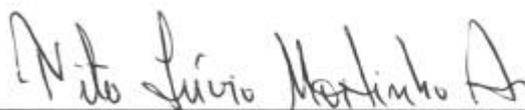


CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* DOS GENES DA ROTA DE  
DEGRADAÇÃO DE CARBAZOL DE *Pseudomonas stutzeri*

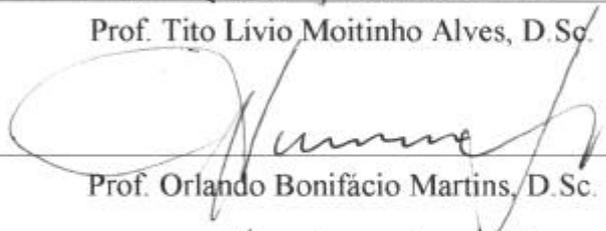
Ariane Leites Larentis

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS  
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS  
EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:



Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D.Sc.



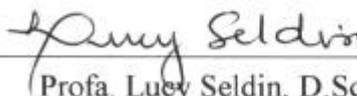
Prof. Orlando Bonifácio Martins, D.Sc.



Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Junior, Dr. Ing.



Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.



Prof. Lucy Seldin, D.Sc.



Prof. Rodolpho Mattos Albano, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JULHO DE 2005

LARENTIS, ARIANE LEITES

Clonagem e Expressão em *Escherichia coli*  
dos Genes da Rota de Degradação de Carbazol  
de *Pseudomonas stutzeri* [Rio de Janeiro] 2005

X, 198 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,  
Engenharia Química, 2005)

Tese – Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, COPPE

1. DNA Recombinante
2. Desnitrogenação de Petróleo
3. Biorrefino
4. Bioprocessos

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*"Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar o nosso destino se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais. É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho; de examinar com atenção a vida real; de confrontar nossa observação com nosso sonho; de realizar escrupulosamente nossa fantasia. Sonhos, acredite neles". Lênin.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Tito e Orlando. Ao Rodrigo, Welington, Alex e Shaila pelas modelagens, pelas discussões acaloradas, ensinamentos, almoços, ajuda na bancada e pela purificação da proteína... e a todos também pela amizade.

À Luisa, Rebeca, Kahune, Haryana, Ailton, Sylvia, Márcio, Ricardo, seu João, Clara, Tiago, pela ajuda no LBM. Aos demais alunos e professores dos laboratórios do Pedro, Sorgine, Gaby, Eleonora, Mônica, Marcus, Aurélio. Também aos colegas do Laboratório de Bioprocessos. À Helen e à Candida, amigas sempre prontas a ajudar.

Ao Instituto de Bioquímica Médica, que abriu suas portas para que eu desenvolvesse esta tese e ao Programa de Engenharia Química/COPPE, cujos colegas, professores e funcionários deram sempre o suporte necessário. À Maysa Clementino, Ivano de Filippis e ao Laboratório de Materiais de Referência/INCQS/Fiocruz pela caracterização da cepa. Aos Laboratórios de Genoma do IBqM/UFRJ e Departamento de Bioquímica/UERJ pelos seqüenciamentos. Aos Profs. Ângela Uller/COPPE e Alexandre Leiras/EQ pela ajuda com as características e tecnologia de petróleo. Ao Prof. Paulo Bisch/IBCCF, pelo suporte na Modelagem por Homologia. Ao Iuri, Luciano e Roberto (LABEK) pela ajuda nos cálculos de áreas dos géis de proteínas.

Aos membros da banca por participarem desta reta final do trabalho (a Alice há algum tempo!). E aos pesquisadores do CENPES/Petrobras, que aceitaram a parceria para continuar este trabalho.

Aos meus pais, Vera e Carlos, irmãs, Carla e Naiara, avós, tios, dindos, afilhada, primos, que mesmo longe (em Porto Alegre, em Bento, no Sul...) estiveram sempre por perto (por telefone, por e-mail, em pensamento...). Aos amigos de POA, que muitas vezes vieram ao Rio e eu nem sempre consegui encontrar.

Aos amigos que fiz na Associação de Pós-Graduandos da UFRJ, nos Conselhos onde fui representante discente, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, que me recebeu tão bem e anda tão precisada de mais verbas...

Ao meu querido Marcelo, que tem me dado força em todas as horas. Aos companheiros do CeCAC, por me ajudarem a ter a certeza de que lutar é a melhor escolha que podemos fazer na nossa vida.

Enfim, aos amigos do Rio (cariocas, de todo o Brasil e também de fora), que são pessoas maravilhosas e que não poderia escrever sobre todos porque a tese iria aumentar muito mais...

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* DOS GENES DA ROTA DE  
DEGRADAÇÃO DE CARBAZOL DE *Pseudomonas stutzeri*

Ariane Leites Larentis

Julho/2005

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Orlando Bonifácio Martins

Programa: Engenharia Química

A biodegradação de carbazol, composto nitrogenado presente nas frações pesadas do petróleo brasileiro, vem sendo pesquisada, uma vez que este composto está associado à emissão de NO<sub>x</sub> e à desativação dos catalisadores de refino. Sua conversão a ácido antranílico (que apresenta menor afinidade pelos sítios ácidos dos catalisadores) em *Pseudomonas* sp. é catalisada por três complexos enzimáticos (que foram modelados por homologia): carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA), 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarB) e hidrolase (CarC), codificadas por oito genes localizados em um operon de 5,8kb. O emprego destas enzimas superexpressas em microorganismos recombinantes é de interesse na área de biorrefino, pois pela obtenção de maior quantidade de proteínas em relação ao sistema selvagem, pode-se obter um aumento nas taxas de degradação. Desta forma, os genes de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 foram clonados separadamente empregando sistema de recombinação sítio-específica e as enzimas foram expressas de forma nativa em *Escherichia coli* BL21-SI, com indução por NaCl. A degradação de 20ppm de carbazol por CarA foi verificada após 15h a 30°C em Tris-HCl 50mM (pH 7,5), Fe(II), NADH e FAD, com grande sensibilidade às condições de expressão. Foi obtida uma taxa de 0,53 (µmoles.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) para CarB e, para CarC, de 1,09 (µmoles.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), a 35°C no mesmo tampão. As atividades foram medidas, respectivamente, pela produção e consumo do composto amarelo HOPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienóico) a partir de 100µM do substrato de cada reação, em células íntegras, sem a necessidade de uso de cofatores.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

CLONING AND EXPRESSION IN *Escherichia coli* OF THE GENES INVOLVED IN THE CARBAZOLE DEGRADATION PATHWAY FROM *Pseudomonas stutzeri*

Ariane Leites Larentis

July/2005

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Orlando Bonifácio Martins

Department: Chemical Engineering

The biodegradation of carbazole found in Brazilian oils has been widely investigated, in particular in the last decade, due to the nitrogen oxide emission and poisoning of refining catalysts. The carbazole degradation pathway to anthranilic acid (a compound that has lower affinity for the acid sites of the refining catalysts) in *Pseudomonas* sp. is performed by three enzymatic complexes (modeled by homology in this work): carbazole 1,9a-dioxygenase (CarA), 2'-aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase (CarB) and hydrolase (CarC), encoded by eight genes in a 5.8kb operon. The employment of these enzymes overexpressed in recombinant microorganisms is a strategy of current great biotechnological interest in the biorrefin field because of the enhancement of protein production in comparison to the wild system, which can also improve the degradation rates. Therefore, the genes that encode the enzymes from the carbazole-degrading bacteria *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 were separately cloned by site-specific recombination system and expressed in native form in *Escherichia coli* BL21-SI, by NaCl induction. The degradation of 20ppm of carbazole by CarA was detected after 15 hours at 30°C in Tris-HCl 50mM (pH 7.5) with Fe(II), NADH and FAD. Enzyme susceptibility for expression conditions was verified and optimized by experimental design technique. The measured activity rate was 0.53 ( $\mu\text{mol.mg protein}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) for CarB, and for CarC, 1.09 ( $\mu\text{mol.mg protein}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), at 35°C using the same buffer. The activities were measured, respectively, by the production and consumption of the yellow compound HOPDA (2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid) from 100 $\mu\text{M}$  of substrate for each reaction, in resting cells system, without the requirement of cofactors.

## ÍNDICE

<b><u>1 INTRODUÇÃO</u></b>	<b>1</b>
Objetivos	10
<b><u>2 REVISÃO DA LITERATURA</u></b>	<b>12</b>
2.1 Degradação microbiológica de carbazol	12
2.2 Rota de degradação de carbazol	18
2.3 Operons de degradação de carbazol	20
2.4 Enzimas e genes do operon <i>car</i> da rota de degradação do carbazol	26
2.4.1 Carbazol dioxigenase (CarA)	27
2.4.2 Dioxigenase de <i>meta</i> -clivagem (CarB)	35
2.4.3 HOADA hidrolase (CarC)	39
2.4.4 Antranilato dioxigenase (AntABC)	43
<b><u>3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</u></b>	<b>44</b>
3.1 Caracterização e cultivo de <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 31258	46
3.2 Extração do DNA de alto peso molecular	47
3.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	49
3.3.1 Quantificação de DNA genômico para amplificação por PCR	52
3.3.2 Identificação do 16S rRNA	52
3.3.3 Desenho dos oligos para amplificação dos genes do operon <i>car</i>	55
3.3.4 Condições empregadas para amplificação dos genes do operon <i>car</i>	58
3.4 Purificação dos produtos de PCR	59
3.5 Clonagem	60
3.5.1 Sistema de clonagem por Recombinação sítio-específica	60
3.5.2 Sistema de clonagem empregando Topoisomerase	62
3.5.3 Condições empregadas na clonagem	62
3.5.4 Vetores empregados	64
3.6 Preparação de células eletrocompetentes	65
3.7 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	66
3.7.1 Determinação das melhores condições de eletroporação e de competência	66
3.7.2 Condições de eletroporação empregadas	67
3.8 Seleção dos clones e propagação de plasmídeos	68
3.9 Extração de DNA plasmidial (Mini-Preparação)	69
3.10 Estoques de glicerol e stabs para manutenção dos clones	69
3.11 Confirmação dos clones	70
3.11.1 PCR	70
3.11.2 Digestão com enzimas de restrição	70
3.11.3 Seqüenciamento	71
3.12 Expressão das proteínas em <i>Escherichia coli</i>	72
3.12.1 Indução das enzimas recombinantes com IPTG em <i>Escherichia coli</i> DH10B	73

3.12.2	Indução das enzimas recombinantes com NaCl em <i>Escherichia coli</i> BL21-SI	73
<b>3.13</b>	<b>Planejamento Experimental e Modelagem Empírica</b>	<b>74</b>
3.13.1	Planejamento experimental para otimização da expressão das subunidades de CarA	77
<b>3.14</b>	<b>Preparação dos extratos celulares</b>	<b>79</b>
<b>3.15</b>	<b>Purificação de enzima expressa com cauda de histidina</b>	<b>79</b>
<b>3.16</b>	<b>Análise e quantificação das proteínas expressas por SDS-PAGE</b>	<b>80</b>
<b>3.17</b>	<b>Testes de biodegradação e medidas de atividade enzimática</b>	<b>80</b>
3.17.1	Preparação de <i>resting cells</i>	81
3.17.2	Testes de biodegradação de carbazol por CarA	81
3.17.3	Testes de biodegradação e medidas de atividade de CarB e CarC	82
3.17.4	Determinação de volume (concentração celular) empregado no sistema de <i>resting cells</i> para ser usado nas medidas de atividade de CarB e CarC	83
<b>3.18</b>	<b>Modelagem por Homologia</b>	<b>84</b>
3.18.1	Seleção de moldes	86
3.18.2	Alinhamentos	87
3.18.3	Modelagem Comparativa	87
3.18.4	Validação dos modelos	87
<b><u>4</u></b>	<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização de <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC31258/ INCQS00520</b>	<b>90</b>
4.1.1	Cultivo de <i>Pseudomonas stutzeri</i> em carbazol	93
<b>4.2</b>	<b>Amplificação dos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)</b>	<b>94</b>
4.2.1	Extração do DNA de alto peso molecular	94
4.2.2	Identificação do 16S rRNA	95
4.2.3	Amplificação dos genes de degradação de carbazol	97
4.2.4	Amplificação do operon <i>car</i> completo de degradação de carbazol	100
<b>4.3</b>	<b>Clonagem</b>	<b>100</b>
4.3.1	Clonagem com cauda de histidina	101
4.3.2	Clonagem das enzimas na forma nativa	104
<b>4.4</b>	<b>Expressão</b>	<b>111</b>
4.4.1	Indução de <i>Escherichia coli</i> DH10B com IPTG	111
4.4.2	Indução de <i>Escherichia coli</i> BL21-SI com NaCl	111
4.4.3	Otimização da expressão de CarAa e CarAcAd	114
4.4.4	Purificação da enzima expressa com cauda de histidina	120
<b>4.5</b>	<b>Caracterização das enzimas de <i>Pseudomonas stutzeri</i></b>	<b>122</b>
4.5.1	Carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA)	122
4.5.2	Dioxigenase de <i>meta</i> -clivagem (CarB)	141
4.5.3	HOADA hidrolase (CarC)	158
<b><u>5</u></b>	<b><u>DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS</u></b>	<b>169</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>181</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

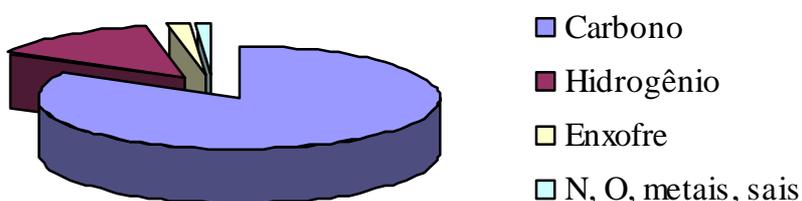
° API	medida da densidade de petróleo e derivados definida pelo <i>American Petroleum Institute</i>
BDN	biodesnitrgenaco
BDS	biodessulfuraco
BLASTP	<i>Basic Local Alignment Search Tool-Protein-Protein</i>
CG	cromatografia gasosa
DBT	dibenzotiofeno
2,3-DHBP	2,3-dihidroxibifenil
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	cido desoxirribonucléico
EBC	<i>Energy BioSystems Corporation</i>
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
FAD	flavina adenina dinucleótido
FID	detector de ionizaco de chama
FMN	flavina mononucletido
GST	glutathiona S-transferase
2-HBP	2-hidroxibifenil
HDA	hidrogenaco de aromáticos
HDM	hidrodesmetalizaco
HDN	hidrodesnitrgenaco
HDO	hidrodesoxidaco
HDPNA	hidrogenaco de aromáticos polinucleares
HDS	hidrodessulfuraco
HDT	hidrotratamento
HOADA	cido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico
HODA	semialdeído 2-hidroximucnico
HOHDA	cido 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienóico
HOHPDA	cido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-hidroxifenil)-hexa-2,4-dienóico
HOPDA	cido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienóico
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	NAD-reduzido
NO <sub>x</sub>	xidos de nitrogênio
NTA	níquel nitrilotriacetato
ORF	quadro aberto de leitura ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Gel de Eletroforese Desnaturante de Poliacrilamida
PCR	Reaco em Cadeia da Polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
ppm	partes por milhão (1 ppm = 1 mg/L e 1000 ppm = 0,1 %)
RMS	<i>root mean square</i>
RNA	cido ribonucléico (rRNA = RNA ribossomal e tRNA = RNA transportador)
rpm	rotaoes por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SO <sub>x</sub>	xidos de enxofre
TCA	ciclo do ácido tricarbxlico
ufc	unidades formadoras de colônias
UV	radiao na região do ultravioleta do espectro eletrônico

## LISTA DE SÍMBOLOS

$A_{600}$	concentração celular medida por absorvância a 600nm	adimensional
F	função distância ou objetivo	adimensional
$k_{cat}$	taxa enzimática máxima (substrato em concentrações saturantes)	tempo <sup>-1</sup>
$k_{cat}/K_m$	constante de especificidade da enzima	concentração <sup>-1</sup> .tempo <sup>-1</sup>
$K_m$	constante de Michaelis-Menten	concentração
$K'_m$	$K_m$ no modelo de inibição não competitiva pelo substrato	concentração
$K_s$	constante associada à inibição pelo substrato	concentração
$l_i$	níveis ou condições experimentais da variável independente	adimensional
NE	número de experimentos do plano experimental	adimensional
NP	número de parâmetros do modelo	adimensional
NR	número de réplicas	adimensional
NX	número variáveis independentes	adimensional
$p_i$	parâmetro do modelo empírico	adimensional
$S_{max}$	concentração máxima de substrato	concentração
T	temperatura de indução	°C
t	tempo de indução	h
$t_1, t_2$	tempo de medida usado nos cálculos de taxas de reação	s
$V_{max}$	velocidade máxima da reação	moles/tempo
$x_i$	variável de processo experimental	-
$x_{i, \text{normalizado}}$	variável de processo normalizada	adimensional
$y_i$	variável de resposta experimental	-
$y_i^c$	variável de resposta calculada pelo modelo	-

# 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é uma mistura heterogênea de moléculas orgânicas, contendo hidrocarbonetos alcanos e aromáticos, de 1 a 60 carbonos, muitos formados por heteroátomos como nitrogênio, enxofre, oxigênio e metais. A variação da composição e das características físico-químicas de petróleo é bastante considerável de um campo para outro, mas uma composição média de óleos crus é formada por 84% de carbono, 14% de hidrogênio, 1-3% de enxofre, além de nitrogênio, oxigênio, metais e sais, cada um destes correspondendo a menos de 1%.



**Figura 1.1** Composição média dos óleos crus em termos de C, H, S, N, O e metais.

De acordo com a proporção de hidrocarbonetos similares, os petróleos são geralmente classificados em óleos parafínicos (cadeias do tipo  $C_nH_{2n+2}$ ), naftênicos (compostos cíclicos saturados do tipo  $C_nH_{2n}$ ) ou aromáticos (compostos cíclicos insaturados) ou misturas de vários tipos.

Em geral o petróleo em todo o mundo contém apreciáveis quantidades de compostos de enxofre, em geral bastante reativos e corrosivos, principalmente nas

frações mais pesadas, na forma de sulfetos (como H<sub>2</sub>S), dissulfetos, mercaptanas, tiofenos, além de enxofre elementar.

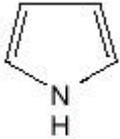
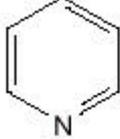
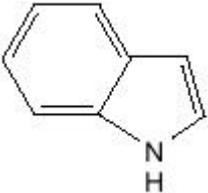
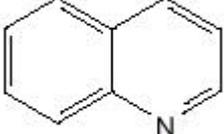
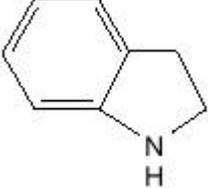
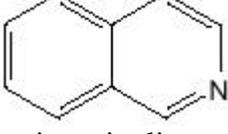
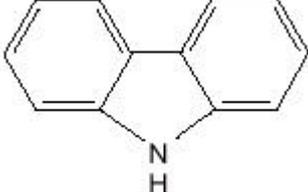
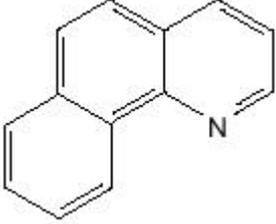
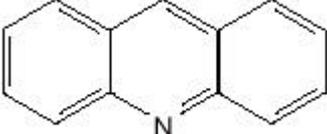
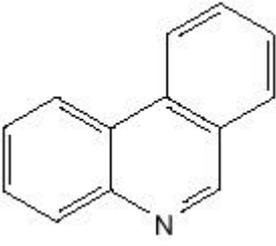
Os compostos oxigenados de petróleo são geralmente fenóis, cetonas e ácidos carboxílicos. Os metais são encontrados sob a forma de traços, incluindo níquel, ferro e vanádio, e os sais mais comuns são NaCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> encontrados em suspensão ou dissolvidos.

Os compostos nitrogenados, que compõem cerca de 0,3% do petróleo, geralmente são encontrados nas frações mais pesadas sob a forma de moléculas com propriedades não-básicas/neutras (como pirrol, indol e carbazol, assim como seus derivados, que somam de 70 a 75% dos compostos nitrogenados, muitos associados com metais como cobre, vanádio e/ou níquel) e de moléculas de caráter básico (derivados de piridina e quinolina) nas frações mais leves. O caráter de neutralidade e basicidade destes compostos, definido segundo o conceito de Lewis, é resultante da configuração eletrônica dos anéis aromáticos destas moléculas e da disponibilidade do par eletrônico não-ligado do nitrogênio ao compartilhamento. Em anéis do tipo piridínicos, de seis membros, o par eletrônico não ligado do nitrogênio não participa da nuvem eletrônica do anel  $\pi$  e estes compostos são definidos como bases de Lewis (capazes de compartilhar um par de elétrons). Em compostos que apresentam anéis pirrólicos de cinco membros, em que o nitrogênio está ligado a um átomo de hidrogênio, o par eletrônico está estabilizado pela nuvem do anel aromático e estas moléculas têm caráter neutro.

O carbazol, composto neutro/não-básico encontrado em maior quantidade no petróleo, é uma molécula heterocíclica aromática composta por um sistema dibenzopirrol (SATO *et al.*, 1997a). As estruturas destes compostos estão apresentadas na Tabela 1.1 (BENEDIK *et al.*, 1998, RIBEIRO, 2004).

Na Tabela 1.2 é apresentado um panorama geral das composições de petróleos de diferentes locais do mundo. Como pode ser verificado, o teor de compostos nitrogenados presentes nos óleos brasileiros é significativamente superior aos teores observados nos demais locais analisados.

**Tabela 1.1** Estrutura de compostos aromáticos comumente presentes em petróleo e que contêm o heteroátomo nitrogênio (BENEDIK *et al.*, 1998, RIBEIRO, 2004).

Compostos não-básicos/neutros (anel de cinco membros contendo NH)	Compostos básicos (anel de seis membros contendo N)
	
pirrol	piridina
	
indol	quinolina
	
indolina	isoquinolina
	
carbazol	benzoquinolina
	
	acridina
	
	fenantridina

**Tabela 1.2** Principais características de algumas bacias de petróleo no mundo. Os dados do Campo Marlim e Cabiúnas (RJ) foram disponibilizados pelo CENPES/Petrobras e os demais foram retirados do sítio da ChevronTexaco, <http://www.chevron.com/crudemarketing/>. Grau API é uma medida da densidade de petróleo e derivados definida pelo *American Petroleum Institute* (quanto menor a densidade do petróleo, maior seu grau API).

Características	Brent (Mar do Norte)	Venezuela Leve (Hamaca)	Ásia Leve (Thevenard Island)	Nigéria Leve	Nigéria Pesado	Kuito (Angola)	Marlim (RJ)	Cabiúnas (RJ)	Árabe Leve
° API	37	24	40,7	36	34	19,0	19,7	24,7	33,3
Parafinas (% vol)	50	52	-	37	63	-	-	-	-
Aromáticos (% vol)	16	14	-	9	19	-	-	-	-
Naftenos (% vol)	34	34	-	54	18	-	-	-	-
Enxofre (% peso)	0,4	1,5	0,03	0,2	2	0,68	0,75	0,47	1,63
Nitrogênio (% peso)	0,104	-	0,01	0,13	-	0,47	0,45	0,27	0,09
Vanádio (ppm)	7,1	152	<0,1	0,5	-	35	24	12	14
Níquel (ppm)	1,4	42	1	5	-	45	19	9	3,5
Ferro (ppm)	-	13	-	0,5	-	-	-	-	-
Acidez (mg KOH/g)	0,05	0,7	0,04	-	-	2,1	1,01	0,83	0,08
Asfaltenos (% peso)	-	-	-	-	-	-	2,6	2,8	1,1

Os compostos contendo átomos de enxofre e nitrogênio encontrados em muitos combustíveis fósseis além do petróleo, quando são queimados levam à formação e emissão de uma série de compostos óxidos. Os óxidos, do tipo  $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_x$ , são altamente poluentes e estão envolvidos na produção de chuvas ácidas (BENEDIK *et al.*, 1998), além de serem capazes de catalisar a destruição da camada de ozônio, através da conversão de  $\text{O}_3$  em  $\text{O}_2$ . Além de serem poluentes ambientais, estes compostos aromáticos são mutagênicos, tóxicos e de difícil remoção (OUCHIYAMA *et al.*, 1993).

Diante deste problema ambiental, alternativas vêm sendo bastante discutidas, como a substituição da matriz energética de petróleo para combustíveis menos poluentes de fontes renováveis (emprego de biomassa para produção de etanol, gás natural, biodiesel) ou a remoção destes componentes contaminantes do petróleo, através da inovação dos processos de refino. Como o petróleo ainda deve demorar a ser substituído, seja pela grande quantidade de reservas ainda disponíveis no mundo, seja pela sua importância geo-político-econômica na conjuntura mundial atual, os processos de remoção de compostos com N, S, O e metais são relevantes economicamente. Além disso, avanços na legislação ambiental, com exigências maiores do controle da emissão de poluentes foram obtidos na última década, de centenas para dezenas de ppm dos heteroátomos até 2005 (LANGE E PACHECO, 1999, HOPKIN, 2005). A partir dos acordos para redução destas emissões (como o Protocolo de Kyoto), principalmente nos países com maior industrialização (que são os maiores responsáveis pela emissão destes poluentes) houve maior impulso para estudos de processos para remoção de compostos indesejáveis em petróleo.

Atualmente, a redução da quantidade de compostos presentes em petróleo, contendo heteroátomos (S, N, O, metais), é realizada pelo emprego de hidrogenação, na presença de um catalisador (geralmente Ni-Mo ou Co-Mo) em condições de operações com altas temperaturas (300 a 400°C) aliadas a altas pressões. Este processamento químico é chamado de hidrotreatamento (HDT), em que praticamente não ocorre formação de compostos mais leves, e inclui os processos de remoção de enxofre por hidrodessulfuração (HDS), remoção de N por hidrodesnitrogenação (HDN), eliminação de oxigênio por hidrodesoxidação (HDO), remoção de metais por meio da reação de hidrodesmetalização (HDM), hidrogenação de aromáticos (HDA) e de aromáticos polinucleares (HDPNA).

Além dos efeitos ambientais provocados pela presença de compostos com heteroátomos no petróleo, eles afetam economicamente o processo de refino do petróleo, assim como a qualidade dos produtos dele derivados (BENEDIK *et al.*, 1998). A remoção de 90% do nitrogênio presente no petróleo, por exemplo, é capaz de resultar em um aumento de rendimento em gasolina acima de 20%, além de aumentar a vida útil dos catalisadores de refino. Os compostos não-básicos, como carbazol, são convertidos em derivados básicos durante o craqueamento de petróleo (processo de quebra de compostos com hidrogênio mediante uso de catalisadores óxidos metálicos e sulfetos suportados em materiais ácidos), sendo adsorvidos nos sítios ativos ácidos dos catalisadores de refino e atuando como "venenos", resultando na sua desativação e no decréscimo do rendimento do processamento (LI *et al.*, 2004). Além disso, H<sub>2</sub>S, S, mercaptanas, NH<sub>3</sub> e cianetos provenientes da decomposição de compostos nitrogenados, ácidos naftênicos, além de derivados dos sais (HCl e NH<sub>4</sub>Cl) promovem a corrosão dos equipamentos de refino, armazenagem e tubulações e atuam também como inibidores da hidrodessulfuração (HDS), processamento utilizado para a retirada de enxofre com intuito de atingir os limites permitidos pelas legislações ambientais (BENEDIK *et al.*, 1998). Ou seja, mesmo com a atual situação em que alguns dos principais países industrializados, em especial os EUA, não assinaram o Protocolo de Kyoto e outros não têm cumprido suas metas de redução das emissões poluentes, o desenvolvimento de processos de refino visando à redução de compostos com heteroátomos é uma necessidade do próprio processamento catalítico do petróleo (LI *et al.*, 2004).

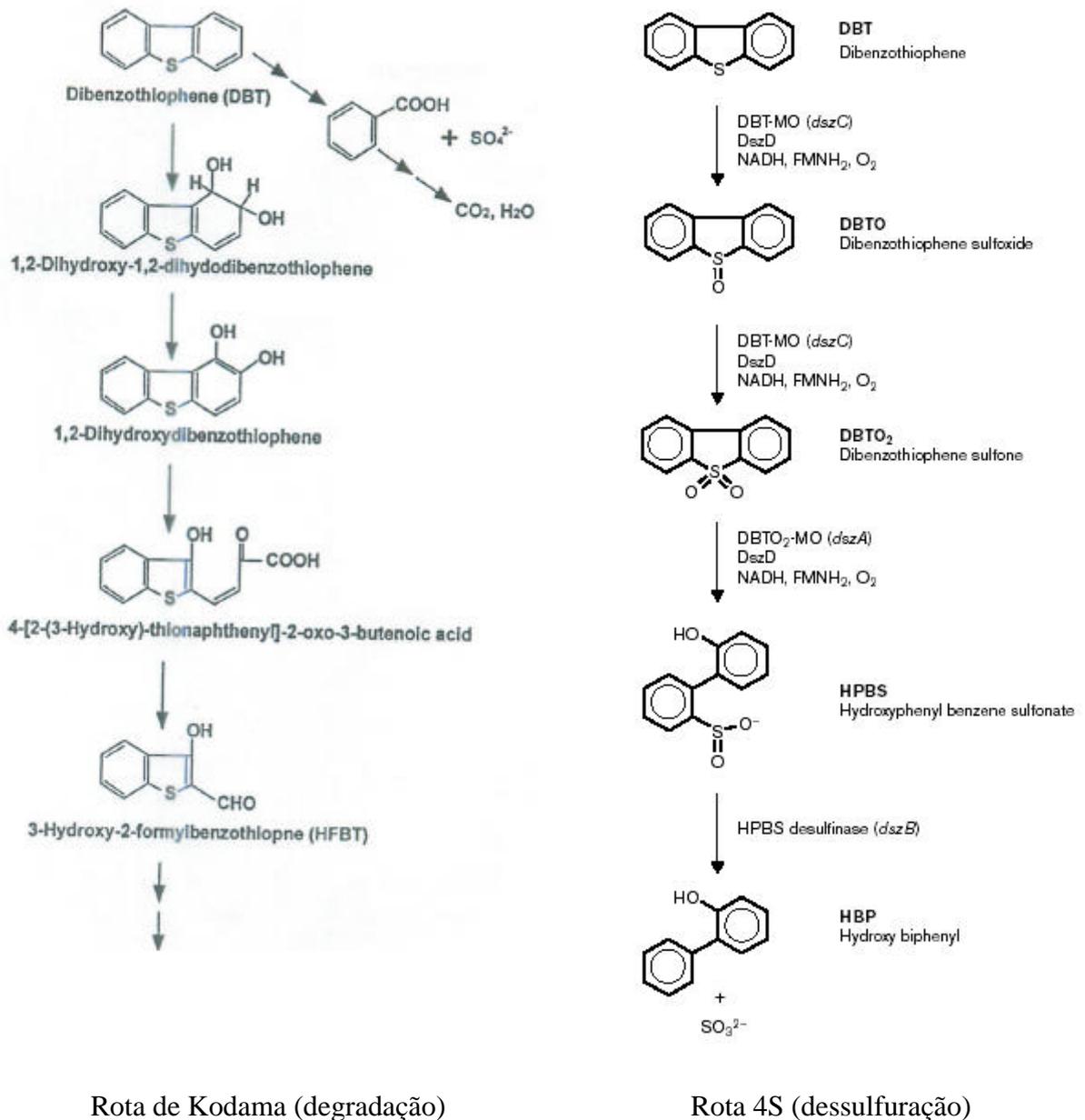
Existe na natureza uma grande variedade de microorganismos capazes de empregar compostos orgânicos e aromáticos, que contenham nitrogênio, enxofre, oxigênio e/ou metais, como fonte de carbono e energia para seus metabolismos. Por este motivo é de grande interesse biotecnológico a aplicação de rotas metabólicas na biodegradação (mineralização) destes compostos presentes em petróleo e outros combustíveis. Neste sentido, o emprego de microorganismos para remoção desses compostos por biorrefino/biorremediação, comparativamente à tecnologia HDT, poderia ser uma alternativa mais econômica, empregando pressões e temperaturas de operação significativamente menores, reduzindo as emissões de CO<sub>2</sub> e eliminando o uso de hidrogênio (LANGE E PACHECO, 1999, RIBEIRO, 2004). Além das condições brandas de processo, a especificidade das reações, devido à seletividade das reações enzimáticas, é também uma característica que atrai para o emprego de biorrefino, uma

vez que não ocorrem degradações significativas de outros componentes da matriz energética, como ocorre com refino catalítico por HDT (BENEDIK *et al.*, 1998, LANGE E PACHECO, 1999).

Apesar dos processos de HDT serem altamente dispendiosos, perigosos e exigirem condições mais drásticas quanto maiores as concentrações de compostos nitrogenados presentes (RIBEIRO, 2004) e de afetarem muitos outros constituintes do petróleo (BENEDIK *et al.*, 1998), as taxas de conversão dos catalisadores inorgânicos empregados nestes processos são muito mais altas do que as dos biocatalisadores. Para efeitos de comparação de dados de catalisadores atualmente em desenvolvimento para degradação de carbazol em petróleo, o tempo de conversão total de carbazol em contato com carbeto de molibdênio foi de segundos em condições de 300 a 360°C e 6MPa (aproximadamente 60atm) (SZYMAŃSKA *et al.*, 2003) e de algumas poucas horas para emprego da rota de degradação de *Pseudomonas*, em temperatura e pressão ambientes (RIDDLE *et al.*, 2003a). Atualmente, a alternativa proposta para viabilizar a utilização de biorrefino em larga escala é o seu acoplamento às unidades de hidrotreatamento e craqueamento de petróleo, similar ao que é proposto para os processos de biodessulfuração (BDS) (MONTICELLO, 1994, LANGE E PACHECO, 1999, KILBANE II, 2004), além do desenvolvimento de processos que permitam a obtenção de co-produtos químicos, como surfactantes, adesivos, resinas e solventes derivados dos compostos aromáticos (LANGE E PACHECO, 1999).

O emprego de rotas metabólicas para degradação de enxofre, presente em combustíveis fósseis na forma de compostos aromáticos, piritas, H<sub>2</sub>S e outros, já é realizada em termos comerciais (BENEDIK *et al.*, 1998, RIBEIRO, 2004), provavelmente porque este problema seja mais abrangente no mundo do que a presença de compostos nitrogenados. Para o composto dibenzotiofeno (DBT), um análogo de carbazol, mas com a presença de S no lugar de N, existem muitas rotas de microorganismos estudadas, como a rota de Kodama (que produz hidrocarbonetos que contém óxidos de enxofre, provocando problemas de disposição e perda de qualidade do combustível) e a rota 4S (na qual o átomo de enxofre sofre sucessivas oxidações, liberando sulfato, que pode ser extraído com água sem provocar perda na capacidade calorífica do DBT). A rota 4S foi utilizada como base para os processos já testados comercialmente pela EBC (*Energy BioSystems Corporation*) (KILBANE II, 2004).

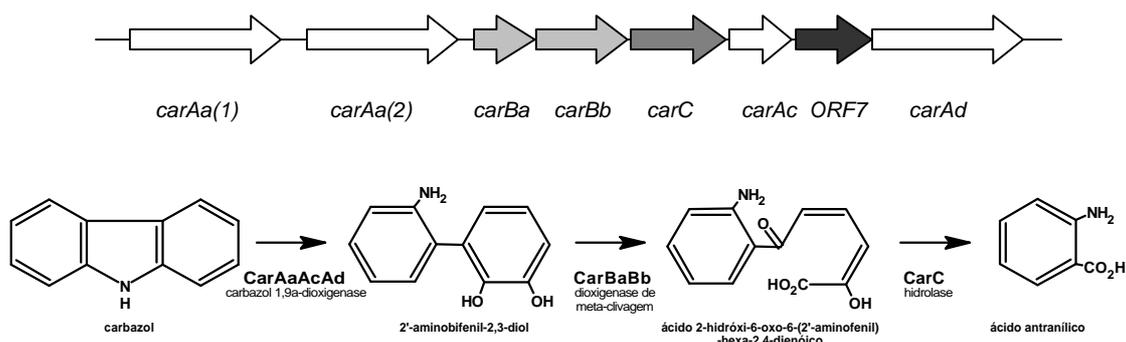
Uma das tendências de pesquisas atuais de biodessulfuração (OHSHIRO E IZUMI, 1999) busca o isolamento de cepas (FURUYA *et al.*, 2001, KILBANE II, 2004), assim como a clonagem de genes e operons de termofílicos, com objetivo de melhorar o rendimento das reações (ISHII *et al.*, 2000). As duas rotas (Kodama e 4S) de degradação de DBT estão apresentadas na Figura 1.2.



**Figura 1.2** Rotas de degradação e dessulfuração microbiológica de DBT (OHSHIRO E IZUMI, 1999).

No caso dos compostos nitrogenados, as pesquisas estão em um grau mais incipiente em comparação com biodegradação de compostos de enxofre, uma vez que o problema do nitrogênio no petróleo é mais regionalizado. As rotas atualmente estudadas para degradação de carbazol lembram a rota destrutiva de degradação de DBT estudada por Kodama, ou seja, podem provocar perda no poder combustível do carbazol (BENEDIK *et al.*, 1998), devido ao consumo de carbono e nitrogênio para o crescimento da bactéria, apesar destes compostos computarem apenas uma pequena parte dos óleos. Para tornar-se economicamente viável, a desnitração destes compostos de petróleo pode ser feita de forma integrada à biodessulfuração, e também na síntese de compostos de química fina derivados destes compostos nitrogenados, como plásticos e fármacos (OUCHIYAMA *et al.*, 1993). Derivados de carbazol e de seus produtos de degradação apresentam importância terapêutica bem estabelecida. Piridocarbazóis tetracíclicos apresentam propriedades anticâncer e compostos heterocíclicos contendo grupos pirróis apresentam atividades antitumorais, antiinflamatórias, antibacterianas e antifúngicas (BALAMURALI E RAJENDRA PRASAD, 2001). Além disso, as mesmas rotas utilizadas na degradação de compostos padrões, como carbazol e DBT, podem ser empregadas no biorrefino de outros compostos com N e S presentes petróleo, devido à relativa abrangência de substratos que estas enzimas são capazes de degradar, e também apresentam potencial para aplicação para biorremediação de ambientes contaminados por poluentes químicos (LANGE E PACHECO, 1999, WACKETT, 2002).

A biodegradação de carbazol, principal composto nitrogenado não-básico do petróleo, vem sendo bastante estudada na última década, tendo sido descritas na literatura algumas espécies de bactérias capazes de utilizá-lo como única fonte de nitrogênio, carbono e energia, com alta especificidade (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, KIRIMURA *et al.*, 1999, SCHNEIDER *et al.*, 2000), assim como as enzimas e genes envolvidos nas rotas de degradação. Entre eles está o operon *car*, da rota enzimática de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b), descrito na Figura 1.3.



**Figura 1.3** Organização dos genes que codificam as enzimas da rota de degradação de carbazol a ácido antranílico (operon *car*) em *Pseudomonas resinovorans* (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, BENEDIK *et al.*, 1998).

## Objetivos

Este trabalho visou à clonagem dos genes de *Pseudomonas stutzeri* envolvidos na degradação de carbazol a ácido antranílico em *Escherichia coli*, de forma a expressar heterologicamente as enzimas que catalisam estas reações. Os genes foram obtidos empregando a técnica de DNA recombinante a partir da caracterização genética da cepa de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520, uma vez que os resultados de bioinformática indicaram identidade praticamente total entre os genes desta bactéria e os de *Pseudomonas resinovorans*. Especificamente, os objetivos foram clonar cada enzima da rota separadamente, expressar cada subunidade em frascos agitados buscando enriquecer o extrato celular e otimizar as condições quando necessário, testar cataliticamente os sistemas enzimáticos empregando extrato celular e células íntegras (*resting cells*) e, por fim, modelar as estruturas por homologia para auxiliar no entendimento da atuação de cada uma das enzimas.

Os sistemas de expressão heterólogos permitem obter maiores quantidades de biocatalisador de forma controlada e reduzir o tempo necessário para a conversão de carbazol e seus produtos subsequentes, buscando um processo com maior viabilidade. As técnicas de biologia molecular possibilitam realizar a clonagem e a expressão dos genes de degradação de carbazol em *Escherichia coli*, bactéria de fácil crescimento, manipulação e obtenção, usualmente empregada como vetor para superexpressão de proteínas heterólogas (BANEYX, 1999). A utilização de um sistema bem estabelecido

geneticamente como *Escherichia coli* deve-se à facilidade de obtenção de plasmídeos, ao conhecimento de seu funcionamento, limitações, vantagens e de sua não patogenicidade. Além disso, outra vantagem da utilização de *Escherichia coli* é o tempo de crescimento inferior ao das cepas de *Pseudomonas* sp. capazes de degradar carbazol. Desta forma, o objetivo estratégico, ainda não completamente atingido durante o período de realização deste trabalho, é obter um microorganismo recombinante, capaz de degradar carbazol com maior eficiência, visando à sua utilização nos processos de biorrefino, aliando as ferramentas de engenharia de bioprocessos para aumentar o rendimento da produção das enzimas envolvidas na rota de degradação.

A clonagem das três enzimas iniciais da rota de degradação de carbazol, gerando ácido antranílico, é a etapa mais importante, uma vez que este composto, embora ainda contenha o heteroátomo de nitrogênio, apresenta muito menor afinidade pelos sítios ácidos dos catalisadores de refino do petróleo, reduzindo, portanto, sua desativação (RIDDLE *et al.*, 2003a). Como frisado anteriormente, este é um dos efeitos dos compostos nitrogenados presentes em petróleo (BENEDIK *et al.*, 1998). Além disso, permite inferir sobre a potencialidade do emprego das técnicas de DNA recombinante, visando ao desenvolvimento de uma estratégia para a remoção do átomo de nitrogênio.

Para subsidiar a discussão sobre a biodegradação de carbazol, na Revisão de Literatura são apresentadas características das cepas atualmente descritas, assim como seus genes e enzimas. No capítulo de Procedimentos Experimentais foram detalhadas as etapas empregadas na tecnologia de DNA recombinante utilizada na obtenção dos catalisadores recombinantes, cujos Resultados são apresentados no capítulo seguinte. Para finalizar, estes resultados foram discutidos buscando indicar suas principais contribuições e as perspectivas na área, no capítulo Discussão e Perspectivas.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Degradação microbiológica de carbazol**

O estudo de microorganismos capazes de degradar compostos nitrogenados presentes em petróleo e outros combustíveis fósseis é biotecnologicamente interessante, além das aplicações em biorrefino e minimização dos efeitos ambientais por biorremediação, mas também porque muitos derivados dos heteroaromáticos possuem atividades quirais e podem ser empregados como intermediários na obtenção de fármacos enantiomericamente puros e outros produtos de química fina (BENEDIK *et al.*, 1998).

Muitas espécies de *Pseudomonas*, assim como de *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Beijerinckia*, *Mycobacterium*, *Serratia* são capazes de degradar compostos nitrogenados presentes em petróleo, carvão, óleos e outros combustíveis, assim como em águas e solos contaminados, em especial compostos não-básicos, como carbazol. Mecanismos de degradação de outros compostos nitrogenados e derivados, como piridina, quinolina e acridina, têm sido estudados (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, BENEDIK *et al.*, 1998, RIBEIRO, 2004). A maior parte dos mecanismos de degradação de compostos aromáticos necessita de uma etapa inicial aeróbia (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b), embora tenham sido relatados casos de degradação anaeróbia (BENEDIK *et al.*, 1998). É verificado também que as enzimas que degradam hidrocarbonetos não são essenciais para o crescimento dos microorganismos, mas lhes confere maior diversidade metabólica, permitindo sua sobrevivência em nichos ou circunstâncias ambientais específicos. As enzimas destas rotas de degradação podem ser codificadas por genes presentes tanto no genoma dos microorganismos quanto em DNAs plasmidiais (BENEDIK *et al.*, 1998).

Na última década a biodegradação de carbazol tem sido bastante estudada, por diferentes grupos de pesquisa, por ser uma molécula tóxica, carcinogênica, detectada em combustíveis, na atmosfera, em rios, lama, sedimentos e águas poluídas, e de difícil

remoção do petróleo pelos processos químicos de desnitração a que ele é usualmente submetido (GROSSER *et al.*, 1991, KOBAYASHI *et al.*, 1995, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996). Neste sentido, ele é usado como um hidrocarboneto aromático com heteroátomo de N modelo e muitos microorganismos capazes de degradá-lo e utilizá-lo como única fonte de carbono, nitrogênio e energia, têm sido isolados de solos, águas contaminadas, lodos ativados e descritos na literatura. Estas cepas são descritas geralmente como bactérias Gram-negativas, em forma de bastão, não esporulantes e com mobilidade e com especificidade para degradar carbazol e não outros compostos aromáticos (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, HISATSUKA E SATO, 1994, GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, KIRIMURA *et al.*, 1999).

GROSSER *et al.* (1991) isolaram uma cepa identificada como provável *Xanthomonas ampelina* por análise de ácidos graxos, capaz de degradar carbazol com alta especificidade, não sendo verificada a degradação de outros compostos aromáticos, como antraceno, pireno, benzo[*a*]antraceno, dibenzo[*a,j*]acridina e dibenzo[*c,g*]carbazol. Experimentos de degradação de carbazol em solo pela bactéria ( $4.10^7$  ufc/g) mostraram que ela é capaz de transformar cerca de 50% deste composto em CO<sub>2</sub> após 14 dias.

As cepas *Pseudomonas* sp. CA06 e CA10 foram caracterizadas por OUCHIYAMA *et al.* (1993), sendo verificada a formação de ácido antranílico e catecol como os principais metabólitos resultantes da degradação de carbazol, além de outros prováveis produtos de uma oxidação inicial, de uma *meta*-clivagem e de uma *orto*-clivagem de ácido antranílico. Com os resultados obtidos, foi proposta uma rota de degradação de carbazol por estes microorganismos, que é descrita em outros trabalhos como sendo a rota usada também por outras cepas. Estas cepas foram cultivadas em meio contendo 17mM de carbazol, sendo detectado acúmulo de 1,4mM de ácido antranílico e 0,1mM de catecol no meio e, após 140h de incubação, desaparecimento de ácido antranílico. Para concentrações iniciais de carbazol de 5,7mM, ambas as cepas foram capazes de consumi-lo totalmente em 18h. A cepa CA10 também foi capaz de degradar outros compostos aromáticos, como dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos (HABE *et al.*, 2001).

No estudo de HISATSUKA E SATO (1994) foi isolada e patenteada uma cepa Gram-negativa, identificada como *Pseudomonas stutzeri* (depositada sob o código ATCC 31258) que cresce aerobiamente bem em carbazol empregado como única fonte de carbono e nitrogênio. O ácido antranílico, intermediário na biossíntese de L-triptofano, foi identificado como metabólito na degradação de carbazol pela bactéria e verificado seu acúmulo em grande quantidade no meio reacional. Após 4 dias de cultivo a 30°C com 10g/L de carbazol em meio contendo surfactantes não-iônicos, o rendimento de ácido antranílico foi de cerca de 4g/L.

KOBAYASHI *et al.* (1995) identificaram cepas capazes de degradar carbazol em condições microaerófilas (de limitação de oxigênio). Como o transporte e armazenagem de petróleo são feitos em atmosfera de nitrogênio, para evitar explosões, os pesquisadores isolaram as cepas com cultivos em condições microaerófilas empregando N<sub>2</sub>. Foram identificadas oito de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Serratia* sp., incluindo uma bactéria caracterizada como *Escherichia coli*, nomeadas como KUKK-(1 a 8). Nestas condições, em 28 dias e em concentrações iniciais de 1000mg/L de carbazol, as cepas foram capazes de degradar até 30% deste composto.

A bactéria *Pseudomonas* sp. LD2 foi isolada por GIEG *et al.* (1996) e descrita como capaz de degradar 87% de carbazol em 24h, quando a cepa atinge a fase estacionária. Após 96h, não foi mais detectado carbazol no meio, em cultivos a 28°C e meio suplementado com sais minerais sem nitrogênio. Foi detectado um percentual significativo de produção de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> na degradação de carbazol marcado com <sup>14</sup>C (43% em 3 dias, 57% em 7 dias e 70% em 30 dias). Ácido antranílico e catecol também podem ser usados como substratos para a bactéria e foram identificados como intermediários na degradação de carbazol. Por outro lado, a cepa não foi capaz de crescer em outros compostos aromáticos heterocíclicos testados, como benzeno, naftaleno, fenantreno, antraceno, dibenzotiofeno, dibenzofurano e fluoreno. Carbazol foi confirmado como sendo a fonte de nitrogênio porque não foi detectada atividade de nitrogenase no meio.

SHOTBOLT-BROWN *et al.* (1996) identificaram três cepas aeróbias, CB1, CB2 e CB3, caracterizadas presumivelmente como *Burkholderia cepacia*, *Xanthamonas* sp. e *Pseudomonas* sp. respectivamente, capazes de degradar carbazol e outros compostos. Os cultivos foram realizados a 28°C, em meio com DMSO, por 2 a 3 dias. As cepas

CB1 e CB2 necessitaram de vitaminas para crescer em carbazol, o mesmo não ocorrendo para CB3, sendo obtidos resultados similares para as três cepas. Foi verificado que 80% do carbazol foi removido do meio nas primeiras 20h de incubação, sendo confirmado pelo clareamento do meio de cultura, resultando em um aumento de 100 vezes no número de células. A capacidade da cepa de degradar outros compostos aromáticos é limitada, não sendo verificado crescimento em pirrol, L-triptofano, naftaleno, fluoreno, fenantreno ou dibenzotiofeno, com capacidade de degradar benzoato, ácido antranílico, bifenil (no caso de CB2) e catecol (cepas CB1 e CB2). O comportamento da cepa é descrito como similar ao da cepa *Pseudomonas* sp. CA10 (OUCHIYAMA *et al.*, 1993). A cepa CB3 foi posteriormente identificada como *Sphingomonas* (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998).

OUCHIYAMA *et al.* (1998) isolaram a cepa *Pseudomonas stutzeri* OM1, que apresentou rota de degradação de carbazol idêntica à rota das cepas CA06 e CA10, mas com uma via de degradação de catecol diferente. Foi identificada uma enzima dioxigenase com atividade para *meta*-clivagem de anéis aromáticos, capaz de transformar catecol em ácido *cis*, *cis*-mucônico.

Outra cepa de *Sphingomonas* sp., denominada CDH-7 (KIRIMURA *et al.*, 1999) metabolizou carbazol em NH<sub>3</sub> via formação de ácido antranílico. Em cultivo de CDH-7 em 500mg/L (2,99mM) de carbazol foi verificada sua degradação completa em 50h. Ao empregar a técnica de *resting cells*, a mesma concentração desapareceu completamente do meio de cultura em 4h com acumulação de 1,64mM de NH<sub>3</sub>. A degradação empregando *resting cells* é seletiva, ou seja, não foi verificado consumo de outros compostos aromáticos (dibenzofurano, fluoreno, dibenzotiofeno, bifenil) presentes no meio de cultura. Os pesquisadores descrevem que a cepa parece ter a mesma rota proposta para a cepa CA10.

A capacidade de biodegradação de carbazol foi também verificada na bactéria *Ralstonia* sp. RJGII.123, anteriormente *Xanthomonas ampelina* (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Foi verificado que a cepa foi capaz de degradar 80% de 2mg/L, assim como 24% de 500mg/L de carbazol a CO<sub>2</sub> em 15 dias. A identificação de metabólitos intermediários indicou que a cepa apresenta a mesma rota que a das cepas de *Pseudomonas* sp. descritas.

A bactéria *Sphingomonas* sp., cepa KA1, foi isolada e descrita por HABE *et al.* (2002) como capaz de crescer em meio mínimo (contendo íons  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), e carbazol a 0,1% m/v como única fonte de carbono e energia, alcançando um máximo de  $5.10^9$  ufc/mL em 48h. Os testes de especificidade de crescimento da cepa KA1 em diferentes substratos aromáticos mostraram que ela é capaz de crescer bem somente em carbazol e não em dibenzofurano, dibenzo-*p*-dioxina, fluorina, 9-fluorenona, dibenzotiofeno (DBT), bifenil, naftaleno, fenantreno, antraceno, acenaftaleno. A realização de subcultivos da cepa KA1 em caldo nutriente mostrou que cerca de 1 a 2% das células podem perder a habilidade de crescer em carbazol após este procedimento. INOUE *et al.* (2004) verificaram que a indução das enzimas de degradação de carbazol desta cepa é melhorada pela presença deste composto. Eles verificaram que células de KA1 cultivadas em carbazol foram capazes de degradar em 10min cerca de 96% de carbazol (presente no meio como única fonte de carbono, nitrogênio e energia em concentração inicial 0,1% m/v), em comparação com 52% de degradação das células cultivadas em caldo nutriente.

A cepa *Sphingomonas* sp. GTIN11 foi isolada de uma planta de gás manufacturado por KILBANE II *et al.* (2002). Diferentemente de outras cepas descritas na literatura, a cepa GTIN11 expressa as enzimas da rota de degradação de carbazol de forma constitutiva. Esta característica permitiu o crescimento da bactéria em meio rico em nutrientes complexos (composto por polipeptonas, extrato de leveduras e NaCl), com crescimento rápido acoplado às taxas de degradação de carbazol. A cepa cultivada neste meio rico, a 37°C apresentou tempo de geração de 2,1h, na ausência ou presença de carbazol. Nestas condições, a cepa é capaz de degradar carbazol de uma concentração de 1,7 a 0,3mM (82%) em 8h, quando a cepa atinge a fase estacionária de crescimento e pára de metabolizar o composto nitrogenado. Neste trabalho também foi empregada a técnica de *resting cells* para degradação de carbazol, sendo observada atividade específica de 8,0 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  cel. seca), similar à observada na cepa *Sphingomonas* sp. CDH-7. Os autores imaginam que a cepa siga a mesma (ou muito similar) rota que as outras cepas descritas na literatura, pela detecção de alguns metabólitos comuns, como ácido antranílico, anidrido succinato, ácido succínico e ácido fumárico e pela evidência de que ácido antranílico pode ser usado como fonte de carbono para crescimento de *Sphingomonas* sp. GTIN11.

A cepa *Pseudomonas rhodesiae* KK1 (YOON *et al.*, 2002) foi identificada como capaz de degradar carbazol como única fonte de carbono. Foi constatado que células pré-cultivas em fenantreno foram capazes de degradar carbazol mais rapidamente que aquelas pré-cultivadas em naftaleno, sugerindo a existência de uma possível ligação no catabolismo dos dois primeiros compostos.

Uma bactéria Gram-negativa com diferente rota de degradação de carbazol, identificada como *Sphingomonas* sp. CP19, foi isolada por BRESSLER *et al.* (2003). A cepa acumula um metabólito amarelo durante seu crescimento em carbazol (com ou sem a presença de outra fonte de carbono), identificado como 2-amino-fenoxazina-3-ona, derivado de 2-aminofenol. A rota seguida pela cepa, assim como a de outras capazes de degradar carbazol, provoca perda de carbono deste composto.

LI *et al.* (2004) isolaram a cepa *Pseudomonas* sp. XLDN4-9 de solo contaminado e verificaram que a biodegradação de carbazol como única fonte de carbono e nitrogênio foi melhorada na presença de fase líquida não-aquosa. Em uma razão fase orgânica/fase aquosa 1:1 empregando ciclohexano, a taxa máxima de degradação obtida foi de 3,34 (mg carbazol.min<sup>-1</sup>.g cel seca<sup>-1</sup>), com remoção de mais de 60% do carbazol. Empregando sistema de *resting cells* em ciclohexano foi verificada a degradação de 47% de 1g de carbazol em 1h. A adição de solventes (tolueno, xileno, ciclohexano, hexano, heptano, tetradecano) e óleo diesel aumentou consideravelmente a degradação de carbazol.

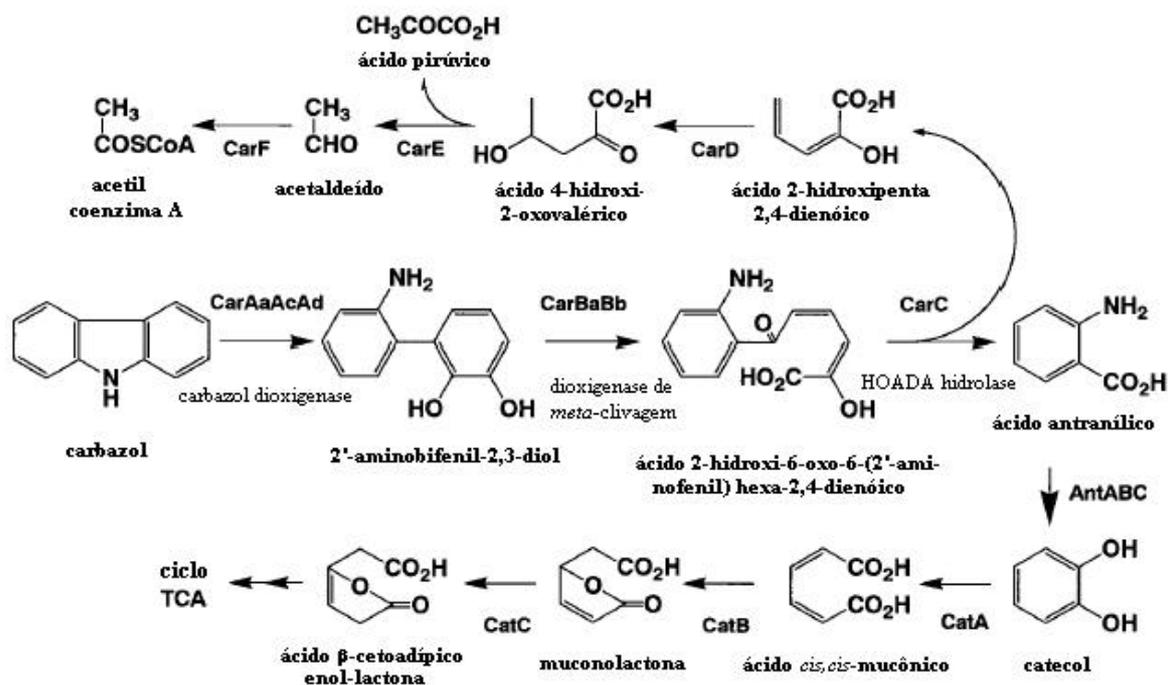
INOUE *et al.* (2005) isolaram várias cepas de diferentes ambientes contaminados, similares às cepas *Pseudomonas resinovorans* CA10, *Sphingomonas* sp. KA1 e CB3, e entre elas, a primeira bactéria Gram-positiva capaz de degradar carbazol, identificada como *Nocardioides* sp. cepa IC177. Esta cepa foi capaz de degradar 18% de carbazol (concentração inicial de 1% m/v) em 4 dias e 80% após 30 dias de crescimento a 30°C e apresentou rota de degradação de carbazol a ácido antranílico similar à rota da bactéria Gram-negativa CA10. Algumas divergências na capacidade de degradação de outros compostos aromáticos foram identificadas entre a cepa IC177 e CA10: ambas foram capazes de degradar ácidos protocatecólico e antranílico, mas somente a primeira foi capaz de degradar dibenzotiofeno-sulfona e antraceno e IC177 não foi capaz de degradar fenol e ácido benzóico.

A cepa Gram-positiva *Gordonia amicalis* F.5.25.8 foi caracterizada por um grupo de pesquisadores do CENPES/PETROBRAS e da UFRJ (SANTOS *et al.*, 2005). A cepa foi descrita como a primeira bactéria capaz de crescer em DBT e em carbazol como fontes de enxofre e nitrogênio, respectivamente. Foi verificada sua capacidade de degradar 40% de carbazol empregando concentração inicial de 3mM por 10 dias a 30°C, separadamente e também com DBT como fonte de enxofre. Foi identificado que a cultura emprega a rota 4S para dessulfuração de DBT.

Os resultados de cultivos destas cepas na degradação de carbazol foram realizados em diferentes concentrações de carbazol, em meio rico, contendo sais sem N, extrato de levedura, pH inicial 7,0 e temperatura de 28 a 30°C. Em alguns trabalhos foi verificado que a eficiência da degradação de carbazol aumenta significativamente quando este aromático é disperso em surfactantes, como polioxietileno, monolaureato glicol e dimetilsulfóxido (DMSO) e n-hexadeceno, pois estes compostos aumentam a solubilização de carbazol, pelo aumento da superfície disponível para biodegradação (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, HISATSUKA E SATO, 1994, KIRIMURA *et al.*, 1999, GIBBS *et al.*, 2003).

## **2.2 Rota de degradação de carbazol**

A rota de biodegradação de carbazol inicialmente proposta por OUCHIYAMA *et al.* (1993) para as cepas CA06 e CA10 de *Pseudomonas* sp., através da identificação dos metabólitos intermediários verificados durante o crescimento da bactéria empregando carbazol como única fonte de carbono, nitrogênio e energia, e em comparação com rotas de degradação de outros compostos aromáticos, como difenil e naftaleno, é apresentada na Figura 2.1. Esta rota é também descrita como a provável via de degradação de carbazol em outras bactérias (GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, KIRIMURA *et al.*, 1999, SCHNEIDER *et al.*, 2000).



**Figura 2.1** Rota completa de degradação do carbazol (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, KIRIMURA *et al.*, 1999, SCHNEIDER *et al.*, 2000, NOJIRI *et al.*, 2001a), onde TCA indica o ciclo do ácido tricarboxílico. Figura baseada em SATO *et al.* (1997b).

A rota proposta (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, BENEDIK *et al.*, 1998) de degradação de carbazol por bactérias tem como etapa inicial a dioxigenação deste composto na posição angular adjacente ao átomo de nitrogênio, convertendo-o a 2'-aminobifenil-2,3-diol. Embora muitas dioxigenases de bactérias venham sendo estudadas há cerca de uma década, a literatura descreve que nem todas estas enzimas são capazes de atacar a ligação adjacente ao átomo de nitrogênio (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b). O composto 2'-aminobifenil-2,3-diol, por sua vez, sofre um ataque na posição *meta* do anel diol por outra dioxigenase, resultando no ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico. Este ácido *meta*-clivado é hidrolisado a ácido antranílico e 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil) hexa-2,4-dienóico. O ácido antranílico produzido é atacado nas posições 1,2 por uma dioxigenase, sendo convertido a catecol, composto que não mais possui nitrogênio. O catecol é metabolizado na rota  $\beta$ -cetoadipato (*orto*-clivagem) pelas proteínas Cat, codificadas pelos genes do operon *cat* (NOJIRI *et al.*, 2002), permitindo sua inserção no ciclo do ácido tricarboxílico

(TCA) da bactéria e sua utilização para obtenção de energia e para seu crescimento. O composto 2-hidroxi-penta-2,4-dienóico também é convertido a um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico por três reações que envolvem *meta*-clivagens. A degradação de carbazol apresenta algumas diferenças em algumas cepas, como a possível formação de ácido indol-3-acético como intermediário em LD2 (GIEG *et al.*, 1996) e a ocorrência de *meta*-clivagem de catecol em OM1, resultando em 2-hidroxi-mucônico semialdeído, que também pode ser intermediário para TCA (OUCHIYAMA *et al.*, 1998).

### 2.3 Operons de degradação de carbazol

A estrutura dos operons que compreendem os genes de degradação de bactérias é resultante dos processos de adaptação dos microorganismos à exposição a compostos tóxicos ou xenobióticos. A análise da sua organização genética permite verificar diferenças entre os genes homólogos, assim como fornece indícios dos processos de recrutamento e rearranjo dos genes envolvidos (INOUE *et al.*, 2004).

As ORFs relacionadas à degradação de carbazol, assim como outros sistemas de degradação de aromáticos, constituem um operon em que o gene regulador ligado ao agregado de genes é transcrito na direção oposta (BENEDIK *et al.*, 1998). A regulação do mecanismo de degradação de carbazol parece estar sujeita à ativação da transcrição dos genes pelo substrato. Embora estas conclusões sejam preliminares (BENEDIK *et al.*, 1998), a detecção da atividade destas enzimas em *Sphingomonas* CB3 só foi possível com crescimento da bactéria em carbazol, e não em acetato ou succinato (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998), indicando uma atividade do operon sob regulação. É descrita na literatura a identificação do operon *car* de degradação de carbazol em *Pseudomonas* sp. CA10 (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b), em *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998) e em *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998). Foi verificada alta homologia (acima de 99%, com diferença de apenas alguns nucleotídeos) entre os genes envolvidos na degradação de carbazol em OM1 e CA10, com oito ORFs e mapa de restrição dos operons muito similares, embora tenham sido isoladas em diferentes locais (OUCHIYAMA *et al.*, 1998). As seqüências do operon *car* de CA10 e CB3, entretanto, apresentam

homologias muito baixas (cerca de 10% entre os genes correspondentes) e o arranjo dos genes no operon é muito diferente, como pode ser verificado na Figura 2.2. Além disso, os genes presentes no operon de 6085bp de *Sphingomonas* CB3 codificam quatro diferentes enzimas, enquanto o operon de *Pseudomonas* sp. CA10 codifica três enzimas. A etapa de conversão de carbazol a 2'-aminobifenil-2,3-diol é realizada por uma dioxigenase em CA10 e catalisada por duas enzimas em CB3 (uma oxigenase e uma desidrogenase). As demais etapas são similares nas duas cepas, catalisadas, respectivamente, por dioxigenases com atividade de *meta*-clivagem e hidrolases. Os pesquisadores que estudam a cepa CA10 de *Pseudomonas* sp. (SATO *et al.*, 1997a, NOJIRI *et al.*, 2001a) verificaram que a quantidade de bases G+C presentes no operon *car* é inferior à quantidade presente no DNA da cepa, o que sugere que estes genes tenham sido obtidos de outro microorganismo. Além disso, o operon *car* está localizado em um megaplasmídeo em *Pseudomonas* sp. CA10 (NOJIRI *et al.*, 2001a). No caso da cepa *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998) o percentual de bases G+C (aproximadamente 61%) dos genes *car* são próximos às quantidades presentes nos genes de outras espécies desta bactéria, inclusive aquelas capazes de degradar compostos aromáticos.

Na cepa *Sphingomonas* KA1 (HABE *et al.*, 2002), foi amplificado um fragmento de gene de 1100pb do operon relacionado com a degradação de carbazol, contendo duas possíveis ORFs, empregando iniciadores da PCR (*primers*) desenhados especificamente para a sequência de *carAa* da cepa CA10 (810pb) e CB3 (918pb). A sequência deduzida de aminoácidos da primeira (ORF1) mostrou 61% de identidade com a componente oxigenase-terminal da carbazol 1,9a-dioxigenase (CarAa), enquanto a sequência de aminoácidos da segunda (ORF2) apresentou 40% de identidade com a menor subunidade da 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarBa) da cepa CA10, ou seja, resultados moderados de homologia. Este resultado revelou que o possível códon ATG de início do gene *carBa* de KA1 ocorre antes do códon de fim do gene *carAa*, o que difere da cepa CA10, que possui um intervalo de 57pb entre as sequências dos dois genes. Além disso, a sequência de aminoácidos da ORF1 não apresentou homologia com a sequência de CarAa da cepa CB3 e 100% de identidade com as regiões CarAa e CarBa da cepa *Sphingomonas* GTIN11, isolada por KILBANE II *et al.* (2002). Os genes relacionados à degradação de carbazol em *Sphingomonas* GTIN11 foram analisados por bioinformática, sendo identificados cinco ORFs, iniciadas por códons ATG ou GTG e

precedidos por potenciais sítios de ligação ribossomais (RBS). Neste trabalho, KILBANE II *et al.* (2002) descrevem que as enzimas envolvidas na degradação de carbazol em GTIN11 apresentam 61% de similaridade com as enzimas presentes em outras cepas capazes de degradar carbazol. Uma diferença significativa desta cepa com relação a outras descritas na literatura é sua capacidade de expressar as enzimas da rota de degradação de carbazol de forma constitutiva.

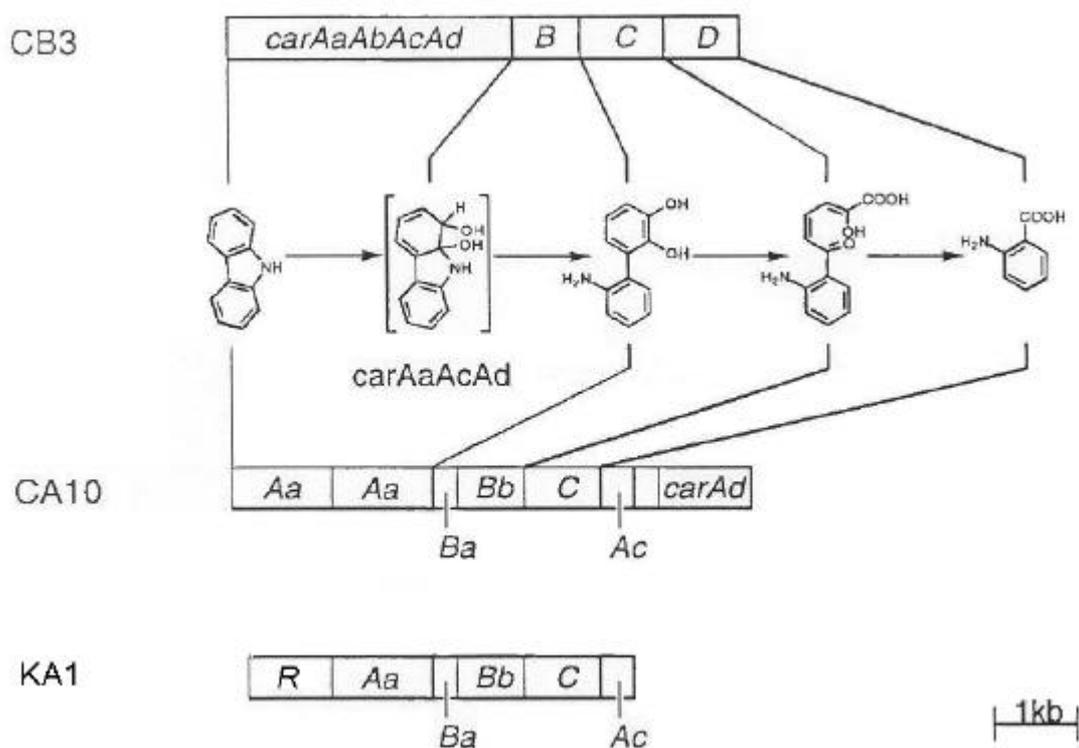
INOUE *et al.* (2004) identificaram que o operon *car* das cepas *Pseudomonas* sp. cepa K23 e *Janthinobacterium* sp. cepa J3, embora com algumas diferenças estão relacionados com a estrutura da cepa *Pseudomonas* sp. CA10. Já o operon de degradação de carbazol da cepa *Sphingomonas* sp. KA1, embora com partes gênicas comuns à CA10, apresenta uma estrutura divergente. Análises das seqüências dos genes mostraram que a cepa K23 apresenta dois operons *car*, um deles com uma cópia do gene *carAa* e outro com o gene duplicado, com regiões vizinhas praticamente idênticas às da cepa CA10 e, diferentemente de ambas, o operon *car* de *Janthinobacterium* sp. não apresenta os genes *carEF*, mas os demais genes *carAaBaBbCAcORF7Ad* com 94% de identidade no nível de aminoácidos com CA10. A componente ferredoxina da carbazol dioxigenase (CarAc) das cepas CA10, K23 e J3 é do tipo Rieske, enquanto a cepa KA1 possui uma ferredoxina do tipo putidaredoxina, que funciona como mediador de elétrons para CarAa. Os genes *carAaBaBbCAc* de *Sphingomonas* sp. KA1 são idênticos aos da cepa GTIN11. Nas regiões localizadas antes dos genes *car* de J3 e KA1, foi identificada uma ORF, de 547pb, denominada *carR*, cuja seqüência deduzida de aminoácidos apresentou homologia com os reguladores da transcrição pertencentes à família GntR. Na cepa KA1, a proteína CarR funciona como repressora na ausência de carbazol e quando este composto está presente liga-se a CarR, resultando na ativação da rota (INOUE *et al.*, 2004). O gene *carR* já havia sido detectado na cepa *Sphingomonas* GTIN11 (KILBANE II *et al.*, 2002), embora com a região 3'-terminal apresente diferenças significativas, possivelmente porque tenha sido corrompido pela inserção da seqüência *IS6100*. Isto sugere que sua capacidade de expressar as enzimas de degradação de carbazol de forma constitutiva seja derivada da interrupção da proteína reguladora (INOUE *et al.*, 2004).

Os genes identificados da cepa Gram-positiva *Nocardioides* sp. IC177 (INOUE *et al.*, 2005) não apresentam alta homologia (mais de 90% de identidade) com os genes das cepas Gram-negativas *Pseudomonas resinovorans* CA10, *Sphingomonas* sp. KA1 e

CB3 e na hibridização com os genes *car* destas cepas foi identificado 51% e 36% de identidade com os genes *carAa* e *carC* homólogos com os da cepa KA1.

Não foi verificada amplificação de genes de *Gordonia amicalis* cepa F.5.25.8 por PCR empregando oligonucleotídeos específicos para *carA*, possivelmente pela ocorrência de rearranjos gênicos, levando a uma organização genética diferente dos genes *car* responsáveis pela degradação de carbazol pela bactéria (SANTOS *et al.*, 2005).

Os operons relacionados à degradação de carbazol (cepas CA10, CB3, KA1) são comparados na Figura 2.2. Verifica-se que a organização dos genes que codificam a enzima que catalisa a primeira etapa da reação é bastante diferente para as cepas CA10 e CB3. O operon da cepa OM1 é praticamente idêntico ao da cepa CA10 (99% de homologia) e o da cepa J3 apresenta 94% de homologia.



**Figura 2.2** Operons de degradação de carbazol da cepa *Pseudomonas* sp. CA10, *Sphingomonas* CB3 e *Sphingomonas* sp. cepa KA1 (modificado de SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998 e INOUE *et al.*, 2004).

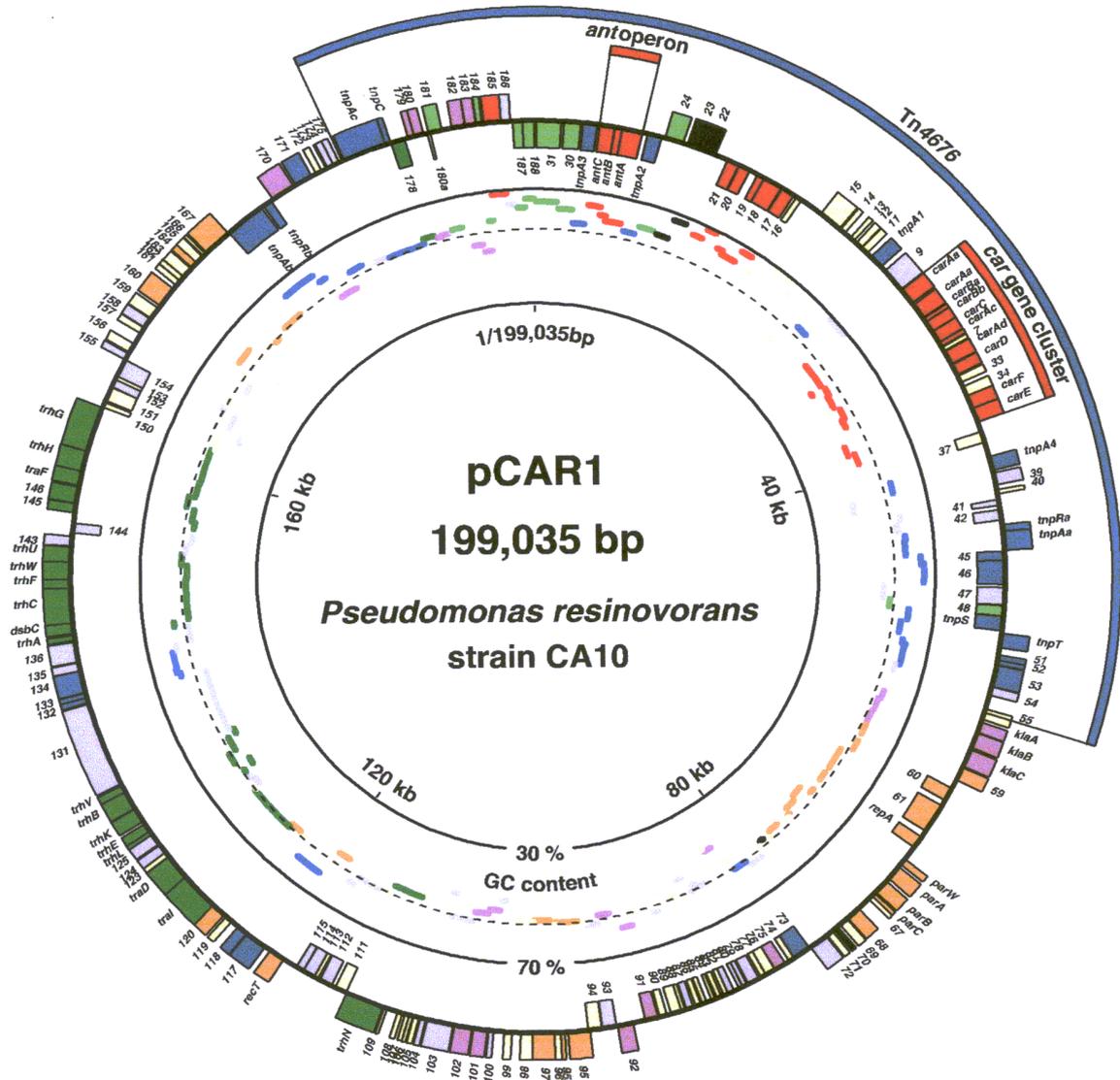
Enquanto as enzimas de degradação de carbazol a ácido antranílico estão presentes no operon *car*, existente em diferentes gêneros de *Pseudomonas* (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998, NOJIRI *et al.*, 2001a), os genes que codificam as enzimas da rota  $\beta$ -cetoadipato formam um conjunto de genes *cat*, presentes no cromossomo da bactéria (NOJIRI *et al.*, 2001a). OUCHIYAMA *et al.* (1998) descrevem que o operon *cat* em *Pseudomonas stutzeri* OM1 é composto por quatro ORFs, sendo que a primeira delas codifica uma ferredoxina e a segunda a enzima responsável pela *meta*-clivagem do anel de catecol. Estes genes foram identificados por NOJIRI *et al.* (2002) como *catR*, *catB*, *catC* e *catA*, o primeiro atuando como um regulador positivo do operon *cat* e as demais codificando as enzimas da rota  $\beta$ -cetoadipato: CatA codifica a catecol 1,2-dioxigenase, CatB uma cicloisomerase e CatC uma isomerase. Os genes *cat* são fortemente induzidos pela ausência da fonte de carbono na cultura e reprimidos pela sua presença, sugerindo que o nível de expressão de *cat* seja controlado por um mecanismo de repressão catabólica.

Em trabalho recente, NOJIRI *et al.* (2001a) sugerem que três ORFs codificam a enzima antranilato 1,2-dioxigenase que promove a reação de ácido antranílico a catecol, *antA*, *antB* e *antC*. Estes genes formam um operon denominado *ant*, que também está localizado no mesmo megaplasmídeo em que está o operon *car* de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (MAEDA *et al.*, 2003).

O mapeamento completo do megaplasmídeo foi determinado por MAEDA *et al.* (2003). Neste plasmídeo, denominado pCAR1, de 199kb, que carrega 190 ORFs, foram identificados genes relacionados à manutenção e processamento de DNA (*repA*, *parWABC*, *recT*), genes para transferência conjugativa (*tra* e *trh*), sugerindo que o plasmídeo seja autotransmissível (INOUE *et al.*, 2004, INOUE *et al.*, 2005), genes de transposição ou integração (*tnp*), transporte, regulação, além de genes relacionados à degradação (*carAaAaBaBbCAcAdDFE* e *antABC*). Todos os genes e ORFs podem ser verificados no mapa do plasmídeo pCAR1 apresentado na Figura 2.3. Segundo dados de MAEDA *et al.* (2003), o plasmídeo é mantido de forma estável na bactéria cultivada em meio rico e cumpre um importante papel na distribuição (ou recrutamento) dos genes *car* na natureza (INOUE *et al.*, 2005).

Os operons *car* das cepas *Sphingomonas* sp. KA1 e GTIN11 também estão localizados em um elemento genético móvel, que pode mediar a transferência lateral de

genes. Foi identificado que estes genes estão localizados em um megaplasmídeo (HABE *et al.*, 2002), denominado pCAR3, de estrutura genética total diferente de pCAR1, mas que ainda está sendo determinada (INOUE *et al.*, 2004).



**Figura 2.3** Mapa circular dos genes do plasmídeo pCAR1 (MAEDA *et al.*, 2003). Genes ou ORFs codificados em sentido horário estão localizados fora do círculo, enquanto aqueles localizados dentro do círculo são codificados em sentido anti-horário. As possíveis funções de cada gene estão descritas por: manutenção e processamento do DNA (laranja), transferência conjugativa (verde escuro), transposição e integração (azul), degradação (vermelho), transporte (verde claro), regulação (preto), outras funções (rosa), funções desconhecidas e com homologia a proteínas hipotéticas (cinza) e sem homologia (amarelo).

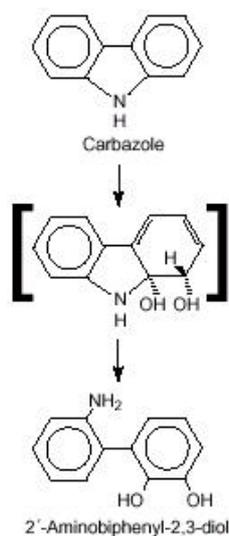
## 2.4 Enzimas e genes do operon *car* da rota de degradação do carbazol

A degradação de carbazol pela cepa CA10 de *Pseudomonas* sp. tem sido bastante estudada (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, NOJIRI *et al.*, 2001a), sendo descrita uma série de enzimas relacionadas à rota de degradação de carbazol e seus respectivos genes, presentes no operon *car* localizado no genoma da bactéria. Três dessas enzimas, CarA, CarB e CarC, e seus respectivos genes, são responsáveis pela reação de degradação completa do carbazol a ácido antranílico. Na parte do operon responsável por estas etapas enzimáticas, foram identificadas oito ORFs, cada uma contendo um sítio de ligação ribossomal, identificado pelas seqüências de Shine-Dalgarno, localizado na parte não-codificante dos genes, ou seja, *upstream* ao possível códon de iniciação da transcrição do gene (seqüência ATG, que codifica o aminoácido metionina (M), ou GTG no caso das ORFs do operon *car*). A representação esquemática deste operon é apresentada na Figura 2.2. Seqüências altamente similares deste operon foram encontradas em *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998). No caso de *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998), a análise da seqüência de nucleotídeos mostrou a presença de seis ORFs completas e uma parcial, todas transcritas na mesma orientação. As ORFs iniciam pelo códon canônico de iniciação ATG (*carAbAcCD*) ou pelo códon GTG (*carAdB*), mais raro e menos eficiente. O códon de iniciação GTG, entretanto, não é incomum em operons envolvidos na degradação de compostos aromáticos (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998).

O estudo dos genes envolvidos na degradação de carbazol por *Pseudomonas* sp. CA10 (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b) e *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998) foi realizado empregando diferentes enzimas de restrição e realizando digestões parciais e totais para a criação de uma biblioteca de DNAs. No estudo do operon de *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998), a técnica de PCR foi usada para obtenção dos genes.

### 2.4.1 Carbazol dioxigenase (CarA)

A etapa inicial da degradação de carbazol pela cepa CA10 de *Pseudomonas* sp. ocorre através da ação catalítica da carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) na posição angular adjacente ao átomo de nitrogênio, que ocorre via formação de um composto intermediário dihidroxilado, que é convertido espontaneamente a 2'-aminobifenil-2,3-diol (SATO *et al.*, 1997b, BENEDIK *et al.*, 1998), como mostra a Figura 2.4. De maneira diferente ocorre em *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998), que apresenta no operon *car* a codificação de uma enzima dihidrodio desidrogenase (de 28kDa, denominada CarB), que juntamente com a carbazol dioxigenase (CarA), é responsável pela conversão de carbazol em 2'-aminobifenil-2,3-diol nesta cepa.



**Figura 2.4** Mecanismo de conversão microbiológica de carbazol em 2'-aminobifenil-2,3-diol (modificado de BENEDIK *et al.*, 1998) pela ação da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) da cepa CA10 de *Pseudomonas* sp., com a passagem por um composto intermediário instável.

As oxigenases são enzimas capazes de incorporar diretamente um (monooxigenases) ou dois átomos de oxigênio (dioxigenases) atmosférico em um co-substrato (WACKETT, 2002). A dioxigenação, realizada por sistemas enzimáticos multicomponentes *in vivo*, é uma das mais importantes reações iniciais envolvidas na biodegradação e metabolismo de hidrocarbonetos e de compostos aromáticos em bactérias (NOJIRI *et al.*, 1999, WACKETT, 2002). Dois tipos de reação são verificados

para a degradação de compostos aromáticos: dioxigenação nas posições laterais dos anéis aromáticos, como bifenil, tolueno e naftaleno, resultando na formação de *cis*-dihidrodióis, e um modo atípico de dioxigenação do núcleo aromático, que é a dioxigenação angular, realizada para a conversão microbiológica de carbazol, entre outros compostos, como dibenzofurano, dibenzo-*p*-dioxina, difenil éter, fluoreno e dibenzotiofeno, alguns contendo heteroátomos O e S, similar ao N do carbazol. Estes compostos, entretanto, também são degradados via dioxigenação lateral e monooxigenação por diferentes rotas microbiológicas. A análise filogenética e a comparação da especificidade de substratos sugerem que o modo atípico de dioxigenação, que é o ataque da posição angular, seja originado da relaxada especificidade de substratos da família das oxigenases de Rieske com ferro que não apresenta configuração de grupamento heme. Além disso, a caracterização genética das rotas de degradação de compostos como carbazol sugerem a possibilidade de recrutamento de genes de várias outras bactérias e que estas rotas catabólicas ainda não sejam maduras sob o prisma da evolução (NOJIRI *et al.*, 2001b).

Estas dioxigenases, que possuem agregados ferro-enxofre do tipo Rieske, coordenados por duas histidinas e duas cisteínas e identificadas por Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>[2Fe-2S], apresentam estrutura e mecanismo de atuação distintos das enzimas que possuem domínios ferro-enxofre diferentes, do tipo encontrado em plantas, que contém quatro cisteínas ligantes aos átomos de ferro, sob a forma Cys<sub>4</sub>[2Fe-2S]. Os centros de Rieske geralmente apresentam um potencial redox maior, o que pode ser importante no controle do fluxo de elétrons durante o ciclo catalítico da oxigenase (WACKETT, 2002). O mecanismo de atuação de sítios de Rieske com ferro sem configuração de grupo heme em dioxigenases é descrito por WACKETT (2002). As dioxigenases multicomponentes que possuem domínio de Rieske empregam piridina nucleotídeo reduzida como fonte inicial dos dois elétrons necessários para a ativação do oxigênio molecular. Estes elétrons passam para um componente protéico que contém um cofator flavina (FAD) capaz de atuar como um interruptor redox para passagem dos elétrons. Estes elétrons são, individualmente, carregados para um centro do tipo [2Fe-2S], presente na mesma proteína com domínio FAD ou em uma componente ferrodioxina separada. Em última instância, os elétrons são transferidos ao componente da dioxigenase que contém o domínio com agregado [2Fe-2S] de Rieske e o centro de ferro mononuclear (WACKETT, 2002). O sítio em que ocorre a ligação e ativação do oxigênio ocorre no

centro de ferro sem configuração de grupamento heme da dioxigenase, onde ocorre a formação de um complexo transiente formado entre enzima-substrato-O<sub>2</sub>. Estudos de estrutura de raios-X destas enzimas indicam que o ferro mononuclear apresenta pelo menos um sítio aberto para ligação de moléculas pequenas como O<sub>2</sub>. Além disso, medidas de EPR (Ressonância Paramagnética Eletrônica) indicam que o centro de ferro não interage diretamente com o substrato orgânico. Essas evidências sugerem que o ataque ao substrato é feito através da formação de um intermediário Fe-O-O-substrato (WACKETT, 2002).

Há na literatura uma série de esquemas propostos para organizar e classificar as informações das oxigenases com agregado ferro-enxofre de Rieske e ferro sem configuração heme (NAM *et al.*, 2001, WACKETT, 2002). As dioxigenases multicomponentes, envolvidas na hidroxilação de anéis de substratos aromáticos, foram classificadas em três grupos por BATIE *et al.*, em 1991, em termos do número de componentes que constituem o sistema enzimático e da natureza dos centros redox (NAM *et al.*, 2001). Todas as oxigenases-terminais consistem em proteínas ferro-enxofre com agregado de Rieske [2Fe-2S] e ferro mononuclear, cuja cadeia de transporte de elétrons pode ocorrer por uma ou por duas subunidades separadas. A diferenciação dos grupos é feita pela caracterização destas subunidades: o grupo IA contém subunidade redutase com domínios FMN e [2Fe-2S] de planta e IB contém este mesmo agregado ferro-enxofre, mas com domínio FAD; o grupo II é formado por uma subunidade redutase com domínio FAD e uma subunidade ferredoxina, com agregado [2Fe-2S] de planta para subgrupo IIA e de Rieske para IIB; o grupo III apresenta componente redutase com domínios FAD e Cys<sub>4</sub>[2Fe-2S] e componente ferredoxina com Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>[2Fe-2S]. Neste último grupo estão classificados a carbazol 1,9a-dioxigenase e a naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas* sp.

Segundo NAM *et al.* (2001), esta classificação apresenta discrepâncias com a afiliação filogenética e à medida que novas dioxigenases são identificadas e caracterizadas. Desta forma, estes autores propõem um novo esquema de classificação, baseado na homologia das seqüências de aminoácidos das subunidades  $\alpha$  da componente oxigenase-terminal destas enzimas, uma vez que é nesta subunidade que se localiza o sítio ativo metálico e que determina a especificidade do substrato. Alguns estudos indicam que a subunidade  $\beta$  das oxigenases é essencial para sua atividade, mas

não tem papel significativo na determinação da especificidade das enzimas; outros sugerem que tanto a subunidade  $\alpha$  quanto  $\beta$  influenciam na interação enzima-substrato. O estudo da naftaleno dioxigenase indica que a subunidade  $\beta$  deva ter um papel estrutural na holoenzima. Estes resultados subsidiam o fato de que, embora a subunidade  $\beta$  possa ter algum papel na atividade enzimática, ainda necessitando de mais estudos, a subunidade  $\alpha$  tem o papel mais crítico no reconhecimento do substrato (NAM *et al.*, 2001). Além disso, alguns estudos indicam que uma única componente redutase e ferredoxina pode atuar em combinação com um número grande de diferentes componentes dioxigenases de Rieske (WACKETT, 2002). Estes argumentos (NAM *et al.*, 2001, WACKETT, 2002) parecem dar subsídios bastante consistentes para a classificação das enzimas segundo as características de suas cadeias  $\alpha$ . Assim, no grupo I estão classificadas as oxigenases que consistem em homo-multímeros, ou seja, apenas possuem subunidades  $\alpha$  idênticas, enquanto os grupos II, III e IV incluem oxigenases que formam heterodímeros, formadas por subunidades não-idênticas  $\alpha$  (maior) e  $\beta$  (menor). A carbazol 1,9a-dioxigenase, como não apresenta cadeia  $\beta$  está classificada no grupo I, enquanto típicos exemplos de cada grupo são: benzoato e toluato dioxigenases no grupo II, naftaleno dioxigenase no grupo III e benzeno, tolueno e bifenil dioxigenases no grupo IV. Desta forma, ambas formas de classificação podem ser utilizadas de forma complementar para expressar tanto a afiliação filogenética quanto os aspectos bioquímicos da enzima, especialmente da cadeia de transporte de elétrons (NAM *et al.*, 2001).

A enzima identificada na cepa CA10 de *Pseudomonas* sp., por SATO *et al.* (1997b), capaz de degradar carbazol, é uma dioxigenase codificada por três diferentes ORFs, que estão localizadas no operon *car* como mostrado esquematicamente na Figura 2.2. É uma enzima de três componentes similar à naftaleno dioxigenase (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998). O operon *car* estudado pelos pesquisadores contém, entretanto, quatro ORFs relacionadas com a ação da carbazol 1,9a-dioxigenase, sendo verificado que as duas primeiras, localizadas uma após a outra, apresentam seqüência de nucleotídeos idênticas, com apenas uma base de diferença localizada na seqüência 5' *upstream* (na parte não codificante do gene). Estas seqüências foram denominadas *carAa* por SATO *et al.* (1997b) e apresentam cerca de 30% de homologia com as maiores subunidades dos componentes terminais de outras oxigenases. Mais recentemente, foi identificada relação filogenética com a oxigenase componente da

2-oxo-1,2-dihidroquinolina 8-monooxigenase de *Pseudomonas putida* (NOJIRI E OMORI, 2002), com a qual apresenta 35% de identidade (NAM *et al.*, 2005). A seqüência consenso (CXHX<sub>16-17</sub>CXXH) de proteínas ferro-enxofre do tipo Rieske que formam sítio de ligação de agregado [2Fe-2S] foi encontrada em *carAa*. As ORFs apresentam também o motivo EX<sub>3-4</sub>DX<sub>2</sub>HX<sub>4-5</sub>H (JIANG *et al.*, 1996, SATO *et al.*, 1997b) que supostamente age como um ligante mononuclear de ferro no sítio de ativação do oxigênio. O gene *carAa* é indispensável para a metabolização do carbazol, mas a reação não necessita das duas ORFs para ocorrer, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas na atividade da enzima pela presença do gene duplicado. O significado da presença de duas cópias de *carAa* é ainda desconhecido (NOJIRI E OMORI, 2002) e exige mais estudos, uma vez que é difícil a manutenção de genes duplicados com a mesma função, a não ser nos casos em que sejam responsáveis pela codificação de uma enzima que catalise uma reação limitante e a duplicação permita a expressão de maiores concentrações da mesma (SATO *et al.*, 1997b, BENEDIK *et al.*, 1998). A expressão deste gene, de 1152pb, em *Escherichia coli*, confirmou a expressão de uma proteína com 43kDa. A seqüência de nucleotídeos da ORF *carAc* apresenta aproximadamente 60% de homologia com as componentes ferredoxina das dioxigenases envolvidas na degradação de clorobenzeno e tolueno por diferentes gêneros de *Pseudomonas* e da bifenil dioxigenase de *Rhodococcus* sp.

O gene *carAc* também apresenta a seqüência de proteínas ferro-enxofre de Rieske que formam sítio de ligação de *cluster* [2Fe-2S], indicando que esta ORF codifica a subunidade ferredoxina da dioxigenase CarA de *Pseudomonas* sp. CA10. A estrutura cristalográfica composta por três folhas- $\beta$  desta subunidade foi recentemente determinada por NAM *et al.* (2005), sendo comprovado que seu enovelamento é altamente semelhante ao da componente ferredoxina da bifenil dioxigenase de *Burkholderia cepacia* cepa LB400 (COLBERT *et al.*, 2000), com diferenças na distribuição de cargas na superfície.

A seqüência *carAd* identificada por SATO *et al.* (1997b) apresenta sítio de ligação de *clusters* [2Fe-2S] presentes em proteínas ferro-enxofre de plantas (CX<sub>4</sub>CXXCX<sub>29</sub>C), localizado perto da posição N-terminal da seqüência deduzida de aminoácidos de CarAd. É também encontrada em *carAd* a seqüência envolvida na ligação de FAD e NAD na posição C-terminal da provável seqüência de aminoácidos da proteína. Além

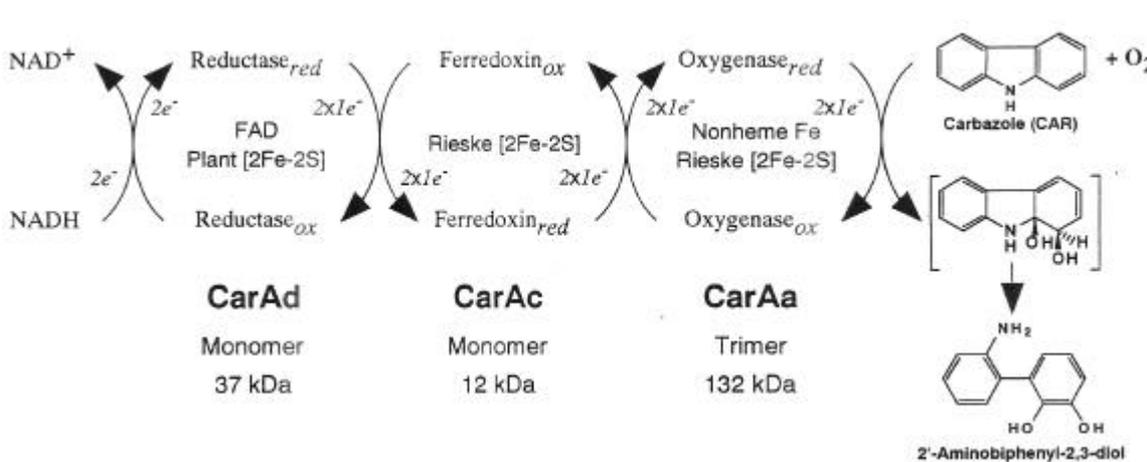
destas características, a sequência apresenta cerca de 50% de homologia com componentes ferredoxina redutases de diferentes *Pseudomonas* que compõem sistemas monooxigenases que degradam tolueno e alquenos, assim como da naftaleno dioxigenase (SATO *et al.*, 1997b, NOJIRI E OMORI, 2002), subsidiando que *carAd* codifica a componente ferredoxina redutase da carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA). A expressão em *Escherichia coli* dos genes *carAc* e *carAd* resultou em proteínas com 11 e 36kDa, respectivamente.

A hipótese de que o gene denominado ORF 7 por SATO *et al.* (1997b) codifica a menor subunidade da componente terminal da carbazol 1,9a-dioxigenase foi testada pelos pesquisadores empregando vetores contendo todos os genes relacionados à enzima (*carAa(1)A(2)AcAd*), com ou sem interrupção da ORF7, permitindo ou não a expressão deste gene. O estudo da atividade destes clones (com expressão ou não da proteína de 11kDa codificada pela ORF7) sobre carbazol não apresentou diferenças no rendimento em 2'-aminobifenil-2,3-diol, sugerindo que este gene não é indispensável para a atividade da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase. Estes resultados sugeriram aos pesquisadores que a proteína carbazol 1,9a-dioxigenase apresenta uma única subunidade da componente terminal, codificada por *carAa*.

Segundo resultados de análise filogenética (NOJIRI E OMORI, 2002, NAM *et al.*, 2005), as subunidades CarAa e CarAd são mais próximas às componentes oxigenase e redutase de monooxigenases multicomponentes do que aos sistemas dioxigenases. Há descrições na literatura de que as componentes redutases dos sistemas de oxigenases de Rieske podem ser substituídas por outras redutases e ferredoxina-redutases, embora as componentes ferredoxinas raramente possam ser substituídas por componentes não relacionadas. No sistema enzimático da carbazol dioxigenase, é relatado que CarAd pode ser substituído por uma redutase não relacionada, mas CarAc é indispensável para a transferência de elétrons para CarAa, sugerindo que existe uma interação específica entre CarAc e CarAa (NAM *et al.*, 2002b). Além disso, a distante afiliação filogenética das três componentes da carbazol dioxigenase indica a possibilidade delas terem sido recrutadas de diferentes sistemas de oxigenases (NOJIRI E OMORI, 2002).

Através da purificação do sistema da carbazol 1,9a-dioxigenase por NAM *et al.* (2002a) e (2002b) e da caracterização espectroscópica dos componentes CarAa, CarAc e CarAd da carbazol dioxigenase de *Pseudomonas resinovorans* CA10, foi proposta a

função de cada um dos componentes, como mostrado na Figura 2.5, de forma similar ao que acontece com outras enzimas descritas na literatura, como a naftaleno e tolueno dioxigenase e de acordo com o mecanismo apresentado por WACKETT (2002). Segundo estes trabalhos, os monômeros carAc, de 13kDa e carAd, de 37kDa, funcionam, respectivamente, como componentes ferredoxina e ferredoxina-redutase no transporte de elétrons de NADH para a componente oxigenase-terminal, carAa. Esta subunidade, por sua vez, cujo monômero apresenta 44kDa, foi purificada sob a forma de um homotrímero, com 132kDa (NAM *et al.*, 2002a, NAM *et al.*, 2002b). As funções propostas para cada uma das subunidades estão de acordo com as funções sugeridas pela seqüência de aminoácidos deduzida de cada uma delas. A atividade da enzima carbazol dioxigenase, para conversão de carbazol a 2'-aminobifenil-2,3-diol, depende da coexistência de todas as subunidades, como descrito anteriormente em outros artigos deste grupo (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b).



**Figura 2.5** Componentes e funções das subunidades da enzima carbazol 1,9-dioxigenase, com mecanismo de transferência de elétrons propostos por NAM *et al.* (2002a) e (2002b).

A enzima dioxigenase (CarA) que ataca o anel aromático do carbazol em *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998) é composta por três componentes, similar à bifenil dioxigenase e tolueno dioxigenase, mas apresenta baixa homologia à carbazol 1,9a-dioxigenase de *Pseudomonas* CA10. A carbazol oxigenase da cepa CB3 é codificada por quatro genes (*carAaAbAcAd*), localizados um após o outro no operon *car* da bactéria, como mostra a Figura 2.2. A componente oxigenase-

terminal é composta por duas subunidades, codificadas pelos genes *carAaAb*, diferente da configuração da carbazol 1,9a-dioxigenase de CA10, que é formada e codificada por apenas uma subunidade e pelo gene *carAa*. O gene *carAa* da cepa CB3 codifica a subunidade maior ( $\alpha$ ) da componente ferro-enxofre e contém a seqüência do motivo de Rieske [2Fe-2S], com os resíduos conservados Cys e His, enquanto *carAb* codifica a subunidade menor ( $\beta$ ) da componente ferro-enxofre. A ORFs *carAc* apresenta homologia com as subunidades ferredoxinas de dioxigenases e conserva motivo de ligação de Rieske [2Fe-2S]. O gene *carAd* codifica a subunidade redutase e a seqüência de aminoácidos referente a proteínas associadas a membranas. Diferentemente da carbazol 1,9a-dioxigenase de CA10, não há evidências se a enzima CarA da cepa CB3 catalise um ataque por uma dioxigenação angular (NOJIRI *et al.*, 2001b).

Os resultados apresentados por SATO *et al.* (1997b) (Tabela 2.1) para oxidação de diferentes substratos pela enzima carbazol 1,9a-dioxigenase, denominada CarA, mostram que ela é capaz de oxidar de forma eficaz uma grande variedade de compostos poliaromáticos além do carbazol, como dibenzo-*p*-dioxina, fenoxazina, fenotiazina, bifenil, fenantreno e antraceno (com conversões de substrato superiores a 90%). A enzima é também capaz de degradar com conversões médias dibenzofurano, fenoxantina, xanteno e naftaleno, mas não é capaz de catalisar a reação de fenazina. Além destas evidências de uma larga faixa de substratos, a enzima CarA é capaz de catalisar diversos tipos de oxigenações: dioxigenação angular, *cis*-dihidroxiilação e monooxigenação, o que não é comum entre enzimas descritas na literatura. A enzima somente é capaz de catalisar dioxigenação angular na posição adjacente a átomo de oxigênio e nitrogênio e não a átomo de enxofre ou carbono (NOJIRI *et al.*, 1999).

**Tabela 2.1** Conversão e especificidade da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase empregando diferentes compostos poliaromáticos como substratos. Os produtos de reação de carbazol, dibenzofurano e dibenzotiofeno indicam o ataque da posição angular adjacente ao átomo de N ou O (modificado de SATO *et al.*, 1997b, NOJIRI *et al.*, 1999).

Substrato	Número de produtos da oxidação	Substrato não consumido (%)
carbazol	<b>1</b> (2'-aminobifenil-2,3-diol)	1,5
dibenzofurano	<b>1</b> (2,2',3-trihidroxibifenil)	48,5
dibenzotiofeno	<b>1</b> (dibenzotiofeno-5-óxido)	45
fluoreno	<b>3</b> (9-hidroxifluoreno + fluoreno dihidrodíóis)	81
<i>n</i> -metilcarbazol	1	(não testado)
<i>n</i> -etilcarbazol	1	(não testado)
dibenzo- <i>p</i> -dioxina	<b>1</b> (2,2',3-trihidrodifenil éter)	4
fenazina	(não detectado)	(não testado)
fenoxazina	1	1
fenotiazina	1	8
fenoxatina	<b>1</b> (2,2',3-trihidroxidifenil sulfeto)	25
xanteno	<b>1</b> (2,2',3-trihidroxidifenilmetano)	53
bifenil	<b>1</b> ( <i>cis</i> -2,3-dihidroxi-2,3-dihidrobifenil)	0,0
naftaleno	<b>1</b> ( <i>cis</i> -1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno)	24
fenantreno	2	5,5
antraceno	<b>2</b> ( <i>cis</i> -1,2-dihidroxi-1,2-dihidroantraceno)	9
fluoranteno	<b>2</b> ( <i>cis</i> -2,3-dihidroxi-2,3-dihidrofluorantreno + 7-hidroxifluorantreno)	90

#### 2.4.2 Dioxigenase de *meta*-clivagem (CarB)

A enzima que catalisa a *meta*-clivagem do composto 2'-aminobifenil-2,3-diol, provocando a abertura do anel hidroxilado, também é uma dioxigenase, mas codificada de diferentes formas para os microorganismos empregados na degradação do carbazol (SATO *et al.* 1997a, SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998). Nesta reação, o composto 2'-aminobifenil-2,3-diol sofre um ataque na posição *meta* do anel hidroxilado, resultando no ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico, que mantém

o grupo aminofenil e apresenta um grupamento ácido (COOH) e uma ligação dupla com oxigênio.

Existem duas classes de dioxigenases envolvidas na quebra de ligações C-C de anéis aromáticos: intradiol e extradiol, ambas classes de enzimas metalo-dependentes. As duas classes diferem pelo estado de oxidação do ferro do sítio ativo e levam a produtos distintos quando catalisam reações de quebra de anéis catecol do mesmo substrato. As extradiol dioxigenases, classe à qual pertence a enzima 2'-aminobifenil-2,3-diol dioxigenase, apresentam sítio ativo formado por um íon ferroso em configuração não-heme e catalisam a clivagem de anéis aromáticos em ligações C-C adjacentes aos grupos OH vicinais (clivagem na posição *meta*), enquanto as intradiol dioxigenases são capazes de quebrar ligações C-C entre os grupamentos OH de um anel catecol (clivagem na posição *orto*) devido à presença de um íon férrico (não-heme) em seu sítio ativo (SUGIMOTO *et al.*, 1999, IWATA *et al.*, 2003). Três classes (I, II e III) das extradiol dioxigenases já foram identificadas: as classes I e II apresentam estruturas primárias similares e possivelmente têm um ancestral comum (a classe II parece ter evoluído a partir da classe I por duplicação genética e apresenta dois domínios com praticamente o mesmo padrão), enquanto as classes III e II não compartilham nenhuma similaridade ao nível seqüencial ou estrutural (IWATA *et al.*, 2003, IWATA *et al.*, 2004). Entretanto, os sítios ativos das classes II e III das extradiol dioxigenases apresentam características comuns que sugerem que elas compartilham o mesmo mecanismo reacional, apesar de suas estruturas 3D serem completamente diferentes (SUGIMOTO *et al.*, 1999). Neste mecanismo, os dois grupamentos hidroxila do anel catecol coordenam-se diretamente ao Fe(II) do sítio ativo em uma geometria trigonal bipyramidal, seguido da ligação da molécula de O<sub>2</sub> ao íon ferroso e a transferência de elétrons do catecol para o O<sub>2</sub> mediada pelo ferro, resultando na quebra da ligação O-O. Esta molécula de O<sub>2</sub> ativada ataca a ligação C-C do anel catecol do substrato (SUGIMOTO *et al.*, 1999, SENDA *et al.*, 1996, VAILLANCOURT *et al.*, 2002).

A enzima 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarB) é codificada por dois genes, *carBa* e *carBb*, indispensáveis para a atividade da enzima, localizados um após o outro no operon CAR de *Pseudomonas sp.* CA10, segundo Sato *et al.* (1997a). A seqüência de aminoácidos resultante da ORF identificada como *carBb* apresenta 30% de homologia com a subunidade LigB da enzima protocatecuato 4,5-dioxigenase de *Pseudomonas paucimobilis* SYK6, assim como foi identificada a conservação de

resíduos de histidina considerados essenciais para os sítios ativos, podendo constituir um sítio de coordenação para um cofator de ferro sem configuração heme. As duas subunidades da enzima foram expressas em *Escherichia coli*, confirmando por SDS-PAGE as massas moleculares previstas: 10kDa para CarBa e 29kDa para CarBb, sob uma estrutura heterotetramérica do tipo  $\alpha_2\beta_2$ , sendo verificada uma expressão em maior quantidade para a segunda subunidade (IWATA *et al.*, 2003).

A atividade da enzima CarB de *Pseudomonas* sp. CA10 foi testada com 2,3-dihidroxibifenil (2,3-DHBP), análogo de 2'-aminobifenil-2,3-diol, sendo comprovada atividade de *meta*-clivagem sobre os dois substratos, com alta especificidade (SATO *et al.*, 1997<sup>a</sup>, IWATA *et al.*, 2003). Foram testados outros substratos (catecol, 3-metilcatecol e 4-metilcatecol), apresentados na Tabela 2.2, sendo verificado que a atividade da enzima que catalisa a *meta*-clivagem é praticamente negligenciável nestes casos. A atividade de *meta*-clivagem de CarB sobre 2'-aminobifenil-2,3-diol, medida com auxílio de eletrodo de oxigênio, mostrou um rápido consumo de O<sub>2</sub> e produção simultânea do composto amarelo *meta*-clivado resultante da reação. Apesar da homologia de CarBb com LigB, a enzima CarB não apresentou atividade sobre protocatecuato. Por estes resultados, os pesquisadores sugerem que o sítio ativo da enzima esteja localizado na subunidade CarBb, mas consideram ainda indeterminada a localização do sítio de ligação de oxigênio e de reconhecimento do substrato.

A enzima de *meta*-clivagem da cepa *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998) é codificada pelos mesmos genes que CA10, sendo verificada alta homologia entre eles.

O gene *carC* presente no operon da cepa CB3 de *Sphingomonas* (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998) é caracterizado como o responsável pela codificação da enzima que catalisa a *meta*-clivagem do composto 2'-aminobifenil-2,3-diol, descrito como uma extradiol dioxigenase. Este gene contém resíduos de aminoácidos His147, His211 e Glu262, que estão implicados na coordenação de ferro do sítio ativo da enzima.

A enzima de *Pseudomonas* sp. LD2 (GIBBS *et al.*, 2003) foi purificada e apresentou duas subunidades (em uma estrutura  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramérica de 70kDa) de tamanhos 8kDa (CarBa) e 25kDa (CarBb). Durante a purificação, foi verificado que a enzima apresenta caráter hidrofóbico e com estabilidade muito limitada.

**Tabela 2.2** Medidas de atividade enzimática (medida pela formação dos produtos) e especificidade de substratos e parâmetros de cinéticos para as dioxigenases de *meta*-clivagem clonadas em *Escherichia coli* das cepa CA10 de *Pseudomonas* sp. (SATO *et al.*, 1997a, IWATA *et al.*, 2003), de *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp. LD2 (GIBBS *et al.*, 2003) e *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998).

<i>Pseudomonas</i> sp. CA10					
Substrato	Atividade ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	
2,3- dihidroxibifenil	1,4 - 13,7 <sup>a</sup>	$1,2 \pm 0,1^a$	7435	-	
	101,7 <sup>b</sup>	$1,9^b$	-	3,3	
2'-aminobifenil-2,3-diol	(reação rápida)	$14^b$	-	0,25	
2,2',3-trihidroxibifenil	-	$5,3^b$	-	1,4	
protocatecuato	-	$130^b$	-	0,015	
catecol	0,02 <sup>a</sup>	$800^b$	-	0,0036	
4-metilcatecol	0,08 <sup>a</sup>	$250^b$	-	0,019	
3-metilcatecol	0,06 <sup>a</sup>	$1590,7 \pm 171,4^a$	2016	-	
	-	$150^b$	-	0,016	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> OM1					
Atividade enzimática relativa (%) <sup>a</sup>					
bifenil-2,3-diol			100		
catechol			2,2		
3-metilcatecol			4,0		
4-metilcatecol			1,4		
<i>Pseudomonas</i> sp. LD2					
	Atividade específica ( $\text{mmol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{mmol}/\text{min}$ )	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$S_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}$ )
2,3- dihidroxibifenil	1,2 <sup>c</sup>	5,1	44	37	13,7
	48,1 <sup>d</sup>				
	>100 <sup>e</sup>	-	-	-	-
<i>Sphingomonas</i> CB3					
Atividade enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)					
2,3- dihidroxibifenil		$820,6 \pm 19,4$			
catecol		$24,0 \pm 1,2$			

<sup>a</sup> extrato celular a 25°C e pH7,5 em tampão 50mM. <sup>b</sup> enzima purificada a 25°C e pH7,5 em tampão 50mM. <sup>c</sup> lisado celular a 25°C e pH8 em tampão 25mM. <sup>d</sup> enzima purificada a 25°C e pH8,0 em tampão 25mM. <sup>e</sup> enzima purificada a 40°C e pH8,0 em tampão 25mM.

Os resultados apresentados para CA10 e CB3 indicam que as enzimas de *meta*-clivagem apresentam uma especificidade muito mais alta para a degradação de substratos com estrutura do tipo bifenil dihidroxilados (como 2'-aminobifenil-2,3-diol e 2,3-dihidroxibifenil) do que para compostos derivados de catecol (com a presença de somente um anel aromático) (SATO *et al.*, 1997a, SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998, IWATA *et al.*, 2003, GIBBS *et al.*, 2003). Estes resultados indicam que a enzima pertence à classe III das extradiol dioxigenases, da família da enzima protocatecuato 4,5-dioxigenase (IWATA *et al.*, 2003, GIBBS *et al.*, 2003).

### 2.4.3 HOADA hidrolase (CarC)

A terceira etapa da rota de degradação de carbazol, que faz a conversão do ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico (HOADA) a ácido antranílico e 2-hidroxipenta-2,4-dienóico é realizada pela enzima CarC. Esta hidrolase catalisa um dos mais raros tipos de reações enzimáticas, que é a quebra hidrolítica de uma ligação C-C. Este grupo de hidrolases, classificadas sob o grupo E.C. 3.7.1, atua sobre ligações C-C de substratos cetônicos, embora ainda pouco se saiba sobre este tipo de quebra hidrolítica envolvida na degradação de compostos aromáticos. Em muitos casos, como no metabolismo de bifenil, tolueno, a especificidade de substratos e as taxas de degradação das hidrolases determinam a capacidade de suas respectivas rotas catabólicas (FUSHINOBU *et al.*, 2002, RIDDLE *et al.*, 2003b). O mesmo papel de ser um dos fatores determinantes da especificidade de substratos da rota de degradação de carbazol é proposto para CarC (NOJIRI *et al.*, 2003).

Embora as hidrolases apresentem baixa similaridade seqüencial, verifica-se que se caracterizam por uma estrutura tridimensional com um enovelamento do tipo  $\alpha/\beta$  conservado (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001, RIDDLE *et al.*, 2003b). Esta estrutura  $\alpha/\beta$  das hidrolases confere às enzimas desta família um mecanismo enzimático que parece ser similar, devido à presença de uma tríade catalítica com a configuração de resíduos nucleofílico-ácido-histidina. Estes três aminoácidos, embora estejam separados por um número variável de resíduos na estrutura primária, apresentam localização espacial similar na proteína enovelada. O resíduo nucleofílico, em muitos casos uma serina, fica

localizada em um motivo conservado, denominado cavidade nucleofílica (“*nucleophilic elbow*”), com uma seqüência consenso identificada por Sm-X-Nu-Sm-Sm, na qual Sm indica um aminoácido pequeno, geralmente uma glicina, X indica qualquer aminoácido e Nu indica o resíduo nucleofílico (RIDDLE *et al.*, 2003b). A etapa inicial da reação consiste de um ataque nucleofílico, seguido da quebra por água do intermediário formado. A função do resíduo ácido e da histidina é ativar a molécula de água.

As hidrolases podem ser divididas em vários grupos, conforme o substrato preferencial das enzimas. Embora haja várias enzimas com características intermediárias, as hidrolases do grupo I estão envolvidas na degradação de compostos aromáticos bicíclicos (como bifenil e carbazol), enquanto a maior parte das hidrolases que pertencem ao grupo III está envolvida na biodegradação de compostos monocíclicos com cadeias alquil laterais curtas, como tolueno, xileno e isopropilbenzeno (HERNÁEZ *et al.*, 2000, NOJIRI *et al.*, 2003, HABE *et al.*, 2003). A especificidade de substrato de CarC de várias cepas é similar à das hidrolases classificadas no grupo I, mas apresenta maior similaridade seqüencial com as do grupo III, como indicado pelas árvores filogenéticas descritas por HERNÁEZ *et al.* (2000) e NOJIRI *et al.* (2003). Embora classificadas no grupo III, estas enzimas compreendem um ramo muito diverso neste grupo, devido às suas características intermediárias entre os grupos e devido às diferenças nas especificidades por substratos e poderiam ser classificadas num novo grupo de hidrolases (NOJIRI *et al.*, 2003). O grupo II é representado por uma única hidrolase envolvida na biodegradação de ácido 3-hidroxifenilpropiónico e o grupo IV é o mais heterogêneo, sendo composto, entre outras, por hidrolases que degradam ligações carbono-heteroátomo, como as carboxilesterases, enol-lactona hidrolases envolvidas em rotas catabólicas com *ortho*-clivagens e epóxido hidrolases, muitas conservando a tríade catalítica serina-aspartato-histidina (HERNÁEZ *et al.*, 2000).

A seqüência traduzida do gene *carC* apresentou cerca de 30% de identidade com hidrolases de compostos *meta*-clivados presentes em outras bactérias. Este percentual de identidade com enzimas isofuncionais é maior do que para a primeira enzima da rota, CarA, sugerindo que as enzimas subseqüentes devam ser mais relacionadas com as enzimas correspondentes a outras rotas de degradação de aromáticos do que CarA (NORII *et al.*, 2003). Foi também confirmada por SATO *et al.* (1997a) a presença da seqüência de aminoácidos Gly-X-Ser-X-Gly, altamente conservada nas hidrolases e que

constitui o motivo estrutural das  $\alpha/\beta$  das hidrolases (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). A homologia entre a seqüência de 870 nucleotídeos do gene *carC* de *Pseudomonas* sp. CA10 (SATO *et al.*, 1997a) e LD2 (RIDDLE *et al.*, 2003b) é de 98%. Em nível de aminoácidos, a proteína CarC de ambos os microorganismos apresenta identidade completa. A seqüência de CarC da cepa *Janthinobacterium* sp. J3 apresenta somente seis aminoácidos diferentes da seqüência da enzima de CA10 (HABE *et al.*, 2003). A estrutura cristalográfica de CarC desta cepa foi determinada por HABE *et al.* (2003), comprovando que a enzima dimérica é formada por dois monômeros assimétricos com uma forte interação entre eles que se dá pela presença de folhas- $\beta$  antiparalelas nas duas subunidades. A estrutura do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase é mais próxima à da enzima homodimérica 2-hidroxi-6-oxo-7-metiloxa-2,4-dienoato hidrolase de *Pseudomonas fluorescens* cepa IP01 (CumD), pertencente ao grupo III (FUSHINOBU *et al.*, 2002) do que da estrutura octamérica 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolase de *Rhodococcus* sp. cepa RHA1 (BphD), da rota de degradação de bifenil/policlorados (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001), pertencente ao grupo I. A estrutura de CarC é dividida em dois domínios: núcleo e tampa e os resíduos que formam a tríade catalítica do sítio ativo são Ser114, Asp233 e His261 (HABE *et al.*, 2003). A participação de Ser114, presente na cavidade nucleofílica característica das  $\alpha/\beta$  das hidrolases (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001), na atividade catalítica da enzima foi confirmada experimentalmente por RIDDLE *et al.* (2003b), uma vez que uma mutação sítio-dirigida deste resíduo conservado para uma alanina reduziu significativamente a atividade hidrolase de CarC, em cerca de 40 vezes (RIDDLE *et al.*, 2003b).

A enzima da cepa CA10 (SATO *et al.*, 1997a) foi expressa por *Escherichia coli* com uma massa molecular de 32kDa, com 290 aminoácidos. A purificação desta enzima da cepa *Pseudomonas* sp. LD2 por RIDDLE *et al.* (2003b) indicou que esta enzima existe sob a forma de um homodímero, sem requerimento de cofatores, com atuação em uma larga faixa de pH (entre 7,0 e 9,0), e atividade ótima em pH 7,0 e em temperatura de 58°C para HOPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico), produto da dioxigenação de *meta*-clivagem de 2,3-dihidroxibifenil, um análogo cromóforo (amarelo) de 2'-aminobifenil-2,3-diol, que faz parte da rota de degradação de carbazol. Além destes compostos, foi verificado que CarC também degrada os produtos de *meta*-clivagem de dibenzofurano e bifenil (NOJIRI *et al.*, 2003, HABE *et al.*, 2003). Uma comparação das atividades de CarC de diversas cepas é apresentada na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** Medidas de atividade enzimática medida por extrato de célula para diferentes substratos da enzima hidrolase clonada em *Escherichia coli* das cepas *Pseudomonas* sp. CA10 (SATO *et al.*, 1997a, NOJIRI *et al.*, 2003, HABE *et al.*, 2003), *Pseudomonas* sp. LD2 (RIDDLE *et al.*, 2003b) e *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003). Compostos: HOADA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico, produto de *meta*-clivagem de 2'-aminobifenil-2,3-diól, da rota de carbazol), HOPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienóico, produto de *meta*-clivagem de 2,3-dihidroxibifenil, da rota de bifenil) e HOHDA (ácido 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienóico, produto de *meta*-clivagem de 3-metilcatecol, da rota de tolueno), HODA (semialdeído 2-hidroximucônico, produto de *meta*-clivagem de catecol), HOHPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-hidroxifenil)-hexa-2,4-dienóico, produto de *meta*-clivagem da rota de dibenzofurano).

<i>Pseudomonas</i> sp. CA10					
Substrato	Atividade enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	
HOPDA	1,20 <sup>a</sup>				
	1,99 <sup>b</sup>	2,51	2,14	0,85	
HOADA	2,44 <sup>b</sup>	-	-	-	
HOHPDA	1,05 <sup>b</sup>	-	-	-	
HOHDA	0,03 <sup>a</sup>	-	-	-	
HODA	0,01 <sup>b</sup>				
<i>Pseudomonas</i> sp. LD2					
Substrato	Atividade enzimática ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{mmol}/\text{min}$ )	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$S_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}$ )
HOPDA	1280 <sup>a</sup>				
	2600 <sup>b</sup>	4,6	3,3	70,0	17,9
<i>Janthinobacterium</i> sp. J3					
Substrato	Atividade enzimática relativa (%) <sup>b</sup>	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	
HOPDA	100	2,73	1,99	0,73	
HOHDA	0,55	-	-	-	
HODA	0,50	-	-	-	

<sup>a</sup> extrato celular a 25°C e pH7,5 em tampão 50mM.

<sup>b</sup> enzima purificada a 25°C e pH7,5 em tampão 50mM.

#### 2.4.4 Antranilato dioxigenase (AntABC)

A etapa de conversão de ácido antranílico a catecol, em que ocorre a eliminação do nitrogênio da rota de degradação de carbazol é feita por uma enzima AntABC em *Pseudomonas* sp. CA10, codificada por três ORFs e identificada como antranilato 1,2-dioxigenase (NOJIRI *et al.*, 2001a). As seqüências de aminoácidos deduzidas das três ORFs apresentaram homologias significativas com os constituintes de diversas dioxigenases multicomponentes do grupo IB da classificação de Batie. Entre estes resultados, o de maior homologia foi verificado com as constituintes da enzima antranilato 1,2-dioxigenase (AntABC) de *Acinetobacter* sp. ADP1. A organização das três ORFs identificadas na cepa CA10 é muito similar ao agregado de genes *antABC* da cepa ADP1. Diferenças são verificadas na localização destes genes, que na cepa CA10 estão entre dois genes de transposases, o que não acontece na cepa ADP1.

O motivo consenso de proteínas ferro-enxofre de Rieske para ligação de agregado [2Fe-2S] é encontrado na porção N terminal da seqüência de aminoácidos deduzida da primeira ORF, assim como o domínio responsável pela coordenação de ferro mononuclear também é conservado neste gene. As cisteínas conservadas do tipo CX<sub>4</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>C, que podem coordenar um agregado [2Fe-2S] em proteínas ferro-enxofre do tipo planta e os potenciais domínios para ligação de cofatores são encontrados na terceira ORF desta seqüência. Estes resultados indicam fortemente que os genes *antA* (de 1403pb) e *antB* (de 491pb) seriam responsáveis, respectivamente, pela codificação das subunidades maior ( $\alpha$ ) e menor ( $\beta$ ) da componente terminal da enzima antranilato 1,2-dioxigenase, enquanto *antC* (1028pb) codificaria a componente redutase desta enzima (NOJIRI *et al.*, 2001a). As massas moleculares preditas para cada uma destas enzimas são 53kDa para AntA, 19kDa para AntB e 38kDa para AntC e os autores que as identificaram não obtiveram êxito na expressão destes genes em células de *Escherichia coli* e na detecção de atividade para antranilato 1,2-dioxigenase.

Devido ao fato dos genes *antABC* estarem localizados no megaplasmídeo pCAR1 em um possível transposon, foi testada e confirmada a presença de uma cópia intacta destes genes no genoma da bactéria. NOJIRI *et al.* (2001a) também verificaram que os genes *ant* são fortemente induzidos na cepa CA10 cultivadas em carbazol.

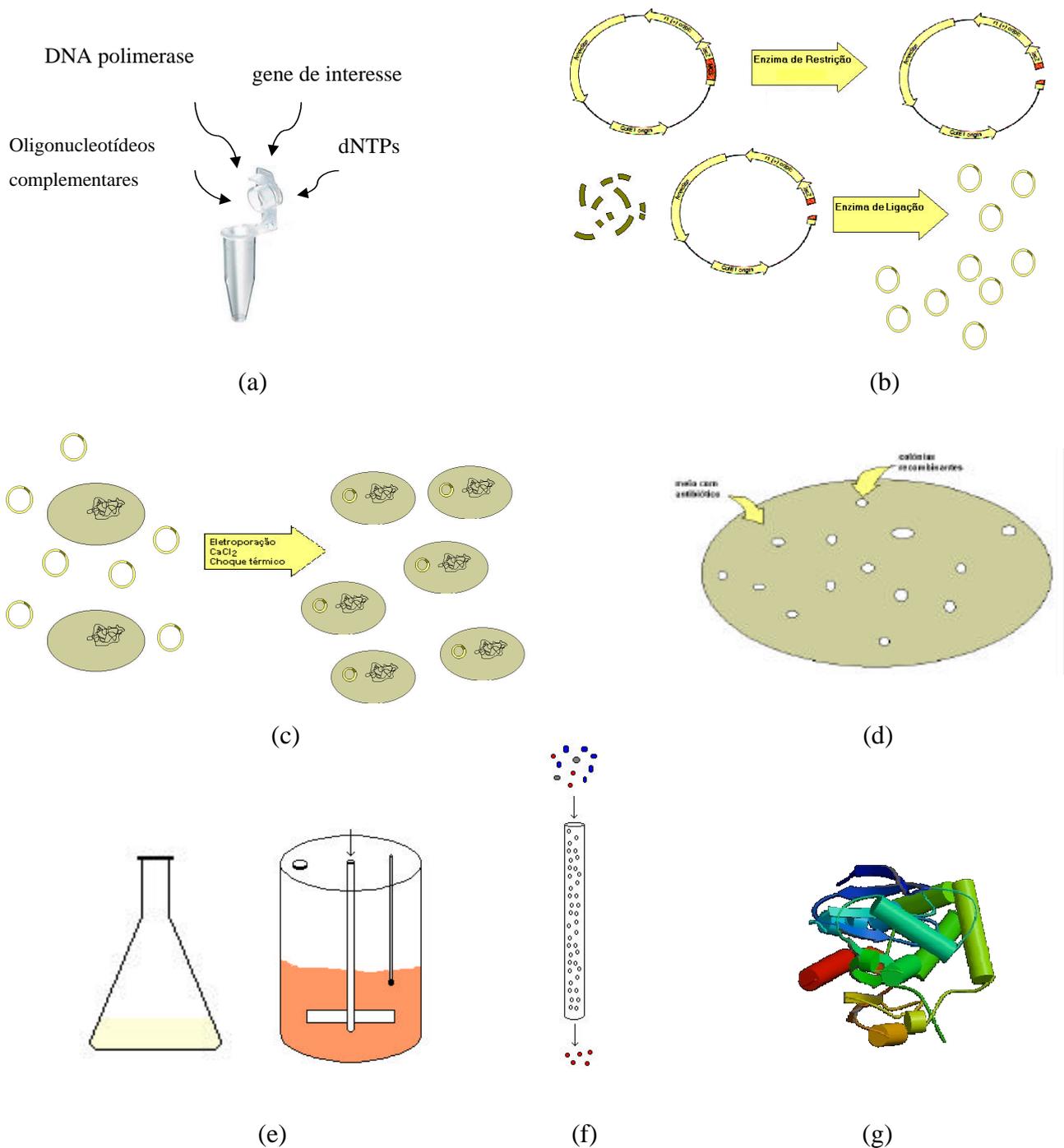
### **3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

Os genes do operon *car* que codificam a rota de degradação de carbazol foram obtidos do DNA genômico da bactéria *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258, descrita na literatura como capaz de degradar carbazol como única fonte de carbono e nitrogênio (HISATSUKA E SATO, 1994). A caracterização desta bactéria está apresentada na seção 3.1. Nas seções 3.2 e 3.3 são discutidos os procedimentos empregados na amplificação destes genes por PCR.

A clonagem foi feita por recombinação sítio-específica, derivada do sistema de lisogenia do bacteriófago lambda, que permite sua integração ao genoma de *Escherichia coli* (usando vetores comerciais GATEWAY™, Invitrogen) aliada ao uso da enzima topoisomerase para ligação do produto de PCR nos plasmídeos. Os procedimentos de biologia molecular empregados na construção dos plasmídeos estão descritos nas seções 3.4 a 3.11.

Nas seções 3.12 a 3.17 estão descritos os resultados de expressão das enzimas e a sua caracterização enzimática. Na seção 3.18 são apresentados os fundamentos e etapas empregadas na modelagem por homologia dos complexos enzimáticos.

Um esquema geral das etapas empregadas na tecnologia de DNA recombinante desde a obtenção do gene até a proteína de interesse pode ser verificada na Figura 3.1.



**Figura 3.1** Técnica de DNA recombinante para obtenção de proteínas. (a) PCR para obtenção de grandes quantidades do gene da proteína de interesse (a partir de genoma ou outra fonte de DNA). (b) Construção do vetor: origem de replicação + promotor + gene de interesse (possível fusão de proteínas) + gene marcador (resistência a antibiótico). (c) Inserção do vetor na célula hospedeira. (d) Seleção das colônias recombinantes (por antibiótico). (e) Expressão da proteína em frascos agitados e biorreator: cinética, estudo de condições de crescimento e indução em diferentes meios, otimização. (f) Purificação e caracterização da proteína recombinante, com clivagem de proteínas de fusão e re-enovelamento (*refolding*), quando necessário. (g) Testes de atividade com a proteína recombinante (LARENTIS *et al.*, 2002).

### 3.1 Caracterização e cultivo de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258

A cepa a ser utilizada para obtenção dos genes envolvidos na degradação de carbazol foi adquirida na ATCC sob o número 31258 (HISATSUKA E SATO, 1994). A ampola da cepa ATCC 31258 liofilizada foi aberta no Laboratório de Materiais de Referência do INCQS/Fiocruz e incluída e disponibilizada na coleção INCQS sob o número 00520.

A cepa *Pseudomonas stutzeri* foi inicialmente cultivada em meio ágar nutriente Difco 0001 (para placas) e caldo nutriente Difco 0003, a 35°C, por 24h, segundo indicação da ATCC. O cultivo da cepa, para posterior liofilização e formação de novos lotes para a coleção INCQS, foi feita com acompanhamento do crescimento da bactéria em placa ágar sangue (meio muito rico, contendo peptonas, extrato de carne, extrato de levedura, sangue de carneiro, com coloração vermelho vivo) para controle de possíveis contaminações e para contagem de colônias. As colônias obtidas foram caracterizadas em placa e as células por coloração de Gram. Foram também realizados testes bioquímicos para confirmação da bactéria *Pseudomonas stutzeri* (MURRAY *et al.*, 1999). Os testes para confirmação bioquímica da cepa *Pseudomonas stutzeri* foram feitos com colônias da placa ágar sangue com crescimento de 21h a 35°C. Foram testadas a capacidade da cepa de redução de nitrato, de oxidação de glicose, lactose, maltose e manitol, crescimento em NaCl 6,5% m/v, além da verificação da presença da enzima catalase. O teste oxidativo de glicose foi feito em meio aberto e fechado (com a presença de óleo mineral sobre o meio, impedindo a entrada de oxigênio), para confirmação se o microorganismo apresenta metabolismo de oxidação ou é uma cepa fermentadora.

O cultivo da cepa *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520 foi realizado em meio mínimo de carbazol, composto por 10g de carbazol, 10g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 5,5g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em 1L de água destilada e com 200µL de Tween 20, durante 3 dias, de acordo com a descrição de HISATSUKA E SATO (1994). A adição de surfactante foi feita para aumentar a solubilidade de carbazol em água, para garantir uma efetiva degradação deste composto.

### 3.2 Extração do DNA de alto peso molecular

A partir de cultivo da cepa em meio mínimo de carbazol foi feita a extração de DNA de alto peso molecular por dois métodos diferentes: empregando coluna comercial específica para ligação de DNA e extração com fenol/clorofórmio. A qualidade das amostras foi analisada em gel de agarose 0,8% m/v e testados para amplificação dos genes do 16S rRNA por PCR.

No protocolo de extração com fenol/clorofórmio, 1,1g de células do cultivo de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 em carbazol (60mL de meio de 3 dias de cultivo centrifugados a 10000rpm por 20min e armazenados em -20°C por cerca de 1 mês em glicerol), foram lavadas com 200mL de tampão de lavagem (10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,15M NaCl, 1mM EDTA e 20% m/v de sacarose) e centrifugadas (6000rpm por 10min a 4°C). Duas alíquotas de 0,5g de precipitado de células foram incubadas em 10mL do tampão de lavagem com adição de 5mg de lisozima por 30min a 37°C. Na seqüência, fez-se a adição de 0,55mL de SDS 25% m/v e incubação por 30min a 60°C. A lisozima age na quebra dos carboidratos da membrana celular e SDS auxilia no rompimento da membrana, formando micelas e levando à formação de grumos do material rompido. Nesta etapa, a agitação deve ser a menor possível para evitar rompimento do DNA total das células. Após, foi feita adição de 0,5mL de proteinase K (10mg/mL) em cada alíquota e incubação por 30min a 37°C. Esta enzima age na desnaturação de proteínas que se ligam ao DNA, precipitando-o, processo que é auxiliado pela adição posterior de 0,53g de NaCl dissolvido. Seguiu-se a estes procedimentos de lise celular a extração das proteínas que se encontram solúveis na fase aquosa junto com o DNA, mediante tratamentos sucessivos com solução fenol/clorofórmio e álcool isoamílico. A primeira extração de cerca de 10mL de material rompido foi feita em temperatura ambiente por 10min com 10mL de solução fenol equilibrado:clorofórmio/álcool isoamílico (1:1 v/v), agitando manualmente com muito cuidado para não ocorrer rompimento de DNA. A solução de fenol deve ser previamente saturada com tampão Tris-EDTA. O material resultante de cada extração foi centrifugado (7000rpm por 10min a 4°C) e a fase aquosa submetida a uma nova extração com igual volume de fenol:clorofórmio/álcool isoamílico (em geral três são suficientes). Ao final das extrações, em cada alíquota resultante (rendimento de cerca de 5mL) foi adicionado 5mL de etanol gelado e incubado em -80°C por 10min para precipitação de DNA de alto peso. Novamente as

alíquotas foram centrifugadas (6000rpm por 10min a 4°C) e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% v/v gelado para retirar excesso de sal, novamente centrifugado (12000rpm por 2min a 4°C), mas desta vez por menos tempo pra evitar perda de DNA. O precipitado foi seco por 5min sob vácuo em temperatura baixa, ressuspensão em 0,5mL de Tris-EDTA com 40mg/mL de ribonuclease A e incubado a 37°C por 30min para degradação de RNA. Nova extração com 0,5mL de fenol:clorofórmio/álcool isoamílico foi feita, com 10min sob agitação branda, sendo repetido o processo de precipitação com etanol. Ao final, cada alíquota de DNA total extraído foi ressuspensão em 150µL de Tris-EDTA pH 7,5 e armazenado a 4°C.

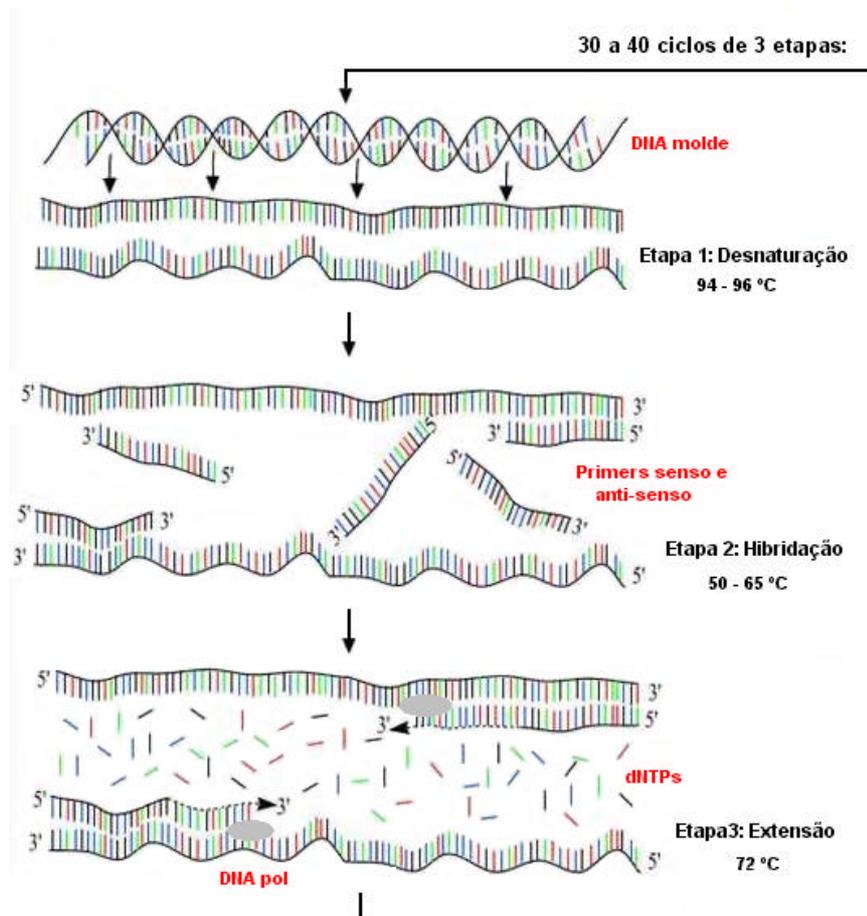
No isolamento de DNA genômico em coluna comercial, uma alíquota 15mL de células de 3 dias cultivo de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 em carbazol (armazenada em -20°C em 20% v/v de glicerol), foi ressuspensa em 150µL de tampão de lise e transferida para uma coluna do kit Wizard®SV Genomic DNA Purification System (Promega), para ligação específica de DNA. Após centrifugação (13000rpm por 3min), foi adicionado 650µL de solução de lavagem contendo 95% v/v de etanol e repetida por quatro vezes a centrifugação por 1min. Como o DNA não é solúvel em etanol, esta lavagem é feita para extração de proteínas, carboidratos e materiais orgânicos. Após secagem da coluna por centrifugação, o DNA ligado foi eluído incubando a matriz com 250µL de água livre de nucleases por 2min em temperatura ambiente e centrifugando a 13000rpm por 1min.

A análise das amostras de DNA total extraído foi feita em gel de eletroforese em 0,8% m/v de agarose em tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA (0,04M de Tris-base-Ácido acético glacial e 0,01M de EDTA). A quantificação do DNA extraído em gel foi feita empregando λDNA em concentração conhecida (Invitrogen), marcado por fluorescência com Syber Green e lido a 280nm no equipamento Storm 860 (Molecular Dynamics). O DNA obtido, após confirmação em gel de agarose, foi utilizado como molde para isolamento específico dos genes de carbazol através das técnicas de PCR, descritas na seção seguinte.

### 3.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis na metade da década do 80 para produzir cópias de regiões específicas de DNA. A técnica de PCR utiliza a enzima DNA polimerase, oligonucleotídeos sintéticos e temperatura para simular *in vitro* o processo de replicação da molécula de DNA que ocorre *in vivo*, permitindo obter maiores quantidades de um determinado gene, que codifica uma proteína de interesse biotecnológico (LARENTIS *et al.*, 2002).

A reação de PCR acontece em três etapas (WATSON *et al.* 1992, LARENTIS *et al.*, 2002): na Etapa 1, a dupla fita de DNA empregada na reação sofre desnaturação, separando-a em duas fitas simples por aquecimento em temperaturas próximas à temperatura de ebulição da água usada como solvente (em torno de 94-96°C). Para permitir que sejam feitas cópias de regiões específicas do DNA, são utilizados oligonucleotídeos que atuam como iniciadores da reação (*primers*), que são complementares a cada uma das regiões 3' do gene a ser copiado. A hibridação ou pareamento destes oligos com as regiões 3' de cada uma das fitas de DNA acontece na Etapa 2, a uma temperatura entre 45-65°C e a especificidade deste pareamento é essencial para que sejam feitas cópias das regiões corretas do DNA. Na Etapa 3, as fitas simples de DNA pareadas com os oligos agem como moldes para a síntese de uma fita de DNA complementar no sentido 5' → 3', através da ação enzimática da DNA polimerase. A enzima adiciona os nucleotídeos necessários para a correta extensão do oligonucleotídeo de forma complementar ao molde, o que acontece em temperaturas entre 65 e 75°C, a uma taxa média de 1 minuto/1 kb. A reação de PCR é conduzida em vários ciclos, de forma que as duplas fitas geradas na Etapa 3 de um ciclo sofrerão desnaturação na Etapa 1 do ciclo seguinte e atuarão como moldes para novas cópias de DNA, ocorrendo uma amplificação do número de cópias de DNA inicialmente colocado na reação, de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.2.



**Figura 3.2** Etapas da PCR (modificado de MAS *et al.*, 2001): Desnaturação (abertura) da fita molde de DNA (Etapa 1, 94-96°C); Ligação específica (hibridação) dos oligos nas fitas simples (Etapa 2, 50-65°C); Síntese das novas fitas de DNA pela extensão dos oligos sob ação da enzima DNA polimerase (Etapa 3, 72°C).

*In vivo*, o processo de replicação de DNA catalisado pela polimerase acontece com uma taxa de adição incorreta de um nucleotídeo para cada  $10^9$  corretamente incorporados à cadeia de DNA sintetizada. Esta capacidade deve-se a uma maquinaria enzimática da célula que é capaz de identificar e remover bases erroneamente incorporadas pela ação exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$ . Algumas DNA polimerases, entretanto, em sua ação *in vitro* na PCR, não apresentam esta capacidade de remoção de nucleotídeos errados. A limitação de tamanho na amplificação de DNA moldes está presumivelmente relacionada com a atividade de correção de bases erroneamente incorporadas. As taxas de extensão dos oligonucleotídeos são reduzidas quando há pareamentos mal feitos (*mismatch*), provocando significativa redução na eficiência da amplificação, principalmente para genes de tamanhos maiores (WESTFALL *et al.*,

1999). Outra característica importante das polimerases é sua atividade nas condições de altas temperaturas utilizadas na PCR. A bactéria *Thermus aquaticus* é encontrada na água a temperaturas de 75°C e sua polimerase, denominada *Taq* DNA Polimerase, tem atividade ótima a 72°C e é razoavelmente estável a 94°C (por quase 1h). Devido, entretanto, à temperatura e concentrações salinas empregadas na PCR e à ausência de atividade exonucleásica 3' → 5', a taxa de erro verificada para *Taq* DNA polimerase é de um nucleotídeo para cada 10<sup>4</sup> bases incorporadas, aproximadamente, o que provoca redução no rendimento, na fidelidade e no tamanho de produto de PCR obtido, como mostra a Tabela 3.1. Para melhorar o rendimento da PCR e contornar problemas com a baixa fidelidade da *Taq*, podem ser utilizadas DNA polimerases de hipertermofílicos, como de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) e de *Pyrococcus* sp. (*Pfx*), cujas enzimas possuem alta termoestabilidade, ou seja, são resistentes a altas temperaturas (WESTFALL *et al.*, 1999). No caso da *Pfx* DNA Polimerase, seu tempo de meia-vida a 95°C é de 12h. Como pode ser verificado na Tabela 3.1, as enzimas de *Pyrococcus* apresentam atividade exonucleásica de correção de bases erroneamente incorporadas, aumentando significativamente a fidelidade com que amplificam DNA moldes, inclusive de maiores tamanhos. A taxa de erro na adição de nucleotídeos para a enzima *Pfu*, por exemplo, é em torno de 10<sup>-6</sup> erros/base (LUNDBERG *et al.*, 1991).

**Tabela 3.1** Características das DNA polimerases termoestáveis empregadas na reação de PCR (WESTFALL *et al.*, 1999, MAS *et al.*, 2001, HOGREFE *et al.*, 2002).

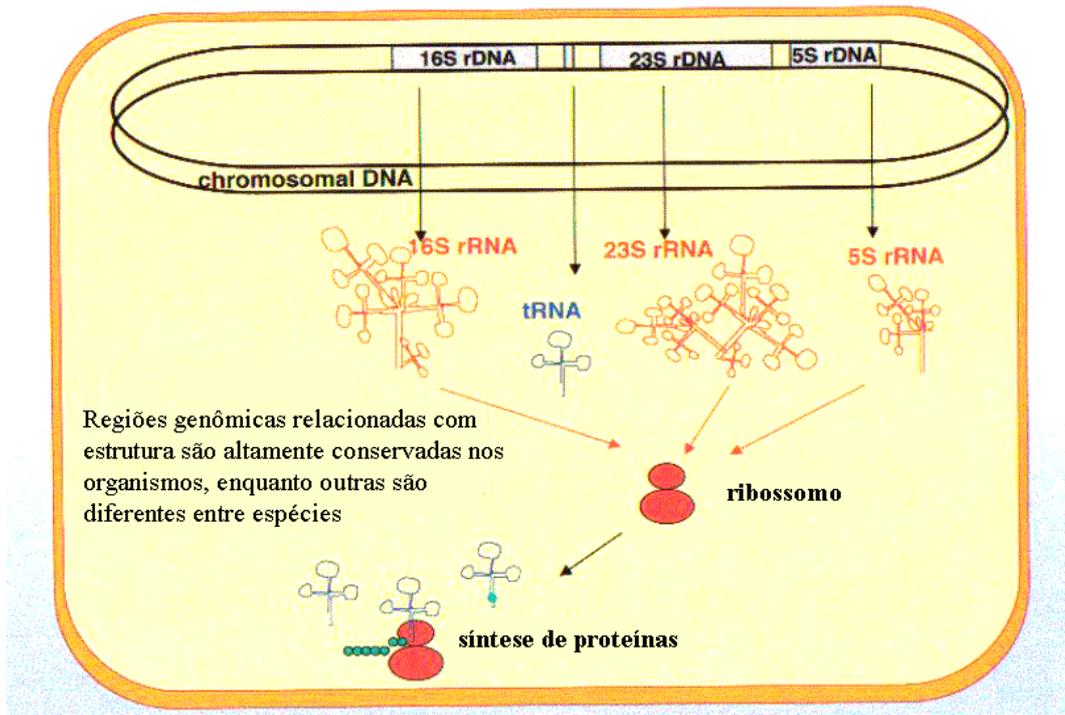
Características	DNA polimerases termoestáveis			
	<i>Taq</i> DNA polimerase (94kDa)	<i>Taq</i> DNA polimerase (61kDa)	<i>Pfu</i> DNA polimerase	<i>Pfx</i> DNA polimerase
polimerase 5' → 3'	Sim	Sim	Sim	Sim
exonuclease 5' → 3'	Sim	Não	-	-
exonuclease 3' → 5'	Não	Não	Sim	Sim
fidelidade	1X	1X	30X	48X
tamanho máximo do gene a ser amplificado	5kb	5kb	1kb	12kb

### 3.3.1 Quantificação de DNA genômico para amplificação por PCR

A quantidade de DNA genômico de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 empregado nas reações de PCR foi determinada em gel de agarose 0,8% m/v: 0,1 µg DNA molde/50 µL, de acordo com a descrição de SHEPHERD E LLOYD-JONES (1998). Foram aplicadas em gel de agarose amostras de DNA extraído com coluna comercial eluído de acordo com procedimentos descritos pelo fabricante (kit 1:1) e diluídos 10 e 100 vezes (kit 1:10 e 1:100). Para DNA genômico extraído com fenol/clorofórmio, a solução obtida no final dos procedimentos (fenol 1:1), assim como sua diluição por 4, 50 e 200 vezes (fenol 1:4, 1:50 e 1:200), também foram observados em gel de agarose.

### 3.3.2 Identificação do 16S rRNA

Os três domínios distintos originados na evolução dos organismos a partir de um ancestral comum foram classificados, há cerca de vinte anos, por Woese e colaboradores (CARDOSO *et al.*, 2003), em Bacteria, Archaea e Eucarya e diferenciam-se pelas seqüências do gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA). As seqüências de rRNA são universalmente distribuídas entre os organismos, funcionalmente constantes, mas moderadamente conservadas. Nos procariotos, os genes que codificam as três espécies de rRNA (16S, 23S e 5S) estão organizados em um operon como uma única unidade funcional de transcrição, como mostrado no esquema dos DNAs e RNAs ribossomais de bactérias na Figura 3.3. Os genes 16S e 23S estão separados por regiões que possuem um grande grau de variabilidade tanto no tamanho quando na seqüência, devido principalmente à presença de varias unidades funcionais, como tRNA, sendo únicas não só entre gêneros, mas também entre espécies. Pelo tamanho de determinadas seqüências genômicas do 16S rRNA é possível diferenciar o domínio ao qual o organismo pertence e pela seqüência é possível diferenciar o gênero e muitas vezes entre espécies.



**Figura 3.3** Esquema da estrutura genética do RNA ribossomal de bactérias.

Para confirmação da espécie da cepa empregada, foram amplificadas duas regiões do 16S rRNA empregando oligos direto e reverso específicos para bactérias. Os DNAs de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 extraídos por coluna comercial e empregando protocolo com fenol/clorofórmio foram utilizados na amplificação de partes do gene que codifica o 16S rRNA da bactéria, para confirmação da espécie. Foram empregados os oligonucleotídeos 968FB, 1401RB, 27FB e 907RAB, nomeados de acordo com a posição de cada seqüência encontrada no genoma de *Escherichia coli* (seqüências apresentadas na Tabela 3.2).

A seqüência amplificada na bactéria *Pseudomonas stutzeri* deve ter aproximadamente o mesmo tamanho dos genes, de cerca de 400pb empregando o conjunto de oligos 968FB e 1401RB e de cerca de 900pb para o gene amplificado com 27FB e 907RAB.

**Tabela 3.2** Seqüência dos oligonucleotídeos empregados para amplificação de genes que codificam o 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) por PCR. F indicam os oligos diretos (*forward*) e R os reversos (*reverse*). A numeração que dá nome a eles indica a posição na seqüência de 16S rRNA de *Escherichia coli*. A base degenerada M indica A ou C.

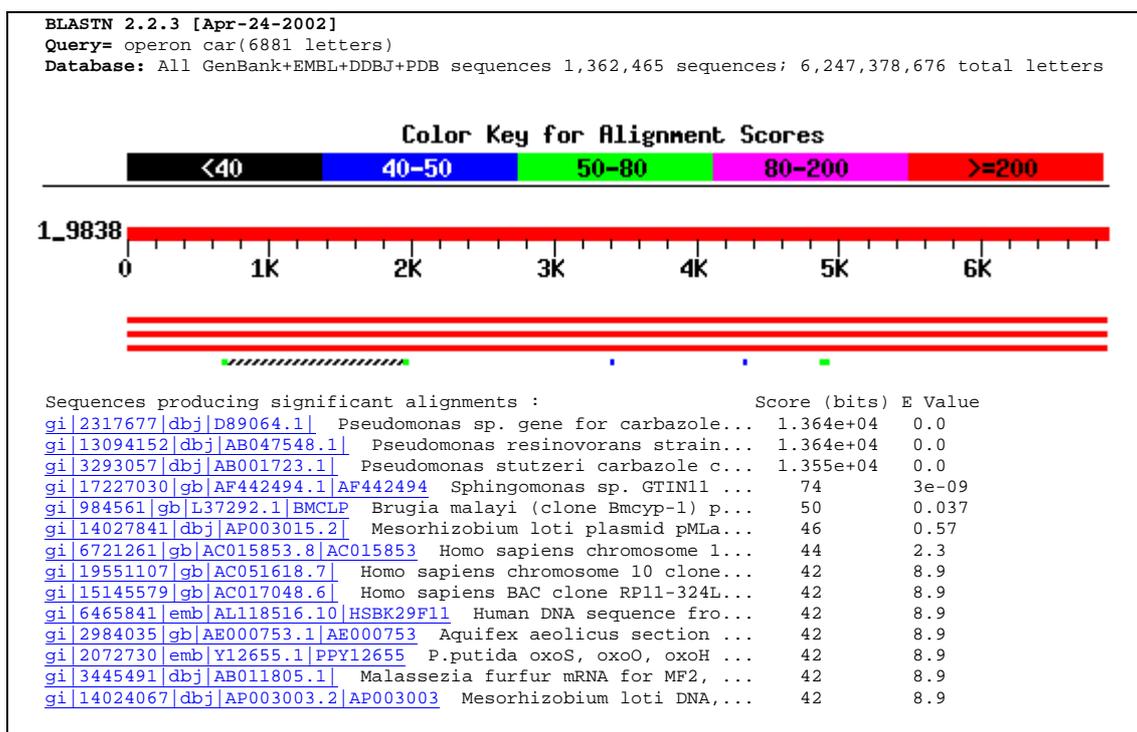
Oligonucleotídeo	Seqüência do oligo
27FB	5' - AGAGTTTGGATCATGGCTCAG - 3'
907RAB	5' - CCGTCAATTCMTTGGAGTTT - 3'
968FB	5' - AACGCGAAGAACCTTAC - 3'
1401RB	5' - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG - 3'

As amplificações dos fragmentos do 16S rRNA foram realizadas em volumes de reação de 50µL em tubo de 0,5mL, empregando enzima recombinante DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (*Taq*) purificada com base no protocolo descrito por ENGELKE *et al.* (1990). As reações foram feitas com tampão de *Taq* (concentração final na reação de 20mM de Tris-HCl pH 8,4, 50mM de KCl e 1,5mM MgCl<sub>2</sub>), 200µM de cada tipo de dNTP, 50pmol (1µM) de cada um dos oligos e cerca de 50ng de DNA genômico de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258. Foram utilizadas 12,5U de *Taq* (5U/µL) para o conjunto de oligos 968FB/1401R e 5U da mesma enzima para o conjunto de oligos 27FB/907RAB. O DNA genômico de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi utilizado como controle positivo para a reação de PCR. O controle negativo foi feito empregando todas as soluções com exceção de DNA molde.

A operação empregada no termociclador PTC100 (MJ Research) para a amplificação dos genes de 16S rRNA por PCR foi de 3min a 94°C, 30 ciclos de 1min30s cada: 94°C para abertura da fita dupla, 50°C de anelamento dos oligos e 72°C para extensão dos oligos e cópia do molde, finalizando a reação por 15min a 72°C, antes de resfriar a 4°C.

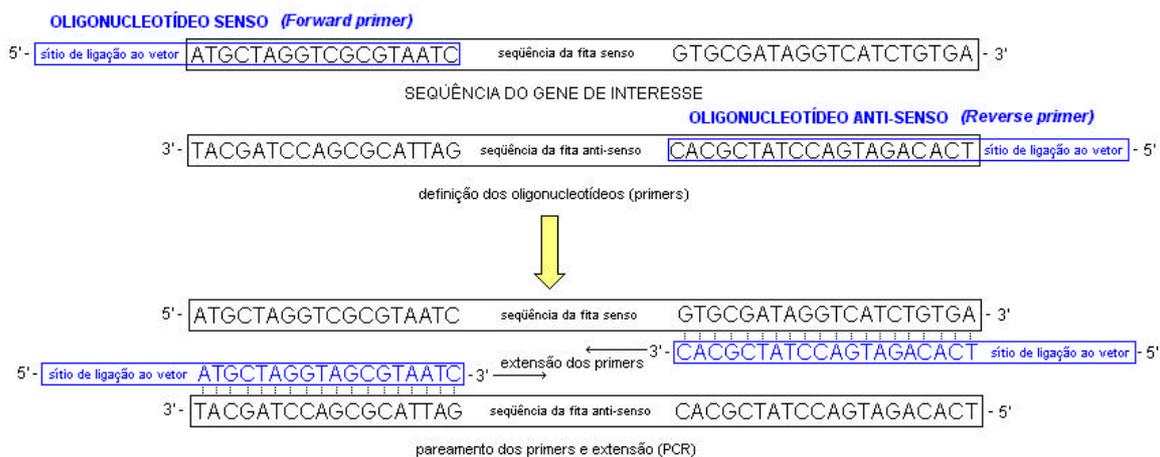
### 3.3.3 Desenho dos oligos para amplificação dos genes do operon *car*

Os oligonucleotídeos específicos usados para amplificação dos genes do operon *car* em quatro partes (*carAa*, *carBaBb*, *carC* e *carAcORF7carAd*) foram desenhados de acordo com os genes da cepa *Pseudomonas resinovorans* CA10 (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b) e *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998), com 99% de identidade, como indicado nos resultados de alinhamento programa TBLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997) apresentados na Figura 3.4.



**Figura 3.4** Resultados de alinhamento por BLASTN entre a seqüência do gene do operon *car* e o banco de dados completo (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB).

Os oligonucleotídeos empregados como iniciadores da PCR foram desenhados a partir do conhecimento das seqüências de bases que codificam as extremidades de cada proteína (regiões N e C-terminais), de acordo com a região 5' de cada fita, de forma a parear com a extremidade 3' complementar na etapa de anelamento da PCR, como mostrado na Figura 3.5.



**Figura 3.5** Esquema de desenho dos oligos para amplificação específica de genes por PCR.

No desenho dos oligos para uso do plasmídeo de entrada do sistema GATEWAY<sup>TM</sup>, utilizando a enzima topoisomerase (plasmídeos pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> e pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>), é necessário adicionar a seqüência CACC na extremidade 5' dos oligonucleotídeos diretos, antes do códon de iniciação, para ligação dos produtos de PCR. Além disso, as seguintes considerações foram seguidas para definição dos oligos (MAS *et al.*, 2001, PREZIOSO, 2001): mínimo de 21 bases pareando com o gene a ser amplificado; quantidade de G + C aproximadamente 50% do total de bases do oligo e a relação de purinas/pirimidinas máxima de 60% / 40% (AG/CT = 1,5); temperatura de hibridação (ideal para pareamento entre os oligos e o DNA) entre 60 e 65°C. Esta temperatura pode ser estimada empiricamente para oligos com 18–24 bases (MAS *et al.*, 2001, PREZIOSO, 2001) como  $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$  e  $T_{hibridação} = (T_m - 5^{\circ}C)$ , indicando que os oligos desenhados devem ter uma  $T_m$  máxima de 70°C e o mais próximo possível para cada par de iniciadores da PCR.

Verifica-se pela Tabela 3.3 que a maioria dos oligos desenhados foi obtida seguindo as regras que otimizam a amplificação por PCR. Alguns deles ficaram com temperaturas de fusão um pouco altas, devido à escolha feita de utilizar no mínimo 7 códons para garantir o alinhamento correto e à exigência da adição da seqüência para TOPO, com três citosinas. O oligo para o plasmídeo 4 foi desenhado além do códon de fim do gene, pois a grande quantidade de A e T ao final de *carAd* iria exigir maior número de bases para atingir uma temperatura de fusão compatível com as demais, o que elevaria seu custo.

**Tabela 3.3** Sequência e propriedades dos oligos desenhados para amplificação por PCR das regiões 5' e 3' dos genes do operon *car* (sublinhados), complementares às sequências de bases nestas regiões. Os códons de início e fim de cada gene estão marcados em cinza. Em vermelho está indicada a troca do códon de início GTG de *carAa* pelo códon canônico ATG no oligo.

Plasmídeo 1: Genes que codificam a subunidade CarAa (1155pb)	
(14 G+C e 10 T+A, Tm=74°C)	(14 A+G e 10 C+T, AG/CT=1,4)
CarAa1f: Oligonucleotídeo direto ( <i>Forward primer</i> )	
5'- <u>C A C C</u> <u>atg</u> gcg aac gtt gat gag gc ... ( <i>carAa</i> ) ... c caa gcg cac gtt tgc ggc <u>tga</u> -3'	3'- cac cgc ttg caa cta ctc cg ... ( <i>carAa</i> ) ... <u>g gtt cgc gtg</u> caa agc ccg act -5'
CarAa2r: Oligonucleotídeo Reverso ( <i>Reverse primer</i> )	
(14 G+C e 8 T+A, Tm=72°C)	(11 A+G e 11 C+T, AG/CT=1,0)
Plasmídeo 2: Genes que codificam as subunidades CarBa e CarBb (1082pb)	
(12 G+C e 11 T+A, Tm=70°C)	(12 A+G e 11 C+T, AG/CT=1,1)
CarB1f: Oligonucleotídeo direto ( <i>Forward primer</i> )	
5'- <u>C A C C</u> <u>atg</u> gct cga tat gaa gtc g ... ( <i>carBaBb</i> ) ... gga gga atg gaa ttt cat gtt aaa <u>taa</u> -3'	3'- tac cgc tct ata ctt cag c ... ( <i>carBaBb</i> ) ... <u>cct cct tac ctt</u> aaa gta caa ttt att -5'
CarB2r: Oligonucleotídeo Reverso ( <i>Reverse primer</i> )	
(8 G+C e 19 T+A, Tm=70°C)	(9 A+G e 18 C+T, AG/CT=0,5)
Plasmídeo 3: Gene que codifica proteína CarC (873pb)	
(9 G+C e 19 T+A, Tm=74°C)	(16 A+G e 12 C+T, AG/CT=1,3)
CarC1f: Oligonucleotídeo direto ( <i>Forward primer</i> )	
5'- <u>C A C C</u> <u>atg</u> tta aat aaa gct gaa caa atc ... ( <i>carC</i> ) ... gac att acc cgt gct gcc gca <u>taa</u> -3'	3'- tac aat tta ttt cga ctt gtt tag ... ( <i>carC</i> ) ... <u>ctg taa tgg gca cga cgg cgt att</u> -5'
CarC2r: Oligonucleotídeo Reverso ( <i>Reverse primer</i> )	
(13 G+C e 11 T+A, Tm=74°C)	(13 A+G e 11 C+T, AG/CT=1,2)
Plasmídeo 4: Genes que codificam as subunidades CarAc, ORF7 e CarAd (1666pb)	
(10 G+C e 16 T+A, Tm=72°C)	(15 A+G e 11 C+T, AG/CT=1,4)
CarAcAd1f: Oligonucleotídeo direto ( <i>Forward primer</i> )	
5'- <u>C A C C</u> <u>atg</u> aac caa att tgg ttg aaa g ... ( <i>carAcORF7Ad</i> ) ... gac gca ttt ttc <u>taa</u> cac cta tgg ag -3'	3'- tac ttg gtt taa acg aac ttt c ... ( <i>carAcORF7Ad</i> ) ... <u>ctg cgt aaa aag att gtg gat acc tc</u> -5'
CarAcAd2r: Oligonucleotídeo Reverso ( <i>Reverse primer</i> )	
(11 G+C e 15 T+A, Tm=74°C)	(14 A+G e 12 C+T, AG/CT=1,2)

### 3.3.4 Condições empregadas para amplificação dos genes do operon *car*

A amplificação dos genes *car* por PCR foi feita empregando 50ng de DNA de alto peso de *Pseudomonas stutzeri* (quantificado em gel de agarose), 1,25U de DNA polimerase de alta fidelidade de *Pyrococcus furiosus* (*Pfx*, Invitrogen), 2,5µL de tampão de amplificação e de solução *Enhancer* para *Pfx* (Invitrogen), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada tipo de dNTP, 1µM dos oligos direto e reverso específicos em 25µL de reação. A enzima *Pfx* apresenta atividade exonucleásica 3'-5' que permite a identificação e remoção de bases erroneamente incorporadas ao DNA. As condições empregadas na PCR foram obtidas a partir da descrição de SHEPHERD E LLOYD-JONES (1998), assim como a operação do temociclador (PTC100, MJ Research) para a reação de PCR: 5min a 94°C, 25 ciclos compostos por 3 etapas (abertura da fita dupla: 2min a 94°C, anelamento dos oligos: 1min a 52°C e extensão dos oligos e cópia do molde: 2min a 72°C) e manutenção do último ciclo por 10min a 72°C, antes de resfriar a 4°C. O controle negativo do PCR foi feito empregando água no lugar de DNA molde.

Para amplificação do operon *car* completo (de 5,8kb) foram usadas inicialmente as mesmas condições testadas para os genes do operon *car*, com enzima *Pfx* (Invitrogen). A partir deste protocolo foram modificados: tempos de extensão da reação de PCR (6 e 9min), concentração de oligonucleotídeos (300µM) e concentrações de Mg (curva de magnésio com 0,25mM, 0,5mM, 0,75mM, 1,0mM, 1,5mM e 2,0mM), mistura de 2,5U de *Pfx* com 0,5U de *Taq* DNA polimerase (WESTFALL *et al.*,1995).

A confirmação do resultado na PCR foi feita por gel de agarose 1% (m/v) em tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA, pela obtenção de fragmentos de aproximadamente 1100pb (*carAa*), 1000pb (*carBaBb*), 900bp (*carC*), 1700bp (*carAcORF7carAd*) para cada um dos genes do operon *car*. Na amplificação do operon *car* completo (*carABC*) pode ser obtida uma banda de cerca de 6kb e outra de 5kb (visto que o gene *carAa* encontra-se duplicado).

### 3.4 Purificação dos produtos de PCR

Após a confirmação dos tamanhos de cada um dos genes *car*, as reações de PCR (em triplicata) foram submetidas à purificação empregando gel de agarose *low melting*, que apresenta baixo ponto de fusão, sendo, portanto, de mais fácil solubilização, para facilitar a eluição do DNA. Os produtos de PCR foram recolhidos de corrida em gel agarose *low melting* 1% m/v, com baixa amperagem (20mA) e tampão Tris-Acetato-EDTA, através da visualização e retirada das bandas correspondentes aos genes desejados em UV (350nm), com a confirmação do tamanho pelo marcador de peso molecular.

A eluição dos produtos de PCR da agarose (armazenados em  $-20^{\circ}\text{C}$  por cerca de 1 mês) foi feita em volume de 500 $\mu\text{L}$  (completado com água ultrapura) empregando temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  por 10-15min, sob agitação esporádica. A seguir o DNA foi submetido a protocolo de extração com igual volume de fenol P.A. equilibrado a pH 8,0 com 0,1M de Tris-HCl (USB), para desnaturação de proteínas que estejam adsorvidas junto ao DNA, sem desnaturação do material genético. Após centrifugação (14000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10min), a fase aquosa superior foi submetida à nova extração de proteínas e lipídeos, respectivamente com 250 $\mu\text{L}$  de fenol e 250 $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi submetida a 500 $\mu\text{L}$  de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para retirar resíduos de fenol (que inibem as enzimas de clonagem). À fase aquosa (que contém o DNA) resultante desta etapa foi adicionado o equivalente a 1/10 de volume (cerca de 45 a 50 $\mu\text{L}$ ) de acetato de sódio 3M pH5,2 e 1 volume (500 $\mu\text{L}$ ) de isopropanol, provocando a precipitação do DNA devido a efeito *salting-out*, em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante a noite. O DNA precipitado foi centrifugado (14000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30min), lavado com 200 $\mu\text{L}$  de etanol 70% v/v gelado e imediatamente submetido à centrifugação (máximo 5min para evitar solubilização do DNA na água). Após a secagem do solvente restante no meio (sob vácuo por 30min), os produtos de PCR foram solubilizados em água autoclavada ultrapura com controle de condutividade superior a 18M $\Omega$  (Milli-Q). A quantificação foi feita em gel de agarose 1% (m/v) com vetor comercial pBluescript<sup>®</sup> II SK (Stratagene) linearizado com *KpnI* (GGTAC C) em concentração 25ng/ $\mu\text{L}$  para determinar os volumes a serem empregados de cada produto de PCR na clonagem com os sistemas TOPO/GATEWAY (Invitrogen).

## 3.5 Clonagem

A estratégia empregada para clonagem das enzimas da rota de degradação de carbazol foi a de recombinação sítio-específica, sistema de vetores de clonagem *in vitro* derivados do sistema de lisogenia do bacteriófago lambda (HARTLEY *et al.*, 2000), aliado à utilização da enzima topoisomerase para ligação dos produtos de PCR a um plasmídeo comercial próprio (HEYMAN *et al.*, 1999).

### 3.5.1 Sistema de clonagem por Recombinação sítio-específica

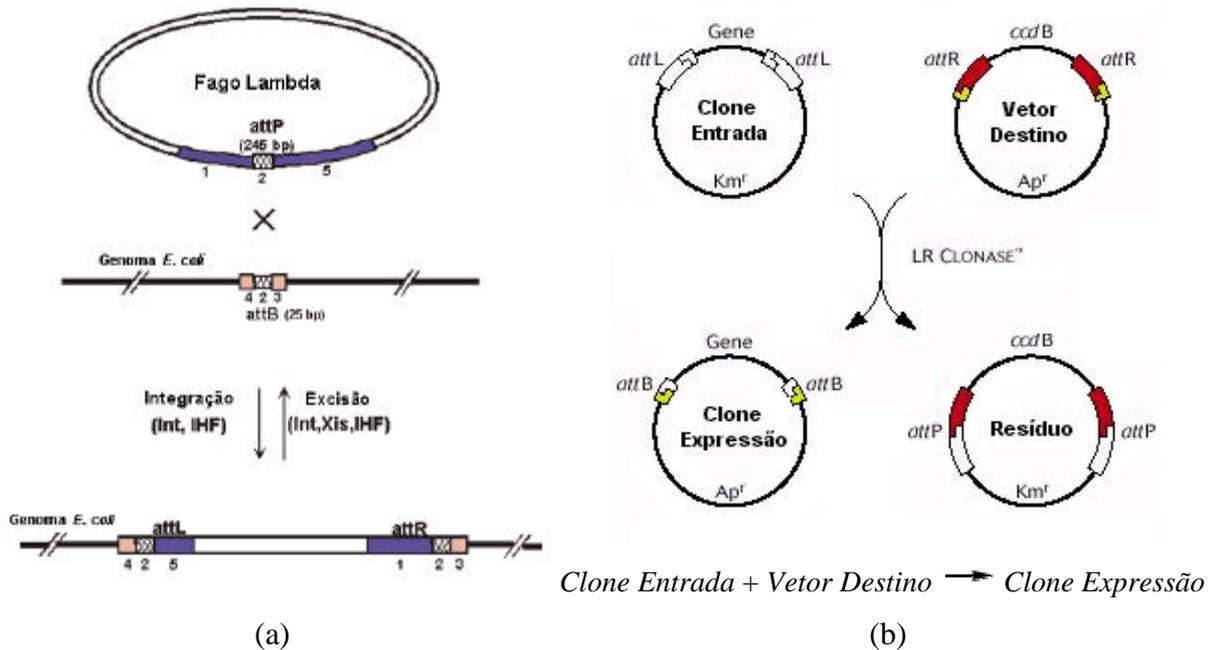
O bacteriófago lambda pode ser integrado ao genoma de *Escherichia coli* por um processo chamado lisogenia, através do qual o sítio *attP* do fago recombina com sítio *attB* da bactéria, catalisado por um sistema de proteínas de recombinação sítio-específica chamadas Int (*integrase*), Xis (*excisionase*) e IHF (*Integration Host Factor*). As enzimas lambda integrases (pertencentes à família das recombinases), além de altamente específicas, são enzimas conservativas, ou seja, atuam sem ganho ou perda de nucleotídeos. Duas reações ocorrem no sistema (como mostra a Figura 3.6):

(1)  $attB \times attP \rightarrow attL + attR$  (mediada por Sistema BP Clonase: Int e IHF)

(2)  $attL \times attR \rightarrow attB + attP$  (mediada por Sistema LR Clonase: Int, IHF e Xis).

O sistema de clonagem por recombinação ocorre por reações *in vitro* a partir de dois vetores: um vetor chamado Clone de Entrada (*Entry Clone*) que contém o segmento de DNA (gene, ORF, produto de PCR) a ser transferido (*attL1-gene-attL2*) e outro chamado Vetor de Destino (*Destination Vector*), para o qual o DNA será subclonado (*attR1-ccdB-attR2*). A incubação destes DNAs com o sistema de proteínas denominado LR Clonase forma uma molécula cointegrada e a partir dela ocorre a transferência do segmento de DNA clonado ao Vetor de Destino. O vetor resultante, que contém o gene de interesse (*attB1-gene-attB2*), é chamado Clone de Expressão (*Expression Clone*). As reações são altamente específicas, ou seja, os sítios *attB1*

recombinam com *attP1*, mas não com *attP2*, assim como sítios *attL1* recombinam somente com *attR1*, mas não com *attR2*.

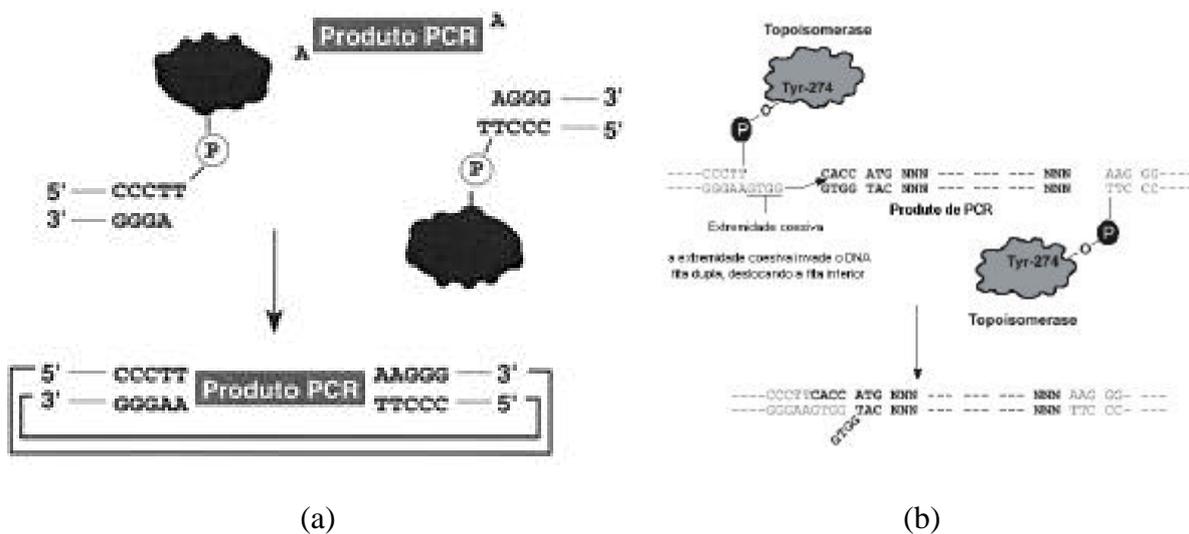


**Figura 3.6** Processo de lisogenia, para integração *in vivo* do fago lambda ao genoma de *Escherichia coli* (a) e sistema de clonagem de DNA *in vitro* usando recombinação sítio-específica baseada no processo de lisogenia (b).

O sistema de recombinação sítio-específica elimina o uso de enzimas de restrição e permite a inserção de um gene simultaneamente em múltiplos vetores (Vetores de Destino) em paralelo (vetores para *Escherichia coli*, leveduras, células de mamíferos, baculovírus, sistemas com proteínas de fusão His, GST que facilitam a purificação) produzindo múltiplos Clones de Expressão. Podem ser alcançadas eficiências de clonagem maiores que 90% em reações rápidas em temperatura ambiente. A técnica permite que qualquer tipo de vetor possa ser simultaneamente transformado, mantendo a orientação do segmento de DNA durante a recombinação (HARTLEY *et al.*, 2000).

### 3.5.2 Sistema de clonagem empregando Topoisomerase

A enzima topoisomerase pode ser utilizada nas técnicas de clonagem molecular, para ligação de produto de PCR em um vetor de expressão usando uma única etapa, como mostrado na Figura 3.7. As enzimas DNA topoisomerasas atuam na replicação do DNA, catalisando a clivagem e a religação das fitas e promovendo a relaxação do DNA. Existem dois tipos de DNA topoisomerasas: as que clivam uma fita (tipo I) e as que são capazes de clivar duas fitas de DNA durante a reação catalítica (tipo II). Esta enzima, isolada de partículas virais em 1977, é capaz de ligar-se à fita dupla de DNA e romper a ligação fosfodiéster de uma fita, com alta especificidade no reconhecimento de seqüências do tipo 5'-(C/T)CCTT, atuando de forma similar a enzimas de restrição (SHUMAN, 1994, SHUMAN, 1998).



**Figura 3.7** (a) Esquema geral de clonagem usando a enzima Topoisomerase (HEYMAN *et al.*, 1999) e (b) especificamente para Vetores de Entrada contendo a extremidade coesiva GTGG, extraído do Manual TOPO® (Invitrogen).

### 3.5.3 Condições empregadas na clonagem

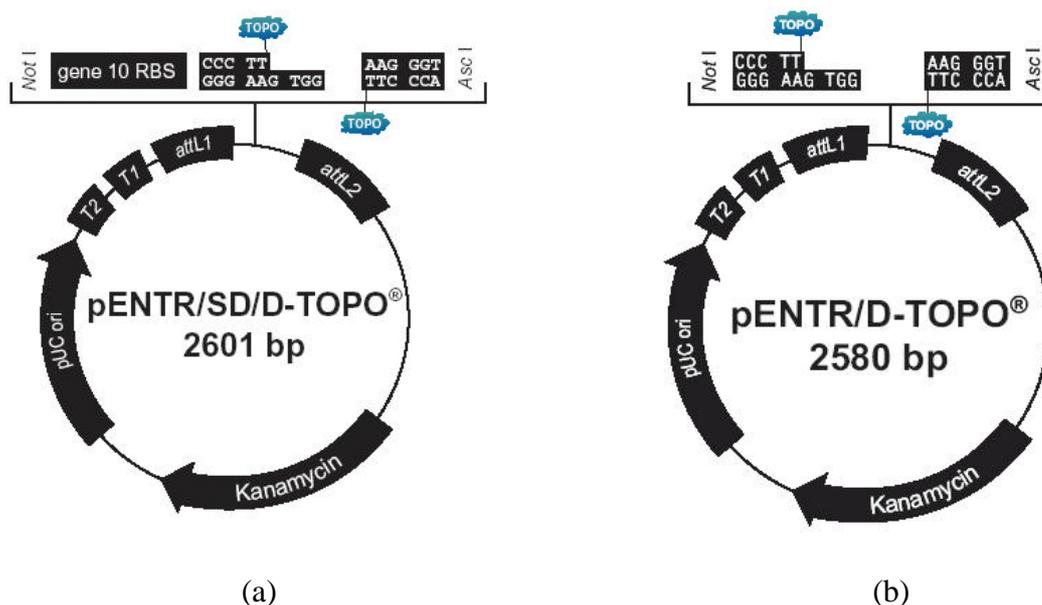
A ligação dos produtos de PCR de cada gene (cerca de 15-20ng) foi feita com 1µL (5-10ng) de vetor pENTR/SD/D-TOPO® de 2601pb (Invitrogen) contendo a enzima topoisomerase, 50mM de NaCl, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, em volume final de 6µL, por 2h a temperatura ambiente. O material resultante da ligação foi submetido à diálise em água ultrapura para retirada de sais com membrana comercial (Millipore), por cerca de 3h,

para posterior transformação em *Escherichia coli* DH10B eletrocompetente. A seleção das colônias e confirmação da ligação com os produtos de PCR aos vetores de entrada foi feita empregando digestão com enzimas de restrição e PCR empregando as colônias como DNA molde, de acordo com as descrições nas seções seguintes.

A reação de recombinação sítio-específica do sistema GATEWAY™ (Invitrogen) foi feita empregando cerca de 100ng (0,5µL) dos plasmídeos pENTR/SD/D-TOPO® ligados aos produtos PCR *car*, após confirmação por PCR e digestão, extraídos com coluna comercial específica para DNA GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) e dosados em gel de agarose 1% m/v, 75ng de pDEST™14 de 6422pb (Invitrogen), 0,5µL de LRClonase (mistura de enzimas recombinases Invitrogen), 1µL de tampão de reação LR (Invitrogen) 5X, em 5µL de reação por 4h a temperatura ambiente. Os produtos de clonagem dos dois vetores foram submetidos à diálise em água ultrapura para retirada de sais com membrana comercial (Millipore), por 2h30min a 3h.

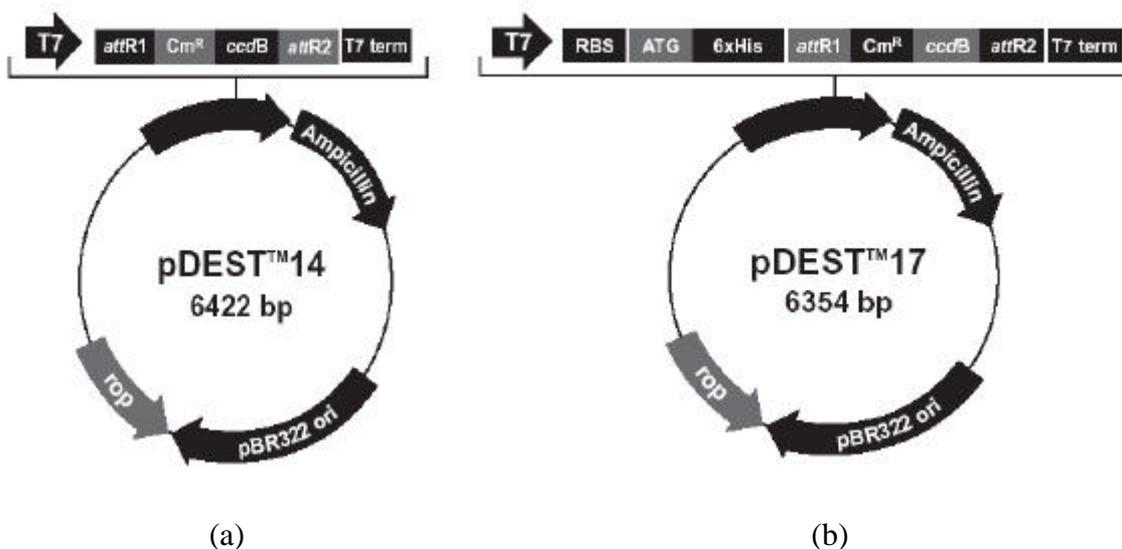
Para o gene *carBaBb*, que codifica a dioxigenase de *meta*-clivagem, além da clonagem em sistema na forma nativa, foi feita clonagem empregando cauda de histidina, para permitir a purificação em coluna de afinidade de níquel. Os procedimentos foram feitos de forma idêntica aos descritos para os vetores de entrada e de expressão das proteínas de forma nativa, mas empregando, respectivamente, os vetores pENTR/D-TOPO® de 2580bp (Invitrogen) e pDEST™17 de 6354pb (Invitrogen). As características dos vetores empregados estão descritas nas Figuras 3.8 e 3.9.

### 3.5.4 Vetores empregados



	pENTR/SD/D-TOPO® (2601bases)	pENTR/D-TOPO® (2580 bases)
seqüência de terminação da transcrição <i>rrnB</i> T2	bases 268-295	bases 268-295
seqüência de terminação da transcrição <i>rrnB</i> T1	bases 427-470	bases 427-470
sítio para oligo direto M13 (-20)	bases 537-552	bases 537-552
<i>attL1</i> (fita complementar)	bases 569-668	bases 569-668
ativador da transcrição gene 10 do sistema T7	bases 684-692	-
sítio de ligação ribossomal (RBS)	bases 694-700	-
sítio 1 de reconhecimento TOPO®	bases 701-705	bases 680-684
seqüência coesiva ( <i>overhang</i> )	bases 706-709	bases 685-688
sítio 2 de reconhecimento TOPO®	bases 710-714	bases 689-693
<i>attL2</i>	bases 726-825	bases 705-804
sítio para oligo reverso M13	bases 866-882	bases 845-861
gene de resistência à canamicina	bases 995-1804	bases 974-1783
Origem de replicação pUC	bases 1925-2598	bases 1904-2577

**Figura 3.8** Vetores de entrada do sistema GATEWAY™ (pENTR/SD/D-TOPO® e pENTR/D-TOPO®) acoplado com sistema TOPO® (uso enzima topoisomerase para ligação de produto de PCR, em substituição de uma enzima de restrição e uma ligase).



	pDEST™17 (6354 bases)	pDEST™14 (6422 bases)
promotor T7	bases 21-40	bases 21-40
sítio de ligação ribossomal (RBS)	bases 86-92	-
sítio de iniciação da tradução ATG	bases 101-103	-
cauda de histidina (6xHis)	bases 113-130	-
attR1	bases 140-264	bases 67-191
gene de resistência a cloramfenicol (Cm <sup>R</sup> )	bases 373-1032	bases 441-1100
gene ccdB	bases 1374-1679	bases 1442-1747
attR2	bases 1720-1844	bases 1788-1912
região T7 de terminação da transcrição	bases 1855-1983	bases 1923-2051
promotor bla	bases 2471-2569	bases 2539-2637
gene de resistência à ampicilina (bla)	bases 2570-3430	bases 2638-3498
origem de replicação pBR322	bases 3575-4248	bases 3643-4316
ORF rop (fita complementar)	bases 4619-4810	bases 4687-4878

**Figura 3.9** Vetores de expressão pDEST™17 e pDEST™14 do sistema GATEWAY™ (Invitrogen).

### 3.6 Preparação de células eletrocompetentes

A cepa *Escherichia coli* DH10B ( $F^-$  *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *ara*Δ139 Δ(*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ- *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *nupG*) foi empregada como hospedeiro para os vetores de clonagem construídos e para seqüenciamento. A transformação dos hospedeiros com os plasmídeos de clonagem foi feita por eletroporação das células DH10B previamente submetidas a sucessivas lavagens com água ultrapura (DOWER *et al.*, 1988), objetivando a retirada de sal do meio para evitar formação de arco na cubeta ao submeter as células a choque elétrico.

O protocolo empregado para obtenção de células eletrocompetentes consistiu em inocular uma colônia isolada de placa LB ágar (1,5% m/v) com 50µg/mL de estreptomicina em meio líquido LB com a mesma concentração de antibiótico. Após crescimento deste pré-inóculo por cerca de 15-16h a 37°C e 200rpm, foi feito um inóculo de 500mL de LB em erlenmeyer de 1L, incubando novamente a 37°C e 200rpm até crescimento na fase exponencial (foi atingido cerca de  $Abs_{600nm}=0,7$ ). As células foram então submetidas a banho de gelo por 15-20min, transferidas para dois tubos de centrífuga de 500mL estéreis e centrifugadas por 15min a 5000rpm e 4°C (centrífuga HimacCR21, Hitachi refrigerada). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em glicerol 10% v/v estéril gelado, com auxílio de um pincel de cerdas flexíveis (esterilizado), até um volume de 500mL de glicerol 10% v/v estéril gelado. As células lavadas foram novamente centrifugadas (15min a 5000rpm e 4°C) e ressuspensas em 250mL de glicerol 10% v/v gelado. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 1mL do mesmo meio, em gelo e com cuidado, aliqüotadas com 40-50µL em tubos de 1,5mL, congeladas em solução de gelo seco e etanol (temperatura de cerca de -50°C) posterior armazenamento em -70°C.

### **3.7 Transformação de *Escherichia coli***

As células eletrocompetentes de *Escherichia coli* foram utilizadas como hospedeiros para os plasmídeos com os genes de degradação de carbazol, com transformação feita por choque elétrico.

#### **3.7.1 Determinação das melhores condições de eletroporação e de competência**

Foram testadas várias condições de eletroporação (voltagem, capacitância, resistência) de plasmídeos comerciais circulares com resistência à ampicilina (pUC e pBluescript) em *Escherichia coli* DH10B eletrocompetente. Após receber o choque elétrico empregando equipamento Gene Pulser<sup>®</sup> II (Bio-Rad), as células foram ressuspensas em 1mL de LB estéril (NaCl 1% m/v, bactotripton 1% m/v e extrato de levedura 0,5% m/v, pH7,5 ajustado com NaOH) ou SOC estéril (2% m/v tripton, 0,5% m/v extrato de levedura, 1% m/v NaCl 1M, 0,25% m/v KCl 1M, 1% m/v  $Mg^{2+}$  2M,

1% m/v glicose 2M) e incubadas a 37°C e 200rpm. Após 1h, um percentual do meio foi plaqueado em LB ágar (1,5% m/v) com ampicilina 100µg/mL, de acordo com a quantidade de plasmídeo empregado na eletroporação, para contagem de colônias obtidas após 20h em estufa a 37°C. Os números de ufc (unidades formadoras de colônias) obtidos em cada condição estão apresentados na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** Condições de transformação por eletroporação em equipamento Gene Pulser® II (Bio-Rad) empregando *Escherichia coli* DH10B eletrocompetente (alíquotas armazenadas em -70°C), medidas pelo número de colônias isoladas obtidas (ufc) após plaqueamento em LB com ampicilina. Controle negativo feito por plaqueamento de DH10B sem plasmídeo.

Testes de parâmetros de eletroporação com diferentes quantidades de DNA plasmidial					
	10pg de DNA (1µL de pUC19 10pg/µL)				
Condição número	1	2	3	4	5
Voltagem	1,25kV	1,80kV	1,25kV	1,80kV	1,80kV
Capacitância	50µF	50µF	50µF	50µF	25µF
Resistência	100Ω	100Ω	200Ω	200Ω	200Ω
Tempo de choque	5,34ms	5,12ms	9,78ms	9,88ms	4,98ms
Colônias obtidas (20% meio plaqueado)	Nenhuma	175ufc	35ufc	223ufc	270ufc
	100pg de DNA (1µL de pUC19 100pg/µL)				
Condição número	1A		3A		
Parâmetros eletroporação	(idem 1)		(idem 3)		
Tempo de choque	5,18ms		9,96ms		
Colônias obtidas (5% meio plaqueado)	96ufc		318ufc		
Testes de meio de ressuspensão de células após a eletroporação (pBluescript 1ng/µL)					
Condição número			3B-SOC	3B-LB	
Parâmetros eletroporação			(idem 3)	(idem 3)	
Meio de ressuspensão			SOC	LB	
Quantidade de DNA			500pg	1000pg	
Colônias obtidas (0,5% meio plaqueado)			22ufc	7ufc	

### 3.7.2 Condições de eletroporação empregadas

As transformações dos plasmídeos construídos para os genes *car* por eletroporação foram feitas com alíquotas de 40-50µL de *Escherichia coli* DH10B previamente submetidas à extração com água ultrapura estéril (protocolo de células competentes) e armazenadas a -70°C, de eficiência superior a 10<sup>8</sup>ufc/µg DNA,

empregando cubeta de 0,1cm de espessura entre os eletrodos, submetendo-a a uma descarga elétrica de cerca de 5ms com voltagem de 1,80kV, capacitância de 25 $\mu$ F e resistência de 200 $\Omega$  em eletroporador Gene Pulser<sup>®</sup> II (Bio-Rad). Imediatamente após o choque as células foram ressuspensas em meio SOC estéril por 1h a 37°C sob agitação de 200rpm e plaqueadas em LB ágar com o antibiótico a que o plasmídeo confere resistência para seleção das transformantes positivas. As placas da transformação foram incubadas em estufa a 37°C, por cerca de 20h. As condições de eletroporação empregadas foram as que apresentaram melhores resultados, de acordo com a Tabela 3.4. A competência da célula *Escherichia coli* DH10B empregada ( $10^8$ ufc/ $\mu$ g DNA) foi calculada nesta condição. Protocolo semelhante foi empregado na transformação de *Escherichia coli* BL21-SI com os plasmídeos de expressão.

### **3.8 Seleção dos clones e propagação de plasmídeos**

A seleção dos clones que receberam plasmídeo no processo de transformação foi feita pelo uso de antibiótico no meio. Somente estas células foram capazes de crescer em pressão seletiva, uma vez que apresentam resistência ao antibiótico conferida pelo plasmídeo recebido. Foram empregados 50 $\mu$ g/mL de canamicina e 100 $\mu$ g/mL de ampicilina, de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Entretanto, algumas colônias transformantes podem ter recebido um plasmídeo com o gene desejado não ligado corretamente, com alguma base erroneamente incorporada na PCR ou sem o gene. Desta forma, foi feita a seleção de algumas colônias (de dezenas obtidas), que foram replaqueadas em LB ágar com o mesmo antibiótico, uma vez que na placa de transformação pode haver alguma colônia satélite que cresça após a degradação do antibiótico. As placas de seleção foram incubadas por cerca de 20h em estufa a 37°C. Após esta purificação em meio sólido, as colônias foram incubadas em LB líquido com antibiótico e cultivadas a 37°C por 18h e 200rpm para propagação dos plasmídeos. As colônias selecionadas de cada um dos genes *car* foram submetidas à confirmação por PCR, digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento, conforme descrição nas seções seguintes.

### 3.9 Extração de DNA plasmidial (Mini-Preparação)

As extrações dos plasmídeos foram feitas pelo protocolo de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) a partir de 3 a 5mL de cultivo de *Escherichia coli* DH10B a 37°C e 200rpm, por cerca de 20h, em meio com antibiótico (50µg/mL de canamicina para pENTR e 100µg/mL de ampicilina para pDEST). Após centrifugação as células foram ressuspensas em glicose 50mM, Tris-HCl 25mM e 10mM EDTA (pH8), tratadas com 50µg de RNase A, lisadas com NaOH 0,2M e SDS 1% m/v e neutralizadas com acetato de potássio 1,32M (pH4,8). Nestas condições ocorre a precipitação de restos celulares, proteínas e de DNA de alto peso molecular, permitindo que os DNAs plasmidiais permaneçam em solução. A agitação do material deve ser feita de forma suave para não ocorrer quebra do DNA de alto peso e fazer com que seja extraído juntamente com DNA plasmidial. Algumas amostras foram submetidas a extrações com fenol equilibrado para DNA (pH8) e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para obtenção de amostras mais purificadas. A precipitação de DNA plasmidial foi feita com acetato de sódio 3M (pH5,2) e isopropanol, em baixas temperaturas. O precipitado resultante foi lavado com etanol 70% v/v e ressuspensão em água ultrapura.

Os plasmídeos de entrada pENTR/(SD)/D-TOPO<sup>®</sup> confirmados positivamente para a ligação dos produtos de PCR, após tratamento com RNase para degradação de RNA, rompimento celular por lise alcalina e neutralização com acetato, foram submetidos a uma coluna comercial GFX *Micro* Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences), específica para ligação de DNA. Os DNAs plasmidiais foram lavados com solução Tris-EDTA e 80% v/v de etanol e eluído em 50µL de água ultrapura autoclavada. Desta forma, os plasmídeos foram obtidos com maior purificação para evitar inibição das enzimas de recombinação sítio-específicas.

### 3.10 Estoques de glicerol e stabs para manutenção dos clones

A partir de inóculos de colônias isoladas de cada uma das transformantes de *Escherichia coli* em 3mL de meio com os respectivos antibióticos (50µg/mL para canamicina e 100µg/mL para ampicilina), cultivados por 18h a 37°C e 200rpm em tubos de 15mL (Falcon), foram feitos os estoques de glicerol 20% v/v estéril empregando meio de cultura ou células centrifugadas para armazenamento de alíquotas de cada um dos clones em -70°C e em -20°C.

Além dos estoques de glicerol, as células foram inoculadas em 1mL de meio ágar (1,5% m/v) com antibiótico (50µg/mL para canamicina e 100µg/mL para ampicilina) e incubadas em estufa a 37°C por 18h. Os stabs foram armazenados em temperatura ambiente.

### **3.11 Confirmação dos clones**

A confirmação dos clones positivos foi feita por reação de PCR empregando as colônias selecionadas como DNA molde e oligos específicos para cada um dos genes, pela análise do padrão de digestão com endonucleases específicas para cada gene e plasmídeo e por seqüenciamento.

#### **3.11.1 PCR**

As colônias transformantes foram analisadas por PCR empregando 20mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM de KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada tipo de dNTP, 1µM dos oligos direto e reverso de cada gene e submetidas 10min a 94°C antes da adição de 2,5U de DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (*Taq*, recombinante, produzida no LMB/IBqM/UFRJ), para rompimento das células e liberação dos plasmídeos. A programação da reação de PCR foi a mesma empregada na amplificação dos genes do operon *car*.

#### **3.11.2 Digestão com enzimas de restrição**

Para confirmação da obtenção de plasmídeos corretamente ligados aos genes de interesse foram selecionadas enzimas de restrição para digerir uma vez no gene inserido e uma vez no plasmídeo, de modo a obter duas bandas facilmente identificadas em gel de agarose. Em cada reação foi empregado 25% de produto de extração plasmidial (cerca de 200-250ng de DNA). Para DNAs submetidos a fenol/clorofórmio ou coluna, a digestão foi feita em 10µL; nas digestões com DNAs plasmidiais extraídos por lise alcalina seguida de precipitação foram usados volumes maiores (20-30µL), para diluir possíveis proteínas não retiradas. As digestões foram feitas a 37°C durante a noite.

*carAa*: pENTR digerido com 2U de *EcoRV* 10U/μL (Gibco) e tampão de reação REact2 10X (Gibco) (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl); pDEST digerido com 1U de *PstI* 10U/μL (Invitrogen) e 1U de *HindIII* 10U/μL (Invitrogen) com tampão REact2 10X (Gibco).

*carB*: pENTR/D (vetor para clonagem com cauda de histidina) foi linearizado com 1U de *NotI* 10U/μL (Pharmacia), empregando tampão H 10X (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ditiotretol, 100mM NaCl), solução de BSA 10X (concentração final de 0,01% m/v), solução 10X de Triton X-100 (concentração final de 0,01% v/v); pENTR/SD (clonagem nativa) digerido com 1U de *EcoRV* 10U/μL (Invitrogen) e 1U de *XhoI* 10U/μL (Gibco), em tampão REact2 10X (Gibco); pDEST digerido com 1U de *PstI* 10U/μL (Amersham Biosciences) e tampão H 10X (Amersham).

*carC*: pENTR digerido separadamente com 2U de *EcoRV* 10U/μL (Invitrogen) e 2U de *StuI* 10U/μL (Biolabs), com tampão REact2 10X (Gibco); para pDEST foram empregadas 1U de *HindIII* 10U/μL (Invitrogen) e 1U de *StuI* 10U/μL (Biolabs), em tampão REact2 10X (Gibco).

*carAcAd*: pENTR digerido com 1U de *NotI* 10U/μL (Amersham Biosciences), em tampão H 10X (Amersham), 0,01% m/v de BSA, 0,01% v/v de Triton X-100; pDEST digerido com 1U *HindIII* 10U/μL (Invitrogen) e tampão REact2 10X (Gibco).

### 3.11.3 Seqüenciamento

Após a ligação dos genes isolados nos plasmídeos pENTR/(SD)/D-TOPO<sup>®</sup>, os mesmos foram submetidos a seqüenciamento, de modo a confirmar se a seqüência amplificada por PCR corresponde à desejada e se ela esta ligada corretamente no vetor.

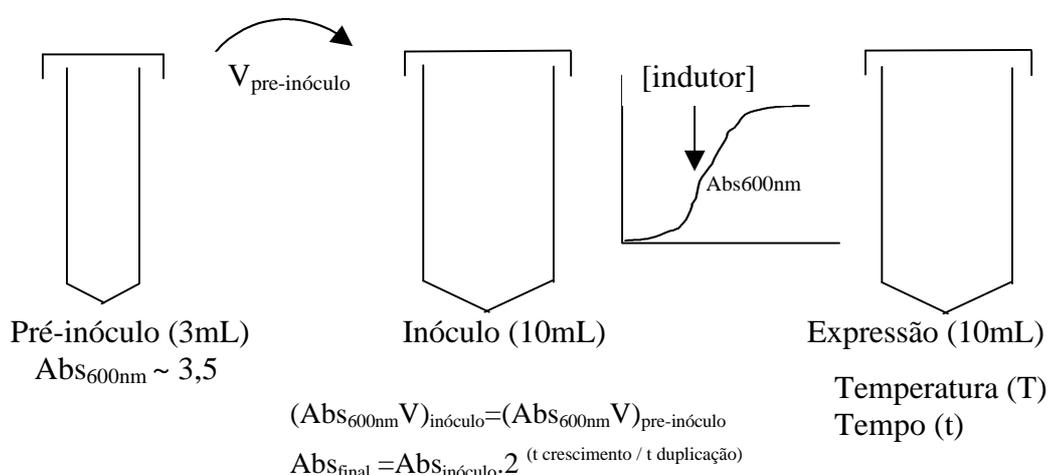
O seqüenciamento foi efetuado pelo método de terminação de cadeia pelo Núcleo de Estudos de Genoma Johanna Döbenreiner no IBqM/UFRJ e no Laboratório de Genoma do Departamento de Bioquímica/UERJ. Foram empregados cerca de 300ng-500ng dos plasmídeos extraídos por GFX *Micro* Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences), 2,5pmol de um dos oligos específicos ou universais (M13f/M13r), cujas seqüências estão apresentadas na Tabela 3.5, em 5μL de reação de PCR com 25 ciclos de 20s a 95°C, 15s a 48-50°C e 1min a 60°C. As seqüências foram analisadas pelos programas BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

**Tabela 3.5** Seqüência dos oligonucleotídeos empregados para seqüenciamento de genes ligados aos plasmídeos de entrada pENTR/(SD)/D-TOPO®.

Oligonucleotídeo	Seqüência do oligo
M13 Forward (-20)	5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3'
M13 Reverse	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

### 3.12 Expressão das proteínas em *Escherichia coli*

Para a expressão das proteínas heterólogas em *Escherichia coli* foram preparados pré-inóculos de 3mL de meio com ampicilina (100µg/mL) em tubos de 10mL (Falcon) a partir de uma colônia isolada de placa com a mesma concentração de antibiótico, incubados a 200rpm durante a noite a 37°C. A partir deste pré-inóculo saturado de células na fase estacionária, uma parte foi reinoculada em 10mL do mesmo meio (em tubos de 50mL) e incubados sob agitação de 200rpm a 37°C até atingir determinada fase de crescimento, monitorada em espectrofotômetro por absorbância em 600nm (Pharmacia Biotech). Na absorbância desejada, o indutor adequado para cada sistema (descritos em 3.12.1 e 3.12.2) foi adicionado ao meio para promover a expressão das enzimas recombinantes desejadas, de acordo com o esquema da Figura 3.10. O emprego de pré-inóculos é bastante comum na literatura (RIDDLE *et al.*, 2003b, OUCHIYAMA *et al.*, 1998) e minimiza efeitos de variação de crescimento em diferentes experimentos.



**Figura 3.10** Procedimentos empregados na indução das proteínas em *Escherichia coli*.

### 3.12.1 Indução das enzimas recombinantes com IPTG em *Escherichia coli* DH10B

A indução da expressão das enzimas CarB recombinantes da rota de degradação de carbazol (na forma nativa e com cauda de histidina) em *Escherichia coli* DH10B foi feita empregando 5% do pré-inóculo (com crescimento a 37°C por 18h) em LB com ampicilina, incubado a 37°C até atingir  $A_{600nm}$  de 1,5. Nesta condição foi adicionado IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo) em concentração final de 1mM, com indução por 2h. A concentração de IPTG e tempo de indução foram os mesmos empregados por RIDDLE *et al.* (2003b) e a indução da cultura de *Escherichia coli* com IPTG em uma densidade celular alta foi empregada por NOJIRI *et al.* (2003) para expressão da enzima CarB de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (indução de 1mM de IPTG com  $A_{600nm}$  de 2,0).

### 3.12.2 Indução das enzimas recombinantes com NaCl em *Escherichia coli* BL21-SI

*Escherichia coli* BL21-SI (F- *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>,m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm endA1 lon-proUp::T7 RNAP::malQ-lacZ (Tet<sup>S</sup>)*) foi utilizada para expressão de proteínas mediante indução por NaCl sob controle do promotor T7. As cepas BL21 são deficientes em proteases para minimizar a degradação de proteínas heterólogas (BHANDARI E GOWRISHANKAR, 1997).

As cepas BL21-SI eletroporadas com os plasmídeos de expressão das enzimas da rota de degradação de carbazol foram cultivadas a 37°C em meio LBON (bactotripton 1% m/v e extrato de levedura 0,5% m/v), na ausência de NaCl, com a adição de 100 $\mu$ g/mL de ampicilina durante 16h para preparação do pré-inóculo. O inóculo em 10mL de LBON com ampicilina foi preparado com 5% do pré-inóculo de modo a atingir um  $A_{600nm}$  inicial de 0,2. A bactéria cresceu até a fase exponencial por cerca de 1h30min, atingindo uma  $A_{600nm}$  de 0,75-0,8, quando foi feita a adição de NaCl na concentração final de 0,3M para indução das proteínas a 37°C por 4 e 24h. Antes da adição do sal e em cada diferente condição experimental foi retirada uma amostra de 1mL, centrifugada e as células armazenadas a -20°C. As amostras sem indução, assim como as amostras do crescimento da cepa BL21-SI sem plasmídeo, foram usadas como controles negativos. Na indução das enzimas da cepa CA10, SATO *et al.* (1997a) empregam algumas condições similares, como crescimento até  $A_{550nm}$  em torno de 0,8 a 37°C antes da adição do indutor (neste caso, IPTG) e incubação por 5h.

### **3.13 Planejamento Experimental e Modelagem Empírica**

O estudo das variáveis importantes para expressão pode ser feito por planejamento experimental, de forma a obter o maior número de efeitos de cada variável e seus cruzamentos com um mínimo de experimentos possíveis.

O planejamento experimental é um conjunto de técnicas estatísticas que permite definir seqüências otimizadas de experimentos, possibilitando uma coleta de dados direcionada a atingir um determinado objetivo. A utilização da técnica de planejamento permite reduzir o esforço experimental, assim como o custo e o tempo empregados para obter uma certa informação (BOX E DRAPER, 1987). As rotinas de planejamento de experimentos podem ser utilizadas para verificação do efeito de variáveis e a possível existência de correlação entre elas, quando não se têm informações prévias sobre o sistema. Quando as variáveis são conhecidas, assim como suas possíveis correlações, podem-se construir modelos e o plano experimental pode ser utilizado para discriminá-los. Se o modelo é conhecido, os dados do planejamento podem ser utilizados na estimação de parâmetros, com a maior precisão possível, permitindo a redução máxima das incertezas de predição de valores futuros. A técnica de planejamento também é apropriada quando se objetiva a otimização de uma determinada propriedade do sistema

Um planejamento experimental deve ser embasado em algumas pré-condições (HIMMELBLAU, 1970). Devem ser bem especificados os objetivos do plano experimental, ou seja, se é desejado verificar os efeitos das variáveis, discriminar modelos, estimar parâmetros ou otimizar o processo. Devem ser conhecidas as variáveis fixas ou independentes e as variáveis dependentes do problema. Deve-se saber quais variáveis serão analisadas, como medi-las, qual a região experimental de interesse e qual o erro cometido nos experimentos. Todo modelo tem sua validade limitada à faixa de condições experimentais analisada. A qualidade do modelo e dos parâmetros estimados está diretamente associada ao erro experimental avaliado. Além disto, o tempo disponível e o custo permitido são importantes pontos a considerar no plano experimental desenvolvido, sendo imprescindível conhecer o número de experimentos a serem realizados e as réplicas.

Um planejamento experimental bem sucedido deve ser baseado em dois princípios estatísticos importantes. Primeiramente, a introdução de certo grau de aleatoriedade no

planejamento e na realização dos experimentos elimina erros sistemáticos e a possibilidade de interferências do pesquisador nos resultados, uma vez que a imposição de uma ordem pré-estabelecida pode mascarar uma possível relação existente entre as variáveis. Em segundo lugar, outro fator de extrema importância é o número de vezes que experimentos são realizados. A condução do maior número possível de experimentos e a repetição sistemática de dados deve ser feita o maior número de vezes possível, uma vez que em geral quanto mais informação se tem sobre um sistema, mais confiáveis são os resultados obtidos e maior é a capacidade de análise. Um plano experimental aleatório e com o maior número de experimentos e réplicas é estatisticamente ideal.

O ideal em um plano experimental seria, portanto, a realização de muitos pontos experimentais escolhidos ao acaso na malha experimental e a conseqüente realização de muitas repetições, mas isto não é real. Com poucos pontos, a escolha aleatória de condições experimentais não é bem sucedida, pois os pontos podem ficar concentrados em poucas regiões. Se o sistema apresenta um comportamento suave, sem comportamentos oscilatórios, não-lineares ou com mudanças bruscas, é possível a utilização de uma distribuição uniforme dos valores da variável a ser estudada na região de interesse. Neste caso, um plano fatorial é gerado a partir da escolha de condições experimentais uniformemente distribuídas e pelo cruzamento das condições das diversas variáveis estudadas.

O número de experimentos a serem realizados em um plano experimental depende dos níveis estudados de cada variável, ou seja, do número de condições experimentais de cada uma delas que se deseja analisar. Também depende do número de repetições que são realizadas. Quando o estudo do sistema envolve um número muito grande de variáveis, o número de experimentos aumenta de forma fatorial, uma vez que o plano é feito através de combinações de condições. O número de experimentos NE em um plano depende dos níveis  $l_i$ , ou seja, das condições experimentais escolhidas para o número de variáveis independentes NX, e do número NR de réplicas feitas, segundo a Equação 3.1.

$$NE = \left( \prod_{i=1}^{NX} l_i \right) NR \quad (3.1)$$

Em termos práticos, a técnica de planejamento orienta a escolha do número mínimo de condições e de repetições que devem ser feitas para que se conheça o sistema, contrastando com a situação estatisticamente ideal. A realização do número mínimo de experimentos causa perda relativa da qualidade das informações e leva a erros maiores que no caso ideal, mas permite conhecer as características básicas do sistema com esforço mínimo. A escolha dos níveis a serem usados no planejamento experimental é extremamente importante no intuito de se obter uma boa função para descrever o comportamento do sistema.

Para verificar se a resposta de um sistema aumenta ou diminui com uma variável deve-se ter no mínimo dois níveis experimentais. Um plano experimental com dois níveis permite somente conhecer se há dependência linear entre as principais variáveis do sistema. Caso haja algum comportamento quadrático, não é possível a verificação por este plano experimental. Quando um plano experimental é realizado em três níveis pode-se verificar a existência de comportamentos quadráticos no sistema, ou seja, se existe alguma concavidade na resposta do sistema para a variável estudada. Planos a três níveis são, portanto, adequados para identificar a existência de máximos e mínimos na região experimental de interesse.

Da forma como o plano experimental é montado, com uma distribuição uniforme dos valores das variáveis de processo estudadas, é possível utilizar modelos empíricos, do tipo polinomial, para avaliação dos efeitos das variáveis e para otimização das condições de expressão das proteínas recombinantes. A estimação dos parâmetros do modelo polinomial indica os efeitos principais das variáveis de processo e do sinergismo entre elas. Para realizar a estimação dos parâmetros empíricos, as variáveis são utilizadas na forma normalizada. Uma vez que os valores das variáveis de processo estão distribuídos uniformemente na região experimental, a normalização das variáveis de processo,  $x_i$ , é feita de modo que as variáveis normalizadas,  $x_{i,\text{normalizado}}$ , tenham valores entre  $-1$  e  $+1$ , com o ponto central de valor  $0$ , como indica a Equação 3.2.

$$x_{i,\text{normalizado}} = \frac{x_i - \left(\frac{x_{i\text{ máx}} + x_{i\text{ mín}}}{2}\right)}{\left(\frac{x_{i\text{ máx}} - x_{i\text{ mín}}}{2}\right)}, \quad -1 < x_{i,\text{normalizado}} < 1 \quad (3.2)$$

Os parâmetros estimados empregando as variáveis normalizadas podem ser diretamente comparados, uma vez que a ordem de grandeza de todas as variáveis é a mesma. Com o uso de uma distribuição uniforme das condições experimentais e da normalização de variáveis obtém-se um plano experimental ortogonal. Neste caso, verifica-se que a soma no plano experimental de todas as variáveis normalizadas, assim como dos produtos entre elas, é sempre nula, como mostra a Equação 3.3. Isto permite obter parâmetros lineares sem correlação para efeitos principais e interações binárias, mas não permite a obtenção de correlações nulas para termos quadráticos (BOX E DRAPER, 1987).

$$\sum_{i=1}^{NE} x_{ki} = 0, \sum_{i=1}^{NE} x_{ki} x_{li} = 0, \forall k, l, k \neq l \quad (3.3)$$

A estimação dos parâmetros empíricos deve ser feita pela otimização de uma função objetivo que descreva o desvio entre as variáveis de resposta experimentais,  $y_i$ , e as variáveis calculadas pelo modelo,  $y_i^c$ , permitindo uma minimização destas medidas pela determinação dos melhores valores dos parâmetros do modelo. A função objetivo utilizada para modelos empíricos polinomiais geralmente é a de mínimos quadrados, mostrada na Equação 3.4.

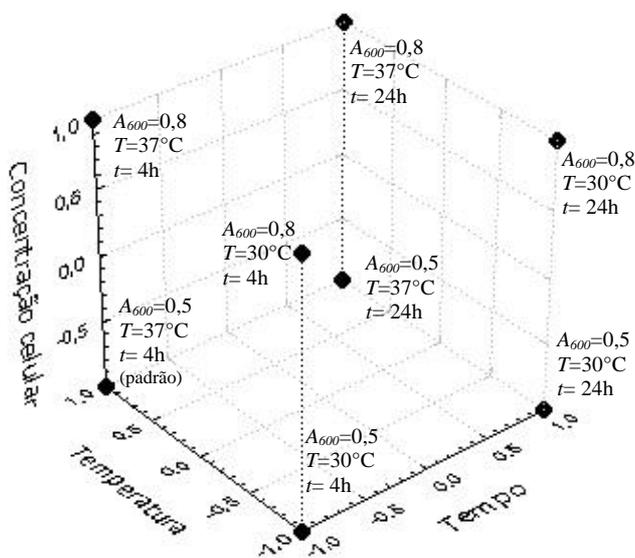
$$F = \sum_{i=1}^{NE} \frac{(y_i - y_i^c)^2}{NE - NP} \quad (3.4)$$

### 3.13.1 Planejamento experimental para otimização da expressão das subunidades de CarA

Como o número de variáveis possível de ser explorado é bastante grande, a realização de planejamento experimental exploratório a dois níveis (BOX E DRAPER, 1987) é interessante para avaliar o efeito linear de algumas variáveis relevantes sobre a expressão das proteínas em *Escherichia coli* contendo os plasmídeos com genes *car*. O emprego de técnicas de planejamento experimental de Taguchi, semifatorial e fatorial a três níveis fornece mais resultados, permitindo inferir sobre a existência de não

linearidades no processo, além das interações entre as variáveis, mas a escolha do planejamento depende do número de variáveis e da carga experimental exigida.

As cepas *Escherichia coli* BL21-SI contendo os plasmídeos de expressão das subunidades da carbazol 1,9-a dioxigenase (CarAa, CarAc/CarAd) foram cultivadas a 37°C em meio LBON (bactotripton 1% m/v e extrato de levedura 0,5% m/v), na ausência de NaCl, com a adição de 100µg/mL de ampicilina durante 16h para preparação do pré-inóculo. O inóculo em 10mL de LBON com ampicilina foi preparado com 5% do pré-inóculo de modo a atingir um  $Abs_{600nm}$  inicial de 0,2. A bactéria cresceu até a fase exponencial por cerca de 1h30min-2h (atingindo  $Abs_{600nm}$  de 0,5 ou 0,8, dependendo do experimento), quando foi feita a adição de NaCl na concentração final de 0,3M para indução das proteínas a temperaturas de 30 e 37°C e em tempos de indução de 4 e 24h. O plano experimental a dois níveis, empregado para verificar o efeito das três variáveis de estudo: concentração celular ( $A_{600}$ ), temperatura ( $T$ ) e tempo ( $t$ ), está apresentado na Figura 3.11.



**Figura 3.11** Plano experimental a dois níveis para estudo da influência da concentração celular ( $A_{600}$ ), temperatura ( $T$ ) e tempo ( $t$ ) na expressão das subunidades da carbazol dioxigenase.

As áreas das bandas correspondentes à expressão de cada uma das proteínas foram quantificadas pelo programa QUANTISCAN Version 1.25. As áreas de cada banda do gel foram recalculadas considerando 100% a quantidade de proteína obtida na condição padrão, isto é, sugerida pelos fabricantes para testes iniciais de expressão de proteínas

recombinantes em *Escherichia coli* ( $Abs_{600nm}=0,5$ , 37°C e 4h). A avaliação estatística dos efeitos da concentração celular, temperatura e tempo na indução destas proteínas foi feita mediante uma modelagem empírica (Equação 3.5) e estimação de parâmetros ( $p_i$ ) das variáveis normalizadas em -1 (menor valor da condição empregada) e +1 (maior valor da condição empregada), empregando o programa STATISTICA 5.0 (STATSOFT, 1995). O modelo empírico com o efeito de cada variável estimado foi empregado na determinação do ponto ótimo de expressão de cada proteína.

$$\text{Expressão} = p_0 + p_1 A_{600} + p_2 T + p_3 t + p_4 A_{600} \cdot T + p_5 A_{600} \cdot t + p_6 T \cdot t \quad (3.5)$$

### 3.14 Preparação dos extratos celulares

As células obtidas pela centrifugação de 1mL de amostra foram ressuspensas em GET (glicose 50mM, EDTA 10mM e Tris-HCl 25mM) e rompidas em sonicador (Sonifier 250 Branson), empregando 5 pulsos de 10s de duração com 1min de intervalo entre cada um, em banho de água gelada. Na seqüência, a concentração de proteína total dos extratos celulares foi dosada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), empregando BSA (albumina de soro bovino) como padrão.

### 3.15 Purificação de enzima expressa com cauda de histidina

A purificação da enzima CarB clonada em vetor com cauda de histidina foi feita empregando 50mL de coluna Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham), mantendo a proporção de 1mL de resina para cada 10mg de proteína. Inicialmente a resina foi lavada com água (10 vezes o volume da coluna) para retirar o tampão de armazenamento (etanol 30% v/v), seguido de carregamento da matriz com Ni empregando solução de sulfato de níquel 10mM, de acordo com o protocolo padrão.

O tampão contendo 50mM Tris-HCl, 30mM NaCl e 5mM imidazol foi empregado na lise celular e para equilibrar a coluna. As lavagens da coluna, empregando 10 vezes seu volume, foram feitas com 50mM Tris-HCl, 30mM NaCl e 20mM de imidazol. Para eluição das proteínas com cauda de histidina ligadas à coluna foi utilizado 50mM Tris-HCl, 300mM NaCl e 500mM imidazol. Todos os tampões foram preparados em pH 8.

### **3.16 Análise e quantificação das proteínas expressas por SDS-PAGE**

As análises das proteínas expressas foram feitas em Gel de Eletroforese Desnaturante de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), em corridas a 80V por 3h em cuba Bio-Rad empregando tampão com concentrações de 25mM de Tris-base, 192mM de glicina e 0,1% m/v de SDS. Foram empregados géis de corrida para separação das proteínas por massa molecular contendo 18% m/v de poliacrilamida em 375mM de Tris-Cl (solução 1,5M pH8,8) e SDS 0,1% m/v, assim como géis de concentração com 5% m/v de poliacrilamida, 125mM de Tris-Cl (solução 1,0M pH6,8) e 0,1% m/v de SDS. Ambos foram polimerizados com persulfato de amônio (0,1% m/v) e TEMED ultrapuro (0,1% v/v) e preparados de acordo com LAEMMLI (1970).

A quantificação e determinação da massa molecular de cada proteína expressa foi feita empregando padrão de massa molecular LMW (Amersham Bioscience), contendo as bandas de 14, 20, 30, 45, 60 e 90kDa, que engloba todas as enzimas envolvidas na degradação de carbazol. Foram aplicadas 20µg de proteína do extrato total de cada amostra empregando tampão com Tris-Cl (31,2mM), 30% m/v de glicose, β-mercaptoetanol 1,3% v/v, 1% m/v de SDS e 0,01% m/v de azul de bromofenol, após aquecimento da mistura por 10min a 95°C. As proteínas retidas nos géis foram coradas com Coomassie blue (solução com 50% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético glacial e 0,1% m/v de Coomassie brilliant blue R-250) durante a noite sob agitação branda. Após, os géis foram submetidos à solução de descoramento contendo metanol 40% v/v e ácido acético glacial 10% v/v).

### **3.17 Testes de biodegradação e medidas de atividade enzimática**

Os testes de atividade enzimática para degradação dos compostos aromáticos foram feitos empregando extratos celulares e células íntegras preparadas pela técnica de *resting cells* (células que não apresentam crescimento, mas apresentam funcionamento de seu metabolismo). A cepa BL21-SI sem plasmídeo foi utilizada como controle negativo em todas as reações enzimáticas.

### 3.17.1 Preparação de *resting cells*

Após a obtenção das células com expressão de cada uma das proteínas recombinantes, determinado volume de meio saturado de células foi centrifugado (13000rpm por 5min e 4°C), e ressuspensão no mesmo volume de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5). Neste tampão, em que não há crescimento celular, é adicionado o composto que será degradado pelas enzimas expressas pela célula (sistema de *resting cells*). A força iônica (50mM) e pH (7,5) empregados foram os mesmos de SATO *et al.* (1997a), OUCHIYAMA *et al.* (1998) e NOJIRI *et al.* (1999).

### 3.17.2 Testes de biodegradação de carbazol por CarA

Para verificar se a carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) foi expressa na forma ativa, foram empregados testes de degradação de 20ppm (120µM) de carbazol. A detecção foi feita por cromatografia gasosa em equipamento Varian 3380 com detector FID e coluna capilar CP-SIL5CB (25m de comprimento e 0,25mm de diâmetro), empregando temperaturas de 250°C no injetor e detector, coluna com aquecimento de 150 a 200°C e taxa de 10°C/min e *split* 1:8 (volume na coluna:volume descartado) e nitrogênio como gás de arraste, a uma pressão de 60kPa.

A reação foi feita empregando 300µL de extrato celular obtido por sonicação das cepas recombinantes BL21-SI clonadas com plasmídeos pDEST™14 contendo os genes *carAa* e *carAcAd* com expressão de CarAa e de CarAcAd nas condições otimizadas pelo planejamento experimental. Para evitar a possibilidade de limitação de cofatores para a reação de degradação *in vitro*, cada um deles foi adicionado em excesso, de acordo com as condições indicadas na literatura (NAM *et al.*, 2002b). Foram empregados 500µM (100nmol) de NADH, 1µM (200pmol) de FAD, 35µM de sulfato ferroso amoniacal com fonte de Fe(II) e 50µM de ácido ascórbico (agente redutor), como cofatores, e 0,02% v/v de Tween 20 para auxiliar na solubilização do carbazol em água, em volume final de 300µL de Tris-HCl 50mM (pH 7,5). As concentrações de  $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  e ascorbato foram as mesmas empregadas para as medidas de atividade de CarB. A degradação de carbazol foi verificada após 15h de reação a 30°C, com interrupção da reação pela acidificação até pH 3 com HCl 1N (SATO *et al.*, 1997a) (adição de 20µL), seguido da extração com igual volume de acetato de etila hidratado e armazenamento a 4°C para posterior injeção de 1µL no cromatógrafo gasoso.

### 3.17.3 Testes de biodegradação e medidas de atividade de CarB e CarC

Testes qualitativos em placa e meio líquido foram empregados para verificar se as enzimas CarB e CarC foram expressas na forma ativa, com crescimento das cepas recombinantes em LB (e expressão das enzimas recombinantes com a presença de 1% m/v (0,17M) de NaCl no meio) por 18h a 37°C com ampicilina, empregando solução 0,5mg/mL de 2,3-dihidroxibifenil (2,3-DHBP) em etanol absoluto (Merck) preparada no mesmo dia de uso, devido à sua instabilidade em solução (SATO *et al.*, 1997a). Este composto, resultante da degradação da bifenil dioxigenase, é análogo ao 2'-aminobifenil-2,3-diol da rota de degradação de carbazol. A obtenção de enzimas de *meta*-clivagem (CarB) ativas, sem e com cauda de histidina, foi confirmada pela produção de um composto amarelo pelas colônias transformantes após borrifamento da solução 2,3-DHBP sobre placas e mistura da solução em meio líquido. Este composto amarelo, HOPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico) é um análogo cromóforo da rota de degradação de bifenil. A expressão da hidrolase (CarC) na forma ativa foi comprovada pelo desaparecimento da coloração amarela, pelo consumo de HOPDA em meio líquido e em placa.

As medidas de atividade enzimática foram feitas por absorvância no comprimento de onda 434nm para detecção de HOPDA, cujo coeficiente de absorção molar a pH7,5 é, segundo a literatura, 13200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (SATO *et al.*, 1997a, OUCHIYAMA *et al.*, 1998), empregando Espectrofotômetro GBC UV/VIS 920 (Analítica). Foram empregadas células integras (*resting cells*), extrato celular (células rompidas por sonicação) e extrato celular incubado em gelo por 10min com ácido ascórbico (35µM) e sulfato ferroso amoniacal (50µM), em tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5) a 35°C, temperatura e pH ótimos das enzimas CarB e CarC de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (IWATA *et al.*, 2003, NOJIRI *et al.*, 2003).

Os ensaios de atividade de CarB sobre 2,3-dihidroxibifenil foram feitos em volume de 1mL, com início da reação pela adição de 10µL de solução 10mM de 2,3-DHBP em etanol (concentração inicial de substrato na reação de 100µM) e dosagem do aumento da absorvância em 434nm pela produção de HOPDA.

A atividade de hidrolase (CarC) foi medida monitorando o desaparecimento do composto colorido HOPDA pela queda de absorvância a 434nm. O substrato HOPDA foi produzido no mesmo dia pelas células recombinantes de CarB (células obtidas a

partir de 3,5mL de meio de cultura com 18h de crescimento em LB a 37°C e ressuspensas em 500µL no mesmo tampão), empregando 50µL de solução 150mM de 2,3-DHBP em etanol. A absorbância inicial a 434nm das células com adição da solução de HOPDA (concentração inicial de substrato de 100µM) foi ajustada para um valor máximo de 1 em Tris-HCl 50mM (pH 7,5).

#### **3.17.4 Determinação de volume (concentração celular) empregado no sistema de *resting cells* para ser usado nas medidas de atividade de CarB e CarC**

Diferentes volumes de meio LB (após crescimento das células BL21-SI por 18h a 37°C com expressão concomitante das enzimas recombinantes CarB e CarC pela presença do indutor NaCl) foram empregados na preparação de *resting cells* (variando de 50 a 500µL). Após determinação das medidas de absorbância a 434nm, os dados foram utilizados para calcular taxas de produção e degradação do composto amarelo HOPDA ao longo do tempo dos experimentos, de acordo com a definição apresentada na Equação 3.6.

$$\text{taxa (velocidade da reação)} = \frac{\Delta \text{Abs}_{434\text{nm}}}{\Delta \text{tempo}} = \frac{\text{Abs}_{434\text{nm}}(t_2) - \text{Abs}_{434\text{nm}}(t_1)}{t_2 - t_1} \quad (3.6)$$

Nos primeiros pontos, quando a taxa calculada pela Equação 3.6 mantém-se constante, as velocidades iniciais da reação obtidas para os diferentes volumes de *resting cells* foram comparadas, assim como as velocidades iniciais normalizadas pelo volume de meio de crescimento celular empregado na sua preparação (taxa inicial/volume). O volume utilizado para medir a atividade do sistema de células íntegras (*resting cells*) de CarB e CarC recombinantes foi aquele que apresenta mesma razão taxa/volume de meio. Quando, para os maiores volumes (altas concentrações celulares), esta razão é reduzida, tem-se indícios de que outros processos estão ocorrendo e competindo com a reação química, não devendo ser utilizados nos sistemas de *resting cells*. Os erros observados nas medidas foram inferiores a 10%.

### 3.18 Modelagem por Homologia

Os métodos de modelagem de proteínas baseados em homologia ou comparação entre seqüências são capazes de extrapolar um modelo para uma nova seqüência, chamada de alvo (*target*) baseado na similaridade com seqüências de proteínas de estruturas 3D conhecidas, ou de proteínas pertencentes à mesma família, chamadas de moldes (*templates*) (PEITSCH, 1995, PEITSCH, 1996, GUEX E PEITSCH, 1997, MARTÍ-RENOM *et al.*, 2000). Para a obtenção de um modelo que possa ser utilizado, duas condições devem ser cumpridas: deve haver similaridade entre a seqüência alvo e a proteína molde e um alinhamento correto entre eles deve ser calculado (MARTÍ-RENOM *et al.*, 2000).

A técnica de modelagem por homologia baseia-se no princípio de que a semelhança entre seqüências de proteínas implica em similaridade estrutural. Estes princípios são corroborados pelas seguintes observações do processo biológico evolutivo (SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003):

(i) homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional;

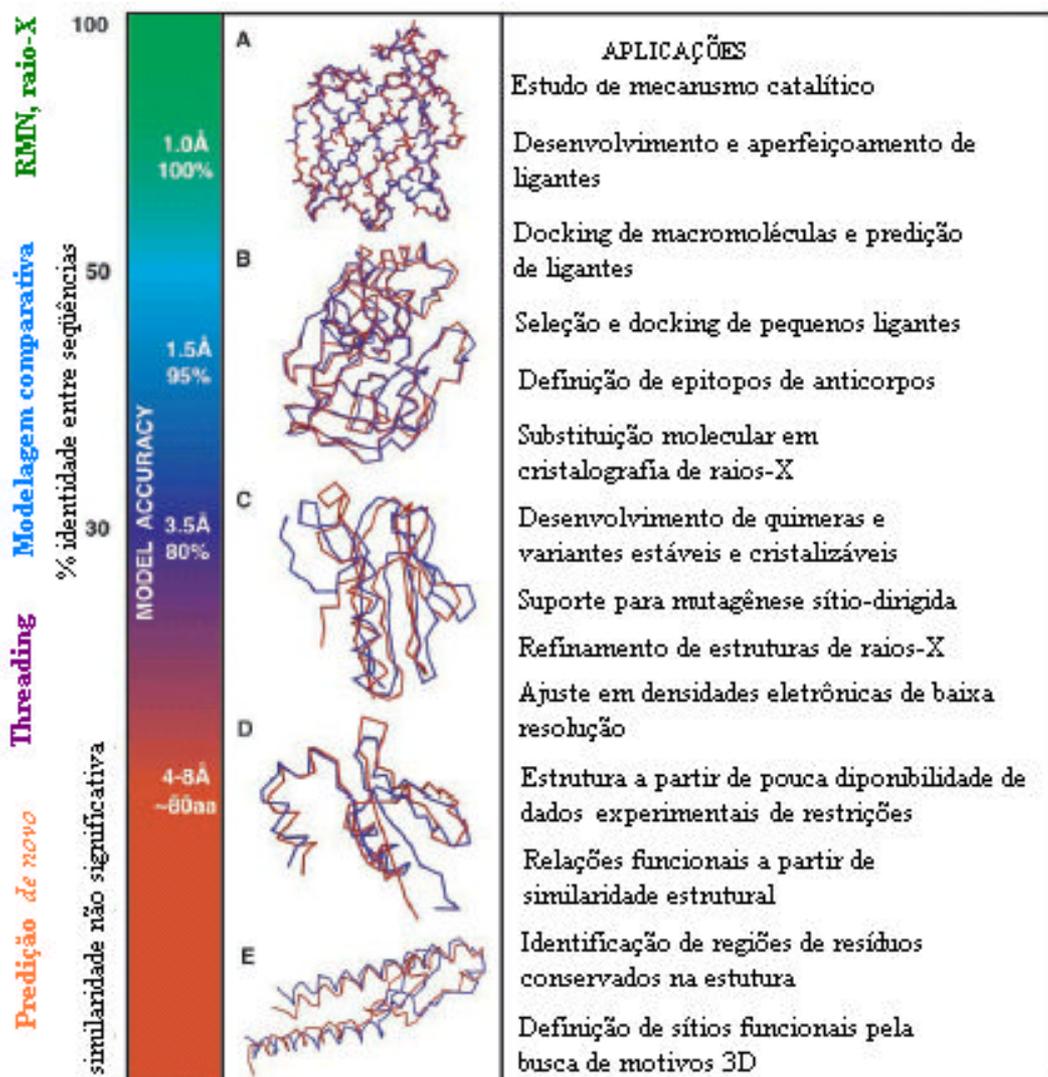
(ii) proteínas homólogas apresentam regiões internas com estruturas secundárias ( $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ ) conservadas;

(iii) as principais diferenças estruturais ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças, ligando elementos de estruturas secundárias.

Além disso, constatou-se que as proteínas se agrupam em número limitado de famílias tridimensionais e que existe um número estimado de 5000 famílias protéicas. Quando a estrutura de pelo menos um representante de uma família é conhecida, os demais membros podem ser modelados por homologia (SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003).

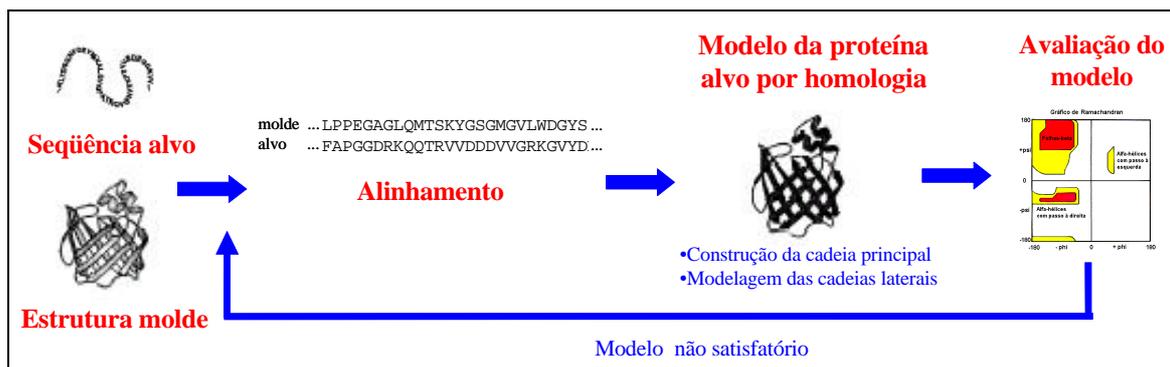
Desta forma, a técnica de modelagem estrutural comparativa permite a predição da estrutura de uma proteína de interesse a partir de sua seqüência de aminoácidos, baseado em alinhamentos com um ou mais proteínas homólogas com coordenadas moleculares conhecidas, disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Na Figura 3.12

(BAKER E ŠALI, 2001) estão esquematizadas as possíveis aplicações de estruturas de proteínas obtidas por diferentes metodologias, dependendo da acurácia obtida.



**Figura 3.12** Aplicação de modelos de estruturas de proteínas (modificado de BAKER E ŠALI, 2001).

A modelagem por homologia foi realizada em quatro etapas iterativas (PEITSCH, 1995, PEITSCH, 1996, MARTÍ-RENOM *et al.*, 2000, SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003): seleção de moldes, alinhamento entre proteínas alvo e molde, construção do modelo por comparação com o molde e avaliação do modelo 3D resultante, como mostrado no esquema da Figura 3.13.



**Figura 3.13** Esquema geral dos procedimentos empregados para realizar modelagem comparativa.

### 3.18.1 Seleção de moldes

A identificação das possíveis proteínas moldes foi feita empregando as ferramentas de bioinformática para busca de homologias e similaridades e identificação de domínios conservados. O programa BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool-Protein-Protein*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) empregando PDB como banco de dados foi utilizado na busca de proteínas homólogas e com alto grau de similaridade com estruturas 3D determinadas experimentalmente para uso como moldes na modelagem por comparação. Este programa encontra-se disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Se o grau de identidade entre as estruturas primárias das proteínas alvo e molde com mais de 80 resíduos for igual ou superior a 25%, existe grande probabilidade de que estas proteínas tenham estruturas tridimensionais semelhantes, e a construção do modelo pode ser feita por comparação (SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003).

Nos casos em que a identidade é inferior a 25%, o método mais adequado, embora ainda menos preciso, é o de compatibilidade seqüência-estrutura (*threading* ou *3D template matching methods*), em que a avaliação da melhor proteína molde é feita empregando um potencial empírico derivado de contatos de resíduos em proteínas conhecidas (SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003). Esta metodologia para selecionar moldes a partir da seqüência de uma proteína sem identidade aparente com outras proteínas (ROST *et al.*, 1997), foi aplicada na identificação de molde para a proteína CarBa, pelo ajuste de sua seqüência de aminoácidos nas estruturas de proteínas tridimensionais disponíveis empregando o programa GenTHREADER (JONES, 1999).

As enzimas envolvidas nas rotas de biodegradação de compostos aromáticos, como naftaleno, bifenil, benzoato, protocatecuato, foram empregadas como moldes.

### **3.18.2 Alinhamentos**

Além de emprego de alinhamento local, podem ser empregados outros tipos de alinhamentos para melhorar os resultados do modelo: alinhamentos globais, usando CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994), alinhamentos locais e globais entre as duas proteínas, empregando o programa T-COFFEE (NOTREDAME *et al.*, 2000), ambos disponíveis em <http://www.expasy.ch>, além de otimizações manuais baseadas em informações da estrutura do molde.

### **3.18.3 Modelagem Comparativa**

Os alinhamentos seqüenciais de cada proteína foram empregados na construção dos modelos estruturais pelo método de restrições espaciais com o programa MODELLER 6v2 (ŠALI E BLUNDELL, 1993). Após este procedimento, o modelo final de CarBa (com identidade inferior a 25% dos resíduos) foi refinado por relaxação da estrutura empregando o programa HyperChem (FROIMOWITZ, 1993) com campo de força Amber (WEINER *et al.*, 1986).

As coordenadas espaciais dos complexos multiméricos das enzimas foram obtidas pelo Swiss-PDBViewer, que emprega técnica de corpos rígidos (GUEX E PEITSCH, 1997), disponível no sítio <http://www.expasy.ch/spdbv/>, pela sobreposição dos modelos de cada monômero com as cadeias homólogas das estruturas multiméricas dos moldes disponíveis no PDB.

### **3.18.4 Validação dos modelos**

A avaliação da qualidade do modelo passa pelo empacotamento global da proteína, possíveis erros estruturais em regiões localizadas e parâmetros estereoquímicos e energéticos (SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003).

A avaliação e validação dos modelos foram feitas por análises da qualidade estereoquímica empregando o programa PROCHECK (LASKOWSKY *et al.*, 1993).

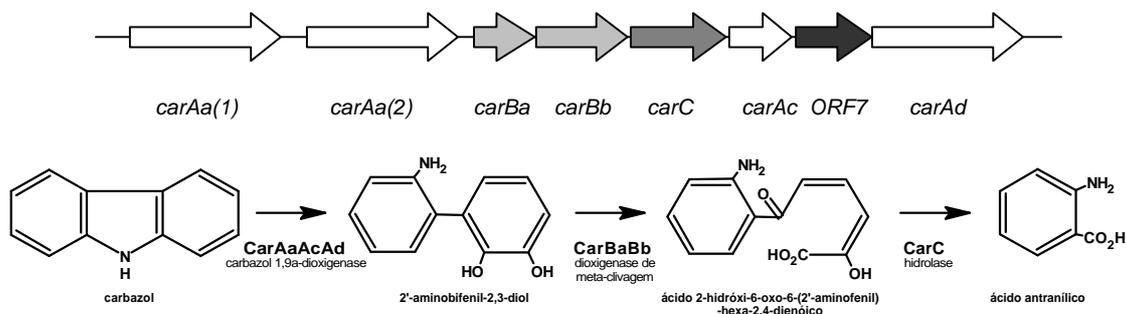
Entre estas análises, os gráficos de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963) indicam os ângulos permitidos de rotação para os resíduos de aminoácidos da cadeia principal de um polipeptídeo, uma vez que as ligações N-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C têm liberdade de rotação. Estas rotações são representadas, respectivamente, pelos ângulos de torção phi e psi e suas conformações estáveis foram estudadas por RAMACHANDRAN *et al.* (1963), considerando a estrutura das proteínas como de esferas rígidas e dimensões correspondentes aos seus raios de van der Waals. Entretanto, algumas existem restrições nestes ângulos que são indicadas no gráfico de Ramachandran, correspondendo a conformações estéricas do esqueleto polipeptídico não permitidas. Por exemplo, não pode haver colapso entre as esferas e os ângulos em que isto acontece não são permitidos e estão indicados fora das regiões permitidas de phi e psi do gráfico. O gráfico de Ramachandran é bastante útil na análise e na avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas, uma vez que ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis (SANTOS FILHO E BICCA DE ALENCASTRO, 2003).

A validação dos modelos também foi feita pela compatibilidade do modelo atômico (3D) com a seqüência de aminoácidos da proteína modelada (1D), usando o VERIFY3D (LUTHY *et al.*, 1992). Erros nas estruturas foram analisados com o WHAT-CHECK (HOOFT *et al.*, 1996) e interações de átomos não-ligados nas estruturas foram analisadas pelo ERRAT (COLOVOS E YEATES, 1993). O programa PROVE (PONTIUS *et al.*, 1996) foi usado para avaliar a qualidade do modelo baseado em cálculos de volumes atômicos. A avaliação energética dos modelos das subunidades da carbazol dioxigenase foi feita pelo Gráfico de Energia dos Resíduos empregando o programa PROSAIL (SIPPL, 1993). Todos os programas, com exceção do PROSAIL (não disponível gratuitamente), foram acessados pelo SAVS (*Structure Analysis and Validation Server*), no endereço <http://www.doe-mpi.ucla.edu/Services/>.

A visualização e caracterização de resíduos e domínios conservados das proteínas, para análise dos sítios ativos e distâncias entre átomos, foram feitas empregando os programas RASMOL (SAYLE E MILNER-WHITE, 1995) e Swiss-PDBViewer (GUEX E PEITSCH, 1997) em comparação com os moldes. O programa Swiss-PDBViewer (GUEX E PEITSCH, 1997) foi também utilizado nos cálculos das pontes de hidrogênio nas estruturas modeladas.

## 4 RESULTADOS

Os genes que codificam as enzimas na rota de degradação de carbazol a ácido antranílico (CarA, carbazol dioxigenase, CarB, dioxigenase de *meta*-clivagem e CarC, hidrolase) da bactéria *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 (HISATSUKA E SATO, 1994), descritos na Figura 4.1, foram clonados separadamente em quatro vetores. A cepa foi caracterizada (seção 4.1) e os genes amplificados por PCR (seção 4.2).



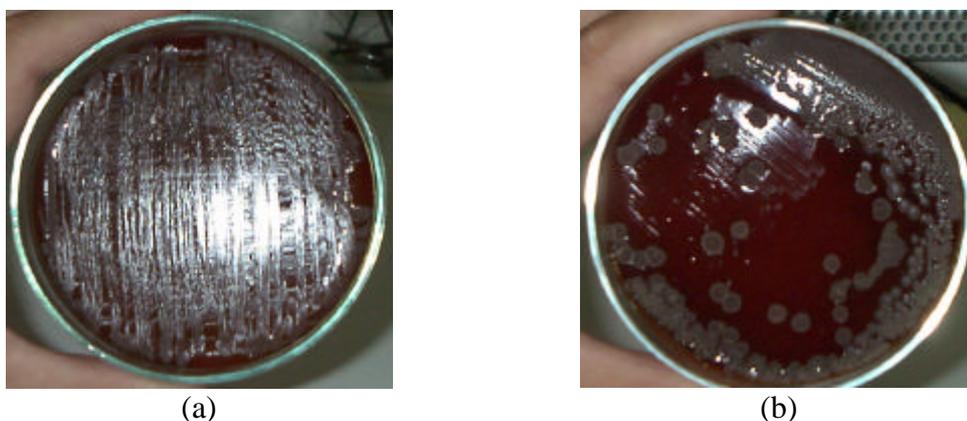
**Figura 4.1** Organização dos genes que codificam as enzimas da rota de degradação de carbazol a ácido antranílico (operon *car*) em *Pseudomonas* sp. (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, BENEDIK *et al.*, 1998).

A estratégia de clonagem empregando as enzimas topoisomerase e de recombinação sítio-específica, descrita na seção 4.3, mostrou-se eficiente na clonagem dos genes. As enzimas foram expressas de forma ativa e em grande quantidade em extrato total de *Escherichia coli* BL21-SI, com indução por NaCl. Os resultados de expressão em tubos agitados e análise de variáveis estão descritos na seção 4.4.

As medidas de atividade enzimática, assim como a caracterização estrutural das enzimas por modelagem molecular por homologia, estão apresentadas na seção 4.5.

## 4.1 Caracterização de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258

A cepa *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520 foi caracterizada por crescimento em placa, coloração de Gram e testes bioquímicos (LARENTIS, 2003). Pela observação das colônias isoladas, com cerca de 1mm de diâmetro, obtidas em placa de ágar sangue com crescimento de 24h a 35°C, verificou-se que a morfologia apresentou características que conferem com as da bactéria *Pseudomonas stutzeri*. As colônias são tipo mucóides (que não tem aspecto seco, devido à presença de uma cápsula, comum para *Pseudomonas* e enterobactérias), acinzentadas, pequenas e redondas (não irregulares). Após 48h de incubação, as colônias apresentaram tamanho variável, algumas com até 5mm de diâmetro, com aspecto seco, quebradiço, indicando que poderiam estar mortas ou somente com as cápsulas secas (com a presença de células vivas por baixo). Testes de viabilidade em 48h não foram feitos, uma vez que a ATCC recomenda um crescimento a 37°C por somente 24h. Na Figura 4.2 é possível verificar o aspecto das colônias de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520 com crescimento em ágar sangue por 24 e 48h.



**Figura 4.2** Colônias em ágar sangue com 24 (a) e 48h (b) de crescimento de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520 a 35°C.

Em nenhuma das etapas de cultivo da cepa, desde a abertura da cepa ATCC até nova liofilização para produção de lotes para a coleção INCQS, foram detectadas contaminações por outros microorganismos. Nas placas da Figura 4.2 não foram verificadas colônias diferentes, o que indicaria possíveis contaminações durante este período de crescimento em placa em meio rico de ágar sangue.

A visualização no microscópio óptico indicou uma cultura pura, sob a forma de um tapete de células Gram negativas, na forma de bastonetes (*rod-shaped*), como descrito na literatura (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, HISATSUKA E SATO, 1994, GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, KIRIMURA *et al.*, 1999). O método de Gram se baseia na capacidade das células de absorverem de maneira idêntica o corante primário (cristal violeta) e o fixador (iodo), adquirindo uma coloração violeta pela formação de um complexo cristal violeta-iodo (chamado iodo-para-rosanilina), que pode ou não ser removido após o tratamento com solvente orgânico (etanol). Nas bactérias Gram positivas, a parede celular é constituída por uma lâmina espessa de mucopeptídio superposta à membrana citoplásmica. O complexo corante-iodo, fortemente retido nesta lâmina, não é removido com álcool nas condições técnicas do método de Gram. Nas mesmas condições, as Gram negativas, que possuem barreira formada por duas camadas finas de lipopolissacárideos e de lipoproteínas, são descoradas, pois o tratamento com álcool aumenta consideravelmente a permeabilidade das barreiras externas, permitindo a remoção do corante da fina camada de mucopeptídio (BIER, 1978).

Para confirmar a espécie da cepa, foram realizados testes de capacidade de oxidação de diferentes açúcares, em sistema aberto ou fechado, de forma a distinguir a via oxidativa ou fermentativa da bactéria, capacidade de redução de nitrato e de crescimento em NaCl. Estes testes são indicados para as cepas de *Pseudomonas stutzeri* (MURRAY *et al.*, 1999). Os resultados dos testes bioquímicos para confirmação da cepa *Pseudomonas stutzeri* são apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** Resultados das provas bioquímicas para *Pseudomonas stutzeri* realizadas nas ampolas INCQS 00520/ATCC 31258.

Provas bioquímicas	Resultados esperados (MURRAY <i>et al.</i> , 1999)	Resultados obtidos
1 Redução/Nitrato/Gás	+	+
2 Oxidação/Glicose (sistema aberto)	+	+
3 Oxidação/Glicose (sistema fechado)	-	-
4 Oxidação/Lactose	-	-
5 Oxidação/Maltose	+	+
6 Oxidação/Manitol	+	+
7 Crescimento 6,5% NaCl	+	-

A cepa foi capaz de reduzir nitrato a nitrito e a  $N_2$ , o que foi detectado com zinco. Os testes confirmaram que a cepa é oxidativa e não segue a via das fermentações, uma vez que os resultados de oxidação de glicose em sistema aberto foram positivos e negativos em sistema fechado. A cepa não foi capaz de oxidar lactose e é catalase positiva (possui a enzima citocromo oxidase).

Os resultados positivos de oxidação de maltose e manitol pela cepa de *Pseudomonas stutzeri* foram confirmados (embora os meios dos tubos 5 e 6 na Figura 4.3 tenham ficado ainda semi-esverdeados). O teste de crescimento em NaCl 6,5% não foi satisfatório como esperado, uma vez que os resultados positivos ainda eram fracos após quatro dias de cultivo, com somente alguns grumos de células, quando o crescimento deveria deixar o meio turbido.

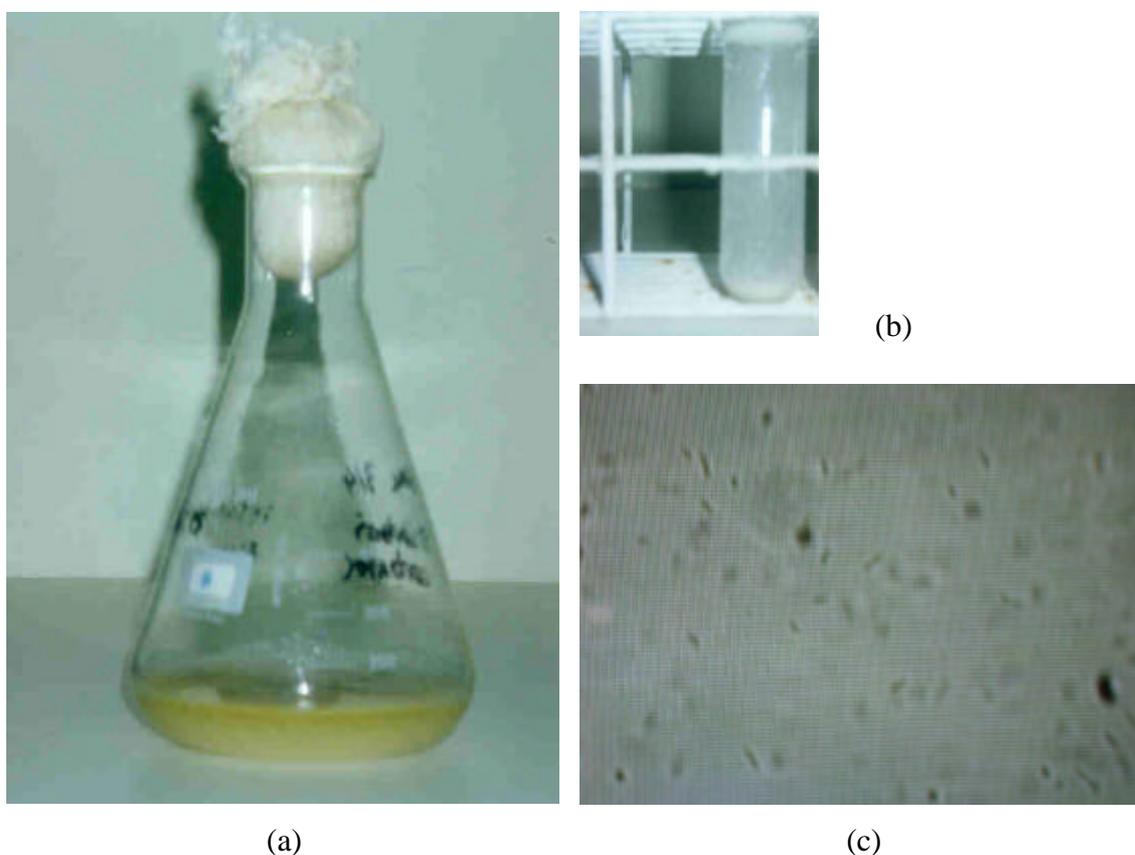


**Figura 4.3** Resultados de testes bioquímicos (4 dias) para *Pseudomonas stutzeri* INCQS 00520/ATCC 31258. Os tubos de ensaio estão na ordem apresentada na Tabela 4.1. Os tubos em meio sólido (2, 3, 5 e 6) são positivos quando ficam amarelos e negativos quando permanecem com a coloração verde. O tubo 4 é negativo quando permanece cor-de-rosa.

As análises bioquímicas confirmaram a espécie da cepa segundo as características identificadas na literatura (MURRAY *et al.*, 1999). O emprego de ferramentas de biologia molecular, como a amplificação e sequenciamento do 16S rRNA também foram empregados nesta confirmação, sendo mais precisos do que as análises bioquímicas implementadas.

#### 4.1.1 Cultivo de *Pseudomonas stutzeri* em carbazol

O crescimento da cepa *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520 em meio mínimo com carbazol como única fonte de carbono e nitrogênio foi confirmado pelo desaparecimento da turbidez do meio inicial e produção de um composto amarelo (ácido antranílico). O crescimento em 10mg/mL de carbazol em água com surfactante foi feito em suspensão, uma vez que carbazol apresenta uma reduzida solubilidade em água. As células em 38h de cultivo foram observadas em microscópio, confirmando a descrição da cepa apresentada na literatura (forma de bastonetes e com muita mobilidade). Estes resultados estão apresentados de forma qualitativa na Figura 4.4.

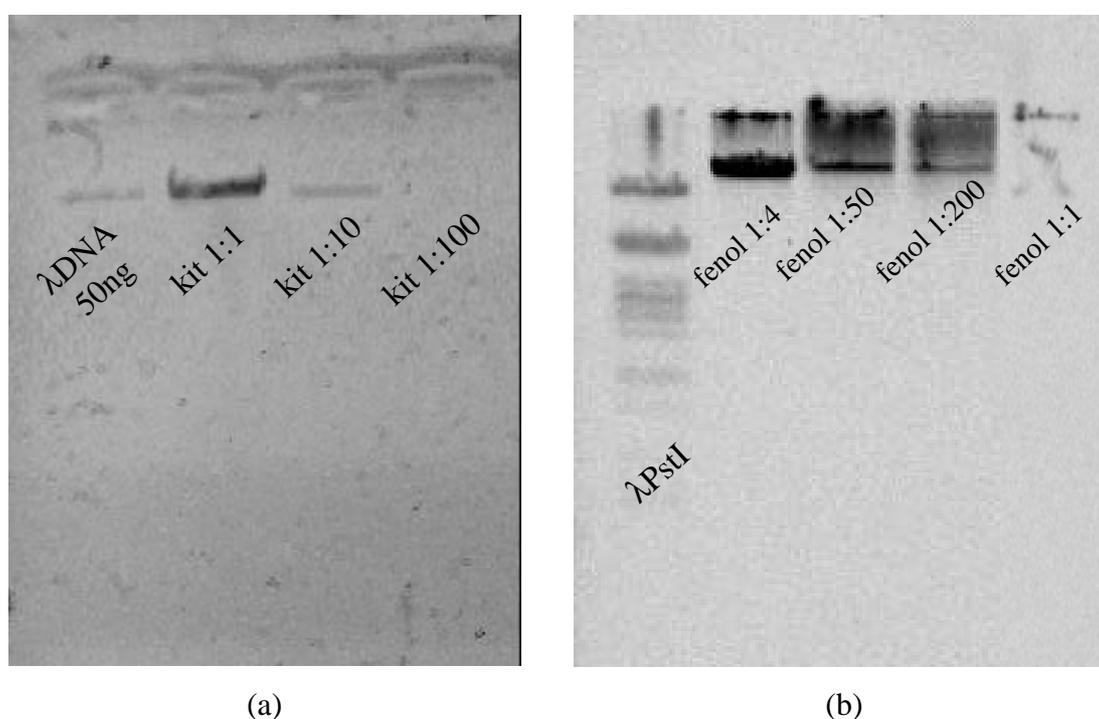


**Figura 4.4** Cultivo da cepa *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520 em meio com carbazol (10g de carbazol, 10g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 5,5g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 1L de água destilada e com 200 $\mu\text{L}$  de Tween 20). Em (a) o resultado do cultivo de 3 dias em comparação com o meio turbido original com carbazol em água com 0,02 % de surfactante Tween 20 (b). Em (c) o aspecto das células ao microscópio óptico com crescimento em 38h a 30°C (1000 X) (LARENTIS, 2003).

## 4.2 Amplificação dos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

### 4.2.1 Extração de DNA de alto peso molecular

A partir de cultivo da cepa *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 em carbazol, foi feita a extração de DNA de alto peso molecular (genômico e de megaplasmídeos, como pCAR1). As soluções de DNA de alto peso molecular obtidas pelos dois métodos de extração (coluna comercial específica para ligação de DNA e extração com fenol/clorofórmio) foram analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 4.5).



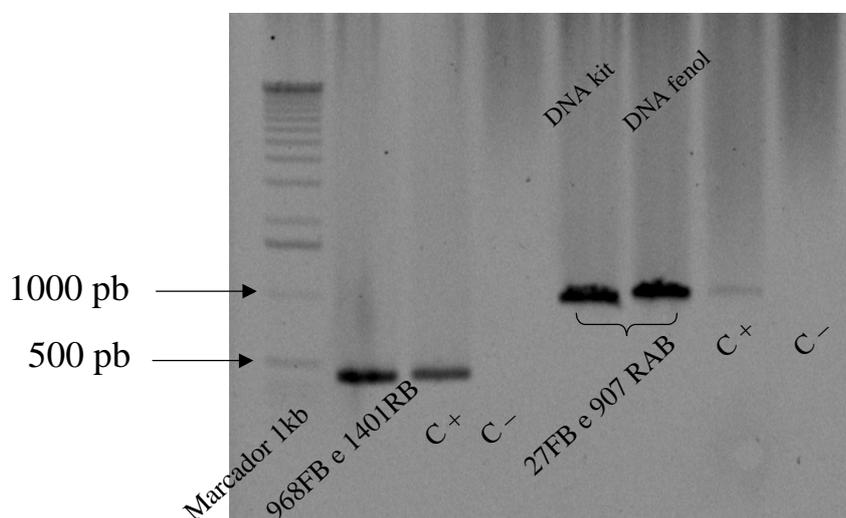
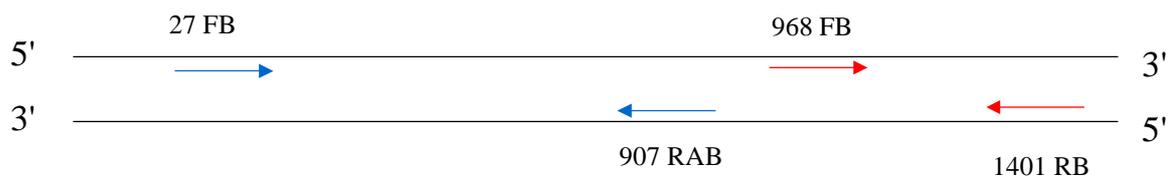
**Figura 4.5** Gel de agarose 0,8% da solução resultante da extração de DNA de alto peso molecular por (a) coluna comercial para ligação específica de DNA (Kit Wizard<sup>®</sup>SV Genomic DNA Purification System, Promega) e (b) protocolo que emprega lisozima e SDS para romper a membrana celular, tratamento do sobrenadante com proteinase K para desnaturação de proteínas, extração mediante sucessivos tratamentos com solução fenol/clorofórmio e álcool isoamílico e precipitação de DNA de alto peso com NaCl e etanol em baixas temperaturas, seguida de lavagem do sal do precipitado com etanol 70% gelado. Foram aplicadas diferentes diluições de cada uma das extrações para definir a quantidade para PCR.

Os géis apresentados na Figura 4.5 mostram que ambos os métodos de extração de DNA de alto peso foram eficientes, permitindo a obtenção de quantidades significativas de DNA, sem contaminação por RNA (constatado pela presença de bandas difusas na parte inferior do gel de agarose). O rendimento do método de extração por fenol/clorofórmio foi superior, uma vez que foi empregada uma quantidade cerca de duas vezes maior de células neste protocolo do que na coluna comercial e a amostra kit 1:100, equivalente a fenol 1:200, praticamente não é visualizada no gel da Figura 4.5. Entretanto, verificou-se a degradação do DNA resultante de outra amostra de extração com fenol/clorofórmio, pela presença de um rastro de bandas em gel de agarose (não mostrado), possivelmente por ter sido agitado em excesso.

A reação de PCR também foi utilizada para confirmar a qualidade dos DNAs extraídos. A quantidade de DNA genômico de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 determinada para amplificação dos genes do operon *car* por PCR foi feita de acordo com a metodologia descrita por SHEPHERD E LLOYD-JONES (1998), que empregou 0,1µg/50µL de DNA molde para amplificação dos genes de *Sphingomonas* CB3. Para utilizar cerca de 50ng de DNA as reações de PCR extraído com coluna comercial e com protocolo empregando fenol/clorofórmio foram utilizadas quantidades equivalentes às bandas identificadas como kit 1:10 e fenol 1:200. A amplificação dos genes de 16S rRNA a partir das duas preparações foi feita com sucesso, como descrito na seção seguinte, confirmando a qualidade das duas amostras.

#### **4.2.2 Identificação do 16S rRNA**

Para confirmação genética da cepa empregada, foram amplificadas duas regiões do 16S rRNA empregando oligonucleotídeos específicos para bactérias. Os DNAs de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 extraídos por coluna comercial e por protocolo com fenol/clorofórmio foram utilizados na amplificação do gene que codifica o 16S rRNA da bactéria, para confirmação da espécie. Foi empregada nas reações DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (*Taq*) expressa e purificada de *Escherichia coli* recombinante. Como esperado, foram obtidos por PCR fragmentos de 400pb e de 1000pb para as os dois genes amplificados com os oligos 968FB e 1401RB e 27FB e 907RB, respectivamente (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Gel de agarose 1% da amplificação por PCR dos genes do 16S rRNA de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 e de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, usado como controle positivo (C+). O controle negativo (C-) da PCR foi feito empregando todas as soluções com exceção de DNA molde. F indicam os oligos diretos (*forward*) e R os reversos (*reverse*) e sua numeração indica a posição das seqüências empregadas no genoma de *Escherichia coli*.

O fragmento de 400pb do gene que codifica o 16S rRNA amplificado por PCR foi eluído do gel de agarose (empregando coluna comercial) e submetido a seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia. Os resultados do seqüenciamento, mostrados na Figura 4.7, permitiram confirmar o gênero da bactéria através da análise da seqüência parcial do gene que codifica o 16S do rRNA de *Pseudomonas*. Possíveis discrepâncias nos resultados apresentados na Figura 4.7 devem-se provavelmente à baixa qualidade do seqüenciamento destas bases.

```

Query= GDBQ0G12.b_CHROMAT_FILE: GDBQ0G12.b_PHD_FILE:
GDBQ0G12.b_.phd.1_CHEM: term DYE: big TIME: Sat Jul 12 15:37:09 2003
(1065 letters)

Sequences producing significant alignments:

Score      E
(bits)     Value

emb|AJ308299.1|PAU308299 Pseudomonas aurantiaca partial 16S rRNA... 119 1e-23
dbj|AB021412.1| Pseudomonas aurantiaca DNA for 16S rRNA, strain ... 119 1e-23
gb|AF098465.1|AF098465 Pseudomonas sp. Iqa-1 16S ribosomal RNA g... 117 4e-23
gb|AY030314.1| Pseudomonas sp. JPL-1 16S ribosomal RNA gene, par... 115 2e-22
gb|AY162140.1| Pseudomonas sp. STB17 16S ribosomal RNA gene, par... 115 2e-22
gb|AY162139.1| Pseudomonas aeruginosa strain BHP7-6 16S ribosoma... 115 2e-22
gb|AY162138.1| Pseudomonas aeruginosa strain MO2 16S ribosomal R... 115 2e-22
gb|AY102324.1| Uncultured bacterium clone a13125 16S ribosomal R... 115 2e-22
gb|AY102310.1| Uncultured bacterium clone a13103 16S ribosomal R... 115 2e-22
gb|AY293865.1| Pseudomonas sp. NUST03 16S ribosomal RNA gene, pa... 115 2e-22

>emb|AJ308299.1|PAU308299 Pseudomonas aurantiaca partial 16S rRNA gene, isolate ICMP
6003; NCIB

      10068
      Length = 1371

Score = 119 bits (60), Expect = 1e-23
Identities = 76/82 (92%)
Strand = Plus / Minus

Query: 53   tagcgattccgacttcatgcagtcgcagagcagaactgcgatccggactacgatcggtttt 112
          |||
Sbjct: 1207 tagcgattccgacttcaegcagtcgnnttgcagactgcgatccggactacgatcggtttt 1148

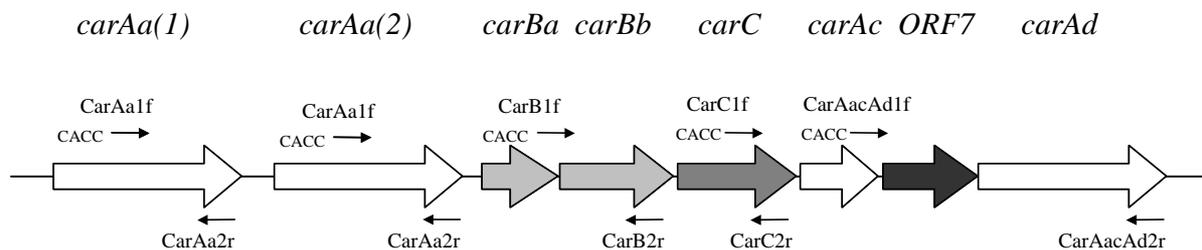
Query: 113  atgggattagctccccctcgcg 134
          |||
Sbjct: 1147 atgggattagctccacctcgcg 1126

```

**Figura 4.7** Resultados do seqüenciamento do gene 16S rRNA com confirmação do gênero *Pseudomonas*.

### 4.2.3 Amplificação dos genes de degradação de carbazol

A amplificação do operon de degradação de carbazol de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 por PCR foi feita com quatro conjuntos de oligos diferentes, de acordo com o esquema apresentado na Figura 4.8, com adição da seqüência CACC na extremidade 5' dos oligos diretos, antes do códon de iniciação, para ligar os produtos de PCR ao plasmídeo de entrada empregando a enzima topoisomerase. Os oligos foram desenhados para amplificação dos genes que codificam, respectivamente, a(s) subunidade(s) catalítica(s) da carbazol dioxigenase (*carAa*), as enzimas CarB e CarC (*carBaBb* e *carC*) e os genes das demais subunidades da enzima CarA que se encontram separados no operon (*carAc* e *carAd*, além da *ORF7*, que, segundo SATO *et al.*, (1997b), não é indispensável para a atividade enzimática).

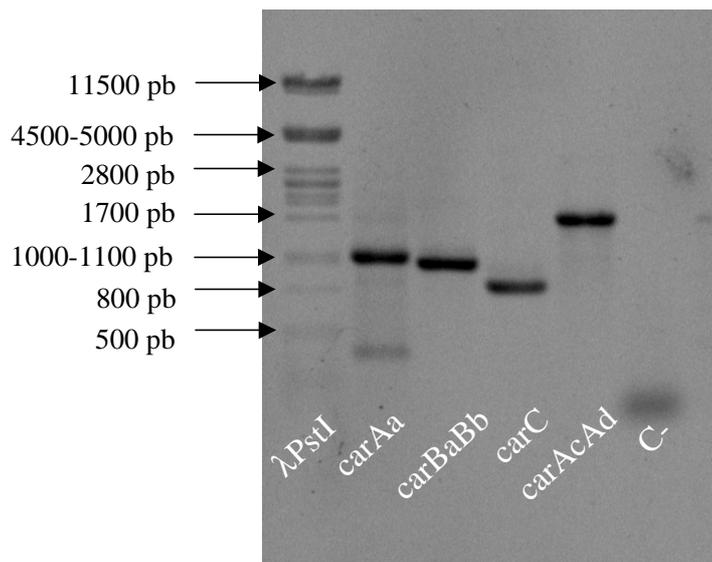


**Figura 4.8** Esquema do desenho dos oligonucleotídeos para clonagem de genes de degradação de carbazol de cepa *Pseudomonas* sp. em plasmídeo pENTR/(SD)/D-TOPO<sup>®</sup>.

A estratégia de obtenção dos genes para quatro diferentes regiões do operon *car* foi pensada para obter as enzimas clonadas em quatro diferentes plasmídeos, possibilitando investigar a funcionalidade das enzimas separadamente, além de evitar problemas de cópia pela extensão dos genes.

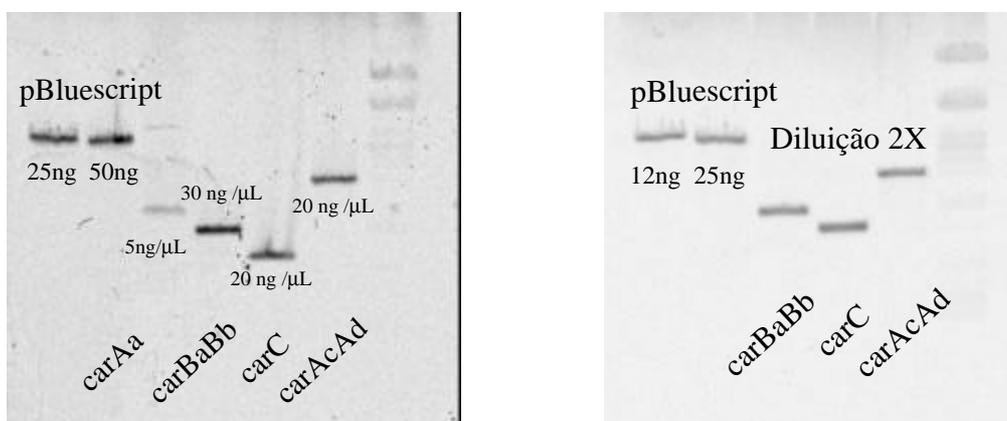
A enzima DNA polimerase de *Pyrococcus* sp. (*Pfx*) foi empregada porque apresenta atividade exonucleásica de correção 3'-5' que permite a identificação e remoção de bases erroneamente incorporadas ao DNA (MAS *et al.*, 2001). Além da capacidade da enzima *Pfx* de amplificar genes com maior probabilidade de acerto em comparação com *Taq* DNA polimerase, esta última enzima adiciona uma base A nas extremidades de cada gene, incompatível com o plasmídeo de clonagem empregado, o que não acontece com a enzima de *Pyrococcus*.

Foram amplificados por PCR (Figura 4.9) fragmentos de aproximadamente 1100pb (*carAa*), 1000pb (*carBaBb*), 900pb (*carC*) e 1700pb (*carAcORF7carAd*), de acordo com os tamanhos esperados pelas análises dos bancos de dados empregando ferramentas de bioinformática e pelas informações da literatura (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b).



**Figura 4.9** Gel de agarose 1% da amplificação dos genes do operon *car* por PCR: *carAa* (1100pb), *carB* (1000pb), *carC* (900pb) e *carAcAd* (1700pb). O marcador utilizado foi lambda DNA digerido com *PstI* na seqüência CTGCA G ( $\lambda PstI$ ). O controle negativo do PCR foi feito empregando água no lugar de DNA molde (no gel é mostrado o resultado de C- de *carAa*).

Os produtos de PCR foram purificados a partir de eluição das bandas extraídas de gel de agarose com baixo ponto de fusão (*low melting*), empregando extração com fenol/clorofórmio. As bandas eluídas foram quantificadas em gel de agarose 1% (Figura 4.10), empregando como padrão quantidades conhecidas do vetor pBluescript, sendo obtido um rendimento de 5ng/ $\mu$ L (*carAa*) e 20-30ng/ $\mu$ L para os demais produtos de PCR, que foram diluídos 2X para empregar na clonagem com topoisomerase.



**Figura 4.10** Quantificação dos produtos de PCR de *carAa* (1100pb), *carB* (1000pb), *carC* (900pb) e *carAcAd* (1700pb) eluídos em gel de agarose 1%.

#### 4.2.4 Amplificação do operon *car* completo de degradação de carbazol

Foram feitas inúmeras tentativas de amplificar o operon *car* completo, de 5,8kb, empregando como iniciadores específicos o oligo direto do plasmídeo 1 (CarAa1f, desenhado de acordo com o início do operon *car*, que codifica a subunidade CarAa) e o oligo reverso do plasmídeo 4 (CarAcAd2r, desenhado de acordo com o final do operon, ou seja, final do gene que codifica a subunidade CarAd).

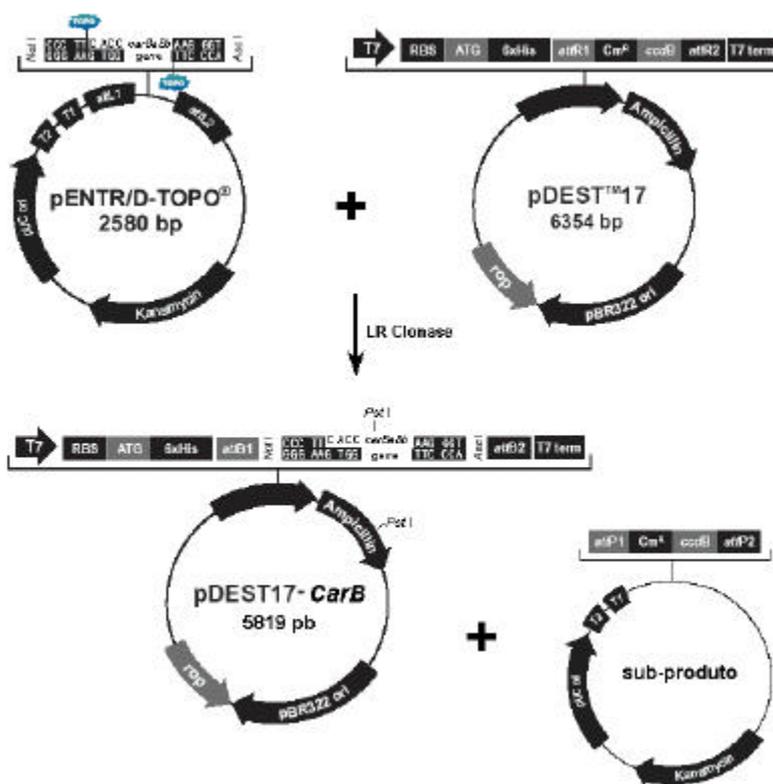
Foram empregadas diversas condições diferentes: enzima *Pfx* em tempos de extensão da reação de PCR até 9min, considerando que a velocidade de adição de bases por *Taq* DNA polimerase é de 1min/kb, concentração de oligonucleotídeos e concentrações de Mg (curva de magnésio com 0,25mM a 2,0mM), nenhuma delas bem sucedidas na amplificação do operon *car* por completo. O mesmo ocorreu com teste empregando mistura de *Pfx* com *Taq* (WESTFALL *et al.*,1995), aliando-se a alta fidelidade da primeira e a capacidade de não adicionar uma base A nas extremidades do gene, com a maior rapidez de cópia da segunda, procurando evitar que a enzima parasse de funcionar antes de completar a cópia do operon de 6kb. Essa foi possivelmente a causa de a reação não ter sido bem sucedida, apesar da literatura indicar que a enzima de *Pyrococcus* sp. é capaz de amplificar DNAs com até 12kb com alta fidelidade (WESTFALL *et al.*, 1999). Uma alternativa é o emprego de enzimas comerciais capazes de amplificar genes longos, como ELONGASE™ (WESTFALL *et al.*,1995), composta de mistura de DNA polimerases de *Taq* e de diferentes espécies de *Pyrococcus* com tampões adequados para permitir a cópia de genes com até 30kb, mas que geralmente apresentam menor fidelidade.

### 4.3 Clonagem

Os genes do operon amplificados por PCR foram eluídos segundo os procedimentos descritos e ligados aos vetores de entrada (pENTR/D-TOPO® pENTR/SD/D-TOPO®) com sítios para enzima topoisomerase e clonados por recombinação sítio-específica empregando os vetores comerciais GATEWAY™.

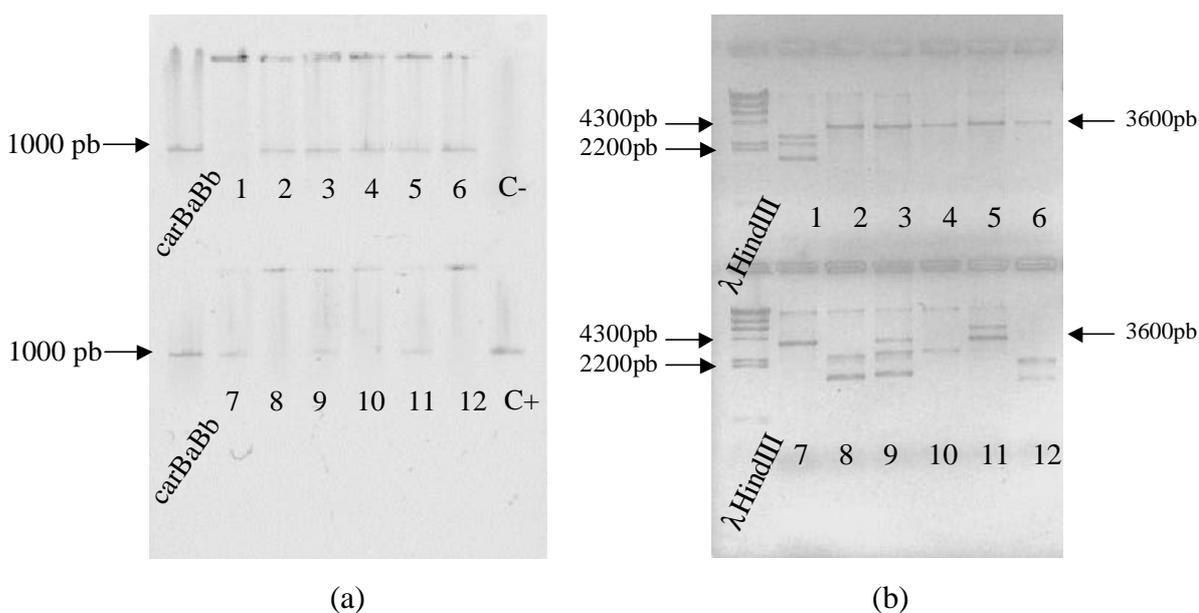
### 4.3.1 Clonagem com cauda de histidina

Inicialmente, o produto de PCR de 1082pb correspondente ao gene *carBaBb* do operon *car* foi ligado ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, de 2580bp (Invitrogen), pelos sítios de reconhecimento da enzima topoisomerase, com auxílio da seqüência coesiva GTGG para ligação do produto de PCR contendo a seqüência complementar CACC adicionada ao oligo direto (HEYMAN *et al.*, 1999). Este vetor contém gene de resistência à canamicina e apresenta também os sítios de *attL1* e *attL2* (de 100bp), para produzir o plasmídeo de expressão empregando a técnica de recombinação sítio-específica pelo sistema enzimático LR Clonase (Invitrogen) com o plasmídeo pDEST<sup>™</sup>17 (6354bp, Invitrogen) que contém os sítios *attR1* e *attR2* (de 125bp cada), além do promotor T7, gene para resistência a ampicilina e cauda de histidina 6xHis, para facilitar a purificação da proteína em coluna de Ni. Além da seleção por antibiótico, a reação forma como sub-produto um vetor que contém um gene marcador (*ccdB*), que codifica uma proteína tóxica à célula, inibindo seu crescimento. Na Figura 4.11 estão esquematizados os plasmídeos e a reação de recombinação sítio-específica.



**Figura 4.11** Estratégia de clonagem do gene *CarB* com cauda de histidina empregando as enzimas de recombinação sítio-específica e topoisomerase (LARENTIS *et al.*, 2005a).

As duas etapas de clonagem foram confirmadas por PCR de 12 colônias selecionadas e por digestão com enzimas de restrição para identificação dos tamanhos dos plasmídeos extraídos das células de *Escherichia coli* recombinantes pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os resultados de confirmação da obtenção do vetor de entrada com topoisomerase são mostrados na Figura 4.12. Como pode ser verificado no gel de agarose, das 12 colônias selecionadas, 8 foram confirmadas positivas para a ligação do gene *carBaBb* ao vetor de clonagem, pelas duas técnicas empregadas (Clones 2, 3, 4, 5, 6, 7). A confirmação dos clones foi feita pela amplificação das bandas de 1082pb por PCR empregando oligos específicos do gene *carBaBb* (Figura 4.Ra) e pela linearização dos plasmídeos com a enzima de restrição *NotI* (GC GGCCGC) na posição 673 do vetor pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, produzindo uma banda de 3600pb em gel de agarose, como indicado na Figura 4.12 (b).

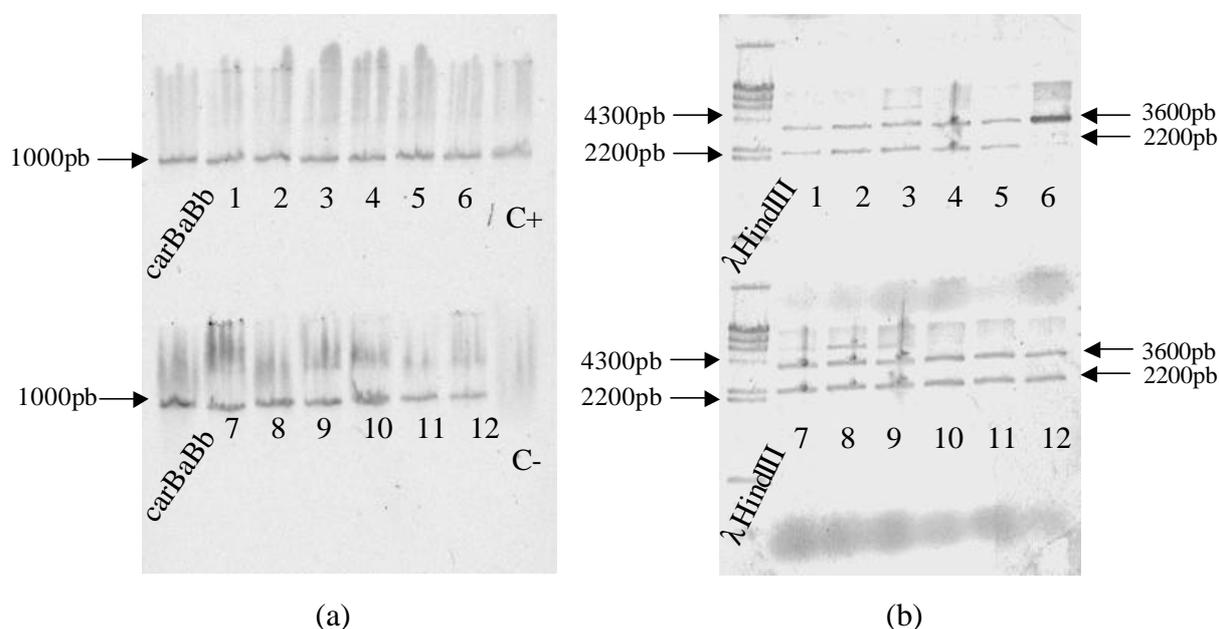


**Figura 4.12** Confirmação dos clones 2-7 de pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> + *carBaBb* por (a) PCR de colônia (amplificação de fragmento com 1000pb) e (b) digestão com a enzima *NotI* (inserto de ~3600pb) em gel de agarose 1% (LARENTIS *et al.*, 2003c).

Pela análise dos resultados de PCR e digestão plasmidial, mostrados na Figura 4.12, pode-se inferir que os clones 9 e 11 contêm o plasmídeo pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> com o inserto do gene *carBaBb*, uma vez que apresentam uma banda em torno de 1000pb e também uma banda de cerca de 3600pb pela digestão com *NotI*. Entretanto, a digestão

produziu outras bandas além da única esperada para os clones positivos, indicando que pode ter ocorrido contaminação, ligação errônea, inserção de mais de um tipo de plasmídeo na eletroporação desta colônia. Ainda no caso do clone 9, além da banda de 3600pb, há o aparecimento de uma banda de cerca de 2600pb, podendo indicar transformação da colônia concomitante com plasmídeo pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> com e sem o inserto, respectivamente. No caso dos clones 1, 8, 10 e 12, que não foram positivos por PCR com iniciadores específicos para *carBaBb* e não apresentaram banda de cerca de 3600pb na digestão, estas colônias podem ter recebido o plasmídeo pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> vazio.

O clone positivo pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> + *carBaBb* (5) foi empregado na recombinação sítio-específica para obtenção do vetor de expressão da enzima CarB. Novamente 12 colônias foram selecionadas por ampicilina e confirmadas por PCR e por digestão dos plasmídeos extraídos pela mesma técnica que na etapa anterior. Os resultados são mostrados na Figura 4.13.

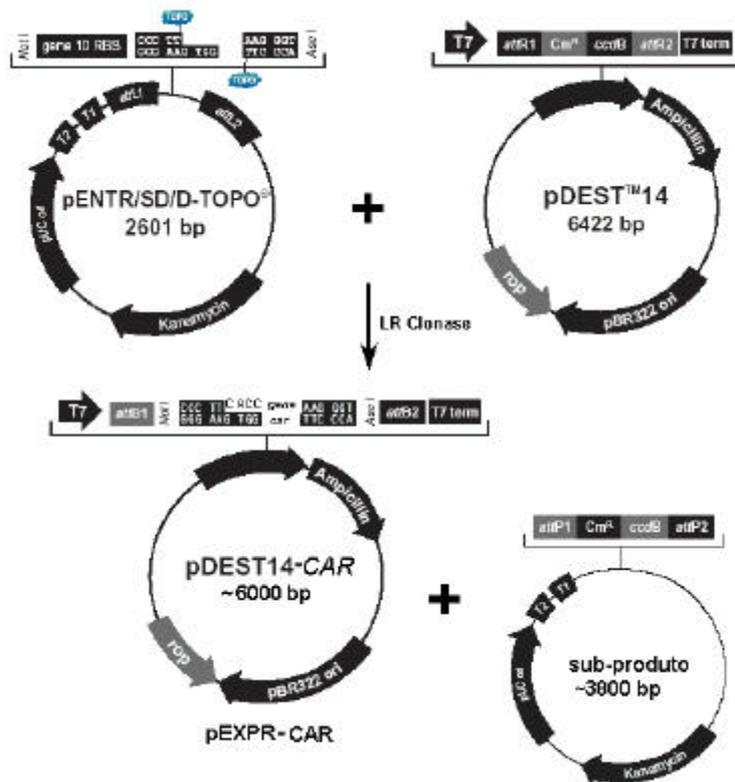


**Figura 4.13** Confirmação dos clones de pDEST<sup>™</sup>17 + *carBaBb* por (a) PCR de colônia (amplificação de fragmento com cerca de 1000pb) e (b) digestão com a enzima *Pst*I (fragmentos de 3,6kb e 2,2kb) em gel de agarose 1% com marcador de tamanho λHindIII (LARENTIS *et al.*, 2003c).

Nesta etapa, a confirmação dos clones pela amplificação das bandas de 1082pb por PCR (Figura 4.13a) e pela linearização dos vetores de expressão com a endonuclease de restrição *Pst*I (CTGCA G). O sítio desta enzima de restrição é encontrado na posição 3116, no gene de resistência à ampicilina do vetor pDEST™17, assim como na posição 181 do gene *carBaBb*. A confirmação da obtenção do vetor de expressão contendo o gene desejado corretamente inserido foi feita pelo aparecimento de duas bandas (cujos tamanhos foram calculados como 3604pb e 2215pb) em gel de agarose da digestão com *Pst*I (Figura 4.13b). A análise dos clones produzidos por recombinação sítio-específica, com 100% de confirmação por PCR e digestão plasmidial, em comparação com os vetores produzidos pela ligação com topoisomerase, alguns com ligação errônea ou sem a ocorrência da ligação do gene *carBaBb*, confirma alta especificidade da reação das enzimas recombinases, como indicado na literatura (HARTLEY *et al.*, 2000, LARENTIS *et al.*, 2005a).

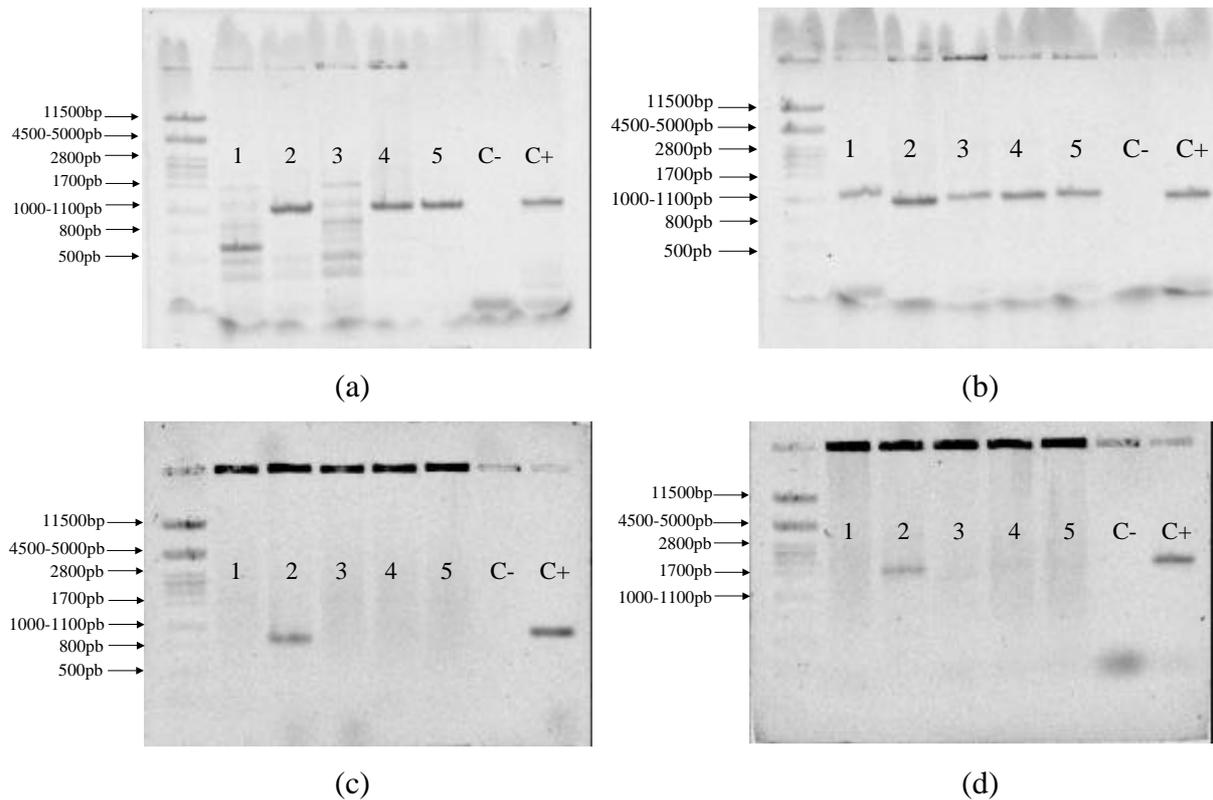
#### **4.3.2 Clonagem das enzimas na forma nativa**

O vetor de entrada pENTR/SD/D-TOPO® de 2601bp (Invitrogen) foi utilizado para a clonagem de enzimas na forma nativa, permitindo a ligação dos produtos de PCR na posição correta (*in frame*) empregando a enzima topoisomerase, de forma similar ao plasmídeo para clonagem com cauda de histidina. Os mesmos sítios, *attL* e *attR*, presentes no vetor de entrada e no plasmídeo de destino com resistência à ampicilina pDEST™14 (Invitrogen), respectivamente, participam da reação de recombinação sítio-específica. como mostrado no esquema de reação da Figura 4.14.



**Figura 4.14** Estratégia de clonagem dos genes do operon *car* empregando topoisomerase e recombinação sítio-específica (LARENTIS *et al.*, 2004c).

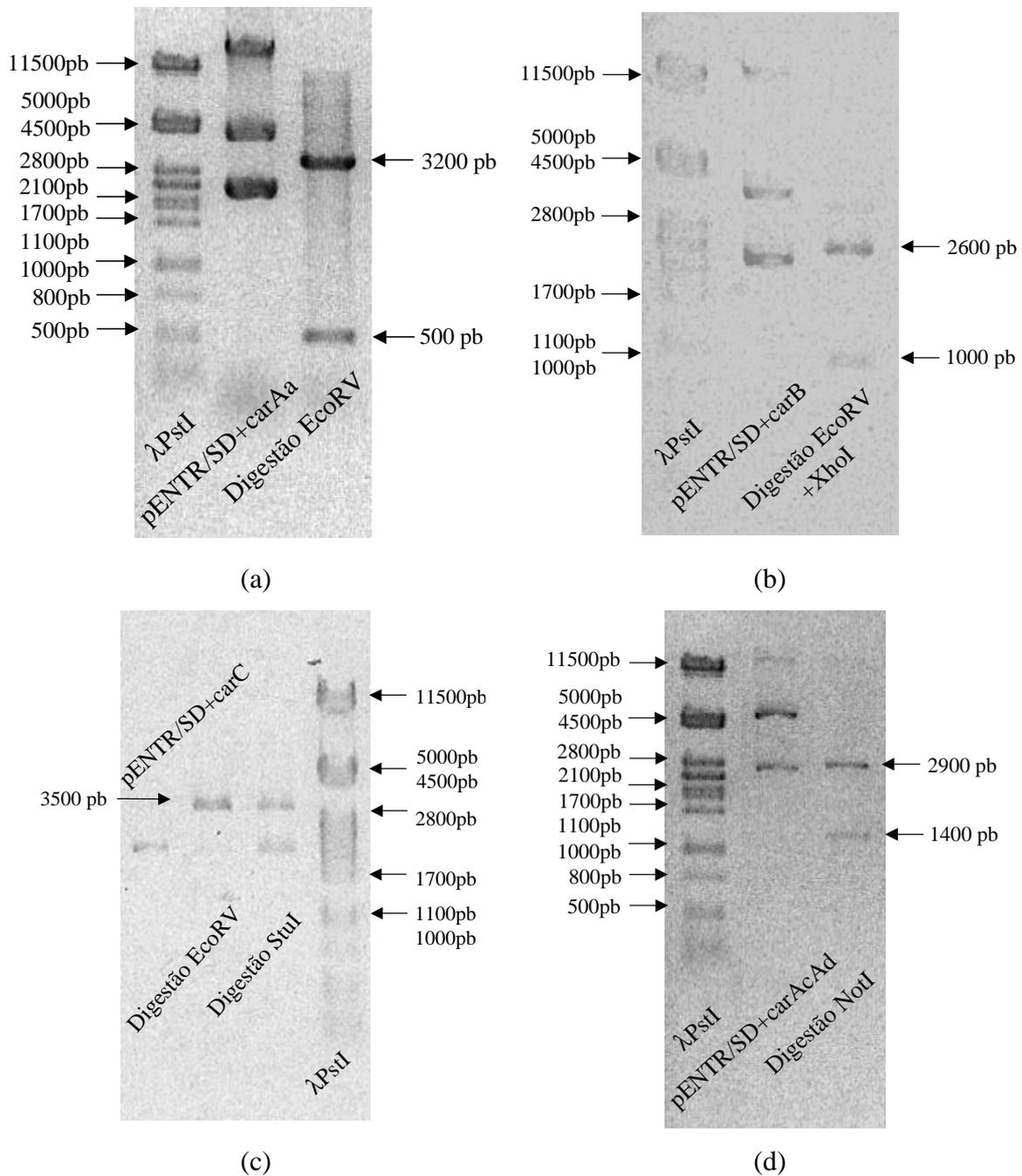
As colônias transformantes foram analisadas por PCR (Figura 4.15), digestão com enzimas de restrição para identificação dos tamanhos dos plasmídeos (Figura 4.16) e por seqüenciamento. Em média, de cada 5 colônias selecionadas para cada um dos genes ligado ao vetor pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>, uma foi confirmada positiva: para *carAa* foram confirmados 3 clones (obtenção de banda de 1100pb por PCR e de bandas inespecíficas nos clones negativos) e um clone positivo para *carB* (os resultados de PCR foram inconclusos, pois todos os clones, mesmo negativos por digestão, apresentaram banda de 1000pb), para *carC* (banda de 900pb por PCR) e para *carAcAd* (banda de 1700pb).



**Figura 4.15** Resultados de análise de PCR empregando como molde o DNA extraído de 5 colônias transformantes de cada um dos genes clonados no plasmídeo pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>: *carAa* (a), *carB* (b), *carC* (c) e *carAcAd* (d). O controle positivo (C+) das reações de PCR foi feito empregando aproximadamente 50ng de DNA de alto peso molecular de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 e iniciadores específicos para cada gene. O controle negativo (C-) do PCR foi feito empregando água no lugar de DNA molde (LARENTIS *et al.*, 2004a).

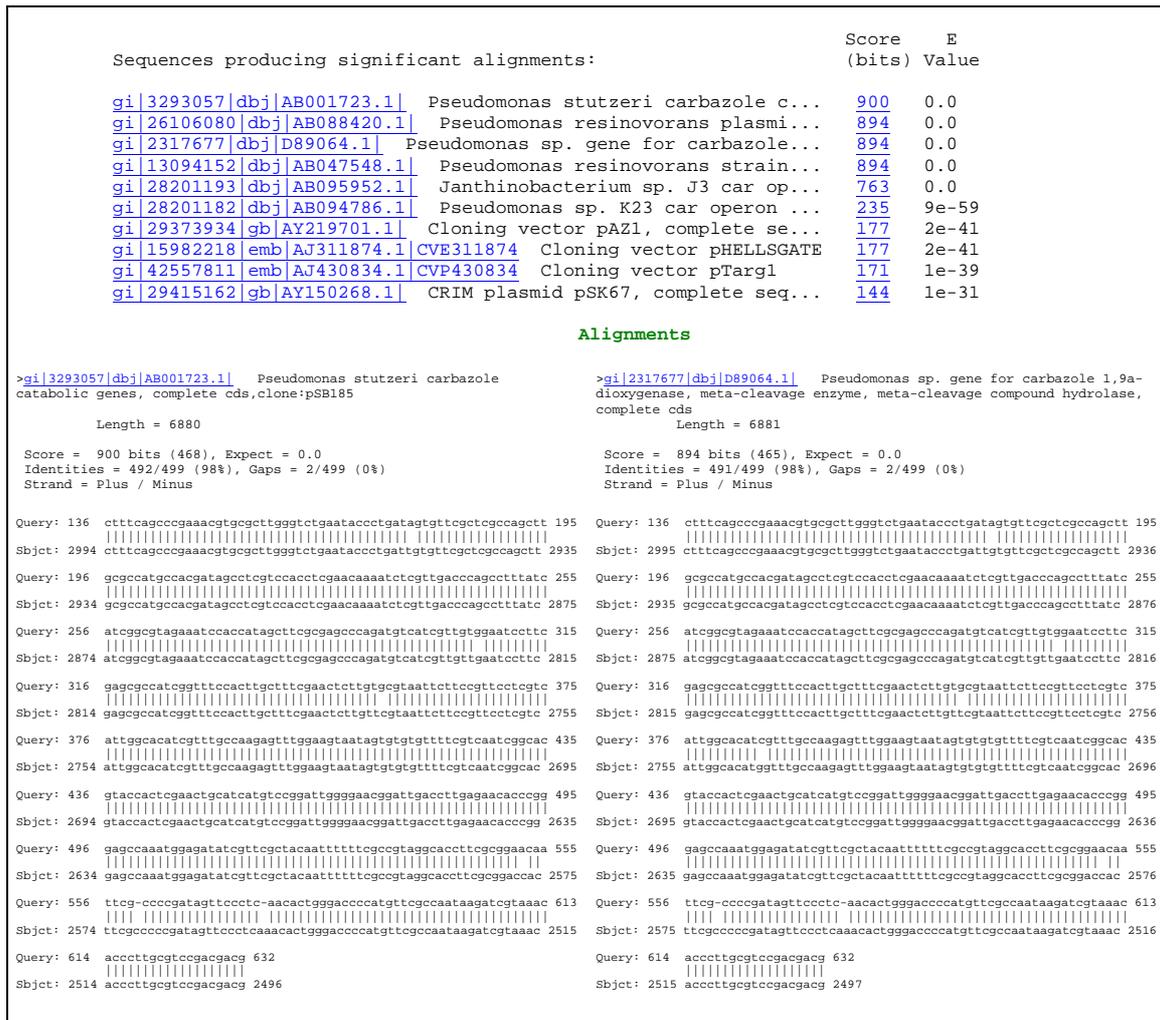
Pelos resultados de digestão mostrados na Figura 4.16, confirmou-se a obtenção dos plasmídeos de entrada. A enzima *EcoRV*, que reconhece o sítio GAT ATC, foi empregada na clivagem da posição 839 do plasmídeo pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup> para *carAa*, *carB* e *carC*. Para o gene *carAa* (1155pb), o sítio da enzima *EcoRV* também está presente na posição 781, confirmando-se a obtenção de duas bandas: 3253 e 503pb; o plasmídeo positivo para *carB* (1082pb) foi confirmado pela digestão com *XhoI* no sítio C TCGAG da posição 133 do gene (obtenção das bandas 2605pb e 1078pb); e para *carC* pela clivagem de AGG CCT de *StuI* na posição 420 do gene *carC* de 873pb, confirmando-se a linearização do plasmídeo (3474pb) por esta enzima (com digestão parcial, como se verifica na Figura 4.16c) e por *EcoRV*. O plasmídeo pENTR/SD + *carAcAd* foi confirmado pela digestão com *NotI* nos sítios GC GGCCGC, presentes nas

posições 655 do gene *carAd* (equivalente à posição 1297 do fragmento de 1666pb correspondente à *carAcORF7Ad*) e 673 do plasmídeo, obtendo-se duas bandas: 2894pb e 1373pb.



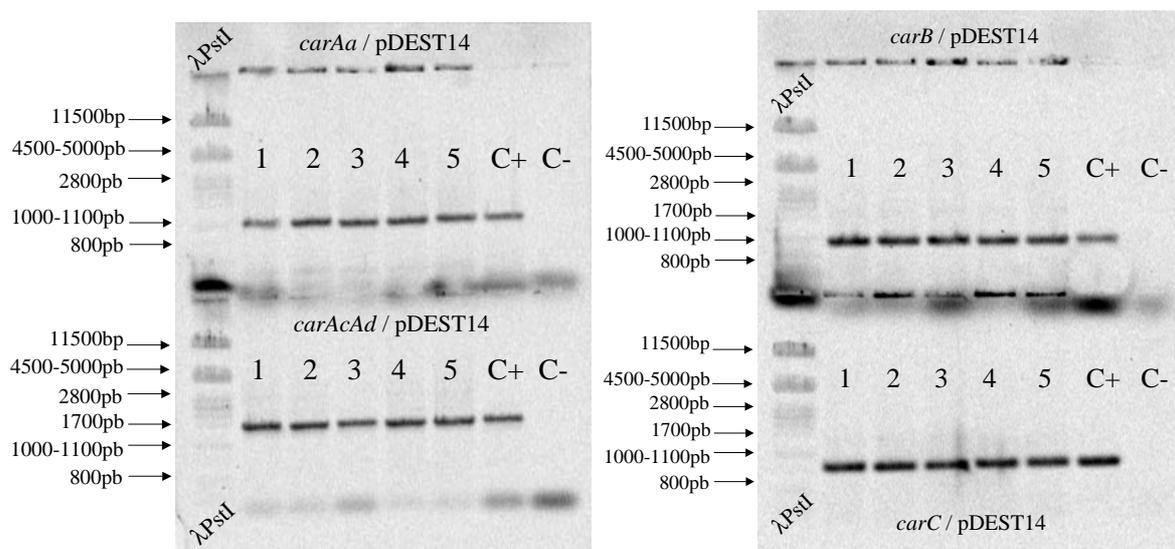
**Figura 4.16** Géis de agarose 1% com as digestões dos plasmídeos pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup> ligados aos genes (a) *carAa*, (b) *carB*, (c) *carC* e (d) *carAcAd*, em comparação com os plasmídeos não digeridos. As bandas geradas nas digestões com as enzimas indicadas em cada gel foram confirmadas empregando  $\lambda PstI$  como marcador de tamanho (LARENTIS *et al.*, 2004c).

As seqüências dos plasmídeos pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup> clonados com os genes do operon *car*, confirmados por PCR, por digestão e submetidos ao seqüenciamento, foram analisadas por alinhamento local (BLAST), indicando 98% de identidade com os genes de degradação de carbazol das bactérias *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998) e *Pseudomonas resinovorans* CA10 (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b), depositadas no GenBank (Figura 4.17).



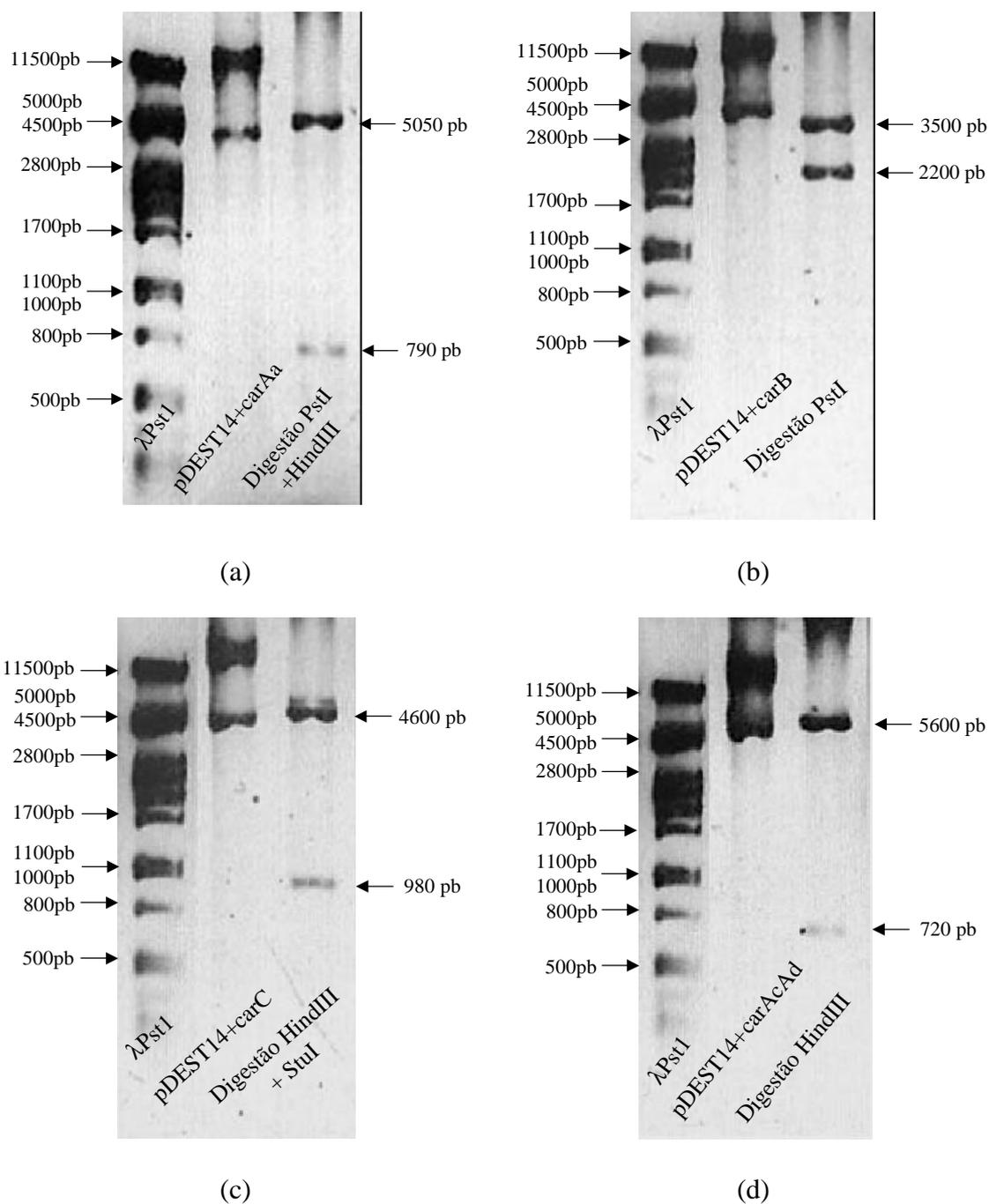
**Figura 4.17** Resultado do seqüenciamento de plasmídeo pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup> com genes *car*.

Os clones positivos de entrada foram empregados na recombinação sítio-específica para obtenção do vetor de expressão de cada uma das enzimas. Foram selecionadas 5 colônias por ampicilina, todas positivas pela análise de PCR, sendo amplificados segmentos de DNA com os mesmos tamanhos descritos anteriormente. Os resultados de PCR empregando as colônias como molde são mostrados na Figura 4.18.



**Figura 4.18** Resultados de análise de PCR empregando como molde o DNA extraído de 5 colônias transformantes (todas positivas) de cada um dos genes clonados no plasmídeo pDEST™14: *carAa* (1100pb), *carB* (1000pb), *carC* (900pb) e *carAcAd* (1700pb). O controle positivo (C+) das reações de PCR foi feito empregando aproximadamente DNA de alto peso molecular de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 e oligos específicos para cada gene e o controle negativo (C-) empregando água no lugar de DNA molde (LARENTIS *et al.*, 2004a).

Os vetores obtidos também foram analisados por digestão, obtendo-se plasmídeos de expressão de 6kb (com sítios *attB* de 25bp), indicando a alta especificidade da reação das enzimas recombinases. Os resultados de digestão são mostrados na Figura 4.19, confirmando os tamanhos calculados para os plasmídeos. O sítio de *PstI* (CTGCA G), presente na posição 3184 de pDEST™14, assim como sítio de *HindIII* (A AGCTT) da posição 2397 foram empregados na confirmação por digestão. Foram confirmados os tamanhos de 5840pb para pDEST™14 + *carAa*; as bandas 3552pb e 2215pb para o vetor de destino de *carB* digerido com *PstI* no plasmídeo e na posição 181 do gene; a digestão de *carC* com *StuI* na posição 420 do gene e com *HindIII* no vetor de destino, obtendo-se as bandas 4578pb e 980pb; e bandas 5634pb e 717pb pela digestão de *carAcAd* com *HindIII* em pDEST™14 e na posição 1476 do gene.



**Figura 4.19** Géis de agarose 1% com digestões de pDEST™14 ligados aos genes (a) *carAa*, (b) *carBaB*, (c) *carC* e (d) *carAcAd* em comparação com os plasmídeos não digeridos.  $\lambda$ PstI foi empregado como marcador de tamanho para identificação das bandas geradas nas digestões (indicadas por flechas). Foram empregadas enzimas (indicadas em cada gel) para produção de duas bandas: uma restrição no gene e outra no plasmídeo (LARENTIS *et al.*, 2004c).

## 4.4 Expressão

Dentre os vários sistemas de superexpressão disponíveis para produção de proteínas recombinantes, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos mais utilizados, inclusive em escala comercial, devido a sua não patogenicidade e habilidade de crescer rapidamente em altas concentrações celulares utilizando substratos baratos, de sua genética ser bem conhecida e de haver disponibilidade (em expansão) de muitos vetores de clonagem e cepas mutantes (BHANDARI E GOWRISHANKAR, 1997, BANEYX, 1999).

### 4.4.1 Indução de *Escherichia coli* DH10B com IPTG

Testes preliminares de expressão de CarB foram feitos empregando a cepa *Escherichia coli* DH10B, após indução com IPTG. A expressão das enzimas recombinantes nestas condições não foi verificada ou ocorreu em níveis muito baixos (dados não mostrados). Isto ocorreu possivelmente pelo emprego da cepa DH10B, que é própria para manutenção de DNAs heterólogos e para emprego em procedimentos de clonagem, mas não para expressão de proteínas (não é deficiente em proteases, por exemplo).

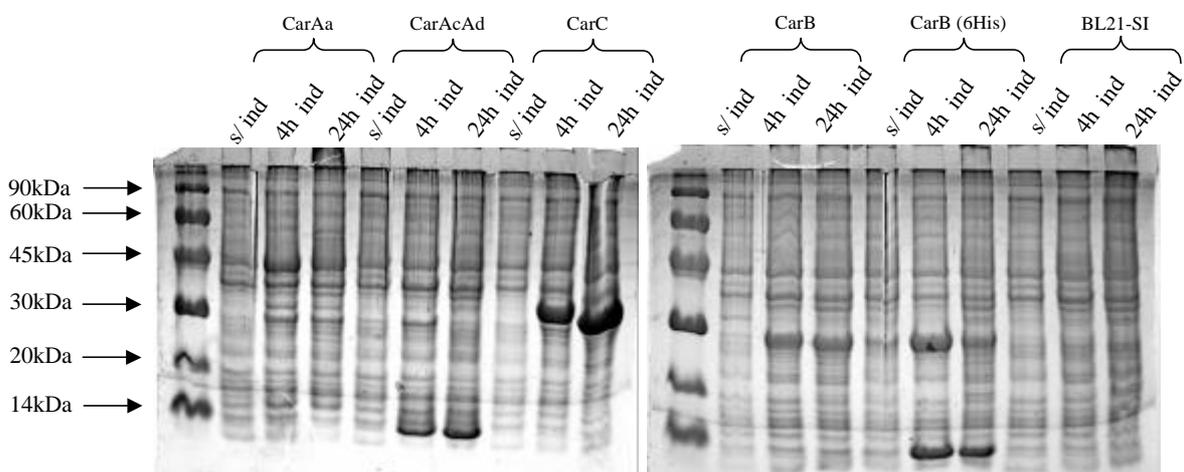
Após os testes preliminares negativos de indução com IPTG, os plasmídeos recombinantes foram empregados na transformação da cepa *Escherichia coli* BL21-SI, própria para expressão heteróloga de proteínas.

### 4.4.2 Indução de *Escherichia coli* BL21-SI com NaCl

As enzimas clonadas foram superexpressas em *Escherichia coli* BL21-SI, que emprega NaCl como indutor para superexpressão de proteínas em *Escherichia coli*, e é deficiente em proteases, para minimizar a degradação de proteínas heterólogas. Nesta cepa, derivada da GJ1158, desenvolvida por BHANDARI E GOWRISHANKAR (1997), a síntese da RNA polimerase do bacteriófago T7 (T7 RNAP) é controlada pelo

promotor *proU* de *Escherichia coli*, induzido osmoticamente e que está associado a um aumento da proporção de proteínas superexpressas na fração solúvel, pela significativa redução da formação de corpos de inclusão.

A confirmação da expressão das proteínas foi obtida pela constatação do aparecimento das bandas correspondentes ao tamanho esperados de cada uma das proteínas em gel SDS-PAGE 18% (Figura 4.20): para CarAa, uma banda de 42kDa, para CarAd e CarAc, bandas de 36 e 12kDa, respectivamente; duas bandas de 29 e 10kDa, correspondentes CarBb e CarBa, respectivamente e uma banda de 30kDa significativamente enriquecida no extrato celular total de CarC. Os resultados de expressão (LARENTIS *et al.*, 2004d, LARENTIS *et al.*, 2004e, LARENTIS *et al.*, 2005b) mostraram o enriquecimento das proteínas de degradação de carbazol nos extratos celulares empregando sistema de clonagem por recombinação sítio-específica e células induzidas por NaCl, em níveis de expressão similares aos obtidos por sistemas de clonagem bem estabelecidos, como os vetores pUC (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, IWATA *et al.*, 2003, NOJIRI *et al.*, 2003), pET (RIDDLE *et al.*, 2003b, HABE *et al.*, 2003), induzidos por IPTG.



**Figura 4.20** Gel SDS-PAGE 18% com 20 $\mu$ g de proteína total de extrato celular obtido por sonicação das induções de *Escherichia coli* BL21-SI recombinantes com 0,3M de NaCl, em  $A_{600nm}=0,8$  e 37°C (LARENTIS *et al.*, 2004d). A expressão de CarAa, CarAcAd, CarC e CarB foram feitas de forma nativa com plasmídeo pDEST™14 e CarB (6His) em vetor pDEST™17. A cepa BL21-SI sem plasmídeo foi usada como controle negativo. O padrão de peso molecular empregado foi LMW (Amersham Bioscience).

Verificou-se expressão em maiores níveis para a maior subunidade da 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarBb, de 29kDa) em comparação com CarBa (de 10kDa), principalmente para a expressão em vetor de forma nativa. A expressão de CarB com cauda de histidina apresentou níveis similares aos do vetor sem proteína de fusão, com um aumento na indução de CarBa, possivelmente porque a cauda 6His foi adicionada a esta componente. Resultados similares de expressão de CarB de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 foram verificados para a enzima de *meta*-clivagem de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (IWATA *et al.*, 2003) e *Pseudomonas* sp. LD2 (GIBBS *et al.*, 2003). A enzima CarB de *Sphingomonas* sp. GTN11, cepa isolada por KILBANE II *et al.* (2002), foi clonada com atividade no hospedeiro termofílico *Thermus thermophilus*, embora possivelmente os resultados de expressão ainda não sejam satisfatórios, uma vez que não são apresentados na publicação. De qualquer forma, os resultados são promissores, mostrando que é possível expressar enzimas mesofílicas, multicomponentes, dependente de cofatores em hospedeiros termofílicos, apresentando atividade em temperaturas mais altas (PARK *et al.*, 2004).

O significativo enriquecimento de CarC foi verificado nas expressões da hidrolase de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (SATO *et al.*, 1997a, NOJIRI *et al.*, 2003), *Pseudomonas* sp. LD2 (RIDDLE *et al.*, 2003b). Segundo os resultados de purificação de CarC de CA10 e *Janthinobacterium* sp. cepa J3, cerca de 20mg da enzima foi obtida em 200 mL de cultivo, sem alterar a atividade com cauda de histidina (HABE *et al.*, 2003).

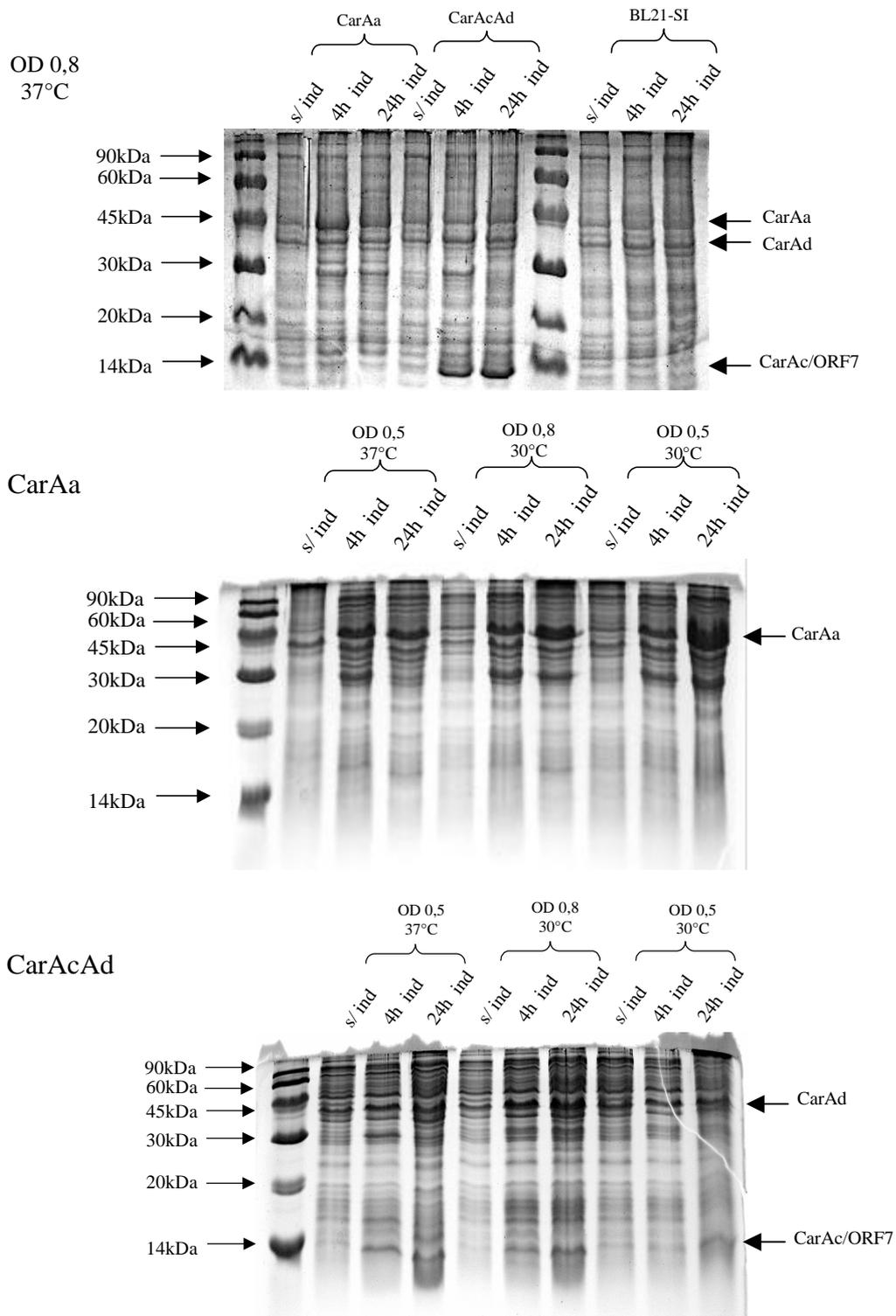
A enzima carbazol 1,9a-dioxigenase, formada por três subunidades (CarAa, CarAc e CarAd), foi expressa em dois vetores pDEST<sup>TM</sup>14 separados, um deles contendo o gene *carAa* e outro os genes *carAc* e *carAd*, além da *ORF7*, que não é essencial para a atividade catalítica, segundo resultados de SATO *et al.* (1997a). Os resultados de expressão de CarA recombinante da *Pseudomonas resinovorans* CA10 induzida com IPTG são os únicos descritos na literatura e os níveis de expressão de CarAa (maior subunidade, com 42kDa) e CarAc (menor subunidade, com 12kDa) da cepa CA10 são superiores aos da componente intermediária, CarAd, de 36kDa (SATO *et al.*, 1997a). Um perfil similar foi obtido para a enzima recombinante de *Pseudomonas stutzeri* induzida por sal em *Escherichia coli* BL21-SI: enquanto as bandas de CarAa e CarAc foram facilmente identificadas em gel de SDS-PAGE (Figura 4.20) pelo aumento da expressão protéica nos tamanhos esperados das proteínas, a expressão de CarAd nesta condição foi muito baixa, dificultando inclusive sua confirmação. Para melhorar os

níveis de expressão e estudar os efeitos de algumas variáveis sobre este sistema, foi empregado um planejamento fatorial a dois níveis.

#### **4.4.3 Otimização da expressão de CarAa e CarAcAd**

A influência de algumas variáveis importantes na indução com sal das componentes da carbazol dioxigenase (CarAa, CarAc, CarAd) foi analisada empregando planejamento experimental a dois níveis (BOX E DRAPER, 1987), buscando a otimização da expressão destas proteínas (LARENTIS *et al.*, 2005c). Os níveis de algumas variáveis de expressão das proteínas recombinantes da rota de degradação de carbazol de *Pseudomonas* sp. em *Escherichia coli* foram selecionadas a partir de resultados apresentados na literatura (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, NAM *et al.*, 2002b, RIDDLE *et al.*, 2003b).

As proteínas CarAa, CarAc e CarAd foram expressas em *Escherichia coli* BL21-SI, mediante indução com sal em diferentes condições de concentração celular ( $A_{600}$ ), temperatura ( $T$ ) e tempo ( $t$ ). A partir da análise dos géis de SDS-PAGE foi possível identificar bandas mais fortes em comparação com as amostras não induzidas abaixo do marcador de 45 kDa (CarAa e CarAd) e o aparecimento de uma banda abaixo de 14kDa (CarAc e ORF7), compatíveis com os tamanhos esperados para cada uma das proteínas (Figura 4.21).



**Figura 4.21** Géis de SDS-PAGE 18% com 20 $\mu$ g de proteína total (coradas com Coomassie brilliant blue R-250) em cada amostra de indução de BL21-SI contendo plasmídeos recombinantes pDEST™14 para expressão das proteínas CarAa, CarAc e CarAd em diferentes condições de concentração celular, temperatura e tempo. A cepa BL21-SI sem plasmídeo foi usada como controle negativo. LMW (Amersham Bioscience) foi empregado como padrão de peso molecular de proteínas (LARENTIS *et al.*, 2005c).

As áreas das bandas de indução de 42kDa (CarAa) e de 36kDa e 12kDa, correspondentes a CarAd e CarAc, foram computadas e analisadas estatisticamente nas diferentes condições dos géis mostrados na Figura 4.21. Foi verificado que cada uma das proteínas apresenta uma resposta diferente para cada uma das variáveis analisadas. As áreas das bandas calculadas por densitometria em cada condição de indução estão apresentadas na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** Áreas das bandas de expressão das proteínas CarAa, CarAc e CarAd em diferentes condições de concentração celular, temperatura e tempo na indução com 0,3M de NaCl, calculadas em relação à condição padrão ( $A_{600}=0,5$ ,  $T=37^{\circ}\text{C}$  e  $t=4\text{h}$ ).

Condição	$A_{600}$	$T$	$t$	CarAa	CarAc	CarAd
$A=0,8$ $T=37^{\circ}\text{C}$ $t=4\text{h}$	1,0	1,0	-1,0	107,2	171,1	9,0
$A=0,8$ $T=37^{\circ}\text{C}$ $t=24\text{h}$	1,0	1,0	1,0	19,6	202,2	0,0
$A=0,5$ $T=37^{\circ}\text{C}$ $t=4\text{h}$	-1,0	1,0	-1,0	100,0	100,0	100,0
$A=0,5$ $T=37^{\circ}\text{C}$ $t=24\text{h}$	-1,0	1,0	1,0	116,0	25,3	47,8
$A=0,8$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=4\text{h}$	1,0	-1,0	-1,0	112,2	56,1	151,8
$A=0,8$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=24\text{h}$	1,0	-1,0	1,0	163,2	84,0	69,9
$A=0,5$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=4\text{h}$	-1,0	-1,0	-1,0	101,8	23,2	83,1
$A=0,5$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=24\text{h}$	-1,0	-1,0	1,0	255,7	149,5	42,5

Para as proteínas CarAa e CarAd foi possível identificar as variáveis com maior influência a partir dos resultados do planeamento experimental realizado e foi possível propor um modelo empírico para a expressão destas proteínas. Para CarAc as variáveis analisadas não foram estatisticamente significativas, uma vez que os valores dos desvios

padrão obtidos foram maiores do que os valores dos parâmetros, invalidando assim o modelo matemático proposto. Os modelos empíricos obtidos, em função da concentração celular ( $A_{600}$ ), temperatura ( $T$ ) e tempo ( $t$ ), para a expressão de CarAa e CarAd (em termos de área relativa à condição padrão) foram, respectivamente:

$$\text{Expressão CarAa} = 121,94 - 21,43 A_{600} - 36,26 T + 16,65 t + -25,81 A_{600} \cdot t - 34,55 T \cdot t \quad (4.1)$$

Desvio padrão dos parâmetros: 0,63

$$\text{Expressão CarAc} = 101,4 + 53,9 A_{600} + 46,5 T + 27,7 t + 70,1 A_{600} \cdot T + 1,8 A_{600} \cdot t - 49,4 T \cdot t \quad (4.2)$$

Desvio padrão dos parâmetros: 51,1

$$\text{Expressão CarAd} = 63,0 - 23,8 T - 23,0 t - 29,4 A_{600} \cdot T \quad (4.3)$$

Desvio padrão dos parâmetros: 7,1

A análise do modelo apresentado na Equação 4.1 indica que a temperatura e a combinação da temperatura e tempo foram as variáveis com efeito mais significativo sobre a expressão de CarAa, seguidos da concentração celular e sua interação com o tempo de indução.  $T$  e  $A_{600}$  na indução apresentaram efeitos inversos, ou seja, maiores níveis de expressão de CarAa podem ser obtidos em menores temperaturas e concentrações celulares, enquanto para maiores tempos de indução os níveis de resposta são maiores.

A expressão de CarAd apresentou influência estatisticamente significativa da interação entre a concentração celular e a temperatura de indução, da temperatura e do tempo, todos com efeitos inversos sobre a expressão de CarAd. A redução na expressão da proteína em todas as condições de 24h em comparação com tempos de 4h pode indicar um efeito de degradação da mesma. É interessante verificar que, de forma diferente de CarAa, para maiores concentrações celulares na indução com sal, o modelo indica maiores níveis de expressão desta proteína, em efeito conjugado com a temperatura. Este comportamento pode estar associado com alguma toxicidade da proteína heteróloga à célula.

Embora o modelo obtido para a expressão de CarAc não tenha sido estatisticamente validado, pode ser verificado que os efeitos das variáveis analisadas são opostos à expressão de CarAd: maiores concentrações celulares, temperatura e tempo

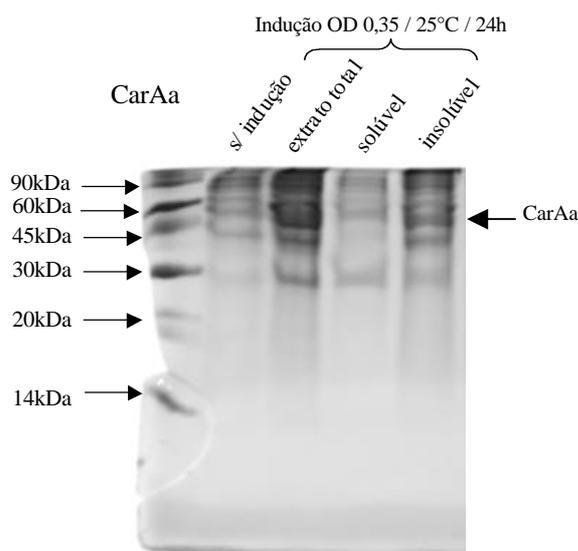
parecem aumentar a expressão de CarAc. O único efeito inverso é o sinergismo entre temperatura e tempo.

A partir da análise da influência da concentração celular, temperatura e tempo sobre a expressão das subunidades CarAa, CarAc e CarAd da carbazol 1,9a-dioxigenase e dos modelos obtidos pode-se buscar a otimização da expressão destas proteínas (LARENTIS *et al.*, 2005c). O modelo apresentado na Equação 4.1 indica que a indução de CarAa em  $A_{600nm}$  em torno de 0,35 e temperatura de 25°C, por 24h, deve provocar um aumento de 400% na expressão desta proteína em comparação com as condições padrão, de acordo com os cálculos apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Resposta do modelo de expressão de CarAa da Equação 4.1 obtida nas melhores condições de concentração celular, temperatura e tempo, calculadas em relação à área da condição padrão ( $A_{600}=0,5$ ,  $T=37^{\circ}C$  e  $t= 4h$ ).

Variável	$A_{600}$	$T$	$t$	Resposta do modelo de expressão de CarAa
Valor normalizado (adimensional)	-2,0	-2,45	1,0	406,7
Valor da variável	0,35	25°C	24h	

O experimento de otimização na expressão de CarAa, calculado segundo a Tabela 4.3, confirmou a análise proposta pela Equação 4.1, como indicado na Figura 4.22 (LARENTIS *et al.*, 2005c).



**Figura 4.22** SDS-PAGE 18% com 20 $\mu$ g de proteína total em cada amostra de expressão de CarAa em *Escherichia coli* BL21-SI contendo o plasmídeo recombinante pDEST™14 na condição otimizada de concentração celular ( $A_{600}=0,35$ ), temperatura ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) e tempo ( $t= 4\text{h}$ ). Além da amostra de extrato total, foram analisadas as frações solúvel e insolúvel (corpos de inclusão). As proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250 e identificadas pelo padrão de peso molecular LMW (Amersham Bioscience).

O extrato celular de CarAa obtido nas condições otimizadas foi também separado nas frações solúvel e insolúvel. Os resultados (apresentados na Figura 4.22) indicam que, mesmo empregando indução com sal através da cepa *Escherichia coli* BL21-SI (BHANDARI E GOWRISHANKAR, 1997) e em temperaturas mais baixas (25 ou  $30^{\circ}\text{C}$ ), geralmente empregadas para reduzir a formação de proteínas insolúveis em corpos de inclusão (NAM *et al.*, 2002b, RIDDLE *et al.*, 2003b), nesta condição a maior parte da proteína CarAa recombinante foi expressa em forma insolúvel. A formação de corpos de inclusão pode ter apresentado resultados diferentes nas condições testadas no planejamento experimental a dois níveis de concentração celular, temperatura e tempo na indução com sal e pode ser incluída como uma das variáveis a serem otimizadas juntamente com a expressão em extrato total.

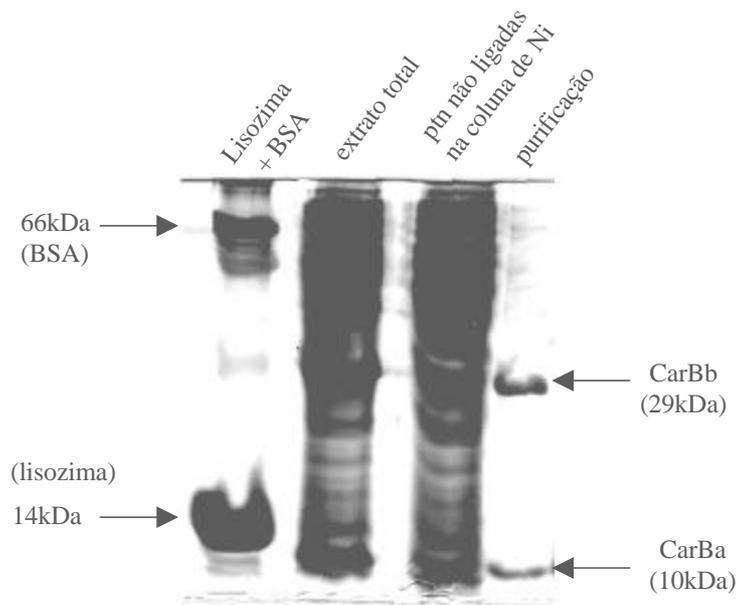
Para CarAd, na mesma condição de temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , mas em  $A_{600\text{nm}}$  em torno de 1,0, o modelo apresentado na Equação 4.3 indica um aumento de 300% na expressão desta proteína em 4h de indução, em comparação com a condição padrão de  $A_{600\text{nm}}=0,5$ ,  $T=37^{\circ}\text{C}$  e  $t= 4\text{h}$ . Entretanto, como o gene *carAc* está presente no mesmo plasmídeo que

*carAd*, e a expressão de CarAc apresenta comportamento inverso à indução de CarAd, como indicado na Equação 4.2, CarAc não foi expressa na condição de otimização proposta para CarAd (dados não mostrados). Desta forma, foi concluído que a melhor condição de expressão resultante para as duas proteínas é a padrão ( $A_{600nm}=0,5$ ,  $T=37^{\circ}\text{C}$  e  $t=4\text{h}$ ).

#### 4.4.4 Purificação da enzima expressa com cauda de histidina

Uma das vantagens do sistema de clonagem de recombinação sítio-específica é poder utilizar vários vetores de expressão (HARTLEY *et al.*, 2000), de acordo com a conveniência: plasmídeos para expressão das proteínas na forma nativa, plasmídeos com seqüências que facilitam a purificação em colunas de afinidade ou anticorpos específicos, que são transcritas fusionadas ao gene de interesse (como caudas 6xHis e GST), emprego de promotor T7, plasmídeos para expressão em *Escherichia coli* ou em diferentes hospedeiros. O inconveniente das estratégias que empregam proteínas de fusão é a produção da proteína desejada com alguns aminoácidos adicionados, o que pode interferir em sua atividade e exigir uma etapa de clivagem das seqüências. No caso das componentes da cadeia de transporte de CarA para degradação de carbazol, a adição de cauda de seis histidinas à expressão de CarAc e CarAd não inativou as proteínas (NAM *et al.*, 2002b), mesmo para CarAc, cujo sítio ativo é formado por histidinas ligadas a ferro. A adição de 6His também não alterou a atividade nativa de CarC (HABE *et al.*, 2003).

Desta forma, a enzima CarB foi clonada em sistema com cauda de histidina para permitir sua purificação, empregando cromatografia de afinidade em coluna de níquel nitrilotriacetato (NTA) e eluição com gradientes de concentração de imidazol e pH. Foi purificada na coluna somente a fração solúvel das proteínas, cujos resultados estão apresentados no gel de SDS-PAGE da Figura 4.23. Como pode ser verificado, foi obtida uma quantidade significativa das subunidades purificadas, dando indícios de que pelo menos uma parte das proteínas é encontrada no citoplasma.



**Figura 4.23** Purificação de CarB expressa com cauda de histidina em coluna de afinidade NTA eluída com imidazol. As concentrações obtidas para cada amostra aplicada em gel são: extrato total (somente fração solúvel) aplicado na coluna (2,37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); fração de proteínas não ligadas na coluna (0,17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e amostra de purificação das duas subunidades da enzima de *meta*-clivagem (CarBa, de 10kDa e CarBb, de 29kDa), com 0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Como pode ser verificado na Figura 4.23, foi possível purificar ambas as componentes de CarB a partir da adição de uma cauda de seis histidinas na subunidade CarBa. A interação entre ambas as unidades é suficientemente forte para que elas permanecessem ligadas durante o processo de cromatografia de afinidade. Entretanto, apesar da obtenção da enzima purificada com alta homogeneidade, não foi detectada atividade de *meta*-clivagem após os processos de eluição tanto com imidazol quanto com gradiente de pH (LARENTIS *et al.*, 2005d). A perda de atividade verificada na enzima eluída na forma pura da resina cromatográfica pode estar associada à perda do íon ferro estrutural devido ao contato a baixa força iônica, e de L-cisteínas (GIBBS *et al.*, 2003) ou outros fatores.

GIBBS *et al.* (2003) relatam a perda de atividade de um percentual significativo após a purificação da enzima recombinante 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas* sp. LD2. Durante a purificação da CarB da cepa LD2, foi verificado que esta enzima é hidrofóbica e de estabilidade muito limitada e apenas um percentual muito baixo da enzima recombinante foi expressa em *Escherichia coli* de forma ativa. Foi

verificada sua estabilidade em altas concentrações de sulfato de amônio, mas perda da maior parte da atividade quando a enzima foi submetida à precipitação nestas condições, assim como sua grande instabilidade na purificação em muitas condições padrão (GIBBS *et al.*, 2003),

A instabilidade e perda de atividade quando a enzima é purificada ou dialisada em tampão com baixa força iônica é um comportamento comumente descrito para as dioxigenases, como para 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase, protocatecuato 4,5-dioxygenase, 2-aminofenol 1,6-dioxigenase, 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygenase (GIBBS *et al.*, 2003).

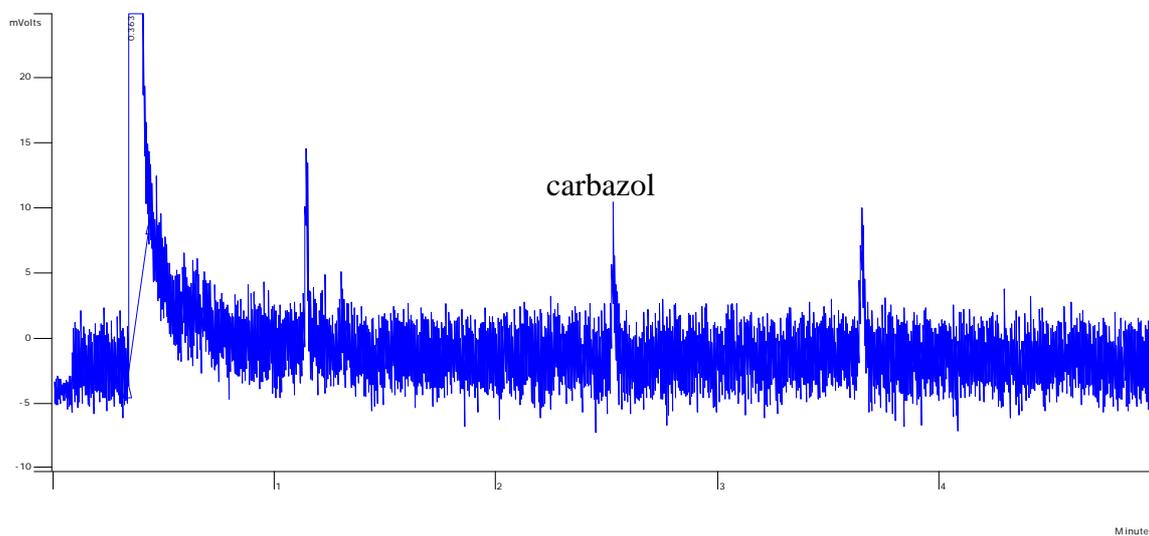
## **4.5 Caracterização das enzimas de *Pseudomonas stutzeri***

### **4.5.1 Carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA)**

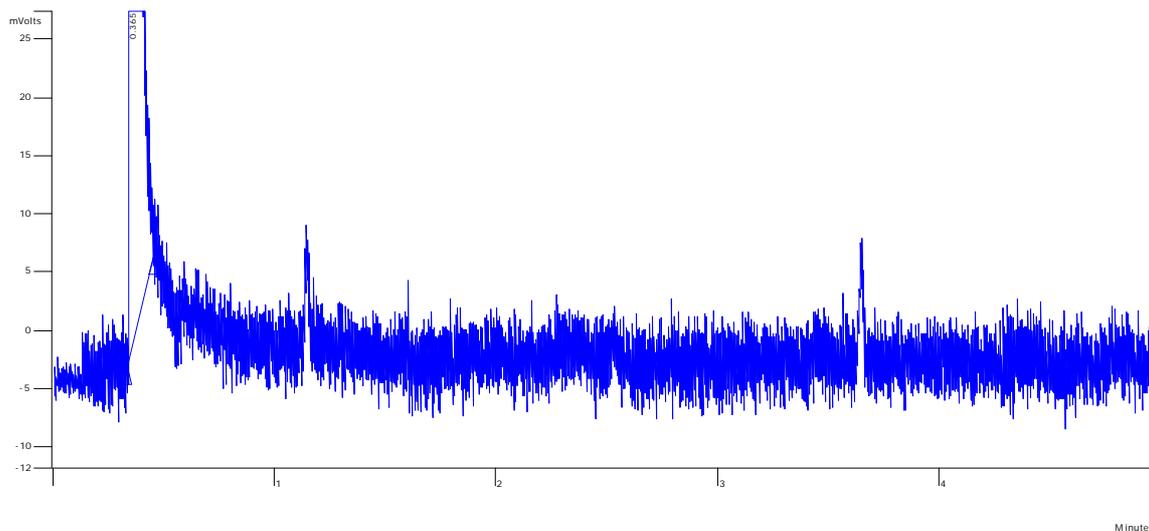
A biodegradação de 20ppm (120 $\mu$ M) de carbazol pela carbazol dioxigenase recombinante foi verificada por cromatografia gasosa. Foram empregados NADH, FAD, sulfato ferroso amoniacal como fonte de Fe(II) e ácido ascórbico como agente redutor em extrato celular (células rompidas por sonicação) das cepas contendo os plasmídeos com genes *carAa* e *carAcAd* com expressão nas respectivas condições otimizadas descritas anteriormente, além de Tween 20 para aumentar a solubilização do carbazol em água. A degradação foi verificada após reação por 15h a 30°C em 50mM de Tris-HCl pH 7,5 (Figura 4.24). As condições de reação empregadas na reconstituição deste sistema *in vitro* foram baseadas na descrição de NAM *et al.* (2002b), com resultados similares aos obtidos. Os resultados de SATO *et al.* (1997b), foi verificada degradação de 0,1% (1000ppm) de carbazol a 30°C por 18h empregando *resting cells* de *Escherichia coli* recombinante. Empregando as mesmas condições de reação, mas com condições não otimizadas de expressão de CarAa e CarAcAd (crescimento e indução por 18h em LB), não foi observada degradação de carbazol, confirmando a sensibilidade das enzimas às variáveis de expressão. A cepa BL21-SI sem plasmídeo foi utilizada como controle negativo e não foi detectada degradação de carbazol quando utilizada na reação.

Outros testes foram implementados para inferir sobre o mecanismo da reação, como o emprego de extrato celular empregando somente Fe(II) e ácido ascórbico como

cofatores e sistema de células íntegras. Entretanto, os resultados obtidos não foram conclusivos, devido a problemas na extração de carbazol, cuja metodologia está sendo aprimorada para obter as respostas desejadas.



(a)



(b)

**Figura 4.24** Resultado do teste de biodegradação de 20ppm (120 $\mu$ M) de carbazol em 15h a 30°C em 50mM de Tris-HCl pH 7,5, empregando o complexo enzimático CarA, com adição de NADH, FAD, sulfato ferroso amoniacal, ácido ascórbico e Tween 20 em extrato celular (células rompidas por sonicação) das cepas contendo os plasmídeos com expressão das proteínas CarAa e CarAcAd. Cromatogramas obtidos em CG Varian 3380 com detector FID e coluna CP-SIL5CB do sistema (a) sem enzima (quantidade inicial de carbazol) e do sistema enzimático descrito (b), verificando-se o desaparecimento do pico em 2,5min de corrida. O nível de ruído dos cromatogramas deve-se à baixa concentração de carbazol nas amostras.

## Construção das estruturas 3-D das subunidades de CarA

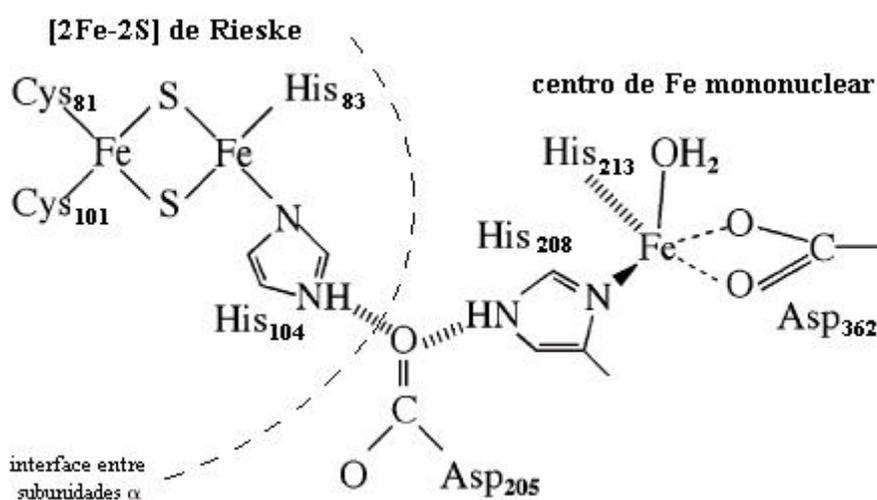
Para auxiliar no entendimento do mecanismo de atuação da carbazol dioxigenase, das interações substrato/enzima e entre as subunidades que a compõem (CarAa, CarAc e CarAd), foi utilizada a técnica de modelagem por homologia (LARENTIS *et al.*, 2003a, LARENTIS *et al.*, 2003b, LARENTIS *et al.*, 2004f). De acordo com o mecanismo das dioxigenases que apresentam sítio de Rieske com ferro sem configuração de grupo heme (WACKETT, 2002), CarAd, de 37kDa, que contém um cofator flavina (FAD) atua como uma componente ferredoxina-redutase, capaz de captar elétrons de piridina nucleotídeo reduzida (NADH), fonte inicial de dois elétrons necessários para a ativação do oxigênio molecular para a quebra da molécula de carbazol e formação de um composto dihidrodiol. Estes elétrons são, individualmente, carregados para um centro do tipo [2Fe-2S] presente na componente ferredoxina, CarAc, de 13kDa. Ambas componentes são monoméricas, segundo resultados da purificação e caracterização espectroscópica da enzima de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (NAM *et al.*, 2002a, NAM *et al.*, 2002b). Em última instância, os elétrons são transferidos para a componente da terminal oxigenase da carbazol 1,9a-dioxigenase (CarAa) que contém o domínio com agregado [2Fe-2S] de Rieske e o centro de ferro mononuclear (WACKETT, 2002). Esta subunidade, cujo monômero apresenta 44kDa, foi purificada sob a forma de um homotrímero, de estrutura do tipo  $\alpha_3$ , com 132kDa (NAM *et al.*, 2002).

A busca por um molde no banco de estruturas de proteínas (PDB) para a enzima CarAa, de 384 aminoácidos, usando o programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1990), indicou a naftaleno 1,2-dioxigenase (depositada sob o código 1NDO) de *Pseudomonas putida* (KAUPPI *et al.*, 1998), de 449 aminoácidos, como uma possível estrutura homóloga para empreender a modelagem comparativa da proteína de interesse.

A naftaleno dioxigenase é uma oxigenase multimérica dependente de ferro mononuclear em configuração não-heme, composta por duas subunidades não idênticas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) que formam um hexâmero do tipo  $\alpha_3\beta_3$  similar a um cogumelo (KAUPPI *et al.*, 1998), que degrada naftaleno por uma reação de dioxigenação lateral, formando um composto *cis*-dihidrodiol (NOJIRI *et al.*, 2001b). Sua atividade, *in vivo*, requer a ação de uma componente redutase de 36 kDa que contém sítios de ligação FAD e agregado [2Fe-2S] de planta. Os elétrons do NADH são transferidos desta componente redutase para uma componente ferredoxina de 14 kDa que contém um agregado [2Fe-2S] de Rieske.

Estes elétrons fluem para a  $\alpha\beta\beta$  dioxigenase de 210kDa que contém três [2Fe-2S] de Rieske e três centros de ferro mononuclear por holoenzima (KAUPPI *et al.*, 1998, WACKETT, 2002). Cada um dos sítios ativos de dioxigenase encontra-se na interface das subunidades  $\alpha$ , formando uma simetria trigonal e verificando-se, portanto, a existência de três sítios por holoenzima. Este sítio ativo é formado pelo agregado ferro-enxofre de Rieske de uma subunidade  $\alpha$  justaposta cerca de 12Å do centro mononuclear de ferro da subunidade  $\alpha$  adjacente (WACKETT, 2002). A distância entre estes centros de ferro da mesma subunidade  $\alpha$  é de 44Å, muito grande para uma transferência de elétrons eficiente. O mecanismo de transferência de elétrons é muito similar entre as dioxigenases, possibilitando inferências de um mecanismo análogo para os sítios ativos (WACKETT, 2002).

A estrutura da naftaleno dioxigenase (1NDO) resolvida por KAUPPI *et al.* (1998) apresenta um centro de Rieske [2Fe-2S] com um átomo de ferro coordenado pelos resíduos Cys81 e Cys101 e outro coordenado por His83 e His104. O domínio catalítico formado por um ferro mononuclear é coordenado pelos resíduos His208, His213 e Asp362. Na estrutura da enzima, His208 está ligado por ponte de hidrogênio ao resíduo Asp205, que por sua vez também é ligado a His104, conectando o centro mononuclear ao agregado de Rieske, conforme mostrado na Figura 4.25.



**Figura 4.25** Configuração do sítio ativo dos centros redox na naftaleno dioxigenase. Esquema modificado de WACKETT (2002) com informações contidas em KAUPPI *et al.* (1998).

De acordo com o sistema de classificação proposto por Batie para dioxigenases multicomponentes (NAM *et al.*, 2001), a carbazol 1,9a-dioxigenase e a naftaleno 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas* sp. pertencem ao mesmo grupo, segundo a composição de sua cadeia de transporte de elétrons (número de componentes constituintes e natureza dos centros redox). Uma diferença importante entre as duas enzimas é que a componente oxigenase da carbazol dioxigenase não possui cadeia  $\beta$ , que provavelmente apresenta apenas um papel estrutural nas dioxigenases do tipo  $\alpha_3\beta_3$  (KAUPPI *et al.*, 1998, NAM *et al.*, 2001). Por outro lado, as cadeias  $\alpha$  formam um trímero similar à naftaleno dioxigenase, dando mais um suporte para sua utilização como estrutura molde (NAM *et al.*, 2002a, NAM *et al.*, 2002b). De acordo com SATO *et al.* (1997b), a carbazol dioxigenase é capaz de degradar ambos os substratos, embora com resultados de conversão diferentes. Enquanto 99% do carbazol foi degradado por CarA de *Pseudomonas* sp. CA10 recombinante em *Escherichia coli*, a conversão foi reduzida para 77% para naftaleno, empregando 0,1% m/v de substrato a 30°C por 18h em sistema de *resting cells* (SATO *et al.*, 1997b). De qualquer forma, este dado experimental subsidia o emprego a naftaleno dioxigenase como molde para obter a estrutura da carbazol dioxigenase por homologia.

Os resultados do alinhamento CarAa- $\alpha$ 1NDO (Figura 4.26) mostram que a seqüência de CarAa apresenta cerca de 23% de identidade e 30% de similaridade com as cadeias  $\alpha$  da naftaleno dioxigenase. Foi possível alinhar os domínios catalíticos (agregado [2Fe-2S] de Rieske e centro de ferro mononuclear), com apenas alguns pequenos *gaps*, indicando que a estrutura da carbazol dioxigenase apresenta menos alças do que na naftaleno dioxigenase. Os agregados ferro-enxofre de Rieske são coordenados por duas histidinas e duas cisteínas com uma assinatura do tipo Cys-X-His-X<sub>16-17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-His, enquanto o centro de ferro mononuclear apresenta motivo do tipo Glu-X<sub>3-4</sub>-Asp-X<sub>2</sub>-His-X<sub>4-5</sub>-His (SATO *et al.*, 1997b, JIANG *et al.*, 1996). Na seqüência de aminoácidos de CarAa, estes domínios podem ser identificados como His71-His93-Cys69-Cys90 e Glu176-Asp180-His183-His187, respectivamente. Três resíduos aspárticos poderiam completar o domínio de ferro mononuclear de CarAa: Asp332, Asp333 ou Asp335. Neste modelo, Asp333 apresentou o melhor ajuste estrutural em relação ao resíduo Asp362 da enzima 1NDO.

O alinhamento construído pelo programa T-COFFEE (NOTREDAME *et al.*, 2000), entre a seqüência da carbazol dioxigenase (CarAa) e a seqüência das cadeias  $\alpha$  da

estrutura da naftaleno dioxigenase depositada no PDB (1NDO) são apresentados na Figura 4.26. Este alinhamento foi empregado para obtenção das coordenadas espaciais de CarAa por modelagem comparativa (LARENTIS *et al.*, 2004f).

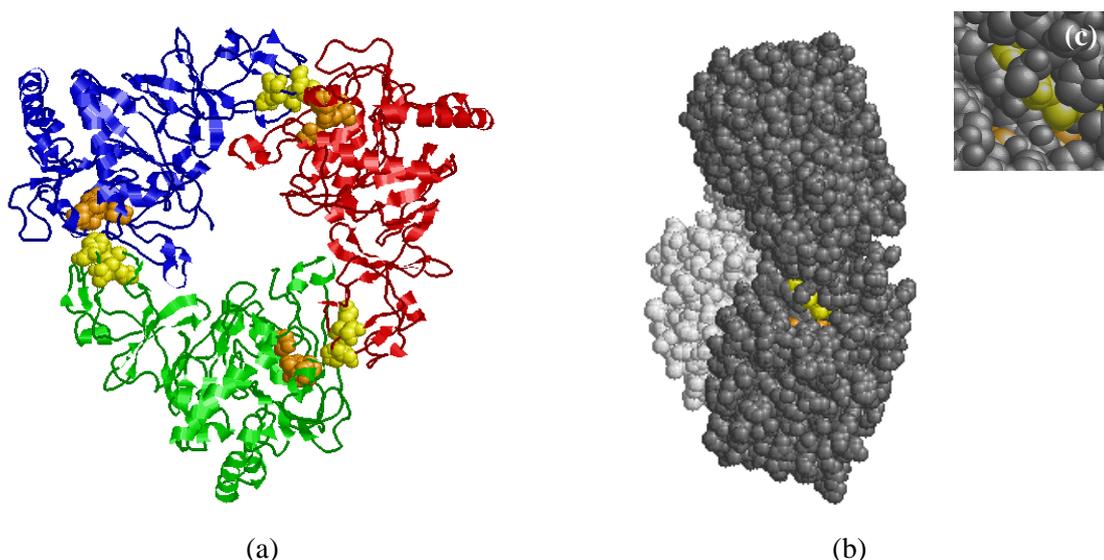
1NDO	1	-MNYNKKILVSEGLSQKHLIHGDEELFQHEL-KTIFARNWLFTHDSLIPAGDYVTAK
CarAa	1	MANVDEAILKRVKGA-----PYVDAKLGFRNHWPVPMFSKEIDE-GEPKTLK
		* : : * * . * : : : * * . : * : : . . . * * : * *
1NDO	59	MGIDEVIVSRQNDGSIRAFNLVCRHRGKTL-VSVEAGNAKGFVCSYHGWGF----GSNGE
CarAa	48	LLGENLLVNRI-DGKLYCLKDRCLHRGVQLSVKVECKTKSTITCWHAWTYRWEDGVLCD
		: : : : * * * * : : : * * * * * * * * . . . : * * * * : * :
1NDO	114	LQSVPFKDLYGESLNKKCLGLKEVARVESFHGFIYGCDFDQEAPPLMDYLGDAAWYLEP
CarAa	107	LLTNPTSAQIGRQKL-----KTYPVQEAQKCVFIYLGDDPPPLARD-----TP
		: : * . : : : . * : . * : : * : : : * : * * * *
1NDO	173	MPKHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAE <sup>16</sup> NFVGD <sup>17</sup> AYH <sup>18</sup> VGWTHASSLSRSGESIFSSLAGNAA
CarAa	151	PNFLDDMEILGK--NQI <sup>16</sup> IKSNWRLAV <sup>17</sup> ENGF <sup>18</sup> -DPS <sup>19</sup> HI <sup>20</sup> -YIHKDSLIVKD---NDLALPLG
		. . . : * : * : : * * * * : . * * . * . * : : * . * : : . * * *
1NDO	233	LPPEGAGLQMTSKYSGMGVLWDGYS--GVHSADLVP <sup>16</sup> ELMAFGGAKQERLNKEIGDVRAR
CarAa	204	FAPGGDRKQQTRVDDDDVGRKGVYDLIGE <sup>16</sup> HGV <sup>17</sup> PFEGTIGGEVVREGAYGEKIVANDIS
		: * * * * . . . : . * . * * . . : . : . : : : * * *
1NDO	291	IYRSH-LNCTVFPNNSMLTCSGVFKVWNPIDANTTEVW <sup>16</sup> TYAIVEKDMPEDLKRRRLADSVQ
CarAa	264	IWLPGVLKVNPFNPDMMQ----FEWYVPIDENTH--YYFQTLGKPCANDEERKNYEQEF
		* : . * : . * * * . * : * : * * * * : : : * . : * * : * :
1NDO	350	RTFGPAGFWES---D <sup>16</sup> NDN <sup>17</sup> METASQNGKKYQSRSDLLSNLGFGE <sup>18</sup> DVYGD <sup>19</sup> AVYPGVVGS
CarAa	318	ESKWKPMALEGFNDDI <sup>16</sup> ----WAREAMVDFYADDKGWVNEILFEVD-----EAI <sup>17</sup> VAWR
		. : . * . * * * : . : : * . . : : : * * . : * *
1NDO	410	AIGETSYRGFYRAYQAHVSSSNWAEFEHASSTWHTELTKTT
CarAa	370	KLASEHNQGIQT--QAHVSG-----
		: . . : * : * * * * .

**Figura 4.26** Alinhamento entre as seqüências da CarAa e cadeia  $\alpha$  da 1NDO. Aminoácidos idênticos são indicados por (\*); aminoácidos similares por (: ) ou ( . ); aminoácidos diferentes ( , ), enquanto (-) indicam *gaps* adicionados às seqüências. O domínio de Rieske está indicado em amarelo (CXHX<sub>16-17</sub>CXXH), enquanto em laranja estão indicados o domínio de ferro mononuclear (EX<sub>3-4</sub>DX<sub>2</sub>HX<sub>4-5</sub>H) e o aspartato (Asp333) que completa este sítio.

A estrutura trimérica, obtida por homologia pela sobreposição do modelo de CarAa com cada uma das cadeias  $\alpha$  homólogas da estrutura da naftaleno dioxigenase, é apresentada na Figura 4.27. O trímero é condizente com os resultados experimentais disponíveis na literatura e com o mecanismo proposto para a carbazol dioxigenase (NAM *et al.*, 2002a, NAM *et al.*, 2002b). Os sítios de Rieske e ferro mononuclear encontram-se nas interfaces entre as subunidades  $\alpha$  do modelo, formando uma geometria trigonal e permitindo a existência de três sítios ativos por holoenzima, o que é

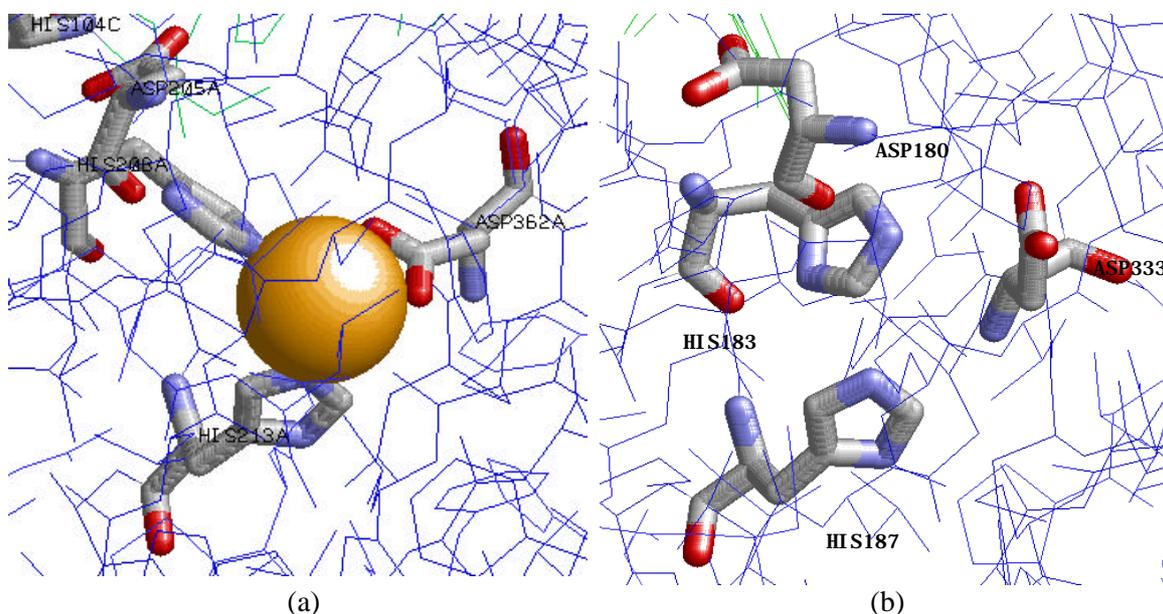
consistente com o mecanismo de transferência de elétrons descrito na literatura para as dioxigenases. Os resultados do modelo confirmam que sítio ativo é formado por um agregado ferro-enxofre de Rieske localizado em uma subunidade  $\alpha$  justaposta cerca de 12-14Å do centro mononuclear de ferro da subunidade  $\alpha$  adjacente. A distância entre estes centros de ferro pertencentes a uma mesma subunidade  $\alpha$  do modelo é muito grande para propiciar uma transferência de elétrons eficiente. Isto é similar à naftaleno dioxigenase, como descrito anteriormente (KAUPPI *et al.*, 1998, WACKETT, 2002).

A existência de um canal de acesso ao sítio catalítico para ligação do substrato na naftaleno dioxigenase pode ser também identificada na estrutura proposta para a carbazol dioxigenase (Figura 4.27b). Os resíduos que possivelmente compõem este canal são hidrofóbicos, como ocorre na estrutura molde. Para estes sítios, entretanto, diferentemente dos domínios de Rieske e de ferro mononuclear, variações são esperadas para diferentes classes de dioxigenases (KAUPPI *et al.*, 1998).



**Figura 4.27** Modelo do trímico de CarAa obtido por homologia, empregando as cadeias  $\alpha$  da estrutura 1NDO como moldes. Em (a) verifica-se as estruturas de alças,  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  de cada uma das três cadeias do trímico (azul, vermelha e verde). Em (b) tem-se uma visão lateral da estrutura compacta do trímico, com detalhamento do possível canal de acesso para ligação do substrato ao sítio ativo (c). A localização dos domínios de Rieske (resíduos amarelos) e de ferro mononuclear (resíduos em laranja) estão indicados por esferas (LARENTIS *et al.*, 2004f).

A estrutura do modelo onde se encontram os resíduos do motivo  $EX_{3-4}DX_2HX_{4-5}H$ , que provavelmente agem como ligantes do ferro mononuclear no sítio catalítico de ativação do oxigênio das dioxigenases (JIANG *et al.*, 1996, SATO *et al.*, 1997b), podem ser verificados na Figura 4.28, em comparação com a estrutura deste motivo no molde.

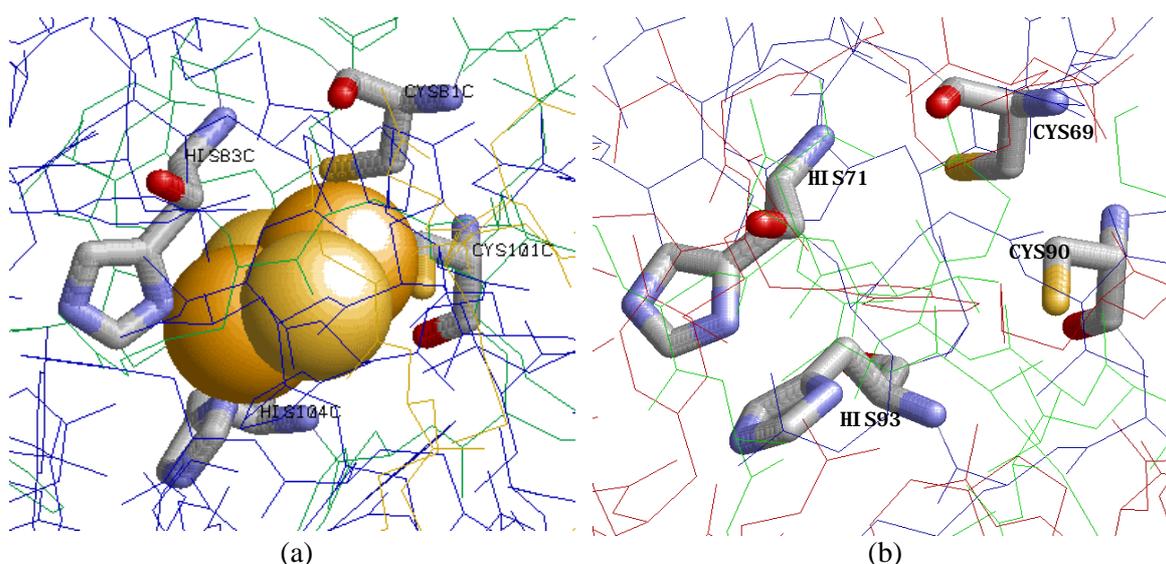


**Figura 4.28** Domínio de ferro mononuclear da 1NDO, formado pelos resíduos Asp205 (responsável pela ligação do sítio mononuclear com a interface da subunidade  $\alpha$  adjacente), His208, His213 e Asp362 (a) e do modelo proposto para a subunidade CarAa da carbazol dioxigenase, formado pelos aminoácidos Asp180, His183, His187 e Asp333 (Asp180 liga os domínios de Rieske e ferro mononuclear na interface de duas subunidades  $\alpha$  da estrutura trimérica de CarAa) (b). Os átomos representados nos aminoácidos são: C (cinza), N (azul) e O (vermelho). A esfera amarela na estrutura de referência representa o átomo de ferro do sítio catalítico (LARENTIS *et al.*, 2004f).

O ferro mononuclear da naftaleno dioxigenase, onde ocorre a reação catalítica de quebra do substrato aromático com oxigênio, está ligado a três resíduos (His 208, His213, Asp362), como pode ser verificado na Figura 4.28, além de uma molécula de água (KAUPPI *et al.*, 1998, WACKETT, 2002). As duas histidinas fazem parte da assinatura do domínio mononuclear Glu200-Asp205-His208-His213, conservado em várias dioxigenases, assim como o resíduo Asp205, responsável pela ligação do sítio mononuclear com o domínio de Rieske na interface da outra subunidade  $\alpha$  do trímero, permitindo a ocorrência da transferência de elétrons necessária para a reação. De forma

análoga, no modelo estrutural de CarAa é possível identificar o motivo de ferro mononuclear como sendo Glu176-Asp180-His183-His187. O modelo indica que o resíduo Asp180, presente na assinatura, pode ser o responsável pela ligação entre o domínio mononuclear e o resíduo His93 do sítio de Rieske, através de forças atrativas (provavelmente uma ligação hidrogênio) na interface de duas subunidades  $\alpha$  do trîmero de CarAa, de forma equivalente a Asp205 da naftaleno dioxigenase. O resíduo Asp362 completa o sítio catalítico e a coordenação do átomo de ferro na naftaleno dioxigenase. De acordo com a estrutura de referência, resíduo proposto pela modelagem para completar o domínio de ferro mononuclear da carbazol dioxigenase é Asp333, como discutido na descrição do alinhamento CarAa- $\alpha$ 1NDO.

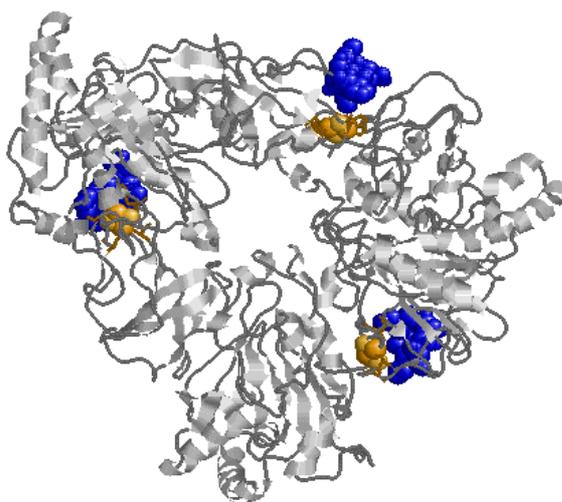
A modelagem do sítio de Rieske, que atua na transferência de elétrons para o sítio catalítico, apresenta resultados consistentes, em comparação com a estrutura de referência (Figura 4.29).



**Figura 4.29** Comparação entre os sítios de Rieske do molde 1NDO (formado pelos resíduos His83, His104, Cys81 e Cys101) (a) e da estrutura modelada para CarAa (formado pelos resíduos His71, His93, Cys69 e Cys90) (b). Os átomos representados nos resíduos são: C (cinza), N (azul), S (amarelo) e O (vermelho). As esferas amarelas na estrutura de referência representam o agregado [2Fe-2S] (LARENTIS *et al.*, 2004f).

As proteínas que possuem agregado [2Fe-2S] em um domínio do tipo Rieske, como as componentes oxigenase terminal e ferredoxina da carbazol dioxigenase (CarAa e

CarAc), formam uma superfamília com um ancestral comum (NOJIRI E OMORI, 2002). O enovelamento do sítio de Rieske da ferredoxina da carbazol dioxigenase (COLBERT *et al.*, 2000, NAM *et al.*, 2005), é representativo da estrutura mínima deste tipo de domínio. Este enovelamento mínimo é maior em domínios de Rieske de proteínas mais complexas, para permitir a transferência de elétrons em cada situação específica (COLBERT *et al.*, 2000), como é o caso da CarAa. Comparando as estruturas dos domínios de Rieske da 1NDO e da CarAa com a estrutura mínima, estas proteínas possuem alguns resíduos a mais inseridos em uma alça rica em prolina presente no enovelamento mínimo. Esta inserção não é necessária na estrutura mínima porque o agregado [2Fe-2S] está exposto para a transferência de elétrons (COLBERT *et al.*, 2000). Estes resíduos são Val117-Pro118-Phe119-Glu120-Lys121-Cys122-Leu123 para a oxigenase terminal da naftaleno dioxigenase (1NDO) e são responsáveis pela mediação desta componente com outra requerida na transferência de elétrons. O mesmo ocorre na componente oxigenase terminal da carbazol dioxigenase (CarAa), que de forma homóloga à componente da 1NDO, apresenta a seqüência Asn110-Pro111-Thr112-Ser113-Ala114-Gln115-Ile116 que faz o contato do agregado [2Fe-2S] com a superfície externa da proteína. Como indicado na Figura 4.30, os resíduos descritos são capazes de fazer a mediação do agregado ferro-enxofre de CarAa com a subunidade CarAc, uma vez que se encontra em uma alça em posição coerente no modelo obtido por homologia.



**Figura 4.30** Estrutura modelada da componente oxigenase da carbazol dioxigenase (CarAa) com agregado [2Fe-2S] em laranja e os resíduos His71, His93, Cys69 e Cys90 conservados nos domínios de Rieske. Em azul estão representados os resíduos que participam da alça característica deste domínio (Asn110-Pro111-Thr112-Ser113-Ala114-Gln115-Ile116).

O modelo foi construído sem a presença de heteroátomos (ferro, enxofre), o que pode explicar algumas diferenças de ângulos entre os resíduos envolvidos quando se compara com a estrutura de referência, tanto nos domínios de ferro mononuclear quanto de Rieske, apresentados nas Figuras 4.28 e 4.29, respectivamente.

O gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963), obtido pelo programa PROCHECK (LASKOWSKY *et al.*, 1993), indica uma razoável qualidade do modelo proposto (95% dos resíduos de aminoácidos modelados se encontram posicionados nas regiões estereoquimicamente permitidas). A existência de alguns resíduos com ângulos não permitidos devem-se à presença de glicinas na estrutura de referência, que, por não apresentarem limitações físicas de posição, ao serem substituídas no alinhamento seqüencial, provocam algumas inconsistências no modelo, sem chegar a comprometer sua qualidade. As energias dos resíduos do modelo, calculadas pelo PROSAIL (SIPPL, 1993), são próximas às do molde na maior parte da estrutura, incluindo os domínios de Rieske e de ferro mononuclear, com exceção de algumas regiões no meio (em torno do aminoácido 250, região de mais baixa similaridade, segundo resultados do alinhamento da Figura 4.26) e no final da seqüência de CarAa. Possivelmente por causa destas regiões, foram identificados resíduos com os níveis 3D e 1D não compatíveis pelo VERIFY3D (LUTHY *et al.*, 1992). Os resultados das análises realizadas com os programas WHAT-CHECK (HOOFT *et al.*, 1996) e PROVE (PONTIUS *et al.*, 1996), com somente 9,4% de aminoácidos com cálculos de volumes atômicos incompatíveis, indicaram que o modelo é satisfatório.

Para as componentes CarAc e CarAd também foram obtidos modelos por homologia consistentes (LARENTIS *et al.*, 2003b). Para CarAc, foi empregada como molde, de acordo com os resultados de busca no banco de estruturas de proteínas (PDB) com o programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1990), a componente ferredoxina da bifeníl dioxigenase BphF (depositada sob o código 1FQT). Esta proteína, da bactéria *Burkholderia cepacia* cepa LB400 (COLBERT *et al.*, 2000), de 109 aminoácidos, possui um sítio formado por um agregado [2Fe-2S] de Rieske. Para CarAd, foi empregada como molde a componente redutase da benzoato 1,2-dioxigenase de *Acinetobacter* sp. ADP1 (KARLSSON *et al.*, 2002), de 338 resíduos, cuja estrutura (código 1KRH), contém um sítio de ligação de agregado ferro-enxofre do tipo encontrado em plantas.

Os resultados de buscas por proteínas homólogas para CarAc e CarAd são consistentes com o sistema de classificação de Batie proposto para as dioxigenases





devido ao enovelamento da proteína. Verifica-se que a localização do sítio de Rieske no modelo proposto para a subunidade protéica CarAc é consistente estruturalmente com o domínio do molde BphF empregado (COLBERT *et al.*, 2000) e com o mecanismo de transferência de elétrons em que este sítio está envolvido nas dioxigenases. COLBERT *et al.* (2000) descrevem que o enovelamento da cadeia principal (C $\alpha$ ) dos domínios de ligação Rieske é conservado, inclusive entre as diferentes componentes das cadeias de degradação de aromáticos (como as ferredoxinas e oxigenases) e entre as proteínas de eucariotos, de membrana (como as envolvidas na cadeia respiratória), apesar de somente os resíduos que são ligados ao agregado [2Fe-2S] sejam idênticos, formados por duas histidinas e duas cisteínas com uma assinatura do tipo Cys-X-His-X<sub>16-17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-His (SATO *et al.*, 1997b, JIANG *et al.*, 1996). O enovelamento conservado do domínio de Rieske (COLBERT *et al.*, 2000), também presente no modelo por homologia obtido para CarAc, é formado por uma folha- $\beta$  em uma estrutura mínima em que os ligantes do agregado Fe-S estão expostos e uma alça rica em prolinas, que no caso da BphF é composta pelos resíduos Pro80-Pro81-Pro82-Cys83-Glu84-Ala85-Leu86. De forma homóloga, esta alça em CarAc é composta pelos resíduos Ser82-Pro83-Cys84-Thr85-Val86-Pro87-Leu88.

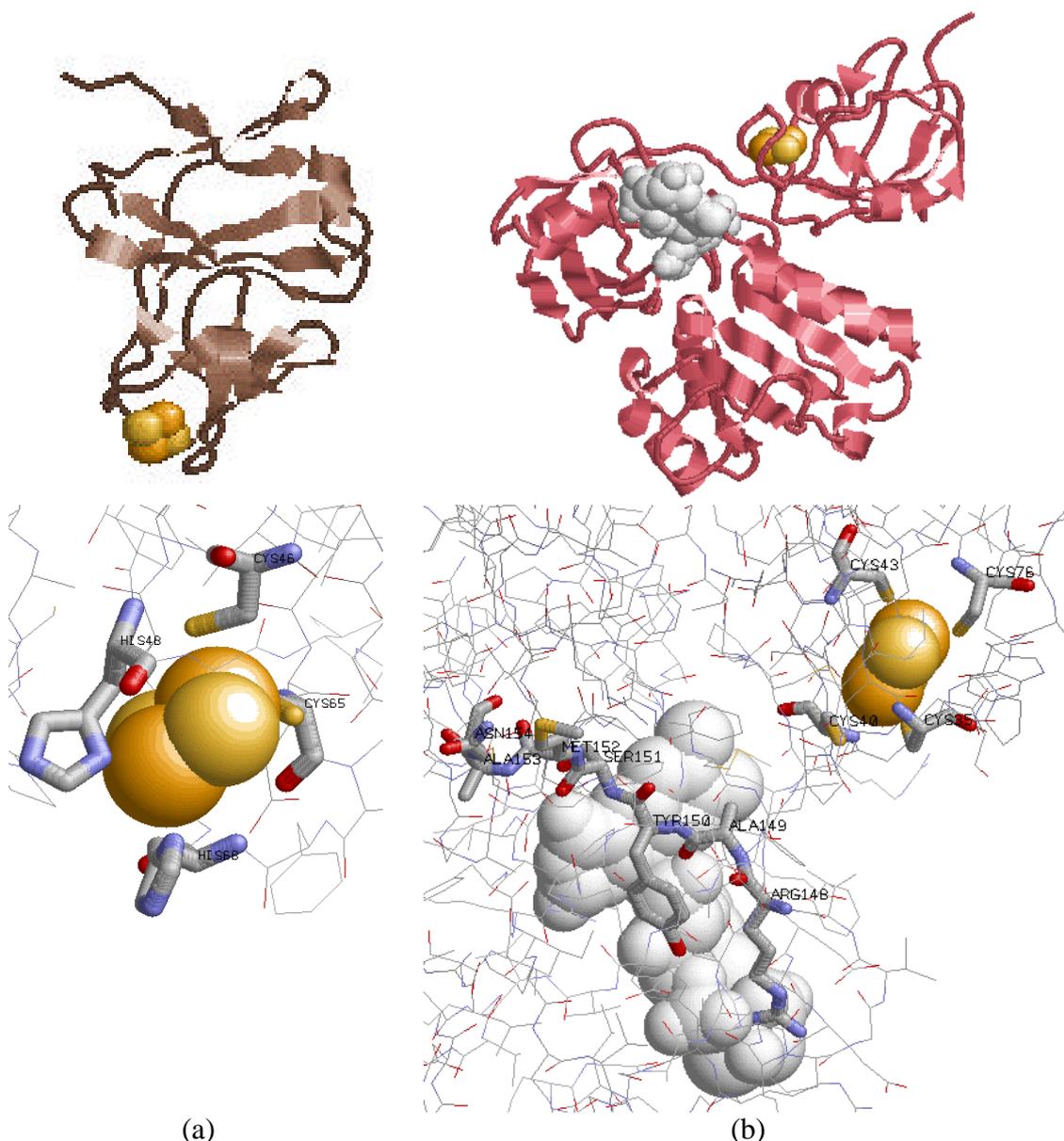
Segundo COLBERT *et al.* (2000), as componentes ferredoxinas das dioxigenases que participam das rotas de degradação de compostos aromáticos entregando elétrons do NAD(P)H para o sítio de ferro da componente oxigenase catalítica, possuem aproximadamente 110 resíduos e apresentam potencial redutor de cerca de -150mV. Este potencial difere do potencial dos agregados de outras componentes, o que é essencial na transferência de elétrons. Vários fatores contribuem para as diferenças de potencial redox entre as proteínas: dependência do pH, exposição do agregado ferro-enxofre, interação com solvente, localização do centro metálico em relação a grupos/átomos com cargas eletrostáticas, interações com as histidinas ligantes e polarizabilidade (COLBERT *et al.*, 2000). As seqüências de resíduos na estrutura 1FQT próximas às posições 48 e 65 afetam as interações do agregado [2Fe-2S] com outros peptídeos dipolares. A ferredoxina associada à bifenil dioxigenase e suas homólogas apresentam resíduos não-polares nas posições 48 (triptofano ou alanina) e 65 (leucina), o que confere potenciais eletrostáticos mais baixos para estas proteínas, importante na transferência de elétrons nos sistemas de dioxigenação. Estes resíduos conferem com Ala51 e Phe67 no modelo obtido para CarAc.

A proteína CarAd, de 329 resíduos, participa da reação de dioxigenação do carbazol sob a forma de um monômero (NAM *et al.*, 2002a, NAM *et al.*, 2002b) e, de forma análoga a da componente redutase da benzoato 1,2-dioxigenase empregada como molde, apresenta uma estrutura com três domínios bastante distintos (KARLSSON *et al.*, 2002), cada um com cerca de 100 resíduos e ligado a um cofator redox, como pode ser visualizado na Figura 4.33b: ferro-enxofre, FAD e NADH. O domínio ferredoxina, presente na porção N terminal da proteína, conter um sítio de ligação para agregado [2Fe-2S] com enovelamento global altamente similar ao das ferredoxinas de plantas (KARLSSON *et al.*, 2002). Este domínio [2Fe-2S] tipo planta, de assinatura Cys-X<sub>4</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>29</sub>-Cys (SATO *et al.*, 1997b, KARLSSON *et al.*, 2002), é formado por quatro cisteínas ligantes aos átomos de ferro, formando um centro de menor potencial redox que os agregado [2Fe-2S] de Rieske de CarAa e CarAc, permitindo a ocorrência da transferência de elétrons para a reação de dioxigenação (WACKETT, 2002). O domínio ferro-enxofre interage com os outros dois domínios (flavina e NAD(P)H). A passagem dos elétrons se dá pela presença pelo cofator NAD, cujo sítio de ligação também está presente em CarAd. Os domínios FAD e NADH, presentes na região C terminal da proteína, são membros da superfamília das oxidoredutases-ferredoxinas.

Verifica-se que a estrutura da redutase da benzoato 1,2-dioxigenase (1KRH) apresenta sítio de ligação de agregado ferro-enxofre do tipo plantas, de forma similar a CarAd, formado pelos resíduos Cys41-Cys46-Cys49-Cys83. As duas estruturas, 1KRH e 1QFJ apresentam sítios de ligação de NAD. Na estrutura 1KRH, o domínio FAD é formado por Arg156-Ser157-Tyr158-Ser159-Phe160-Ser161-Ser162. Na seqüência de CarAd, o domínio [2Fe-2S] foi identificado como Cys35-Cys40-Cys43-Cys76 e o domínio FAD da seqüência CarAd é identificado como Arg148-Ala149-Tyr150-Ser151-Met152-Ala153-Asn154 (SATO *et al.*, 1997b). KARLSSON *et al.* (2002) indicam que a região C terminal da redutase da benzoato 1,2-dioxigenase está envolvida na ligação FAD. O resíduo Phe335 desta enzima interage com o anel isoaloxazina da flavina, permitindo o empilhamento das cadeias laterais dos anéis aromáticos, e alinha com Phe328 de CarAd (NAM *et al.*, 2002b).

Os cofatores [2Fe-2S] e FAD estão afastados cerca de 9 Å na estrutura obtida para CarAd, medida feita no programa RASMOL (SAYLE E MILNER-WHITE, 1995). Esta distância é descrita para os domínios de Rieske e flavina na redutase da benzoato 1,2-dioxigenase (KARLSSON *et al.*, 2002), o que permite uma rápida transferência de

elétrons. O principal contato entre o centro ferro-enxofre e o domínio flavina na estrutura de 1KRH é feito pelo resíduo Asp40 (KARLSSON *et al.*, 2002), equivalente a Glu34 no alinhamento empregado na modelagem de CarAd, cuja distância do cofator FAD (6,5Å) subsidiou este resultado.

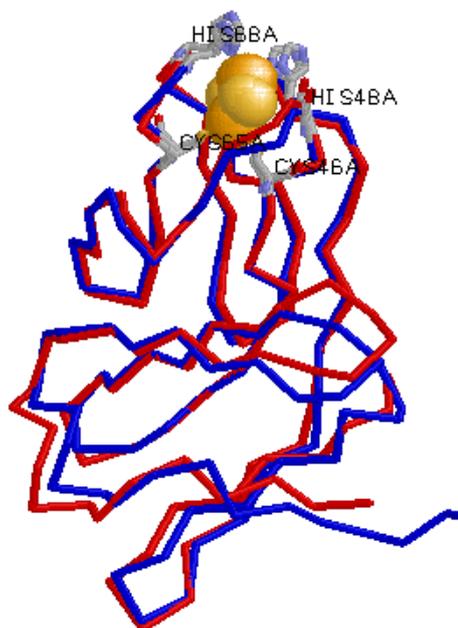


**Figura 4.33** Modelos obtidos por homologia para as estruturas monoméricas da ferredoxina CarAc (12kDa), cujo sítio de Rieske é composto por Cys46-His48-Cys65-His68 (a) e da redutase CarAd (37kDa), com detalhamento de agregado [2Fe-2S] do tipo planta (Cys35-Cys40-Cys 43-Cys76) e sítio de ligação FAD (Arg148-Ala149-Tyr-150-Ser151-Met152-Ala153-Asn154). Os domínios modelados estão envolvidos no mecanismo de transferência de elétrons para a carbazol 1,9a-dioxigenase (LARENTIS *et al.*, 2003b).

O modelo obtido para CarAd apresentou somente um resíduo nas regiões não permitidas do Gráfico de Ramachandran, com 98% nas regiões mais favoráveis (LASKOWSKI *et al.*, 1993, RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). Os resultados do programa VERIFY3D indicaram que o modelo é satisfatório, com 86% dos resíduos compatíveis com a seqüência de aminoácidos de CarAd (LUTHY *et al.*, 1992). A avaliação do modelo feita pelos programas WHAT-CHECK, PROVE e ERRAT também indicaram que o modelo é satisfatório (HOOFT *et al.*, 1996, PONTIUS *et al.*, 1996, COLOVOS E YEATES, 1993). Segundo cálculos de volumes atômicos, somente 7,8% dos aminoácidos foram considerados fora dos padrões (PONTIUS *et al.*, 1996).

A avaliação do modelo monomérico obtido para CarAc indicou que os parâmetros estereoquímicos e energéticos do modelo são aceitáveis. O gráfico de Ramachandran do modelo obtido pelo PROCHECK (LASKOWSKY *et al.*, 1993) não apresentou nenhum resíduo em posição inconsistente e mais de 90% nas regiões mais favorecidas, indicando um modelo de boa qualidade. Pela análise das energias dos resíduos do modelo, calculadas pelo PROSAIL (SIPPL, 1993), não há regiões do modelo com parâmetros fora dos valores permitidos.

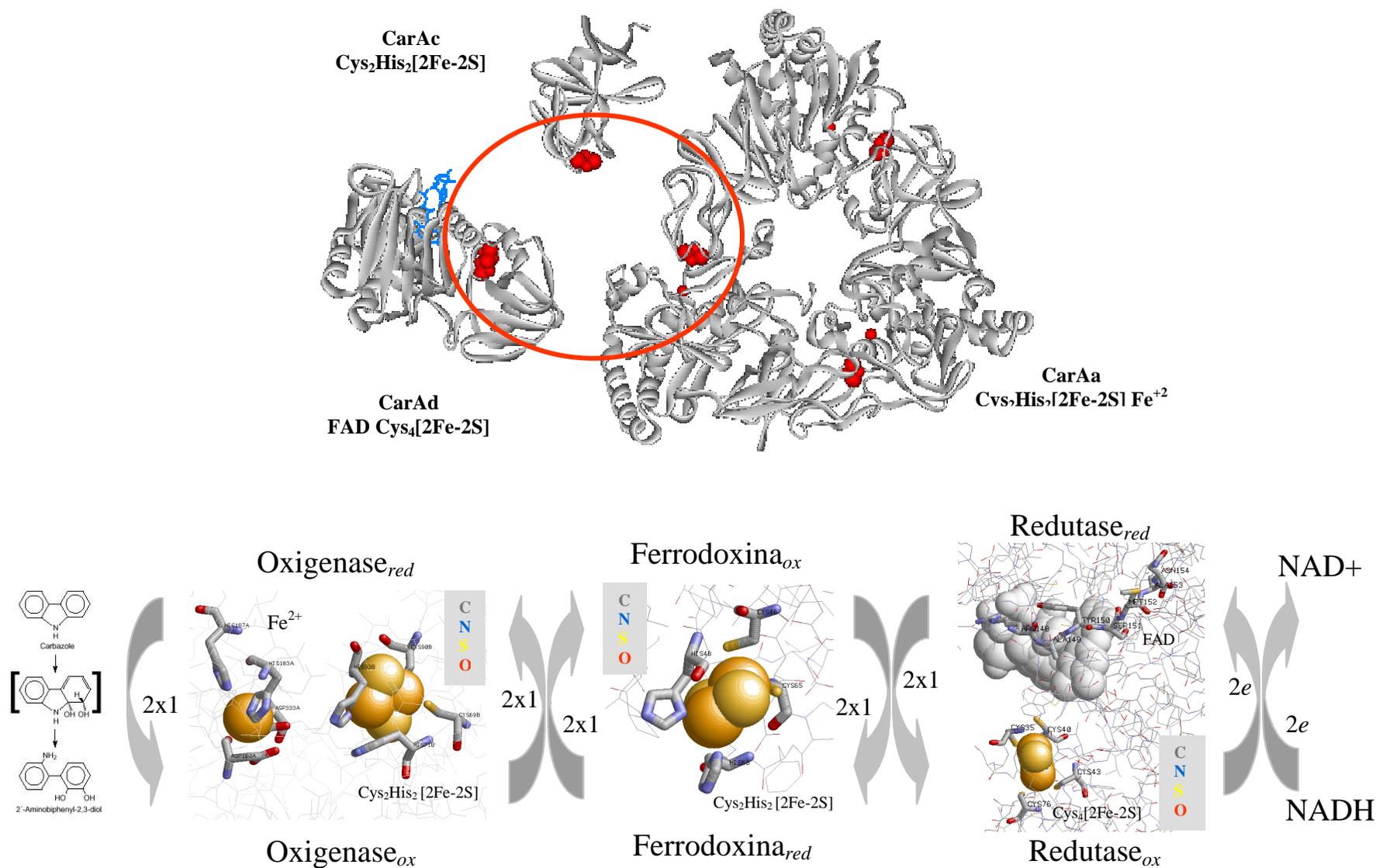
A sobreposição entre o modelo de CarAc obtido por homologia e o cristal determinado por NAM *et al.* (2005) por raios-X, indicou desvio de 1,71Å calculado entre todos os átomos envolvidos (741) e desvio de 1,12Å entre as cadeias de carbonos (101 átomos) de ambas estruturas, resultados de RMS (*root mean square*) empregando o programa Swiss-PDBViewer (GUEX E PEITSCH, 1997). Na região do sítio de Rieske o modelo obtido apresenta a melhor sobreposição com o cristal, como pode ser verificado na Figura 4.34, enquanto as regiões onde as cadeias principais do modelo e do cristal mais se distanciam são as do início e final da proteína, que compõe o domínio basal, nas quais o alinhamento apresenta menor similaridade, como pode ser conferido na Figura 4.31. Estes resultados são coerentes com as indicações de COLBERT *et al.* (2000), de que os domínios de Rieske apresentam um enovelamento conservado entre diferentes tipos de proteínas com agregado [2Fe-2S] e que o domínio basal é o que mais apresenta divergências. A análise realizada mostrou que modelo obtido é satisfatório (para efeito de comparação, a diferença obtida entre duas cadeias do cristal de 1KRH foi de 0,60Å), principalmente para empreender inferências sobre o mecanismo da reação e da transferência de elétrons entre as componentes das dioxigenases, que ocorre através dos domínios de Rieske.



**Figura 4.34** Sobreposição do modelo de CarAc, em azul, com a estrutura da proteína de *Pseudomonas* sp. obtida por raios-X (NAM *et al.*, 2005), em vermelho.

KARLSSON *et al.* (2002) descrevem a estrutura de BenC como um protótipo estrutural para a família das redutases de dioxigenases, que apresentam organização similar dos três domínios, e empregam-na na obtenção do modelo da redutase da naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas* sp. Esta enzima pertence à classe III, similar à carbazol segundo a composição da cadeia de transporte de elétrons e os autores assumem que o enovelamento entre elas é muito similar, validando o emprego da modelagem de CarAd por homologia empregando a componente redutase da benzoato 1,2-dioxigenase.

Após a obtenção de modelos de cada uma das subunidades da carbazol 1,9a-dioxigenase coerentes com seu mecanismo catalítico proposto (NAM *et al.*, 2002b), buscou-se fazer análises estruturais destes modelos, empregando os programas SPDBViewer e RasMol e programas de cálculo de superfície para identificação de possíveis regiões de interação entre as moléculas para a composição do complexo (Figura 4.35). Não há na literatura nenhum destes complexos descritos e sua identificação permitirá fazer inferências sobre a forma como ocorre a transferência de elétrons e possíveis mutações para aumentar a atividade e a seletividade, para um maior número de compostos nitrogenados de petróleo, visando a aplicação das enzimas em biorrefino e biorremediação.



**Figura 4.35** Modelos das componentes CarAa (oxigenase), CarAc (ferredoxina) e CarAd (redutase) obtidos por homologia. As regiões dos sítios indicadas (agregados [2Fe-2S] nas três proteínas e ferro mononuclear em CarAa) são aquelas que possivelmente interagem propiciando o mecanismo de transferência de elétrons entre as componentes para a reação de dioxigenação de carbazol (LARENTIS *et al.*, 2003b, LARENTIS *et al.*, 2004a).

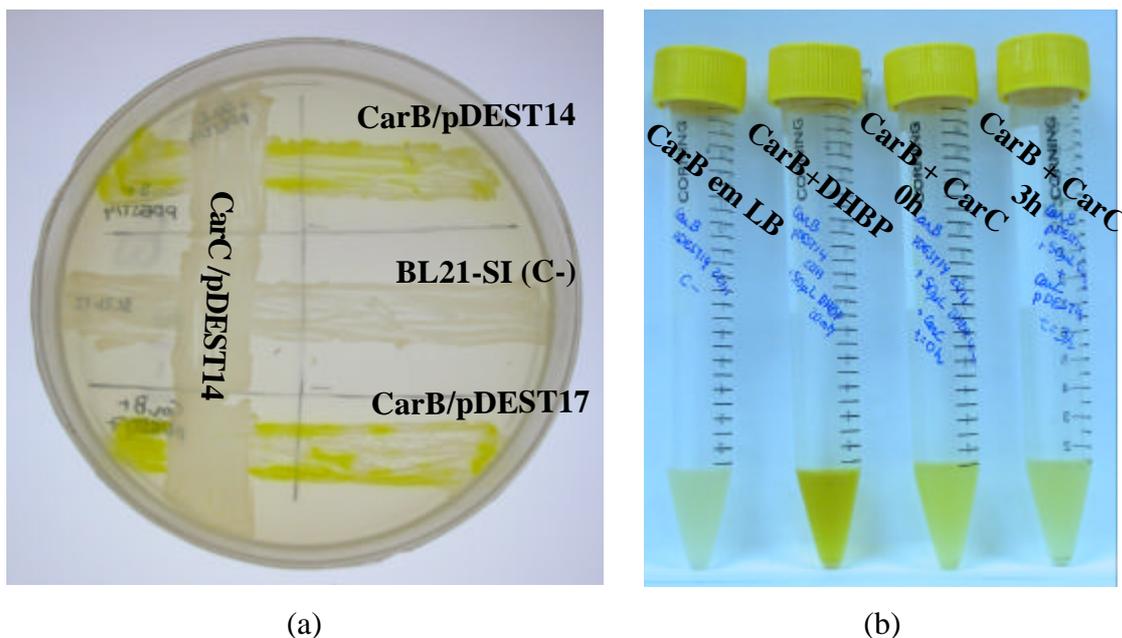
#### 4.5.2 Dioxigenase de *meta*-clivagem (CarB)

A confirmação da expressão das enzimas CarB (dioxigenase de *meta*-clivagem) e CarC (HOADA hidrolase) de forma ativa em *Escherichia coli* foi feita pela detecção da atividade pela produção e consumo, respectivamente, do composto amarelo HOPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico), análogo cromóforo ao composto da rota de degradação de carbazol, resultante da *meta*-clivagem da rota de degradação de bifenil, de acordo com o esquema apresentado na Figura 4.36.



**Figura 4.36** Esquema reacional da degradação de 2,3-DHBP (2,3-dihidroxibifenil) e HOPDA (ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico), da rota de biodegradação de bifenil, análogos aos compostos da rota de carbazol.

Os testes foram feitos de forma qualitativa em placa e meio líquido com expressão das enzimas em *Escherichia coli* BL21-SI, com indução por NaCl concomitante ao crescimento da bactéria em 18h em meio LB, empregando 2,3-dihidroxibifenil (2,3-DHBP) como substrato inicial da rota reacional. Este composto, resultante da degradação da bifenil dioxigenase, é análogo ao 2'-aminobifenil-2,3-diol. Os resultados qualitativos dos testes em placa e meio líquido estão apresentados na Figura 4.37.



**Figura 4.37** Testes de produção (por CarB) e consumo (por CarC) do composto amarelo HOPDA pelas células recombinantes *Escherichia coli* BL21-SI + pDEST<sup>TM</sup>14 + CarB/CarC e pDEST<sup>TM</sup>17 + CarB em placa LB sem antibiótico e pDEST<sup>TM</sup>14 + CarB/CarC em LB líquido com ampicilina. O controle negativo em placa é a cepa BL21-SI sem plasmídeo e no meio líquido é a célula sem o substrato 2,3-DHBP (LARENTIS *et al.*, 2005b).

Como pode ser verificado pelos resultados da Figura 4.37, a expressão de CarB na forma ativa foi bem sucedida nos dois vetores empregados: pDEST<sup>TM</sup>17 (com cauda de Histidina) e pDEST<sup>TM</sup>14 (forma nativa). Em placa, as colônias recombinantes com os dois plasmídeos foram capazes de converter 2,3-DHBP em HOPDA, como pode ser verificado pela coloração amarela produzida praticamente de imediato pelas colônias. O consumo deste composto amarelo pela cepa recombinante contendo o gene *carC* foi verificado algum tempo após a sua formação em placa e em meio líquido. Os produtos das reações não foram detectados no controle negativo empregado (*Escherichia coli* BL21-SI sem plasmídeo), como verificado no experimento em placa, com as colônias estriadas brancas após o borrifamento da solução de 2,3-DHBP em etanol.

O meio líquido com a produção de HOPDA por CarB foi centrifugado, ficando a coloração amarela na solução sobrenadante e não nas células precipitadas. Estes resultados fornecem indícios de que estes compostos hidrofóbicos com grupamentos hidrofílicos passem livremente pela membrana celular ou que as proteínas estejam associadas à membrana celular. No caso de CarB, a enzima foi purificada empregando

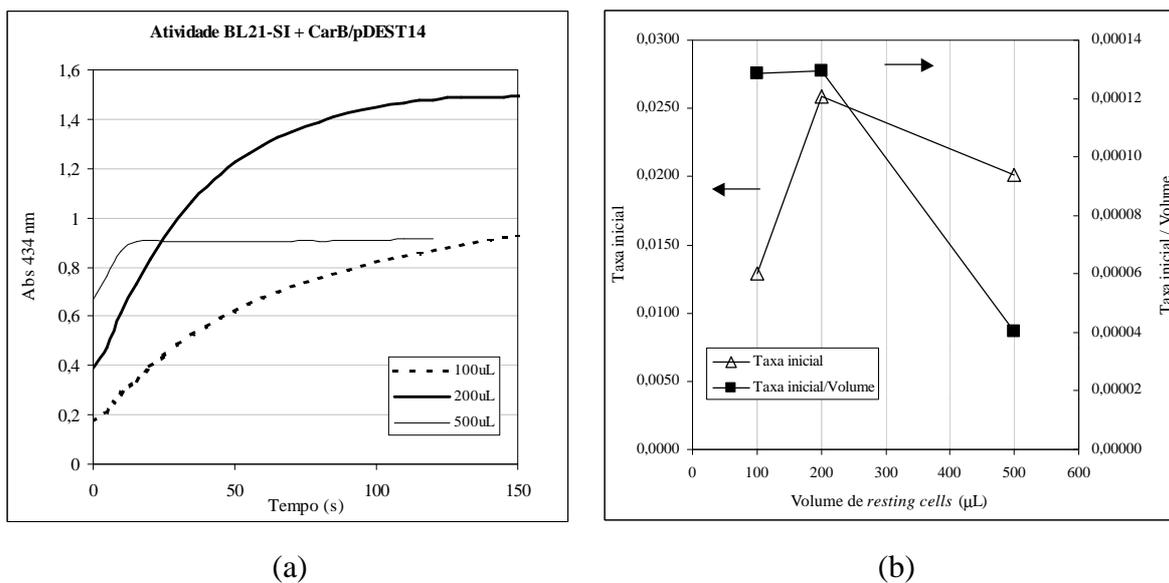
somente a fração solúvel, indicando que as enzimas recombinantes não estão associadas à membrana celular e, portanto, o substrato deve ser transportado para o interior da célula. Além disso, a atividade da dioxigenase de clivagem de anel catecol da enzima da cepa *Pseudomonas stutzeri* OM1 expressa em *Escherichia coli* foi confirmada por OUCHIYAMA *et al.* (1998) empregando somente a fração solúvel das células sonicadas (descartando os debris celulares do extrato após rompimento por sonicação). Segundo GRAY *et al.* (1996), toda a atividade enzimática de biodessulfuração de dibenzotiofeno (DBT) por *Rhodococcus* sp. está associada à fração solúvel das proteínas e nenhuma atividade foi verificada na fração associada à membrana. Para este mecanismo de biodessulfuração, DBT é capaz de atravessar a membrana celular e as enzimas Dsz são solúveis e presumivelmente encontradas no citoplasma, enquanto as enzimas do metabolismo de outras moléculas hidrofóbicas, como alcanos, estão associadas à membrana celular (MONTICELLO, 2000). A localização das enzimas na célula é de grande importância, uma vez que está relacionada aos mecanismos de transferência de massa envolvidos na reação, uma vez que não há evidências de que as moléculas sejam ativamente transportadas para dentro das células (MONTICELLO, 2000).

### **Determinação da concentração celular para medir atividade de CarB nativa**

O sistema de células íntegras (*resting cells*) empregado como catalisador nas reações de degradação dos compostos da rota de carbazol evita a necessidade de purificação das enzimas e possibilita ainda assim a obtenção de altas taxas de conversão. Para maximizar os resultados de conversão, portanto, é desejável empregar o máximo de catalisador (neste caso, o máximo de volume de meio) mas sem modificar a taxa de conversão da reação. Quando se tem excesso de células, a taxa pode ser reduzida devido ao aparecimento de efeitos de processo que competem com a reação enzimática, como a adsorção do substrato nas células. Estes efeitos foram verificados em outros sistemas, como na biodessulfuração de dibenzotiofeno (DBT) a 2-hidroxi-bifenil (2-HBP) por *Rhodococcus erythropolis* (IZUMI *et al.*, 1994). Neste sistema, o significativo retardamento na degradação de DBT com o emprego de densidades celulares muito altas foi associado a indícios de que o oxigênio é um fator limitante neste processo de conversão pelas células. Quando enzima livre é empregada

como catalisador estes testes não fazem sentido, uma vez que em geral utiliza-se a menor quantidade possível tendo em vista principalmente o fator custo.

A atividade de *meta*-clivagem foi medida a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl, monitorando o aparecimento de HOPDA pela degradação de 100µM de 2,3-dihidroxibifenil, por absorvância a 434nm. Os testes com células íntegras (*resting cells*) contendo o plasmídeo pDEST™14 foram feitos em diferentes volumes de meio LB com crescimento de 18h (Abs<sub>600nm</sub> de 4,5), a 37°C sob agitação, centrifugado e ressuspenso em Tris-HCl 50mM (pH 7,5). Para a expressão sob a forma nativa, em plasmídeo pDEST™14, foi determinada uma quantidade de proteína total (dosada pelo método de Bradford) de 1µg/µL, sendo empregados volumes de meio de 100µL, 200µL e 500µL para os testes de atividade, cujos resultados são apresentados na Figura 4.38.



**Figura 4.38** Medidas de atividade de CarB clonada sob a forma nativa em pDEST™14. Em (a) varredura temporal de absorvância a 434nm da formação de HOPDA pela degradação de 100µM de 2,3-DHBP a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl em diferentes volumes de *resting cells* (com 1µg proteína total/µL). Em (b) valores calculados de taxa inicial e taxa inicial/volume de célula empregado no sistema de *resting cells*.

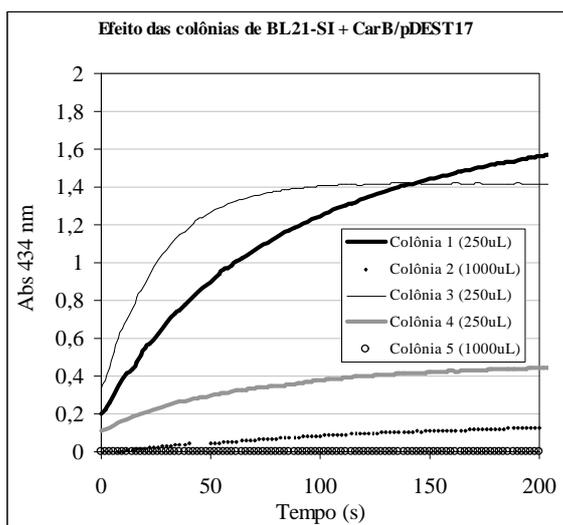
Como pode ser verificado na Figura 4.38, para cada medida em diferentes volumes foram calculadas as taxas iniciais ( $\text{taxa} = \Delta\text{Abs}_{434\text{nm}}/\Delta\text{tempo}$  para os primeiros pontos), assim como as taxas iniciais normalizadas pelo volume de meio de crescimento

celular empregado (Taxa inicial/Volume). Verifica-se que a taxa obtida empregando volume de 200 $\mu$ L foi o dobro do valor da taxa obtida para 100 $\mu$ L, sendo obtido o mesmo valor para a taxa normalizada pelo volume. Quando foram empregados 500 $\mu$ L de meio nesta medida, a taxa normalizada não se manteve e o valor ainda caiu consideravelmente em comparação com os demais, indicando a ocorrência dos efeitos de competição causados por excesso de densidade celular. Desta forma, a determinação da atividade enzimática foi feita empregando 200 $\mu$ L de meio de expressão de CarB expresso na forma nativa (com 200 $\mu$ g de proteína total).

### **Análise da estabilidade dos clones de CarB com cauda de histidina**

Testes de atividade prévios em placa para CarB expressa com cauda de histidina, em plasmídeo pDEST<sup>TM</sup>17 apresentaram colônias transformantes amarelas (positivas) com a adição de solução de 2,3-DHBP (como mostrado na Figura 4.37) e colônias negativas, que não ficaram amarelas na presença do substrato cromóforo.

Desta forma, a partir de uma placa com colônias isoladas provenientes do estoque de glicerol de uma única colônia positiva de BL21-SI contendo o plasmídeo pDEST<sup>TM</sup>17 com o gene *carB* confirmado por PCR e digestão, foram selecionadas algumas colônias para a dosagem de atividade de dioxigenase de *meta*-clivagem. Os resultados de crescimento celular e de atividade das diferentes colônias expressas em pDEST<sup>TM</sup>17 (Figura 4.39), identificam diferentes comportamentos nas colônias selecionadas: baixo crescimento em relação à cepa com expressão na forma nativa, com atividade similar (colônia 1), crescimento similar à célula com expressão nativa, mas sem praticamente nenhuma atividade (colônia 2), crescimento e atividade similares aos obtidos para proteína expressa na forma nativa (colônia 3), crescimento até Abs<sub>600nm</sub> de 5,0, com baixíssima atividade (colônia 4), nenhum crescimento e, conseqüentemente, nenhuma atividade (colônia 5).



(a)

Abs <sub>600nm</sub> (18h)	
Colônia 1	2,3
Colônia 2	3,6
Colônia 3	4,5
Colônia 4	5,0
Colônia 5	0,06

(b)

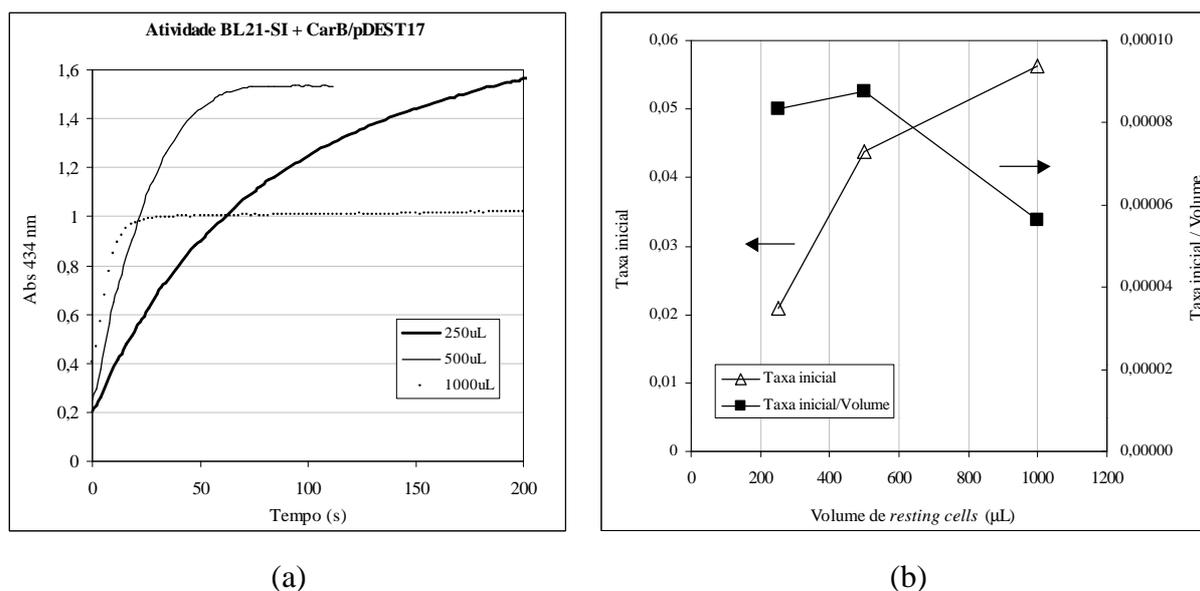
**Figura 4.39** Atividade de diferentes colônias isoladas a partir de estoque de glicerol de um único clone transformante com cauda de histidina (clonado em pDEST<sup>TM</sup>17). Em (a) varredura temporal de absorvância a 434nm da formação de HOPDA pela degradação de 100 $\mu$ M de 2,3-DHBP (35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl) em diferentes volumes de *resting cells* de cada uma das colônias (indicados na legenda); em (b) concentração celular medida por Abs<sub>600nm</sub> de cada colônia com crescimento por 18h a 37°C empregadas nas medidas em (a).

A instabilidade verificada na atividade das colônias expressas com plasmídeo pDEST<sup>TM</sup>17 pode ser devida à adição da cauda de histidina à proteína CarB. Não foi verificado comportamento semelhante para as cepas expressando CarB na forma nativa, clonadas em pDEST<sup>TM</sup>14. Como o sítio ativo da enzima é composto por duas histidinas, possivelmente a cauda, em algumas colônias, deve estar interferindo nesta atividade, assim como afetando a capacidade de crescimento celular, talvez pelo envelhecimento errôneo destas proteínas, que poderia estar causando alguma toxicidade à célula.

NAM *et al.* (2002b) relatam que a adição de cauda de histidina às regiões C terminais das proteínas CarAc e CarAd, cujo sítios ativos são formados por agregados [2Fe-2S] ligados, respectivamente, a Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> e Cys<sub>4</sub>, não afetou significativamente suas atividades. Entretanto, para CarAc, cujo sítio além de ferro apresenta histidinas, estes autores inferem que a cauda deve ter afetado um pouco a estrutura interna da enzima, uma vez que nesta proteína, como descrito anteriormente, ambas regiões terminais encontram-se expostas. A mesma alteração da estrutura interna de CarAd, assim como de sua função transportadora de elétrons, é relatada (NAM *et al.*, 2002b).

## Determinação da concentração de células para estudos de atividade de CarB com cauda de histidina

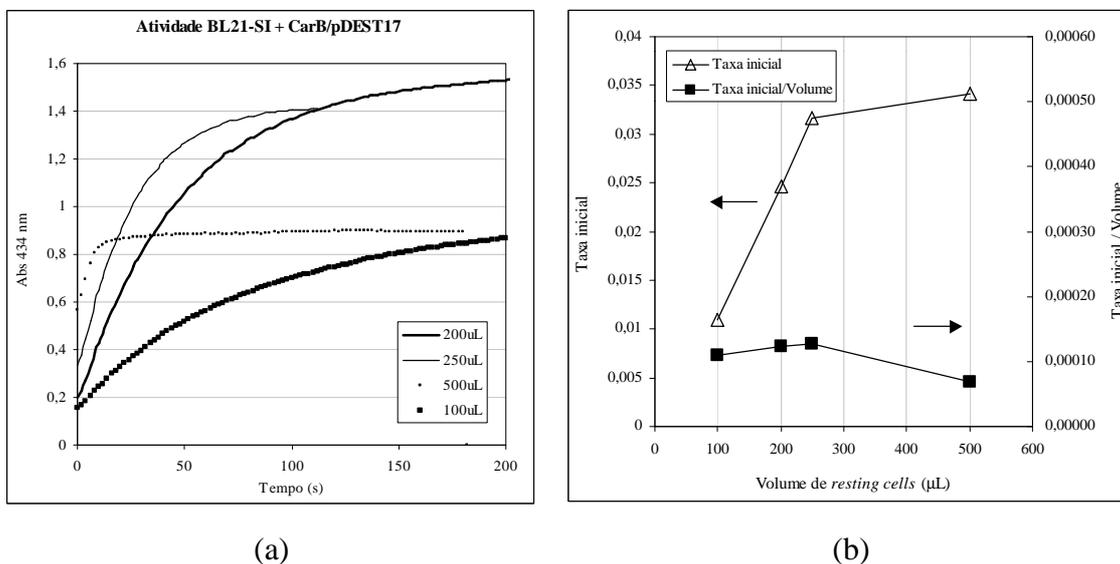
Para as colônias com atividades similares à expressa da forma nativa (colônias 1 e 3) foram feitos testes com células íntegras (*resting cells*) em Tris-HCl 50mM (pH 7,5) a partir de diferentes volumes de meio de crescimento durante a noite em LB. Para a colônia com crescimento até  $Abs_{600nm}$  de 2,3 (colônia 1) e quantidade de proteína total de  $0,6\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foram utilizados volumes equivalentes à aproximadamente a metade dos volumes empregados para a célula com expressão nativa: 250 $\mu\text{L}$ , 500 $\mu\text{L}$  e 1000 $\mu\text{L}$ . Pelos resultados apresentados na Figura 4.40, verifica-se que a taxa normalizada pelo volume mantém-se constante até 500 $\mu\text{L}$  e reduz-se acima desta condição.



**Figura 4.40** Medidas de atividade de CarB clonada com cauda de Histidina (pDEST<sup>TM</sup>17) e com crescimento por 18h em LB até  $Abs_{600nm}=2,3$  e  $0,6\mu\text{g}$  proteína total/ $\mu\text{L}$  (colônia 1). (a) Varredura temporal de absorvância a 434nm da formação de HOPDA pela degradação de 100 $\mu\text{M}$  de 2,3-DHBP a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl em diferentes volumes de *resting cells*. (b) Taxa inicial e Taxa inicial/Volume, calculadas a partir dos dados de absorvância a 434nm apresentados em (a).

O mesmo experimento foi feito para a colônia 3 de CarB de expressa com cauda de histidina, em plasmídeo pDEST<sup>TM</sup>17 (dosagem de proteína total de  $1,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),

empregando volumes de 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 250 $\mu$ L e 500 $\mu$ L de meio LB para os testes de atividade. Para esta colônia, para volumes superiores a 250 $\mu$ L o valor da taxa inicial ficou consideravelmente reduzido, como mostrado na Figura 4.41.



**Figura 4.41** Medidas de atividade de CarB clonada com cauda de Histidina (pDEST<sup>TM</sup>17) e com crescimento por 18h em LB até Abs<sub>600nm</sub>=4,5 e 1,5 $\mu$ g proteína total/ $\mu$ L (colônia 3). (a) Varredura temporal de absorvância a 434nm da formação de HOPDA pela degradação de 100 $\mu$ M de 2,3-DHBP a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl em diferentes volumes de *resting cells*. (b) Taxa inicial e Taxa inicial/Volume calculados a partir da absorvância a 434nm de (a).

O comportamento apresentado por CarB expressa com e sem cauda de histidina foi similar, como verificado nos resultados de taxas medidas em sistemas de células íntegras (*resting cells*), em que em densidades celulares muito altas provocaram a redução das taxas de reação, como discutido por IZUMI *et al.* (1994) na degradação de DBT. Verifica-se pelos cálculos de taxas iniciais que em volumes de meio contendo células íntegras equivalentes ou abaixo de 200 $\mu$ L dos clones com pDEST<sup>TM</sup>14, 500 $\mu$ L para a colônia 1 com pDEST<sup>TM</sup>17 e 250 $\mu$ L para a colônia 3 com cauda de histidina, o comportamento da taxa inicial com a concentração celular mantém-se constante. Nestas condições a taxa medida indica a velocidade da reação, sem a competição de outros processos, e estes volumes podem ser empregados nas medidas de atividade.

## Determinação de atividade das células íntegras e sonicadas

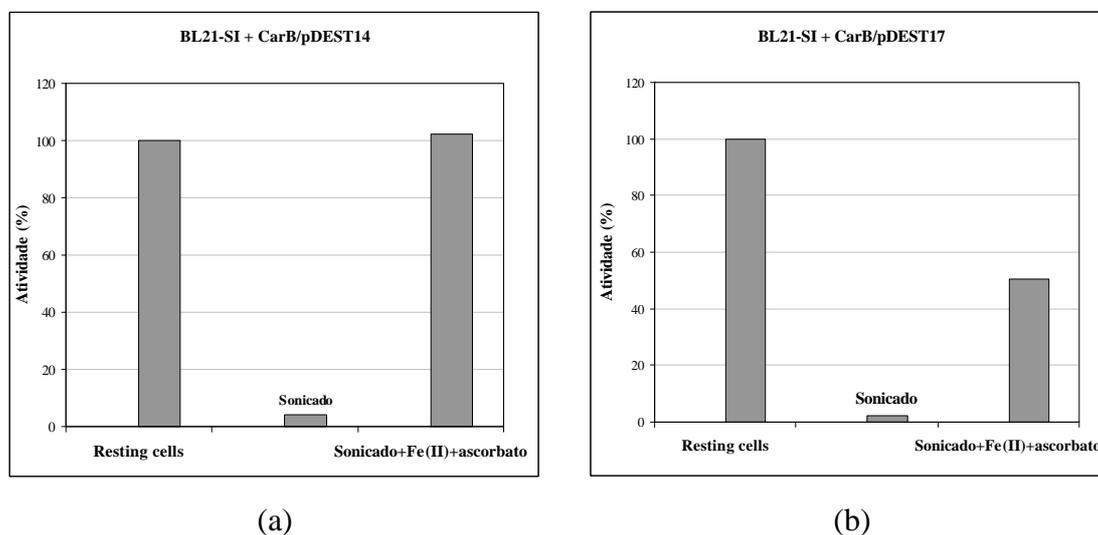
A atividade de CarB na degradação de 2,3-DHBP foi medida em três diferentes condições: células íntegras (*resting cells*), extrato celular (células rompidas por sonicação) e extrato celular ativado com a presença de cofatores. Foram empregados volumes em que a taxa inicial indica a velocidade da reação e não tem influência de outros efeitos, como limitação de transferência de massa e adsorção (IZUMI *et al.*, 1994). Enquanto nenhuma (ou reduzida) atividade foi detectada em extrato celular sem adição de cofatores ao meio, após incubação com ácido ascórbico e sulfato ferroso amoniacal em gelo, a enzima recuperou a atividade de *meta*-clivagem (LARENTIS *et al.*, 2005b, LARENTIS *et al.*, 2005d), como pode ser verificado na Tabela 4.5, similar aos resultados descritos para a enzima CarB de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (IWATA *et al.*, 2003).

**Tabela 4.5** Atividade de *meta*-clivagem ( $\mu\text{moles HOPDA} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) de CarB clonada em vetor com cauda de Histidina (200 $\mu\text{L}$  volume de meio contendo células com 200 $\mu\text{g}$  prote\u00edna total) e na forma nativa (250 $\mu\text{L}$  com 150 $\mu\text{g}$  de prote\u00edna total para col\u00f4nia 1 e para col\u00f4nia 3, 200 $\mu\text{L}$  com 300 $\mu\text{g}$  prote\u00edna total) para degrada\u00e7\u00e3o de 100 $\mu\text{M}$  de 2,3-dihidroxibifenil em 35°C e tamp\u00e3o Tris-HCl 50mM (pH 7,5). Foram empregados *resting cells*, extrato celular e reativa\u00e7\u00e3o com \u00e1cido asc\u00f3rbico (35 $\mu\text{M}$ ) e sulfato ferroso amoniacal (50 $\mu\text{M}$ ) em gelo por 10min.

C\u00e9lula	<i>Resting cells</i>	Extrato celular	Extrato celular + ascorbato + Fe(II)
Nativa	0,53	0,02	0,55
Cauda de His (col\u00f4nia 1)	0,82	0,02	0,42
Cauda de His (col\u00f4nia 3)	0,50	0,07	0,77

Os resultados de atividade da Tabela 4.5 est\u00e3o apresentados na forma de percentuais na Figura 4.42. A queda de atividade verificada com o rompimento das c\u00e9lulas confirma o requerimento pela enzima de *meta*-clivagem de \u00edon ferroso no meio de rea\u00e7\u00e3o (o \u00e2nion ascorbato atua como agente redutor em condi\u00e7\u00f5es aer\u00f3bias). Em contraposi\u00e7\u00e3o, os cofatores s\u00e3o supridos pelo meio celular no sistema de *resting cells*.

Experimento similar foi realizado por URAGAMI *et al.* (2001) para confirmar que o sítio ativo da enzima bifenil dioxigenase, homóloga à 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase, é também formado por Fe(II).

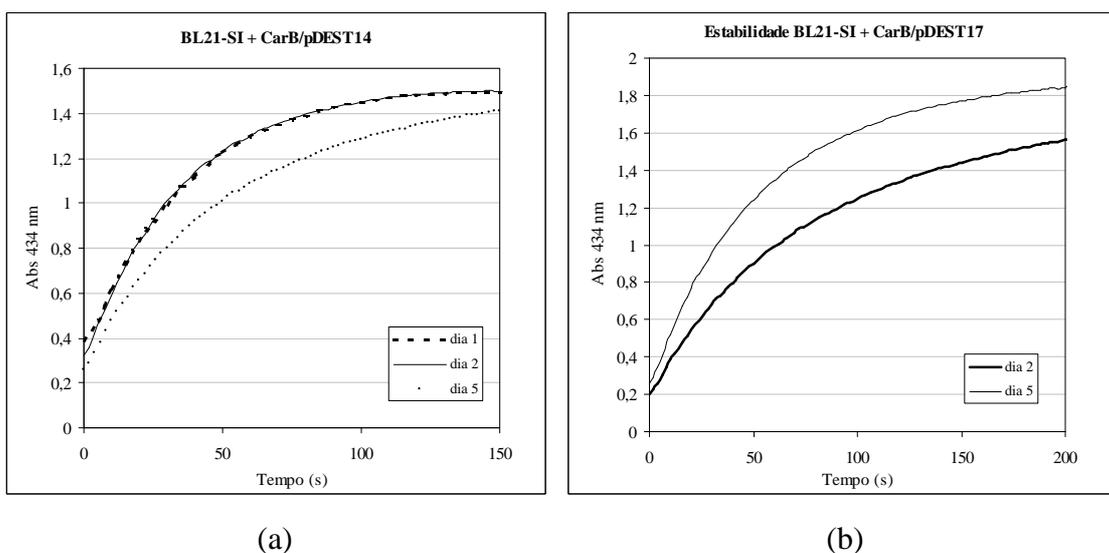


**Figura 4.42** Comparação das atividades de *meta*-clivagem de CarB clonada em vetor na forma nativa (a) e com cauda de Histidina (colônia 1) (b) para degradação de 100 $\mu$ M de 2,3-dihidroxibifenil em 35°C e tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5) empregando *resting cells*, extrato celular e reativação com ácido ascórbico e sulfato ferroso amoniacal em gelo.

Os resultados de *meta*-clivagem obtidos para o extrato celular de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 foram similares aos verificados para a 2'-aminobifenil-2,3-diol dioxigenase recombinante de *Pseudomonas* sp. CA10 por (SATO *et al.*, 1997a), cuja taxa de 1,4 ( $\mu$ mol composto *meta*-clivagem/min.mg de proteína) a 25°C foi medida em extrato cru de *Escherichia coli* e tampão fosfato de sódio 50mM (pH7,5).

### Estabilidade das células com expressão de CarB

A estabilidade enzimática de CarB foi testada mantendo a célula em geladeira (em meio), verificando-se manter atividade por até 3 semanas nestas condições. Os testes feitos com meio após 1 mês não mostraram atividade, possivelmente pelas condições não propícias de armazenagem. Os resultados dos testes até os primeiros 5 dias indicaram que a enzima manteve praticamente 100% de sua atividade (Figura 4.43).



**Figura 4.43** Estabilidade das células de CarB clonada sob a forma nativa em pDEST<sup>TM</sup>14 (a) e pDEST<sup>TM</sup>17 (b) medidas pela atividade de produção de HOPDA até 5 dias de armazenamento em geladeira.

### Construção da estrutura 3-D de CarB

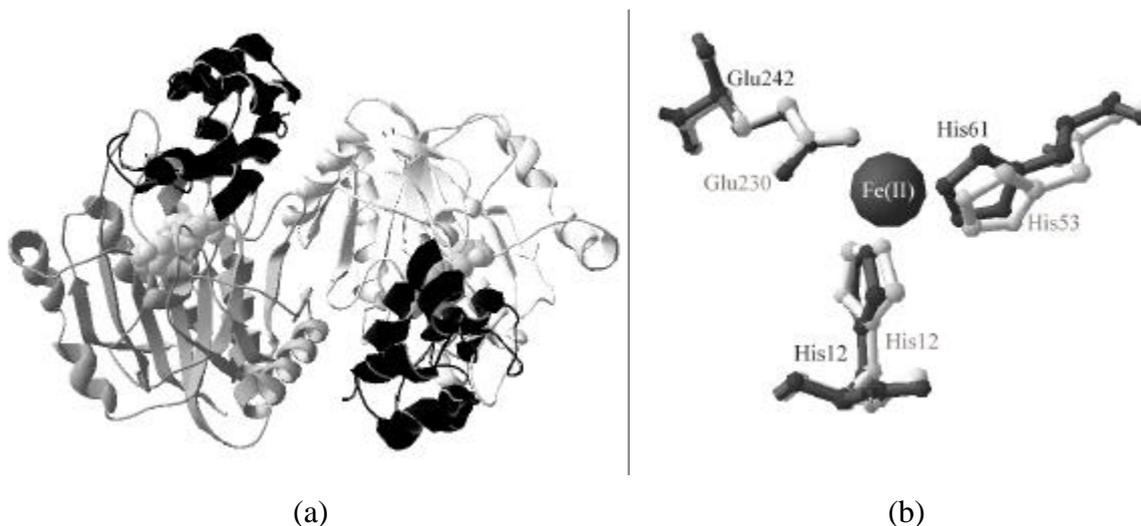
A estrutura do heterotetramérica  $\alpha_2\beta_2$  de CarB foi obtida por modelagem por homologia empregando como moldes para a obtenção dos modelos de CarBa e CarBb as subunidades correspondentes da protocatecuato 4,5-dioxigenase de *Sphingomonas paucimobilis* (código de acesso 1B4U no PDB). Embora a cristalização desta enzima tenha sido descrita por IWATA *et al.* (2004), sua estrutura ainda é desconhecida.

O alinhamento global entre a seqüência de 30kDa de CarBb e a seqüência da cadeia  $\beta$  do molde (LigB), obtido pelo programa T-COFFEE (Figura 4.44), apresentou 31% de identidade e 67% de similaridade (LARENTIS *et al.*, 2004b, LARENTIS *et al.*, 2005d). A estereoquímica e geometria do modelo foram consideradas boas pelas análises realizadas com o PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), com 97% dos resíduos nas regiões permitidas do Gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963), incluindo todos aqueles utilizados nas análises estruturais. Os resultados do programa VERIFY3D indicaram que quase 92% modelo tridimensional é compatível com a seqüência de aminoácidos de CarBb (LUTHY *et al.*, 1992). As análises implementadas no WHAT-CHECK, PROVE (8,7% de resíduos fora) e ERRAT

confirmaram que o modelo obtido é satisfatório (HOOFT *et al.*, 1996, PONTIUS *et al.*, 1996, COLOVOS E YEATES, 1993).

O modelo da subunidade CarBa de 10kDa (LARENTIS *et al.*, 2005d) foi construído a partir de um alinhamento com 26% de identidade e 61% de similaridade com os resíduos 30 a 139 da cadeia  $\alpha$  do molde (LigA). O alinhamento empregado foi melhorado manualmente e selecionado por similaridade estrutural com o molde pelo programa SPDBViewer, após a construção de vários modelos (Figura 4.44). Como o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) não identificou um molde com suficiente similaridade entre a subunidade CarBa e as estruturas de proteínas disponíveis no PDB, como indicado na literatura (SATO *et al.*, 1997a), foi empregada a metodologia de *threading* para identificação do molde para esta subunidade, empregando o programa GenTHREADER (JONES, 1999). Esta metodologia (“*profile-based threading*”) foi desenvolvida para identificação de estrutura de uma proteína a partir somente das informações da seqüência da mesma na ausência de nenhuma identidade seqüencial aparente com nenhuma outra proteína (ROST *et al.*, 1997). Desta forma, a partir do uso esta ferramenta, a subunidade LigA foi identificada como uma proteína com escore suficiente para a construção do modelo 3D de CarBa. O modelo gerado não apresentou resíduos nas regiões não permitidas do Gráfico de Ramachandran, com 92% nas regiões mais favoráveis (LASKOWSKI *et al.*, 1993, RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). Os resultados das análises realizadas com o programa VERIFY3D foram similares às do modelo de CarBb (LUTHY *et al.*, 1992). A avaliação do modelo feita pelos programas WHAT-CHECK, PROVE (5,2% de resíduos fora) e ERRAT também indicaram que o modelo é satisfatório (HOOFT *et al.*, 1996, PONTIUS *et al.*, 1996, COLOVOS E YEATES, 1993).





**Figura 4.45** Modelo estrutural  $\alpha_2\beta_2$  de CarB obtido por homologia (LARENTIS *et al.*, 2005d). Em (a) verifica-se as estruturas de alças,  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  das subunidades CarBa (cadeias pretas) e CarBb (cadeias cinzas), com a representação do sítio ativo em esferas. (b) Representação do sítio catalítico na subunidade CarBb em cinza claro (Fe(II) coordenado pelos resíduos His12, His53 e Glu230) sobreposto com o sítio catalítico do molde LigB em cinza escuro (resíduos His12, His61 e Glu242).

O modelo heterotetramérico  $\alpha_2\beta_2$  é composto por duas unidades CarBb (cadeias  $\beta$ ) que estão ligadas entre si e em contato com a subunidade menor CarBa (cadeias  $\alpha$ ), enquanto estas duas não fazem contato direto. CarBa é formada por  $\alpha$  hélices, enquanto CarBb apresenta uma estrutura  $\alpha/\beta$  similar ao do molde (SUGIMOTO *et al.*, 1999). O sítio catalítico da enzima foi caracterizado *in silico* (Figura 4.45), confirmando que a coordenação do Fe(II) no complexo da CarB ocorre por três resíduos de aminoácidos (His12, His53 e Glu230), completamente conservados na classe III das extradiol dioxigenases, como indicado por SATO *et al.* (1997a) e SUGIMOTO *et al.* (1999). Os resíduos do sítio ativo estão corretamente posicionados em comparação com a estrutura cristalográfica da enzima LigAB, como indicado na Figura 4.45b. His12 e His53 estão localizados em alças e parecem ser relativamente flexíveis, enquanto Glu230 é um pouco inflexível porque está posicionado em uma  $\alpha$ -hélice. Eles estão localizados em uma fenda na subunidade CarBb, similar ao molde (SUGIMOTO *et al.*, 1999). De acordo com a estrutura do molde, o sítio ativo é provavelmente completado por uma molécula de água e é coberto pela subunidade CarBa, que atua como uma tampa. Os resíduos Ser54 a Thr75 de CarBa cobrem a cavidade em que fica o sítio ativo,

equivalentes aos do molde (resíduos 85 a 110 de LigA). Todos estes resíduos na LigAB estão localizados em uma hélice que fecha a saída da cavidade catalítica, e, por esta razão, o substrato fica completamente inacessível ao solvente. Assim, na ausência do substrato, cinco moléculas de água ocupam a cavidade e isto parece ser essencial para a atividade desta classe de enzimas (SUGIMOTO *et al.*, 1999).

O modelo também indica que os resíduos His117 e His182 em CarBb são importantes para a formação de ligações hidrogênio com os dois grupamentos hidroxila do anel catecol do substrato, e por esta razão, para a atividade catalítica. His182 é o aminoácido correspondente a His195 da LigAB e His194 da BphC, que a literatura (SUGIMOTO *et al.*, 1999, URAGAMI *et al.*, 2001) sugere que sejam as bases catalíticas responsáveis pela desprotonação de um dos grupamentos OH do substrato, pela formação de uma ligação hidrogênio. No modelo de CarB foi verificada a formação de uma ligação hidrogênio entre His182 e o grupamento OH do substrato 2,3-dihidroxibifenil (Figura 4.46a), dando suporte ao alinhamento que indica que este resíduo pode ser a base para a catálise na enzima 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase. O outro grupo OH do anel catecol do substrato é ligado por ponte de hidrogênio ao resíduo His117, correspondente a His127 de LigAB, o que foi confirmado pelo cálculo das ligações-H no modelo.

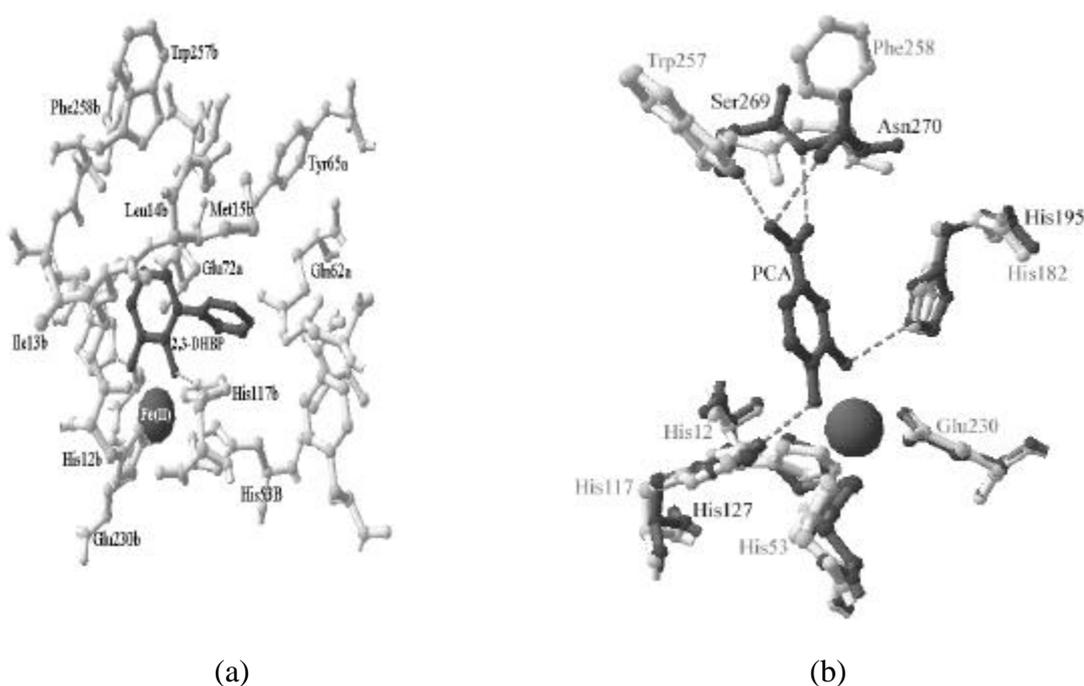
Os resíduos Ile13, Leu14, Met15, His117, Leu184 e Thr259 de CarBb, assim como alguns resíduos de CarBa (Gln62, Tyr65), são aminoácidos hidrofóbicos que o modelo sugere que formem a cavidade catalítica de ligação do substrato, uma vez que apresenta uma superfície complementar à forma do substrato (Figura 4.46a). Na estrutura da enzima LigAB, os resíduos Ile13, Pro14, Leu197, His195 e Thr271 (LigB), além de Phe103 em LigA, fazem contato com o anel catecol do substrato (PCA) e há uma complementaridade entre a superfície de van der Waals do substrato ligado e destes resíduos (SUGIMOTO *et al.*, 1999, URAGAMI *et al.*, 2001). O aminoácido Phe103 de LigA corresponde ao resíduo negativo Glu72 no alinhamento com CarBa, o qual pode interagir por ligação hidrogênio com o grupamento NH<sub>2</sub> do substrato da enzima 2'-aminobifenil-2,3-diol (Figura 4.46a). URAGAMI *et al.* (2001) identificaram a forma da cavidade de ligação do substrato e propuseram que seu caráter hidrofóbico é importante para a ligação do substrato e SUGIMOTO *et al.* (1999) mostraram que a precisa complementaridade de formas de superfície entre o substrato e a cavidade de ligação da enzima parece ser o fator dominante para a estabilização do ligante, mais do

que a coordenação entre o ferro e os grupos hidroxila. A análise do modelo indica que os resíduos hidrofóbicos próximos ao sítio catalítico, como descrito acima, provavelmente permitem a ligação dos anéis aromáticos dos substratos, assim como formam uma cavidade que permite o encaixe do composto 2,3-dihidroxibifenil, o que explicaria a alta afinidade entre CarB e 2,3-DHPB. Este resultado é interessante porque o modelo foi construído usando a enzima que degrada protocatecuato e não o substrato específico de CarB. Mesmo que a sequência e as estruturas da aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarB) e 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase (BphC) sejam diferentes, ambas as enzimas são capazes de degradar 2,3-dihidroxibifenil (IWATA *et al.*, 2003, SUGIMOTO *et al.*, 1999, URAGAMI *et al.*, 2001), o que provavelmente está relacionado com a natureza do sítio de ligação do substrato. Este resultado está de acordo com a literatura (SUGIMOTO *et al.*, 1999), ou seja, que estas enzimas apresentam sítos ativos e mecanismos de reação similares.

Aparentemente, a substituição dos resíduos Ser269 e Asn270 de LigB por resíduos hidrofóbicos (Trp257 e Phe258, respectivamente) na estrutura de CarBb não permite a formação de ligações hidrogênio entre o protocatecuato e estes resíduos (Figura 4.46b). SUGIMOTO *et al.* (1999) descrevem que estas ligações são essenciais para a estabilização do protocatecuato no sítio ativo da enzima LigAB para a degradação deste composto, uma vez que para catecuato a atividade enzimática é negligenciável (IWATA *et al.*, 2003, IWATA *et al.*, 2004). Isto pode explicar porque CarB, mesmo apresentando uma estrutura similar a LigAB, não é capaz de degradar o composto protocatecuato.

Apesar dos modelos terem sido construídos usando alinhamentos que não apresentam altos percentuais de identidade sequencial, as estruturas moleculares já descritas na literatura dão suporte, e os resultados de modelagem apontam no mesmo sentido, que o caráter hidrofóbico dos resíduos que formam o sítio de ligação dos substratos nas dioxigenases que promovem a quebra de anéis catecólicos é mantido. Além disso, as inferências feitas a partir da modelagem não ficam invalidadas principalmente porque as mais importantes conclusões estruturais foram obtidas por análises dos sítos ativos, cujos resíduos e geometria são completamente conservados nestas enzimas (SUGIMOTO *et al.*, 1999). Embora as estruturas das classes I-II e III das extradióis dioxigenases não sejam relacionadas evolutivamente e não exibam nenhuma similaridade, seus sítos ativos compartilham de características comuns (coordenação do íon ferroso em configuração tipo não-heme com rearranjo geométrico

similar), sugerindo fortemente o mesmo mecanismo reacional (SUGIMOTO *et al.*, 1999, VAILLANCOURT *et al.*, 2002, IWATA *et al.*, 2004). Assim, para CarB e LigAB (ambas pertencentes à classe III), pode ser sugerido o mesmo mecanismo de quebra enzimática. Esta hipótese é corroborada pela completa conservação dos aminoácidos nos sítios ativos, pela coerente caracterização estrutural realizada por meio da modelagem e pela geometria similar compartilhada por estas enzimas.

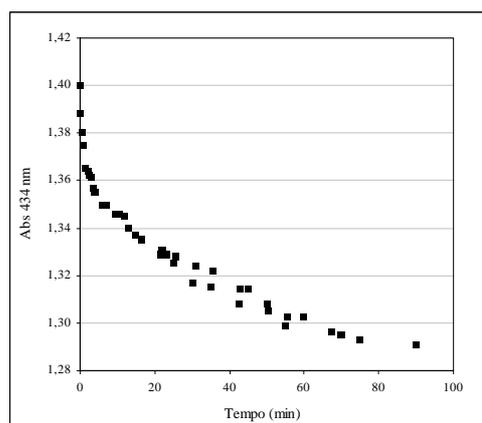


**Figura 4.46** (a) Estrutura do complexo CarB e 2,3-dihidroxibifenil (2,3-DHBP) com as ligações hidrogênio (indicadas por linhas tracejadas) entre os aminoácidos do sítio catalítico e os grupamentos OH do substrato, assim como os resíduos hidrofóbicos que formam a cavidade de ligação com o substrato. Os sufixos a e b indicados nos resíduos referem-se às subunidades CarBa e CarBb, respectivamente. (b) Sobreposição do sítio catalítico (íon ferroso) do complexo LigAB-protocatecuato (PCA) em cinza escuro com o sítio catalítico de CarB (cinza claro). As linhas tracejadas representam as ligações hidrogênio formadas com os aminoácidos próximos aos resíduos catalítico que são importantes para a quebra catalítica do anel do PCA. De forma diferente do complexo LigAB-PCA, não ocorre formação de ligações hidrogênio no complexo CarB-2,3-DHBP exceto aquelas entre os grupos OH com os resíduos hidrofóbicos (LARENTIS *et al.*, 2005d).

### 4.5.3 HOADA Hidrolase (Car C)

A confirmação da expressão da expressão da enzima CarC (HOADA hidrolase) sob a forma ativa em *Escherichia coli* foi feita em placa e em meio líquido (LB), como mostrado na Figura 4.37.

Testes preliminares de degradação de 16 $\mu$ M de HOPDA a 25°C e tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5-8) foram implementados empregando *resting cells* (500mL de meio com crescimento/indução por 18h em LB), resultando em conversão de HOPDA de mais de 25% em 10-12min e quase 50% em 50min-1h. Estes dados, apresentados na Figura 4.47, não foram empregados nos cálculos de atividade, uma vez que a taxa inicial obtida (0,01  $\mu$ moles HOPDA/min) está provavelmente subestimada pelo emprego de excesso de células e baixa concentração de substrato em relação ao valor de  $K_m$  de 2,5 $\mu$ M (SATO *et al.*, 1997a, NOJIRI *et al.*, 2003, HABE *et al.*, 2003). As células ainda mantiveram atividade após 3 semanas armazenadas em geladeira, de forma similar às cepas recombinantes com a enzima CarB (nativa e com cauda de histidina).

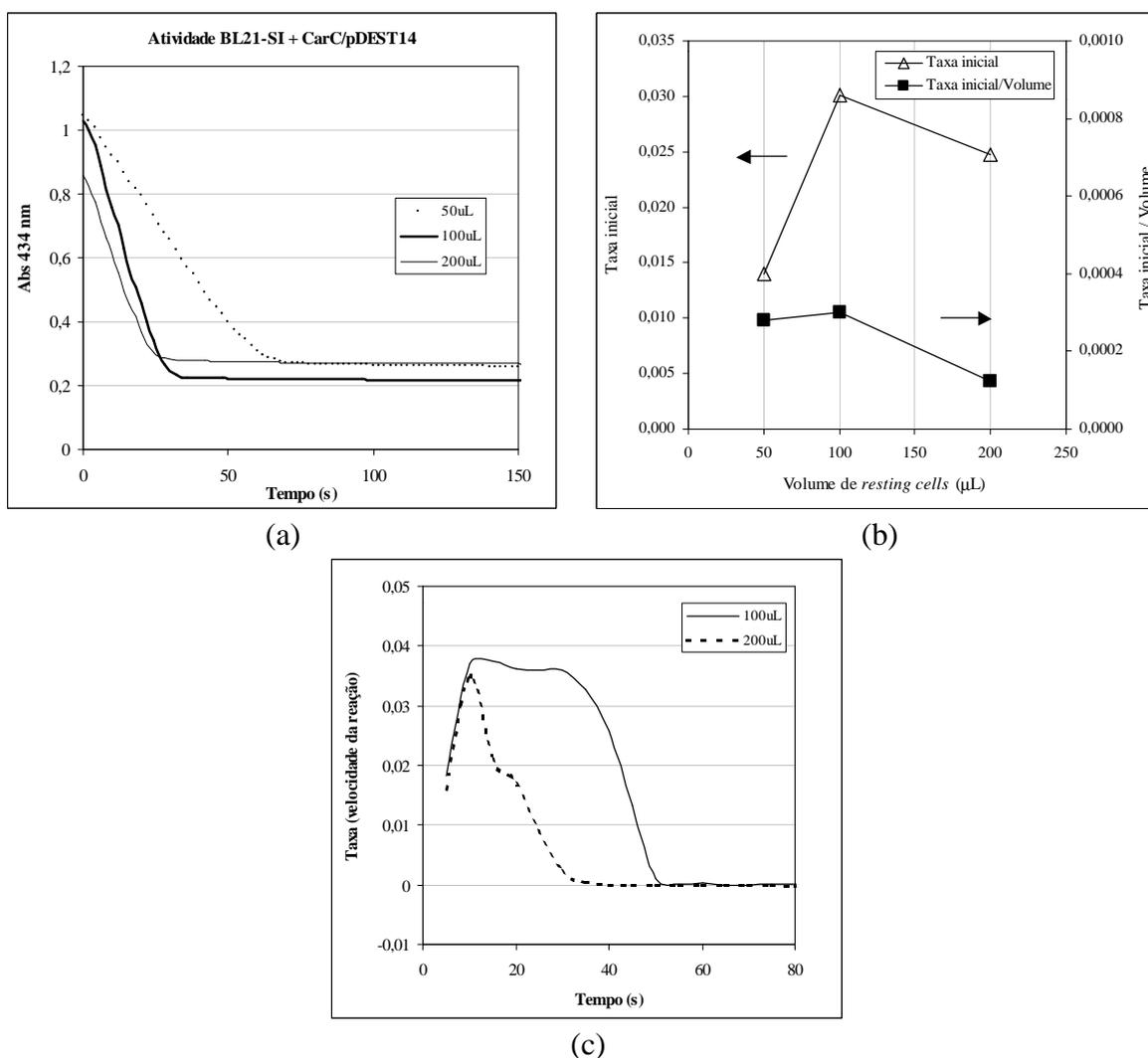


**Figura 4.47** Medidas de degradação de 16 $\mu$ M de HOPDA a 25°C empregando CarC clonada sob a forma nativa em pDEST<sup>TM</sup>14.

### Determinação da concentração de células para estudos de atividade

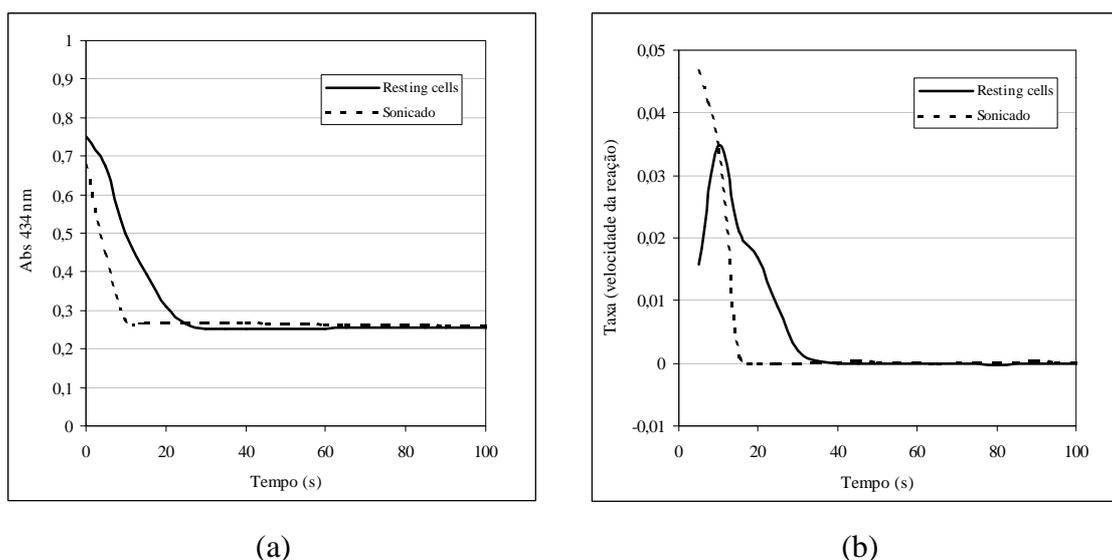
A atividade sobre a degradação do produto de *meta*-clivagem foi medida a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl, monitorando a degradação do composto amarelo HOPDA, por absorbância a 434nm. Os testes foram feitos em sistema de células íntegras (*resting cells*) a partir de 500 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 100 $\mu$ L e 50 $\mu$ L de meio LB com crescimento da cepa BL21-SI e expressão de CarC de forma nativa em pDEST<sup>TM</sup>14, de forma similar aos

testes empreendidos para medidas de atividade de CarB. Pelos resultados verificados na Figura 4.48a, com 500 $\mu$ L de meio de crescimento centrifugado, a reação é instantânea e somente abaixo de 100 $\mu$ L é possível inferir sobre a atividade da enzima, uma vez que mantém a linearidade entre taxa e quantidade de catalisador, como mostrado na Figura 4.48b. Com 200 $\mu$ L tem-se uma subestimação da atividade enzimática, pois o volume é dobrado mas a taxa é inclusive menor, não devendo ser utilizado este volume os testes de atividade.



**Figura 4.48** Medidas de atividade de CarC clonada sob a forma nativa em pDEST<sup>TM</sup>14 e com crescimento por 18h em LB até  $Abs_{600nm}=5$ . (a) Varredura temporal de absorbância a 434nm da degradação de 100 $\mu$ M HOPDA a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl em diferentes volumes de *resting cells*. (b) Taxa inicial e taxa inicial/Volume para os diferentes volumes de *resting cells* testados. (c) Taxas ao longo do tempo para 100 e 200 $\mu$ L. Os dados de taxa em (b) e (c) foram calculados a partir dos dados de absorbância a 434nm (taxa =  $\Delta Abs_{434nm}/\Delta tempo$ ).

Nos sistemas catalíticos empregando células íntegras (*resting cells*), tanto para as cepas expressando CarB quanto CarC, verificou-se nos primeiros instantes que os valores de taxa aumentam antes de um breve espaço de tempo constante (utilizados para as medidas de atividade), seguido da sua redução. Este efeito inicial foi atribuído à transferência de massa do substrato (ou do produto) da reação para dentro das células. Nas taxas iniciais calculadas a partir dos dados de absorvância a 434nm para os volumes de 100 e 200µL apresentados na Figura 4.48c, este efeito pode ser claramente visualizado. Os dados de taxas de 100µL foram empregados dos cálculos de atividade de CarC na degradação de HOPDA, quando a taxa permanece constante por alguns segundos. Também é possível confirmar este mecanismo de transferência que ocorre nos sistemas de células íntegras pela comparação das taxas com células rompidas por sonicação, quando não é verificado um aumento inicial das taxas, mas uma redução contínua (Figura 4.49).



**Figura 4.49** Medidas de absorvância a 434nm da degradação de 100µM HOPDA a 35°C, pH 7,5 e 50mM de Tris-HCl em 200µL de meio com crescimento por 18h em LB até  $Abs_{600nm}=5$  de *Escherichia coli* expressando CarC a forma nativa em pDEST<sup>TM</sup>14, em sistema de células íntegras e sonicadas. (a) Dados de taxa (= velocidade da reação =  $\Delta Abs_{434nm}/\Delta tempo$ ) calculados a partir dos dados apresentados em (a).

A ocorrência de transferência de massa de produto ou substrato (tanto para CarB quanto para CarC) corrobora os indícios de que as proteínas recombinantes são

expressas preferencialmente no citoplasma de *Escherichia coli*, exigindo transporte dos compostos através da membrana celular. Os processos de transferência de massa são de grande importância no metabolismo de moléculas hidrofóbicas por células, juntamente com a cinética enzimática. Dos muitos processos envolvidos nas taxas de degradação, a transferência de massa pode algumas vezes ser a etapa limitante, especialmente de poliaromáticos da fase óleo para dentro da célula (MONTICELLO, 2000).

### Determinação de atividade das células íntegras e sonicadas

A partir dos dados mostrados na Figura 4.nn foi verificado que a célula sonicada apresenta comportamento muito próximo ao sistema de células íntegras, diferente do que foi verificado para a célula recombinante expressando CarB, para o qual a célula rompida não apresenta atividade, a não ser após sua reativação com  $Fe^{2+}$ . Este resultado indica que a enzima CarC de *Pseudomonas stutzeri* não é dependente de nenhum cofator, e não é uma metalo-enzima, como indicado pela caracterização da enzima da cepa *Pseudomonas* sp. LD2 (RIDDLE *et al.*, 2003b) e pelas análises estruturais obtidas pela modelagem por homologia, assim como pela estrutura de CarC de *Janthinobacterium* sp. J3 determinada por HABE *et al.* (2003). Os dados de absorvância a 434nm das células íntegras e sonicadas foram repetidos empregando 100 $\mu$ L (1,5 $\mu$ g proteína total/ $\mu$ L), que foram utilizados para calcular a atividade de CarC na degradação de HOPDA (LARENTIS *et al.*, 2005b), apresentados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** Atividade de degradação de 100 $\mu$ M do produto de *meta*-clivagem HOPDA ( $\mu$ moles HOPDA.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) de CarC clonada na forma nativa a 35°C em tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5) empregando *resting cells* e extrato celular obtido por sonicação.

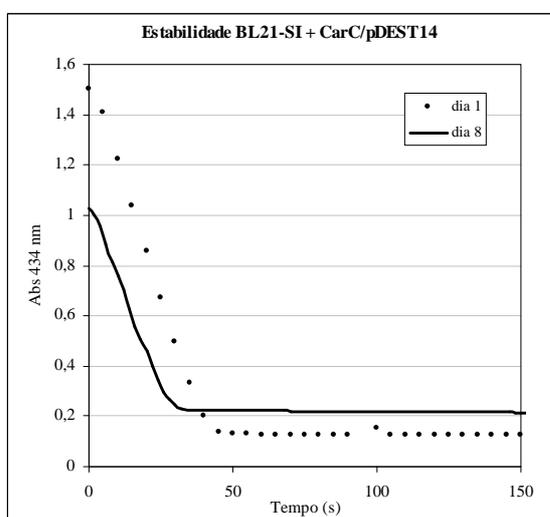
Sistema	Taxa de consumo de HOPDA
Células íntegras ( <i>resting cells</i> )	1,09
Extrato celular	1,15

Para a hidrolase recombinante de *Pseudomonas* sp. CA10 foram obtidas taxas de consumo de HOADA similares, de 1,20 ( $\mu$ mol/min.mg proteína) (SATO *et al.*, 1997a)

e de 1,71 ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  proteína) (NOJIRI *et al.*, 2003) em extrato cru de *Escherichia coli* a 25°C em tampão fosfato de sódio 50mM e pH 7,5.

### Estabilidade das células com expressão de CarC

A estabilidade das células recombinantes expressando a HOPDA hidrolase mantiveram um alto percentual de sua atividade inicial após 8 dias de armazenamento em geladeira, como pode ser verificado nos resultados de consumo de 100 $\mu\text{M}$  de HOPDA mostrados na Figura 4.50.



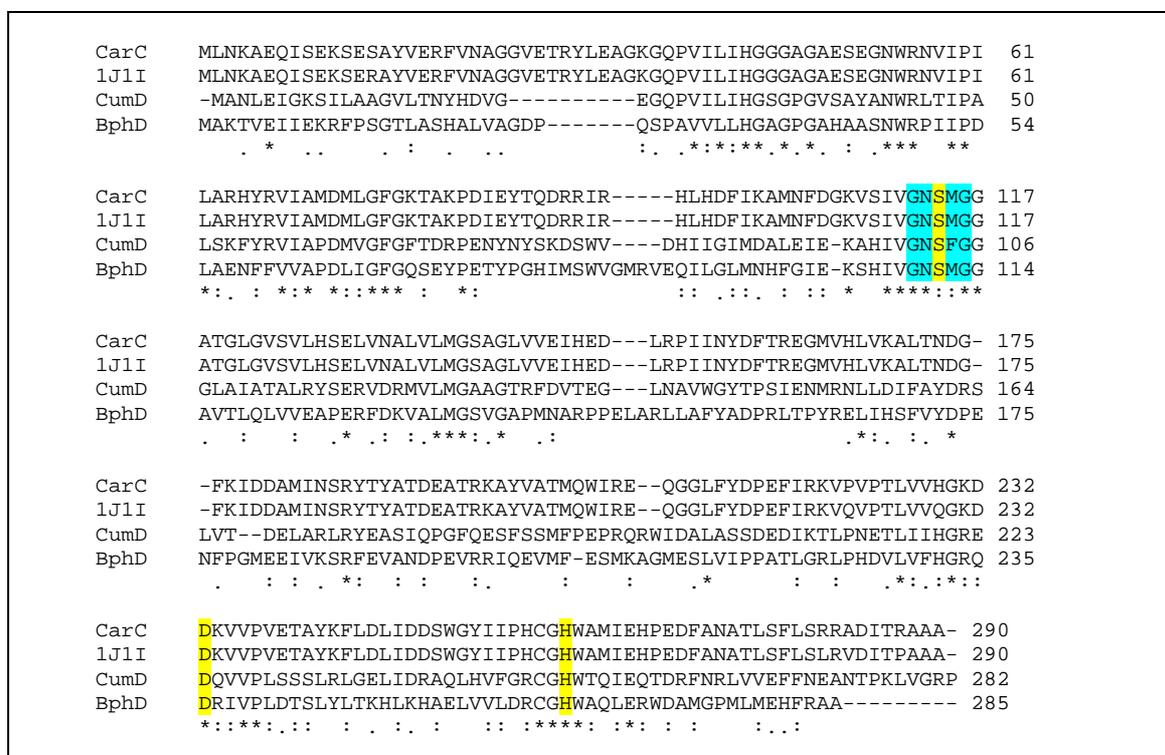
**Figura 4.50** Estabilidade das células recombinantes com expressão nativa (pDEST™14) da enzima CarC medidas pelo consumo de 100 $\mu\text{M}$  de HOPDA a 35°C empregando sistema de células íntegras em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5.

### Construção da estrutura 3-D de CarC

A enzima CarC apresenta enovelamento do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase (SATO *et al.*, 1997a, RIDDLE *et al.*, 2003b), cujo domínio catalítico é altamente conservado entre um grande número de enzimas, pertencentes à família das alfa/beta hidrolases, como hidrolases, aciltransferases, lipases, dehalogenases (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001).

A seqüência de CarC de *Pseudomonas* sp., de 290 aminoácidos, apresenta somente seis aminoácidos diferentes (97% de identidade) da seqüência da hidrolase de *Janthinobacterium* sp. J3, cuja estrutura do monômero (1IJI) foi determinada por HABA

*et al.* (2003). Além desta enzima, foram identificadas pelo programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1990) como homólogas à CarC outras estruturas de hidrolases de produtos de *meta*-clivagem de rotas de degradação de compostos aromáticos. As maiores similaridades de CarC foram verificadas com a hidrolase 2-hidroxi-6-oxo-7-metilocta-2,4-dienoato (CumD) de *Pseudomonas fluorescens* IP01 (FUSHINOBU *et al.*, 2002), da rota de degradação de isopropilbenzeno (cumeno) e com a estrutura BphD da 2-hidroxil-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolase de *Rhodococcus* sp. cepa RHA1, da rota de degradação de bifenil/policlorados (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). A seqüência de CarC apresenta 33% de identidade e 55% de similaridade com a seqüência de CumD e com BphD apresenta 28% de identidade e 47% de similaridade. Diferentemente de CarC e CumD, ativas como dímeros assimétricos, a enzima BphD é uma estrutura quaternária octamérica, formada de dois círculos planares com quatro monômeros cada (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). O alinhamento obtido entre as seqüências das quatro enzimas está apresentado na Figura 4.51. O alinhamento entre as seqüências de CarC de *Pseudomonas* sp e do monômero 11JI de *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003) foi empregado nos procedimentos de modelagem comparativa.

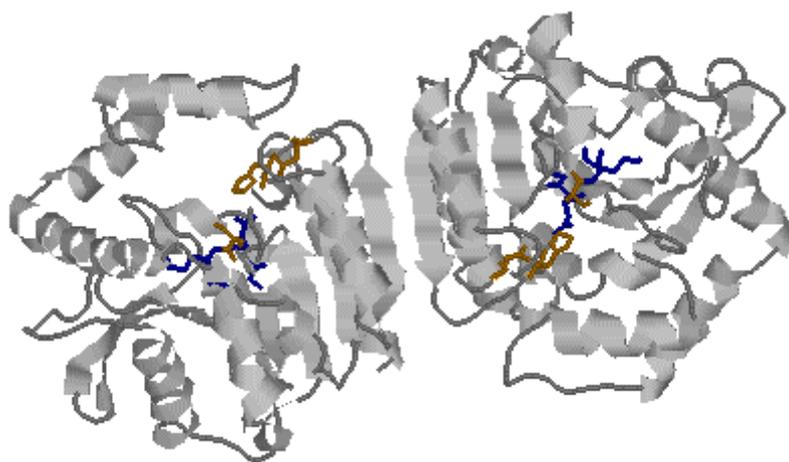


**Figura 4.51** Alinhamento múltiplo obtido pelo CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) entre as seqüências da CarC de *Pseudomonas* sp. e da estrutura 11JI de *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003) e as hidrolases CumD (FUSHINOBU *et al.*, 2002) e BphD

(NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). Os resíduos da tríade catalítica estão indicados em amarelo (para CarC são Ser114-Asp233-His261) e a cavidade nucleofílica (Gly-X-Ser-X-Gly) em azul. Aminoácidos idênticos são indicados por (\*); aminoácidos similares por (: ou (•); aminoácidos diferentes ( ), enquanto (-) indicam *gaps* adicionados às seqüências.

Pelo fato da seqüência de CarC de *Janthinobacterium* sp. empregada como molde ser praticamente idêntica à seqüência de *Pseudomonas* sp., o modelo obtido apresenta excelentes parâmetros estereoquímicos e energéticos: somente um resíduo (Ser114) em região não permitida do Gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963), com 93,2% nas regiões mais favoráveis (LASKOWSKI *et al.*, 1993); 100% dos resíduos do modelo tridimensional compatíveis com a seqüência de aminoácidos, de acordo com os resultados do programa VERIFY3D (LUTHY *et al.*, 1992); alto fator de qualidade global indicado pelo ERRAT (COLOVOS E YEATES, 1993); baixo percentual de resíduos com volumes incompatíveis (5,1%) analisados pelo programa PROVE (PONTIUS *et al.*, 1996); estrutura satisfatória a partir da análise de erros pelo WHAT-CHECK (HOOFT *et al.*, 1996).

Segundo as análises do cristal de CarC da cepa *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003), a estrutura  $\alpha/\beta$  hidrolase desta enzima apresenta maior similaridade com a estrutura da enzima homodimérica CumD (FUSHINOBU *et al.*, 2002), que degrada compostos do grupo monoalquilbenzeno, do que da estrutura octamérica da hidrolase BphD (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001), embora CarC e BphD degradem compostos do tipo bifênol. Resultados experimentais de CarC de *Pseudomonas* sp. LD2 confirmam que a proteína atua cataliticamente como um homodímero (RIDDLE *et al.*, 2003b). Desta forma, o homodímero de CarC de *Pseudomonas* sp. foi modelado sobrepondo o monômero obtido por homologia sobre as coordenadas espaciais do dímero da 2-hidroxi-6-oxo-7-metilocta-2,4-dienoato hidrolase de *Pseudomonas fluorescens* (FUSHINOBU *et al.*, 2002). A estrutura tridimensional obtida por homologia está apresentada na Figura 4.52. Como pode ser visualizado na estrutura do dímero, de acordo com a estrutura do molde (HABE *et al.*, 2003), a interação entre as duas cadeias se dá pela presença de folhas- $\beta$  antiparalelas nas duas.



**Figura 4.52** Modelo obtido para dímero de CarC por homologia, com indica o da cavidade nucleofílica Gly112-Asn113-Ser114-Met115-Gly116 das hidrolases (resíduos em azul) e os resíduos que formam a tríade catalítica (resíduos amarelos). O sítio ativo está localizado entre o núcleo e a tampa, onde fica a possível cavidade de liga o do substrato.

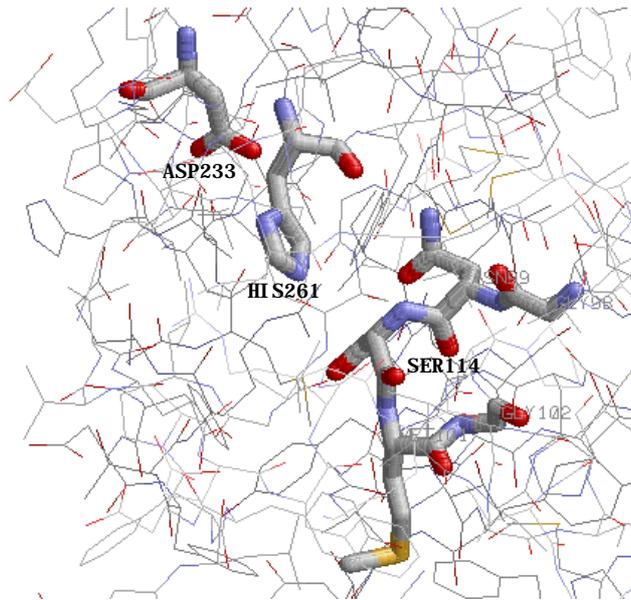
As estruturas de CarC de *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003), assim como as hidrolases dos produtos de *meta*-clivagem de *Pseudomonas fluorescens* (FUSHINOBU *et al.*, 2002) e de *Rhodococcus* sp. (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001) apresentam dois domínios: núcleo, formado pelos resíduos das regiões C e N terminais das proteínas, e tampa, formada pelos aminoácidos da região central. O núcleo apresenta um enovelamento canônico e conservado nas estruturas das  $\alpha/\beta$  hidrolases. Mesmo entre membros diferentes da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, que apresentam baixas identidades seq nciais entre aminoácidos, as estruturas dos núcleos destas enzimas apresentam significativa similaridade e boa uma sobreposi o. Já a tampa apresenta significativa diversidade entre estas enzimas (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). A conexão entre os dois domínios é feita por alças flexíveis e a tampa das hidrolases, composta por quatro  $\alpha$ -hélices, está localizada acima do núcleo (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001).

O sítio catalítico do modelo obtido por homologia (Figura 4.52) encontra-se em um domínio interno da proteína, mas localizado em uma região exposta, de interface. Estes resultados permitem identificar facilmente a separa o dos domínios núcleo e tampa descritos para as hidrolases (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001, FUSHINOBU *et al.*, 2002, HABE *et al.*, 2003).

A tríade catalítica do modelo da hidrolase e da estrutura cristalográfica de *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003) é formada por Ser114, Asp233 e His261, com a ocorrência de uma ligação hidrogênio entre o aspartato e a histidina, calculada no Swiss-PDBViewer (GUEX E PEITSCH, 1997), similar ao que ocorre na estrutura de CumD (FUSHINOBU *et al.*, 2002). A participação de Ser114 na atividade catalítica da enzima foi confirmada experimentalmente por RIDDLE *et al.* (2003b) como sendo o resíduo nucleofílico que promove o ataque nucleofílico que inicia a reação de hidrólise, cujo motivo conservado é formado pela cavidade Gly-X-Ser-X-Gly (SATO *et al.*, 1997a, RIDDLE *et al.*, 2003b).

O resíduo nucleofílico que compõe o sítio catalítico desta enzima (Ser110) encontra-se em uma região de ângulos desfavoráveis no gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). Isto ocorre porque este resíduo está presente em uma volta, resultando em uma conformação tensionada deste resíduo, que forma uma estrutura chamada de cavidade nucleofílica, bastante conservada em todas as  $\alpha/\beta$  hidrolases (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). O mesmo ocorre com a Ser114 de CarC da cepa J3 e, conseqüentemente, com o mesmo resíduo do modelo para CarC de *Pseudomonas* sp. Os resíduos His43 e Gly44 de CarC, equivalentes a His35 e Gly36 de BphD (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001), são também altamente conservados entre as  $\alpha/\beta$  hidrolases e podem estar envolvidos na formação do buraco do oxianion, uma vez que o mecanismo catalítico parece ser similar entre as enzimas desta família.

A disposição espacial da tríade catalítica do modelo obtido para CarC por homologia (Ser114, localizada na cavidade nucleofílica, Asp233 e His261) é apresentada na Figura 4.53. O sítio ativo é idêntico ao da enzima CarC *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003).



**Figura 4.53** Tríade catalítica do modelo obtido para CarC de *Pseudomonas* sp. por comparação, formada por Ser114 (presente em uma volta em conformação tensionada na cavidade nucleofílica), Asp233 e His261. Os átomos dos aminoácidos do representam: C (cinza), N (azul), S (amarelo) e O (vermelho).

O sítio ativo de CarC (Ser114, Asp233 e His261) se encontra em uma cavidade situada entre o núcleo da cadeia protéica e a tampa, permitindo o acesso do substrato. De forma similar ao que é descrito para a enzima BphD (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001) e CumD (FUSHINOBU *et al.*, 2002), para CarC pode ser verificada a ocorrência de uma cavidade tubular entre os dois domínios que deve formar o sítio de ligação do substrato, de largura suficiente para acomodar o substrato. Nas lipases, a tampa pode adotar duas conformações, aberta e fechada, para acomodar substratos grandes. A tampa da enzima BphD não pode adotar uma posição aberta, pois está envolvida na interação com as subunidades adjacentes da estrutura octamérica e, desta forma, o tamanho do substrato não pode exceder a largura do sítio de ligação (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001). Nas estruturas de CumD e CarC a região da tampa está livre para adotar estas conformações, pois não interage com a outra subunidade dos dímeros. Entretanto, estas conformações não foram discutidas na literatura (FUSHINOBU *et al.*, 2002, HABE *et al.*, 2003).

A observação da existência de resíduos bem conservados no fundo e nas paredes (do núcleo) da cavidade de ligação do substrato (mesmo entre as enzimas com 30% de identidade seqüencial), sugere que estas partes estejam envolvidas nas interações

específicas com o substrato. Já os resíduos da tampa exibem significativa diversidade entre as hidrolases dos produtos de *meta*-clivagem, sugerindo que não estão envolvidos nas interações com os substratos (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001).

Para as hidrolases CarC de *Janthinobacterium* sp. J3 (HABE *et al.*, 2003), CumD de *Pseudomonas fluorescens* (FUSHINOBU *et al.*, 2002) e BphD de *Rhodococcus* sp. (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001), foi observado que este sítio é dividido em duas partes na posição da serina que compõe o sítio ativo: proximal (P) e distal (D) em relação à entrada do sítio. A parte P apresenta alguns resíduos polares conservados nas três enzimas que podem fazer interações eletrostáticas com as partes hidrofílicas dos substratos. Já a região D de BphD (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001) é formada basicamente por resíduos hidrofóbicos e, em contraste, esta região de CarC encontra-se exposta ao solvente devido à conformação da tampa (HABE *et al.*, 2003).

## **5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS**

A degradação de carbazol e seus derivados dibenzopirróis, comumente presentes em combustíveis fósseis e associados a sérios problemas ambientais na sua combustão, como a geração e emissão de óxidos do tipo NO<sub>x</sub>, envolvidos na formação de chuvas ácidas e na destruição da camada de ozônio (BENEDIK *et al.*, 1998), tem sido pesquisada, em particular desde a última década, devido à necessidade de redução destas emissões apontadas pelo Protocolo de Kyoto (HOPKIN, 2005). Além disso, estes compostos nitrogenados aromáticos, presentes nos óleos brasileiros, afetam economicamente o processo de refino, pois atuam como "venenos" dos catalisadores de craqueamento, inibidores da hidrodessulfuração e alteram a qualidade dos derivados de petróleo. Atualmente, a retirada de N e S é feita por processos de hidrotreatamento, que utilizam altas pressões e temperaturas e afetam outros constituintes do petróleo. Estes problemas podem ser contornados pelo acoplamento de rotas metabólicas de biodegradação, devido à seletividade e condições brandas (BENEDIK *et al.*, 1998).

As pesquisas atualmente realizadas na área de biorrefino empregam microorganismos com rotas de degradação destrutiva de carbazol, o que pode provocar perda no poder combustível do petróleo, devido ao consumo de carbono e nitrogênio para o crescimento das bactérias (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, HISATSUKA E SATO, 1994, GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, KIRIMURA *et al.*, 1999, SCHNEIDER *et al.*, 2000, HABE *et al.*, 2002). Uma das alternativas é o isolamento e identificação de cepas com rotas não destrutivas, similares às empregadas em biodessulfuração. Outra alternativa que tem sido estudada é a utilização de microorganismos geneticamente modificados com parte dos genes da rota, que sejam capazes de consumir parcialmente o carbazol, retirando o N e mantendo o esqueleto de carbono. A aplicação da tecnologia de DNA recombinante ao sistema, com a clonagem das enzimas da rota de degradação de carbazol permite o aumento da concentração pelo enriquecimento do extrato protéico nas proteínas recombinantes e o controle dos níveis de expressão, o que é indispensável para obter maiores quantidades destes biocatalisadores para aplicações biotecnológicas na degradação de compostos contendo nitrogênio. Além disso, devido à capacidade de enriquecer o extrato protéico

nas proteínas desejadas, os sistemas recombinantes permitem a obtenção de maiores quantidades de proteínas em relação aos sistemas selvagens. Esta característica pode permitir um aumento nas taxas de degradação, uma vez que o crescimento das bactérias atualmente utilizadas é bastante lento, limitando seu emprego em biorrefino (RIDDLE *et al.*, 2003a).

### **Sistema recombinante para avaliar biodegradação de carbazol**

Com o objetivo de obter cepas recombinantes capazes de degradar carbazol, os genes que formam o operon *car* (que codificam os três complexos enzimáticos responsáveis pela degradação de carbazol a ácido antranílico: carbazol dioxigenase, CarA, dioxigenase de *meta*-clivagem, CarB, e HOADA hidrolase, CarC) da bactéria *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258/INCQS 00520, capaz de degradar carbazol como única fonte de carbono e nitrogênio (HISATSUKA E SATO, 1994, LARENTIS, 2003), foram clonados separadamente empregando sistema de recombinação sítio-específica. A análise destes genes por ferramentas de bioinformática permitiu o desenho de oligos específicos para sua amplificação pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir da extração de DNA de alto peso da cepa *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 (HISATSUKA E SATO, 1994), empregando a enzima DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus*, com capacidade de correção 3'-5'. Através da técnica de PCR foi possível obter fragmentos de aproximadamente 1100pb (*carAa*), 1000pb (*carBaBb*), 870bp (*carC*) e 1700bp (*carAcORF7carAd*), de acordo com os tamanhos esperados pelas análises dos genes do operon *car* depositados nos bancos de dados (LARENTIS *et al.*, 2003c, LARENTIS *et al.*, 2004c).

A eficiência da clonagem foi confirmada pelas técnicas de PCR, digestão com enzimas de restrição para identificação dos tamanhos dos plasmídeos e seqüenciamento. A estratégia de clonagem em duas etapas empregando sistema de recombinação sítio-específica (HARTLEY *et al.*, 2000) auxiliado pelo uso da enzima topoisomerase (HEYMAN *et al.*, 1999) para a ligação dos genes amplificados por PCR aos vetores de clonagem, no lugar do uso de enzimas de restrição e ligase, mostrou-se simples, rápida e de alta fidelidade. A ligação dos produtos de PCR nos vetores pENTR empregando a enzima topoisomerase resultou entre 20 e 60% de clones positivos, enquanto a reação LR de recombinação sítio-específica para produção de pDEST apresentou 100% das

colônias positivas, comprovando a alta especificidade destas enzimas descritas na literatura (HARTLEY *et al.*, 2000, LARENTIS *et al.*, 2003c, LARENTIS *et al.*, 2004c). Além disso, é um sistema versátil que pode ser empregado na transferência do gene clonado para diferentes hospedeiros e vetores de expressão, incluindo sistemas extremofílicos, que podem ser uma alternativa na obtenção de enzimas resistentes a condições extremas de temperatura, pressão, solventes e pH, o que é estratégico no desenvolvimento de processos de biorrefino e biorremediação (PARK *et al.*, 2004, LARENTIS *et al.*, 2005a).

Embora o ácido antranílico ainda contenha nitrogênio, além deste composto apresentar menor afinidade pelos sítios ácidos dos catalisadores de refino, reduzindo sua desativação, o sistema permite inferir sobre a potencialidade do emprego das técnicas de DNA recombinante e do desenvolvimento de uma estratégia para a remoção do heteroátomo (RIDDLE *et al.*, 2003a).

### **Expressão das enzimas ativas no sistema recombinante**

As enzimas clonadas foram superexpressas em *Escherichia coli* BL21-SI (BHANDARI E GOWRISHANKAR, 1997), que emprega NaCl como indutor do promotor T7 para superexpressão de proteínas em *Escherichia coli*, e é deficiente em proteases, para minimizar a degradação de proteínas heterólogas. Os níveis de expressão verificados para os plasmídeos construídos por recombinação sítio-específica e induzidos com sal foram similares aos obtidos empregando os sistemas clássicos de clonagem em vetores pUC induzidos por IPTG (IWATA *et al.*, 2003, LARENTIS *et al.*, 2004d, LARENTIS *et al.*, 2004e, LARENTIS *et al.*, 2005a, LARENTIS *et al.*, 2005b), com custos bastante inferiores em relação a este composto.

As enzimas da rota de degradação de carbazol de *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 31258) clonadas por recombinação sítio-específica e expressas em *Escherichia coli* foram caracterizadas por medidas de atividade e por modelagem por homologia, que auxiliaram no entendimento do mecanismo de atuação de cada uma das enzimas e da rota. O emprego de células íntegras (sistema de *resting cells*) como catalisador (MONTICELLO, 1998) foi confirmado como uma técnica segura e promissora, uma vez que os compostos da rota são capazes de atravessar a membrana celular e os cofatores são supridos pelo meio, sem a necessidade de reposição, tornando-o mais

simples, menos custoso e facilitando a recuperação das células. Estes resultados corroboram dados de SATO *et al.* (1997a), NOJIRI *et al.* (1999) e NAKAGAWA *et al.* (2002), que empregaram sistemas de *resting cells* com outras bactérias capazes de degradar compostos da rota de carbazol.

O emprego de *Escherichia coli* como sistema de expressão mostrou-se bastante adequado, uma vez que muitos estudos têm sido feitos para melhorar seu desempenho e a versatilidade como hospedeiro heterólogo, visando desenvolver estratégias para contornar algumas dificuldades relacionadas à produção de proteínas recombinantes biologicamente funcionais, ativas e solúveis em larga escala (WALL E PLÜCKTHUN, 1995, KURLAND E GALLANT, 1996, MAKRIDES, 1996, WEICKERT *et al.*, 1996, BHANDARI E GOWRISHANKAR, 1997, LILIE *et al.*, 1998, BANEYX, 1999).

Foram testados sistemas de células íntegras em altas concentrações (*resting cells*) e extrato celular (células rompidas) na avaliação da degradação de carbazol empregando as cepas recombinantes *Escherichia coli* BL21-SI com CarA, CarB e CarC. A atividade das enzimas foi confirmada empregando sistemas *in vitro*, com os devidos cofatores, e empregando células íntegras como catalisador (*resting cells*). Os resultados de atividade foram comparáveis aos apresentados na literatura para a dioxigenase de *meta*-clivagem recombinante (Tabela 2.2) de *Pseudomonas* sp. CA10 (SATO *et al.*, 1997a, IWATA *et al.*, 2003), *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp. LD2 (GIBBS *et al.*, 2003), *Sphingomonas* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998) e para HOADA hidrolase (Tabela 2.3) de *Pseudomonas* sp. CA10 (SATO *et al.*, 1997a, NOJIRI *et al.*, 2003, HABE *et al.*, 2003), de *Pseudomonas* sp. LD2 (RIDDLE *et al.*, 2003b) e de *Janthinobacterium* sp. cepa J3 (HABE *et al.*, 2003). Para CarAa os resultados obtidos, embora ainda incipientes, dão indícios de que esta etapa seja a mais lenta da reação, corroborando alguns resultados da literatura (RIDDLE *et al.*, 2003a).

A degradação de 120µM (20ppm) de carbazol por CarA foi confirmada por cromatografia gasosa empregando extratos totais das cepas expressando as subunidades CarAa e CarAc/CarAd por 15h a 30°C em Tris-HCl 50mM pH7,5, com a adição de cofatores NADH, FAD, sulfato ferroso amoniacal como fonte de Fe(II) e ácido ascórbico como agente redutor, além de Tween 20. Para CarB foi obtida uma taxa de 0,53 (µmoles.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e para CarC de 1,09 (µmoles.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), medidos a 35°C em Tris-HCl 50mM (pH 7,5), respectivamente, pela produção e consumo do composto amarelo HOPDA a partir de 100µM do substrato de cada reação,

em células íntegras (*resting cells*) (LARENTIS *et al.*, 2005b). A enzima CarC apresentou atividade tanto em células íntegras quanto em extrato celular (células rompidas por sonicação), enquanto a enzima CarB apresentou atividade para extrato celular somente após a adição de cofatores (sulfato ferroso amoniacal como fonte de Fe(II) e ácido ascórbico como agente redutor). Isto indicou que CarB requer o emprego de cofatores, e neste caso o sistema de emprego de células íntegras como catalisador é o mais eficiente, mais simples e menos dispendioso. CarC não apresentou a necessidade de cofatores, mas ainda assim o sistema de *resting cells* mostrou-se promissor por facilitar o processo principalmente para a recuperação das células e do produto que é transportado através da membrana celular. Os resultados de taxas obtidos são promissores para emprego na degradação de carbazol e derivados (LARENTIS *et al.*, 2005b). As taxas específicas para células íntegras, obtidas em função dos resultados de peso seco (1,25mg célula seca/mL de meio saturado), foram na ordem de 0,5 ( $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg cel. seca}^{-1}$ ) para cada etapa, comparativamente superiores às taxas (8-10  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g cel. seca}$ ) obtidas para conversão a ácido antranílico por *resting cells* cepas *Sphingomonas* sp. GTIN11 e CDH-7 (KILBANE II *et al.*, 2002). Ainda, uma parte considerável da expressão de CarAa ocorreu sob a forma de corpos de inclusão, apesar do emprego da cepa BL21-SI, enquanto para CarB foi possível purificar a enzima expressa com cauda de histidina empregando somente a fração solúvel.

### **Planejamento experimental para otimização de expressão de proteínas**

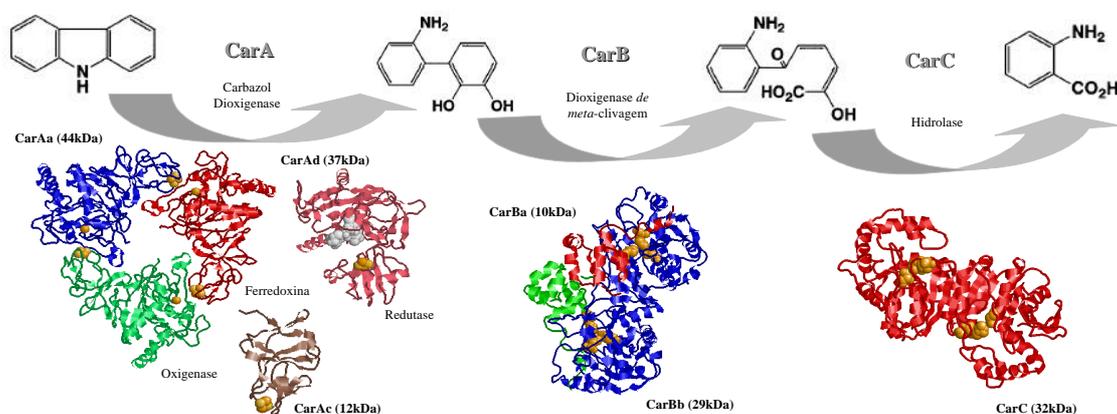
Para a carbazol dioxigenase, houve a necessidade de otimização das condições de expressão. A influência de algumas variáveis importantes (temperatura, tempo e concentração celular) na indução com sal das componentes da carbazol dioxigenase (CarAa, CarAc, CarAd) foi analisada empregando planejamento experimental a dois níveis (BOX E DRAPER, 1987), buscando a otimização da expressão destas proteínas. Foi verificado que cada uma das subunidades da CarA apresenta uma resposta diferente para cada uma das variáveis analisadas (LARENTIS *et al.*, 2005c) e grande sensibilidade das subunidades de CarA às condições de indução, uma vez que em algumas destas condições não foi verificada expressão nem atividade sobre a degradação de carbazol. Já CarB e CarC mostraram-se menos sensíveis às condições de expressão, sendo verificada degradação de 2,3-DHBP e HOPDA em crescimento concomitante com a indução das enzimas por sal em BL21-SI.

O planejamento experimental fatorial mostrou-se uma valiosa ferramenta na análise das variáveis de indução envolvidas na expressão das componentes recombinantes da carbazol dioxigenase e na determinação de condições otimizadas. As técnicas de planejamento experimental estão bastante consolidadas na área de processos, inclusive biotecnológicos, para análise de efeitos de variáveis e otimização das condições de processo. Entretanto, na área de biologia molecular verificam-se poucos trabalhos em que a metodologia de planejamento experimental é empregada na expressão heteróloga de proteínas recombinantes, em particular em *Escherichia coli*. O mais usual é a avaliação dos efeitos de cada variável separadamente (MADURAWA *et al.*, 2000, GUPTA *et al.*, 2001), o que pode levar a interpretações errôneas dos dados obtidos, pois não são considerados efeitos de interação entre as variáveis analisadas, não permitindo uma análise do processo global (como a busca de sua otimização), além de usualmente exigir um número maior de experimentos para alcançar as mesmas conclusões obtidas com o planejamento fatorial. No caso do estudo de expressão de proteínas heterólogas, as técnicas de planejamento experimental podem ser muito úteis na otimização do processo, visando às melhores condições para obtenção de proteínas funcionais na maior quantidade possível. Além disso, o emprego destas técnicas, buscando maior integração entre ferramentas usuais de áreas distintas, permite um conhecimento maior das variáveis que influenciam a expressão de proteínas. As mais relevantes, particularmente na expressão das enzimas da rota de degradação de carbazol (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b, OUCHIYAMA *et al.*, 1998, NAM *et al.*, 2002b, RIDDLE *et al.*, 2003b), são temperatura, pH, diferentes meios de cultivo (meio rico, meio mínimo, razão C/N), concentração de antibiótico (que confere pressão seletiva devido ao gene de resistência presente no plasmídeo), aeração e condições de indução (temperatura, tempo, concentração celular, concentração do indutor).

### **Modelagem estrutural das enzimas por homologia**

Para auxiliar no entendimento do mecanismo das reações envolvidas na degradação de carbazol, foram construídos modelos estruturais por modelagem comparativa para a proteína  $\alpha_3$ -homotrimérica CarAa (SATO *et al.*, 1997b, LARENTIS *et al.*, 2003a, LARENTIS *et al.*, 2004f) e os monômeros CarAc e CarAd (SATO *et al.*,

1997b, LARENTIS *et al.*, 2003b), assim como para o  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrâmero CarB (SATO *et al.*, 1997a, IWATA *et al.*, 2003, LARENTIS *et al.*, 2005d) e homodímero CarC (SATO *et al.*, 1997a, NOJIRI *et al.*, 2003, HABE *et al.*, 2003).



**Figura 5.1** Modelos por homologia das enzimas da rota de degradação de carbazol a ácido antranílico, cujos genes (operon *car*) de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 foram clonados por recombinação sítio-específica e expressos em *Escherichia coli* (LARENTIS *et al.*, 2004e).

O modelo do trímero de CarAa (LARENTIS *et al.*, 2003a, LARENTIS *et al.*, 2004f) e das demais subunidades, CarAc e CarAd, foram empregados em uma avaliação prévia de como se dá a formação do complexo enzimático da carbazol dioxigenase (LARENTIS *et al.*, 2003b, LARENTIS *et al.*, 2004a). Entretanto, não foi possível determinar como se dá a interação entre elas a partir da análise da superfície eletrostática dos modelos (LARENTIS *et al.*, 2003b). Ainda estão em andamento as análises de como ocorre a formação do complexo enzimático para a transferência de elétrons necessária à atividade enzimática e uma das perspectivas é a utilização da técnica molecular de duplo híbrido para determinar experimentalmente quais subunidades interagem para posterior emprego de técnicas de ancoramento (*docking*) *in silico* para a caracterização de possíveis regiões de ligação dos modelos tridimensionais.

O modelo heterotetramérico obtido para CarB permitiu inferir sobre a forma do sítio de ligação do substrato e validou o sítio ativo da enzima, formado por Fe(II) (LARENTIS *et al.*, 2004b), explicando os resultados experimentais de perda de atividade enzimática com extrato celular pela oxidação do metal e retorno de sua atividade com a adição dos cofatores (sulfato ferroso amoniacal e ácido ascórbico),

assim como seu comportamento frente a diferentes substratos (LARENTIS *et al.*, 2005d).

O conhecimento destas enzimas, seu funcionamento e seletividade quanto a diferentes compostos nitrogenados, é essencial para o desenvolvimento de biocatalisadores para biorrefino e/ou biorremediação de petróleo. Por isso, a caracterização estrutural das subunidades protéicas que formam os complexos enzimáticos da rota de degradação do carbazol e de seus sítios catalíticos é uma ferramenta potencial para entender o mecanismo das reações, uma vez que somente as estruturas de CarC (HABE *et al.*, 2003) e da componente CarAc (NAM *et al.*, 2005) são conhecidas. Estas estruturas foram empregadas para confirmar a validade da metodologia de modelagem por homologia empregada (LARENTIS *et al.*, 2004d). A modelagem de proteínas por homologia ou comparação é o método de maior acurácia de predição de estruturas tridimensionais. A acurácia global do método de modelagem comparativa é bastante variável, indo dos modelos de baixa resolução, nos quais geralmente apenas o enovelamento está correto, até os modelos de resolução comparáveis às das estruturas determinadas experimentalmente (MARTÍ-RENOM *et al.*, 2000). Porém, mesmo os modelos de baixa resolução, que algumas vezes apresentam resultados errôneos, podem ser muito úteis em estudos biológicos. Em geral, estes modelos apresentam informações suficientes e essenciais sobre o arranjo espacial de importantes resíduos e são capazes de auxiliar no entendimento estrutural da proteína e conseqüentemente, podem fornecer valiosas indicações do seu funcionamento experimental (PEITSCH, 1995, PEITSCH, 1996, MARTÍ-RENOM *et al.*, 2000).

### **Perspectivas na área de biodesnitrogenação**

A partir dos resultados de modelagem estrutural, que permitem inferir sobre os sítios ativos e de ligação dos substratos de cada uma das enzimas, pode-se empregar técnicas de biologia molecular para buscar enzimas capazes de degradar uma gama de substratos, com alta especificidade e altas taxas de atividade de degradação, e estáveis em condições temperatura, pressão, solventes e pH, empregadas nos processos de biorrefino e biorremediação. As técnicas de mutagênese ou evolução sítio-dirigida e de “DNA shuffling” podem ser empregadas tanto no melhoramento das enzimas quanto no desenvolvimento de novas enzimas híbridas ou quimeras, a partir de diferentes genes,

que apresentem as características necessárias para as aplicações industriais (McFARLAND, 1999, MONTICELLO, 2000, DALBY, 2003). Estas técnicas foram empregadas para modificar as características do gene *dszC*, que codifica a enzima dibenzotiofeno monooxigenase, que catalisa a primeira e limitante etapa na degradação de DBT pela rota 4S (COCO *et al.*, 2001, ACERO, sem data), levando ao aumento nas taxas de dessulfuração. As taxas de degradação, mesmo com aumento para os sistemas recombinantes e empregando altas densidades celulares, ainda são o principal problema para empregar microorganismos em sistemas industriais de dessulfuração e desnitração. MONTICELLO (2000) discute que são necessárias taxas sustentáveis bastante superiores às apresentadas pelas cepas atualmente estudadas, acima de 20  $\mu$ moles de produto de degradação/min/g de catalisador. Para efeitos de comparação, as taxas específicas obtidas para a dessulfuração de DBT empregando cepas recombinantes obtidas pela clonagem dos genes da rota 4S de *Rhodococcus* foi de 4,7 ( $\mu$ moles 2-HBP/min/g células secas) (KILBANE II, 2004) e, para cepas de *Rhodococcus* não modificadas geneticamente, de 0,1-0,5 ( $\mu$ moles 2-HBP/min/g células secas) (McFARLAND, 1999). Por estas características, o processo de dessulfuração já testado comercialmente emprega como etapa inicial a hidrodessulfuração (HDS) das frações destiladas de petróleo para reduzir a quantidade de enxofre, seguido da biodessulfuração (BDS) para retirar o enxofre restante, chegando a 50ppm ou menos (MONTICELLO, 1994, MONTICELLO, 1998, LANGE E PACHECO, 1999, KILBANE II, 2004). Desta forma, a complementação entre os dois processos pode ser visualizada como uma alternativa viável na aplicação de biodesnitração.

Para que o sistema desenvolvido seja promissor em termos de aplicação em biorrefino, deve ser testada a degradação de carbazol a ácido antranílico empregando as células recombinantes obtidas, a degradação de diferentes substratos, assim como clonar o operon *car* completo em um único plasmídeo. Isto pode ser feito a partir da amplificação de todos os genes, de cerca de 6kb, empregando os oligos já desenhados e uma enzima capaz de copiar genes mais longos, que ainda não foi bem sucedida. A caracterização quantitativa deste sistema permitirá avaliá-lo e comparar as taxas de crescimento e de degradação de carbazol com cepas selvagens já caracterizadas, indicando seu potencial biotecnológico nas aplicações de biorrefino. Neste sentido, os resultados preliminares do emprego das cepas recombinantes (LARENTIS *et al.*, 2005a, LARENTIS *et al.*, 2005d) são promissores e corroboram alguns outros relatados na

literatura (RIDDLE *et al.*, 2003a, LI *et al.*, 2004), principalmente para biodessulfuração (LANGE E PACHECO, 1999).

Além de explorar as características genéticas dos hospedeiros empregados na superexpressão de proteínas recombinantes, como o desenvolvimento de diferentes promotores para indução de *Escherichia coli* (MAKRIDES, 1996, HANNING E MAKRIDES, 1998), inclusive por temperatura (SEEGER *et al.*, 1995, SCHMIDT *et al.*, 1999), as condições e estratégias de processo são essenciais para melhorar o rendimento na produção das mesmas (WATERS E NEUJAHR, 1994). Como a maioria das proteínas heterólogas localiza-se intracelularmente na bactéria recombinante, a produtividade é proporcional à densidade celular final e à produtividade específica (LEE, 1996). Por isso, uma das formas de aumentar a quantidade de proteína produzida é o cultivo da bactéria em altas densidades celulares pela redução dos efeitos indesejáveis que possam ocorrer, como inibição por substrato, limitação da capacidade de transferência de oxigênio ou formação de metabólitos que inibam seu crescimento (WATERS E NEUJAHR, 1994, KORZ *et al.*, 1995, SEEGER *et al.*, 1995, KWON *et al.*, 1996, LEE, 1996, WANG E LEE, 1997, MADURAWA *et al.*, 2000, GUPTA *et al.*, 2001). Desta forma, é descrito na literatura que a estratégia de alimentação (LEE, 1996), de aeração (WATERS E NEUJAHR, 1994, KORZ *et al.*, 1995, LEE, 1996, BHATTACHARYA E DUBEY, 1997, GOMBERT E KILIKIAN, 1998, ALBA E CALVO, 2000, GUPTA *et al.*, 2001), a composição do meio e fontes de carbono na alimentação (WATERS E NEUJAHR, 1994, KORZ *et al.*, 1995, LEE, 1996, WANG E LEE, 1997, MADURAWA *et al.*, 2000, GUPTA *et al.*, 2001, FUCHS *et al.*, 2002), temperatura (LEE, 1996, GUPTA *et al.*, 2001), concentração dos antibióticos (GUPTA *et al.*, 2001) influenciam no cultivo de *Escherichia coli* em altas densidades celulares, uma vez que permitem controlar o metabolismo celular e evitar a formação de produtos indesejáveis, além de controlar e/ou evitar a agregação das proteínas expressas em corpos de inclusão insolúveis (BANEYX, 1999). Estas variáveis devem ser levadas em conta na otimização de processo de produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico. O aumento de escala da expressão das enzimas recombinantes de degradação de carbazol, mediante cultivos de *Escherichia coli* em altas densidades celulares (LEE, 1996) pode melhorar as taxas significativamente, empregando técnicas de bioprocessos, como planejamento experimental, estratégias de operação de biorreatores, modelagem, estimação de parâmetros e otimização e estudos cinéticos. A

avaliação cinética da produção das enzimas recombinantes em biorreatores, com estudos de aeração para cultivo de altas densidades celulares e determinação das condições ótimas de processo por planejamento podem melhorar significativamente sua expressão, levando, conseqüentemente, ao aumento nas taxas de degradação.

Além disso, a partir dos resultados experimentais que permitiram inferir sobre a etapa mais lenta da reação, estudos de modelagem enzimática de cada etapa da rota podem auxiliar na avaliação das velocidades de cada uma das etapas da reação e buscar determinar a quantidade de enzima necessária em cada etapa para uma otimização do processo (LARENTIS, 2003). Em última instância, a modelagem pode auxiliar a determinar uma possível necessidade de clonagem de um maior número de cópias do gene que codifica determinada enzima mais lenta.

O sistema recombinante de degradação de carbazol também deve ser testado enzimaticamente em sistema com fase líquida não aquosa (óleo-água), com exploração dos efeitos de razão fase orgânica/fase aquosa, e diferentes meios e solventes (KIRIMURA *et al.*, 1999, RIDDLE *et al.*, 2003a, LI *et al.*, 2004), visando à avaliação na degradação de carbazol em frações de petróleo. Resultados de biodessulfuração de DBT (LANGE E PACHECO, 1999, McFARLAND, 1999), assim como de degradação de carbazol (LI *et al.*, 2004), empregando sistemas de duas fases (solvente e água) indicam que são obtidas taxas maiores nestas condições de processo em comparação com sistemas aquosos. No caso de uso de *Escherichia coli* recombinante nos processos de degradação de carbazol empregando solventes em sistemas bifásicos, há poucos resultados na literatura que permitam inferir previamente sobre o efeito de sua toxicidade sobre a bactéria: cepas clonadas com os genes de *carABC* de *Pseudomonas* sp. LD2 não foram ativas em presença de xileno, mas foram capazes de degradar carbazol solubilizado em diesel de forma similar às cepas de *Pseudomonas putida* recombinantes (RIDDLE *et al.*, 2003a). Uma alternativa de hospedeiro seria o uso nas próprias cepas *Pseudomonas* (SCHWEIZER, 2001, RIDDLE *et al.*, 2003a), que apresentam interação com a fase orgânica, embora além de serem sistemas recombinantes menos usados, podem degradar todo o esqueleto de carbono do carbazol.

Com a confirmação do aumento nas taxas de degradação de carbazol empregando sistemas recombinantes, abre-se a perspectiva de investir na retirada do heteroátomo de nitrogênio, viabilizando a expressão heteróloga de uma enzima capaz de degradar ácido antranílico sem consumir o esqueleto de carbono da molécula, como AntABC,

responsável pela dioxigenação que converte ácido antranílico em catecol, que não foi bem sucedida pela técnica clássica de clonagem (NOJIRI *et al.*, 2001a). Outros tipos de enzimas que podem estar presentes em diferentes microorganismos, capazes de retirar seletivamente o átomo de nitrogênio em uma das etapas da degradação de carbazol, podem ser empregadas no desenvolvimento de novas rotas biotecnológicas ou na utilização de técnicas como engenharia metabólica no desenvolvimento destas enzimas. Um exemplo é apresentado por KILBANE II (2004), que discute a degradação de carbazol sob esta perspectiva, com o emprego de uma deaminase ou amidase capaz de clivar a ligação C-N após a primeira etapa da conversão de carbazol por dioxigenação, com liberação de amônia e manutenção do esqueleto de carbono da molécula de carbazol. A obtenção de uma enzima com estas características pode auxiliar no desenvolvimento de processos de biodesnitrificação de petróleo (BDN).

Além disto, o descobrimento de novos microorganismos, como aqueles pertencentes ao domínio Archaea, que são microorganismos em sua maioria extremófilos e possuem enzimas capazes de tolerar condições extremas de temperatura, pressão, pH, sais, solventes (CARDOSO *et al.*, 2003), capazes de degradar estes compostos nitrogenados, também é de grande interesse biotecnológico. Entretanto, dos organismos deste domínio conhecidos até o presente, há somente evidências de que tenham capacidade de degradar compostos com enxofre, como é o caso da degradação de DBT (ISHII *et al.*, 2000, FURUYA *et al.*, 2001). Uma estratégia de clonagem promissora, visto que não foram encontradas proteínas homólogas às enzimas de degradação de carbazol em microorganismos termofílicos (LARENTIS, 2003), seria a expressão destas enzimas mesófilas em hospedeiros extremófilos. Uma possível expressão destes genes em hospedeiros termofílicos pode resultar em aumento da temperatura ótima das enzimas. Este enfoque foi tentado inicialmente pelo grupo de pesquisa de Kilbane II (PARK *et al.*, 2004), que expressaram as duas componentes da enzima CarBaBb de *Sphingomonas* sp. GTIN11 no microorganismo termofílico *Thermus thermophilus*. Apesar de promissora, a expressão heteróloga de genes em sistemas termófilos é incipiente e muitos outros estudos ainda são necessários para melhorar os níveis de expressão. O sistema de clonagem por recombinação sítio-específica foi escolhido por apresentar versatilidade, alta eficiência e fidelidade, independente do vetor ou hospedeiro empregado (HARTLEY *et al.*, 2000), podendo ser visualizado como um sistema de clonagem para expressão em termofílicos.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### **6.1 Degradação de compostos aromáticos**

- ACERO, J. R., s.d., *Development of DBT-Monooxygenase Mutants by Directed Evolution for Organic Sulfur Removal*. ECOPETROL-Instituto Colombiano del Petróleo.
- BALAMURALI, R., RAJENDRA PRASAD, K.J., 2001, "Synthesis, characterization and pharmacological activities of 5,6,11,12-tetrahydroindolo[2,3-*a*]carbazole derivatives", *Il Farmaco*, v. 56, pp. 229–232.
- BENEDIK, M. J., GIBBS, P. R., RIDDLE, R. R., WILLSON, R. C., 1998, "Microbial denitrogenation of fossil fuels", *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, pp. 390-395.
- BIER, O., 1978, *Bacteriologia e Imunologia*. 19<sup>a</sup> ed., São Paulo, Melhoramentos.
- BRESSLER, D. C., KIRKPATRICK, L. A., FOGHT, J. M., FEDORAK, P. M., GRAY, M. R., 2003, Denitrogenation of carbazole by combined biological and catalytic treatment. *American Chemical Society, Petroleum Chemistry Division Preprints*, v. 48, pp. 44-46.
- CARDOSO, A. M., CLEMENTINO, M. B. M., MARTINS, O. B., VIEIRA, R. P., ALMEIDA, R. V., ALQUÉRES, S. M. C., ALMEIDA, W. I., 2003, "Archaea: Potencial Biotecnológico", *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 30, pp. 71-77.
- CARREDANO, E., KARLSSON, A., KAUPPI, B., CHOUDHURY, D., PARALES, R. E., PARALES, J. V., LEE, K., GIBSON, D. T., EKLUND, H., RAMASWAMY, S., 2000, "Substrate Binding Site of Naphthalene 1,2-Dioxygenase: Functional Implications of Indole Binding", *Journal of Molecular Biology*, v. 296, pp. 701-712.
- COCO, W. M., LEVINSON, W. E., CRIST, M. J., HEKTOR, H. J., DARZINS, A., PIENKOS, P. T., SQUIRES, C. H., MONTICELLO, D. J., 2001, "DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes", *Nature Biotechnology*, v. 19, pp. 354-359.

- COLBERT, C. L., COUTURE, M. M.-J., ELTIS, L. D., BOLIN, J. T., 2000, "A Cluster Exposed: Structure of the Rieske Ferredoxin from Biphenyl Dioxygenase and the Redox Properties of Rieske Fe-S Proteins", *Structure with Folding & Design*, v. 8, n. 12, pp. 1267-1278.
- DALBY, P. A., 2003, "Optimising enzyme function by directed evolution", *Current Opinion in Structural Biology*, v. 13, pp. 1-6.
- FEDORAK, P. M., WESTLAKE, D. W. S., 1984, "Microbial Degradation of Alkyl Carbazoles in Norman Wells Crude Oil", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 4, pp. 858-862.
- FURUYA, T., KIRIMURA, K., KINO, K., USAMI, S., 2001, "Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives by *Mycobacterium phlei* WU-F1", *FEMS Microbiology Letters*, v. 204, n. 1, pp. 129-133.
- FUSHINOBU, S., SAKU, T., HIDAKA, M., JUN, S.-Y., NOJIRI, H., YAMANE, H., SHOUN, H., OMORI, T., WAKAGI, T., 2002, "Crystal structures of a meta-cleavage product hydrolase from *Pseudomonas fluorescens* IP01 (CumD) complexed with cleavage products", *Protein Science*, v. 11, pp. 2184-2195.
- GIBBS, P. R., RIDDLE, R. R., MARCHAL, L., BENEDIK, M. J., WILLSON, R. C., 2003, "Purification and characterization of 2'aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. LD2", *Protein Expression and Purification*, v. 32, pp. 35-43.
- GIEG, L. M., OTTER, A., FEDORAK, P. M., 1996, "Carbazole Degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: Metabolic Characteristics and the Identification of Some Metabolites", *Environmental Science & Technology*, v. 30, n. 2, pp. 575-585.
- GRAY, K. A., POGREBINSKY, O. S., MRACHKO, G. T., XI, L., MONTICELLO, D. J., SQUIRES, C. H., 1996, "Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels", *Nature Biotechnology*, v. 14, pp. 1705-1709.
- GROSSER, R. J., WARSHAWSKY, D., VESTAL, J. R., 1991, "Indigenous and Enhanced Mineralization of Pyrene, Benzo[a]pyrene, and Carbazole in Soils", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 12, pp. 3462-3469.
- HABE, H., IDE, K., YOTSUMOTO, M., TSUJI, H., HIRANO, H., WIDADA, J., YOSHIDA, T., NOJIRI, H., OMORI, T., 2001, "Preliminary examinations for applying a carbazole-degrader, *Pseudomonas* sp. strain CA10, to dioxin-

contaminated soil remediation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 5-6, pp. 788-795.

HABE, H., ASHIKAWA, Y., SAIKI, Y., YOSHIDA, T., NOJIRI, H., OMORI, T., 2002, "*Sphingomonas* sp. strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in soil", *FEMS Microbiology Letters*, v. 211, pp. 43-49.

HABE, H., MORII, K., FUSHINOBU, S., NAM, J-W., AYABE, Y., YOSHIDA, T., WAKAGI, T., YAMANE, H., NOJIRI, H., OMORI, T., 2003, "Crystal structure of a histidine-tagged serine hydrolase involved in the carbazole degradation (CarC enzyme)", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 303, n. 2, pp. 631-639.

HERNÁEZ, M. J., ANDÚJAR, E., RÍOS, J. L., KASCHABEK, S. R., REINEKE, W., SANTERO, E., 2000, "Identification of a serine hydrolase which cleaves the alicyclic ring of tetralin", *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 19, pp. 5448-5453.

HISATSUKA, K., SATO, M., 1994, "Microbial Transformation of Carbazole to Anthranilic Acid by *Pseudomonas stutzeri*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 58, n. 1, pp. 213-214.

HOPKIN, M., 2005, "Kyoto Protocol comes into force", *Nature*, 16 February 2005, news@nature.com.

INOUE, K., WIDADA, J., NAKAI, S., ENDOH, T., URATA, M., ASHIKAWA, Y., SHINTANI, M., SAIKI, Y., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., NOJIRI, H., 2004, "Divergent structures of carbazole degradative car operons isolated from Gram-negative bacteria", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, n. 7, pp. 1467-1480.

INOUE, K., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., NOJIRI, H., 2005, "Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel Gram-positive carbazole-degrading bacterium", *FEMS Microbiology Letters*, v. 245, n. 1, pp. 145-153.

ISHII, Y., KONISHI, J., SUZUKI, M., MARUHASHI, K., 2000, "Cloning and Expression of the Gene Encoding the Thermophilic NAD(P)H-FMN

Oxidoreductase Coupling with the Desulfurization Enzymes from *Paenibacillus* sp. A11-2", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 6, pp. 591-599.

IWATA, K., NOJIRI, H., SHIMIZU, K., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2003, "Expression, Purification, and Characterization of 2'-Aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase from Carbazole-degrader *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, pp. 300-307.

IWATA, K., NOGUCHI, H. USAMI, Y., NAM, J-W, FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., NOJIRI, H., 2004, "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the 2'-aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase from the carbazole-degrader *Pseudomonas resinovorans* strain CA10", *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D60, pp. 2340-2342.

IZUMI, Y., OHSHIRO, T., OGINO, H., HINE, Y., SHIMAO, M., 1994, "Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 1, pp. 223-226.

JIANG, H., PARALES, R. E., LYNCH, N. A., GIBSON, D. T., 1996, "Site-Directed Mutagenesis of Conserved Amino Acids in the Alpha Subunit of Toluene Dioxygenase: Potential Mononuclear Non-Heme Iron Coordination Sites", *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 11, pp. 3133-3139.

KARLSSON, A., BEHARRY, Z. M., MATTHEW EBY, D., COULTER, E. D., NEIDLE, E. L., KURTZ, JR , D. M., EKLUND, H., RAMASWAMY, S., 2002, "X-ray Crystal Structure of Benzoate 1,2-Dioxygenase Reductase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1", *Journal of Molecular Biology*, v. 318, n. 2, pp. 261-272.

KAUPPI, B., LEE, K., CARREDANO, E., PARALES, R. E., GIBSON, D. T., EKLUND, H., RAMASWAMY, S., 1998, "Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase - naphthalene 1,2-dioxygenase", *Structure with Folding & Design*, v. 6, n. 5, pp. 571-586.

KILBANE II, J. J., DARAM, A., ABBASIAN, J., KAYSER, K. J., 2002, "Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 297, pp. 242-248.

- KILBANE II, J. J., 2004, "Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals". In: Vazquez-Duhalt, R., Quintero-Ramirez, R. (eds), *Petroleum Biotechnology, 151, Development and perspectives*. Studies in Surface Science and Catalysis, chapter 2, Cidade do México, México, Elsevier.
- KIRIMURA, K., NAKAGAWA, H., TSUJI, K., MATSUDA, K., KURANE, R., USAMI, S., 1999, "Selective and Continuous Degradation of Carbazole Contained in Petroleum Oil by Resting Cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, n. 9, pp. 1563 -1568.
- KOBAYASHI, T., KURANE, R., NAKAJIMA, K., NAKAMURA, Y., KIRIMURA, K., USAMI, S., 1995, "Isolation of Bacteria Degrading Carbazole under Microaerobic Conditions, *i.e.* Nitrogen Gas Substituted Conditions", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, n. 5, pp. 932–933.
- LANGE, E. A., PACHECO, M. A., 1999, "Advances in biocatalytic desulphurisation", *PTQ*, Autumn, pp. 37-43.
- LARENTIS, A. L., 2003, *Clonagem e Expressão dos Genes de Pseudomonas stutzeri em Escherichia coli para Degradação de Carbazol*. Exame de Qualificação para Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., CARDOSO, A. M., RÖSSLE, S. C., BISCH, P. M., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2003a, "Modelagem Estrutural da Carbazol 1,9a-Dioxigenase da Rota de Desnitrogenação de Petróleo por *Pseudomonas* sp." *XIV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM 2003)*, T271 (CD-ROM), Florianópolis, SC, Brasil, 5-8 Ago.
- LARENTIS, A. L., RÖSSLE, S. C., ALMEIDA, R.V., CARDOSO, A. M., ALMEIDA, W. I., BISCH, P. M., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2003b, "Modelagem Estrutural do Complexo da Carbazol 1,9a-dioxigenase (*Pseudomonas* sp.) da Rota de Desnitrogenação de Petróleo". In: *Livro de Resumos do IX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Regional Rio*, pp.34, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Out.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., ALMEIDA, W. I ., CARDOSO, A. M., RÖSSLE, S. C., BISCH, P. M., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2003c, "Clonagem dos Genes (*carB*) de *Pseudomonas stutzeri* em *Escherichia coli* para

Degradação de Carbazol Presente em Petróleo". *Colóquio Anual de Engenharia Química 2003*, PEQ-COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 4-5 Dez.

LARENTIS, A. L., CARDOSO, A. M., ALMEIDA, R. V., ROSSLE, S. C., ALMEIDA, W. I., BISCH, P. M., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2004a, "Clonagem e Modelagem Comparativa da Carbazol 1,9a-dioxigenase da Rota de Desnitrogenação de Petróleo de *Pseudomonas stutzeri*". In: *Resumos do VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (Enzitec 2004) - Microorganismos Produtores de Enzimas - Biologia Molecular*, p.77, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Apr.

LARENTIS, A. L., CARDOSO, A. M., ALMEIDA, R. V., ROSSLE, S. C., ALMEIDA, W. I., BISCH, P. M., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2004b, "Cloning and comparative modeling of 2'-aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* carbazole degradation pathway". In: *Programa e Resumos da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq 2004)*, pp.60, Caxambu, MG, Brasil, May.

LARENTIS, A. L., ZARONI, L. S. K., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2004c, "Clonagem dos genes do operon *car* de *Pseudomonas stutzeri* em *Escherichia coli* para Biodegradação de Carbazol presente em Petróleo". *XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2004)*, 3083 (CD-ROM), Curitiba, PR, Brasil, 26-29 Set.

LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R.V., RÖSSLE, S. C., ALMEIDA, W. I., CARDOSO, A. M., BISCH, P. M., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2004d, "Cloning, expression and comparative modeling of enzymes involved in carbazole degradation pathway from *Pseudomonas stutzeri*". In: *Abstracts and Program 1st Latin American Protein Society Meeting (LAPSM)*, pp. 268, Angra dos Reis, RJ, Brasil, Nov.

LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., ALMEIDA, W. I., CARDOSO, A. M., RÖSSLE, S. C., BISCH, P. M., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2004e, "Clonagem, Expressão e Modelagem Comparativa das Enzimas da Rota de Degradação de Carbazol de *Pseudomonas stutzeri*". *Colóquio Anual de Engenharia Química 2004*, PEQ-COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2-3 Dez.

- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., CARDOSO, A. M., ALMEIDA, W. I., RÖSSLE, S. C., BISCH, P. M., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2004f, "Homology Modeling of the Oxygenase Component of Carbazole 1,9a-Dioxygenase (CarAa) involved in Petroleum Denitrogenation Pathway of *Pseudomonas* sp.", *Brazilian Archives of Biology and Technology* (no prelo).
- LARENTIS, A. L., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2005a, "Cloning and Expression of *meta*-Cleavage Enzyme (CarB) of Carbazole Degradation Pathway from *Pseudomonas stutzeri*", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. special, pp. 127-134.
- LARENTIS, A. L., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2005b, "Expression of the Enzymes Involved in the Carbazole Degradation Pathway in Petroleum". In: *First Brazilian Symposium of Petroleum Biotechnology - Abstract*, pp.13, Natal, RN, Brazil, Apr.
- LARENTIS, A. L., COSTA, R. G., SAMPAIO, H., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2005c, "Influence of Induction Conditions on the Overexpression of Carbazole Dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* in Recombinant *Escherichia coli*". In: *Proceedings ENPROMER 2005 - 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, 1275 (CD-ROM), Costa Verde, RJ, Brazil, 14-18 Aug.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., RÖSSLE, S. C., CARDOSO, A. M., ALMEIDA, W. I., BISCH, P. M., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2005d, "Expression and Homology Modeling of 2'-Aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenase (CarB) from *Pseudomonas stutzeri* Carbazole Degradation Pathway", *Cell Biochemistry and Biophysics* (no prelo).
- LI, L., XU, P., BLANKESPOOR, H. D., 2004, "Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp.", *Biotechnology Letters*, v. 26, pp. 581-584.
- MAEDA, K., NOJIRI, H., SHINTANI, M., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2003, "Complete Nucleotide Sequence of Carbazole/Dioxin-degrading Plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10 Indicates its Mosaicity and the Presence of Large Catabolic Transposon Tn4676", *Journal of Molecular Biology*, v. 326, pp. 21-33.

- McFARLAND, B. L., 1999, "Biodesulfurization", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 2, pp. 257-264.
- MONTICELLO, D. J., 1994, "Biocatalytic desulfurization", *Hydrocarbon Processing*, February, pp. 39-45.
- MONTICELLO, D. J., 1998, "Biocatalytic desulfurization of fossil fuels". In: *Proceedings of the 15th World Petroleum Congress*, John Wiley & Sons, pp. 901-906.
- MONTICELLO, D. J., 2000, "Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, pp. 540-546.
- MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H., 1991, *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>th</sup> Edition, Washington, Asm Press, pp. 522.
- NAKAGAWA, H., KIRIMURA, K., NITTA, T., KINO, K., KURANE, R., USAMI, S., 2002, "Recycle use of *Sphingomonas* sp. CDH-7 cells for continuous degradation of carbazole in the presence of MgCl<sub>2</sub>", *Current Microbiology*, v. 44, n. 4, pp. 251-256.
- NAM, J-W., NOJIRI, H., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., 2001, "New Classification System for Oxygenase Components Involved in Ring-Hydroxylating Oxygenations", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65, n. 2, pp. 254-263.
- NAM, J-W., FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H., YAMANE, H., YOSHIDA, T., HABE, H., NOJIRI, H., OMORI, T., 2002a, "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the terminal oxygenase component of carbazole 1,9a-dioxygenase of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10", *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D58, Pt 8, pp. 1350-1352.
- NAM, J-W., NOJIRI, H., NOGUCHI, H., UCHIMURA, H., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., 2002b, "Purification and Characterization of Carbazole 1,9a-Dioxygenase, a Three-Component Dioxygenase System of *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, pp. 5882-5890.

- NAM, J-W., NOGUCHI, H., FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H., ASHIKAWA, Y., ABO, M., FUSHINOBU, S., KOBASHI, N., WAKAGI, T., IWATA, K., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., NOJIRI, H., 2005, "Crystal Structure of the Ferredoxin Component of Carbazole 1,9a-Dioxygenase of *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10, a Novel Rieske Non-Heme Iron Oxygenase System", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 58, pp. 779–789.
- NANDHAGOPAL, N., YAMADA, A., HATTA, T., MASAI, E., FUKUDA, M., MITSUI, Y., SENDA, T., 2001, "Crystal Structure of 2-Hydroxyl-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic Acid (HPDA) Hydrolase (BphD enzyme) from the *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 of the PCB Degradation Pathway", *Journal of Molecular Biology*, v. 309, pp. 1139-1151.
- NOJIRI, H., NAM, J-W., KOSAKA, M., MORII, K-I., TAKEMURA, T., FURIHATA, K., YAMANE, H., OMORI, T., 1999, "Diverse Oxygenations Catalyzed by Carbazole 1,9a-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 10, pp. 3105–3113.
- NOJIRI, H., SEKIGUCHI, H., MAEDA, K., URATA, M., NAKAI, S.I., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2001a, "Genetic Characterization and Evolutionary Implications of a *car* Gene Cluster in the Carbazole Degradation *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 12, pp. 3663-3679.
- NOJIRI, H., HABE, H., OMORI, T., 2001b, "Bacterial degradation of aromatic compounds via angular dioxygenation", *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 47, n. 6, pp. 279-305.
- NOJIRI, H., MAEDA, K., SEKIGUCHI, H., URATA, M., SHINTANI, M., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2002, "Organization and transcriptional characterization of catechol degradation genes involved in carbazole degradation by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.66, n. 4, pp. 897-901.
- NOJIRI, H., OMORI, T., 2002, "Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 10, pp. 2001–2016.
- NOJIRI, H., TAIRA, H., IWATA, K., MORII, K., NAM, J-W. , YOSHIDA, T., HABE, H., NAKAMURA, S., SHIMIZU, K., YAMANE H., OMORI, T., 2003,

- "Purification and Characterization of *meta*-Cleavage Compound Hydrolase from a Carbazole Degradar *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, pp. 36-45.
- OHSIRO, T., IZUMI, Y., 1999, "Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, n. 1, pp. 1-9.
- OUCHIYAMA, N., ZHANG, Y., OMORI, T., KODAMA, T., 1993, "Biodegradation of Carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 3, pp. 455-460.
- OUCHIYAMA, N., MIYACHI, S., OMORI, T., 1998, "Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge", *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 44, pp. 57-63.
- PARK, H.-S., KAYSER, K. J., KWAK, J. H., KILBANE II, J. J., 2004, "Heterologous gene expression in *Thermus thermophilus*: beta-galactosidase, dibenzothiophene monooxygenase, PNB carboxy esterase, 2-aminobiphenyl-2,3-diol dioxygenase, and chloramphenicol acetyl transferase", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, pp. 189-197.
- RIBEIRO, C. M. S., 2004, *Estudo do Processo de Desnitrogenação de Quinolina Utilizando Microorganismo Isolado de Ambientes Contaminados por Petróleo*. Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- RIDDLE, R. R., GIBBS, P. R., WILLSON, R. C., BENEDIK, M. J., 2003a, "Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, pp. 6-12.
- RIDDLE, R. R., GIBBS, P. R., WILLSON, R. C., BENEDIK, M. J., 2003b, "Purification and properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoic acid hydrolase involved in microbial degradation of carbazole", *Protein Expression and Purification*, v. 28, pp. 182-189.
- SANTOS, S. C. C., ALVIANO, D. S., PÁDULA, M., LEITÃO, A. C., MARTINS, O. B., BEVILAQUA, J. V., SEBASTIÁN, G. V., ALVIANO, C. S., SELDIN, L., 2005, "Characterization of a newly isolated dibenzothiophene and carbazole-

degrading *Gordonia amicalis* strain F.5.25.8", *Applied Microbiology and Biotechnology* (aceito).

SATO, S-I., OUCHIYAMA, N., KIMURA, T., NOJIRI, H., YAMANE, H., OMORI, T., 1997a, "Cloning of Genes Involved in Carbazole Degradation of *Pseudomonas* sp. Strain CA10: Nucleotide Sequences of Genes and Characterization of *meta*-Cleavage Enzymes and Hydrolase", *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 15, pp. 4841-4849.

SATO, S-I., NAM, J-W., KASUGA, K., NOJIRI, H., YAMANE, H., OMORI, T., 1997b, "Identification and Characterization of Genes Encoding Carbazole 1,9a-Dioxygenase in *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 15, pp. 4850-4858.

SCHNEIDER, J., GROSSER, R. J., JAYASIMHULU, K., XUE, W., KINKLE, B., WARSHAWSKY, D., 2000, "Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII.123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil", *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 3, pp. 269-277.

SCHWEIZER, H. P., 2001, "Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in Pseudomonads", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 439-445.

SENDA, T., SUGIYAMA, K., NARITA, H., YAMAMOTO, T., KIMBARA, K., FUKUDA, M., SATO, M., YANO, K., MITSUI, Y., 1996, "Three-dimensional Structures of Free Form and Two Substrate Complexes of an Extradiol Ring-cleavage Type Dioxygenase, the BphC Enzyme from *Pseudomonas* sp. Strain KKS102", *Journal of Molecular Biology*, v. 255, pp. 735-752.

SHEPHERD, J. M., LLOYD-JONES, G., 1998, "Novel Carbazole Degradation Genes of *Sphingomonas* CB3: Sequence Analysis, Transcription, and Molecular Ecology", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 247, n. 1, pp. 129-135.

SHOTBOLT-BROWN, J., HUNTER, D. W. F., AISLABIE, J., 1996, "Isolation and description of carbazole-degrading bacteria", *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, pp. 79-82.

- SUGIMOTO, K., SENDA, T., AOSHIMA, H., MASAI, E., FUKUDA, M., MITSUI, Y., 1999, "Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions", *Structure with Folding & Design*, v. 7, pp. 953-965.
- SZYMAŃSKA, A., LEWANDOWSKI, M., SAYAG, C., DJÉGA-MARIADASSOU, G., 2003, "Kinetic study of the hydrodenitrogenation of carbazole over bulk molybdenum carbide", *Journal of Catalysis*, v.218, pp. 24-31.
- URAGAMI, Y., SENDA, T., SUGIMOTO, K., SATO, N., NAGARAJAN, V., MASAI, E., FUKUDA, M., MITSUI, Y., 2001, "Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase", *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 83, pp. 269–279.
- VAILLANCOURT, F. H., LABBÉ, G., DROUIN, N. M., FORTIN, P. D., ELTIS, L. D., 2002, "The Mechanism-based Inactivation of 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase by Catecholic Substrates", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, pp. 2019–2027.
- WACKETT, L. P., 2002, "Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, pp. 577–587.
- YOON, B. J., LEE, D. H., KANG, Y. S., OH, D. C., KIM, S. I., OH, K. H., KAHNG, H. Y., 2002, "Evaluation of carbazole degradation by *Pseudomonas rhodesiae* strain KK1 isolated from soil contaminated with coal tar", *Journal of Basic Microbiology*, v. 42, pp. 434-443.

## 6.2 DNA Recombinante

- BRADFORD, M. M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248-254.
- DOWER, W. J., MILLER, J. F., RAGDALE, C. W., 1988, "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation", *Nucleic Acids Research*, v. 16, n. 13, pp. 6127-6145.

- ENGELKE, D. R., KRIKOS, A., BRUCK, M. E., GINSBURG, D., 1990, "Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*", *Analytical Biochemistry*, v. 191, n. 2, pp. 396-400.
- HARTLEY, J. L., TEMPLE, G. F., BRASCH, M. A., 2000, "DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination", *Genome Research*, v. 10, n. 11, pp. 1788-1795.
- HEYMAN, J. A., CORNTHWAITE, J., FONCERRADA, L., GILMORE, J. R., GONTANG, E., HARTMAN, K. J., HERNANDEZ, C. L., HOOD, R., HULL, H. M., LEE, W.-Y., MARCIL, R., MARSH, E. J., MUDD, K. M., PATINO, M. J., PURCELL, T. J., ROWLAND, J. J., SINDICI, M. L. HOEFFLER, J. P., 1999, "Genome-Scale Cloning and Expression of Individual Open Reading Frames Using Topoisomerase I-Mediated Ligation Methods", *Genome Research*, v. 9, n. 4, pp. 383-392.
- HOGREFE, H. H., HANSEN, C. J., SCOTT, B. R., NIELSON, K. B., 2002, "Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 2, pp. 596-601.
- LAEMMLI, U.K., 1970, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, v. 227, pp. 680-685.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2002, *Engenharia de Processos Recombinantes*. Escola Piloto Virtual do Programa de Engenharia Química/COPPE.
- LUNDBERG, K.S., SHOEMAKER, D.D., ADAMS, M.W., SHORT, J.M., SORGE, J.A., AND MATHUR, E.J., 1991, "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*", *Gene*, v. 108, n. 1, pp. 1-6.
- MAS, E., POZA, J., CIRIZA, J., ZARAGOZA, P., OSTA, R., RODELLAR, C., 2001, "Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)", *Revista AquaTIC* 15, Noviembre.
- PREZIOSO, V. R., 2001, "General Notes on Primer Design in PCR", Brinkmann Instruments, Inc., [www.brinkmann.com](http://www.brinkmann.com).

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SHUMAN, S., 1994, "Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, pp. 32678-32684.
- SHUMAN, S., 1998, "Vaccinia virus DNA topoisomerase: a model eukaryotic type IB enzyme", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1400, pp. 321-337.
- WATSON, J. D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J., ZOLLER, M., 1992, *Recombinant DNA*. 2 ed. Scientific American Books, New York.
- WESTFALL, B., SITARAMAN, K., BERNINGER, M., MERTZ, L. M., 1995, "Elongase™ Reagents For Amplification of Long DNA Templates", *Focus*, v. 17, n. 2, pp. 62-65.
- WESTFALL, B., SITARAMAN, K., LEE, J. E., BORMAN, J., RASHTCHIAN, 1999, "Platinum Pfx DNA Polymerase for High-Fidelity PCR", *Focus*, v. 21, n. 2, pp. 46-48.

### **6.3 *Escherichia coli* como sistema de expressão**

- ALBA, M. J. G., CALVO, E. G., 2000, "Characterization of biorreactor process: Aerobic *Escherichia coli* cultures", *Journal of Biotechnology*, v. 84, pp. 107-118.
- BANEYX, F., 1999, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, pp. 411-421.
- BHANDARI, P., GOWRISHANKAR, J., 1997, "An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer", *Journal of Bacteriology*, v. 179, pp. 4403-4406.
- BHATTACHARYA, S. K. E DUBEY, A. K., 1997, "Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, pp. 355-360.

- FUCHS, C., KÖSTER, D., WIEBUSCH, S., MAHR, K., EISBRENNER, G., MÄRKL, H., 2002, "Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, v. 93, pp. 243–251.
- GOMBERT, A.K., KILIKIAN, B.V., 1998, "Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer", *Journal of Biotechnology*, v. 60, pp. 47–54.
- GUPTA, P., SAHAI, V., BHATNAGAR, R., 2001, "Enhanced Expression of the Recombinant Lethal Factor of *Bacillus anthracis* by Fed-Batch Culture", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, pp. 1025-1033.
- HANNING, G., MAKRIDES, S. C., 1998, "Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*", *Trends in Biotechnology*, v. 16, pp. 54-60.
- KORZ, D. J., RINAS, U., HELLMUTH, K., SANDERS, E. A., DECKWER, W.-D., 1995, "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, v. 39, pp. 59-65.
- KURLAND, C., GALLANT, J., 1996, "Errors of heterologous protein expression", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, pp. 489-493.
- KWON, S., KIM, S., KIM, E., 1996, "Effects of Glycerol on  $\beta$ -Lactamase Production during High Cell Density Cultivation of Recombinant *Escherichia coli*", *Biotechnology Progress*, v. 12, pp. 205-208.
- LEE, S. Y., 1996, "High cell-density culture of *Escherichia coli*", *Trends in Biotechnology*, v. 14, pp. 98-105.
- LILIE, H., SCHWARZ, E., RUDOLPH, R., 1998, "Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 9, pp. 497-501.
- MADURAWA, R. D., CHASE, T. E., TSAO, E. I., BENTLEY, W. E., 2000, "A Recombinant Lipoprotein Antigen against Lyme Disease Expressed in *E. coli*: Fermentor Operating Strategies for Improved Yield", *Biotechnology Progress*, v. 16, pp. 571-576.
- MAKRIDES, S. C., 1996, "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*", *Microbiological Reviews*, v. 60, n. 3, pp. 512-538.

- SEEGER, A., SCHNEPPE, B., MCCARTHY, J. E. G., DECKWER, W.-D., RINAS, U., 1995, "Comparison of temperature – and isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranoside – induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, pp. 947-953.
- SCHMIDT, M., BABU, K. B., KHANNA, N., MARTEN, S., RINAS, U., 1999, "Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, v. 68, pp. 71–83.
- WALL, J. G., PLÜCKTHUN, A., 1995, "Effects of overexpression folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 6, pp. 507-516.
- WANG, F., LEE, S. Y., 1997, "Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Filamentation-Suppressed Recombinant *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 12, pp. 4765-4769.
- WATERS, S., NEUJAHN, H. Y., 1994, "A Fermentor Culture for Production of Recombinant Phenol Hydroxylase", *Protein Expression and Purification*, v. 5, pp. 534-540.
- WEICKERT, M. J., DOHERTY, D. H., BEST, E. A., OLINS, P. O., 1996, "Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, pp. 494-499.

## **6.4 Modelagem Molecular por Homologia e Bioinformática**

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J., 1990, "A Basic Local Alignment Search Tool", *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, pp. 403-410.
- BAKER, D. E. ŠALI, A., 2001, "Protein structure prediction and structural genomics", *Science*, v. 294, pp. 93-96.

- COLOVOS, C., YEATES, T. O., 1993, "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions", *Protein Science*, v. 2, pp. 1511-1519.
- FROIMOWITZ, M., 1993, "HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling", *Biotechniques*, v. 14, pp. 1010-1013.
- GUEX, N. E PEITSCH, M. C., 1997, "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling", *Electrophoresis*, v. 18, pp. 2714-2723.
- HOOFT, R. W. W., VRIEND, G., SANDER, C., ABOLA, E. E., 1996, "Errors in protein structures", *Nature*, v. 381, pp. 272.
- JONES, D.T., 1999, "GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences", *Journal of Molecular Biology*, v. 287, pp. 797-815.
- LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S., THORNTON, J. M., 1993, "Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures", *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, pp. 283-291.
- LUTHY, R., BOWIE, J. U., EISENBERG, D., 1992, "Assessment of protein models with three-dimensional profiles", *Nature*, v. 356, pp. 83-85.
- MARTÍ-RENOM, M. A., STUART, A. C., FISER, A., SÁNCHEZ, R., MELO, F., ŠALI, A., 2000, "Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes", *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 29, pp. 291-325.
- NOTREDAME, C., HIGGINS, D. G., HERINGA, J., 2000, "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment", *Journal of Molecular Biology*, v. 302, pp. 205-217.
- PEITSCH, M. C., 1995, "Protein modeling by E-mail", *Bio/Technology*, v. 13, pp. 658-660.
- PEITSCH, M. C., 1996, "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modeling", *Biochemical Society Transactions*, v. 24, pp. 274-279.

- PONTIUS, J., RICHELLE, J. AND WODAK, S. J., 1996, "Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures", *Journal of Molecular Biology*, v. 264, pp. 121-136.
- RAMACHANDRAN, G. N., RAMAKRISHNAN C., SASISEKHARAN, V., 1963, "Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations", *Journal of Molecular Biology*, v. 7, pp. 95-99.
- ROST, B., SCHNEIDER, R., SANDER, C., 1997, "Protein fold recognition by prediction-based threading", *Journal of Molecular Biology*, v. 270, pp. 471-480.
- ŠALI, A., BLUNDELL, T. L., 1993, "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints", *Journal of Molecular Biology*, v. 234, pp. 779-815.
- SANTOS FILHO, O. A., BICCA DE ALENCASTRO, R., 2003, "Modelagem de Proteínas por Homologia", *Química Nova*, v. 26, n. 2, pp. 253-259.
- SAYLE, R. A., MILNER-WHITE, E. J., 1995, "RASMOL: biomolecular graphics for all", *Trends in Biochemical Sciences*, v. 20, n. 9, pp. 374-376.
- SIPPL, M. J., 1993, "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Proteins*, v. 17, pp. 355-352.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J., 1994, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Research*, v. 22, pp. 4673-4680.
- WEINER, S. J., KOLLMAN, P. A., NGUYEN, D. T., CASE, D. A., 1986, "An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids", *Journal of Computational Chemistry*, v. 7, pp. 230-252.

## **6.5 Planejamento Experimental e Estimação de Parâmetros**

- BOX, G. E. P., DRAPER, N. R., 1987, *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. Hardcover Edition, John Wiley & Sons, New York.
- STATSOFT, Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa, Oklahoma, USA, 1995.