NATALIA CERRONE ARAUJO

Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3” e C6’ da biossíntese de gentamicina

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

São Paulo
2018

NATALIA CERRONE ARAUJO

Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3” e C6’ da biossíntese de gentamicina

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Versão Corrigida.

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cerrone Araujo, Natalia
Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3″ e C6′ da biossíntese de gentamicina / Natalia Cerrone Araujo; orientador Marcio Vinicius Bertacine Dias. -- São Paulo, 2018.
74 p.

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

1. Produtos naturais. 2. Aminoglicosídeo. 3. Gentamicina. 4. Cristalografia. I. Bertacine Dias, Marcio Vinicius , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Natalia Cerrone Araujo

Título da Dissertação: Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3" e C6' da biossíntese de gentamicina

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **757/15** referente ao projeto intitulado: "*Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação da posição C3" da biossíntese de gentamicina X2*" sob a responsabilidade de **Natalia Cerrone Araújo**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Márcio Vinicius Bertacine Dias**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de agosto de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A ZANOTTO
Coordenador da CEPSH - ICB/USP

ICB USP

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

Decl. CEPSH.007.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção **757/2015**, emitido em 31/08/2015, e por solicitação do Prof. Dr. ***Márcio Vinícius Bertacine Dias***, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto da aluna ***Natalia Cerrone Araújo,*** foi alterado para "***Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação das posições C3" e C6' da biossíntese de gentamicina***" para melhor adequação ao estudo desenvolvido.

São Paulo, 20 de outubro de 2017.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Silvana, por ter me presenteado aos 7 anos com um livro intitulado Viagem ao Mundo dos Micróbios, no qual uma menina era encolhida e se aventurava pelo mundo dos microrganismos, conhecendo a penicilina. Agradeço por ter plantado em mim a sementinha da curiosidade.

Aos meus colegas de trabalho com quem tive o enorme prazer de conviver durante estes anos: À Priscila, que dedicou o pouco do seu tempo para me ensinar toda a base necessária e também pela amizade, à Larissa que compartilhou seu vasto conhecimento sobre as técnicas e por sua doce companhia, atenção e amizade. Ao João Pimenta que sempre ofereceu ajuda com um sorriso no rosto, à Catharina por sempre me ouvir e me acalmar com sua sensatez, e também por todos os trabalhos em dupla com quem tive a sorte de compartilhar. Ao Gerardo, por sempre me lembrar sobre a importância de ser correta, ética e comprometida, ao Xiba, pelos incontáveis momentos de descontração, por toda força e por compartilhar todo seu conhecimento com a maior atenção e humildade possível. Jademilson por ampliar minha base sobre química e cristalografia e por ser um ótimo avaliador de apresentações. À querida Tábata por deixar a vida mais leve. Ao amigo Sair que sempre esteve disponível para ajudar em qualquer dificuldade que eu tivesse, desde a vida acadêmica até a pessoal, e por fim, mas não menos importante, à Fer por ser sempre tão prestativa, por toda ajuda e apoio fornecidos dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do laboratório vizinho, Ana, Cris e Marcelo que sempre estiveram disponíveis para discutir ciência e para descontrair, e à Pam, por dividir o lab e o apê comigo, agradeço por ter podido contar com sua amizade durante esse período tão intenso das nossas vidas.

Sou muito grata ao grupo LBEA fármacos e transportadores, com quem tive a sorte de conviver esses anos, por todo o conhecimento compartilhado, sempre com carinho e atenção, este trabalho e minha jornada, sem cada um deles, não teriam sido tão ricos.

Agradeço também à toda minha família por todo apoio, toda compreensão e a enorme paciência (incluo aqui Marina, Joaquim e Alex, minha família do coração). Agradeço em especial à minha Nonna Osmil, a quem dedico este trabalho, pois sem seu apoio emocional nada disso seria possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias pela orientação e pela oportunidade de realizar este projeto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) (número do processo: 1566475 / 2015-2017).

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

À Universidade de São Paulo (USP) pela infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho e também pela oportunidade de realizar Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), onde pude aprimorar a atividade didática de graduação através de preparação Pedagógica e estágio Supervisionado em Docência.

Agradeço também ao grupo do Prof. Peter Leadlay da Universidade de Cambridge, pelos plasmídeos cedidos. Aos coordenadores e técnicos do Laboratório de Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade de São Paulo e aos coordenadores e técnicos da linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e da linha P13, PETRA III, *Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESy)* na Alemanha, por toda assistência prestada.

“Eu tenho medo de viver uma vida onde eu poderia ter realizado algo e não realizei.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

ARAUJO N. C. **Estudo estrutural de enzimas relacionadas com a modificação nas posições C3" e C6' da biossíntese de gentamicina.** 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2018.

Antibióticos antimicrobianos são moléculas capazes de inibir o crescimento de microrganismos, na maioria, produtos naturais derivados de fungos ou bactérias que bloqueiam processos cruciais para a sobrevivência de microrganismos. A gentamicina é um aminoglicosídeo 4,6 bisubstituído que exerce papel importante no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas; apresenta uma complexa e pouco entendida rota de biossíntese. Dessa via, a desidrogenase GenD2 e a aminotransferase GenS2 atuam sobre a posição C3" da gentamicina A2 produzindo gentamicina X2, e a GenB2 atua na posição C6' epimerizando a molécula de gentamicina $C2_a$. As enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade e por exclusão de tamanho, no tampão composto por 50 mM de Tris HCl, 100 mM de NaCl pH 7,7. Com a intenção de compreender a rota de biossíntese da gentamicina, o objetivo deste trabalho foi estudar estruturalmente as enzimas GenD2, GenS2 e GenB2 em complexo com seus cofatores e ligantes. Cristais da enzima GenD2 difrataram, porém não foi possível determinar sua estrutura, análises biofísicas através de calorimetria de titulação isotérmica e por gel filtração analítica, puderam confirmar seu cofator, o NAD^+, e um estado oligomérico compatível à um tetrâmero em solução. A enzima GenB2 em complexo com o cofator PMP e gentamicina X2 difratou a uma resolução de 1,7 Å e foi resolvida por substituição molecular, na qual foi identificada uma molécula na unidade assimétrica pertencente ao grupo espacial C 2 2 2_1. Essa enzima é um homodímero, seu sítio de ligação está na interface entre os protômeros com contribuições de resíduos de ambas as moléculas. A região onde se encontra o anel pirimidínico do PMP é carregada positivamente, favorecendo a interação com o cofator. A cavidade onde se encontra posicionada a gentamicina X2, é bastante ampla e eletronegativa, por seu substrato ser um aminoglicosídeo. A lisina 227 é o resíduo que realiza a clássica base de Schiff, presente em enzimas PLP/PMP dependentes, entre o anel pirimidínico do PMP e a tirosina 124. Os avanços promissores sobre a GenD2 e a compreensão estrutural da GenB2 auxiliam no entendimento da via de biossíntese de gentamicina bem como contribuem para o crescente entendimento sobre o enovelamento de enzimas PLP dependentes.

Palavras-chave: Produtos naturais. Aminoglicosídeo. Gentamicina. Cristalografia.

ABSTRACT

ARAUJO, N. C. **Structural study of enzymes involved in the modification at the C3" and C6' positions of gentamicin C.** 2018. 70 f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2018.

Antimicrobial antibiotics are molecules capable of inhibiting the growth of microorganisms, most of them are natural products derived from fungi or bacteria that block some crucial processes to the survival of microorganisms. Gentamicin is a 4,6 disubstituted aminoglycoside that plays an important role in the treatment of severe infections caused by gram-negative bacteria. This aminoglycoside presents a complex and poorly understood biosynthesis route. From this route, GenD2 dehydrogenase and GenS2 aminotransferase have been identified to act at C3' position of gentamicin A2 producing gentamicin X2, and the enzyme GenB2 acts at the C6" position, epimerizing the gentamicin $C2_a$ molecule. These enzymes were purified by immobilized metal ion affinity and size exclusion chromatography in a buffer composed of 50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl pH 7,7. In order to understand the route of gentamicin biosynthesis, this work aims to study the enzymes GenD2, GenS2 and GenB2 in complex with their cofactors and ligands. Some crystals of GenD2 diffracted, however it was not possible to determine its structure. Biophysical analysis by isothermal titration calorimetry and analytical gel filtration; confirmed NAD^+ as its cofactor, and an oligomeric state compatible with a tetramer in solution. GenB2 crystals in complex with PMP cofactor and gentamicin X2 diffracted at a resolution of 1.7 Å and its structure was resolved by molecular replacement, which presented one molecule in the asymmetric unit belonging to the space group C 2 2 2_1. This enzyme is a homodimer, the binding site is located at the interface between protomers and residues from both molecules contribute toward the formation of the active site. The region where the PMP pyrimidine ring is located is positively charged, favoring the interaction with the cofactor. The active site cavity, where gentamicin X2 is positioned, is a large groove and predominantly electronegative, compatible with the substrate of the enzyme, which is an aminoglycoside. Lysine 227 is the key residue that performs the classical Schiff base, commonly present in PLP/PMP dependent enzymes, between the PMP pyrimidine ring and tyrosine 124. Promising advances on GenD2 and the structural understanding of GenB2 aids in the understanding of the gentamicin biosynthetic pathway as well as contribute towards the knowledge about the folding of PLP dependent enzymes.

Keywords: Natural products. aminoglycosides. gentamicin. crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação dos aminoglicosídeos.....18
Figura 2. Estruturas de aminoglicosídeos apresentando o aminociclitol das duas principais classes. 19
Figura 3. Estrutura química da gentamicina, um aminoglicosídeo 4,6 bisubistituído.....21
Figura 4. Genes relacionados da rota biossintética de aminoglicosídeos.....22
Figura 5. Via de biossíntese da gentamicina resumida. 23
Figura 6. Alinhamento de sequências entre GenD2 e uma oxidoredutase de *Desulfitobacterium hafniense*, código PDB: 3DB2.....24
Figura 7. Alinhamento entre GenS2 e uma aminotransferase de butirosina, código PDB: 2C7T. 25
Figura 8. Continuação da via de biossíntese de gentamicina previamente mostrada na figura 5. A imagem mostra um dos ramos finais da via de biossíntese de gentamicina a partir da gentamicina X2.....26
Figura 9. Alinhamento entre GenB2 e uma isomerase de *Thermus thermophilus*, código PDB: 2E7U.....28
Figura 10. Purificação por afinidade da proteína GenD2.....36
Figura 11. Purificação por exclusão molecular da proteína GenD2.....36
Figura 12. Purificação por afinidade da proteína GenD2 com selenometionina.....38
Figura 13. Purificação por exclusão molecular da proteína GenD2 com selenometionina.....39
Figura 14. Gel filtração analítica em coluna 16/60 Superdex 200 da GenD2 (145,81 kDa) e dos marcadores moleculares:.....40
Figura 15. Purificação por afinidade da proteína GenS2. 41
Figura 16. Purificação por exclusão molecular da proteína GenS2.....41
Figura 17. Purificação por afinidade da proteína GenB2.....42
Figura 18. Purificação por exclusão molecular da proteína GenB2. 43
Figura 19. Curvas de desenovelamento térmico da GenD2 realizada pelo experimento de *Differencial Scanning fluorimetry*.....45
Figura 20. Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica utilizando o microcalorímetro iTC200 (Mricrocal).....47
Figura 21. Tetrâmero de GenD2 gerado por operações de simetria.....54
Figura 22. Dímero de GenD2 em complexo com o cofator NAD^+.....55
Figura 23. Monômero de GenD2 em complexo com o cofator NAD^+. 56
Figura 24. Molécula de GenD2 em sobreposição com a oxidoredutase de *Desulfitobacterium hafniense* PDB: 3DB2.....57
Figura 25. Dímero de GenB2 evidenciando o sítio ativo. 60
Figura 26. Superfície de potencial eletrostático da holoenzima GenB2.....62
Figura 27. Sítio ativo evidenciando os resíduos envolvidos na interação. 64
Figura 28. Imagem plana do sítio ativo e as interações estabelecidas nele. 66
Figura 29. Mapa de densidade eletrônica da lisina (A), Piridoxamina-5'-fosfato (B) e gentamicina X2 (C). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cristais da enzima GenD2 e condição de cristalização. 51
Tabela 2. Cristais da enzima GenB2 e condição de cristalização. 52
Tabela 3. Dados estatísticos de coleta e refinamento cristalográfico da enzima GenD2. 53
Tabela 4. Dados estatísticos de coleta e refinamento cristalográfico da enzima GenB2 em complexo com gentamicina X2. 58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Å	Ångström
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma (10^{-6} g)
µL	Microlitro (10^{-6} L)
µM	Micromolar (10^{-6} M)
APS	Persulfato de amônio
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
cm	centímetro
CV	volume de coluna
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	aceleração de gravidade
g	grama
h	hora
IMAC	*Immobilized Metal Affinity Chromatography* (Cromatografia de afinidade por íons metálicos)
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITC	*Isothermal Titration Calorimetry* (Calorimetria de titulação isotérmica)
K_d	Constante de dissociação
kDa	QuiloDalton (10^3 Dalton)
L	Litro
M	Molar (mol/L)
mg	miligrama (10^{-3} g)
min	minuto

mL	Mililitro (10^{-3} L)
mM	Milimolar (10^{-3} M)
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
ng	Nanograma (10^{-9} g)
nm	nanômetro
OD_{600}	Densidade ótica à 600 nm
ORF	*Open Reading Frame* (Quadro aberto de leitura)
pb	pares de base
PDB	*Protein Data Bank*
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PMP	Piridoxamina-5'-fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonilo
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*
Se	selênio
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina
T_m	Temperatura de *melting*
V	Volts
v/v	Volume por volume
w/v	Massa por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....17

1.1. Antibióticos antimicrobianos naturais.....17

1.2. Aminoglicosídeos.....17

1.3. Gentamicina.....20

1.4. Enzimas que atuam na posição C3" da biossíntese de gentamicina.....22

1.4. Enzimas que atuam na posição C6' da biossíntese de gentamicina.....25

2 OBJETIVOS.....28

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....29

3.1. Expressão e purificação das proteínas.....29

3.1.1 Expressão e purificação com selenometionina.....31

3.1.2 Gel Filtração Analítica.....31

3.2. Confirmação da presença de proteína.....32

3.3. Ensaio de deslocamento térmico.....32

3.4. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....33

3.5. Cristalização das proteínas.....33

3.6. Coleta e processamento de dados de difração por Raios X.....34

3.7. Resolução de estruturas e refinamento cristalográfico.....34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....35

4.1 Expressão e purificação.....35

4.1.1 GenD2.....35

4.1.2 GenS2.....40

4.1.3 GenB2.....41

4.2 Ensaio de deslocamento térmico.....43

4.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....46

4.4 Ensaios de Cristalização.....48

4.4.1-GenS2.....48

4.4.2-GenD2.....49

4.4.3-GenB2.....51

4.5 Dados Estruturais.....52

4.5.1-GenD2.....52

4.5.2-GenB2.....57

5 CONCLUSÃO.....69

REFERÊNCIAS.....70

1 INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos antimicrobianos naturais

Os antibióticos antimicrobianos são moléculas capazes de inibir o crescimento de microrganismos. Estas moléculas podem ser produtos naturais como a penicilina e a estreptomicina, semissintéticos como amicacina ou cefalosporina, ou também produzidas sinteticamente pelo ser humano, como as sulfonamidas e quinolonas (ZHANG, 2005). A maior parte dos antibióticos são produtos naturais derivados de fungos ou bactérias, geralmente esses compostos são gerados a partir do metabolismo secundário desses microrganismos e foram selecionados evolutivamente ao longo de milhares de anos em resposta às necessidades e desafios impostos pelo ambiente. A pressão seletiva sobre os organismos produtores destes compostos gerou uma gama enorme de moléculas capazes de bloquear alguns processos cruciais na sobrevivência de microrganismos e essa propriedade é utilizada pelos seres humanos para o tratamento contra bactérias ou fungos patogênicos. Enquanto milhares de moléculas têm sido reportadas como tendo propriedades antibióticas, somente uma pequena parcela delas tem sua eficácia e segurança comprovadas para o tratamento de doenças bacterianas que acometem os seres humanos. (WALSH, 2003).

Os antibióticos antibacterianos podem ser classificados de diversas maneiras. A classificação mais comum é aquela que divide as principais classes de antibióticos de acordo com seus alvos, que podem ser: (1) Parede celular bacteriana, inibindo a sua síntese, ex. β-lactâmicos, (2) Ribossomos bacterianos, ex. aminoglicosídeos que bloqueiam a síntese de proteínas, (3) DNA bacteriano, bloqueando sua replicação e reparo, ex. quinolonas, e (4) Via de biossíntese de folato, essencial por fornecer unidades monoméricas para a síntese de DNA, que é bloqueada por sulfas (WALSH, 2003).

1.2. Aminoglicosídeos

Dentre os antibióticos que inibem a síntese proteica bacteriana, encontramos os aminoglicosídeos, tais como a estreptomicina, canamicina, gentamicina e tobramicina. O primeiro aminoglicosídeo descoberto foi a estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus***,** em 1944 por Selman Waksman. Esta descoberta causou uma revolução na medicina, haja visto que esse foi o primeiro agente antibacteriano efetivo para o tratamento da tuberculose. Atualmente,

a estreptomicina é substituída por fármacos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, apesar de ainda ter importância significativa como antibiótico de segunda linha (ARYA, 2006). Após esta descoberta, outros aminoglicosídeos foram descritos: neomicina (1949), canamicina (1957), paromomicina (1959), gentamicina (1963), tobramicina (1967), sisomicina (1970), butirosina (1971), lividomicina (1971), entre outros (Park, 2012). Entretanto, devido à alta nefrotoxicidade e ototoxicidade, comum aos aminoglicosídeos, a maioria não foi introduzida na clínica humana e veterinária.

Diferentemente da maioria dos antibióticos que tem ação no ribossomo bacteriano, os aminoglicosídeos são bactericidas. O mecanismo de ação destes antibacterianos se dá pela sua ligação ao RNA 16S da subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Essa ligação pode levar ao bloqueio da síntese proteica ou gerar proteínas não funcionais pela incorporação de aminoácidos incorretos. Essa ação é o que torna tal classe de antimicrobianos letal para a bactéria alvo. (Figura 1) (COX, et al., 1964, CHAMBERS, 2003, PARK 2012).

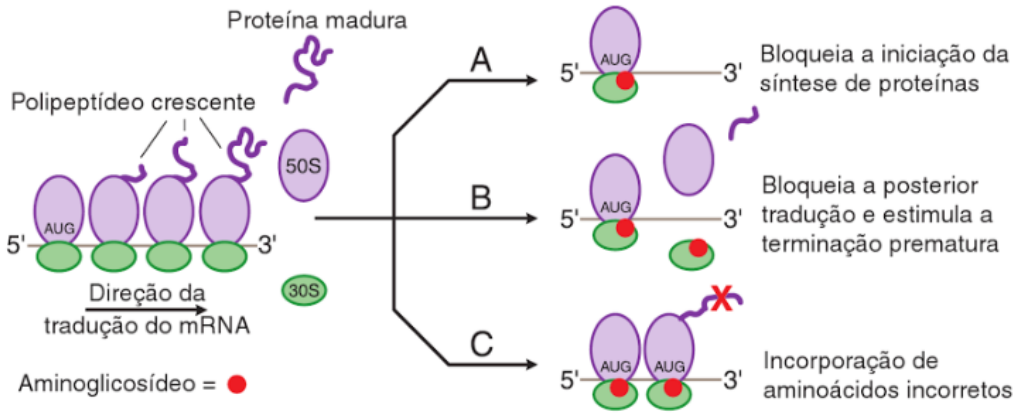


Figura 1. Mecanismo de ação dos aminoglicosídeos
O aminoglicosídeo se liga à subunidade 30S do ribossomo bacteriano podendo: A. bloquear o início da síntese de proteínas; B. levar a liberação do complexo ribossomal causando uma parada prematura da tradução ou C. levar a adição de um aminoácido incorreto à proteína.
Fonte: Chambers (2003).

Os aminoglicosídeos são produzidos principalmente por actinomicetos, são produtos do metabolismo secundário de carboidratos e podem ser descritos quimicamente por apresentarem um núcleo derivado de um aminociclitol unido a vários outros aminoaçúcares ou desoxiaçúcares por ligação glicosídica (WALSH, 2003, CHAMBERS, 2003). A combinação da ligação destas moléculas de açúcares e suas funções resultam na especificidade do fármaco

ao ribossomo bacteriano, pois sua característica protonada em pH fisiológico contribui para a ligação à região alvo do ribossomo, que é polianiônica (KUDO; EGUCHI, 2009).

Duas categorias principais de aminoglicosídeos são observadas. A primeira é representada por antibióticos que possuem o núcleo aminociclitol modificado para estreptidina, como a estreptomicina, fortimicina A e bluensomicina; e a segunda, por antibióticos que contém o grupo 2-desoxiestreptamina (2-DOS) tais como a neomicina, canamicina e gentamicina (WALSH, 2003) (Figura 2). Dentro da segunda categoria, os aminoglicosídeos também podem ser subdivididos de acordo com a posição das substituições do grupo 2-DOS, podendo ser 4,5-bisubstituídos (butirosinas e neomicinas) ou 4,6-bisubstituídos (gentamicinas e tobramicinas).

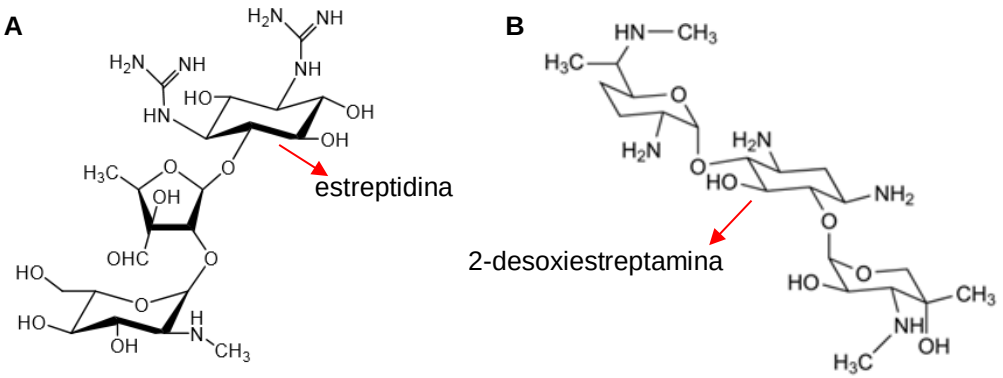


Figura 2. Estruturas de aminoglicosídeos apresentando o aminociclitol das duas principais classes. **A.** Estreptomicina com seu aminociclitol modificado para estreptamina, **B.** Gentamicina C_1 com seu núcleo modificado para 2-desoxiestreptamina.

A onipresença e a localização geralmente central dos grupos estreptidina ou 2-DOS na estrutura de todos os aminoglicosídeos demostram que esses grupos têm um papel fundamental na atividade biológica, como pôde ser observado pela estrutura cristalográfica da unidade 30S do ribossomo em complexo com alguns aminoglicosídeos (CARTER, et al., 2000). Além disso, para corroborar este fato, experimentos medindo a afinidade do composto 2-DOS isoladamente, sem qualquer decoração de aminoaçúcares, mostraram que há uma ligação na ordem de micromolar nas alças tipo *hairpin* do RNA ribossômico de bactérias (LIU, et al., 2004). Recentemente essa característica dos aminoglicosídeos de causar um erro de leitura do mRNA tem sido aplicada de forma indireta na terapia gênica; a administração de gentamicina ou compostos derivados em pacientes com fibrose cística pode causar a supressão, mesmo que parcial, desta doença genética que afeta predominantemente os pulmões, devido a uma alteração

no transporte de íons através das membranas das celulares. (AMARAL, 2015, PRAYLE; SMYTH, 2010), entretanto as bases moleculares que causam esse efeito ainda não foram completamente elucidadas.

Os genes responsáveis pela biossíntese de aminoglicosídeos geralmente estão organizados em *clusters* gênicos, que podem apresentam mais de 40 ORFs (*Open Reading Frame*) para a biossíntese de uma única molécula (ARYA, 2006). Recentemente mais de 15 *clusters* gênicos para aminoglicosídeos foram clonados e analisados (KUDO; EGUCHI, 2009). Embora esses dados genéticos não sejam suficientes para obter conclusões sobre aspectos relacionados à produção, os mesmos são cruciais para o entendimento da enzimologia da biossíntese, resistência aos aminoglicosídeos, regulação, localização genômica e vias de disseminação entre bactérias (KUDO; EGUCHI, 2009). Além disso, essas informações são essenciais para a aplicação da biologia sintética ou metabólica para obtenção de novos aminoglicosídeos que possam ser menos tóxicos se manipulados geneticamente (PARK, et al., 2011, PARK, et al., 2013).

Estreptomicina, além de ter sido o primeiro aminoglicosídeo descoberto, também foi o primeiro a ter seu *cluster* gênico determinado em *Streptomyces griseus*, o que abriu oportunidade para a descoberta de vários outros *clusters* gênicos, incluindo, tobramicina, canamicina, gentamicina, entre outros (ARYA, 2006, KUDO; EGUCHI, 2009). Entretanto a bioquímica enzimática relacionada com a biossíntese desses antibióticos não tem acompanhado a mesma velocidade que a quantidade de informações genéticas obtidas, sendo ainda muito pouco o conhecimento a respeito desse assunto.

1.3. Gentamicina

A gentamicina foi descrita por Weinstein e colaboradores em 1963 e é produto de fermentação do actinomiceto *Micromonospora echinospora* (WEINSTEIN, et al., 1963). É um antibiótico representante do grupo dos aminoglicosídeos e apresenta em seu núcleo o grupo 2-desoxiestreptamina 4,6 bisubstituído. Na posição C4 deste núcleo está ligada uma molécula de açúcar purpurosamina e na posição C6 um açúcar garosamina (Figura 3) (LLEWELLYN; SPENCER, 2006). A gentamicina é isolada da bactéria produtora como uma mistura de cinco componentes C1, C2, $C1_a$, $C2_a$ e $C2_b$ (YU et al., 2017), e em sua forma terapêutica a

gentamicina compreende três moléculas, C_1, C_{1a} e C_2 (Figura 3), que diferem somente no grau de metilação da posição C6' do açúcar ligado ao C4 do 2-DOS (PARK, et al., 2008).

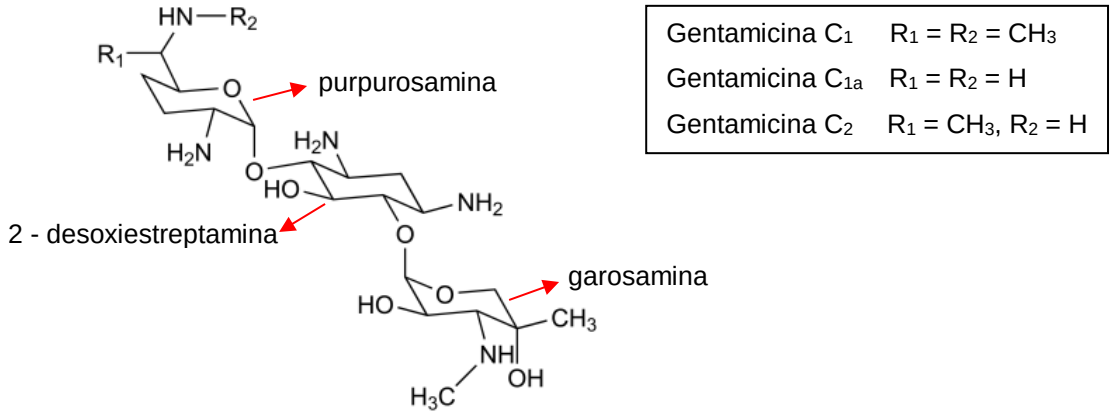


Figura 3. Estrutura química da gentamicina, um aminoglicosídeo 4,6 bisubistituído.
Molécula de gentamicina evidenciando suas três porções: purpurosamina, 2-desoxiestreptamina e garosamina. No quadro os radicais das gentamicinas C_1, C_{1a} e C_2, complexo utilizado como fármaco.

Este antibiótico exerce papel importante no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas como as dos gêneros *Pseudomonas*, *Proteus* e *Serratia*, e é utilizado com frequência em combinação com um β-lactâmico contra bactérias resistentes à antibióticos menos tóxicos (PALOMINO; PACHÓN, 2003). É também empregado no tratamento de pacientes infectados com bactérias oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos. Seu uso também é recorrente contra infecções causadas por algumas bactérias gram-positivas, como as representantes do gênero *Staphylococcus* (HAINRICHSON et al, 2007). Além disso, a gentamicina apresenta eficiência em algumas células cancerígenas e em determinadas doenças hereditárias associadas com a parada de leitura prematura do ribossomo (CUCCARESE, et al., 2013, HAINRICHSON, et al., 2008, LINDE; KEREM, 2008, WALSH, 2003).

A determinação do *cluster* gênico para a biossíntese de gentamicina foi realizada paralelamente por dois grupos de pesquisa que identificaram todos os genes requeridos na via. (KHAREL, et al., 2004, UNWIN, et al., 2004). A biossíntese de gentamicina apresenta algumas etapas de reação comuns a outros aminoglicosídeos como canamicina e tobramicina (Figura 4) (KUDO; EGUCHI, 2009), mas difere por apresentarem várias enzimas únicas responsáveis pela síntese de seus açúcares pouco usuais.

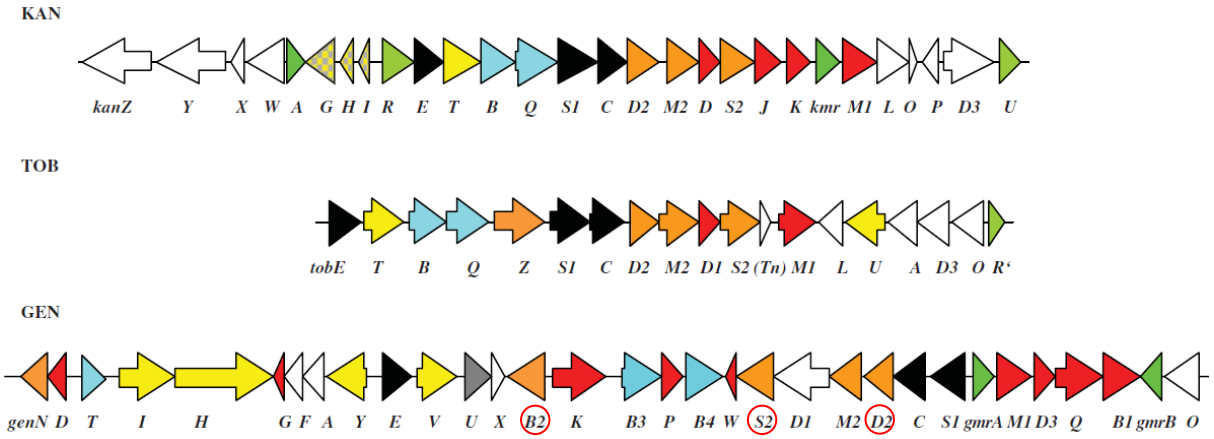


Figura 4. Genes relacionados da rota biossintética de aminoglicosídeos.
Clusters gênicos da canamicina (KAN), tobramicina (TOB) e gentamicina (GEN). Circuladas em vermelho estão as enzimas estudadas no presente trabalho.
Modificado de: ARYA (2006).

Nosso grupo de pesquisa em colaboração com o grupo do Prof. Peter Leadlay da Universidade de Cambridge, vêm estudando estruturalmente (grupo brasileiro) e funcionalmente (grupo britânico) várias enzimas responsáveis pela formação de gentamicina e de seu análogo estrutural sisomicina. Recentemente, o grupo do Prof. Peter Ledlay tem feito significativo avanço nos passos finais da biossíntese de gentamicina e elucidado a função de várias transaminases (GUO, et al., 2014), além de identificar as rotas finais para a produção de gentamicina X2 a partir de gentamicina A (HUANG, et al., 2015). Por outro lado, nosso grupo determinou a estrutura de uma N-metiltransferase que metila a posição C3" e é relacionada com o passo final da biossíntese da gentamicina A (BURY et al., 2017).

1.4. Enzimas que atuam na posição C3" da biossíntese de gentamicina

A Gentamicina A2 é um intermediário na biossíntese do complexo C da gentamicina (PARK, et al., 2008) e dentre as enzimas que participam da via de biossíntese deste aminoglicosídeo, foi confirmada a atuação das enzimas GenD2 e GenS2 sobre a gentamicina A2 (Figura 5).

A enzima GenD2 realiza incialmente a oxidação do grupo hidroxil da posição C3", e a GenS2 a posterior aminação dessa mesma posição. Essas enzimas exercem contribuições catalíticas essenciais nas etapas de biossíntese, sendo cruciais para a transformação de gentamicina A2 em gentamicina X2 (Figura 5). Existem várias evidências de enzimas da biossíntese de aminoglicosídeos que se apresentam promíscuas ou exercem dupla função

(HUANG et al., 2007, PARK et al., 2011) porém as enzimas GenD2 e GenS2 parecem ser as únicas envolvidas nas etapas de oxidação e aminação da posição C3" da gentamicina A2 e não são requeridas para outras etapas da mesma via. Essas duas enzimas também foram testadas em relação à sua promiscuidade a substratos de outras vias e foram capazes de oxidar e aminar a canamicina B e a tobramicina, assim como ocorre na gentamicina A2 (HUANG, et al., 2015).

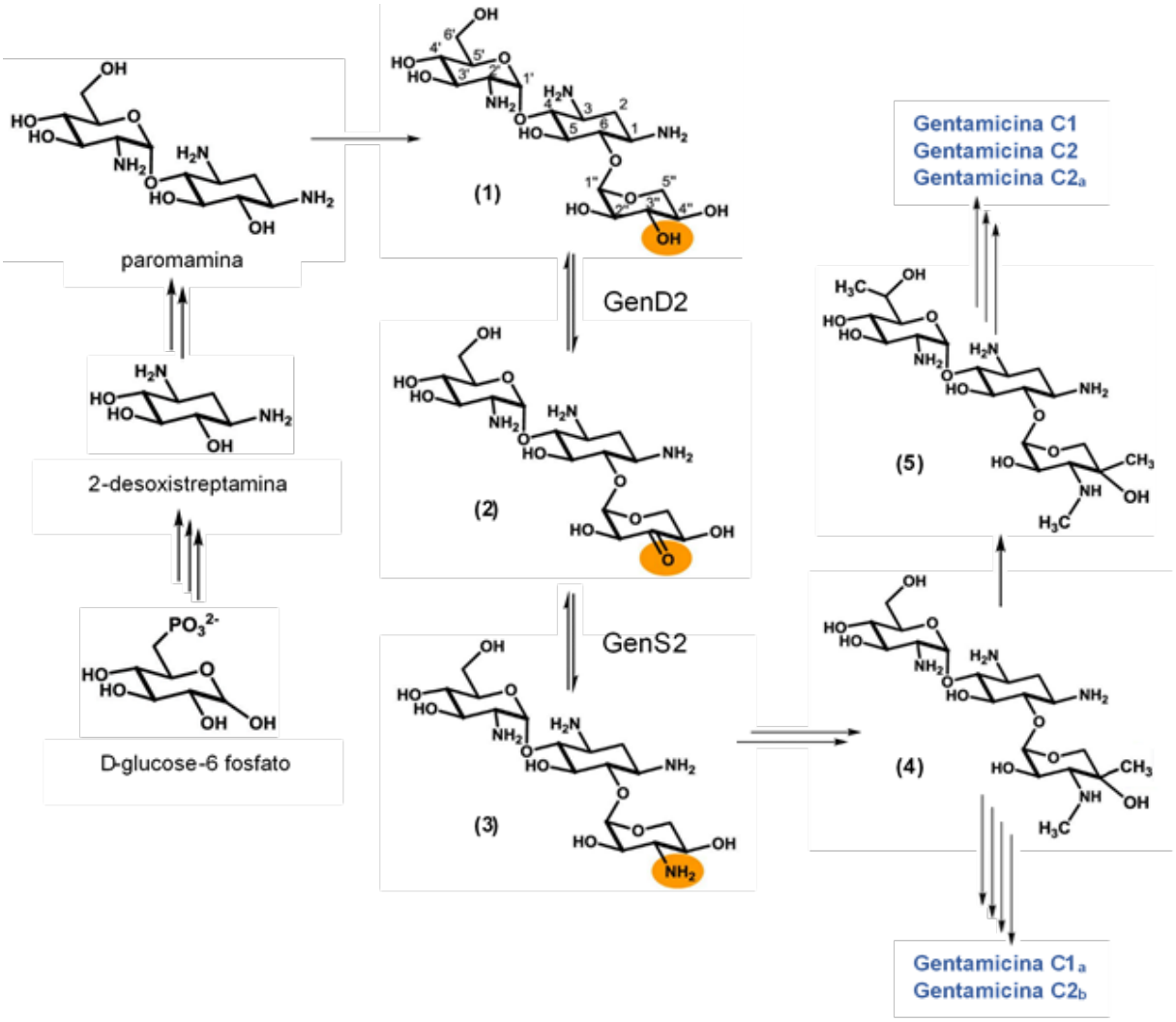


Figura 5. Via de biossíntese da gentamicina resumida.
A partir e D-glucose-6 fosfato dá se o início da biossíntese do aminoglicosídeo até a formação de **(1)** – gentamicina A2, onde atua a enzima GenD2 na posição C3" (evidenciada em amarelo). **(2)** – 3"-desidro-3"-oxi-gentamicina A2 onde atua a enzima GenS2 na posição em amarelo. **(3)** – 3"-desidro-3"-amino-gentamicina A2. Após etapas enzimáticas realizadas por outras enzimas há a formação de **(4)** – gentamicina X2. **(5)** – G418.
Modificado de: HUANG et al, (2015).

A enzima GenD2 (Uniprot: Q70KD1) apresenta 341 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 36507.20 Da. Acredita-se que a GenD2 seja uma desidrogenase NAD dependente, com significante identidade com Sis12, KanD2 e TobD2 da biossíntese de sisomicina,

canamicina e tobramicina respectivamente. A função desta enzima tem sido validada tanto *in vitro* quanto *in vivo* por HUANG et al, (2015). A mesma atua na oxidação da posição C3” da gentamicina A2 possibilitando a posterior atuação da enzima GenS2. A GenD2 apresenta aproximadamente 27% de identidade em 77% de cobertura com a oxidoredutase dependente de NAD de *Desulfitobacterium hafniense* (Código PDB: 3DB2), depositada no *Protein Data Bank*, que teve sua estrutura tridimensional determinada por consórcio de biologia estrutural e não apresenta função definida até o presente momento (Figura 6).

Estruturalmente enzimas desidrogenases NAD dependentes apresentam enovelamento do tipo *Rossmann fold*, possuem uma região de ligação com a coenzima conservada em várias outras proteínas da mesma família. Esse tipo de enovelamento caracteriza-se por conter uma série de α-hélices e fitas-β alternadas. (EVENTOFF; ROSSMANN, 1976, HANUKOGLU, 2015). É o único motivo β α β α β que se liga a um mononucleotídeo (BOTTONS, 2002).

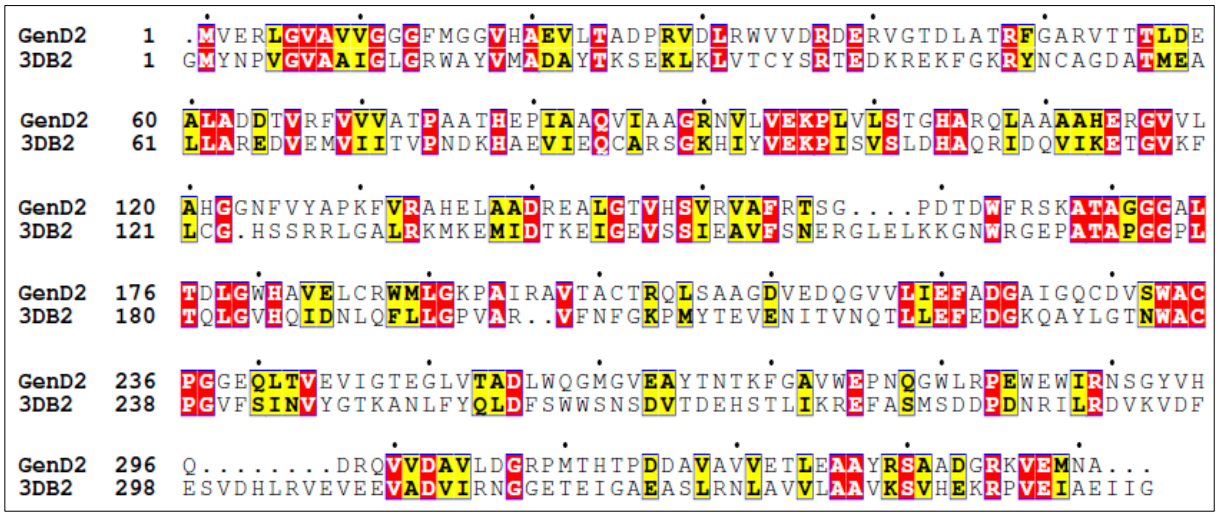


Figura 6. Alinhamento de sequências entre GenD2 e uma oxidoredutase de *Desulfitobacterium hafniense*, código PDB: 3DB2. Foi utilizado o programa ESPript 3. Os resíduos em branco emoldurados em vermelho são resíduos idênticos; os resíduos em preto com fundo amarelo são diferentes, porém apresentam a mesma propriedade química, apresentando mais de 70% de similaridade; e os não emoldurados são diferentes.

A enzima GenS2 tem ação de aminotransferase, como o nome já sugere, essa enzima transfere um grupo amina para a posição do carbono 3” da gentamicina A2, a mesma posição da anterior atuação da enzima GenD2 na etapa de formação da gentamicina X2. A enzima GenS2 (Uniprot: Q70KD4) apresenta 418 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 46794.25 Da. GenS2 é predita ser uma aminotransferase dependente de PLP com alta identidade à Sis15, KanS2 e TobS2 das vias de biossíntese de sisomicina, canamicina e

tobramicina respectivamente. GenS2 apresenta identidade de 34% em 93% de cobertura com a com a enzima BtrR (Código PDB: 2C7T), uma aminotransferase da biossíntese de butirosina, um outro aminoglicosídeo que teve sua estrutura resolvida (POPOVIC, et al., 2006) (Figura 7).

Enzimas PLP (Piridoxal-5'-fosfato) dependentes podem catalisar uma diversidade de reações e são alvos de intenso estudo por este motivo. Estruturalmente, proteínas que têm como coenzima a forma ativa da vitamina B_6 (PLP) podem pertencer a uma das cinco principais classes que representam os enovelamentos mais comuns, e a maioria dessas enzimas atuamcomo dímeros. Apenas as do tipo I são bem caracterizadas, portanto informações estruturais acerca de variadas enzimas PLP dependentes contribuirão para o melhor entendimento dos outros grupos (SCHNEIDER et al., 2000, ELIOT; KIRSCH, 2004).

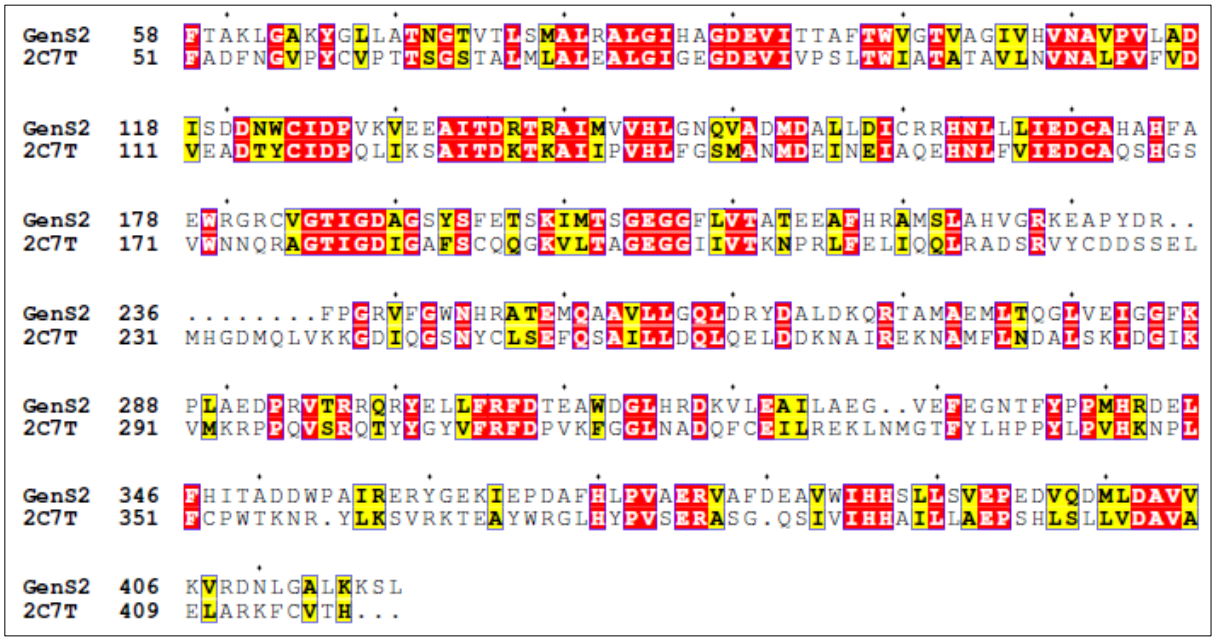


Figura 7. Alinhamento entre GenS2 e uma aminotransferase de butirosina, código PDB: 2C7T.
Foi utilizado o programa ESPript 3. Os resíduos em branco emoldurados em vermelho são resíduos idênticos; os resíduos em preto com fundo amarelo são diferentes, porém apresentam a mesma propriedade química, apresentando mais de 70% de similaridade; e os não emoldurados são diferentes.

1.4. Enzimas que atuam na posição C6' da biossíntese de gentamicina

Estudos apontam que a gentamicina A2 é o primeiro pseudo-trissacarídeo precursor do complexo gentamicina C (PARK, et al., 2008, GUO, et al., 2014). Após a ação de algumas enzimas, dentre elas GenD2 e GenS2, há a formação de gentamicina X2 que será o substrato precursor para duas vias biossintéticas paralelas. Em um dos ramos, há a formação final das gentamicinas $C1_a$ e $C2_b$, por outro lado, a gentamicina X2 pode ser metilada na posição C6'

pela GenK gerando G418, que é substrato para outra possível rota da mesma via biossintética e que, ao final, gerará as gentamicinas C1, C2 e $C2_a$ (GUO, et al., 2014, YU Y et al. 2017) (Figura 8). Essa etapa da via onde o G418 é o substrato precursor, ainda não está muito bem compreendida com relação à ordem e a função de algumas das enzimas desta etapa. Através de estudos de deleção gênica e verificação por espectrometria de massas, foi identificado que a enzima GenB2, PLP dependente, age na posição C6' da gentamicina $C2_a$ como uma epimerase sendo capaz de catalisar a conversão estereoquímica para a formação de gentamicina C2 (Figura 8).

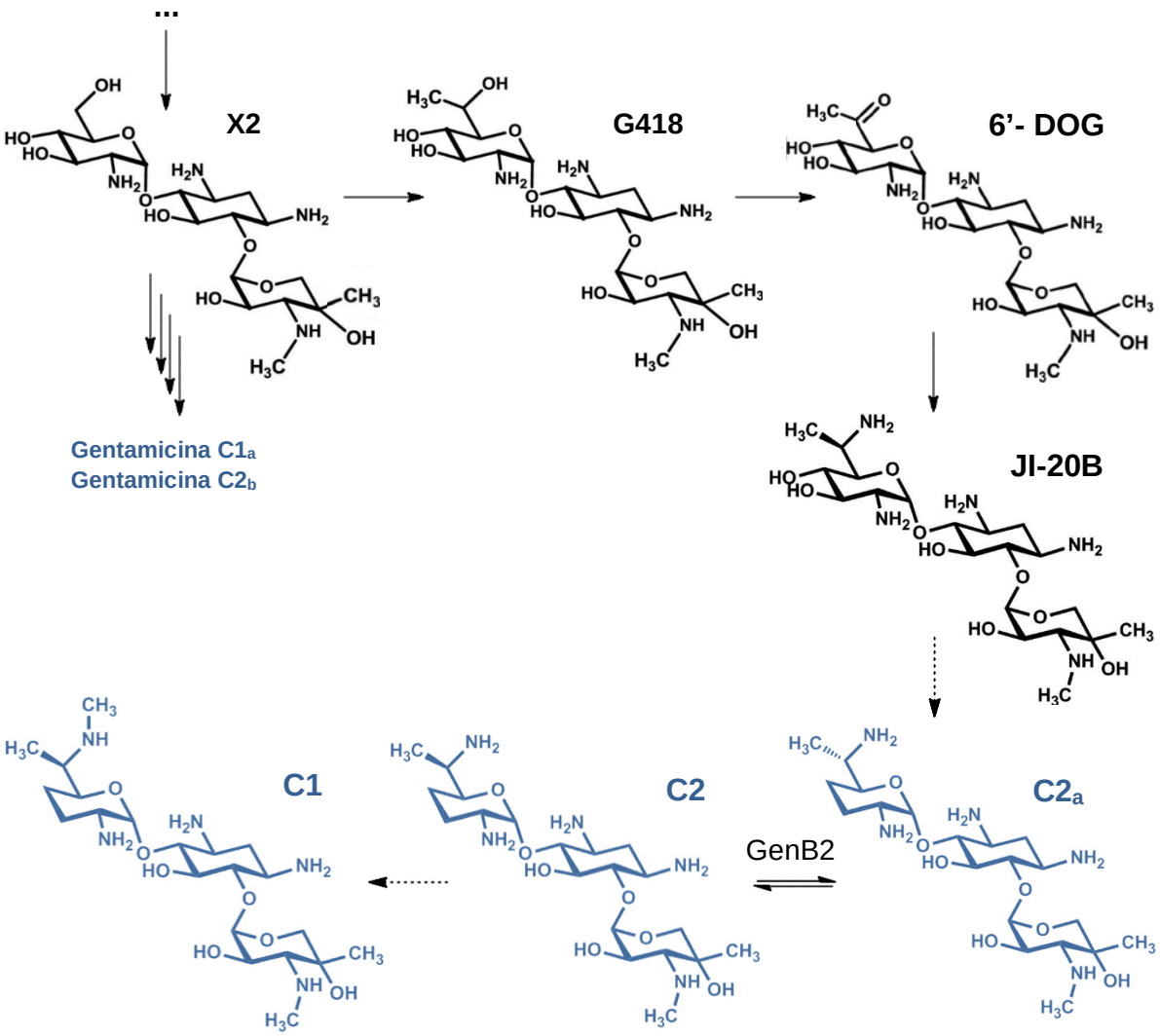


Figura 8. Continuação da via de biossíntese de gentamicina previamente mostrada na figura 5. A imagem mostra um dos ramos finais da via de biossíntese de gentamicina a partir da gentamicina X2.
A partir da gentamicina X2 se separam dois ramos, um formará as gentamicinas $C1_a$ e $C2_b$ e o outro ramo as gentamicinas $C2_a$, C2 e C1, todas evidenciadas em azul. A enzima GenB2 atua nas gentamicinas $C2_a$ e C2.
Modificado de: GUO et al, (2014).

Esse ramo da via de biossíntese de gentamicina ainda não está completamente elucidado e a posição de atuação de quatro enzimas PLP dependentes (GenB1, GenB2, GenB3 e GenB4) está sendo desvendada a partir de estudos funcionais deletérios (GUO, et al., 2014 e dados não publicados do grupo do Prof. Peter Leadlay, Universidade de Cambridge, UK). Aparentemente, apenas a GenB2 tem função de epimerase. Há também um baixo nível de promiscuidade das outras enzimas GenB em substituir a GenB1 na aminação do composto 6'desidro-oxi-G418, mas ainda não se sabe como e se a GenB2 poderia atuar nesta etapa. A informação estrutural destas enzimas acrescentará informação aos estudos funcionais e contribuirá para o entendimento total da etapa final de biossíntese dos principais componentes do complexo clínico da gentamicina.

Essas proteínas também têm sido estudadas em conjunto com o grupo de pesquisa do Prof. Peter F. Leadlay. Os protocolos para expressão heteróloga e para purificação, bem como a condição de cristalização da enzima GenB2 foram enviados para que pudéssemos reproduzi-los em nosso laboratório.

A enzima GenB2 (Uniprot: Q70KE6) apresenta 414 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 44589.40 Da. Acredita-se que a GenB2 seja uma epimerase aminotransferase PLP dependente, apresentando baixa similaridade com as enzimas Sis5 e GenB1.

GenB2 apresenta identidade de 29% em 83% de cobertura com uma isomerase de *Thermus thermophilus* (Código PDB: 2E7U), sem função biológica definida (Figura 9).

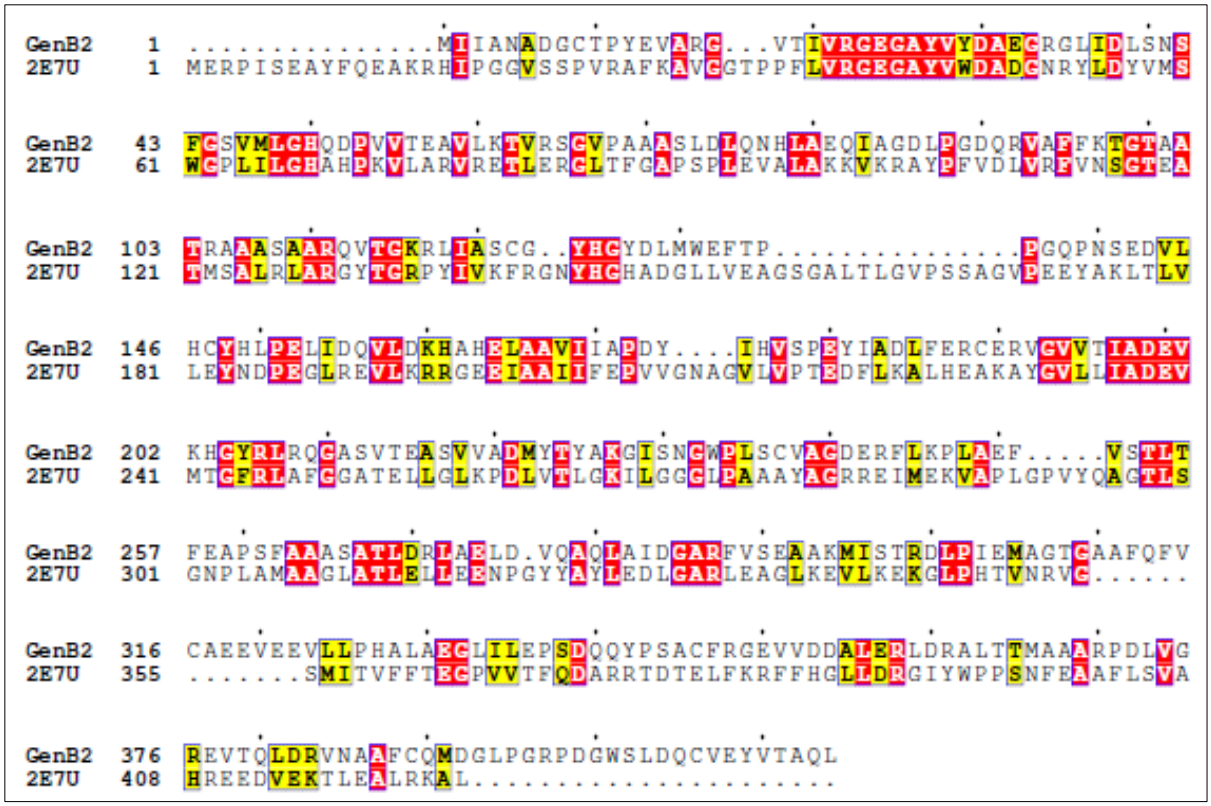


Figura **9**. Alinhamento entre GenB2 e uma isomerase de *Thermus thermophilus*, código PDB: 2E7U.
Foi utilizado o programa ESPript 3. Os resíduos em branco emoldurados em vermelho são resíduos idênticos; os resíduos em preto com fundo amarelo são diferentes, porém apresentam a mesma propriedade química, apresentando mais de 70% de similaridade; e os não emoldurados são diferentes.

2 OBJETIVOS

Com a intenção de compreender a rota de biossíntese da gentamicina e gerar informações que podem ser úteis na aplicação de biologia sintética, o objetivo deste trabalho foi estudar estruturalmente as enzimas GenD2, GenS2 e GenB2 em complexo com seus cofatores e também ligantes (GenD2 com NAD^+, GenS2 em complexo com PLP e GenB2 com PLP e ligantes).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Expressão e purificação das proteínas

Os genes referentes a GenD2, GenS2 e GenB2 foram clonados a partir de DNA genômico de *Micromonospora echinospora* DSM 43036 em sistema de expressão do tipo pET28a pelo grupo de Pesquisa do Prof. Peter Leadlay da University of Cambridge-UK, e nos foram gentilmente cedidos.

A transformação dos plasmídeos obtidos foi realizada por choque térmico em células competentes de *Escherichia coli*. Inicialmente, foi utilizada *E. coli* DH5α para a produção de estoque do plasmídeo cedido e, posteriormente, *E. coli* BL21(DE3) para a produção da proteína recombinante de interesse. Para cada tubo, aproximadamente 50 a 100 ng/µL dos plasmídeos foram incubados com 50 µL de células competentes, durante 10 min no gelo. O choque térmico foi realizado em banho maria a 42 ºC por 40s. Logo após, uma segunda incubação no gelo foi realizada por 5 min. Foram adicionados 100 µL de meio de cultura *Lysogeny Broth-Miller* (LB) aos tubos que foram, então, incubados no *shaker* a 37 ºC a 200 rpm por 1h. A suspensão celular, em seguida, foi plaqueada em ágar LB contendo canamicina (50 µg/mL) e incubada em estufa para o crescimento de colônias a 37 ºC *overnight*.

Para produção heteróloga das enzimas GenD2, GenS2 e GenB2, foi preparado um pré-inóculo a partir de uma colônia de cada construção em *E. coli* BL21(DE3), os quais foram crescidos em meio LB contendo o antibiótico canamicina a uma concentração final de 50 µg/mL, mantidos sob agitação constante de 200 rpm a 37°C *overnight*. Em seguida foi inoculado, a partir do pré-inóculo, 1% em 1L de LB fresco contendo canamicina (50 µg/mL). Essa cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até a leitura de OD_{600} atingir 0,6. Após atingir este valor de densidade ótica, a temperatura foi diminuída para 18°C e a cultura foi mantida a 1 h nessa temperatura para que fosse homogeneizada antes da adição de IPTG. A indução da expressão nos dois casos foi realizada pela adição de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,2 mM, por um tempo de indução de 12 a 18 h à 18°C. Após esse processo, os meios foram centrifugados a 6084.1 x g por 30 min e o *pellet* foi armazenado a -80°C.

Para a purificação das enzimas GenD2, GenS2 e GenB2, o *pellet* foi descongelado e diluído à proporção de 1:1 em tampão de lise, contendo 50 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl no pH 7,7. A este extrato celular foram adicionados fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), DNAse e lisozima a concentrações de 5 µM/mL, 50 µg/mL e 50 µg/mL respectivamente, seguido da incubação em gelo por 30 min. Posteriormente, foi realizada a lise celular com o auxílio de um sonicador ultrassônico (BransonSonifier), em 15 ciclos, intercalando 20 s de exposição e 20 s de descanso para que a amostra não viesse a esquentar, o que poderia danificar a proteína de interesse. O extrato celular foi centrifugado a 17744.7 x g por 60 min a 4 ºC para a separação das fases solúvel e insolúvel.

Para a purificação das enzimas, foram realizados dois passos de cromatografia utilizando o sistema ÄKTA *Purifier*. Para o primeiro passo, por cromatografia de afinidade, o lisado obtido após centrifugação foi injetado em uma coluna HisTrap IMAC HP 5ml (GE Healthcare Life Sciences) carregada com íons níquel, previamente equilibrada com o Tampão A (50 mM de Tris HCl, 100 mM de NaCl pH 7,7).

Como a proteína recombinante possui uma cauda de histidina (6xHis) que apresenta afinidade pelos íons de níquel presentes na coluna, a mesma fica retida. Então para sua eluição, foi realizado um gradiente linear de 500 mM de Imidazol utilizando o tampão B (50 mM de Tris HCl, 100 mM de NaCl e 500 mM de Imidazol no pH 7,7.). O método inicia-se com uma lavagem contendo 5% tampão B (25 mM de imidazol) para remover qualquer proteína contaminante que tenha se ligado fracamente à coluna e, em seguida, o gradiente linear continua até atingir 500 mM de imidazol (100% de tampão B).

Para aumentar o grau de pureza da proteína, foi realizada uma segunda cromatografia de exclusão por peso molecular, com o mesmo tampão A ou quando necessário, o tampão foi trocado nesta etapa para 50 mM de HEPES, 100 mM de NaCl, pH 7,0. As frações coletadas na cromatografia por afinidade foram transferidas para filtros de ultracentrifugação Amicon® para concentração até um volume final de 2 mL que foi injetado na coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 (*GE Healthcare Life Sciences*).

3.1.1 Expressão e purificação com selenometionina

Para a substituição dos resíduos de metionina da proteína por selenometionina foi realizado um protocolo utilizando a célula competente *E. coli* BL21(DE3) no meio mínimo M9 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Inicialmente foi preparado um estoque a 5X de meio M9, contendo 30 g/L Na_2HPO_4, 5 g/L KH_2PO_4, 5 g/L NH_4Cl e 2,5 g/L NaCl. Para produzir 500 mL de meio mínimo, foram adicionados 100 mL de M9 5X, 500 µL de $MgSO_4$ (1M), 10 mL de glicose 20%, 50 µL de tiamina 0,5%, 5 µL de solução a 100 mg/mL de canamicina e completado para 500 mL com água ultrapura esterilizada.

A inserção do plasmídeo foi realizada por transformação, utilizando o método de choque térmico, e plaqueada em meio ágar LB. Posteriormente, foi preparado um pré-inóculo de uma colônia em meio LB com canamicina a 50 µg/mL *overnight*. A suspenção celular em meio LB foi centrifugada por 2 min a 13000 x g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 50 mL de meio mínimo. Esse processo foi repetido a fim de retirar o excesso de meio LB. Foi realizado outro pré-inóculo em 500 mL de meio mínimo incubados em *shaker* a 37 ºC a 200 rpm por 6 h, 50 mL desse preparado foram adicionados em 500 mL de meio mínimo em erlenmeyer de 2L e as células foram crescidas em *shaker* a 37 ºC a 200 rpm até atingir a D.O. de 0,3 em 600 nm. Após essa etapa, a temperatura do *shaker* foi reduzida para 18 ºC e foram adicionados L-aminoácidos ao meio: 0,1 g/L dos aminoácidos L-lisina, L-fenilalanina, L-treonina e 0,05 g/L de L-isoleucina, L-leucina, L-valina e L-selenometionina. Após completa incorporação dos aminoácidos ao meio foi adicionado 1mM de IPTG e o tempo de indução foi de 12 a 18h. Os meios foram centrifugados a 6084.1 x g por 30 min e o *pellet* foi armazenado a -80 °C.

Para a purificação, foi utilizado o mesmo método descrito para as enzimas sem adição de selenometionina; porém, ao tampão (50 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl no pH 7,7) foi adicionado 0,1 mM de TECEP (Tris (2-carboxietil) fosfina), um potente agente redutor.

3.1.2 Gel Filtração Analítica

A análise da massa molecular em solução da proteína GenD2 foi realizada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna calibrada. A coluna utilizada foi a HiLoad 16/60 Superdex 200, usando gel filtration kit HMW e LMW (GE Healthcare), contendo

anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritina (440 kDa) e azul de dextran (>2,000,000 M_r), sendo que esse último foi injetado separadamente para determinar o volume morto da coluna. A corrida foi realizada em tampão 50 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl pH 7,7. A amostra foi injetada após etapa de purificação por afinidade a uma concentração aproximada de 5mg/mL, com fluxo de 1mL/min. Utilizando os valores prévios de calibração da coluna foi possível determinar a massa molecular da proteína em solução.

3.2. Confirmação da presença de proteína

Para confirmar a presença da proteína após cada etapa da purificação, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% ou 15%, corado com Coomassie Brilliant Blue. As frações contendo a proteína de interesse foram concentradas em filtros de ultracentrifugação AmiconUltra-15 (Millipore) até atingir a concentração mínima de 15mg/mL, para permitir experimentos posteriores. A concentração foi medida em BioDrop µLITE (Analítica) e as proteínas foram armazenadas em alíquotas a uma temperatura de -80°C.

3.3. Ensaio de deslocamento térmico

Com a utilização do experimento de *Thermofluor* ou *Differencial Scanning fluorimetry* (DSF) foi realizada uma análise dos possíveis ligantes para a enzima GenD2 para posterior realização de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), a fim de analisar promiscuidade da enzima aos aminoglicosídeos testados. Foram utilizados os aminoglicosídeos canamicina, G418, sulfato de gentamicina, apramicina, sisomicina, neomicina, amicacina e paromamina. Como controle foi utilizado o tampão em que a proteína e os aminoglicosídeos estavam diluídos (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,0) e como controle negativo o antibiótico Meropeném, devido a grande diferença estrutural com aminoglicosídeos. Em uma placa de PCR de 96 poços (Bio-Rad), foi adicionado em cada poço 25µL de volume final, contendo 50 mM do tampão, o fluoróforo *SYPRO® Orange* 5X (Life Science), 10µM de proteína e 125 µM de cada ligante. Com a utilização do termociclador (Bio-Rad CFX Connect) com filtros de detecção da excitação variando entre 450 - 580 nm, um intervalo de temperatura de 25 ºC a 95 ºC a um aumento de linear de 0,5 ºC por minuto. Os valores de T_m foram determinados com o programa Bio-Rad CFX Manager. O ΔT_m foi calculado subtraindo a T_m da proteína (em ausência de ligante) da T_m na presença de ligante ($\Delta T_m = T_{m\ Lig} - T_{m\ sem\ Lig}$).

3.4. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A interação entre a enzima GenD2 e os aminoglicosídeos selecionados no experimento de *thermofluor* foi testada por Calorimetria de Titulação Isotérmica (CHAIRES, 2008). Também foi realizado um teste de confirmação da afinidade com os ligantes NAD^+, NADH, $NADP^+$ e NADPH ambos com utilização do microcalorímetro iTC200 (Microcal) a 25 °C. Foram realizadas 18 injeções para a titulação, com 180 s de espaçamento e 400 rpm de agitação. A proteína se apresentava em tampão HEPES a 50 mM e 100 mM de NaCl, pH 7,0. Os ligantes foram diluídos no mesmo tampão a fim de eliminar ruído. Foram utilizadas variações na concentração de proteína de 100 µM a 150 µM na célula e tituladas contra as concentrações de 2 mM a 10 mM dos possíveis ligantes na seringa (canamicina, sulfato de gentamicina, sisomicina, neomicina, NAD^+, NADH, $NADP^+$ e NADPH). Foram realizadas corridas de titulação de tampão na célula contra ligantes na seringa e subtraídos dos dados ainda sem tratamento a fim de eliminar possíveis ruídos.

Os dados foram processados com Origin 5.0 (Microcal iTC200 software) usando o modelo de ligação de um sítio ou modelo de ligação sequencial com 2 sítios de ligação.

3.5. Cristalização das proteínas

Para cristalização de proteínas foi utilizado o sistema de gota sentada, com condições padronizadas e comercializadas pela Hamptom Research e JENA bioscience. Nesta etapa utilizou-se a plataforma de cristalização automatizada com o robô Oryx 4 (Douglas Instruments), presente em nosso laboratório (LBEA – Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada). Foram utilizadas placas de 96 poços MRC2 (Swissci) onde foram depositados 30µL de condição de cristalização em cada reservatório, e cada gota era composta por 0,3µL de condição de cristalização e 0,3µL de solução de proteína a 10 mg/mL com seu respectivo ligante a 5mM (NAD para GenD2 e PLP para GenS2). Ao serem obtidos os primeiros *hits*, estes foram otimizados variando parâmetros como pH, concentração de proteína e/ou precipitante em placas VDX (Limbro) de 24 poços (Hampton Research). Nesta placa foi utilizado o sistema de gota suspensa, utilizando 400µL de condição de cristalização em cada poço e em lamínulas siliconadas, foram pipetadas três gotas variando a proporção entre proteína e condição (1:1, 1:2 e 2:1) as quais foram invertidas sobre os poços da placa. Para prevenir a evaporação da solução de cristalização para o meio externo, o sistema foi vedado com óleo mineral de alta viscosidade. As placas foram armazenadas a 16 ºC e observadas

periodicamente em lupa estereomicroscópica para o acompanhamento do crescimento de cristais.

3.6. Coleta e processamento de dados de difração por Raios X

A coleta dos dados de difração por Raios X foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) junto ao CNPEM, em Campinas, Brasil e no *Deutsche Elektronen-Synchrotron* (DESY), PETRA III em Hamburgo, Alemanha.

O processamento de dados de difração por raios X foi realizado pelo programa MOSFLM (LESLIE, 2006) ou XDS (Kabsch, 2010). Os dados foram escalonados pelo programa SCALA (Evans, 2006) ou AIMLESS (EVANS; MURSHUDOV, 2013) presente no pacote de programas do CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994) (WINN et al, 2011).

3.7. Resolução de estruturas e refinamento cristalográfico

Para a resolução das estruturas por substituição molecular ou faseamento experimental foram utilizados os programas Molrep (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010) ou Phaser (MCCOY, 2007), presentes no pacote de programas do CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994). Além disso, foi utilizado o pacote de programas Phenix (ADAMS, et al., 2011) para tentativas de determinação da estrutura por SAD (Single Anoumalous Dispersion).

O refinamento cristalográfico das estruturas foi efetuado pelos programas REFMAC (MURSHUDOV, et al., 2011) ou pelo Phenix (ADAMS, et al., 2011) A inspeção e a construção dos modelos foram efetuadas pelo programa Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) utilizando mapas de densidade eletrônica $2F_o$-F_c, F_o-F_c e *omit map*.

As estruturas cristalográficas finais foram analisadas e visualizadas nos programas Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) e PyMol (DeLANO, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação

A partir da chegada dos plasmídeos referentes a GenD2, GenS2 e GenB2 em pET28a, as enzimas foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) e posteriormente purificadas. Foram efetuadas as expressões das proteínas utilizando 4 litros de cultura em meio LB, resultando numa quantidade satisfatória de proteína purificada ao final do processo (aproximadamente entre 6 e 7 mg por litro de cultura). As proteínas foram purificadas utilizando o tampão A (50 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl no pH 7,7), já estabelecido pelo grupo colaborador (HUANG, et al. 2015) e posteriormente também foram purificadas em 50 mM HEPES e 100 mM NaCl no pH 7,0 para realização de experimentos que impossibilitavam a utilização de Tris HCl.

4.1.1 GenD2

A enzima GenD2 foi purificada em coluna de afinidade por cauda de histidina e eluiu em aproximadamente 40% de tampão B (200 mM de imidazol). A figura 10 mostra o resultado da purificação por afinidade em SDS-PAGE. Nela é possível identificar a presença significativa de proteína no *pellet* e uma fração um pouco menor no lisado; porém, nas frações de eluição nota-se a maior quantidade da enzima de interesse com pouco contaminante, por este motivo, somente essas frações foram coletadas e concentradas para serem injetadas em coluna de exclusão molecular, resultado apresentado na figura 11.

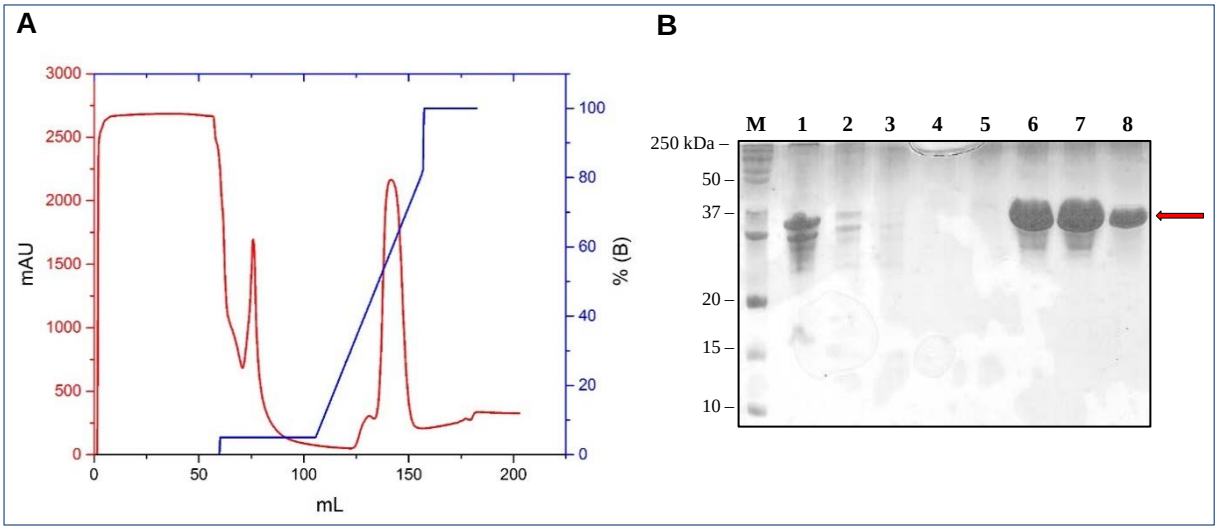


Figura 10. Purificação por afinidade da proteína GenD2.
A – Cromatograma com pico de eluição da proteína em aproximadamente 40% do tampão de ligação (200 mM de imidazol). **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 15%. Resultado da purificação por afinidade da proteína GenD2. M- Marcador molecular; 1- *Pellet* ; 2- Lisado; 3- *Flow through*; 4- 5% de tampão B; 5- possível contaminante; 6 a 8- Frações coletadas evidenciando bandas aproximadamente na altura do peso da enzima, confirmando sua presença.

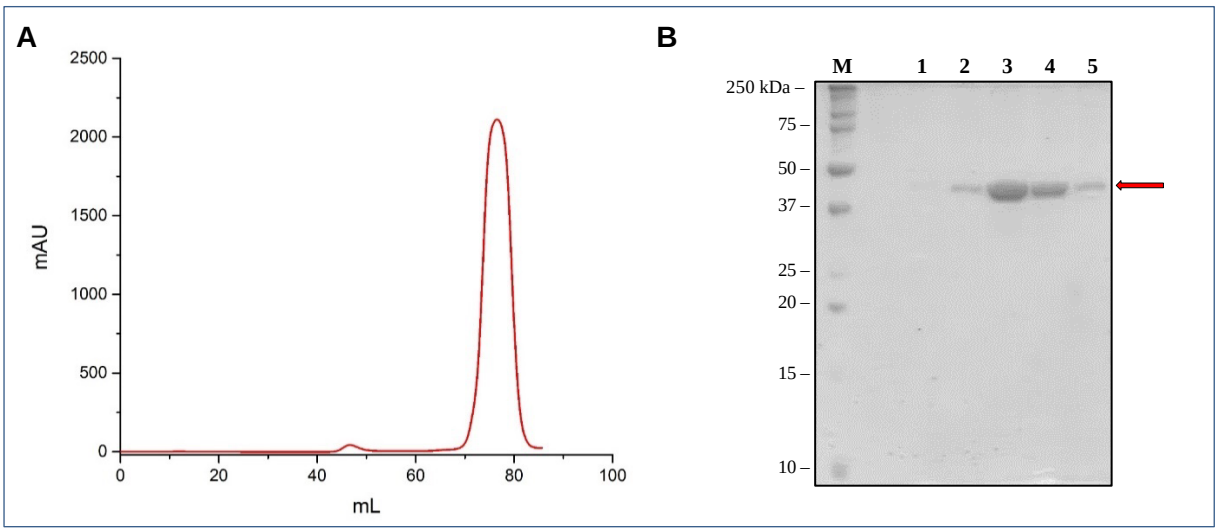


Figura 11. Purificação por exclusão molecular da proteína GenD2.
A – Cromatograma com pico de eluição da proteína. **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 15%. M - Marcador molecular; 1 a 5- Frações coletadas, evidenciando bandas aproximadamente no peso da proteína, confirmando a presença da proteína pura.

Após a confirmação da presença da proteína purificada na amostra obtida da gel filtração (Figura 11), em concentração e pureza aceitáveis, as frações foram coletadas e o resultado foi centrifugado a 20579,6 x g, em filtros AmiconUltra-15, até atingir concentração superior a 15 mg/mL. A proteína foi armazenada em tubos de 600 µL a -80 °C.

4.1.1.1 Expressão com selenometionina

Na cristalografia, para que seja desvendada a estrutura de uma proteína pelo método de substituição molecular, é necessário que exista algum modelo tridimensional já resolvido com relativamente alta identidade com a proteína em estudo, para que este seja utilizado como auxílio para obtenção da fase, permitindo assim chegar a estrutura final da molécula com estatísticas bastante aceitáveis. No caso da enzima estudada, GenD2, não há depositada no *Protein Data Bank* nenhuma molécula com identidade suficiente. Desta maneira, para contornar esse problema, utilizou-se o método de faseamento experimental, que consiste em encontrar a fase experimentalmente, através do auxílio de sinais anômalos, permitindo a resolução de estruturas inéditas. Esse método baseia-se na incorporação de metais de alto peso atômico na estrutura da proteína. Existem algumas formas de incorporação desses metais, sendo que um dos métodos utilizados no presente trabalho foi *soaking*, que consiste em mergulhar o cristal proteico em uma solução contendo moléculas com átomos de alto peso atômico, geralmente com NaI, KI, NaBr e KBr. Esses átomos podem se ligar inespecificamente entre as moléculas na rede cristalina (BLUNDELL; JOHNSON, 1976, MIZUTANI, et al., 2014). Foi utilizada também a substituição dos resíduos de metionina já presentes na proteína por selenometionina pelo método de incorporação através de expressão em meio mínimo M9 e com a adição suplementar de selenometionina (SeMet) (FUSINITA, 2003, WALDEN, 2010).

A presença de átomos que tenham peso atômico maior do que os átomos frequentemente encontrados em uma molécula de proteína altera o espalhamento da radiação, em comparação com a macromolécula em seu estado natural. A partir desses sinais anômalos gerados, torna-se possível a obtenção das fases da molécula, resultando na construção do mapa de densidade eletrônica (TAYLOR, 2010).

Para obtenção da enzima GenD2 com incorporação de selênio foi realizada a expressão desta proteína em células *E. coli* BL21(DE3), utilizando 4 litros de meio mínimo M9. Utilizamos o protocolo com a célula BL21 (DE3), pois quando foi utilizada a célula auxotrófica para metionina (B834(DE3)) o rendimento foi extremamente baixo a ponto de inviabilizar experimentos futuros. Apesar do uso da cepa auxotrófica permitir incorporação de aproximadamente 100% de selenometionina, existe a desvantagem no rendimento, uma vez que há expressiva queda na produção de proteína, apresentando de 15% a 20% do rendimento da proteína nativa (WALDEN, 2010). Portanto, apesar de não garantir a completa substituição das metioninas por selenometioninas, o método com as células competentes BL21(DE3)

(FUSINITA, 2003) acabou se tornando viável, com produção de proteína em quantidade semelhante às produções da enzima nativa. Proteínas que contém selenometionina são mais sensíveis a oxidação, podendo alterar solubilidade e hidrofobicidade caso estejam presentes na superfície da molécula. Na tentativa de reduzir os efeitos adversos que podem ser causados pela modificação nos resíduos de aminoácidos é necessária a adição de um agente redutor (WALDEN, 2010), no caso foi utilizado TCEP (Tris (2-carboxietil) fosfina).

As figuras 12 e 13 apresentam os resultados da purificação por afinidade e, em seguida, por exclusão molecular, com os mesmos métodos utilizados para a purificação das proteínas nativas. O cromatograma evidencia o mesmo comportamento da enzima nativa, porém com menor rendimento, como esperado, já que o método de inibição de metionina em meio mínimo apresenta entre 30% a 80% do rendimento anteriormente observado com a proteína nativa (WALDEN, 2010). As imagens dos géis de poliacrilamida com bandas entre 50 kDa e 37 kDa evidenciam presença da proteína de interesse.

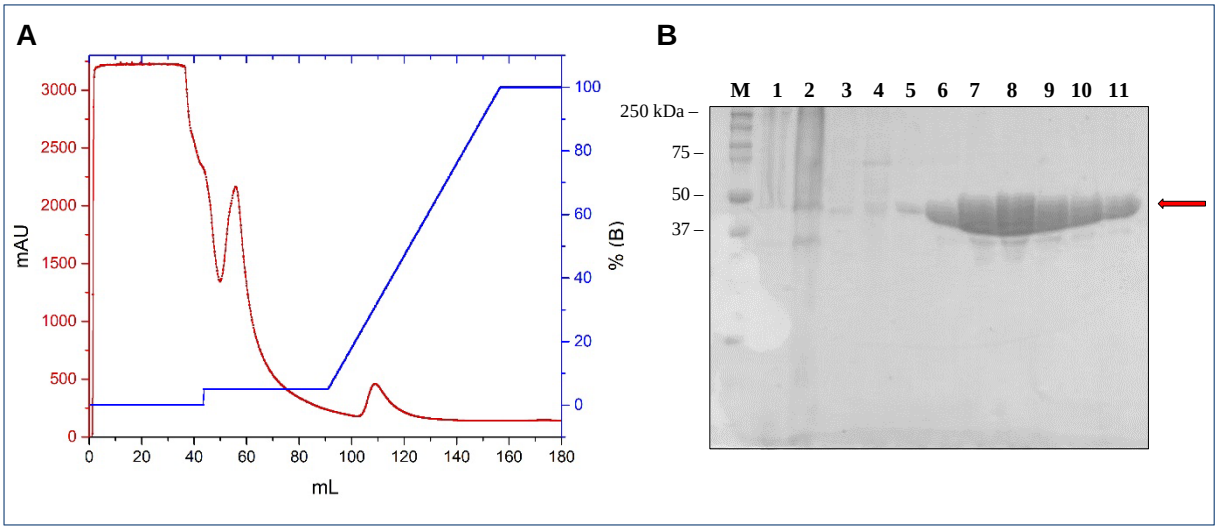


Figura 12. Purificação por afinidade da proteína GenD2 com selenometionina.
A - Cromatograma evidenciando o pico de eluição da proteína com selenometionina. **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 12%. M- Marcador molecular; 1- *Pellet* ; 2- Lisado; 3- *Flow through*; 4- 5% de tampão B; 5 a 11- Frações coletadas evidenciando bandas com mesmo padrão da enzima não modificada, confirmando a presença da proteína.

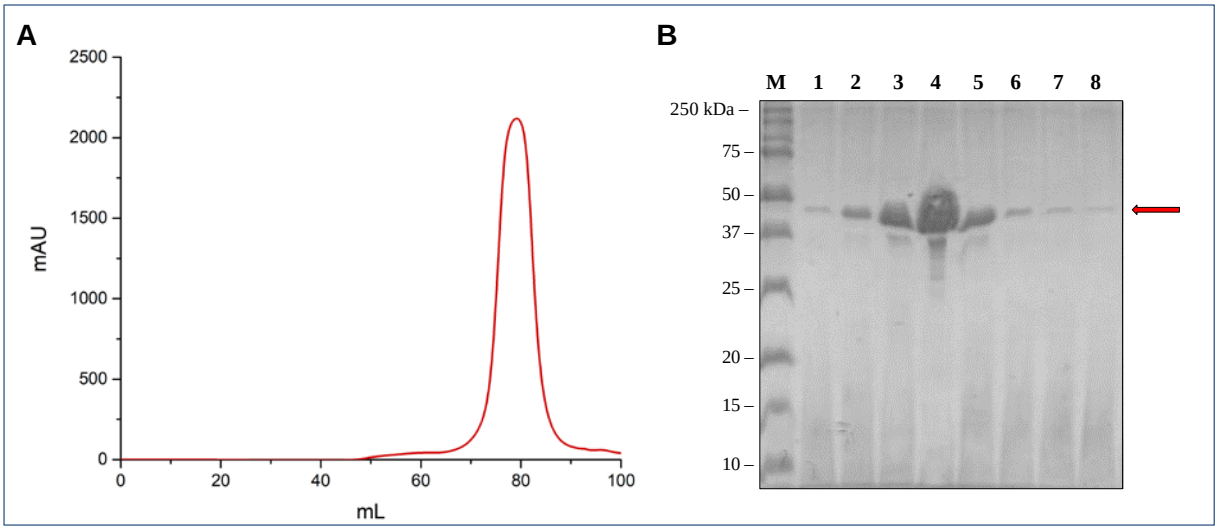


Figura 13. Purificação por exclusão molecular da proteína GenD2 com selenometionina.
A - Cromatograma evidenciando o pico de eluição da proteína. **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 12%. M - Marcador molecular; 1 a 8- Frações coletadas, evidenciando bandas com o mesmo padrão anterior, confirmando a presença da proteína.

Para determinação da massa molecular da enzima GenD2 foi realizada uma cromatografia por exclusão molecular em coluna 16/60 Superdex 200 previamente calibrada com cinco proteínas de massa molecular conhecida (anidrase carbônica, ovoalbumina, conalbumina, aldolase e ferritina). A proteína GenD2 apresentou o padrão de eluição normalmente observado e seu tempo de retenção foi de 66,70 mL (Figura 14). De acordo com a calibração feita a partir das proteínas de massa conhecida, a enzima GenD2 no tampão 50 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl, pH 7,7 apresentou massa molecular de 145,81 kDa. Como essa enzima, no estado monomérico apresentaria massa molecular de 36,50 kDa portanto, a massa apresentada em solução equivale a aproximadamente quatro moléculas, sendo assim, nestas condições a GenD2 se apresenta como um tetrâmero, corroborando o estado oligomérico para várias outras desidrogenases descritas na literatura (EVENTOFF; ROSSMANN, 1976).

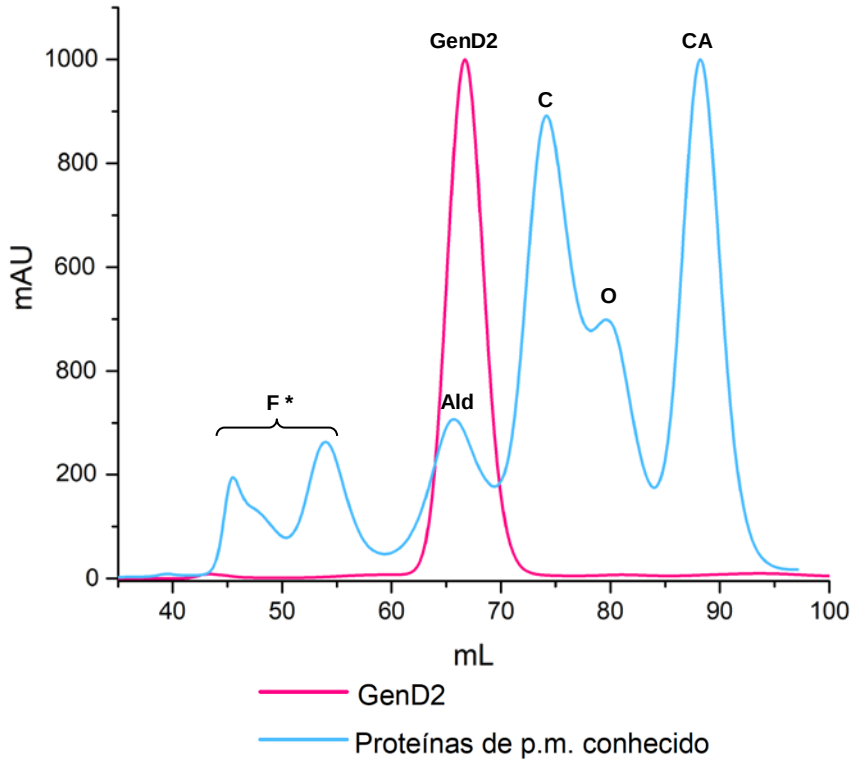


Figura 14. Gel filtração analítica em coluna 16/60 Superdex 200 da GenD2 (145,81 kDa) e dos marcadores moleculares: **F** - Ferritina (440 kDa), **Ald** - aldolase (158 kDa), **C** - conalbumina (75 kDa), **O** - ovoalbumina (43 kDa) e **CA** - anidrase carbônica (29 kDa). *****De acordo com o manual *Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare)*, 2011, o padrão de eluição da ferritina pode conter dois picos que representam estados oligoméricos diferentes.

4.1.2 GenS2

Para a expressão e purificação da enzima GenS2, o processo utilizado foi o mesmo realizado para a GenD2 nativa. A eluição da GenS2 ocorreu em 20% de tampão B (100 mM de imidazol). A eluição desta proteína ocorre a uma concentração mais baixa de tampão B do que a enzima GenD2 podendo indicar que a cauda de histidina no seu N-terminal pode estar menos exposta que a cauda da GenD2. A análise do SDS-PAGE revela que há maior quantidade de proteína no *pellet* quando comparado ao *pellet* da purificação por afinidade da GenD2, porém, na eluição a enzima se apresentou em grande quantidade e alto grau de pureza (Figura 15). Desta forma, as frações purificadas foram coletadas e utilizadas para a próxima etapa de centrifugação. A figura 16 mostra o resultado da cromatografia por exclusão molecular e a confirmação por SDS-PAGE.

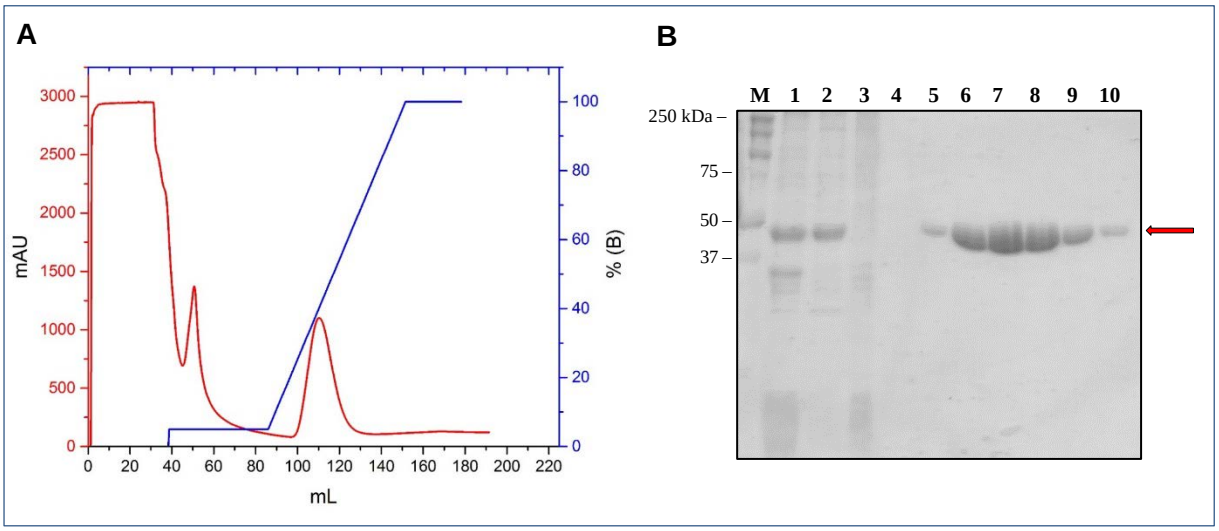


Figura 15. Purificação por afinidade da proteína GenS2.
A - Cromatograma indicando o pico de eluição da proteína em aproximadamente 20% do tampão de ligação (100 mM de imidazol). **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 12% Resultado da purificação por afinidade da proteína GenS2. M - Marcador molecular; 1- *Pellet* ; 2- Lisado; 3- *Flow through*; 4- 5% de tampão B; 5 a 10- Frações coletadas evidenciando bandas em aproximadamente 46kDa, confirmando a presença da proteína.

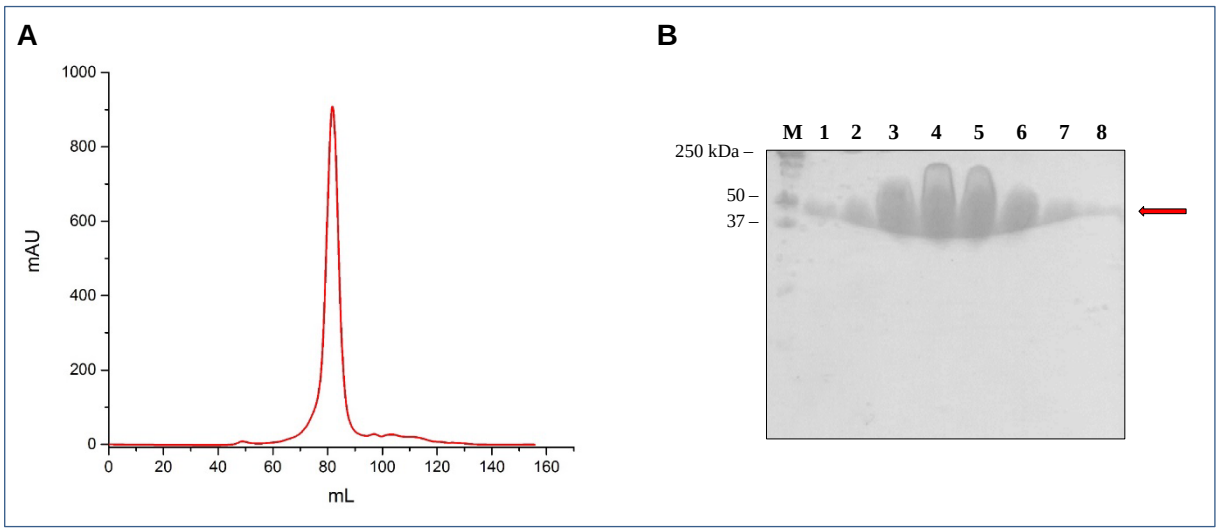


Figura 16. Purificação por exclusão molecular da proteína GenS2.
A - Cromatograma indicando o pico de eluição da proteína. **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 12%. Resultado da purificação por exclusão molecular da proteína GenS2. M - Marcador molecular; 1 a 8- Frações coletadas, evidenciando bandas em aproximadamente 46kDa, confirmando a presença da proteína.

4.1.3 GenB2

Foi realizada expressão e purificação da enzima GenB2 (Figura 17), utilizando o mesmo tampão das enzimas GenD2 e GenS2 (50 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl no pH 7,7), tampão este comumente utilizado para purificação de proteínas da via de biossíntese de gentamicina (GUO, J., et al. 2014).

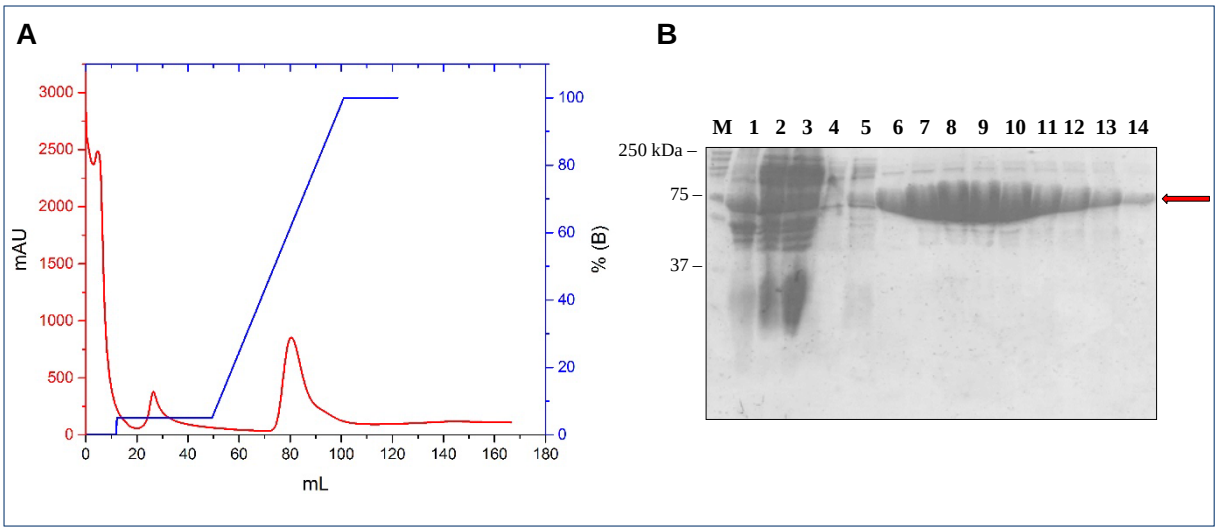


Figura 17. Purificação por afinidade da proteína GenB2.
A - Cromatograma com o pico de eluição da proteína em aproximadamente 50% do tampão de ligação (250 mM de imidazol). **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 15%. Resultado da purificação por afinidade da proteína GenB2, M - Marcador molecular; 1- *Pellet* ; 2- Lisado; 3- *Flow through*; 4- 5% de tampão B; 5 – fração do pico descartada; 6 a 14 - Frações coletadas evidenciando presença da proteína.

Na purificação por exclusão molecular foram obtidos dois picos de intensidade em pontos com tamanhos diferentes. Ao realizar o SDS-PAGE foi possível observar que a GenB2 estava presente em ambos picos (Figura 18). Como ainda não tínhamos muitas informações a respeito da proteína, este resultado poderia indicar que a enzima estava presente em estados oligoméricos diferentes, ou então que o primeiro pico poderia representar a enzima agregada por alguma adversidade na etapa de purificação. Devido a possibilidade do primeiro pico representar agregados proteicos, somente o segundo pico foi coletado. Sabe-se que a presença de proteína agregada pode inviabilizar o processo de cristalização (PATRO; PRZYBYCIEN, 1996). Assim, mesmo com a exclusão da amostra do primeiro pico, a quantidade de proteína ainda foi satisfatória para experimentos posteriores de cristalização.

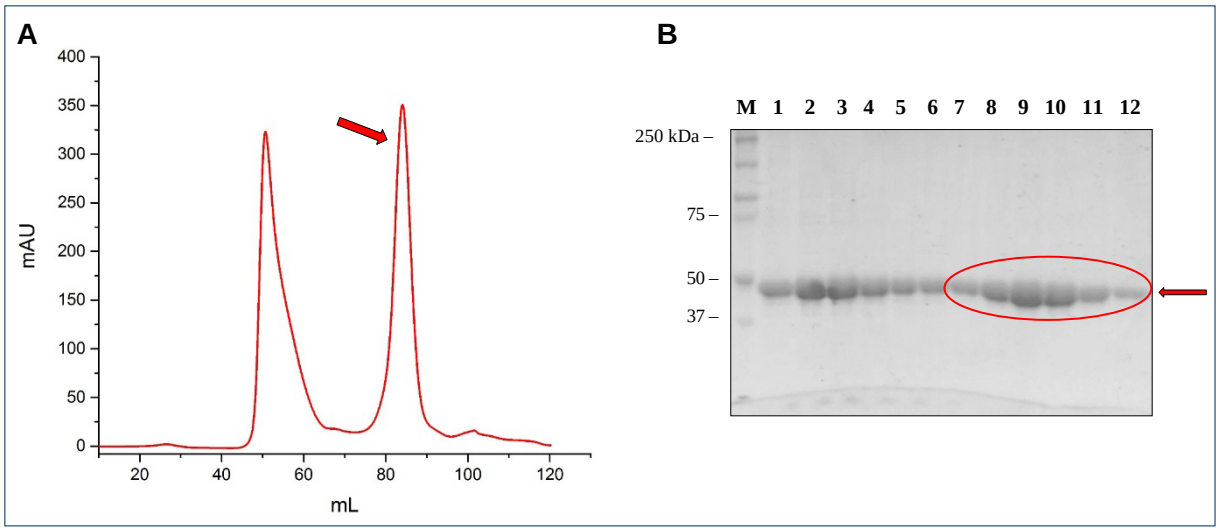


Figura 18. Purificação por exclusão molecular da proteína GenB2.
A - Cromatograma da purificação, a seta indica o pico coletado. **B** - Eletroforese em SDS-PAGE 15%. Resultado da purificação por exclusão molecular da proteína GenB2. M - Marcador molecular; de 1 a 6 correspondem ao primeiro pico, e de 7 a 12 correspondem ao segundo pico, o círculo indica as frações armazenadas.

4.2 Ensaio de deslocamento térmico

Existem muitas evidências de que as enzimas das vias de biossíntese de aminoglicosídeos são promiscuas, atuando em várias etapas da mesma via (HUANG et al., 2007, PARK et al., 2011). HUANG et al. (2015). Entretanto, através de estudos, foi provada a exclusividade das enzimas GenD2 e GenS2 na posição C3” da gentamicina A2 e verificou que nenhuma outra enzima do mesmo microrganismo é capaz de atuar nessa posição. Aparentemente, estas também não são necessárias em outra etapa desta mesma via, porém, podem atuar oxidando e aminando substratos de outras vias, como as de canamicina B e tobramicina, caso sejam inseridas nos organismos produtores destes antibióticos ou realizados ensaios enzimáticos. A partir destas informações, procuramos investigar indiretamente se a enzima GenD2 poderia atuar como desidrogenase em outros aminoglicosídeos e ser capaz de modificar antibióticos já existentes. Para tal, realizamos previamente um ensaio de deslocamento térmico por *thermofluor* para selecionar aminoglicosídeos para a realização de Calorimetria de Titulação Isotérmica.

Com os resultados de *thermofluor* esperamos pressupor alguma interação baseada na estabilidade térmica que algum aminoglicosídeo pode vir a exercer sobre a proteína. Foram

utilizados os antibióticos canamicina, G418, sulfato de gentamicina, apramicina, sisomicina, neomicina, amicacina e paromamina para análise.

A técnica de *Thermofluor* utiliza fluoróforos que se ligam às regiões hidrofóbicas da proteína; normalmente, quando a mesma se encontra devidamente enovelada, não há muita exposição dessas regiões. Entretanto, conforme a temperatura aumenta, há o gradual desenovelamento da proteína, exibindo assim regiões de hidrofobicidade, onde os fluoróforos se ligam e emitem fluorescência. Compostos que estabilizem o estado enovelado da proteína apresentarão valores de T_m (temperatura de *melting*) mais elevados. Além disso, a energia livre de Gibbs (ΔG) está correlacionada positivamente com a T_m da proteína, eventos de ligação geralmente aumentam o ΔG, levando a um aumento na T_m (CIULLI; ABELL, 2007). Portanto, é uma técnica preliminar útil para observação de interação de possíveis ligantes.

No gráfico apresentado na figura 19, a curva em preto representa o tampão em que a proteína se encontra (50 mM HEPES e 100 mM NaCl no pH 7,0) e o antibiótico carbapenêmico meropeném, que foi utilizado como controle negativo, é representado pela curva azul claro. As demais curvas coloridas representam os antibióticos aminoglicosídeos testados.

As curvas representam o desenovelamento da proteína de acordo com o aumento da temperatura (Figura 19). Neste caso, podemos notar que a curva em rosa, que representa o antibiótico Sulfato de Gentamicina, um complexo composto pelas gentamicinas C1, $C1_a$ e C2, é o composto que mais estabilizou a proteína dentre os testados, apresentando uma T_m de 62,50 ºC, com um ΔT_m de 10 ºC. Esse resultado é esperado, já que as moléculas do composto terapêutico da gentamicina estão mais próximas estruturalmente do próprio substrato da enzima, já que se trata do mesmo antibiótico. Os antibióticos canamicina e sisomicina vêm em seguida, apresentando T_m de 60,50 ºC, um ΔT_m. de 8 ºC, um valor próximo do Sulfato de gentamicina, indicando uma grande possibilidade de interação. Apramicina, neomicina, amicacina e G418 apresentaram T_m por volta de 59 º C (ΔT_m 6,5 ºC), e paromamina com T_m de 57 ºC que mesmo tendo o menor valor se apresentou maior que a T_m do tampão e do controle negativo (T_m de 52,50 ºC e 53 ºC, respectivamente) com um ΔT_m de 4,5 ºC, ainda uma mudança significativa de estabilidade térmica. Estes resultados mostram que os aminoglicosídeos testados apresentam algum tipo de interação com a enzima GenD2.

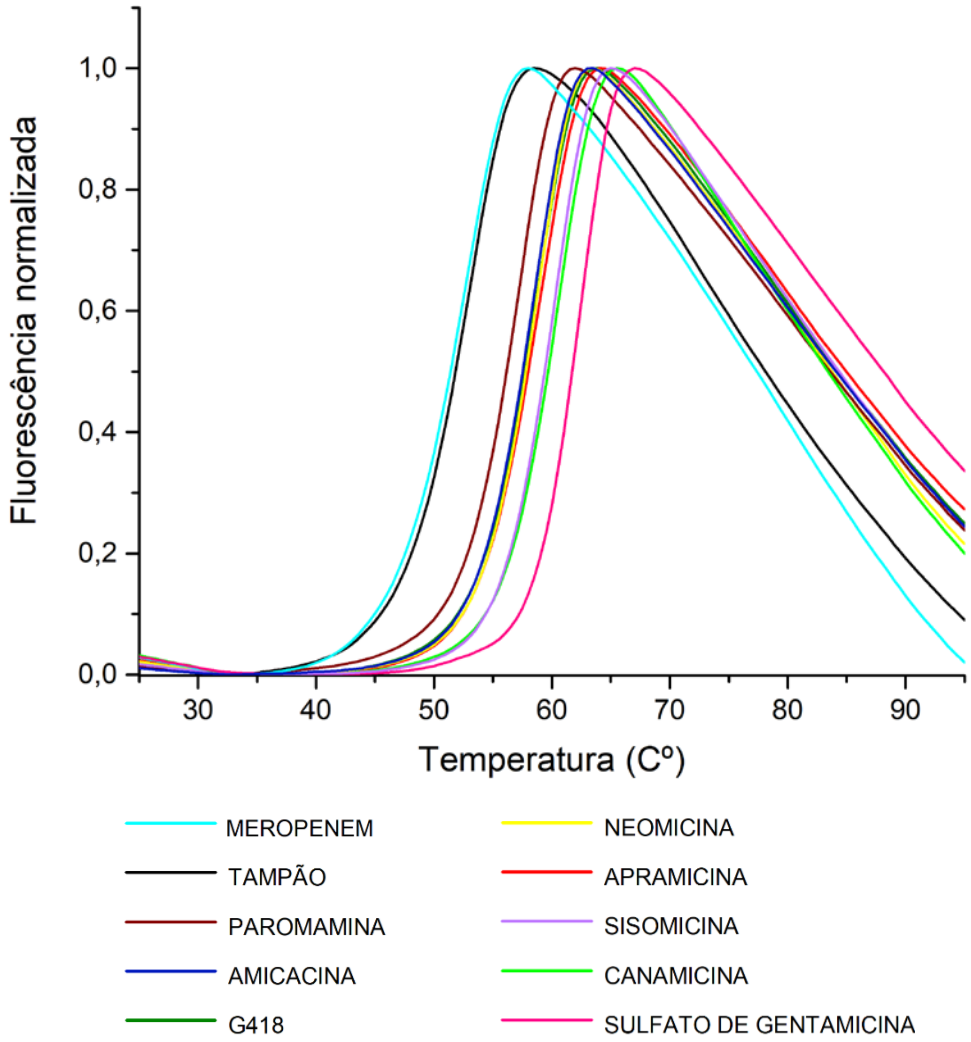


Figura 19. Curvas de desenovelamento térmico da GenD2 realizada pelo experimento de *Differencial Scanning fluorimetry*. Como controle negativo foi utilizado o meropenem e como controle positivo o tampão (50 mM HEPES e 100 mM NaCl no pH 7,0). Os aminoglicosídeos testados apresentaram ΔT_m de 4 ºC até 10 ºC, o que evidencia interação entre todos os aminoglicosídeos testados e a GenD2.

Qualquer conclusão referente ao motivo da estabilidade térmica apresentada entre a enzima GenD2 e os antibióticos aminoglicosídeos obtido através desta técnica é extrapolar os resultados, pois sem a estrutura molecular da proteína não podemos afirmar tal interação. Com o intuito de unir provas de interação, utilizamos os antibióticos canamicina, sulfato de gentamicina, sisomicina e neomicina para a realização da calorimetria de titulação isotérmica.

4.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

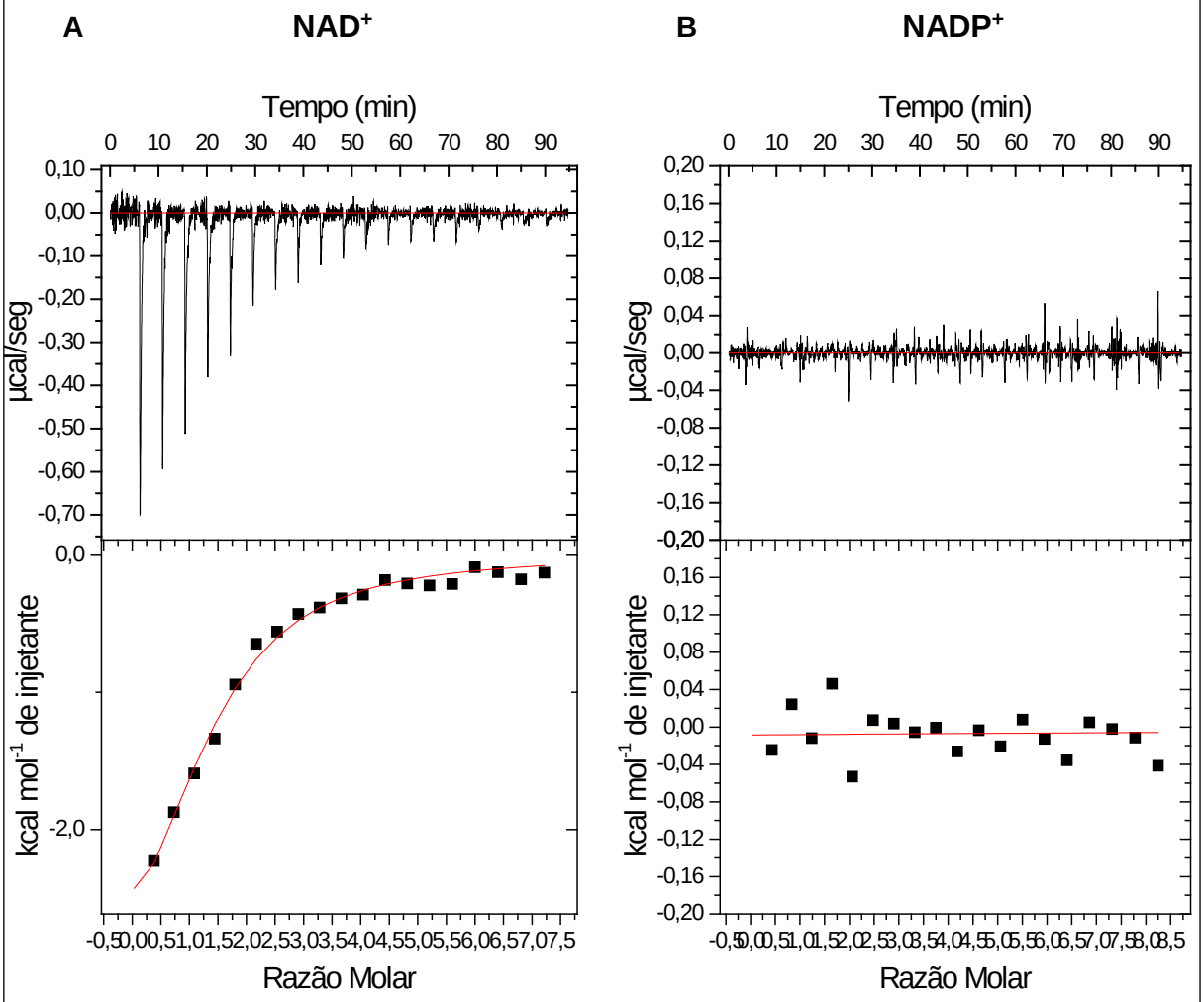
A técnica de ITC mede a energia liberada ou absorvida de uma reação química entre dois componentes em temperatura constante, baseado no fato de que em toda interação molecular há troca de energia em forma de calor. Uma concentração de ligante é adicionada à uma célula contendo uma concentração definida de proteína. A cada injeção do ligante é obtido um pico, e o calor associado à interação é medido por sua área. A cada injeção, a disponibilidade de proteína não complexada diminui até atingir saturação; desta forma os picos vão diminuindo até que se atinja a saturação completa (LEAVITT, 1990, FREIRE, 2001).

Após muitas tentativas de padronização dos parâmetros do método de ITC para obter medição do calor de reação entre a enzima GenD2 e os antibióticos aminoglicosídeos previamente escolhidos, não foi possível observar padrão de interação com nenhum dos antibióticos. Mesmo obtendo resultado sobre possível interação através do *thermofluor* entre os aminoglicosídeos, não pudemos afirmar através da técnica de ITC qualquer tipo de interação entre a GenD2 e as moléculas de canamicina, sulfato de gentamicina, sisomicina e neomicina. Desta maneira, outras técnicas, como termoforese, poderiam ser ainda utilizadas para avaliar a afinidade destes ligantes com a GenD2.

A fim de testar a viabilidade da proteína e tentar provar qual o exato cofator da enzima GenD2, realizamos titulação isotérmica com os cofatores NAD^+ e $NADP^+$. A figura 20 mostra os resultados da análise. Foi possível constatar interação preferencial entre GenD2 e NAD^+. O termograma da Figura 20-A mostra os picos resultantes da injeção do cofator, indicando uma interação exotérmica. Não foi obtido resultado de interação entre a GenD2 e $NADP^+$ (Figura 20-B), o que prova que a enzima é NAD^+ dependente e não $NADP^+$ dependente.

Estes resultados sugerem que a falta de interação entre a proteína e os aminoglicosídeos testados não é um problema de falta de viabilidade da enzima, como estar degradada ou não funcional, por exemplo. Portanto, a falta de interação observada nas análises termodinâmicas entre a enzima e os aminoglicosídeos canamicina, sulfato de gentamicina, sisomicina e neomicina pode indicar que estas interações sejam de baixa afinidade, e o método utilizado não permite medi-las. Mesmo considerando este fato, não podemos afirmar tal interação, pois pode ser também que o *thermofluor* tenha indicado uma interação inespecífica. Apesar dos dados obtidos, HUANG et al., 2015 comprovaram *in vitro* a atuação de GenD2 nos antibióticos canamicina B e tobramicina, que são estruturalmente análogos ao substrato da enzima. Gen D2

em conjunto com as enzimas GenS2 e GenN foram capazes de aminar a região C3” destes outros antibióticos. Portanto, estas questões só poderão ser bem esclarecidas através da resolução da estrutura da proteína em complexo com estes antibióticos.



Concentração de proteína	100 µM	100 µM
Concentração de ligante	3,5 mM	4 mM
Estequiometria (N)	1,3 ± 0,1	-
K_d (µM)	7,1 ± 1,1	-
ΔH (kcal/mol)	-3,8 ± 0,4	-
-TΔS (kcal/mol)	-1,78	-

Figura 20. Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica utilizando o microcalorímetro iTC200 (Mricrocal). Foram utilizados 100 µM de GenD2 e concentração de ligantes de 3,5 mM para NAD^+ e 4 mM para $NADP^+$. **A** - Curvas de titulação isotérmica de GenD2 com NAD^+, evidenciando interação. **B** - Curvas de titulação isotérmica de GenD2 com $NADP^+$, sem nenhum tipo de interação. (Os termogramas foram construídos a partir do modelo de um sítio de ligação).

4.4 Ensaios de Cristalização

Para que um cristal de proteína se forme é necessário que seja alcançado um estado de supersaturação da macromolécula em uma solução contendo agentes precipitantes, tampão e/ou aditivos. A cristalização é considerada uma técnica de tentativa e erro, portanto, quanto mais variáveis forem testadas maior a chance de obtenção de cristais. Fatores como grau de pureza da proteína, pH, temperatura e componentes da solução de precipitação são fatores determinantes para o sucesso da cristalização (MCPHERSON; GAVIRA, 2014).

Para aumentar as chances de sucesso, as proteínas purificadas foram levadas à plataforma de cristalização automatizada com o robô Oryx 4 em condições de *kits* iniciais para que pudéssemos testar centenas de condições diferentes. Os cristais obtidos foram enviados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) junto ao CNPEM e ao *Deutsche Elektronen-Synchrotron* (DESy), PETRA III na Alemanha para coleta de dados de difração por raios X.

4.4.1-GenS2

Apesar de serem testadas centenas de condições de cristalização, como as utilizadas para a enzima GenD2, não houve condição em que a enzima GenS2 apresentasse cristais promissores, porém algumas condições apresentaram microcristais, sem confirmação de serem proteicos, muito embora estas poucas condições tenham sido reproduzidas e nenhum cristal foi obtido.

Foram realizadas outras expressões e purificações da mesma enzima com mais atenção aos detalhes que poderiam desestabilizá-la, como temperatura, método de lise, troca de tampão e muitas tentativas de *screening* com o auxílio do robô Oryx 4, porém não obtivemos sucesso na formação de cristais promissores.

A identificação de condições químicas, bioquímicas e físicas que levem à produção de um material cristalino é bastante difícil. Na abordagem inicial, tenta-se modificar o que se acredita serem as variáveis cruciais, como o tipo de precipitante e sua concentração, pH, temperatura, concentração de proteína, etc. Entretanto, quando não há formação cristalina existe uma grande dificuldade em afirmar o real motivo da não cristalização de uma macromolécula (MCPHERSON, et al., 2014). Para tentar responder essa pergunta, são necessárias várias análises que permitam entender os fatores que possam estar influenciando na cristalização, como por exemplo, análise de espalhamento dinâmico de luz (DSL) ou dicroísmo circular (CD),

entre outros. Somando o máximo de informações acerca da proteína, poderemos compreender os motivos da não cristalização e contornar estes problemas com a intenção de obter cristais promissores que difratem a uma resolução considerada suficientemente alta para determinar sua estrutura.

4.4.2-GenD2

Foram testadas centenas de condições de cristalização em placas de 96 poços, utilizando o método de difusão de vapor de gota sentada através do robô Oryx4 com a enzima GenD2 e analisadas ao longo do tempo. Por este método, obtivemos alguns cristais dos quais foram analisados a condição de cristalização, formato dos mesmos e em alguns casos foi utilizado *Izit Crystal Dye* (Hampton Research) para confirmação de cristal proteico. Alguns cristais foram selecionados e levados para testes de difração no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) junto ao CNPEM, havendo confirmação de serem proteicos e com difração promissora. As condições de obtenção do cristal foram otimizadas em placas pelo método de gota suspensa. Algumas condições ao serem otimizadas não se apresentaram reprodutíveis, provavelmente devido à essas condições terem como constituintes álcoois voláteis, dificultando a reprodução exata do kit inicial de cristalização. Além disso, outra provável causa para aqueles que não continham álcool seria a alteração dos volumes ou pequenas alterações em pH e molaridade que podem eventualmente ocorrer. A única condição em que foi possível cristalizar a GenD2 após otimizações manuais foi a condição contendo 0,1M de Acetato de sódio pH 4,6 e 2M de formato de sódio. Nessa condição, foram testadas quantidades diferentes de proteína e houveram tentativas de co-cristalização com NAD^+, NADH e alguns aminoglicosídeos. Foram testadas também, temperaturas diferentes, variando entre 18 ºC e 25 ºC.

Existe um obstáculo na resolução desta molécula por substituição molecular, pois a proteína que apresenta maior semelhança com a GenD2 é uma oxidoredutase (Código PDB: 3DB2), que apresenta 27% de identidade em 70% de cobertura com a GenD2. Não fomos capazes de realizar a determinação da estrutura por substituição molecular utilizando esse modelo devido à baixa identidade. Na literatura, é bastante recorrente que os resultados satisfatórios por substituição molecular se baseiem em valores de identidade entre as proteínas geralmente acima de 30%, indicando que um bom modelo de pesquisa deve ser pelo menos 30% idêntico ao alvo (SCAPIN, 2013, CHOTHIA; LESK, 1986). Dados coletados a uma boa resolução também contribuem para maior sucesso.

Durante o processo de difração por raios X há perda de alguns valores matemáticos, conhecido como o problema das fases, e para que seja resolvida uma estrutura cristalográfica é necessário que essas fases sejam determinadas. Quando existe uma estrutura proteica que exibe alta similaridade com a proteína em estudo, este problema é resolvido por substituição molecular, utilizando a fase da proteína modelo para a construção da estrutura da proteína nova. Porém, quando não há estrutura similar resolvida é necessário encontrar outras formas de determinar a fase. O método utilizado no presente trabalho foi a incorporação de átomos de alto peso atômico à proteína ou ao cristal proteico. Esses átomos exibirão um espalhamento anômalo na difração de Raios X, pois não é frequente a presença desses elementos de elevado peso atômico em macromoléculas biológicas. Esse espalhamento será detectado pelos programas de determinação estrutural e a partir deles será possível a obtenção da fase experimentalmente (NAGEM et al., 2001).

Desta forma, utilizamos o método de incorporação de selenometionina à proteína e o método de *soaking* com metais de alto peso molecular. Após a expressão e purificação através de meio mínimo M9 na presença de selenometionina, ensaios de cristalização foram realizados com a utilização de kits iniciais e também nas mesmas condições de cristais nativos que já haviam sido reproduzidas com sucesso.

Todos os cristais promissores obtidos após a otimização pelo método de gota suspensa e alguns dos cristais de placas com o método de gota sentada, obtidos nas triagens iniciais, foram enviados à linha de Raios X de macromoléculas P13 no síncrotron PETRA III, na Alemanha, na qual foram obtidos alguns dados com difrações entre 1,9 a 2,6 Å.

Muita dificuldade foi encontrada na resolução da enzima através de faseamento experimental e substituição molecular, então foram realizadas tentativas de resolução da estrutura da GenD2 através de técnicas de substituição molecular utilizando servidores on-line, que utilizam fragmentos semelhantes à enzima de interesse vindos de várias proteínas diferentes, e não somente uma enzima com baixa similaridade, isso aumenta a semelhança entre o modelo construído e os dados de difração do cristal, permitindo assim maior chance de sucesso na resolução da estrutura, os programas utilizados foram o BALBES (LONG et al., 2008) e MrBUMP (KEEGAN; WINN, 2008). Através do programa MrBUMP obtivemos um modelo inicial que apresentou mapas de densidade eletrônica que permitiu a reconstrução da GenD2.

Tabela 1. Cristais da enzima GenD2 e condição de cristalização.

	15 mg/mL em complexo com NAD^+ **Condição de cristalização:** 0,1 M acetato de sódio pH 4,6 2 M formiato de sódio 18 ˚C

4.4.3-GenB2

Obtivemos a condição de cristalização da enzima GenB2 através de nosso grupo colaborador (29% de Polietilenoglicol 4000; 1M de NaCl; 0,1M PIPES no pH 6.0 e 30% Ácido 6-Aminohexanoico). A condição foi reproduzida variando a concentração de proteína entre 8mg/mL e 15mg/mL, em aproximadamente 2 a 3 dias, houve formação de cristais (Tabela 2).

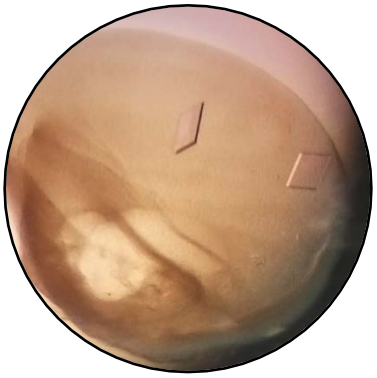
Estudos em colaboração com a doutoranda Priscila dos Santos Bury, tiveram como objetivo determinar a estrutura da enzima GenB2, pelo método de substituição molecular com a enzima homóloga Sis5, a qual apresenta 35% de identidade com a GenB2. A aluna Priscila conduziu os experimentos determinando a resolução da estrutura da apoenzima GenB2.

Através da técnica de *soaking*, em que pequenas moléculas são inseridas no cristal proteico a fim de obter um complexo proteína-ligante, foi incorporado ao cristal da GenB2 o composto gentamicina X2, o último precursor comum entre as gentamicinas C_1, C_{1a}, C_2, C_{2a} e C_{2b} (GUO, et al., 2014). Esses cristais foram levados para difração no síncrotron do LNLS junto ao CNPEM, com o objetivo de analisar sua possível interação com o substrato e seu sítio ativo.

O substrato da enzima GenB2 não é vendido comercialmente e sua produção é relativamente inviável do ponto de vista sintético, portanto, a utilização de um composto bastante semelhante pode ainda ser útil para um entendimento geral da localização e acoplamento dessa molécula no sítio ativo da estrutura da enzima. Há também a intenção de observar se a enzima GenB2 seria capaz de realizar interação com compostos conhecidos da mesma via, que não seu substrato natural.

Foi possível a determinação da estrutura da enzima em complexo com gentamicina X2 com resolução de 1,7 Å (Tabela 3), obtendo sucesso na incorporação do composto.

Tabela 2. Cristais da enzima GenB2 e condição de cristalização.

	GenB2 a 8 mg/mL em complexo com PMP e *soaking* com gentamicina X2 **Condição de cristalização:** 29% de Polietilenoglicol 4000 1 M de NaCl 0,1 M PIPES pH 6.0 30% Ácido 6-Aminohexanoico 18 ºC

4.5 Dados Estruturais

4.5.1-GenD2

Os cristais da GenD2 foram levados à PETRA III, *Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESy)* na Alemanha para coleta de dados de difração por Raios X, com a utilização da linha de luz P13. Os dados da coleta e do refinamento da estrutura são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Dados estatísticos de coleta e refinamento cristalográfico da enzima GenD2.

Comprimento de onda (Å)		0,976250
Resolução (Å)		48,61 - 2,402 (2,488 - 2,402)
Grupo espacial		P 3_1 1 2 1
Parâmetros de célula unitária	a, b, c (Å)	123,997 123,997 272,569
	α, β, γ (°)	90 90 120
Reflexões Totais		434902 (26390)
Reflexões Únicas		67301 (4434)
Multiplicidade		6,5 (6,0)
Completeza (%)		99,94 (100)
I/σ (I)		11,8 (2,7)
Fator temperatura (Wilson) (Å^2)		40,32
R-merge		0,124 (0,665)
R-meas		0,147 (0,807)
R-pim		0,078 (0,449)
CC1/2		0,995 (0,770)
R-work		0,1809 (0,2229)
R-free		0,2256 (0,2864)
Número de átomos	Proteína	15328
	Ligante	264
	Resíduos da proteína	2036
RMS (Å)	Ligações	0,009
	Ângulos	1,30
Ramachandran (%)	Favoráveis	96,29
	Permitidos	3,06
	Não permitidos	0,64
Rotâmeros não permitidos (%)		0,13
Clash score		4,76
Fator temperatura (Å^2)	Média	35,02
	Proteína	35,04
	Ligantes	37,44
	Solvente	32,62

Estatísticas para a camada de maior resolução são mostradas em parênteses.

A estrutura da enzima GenD2 foi resolvida por substituição molecular, em sua unidade assimétrica a enzima apresentou seis moléculas. Entre as seis moléculas da unidade assimétrica não havia a representação de um tetrâmero, então foi realizada operação de não simetria para a criação do modelo apresentado na figura 21. A resolução final da estrutura é de 2,4 Å.

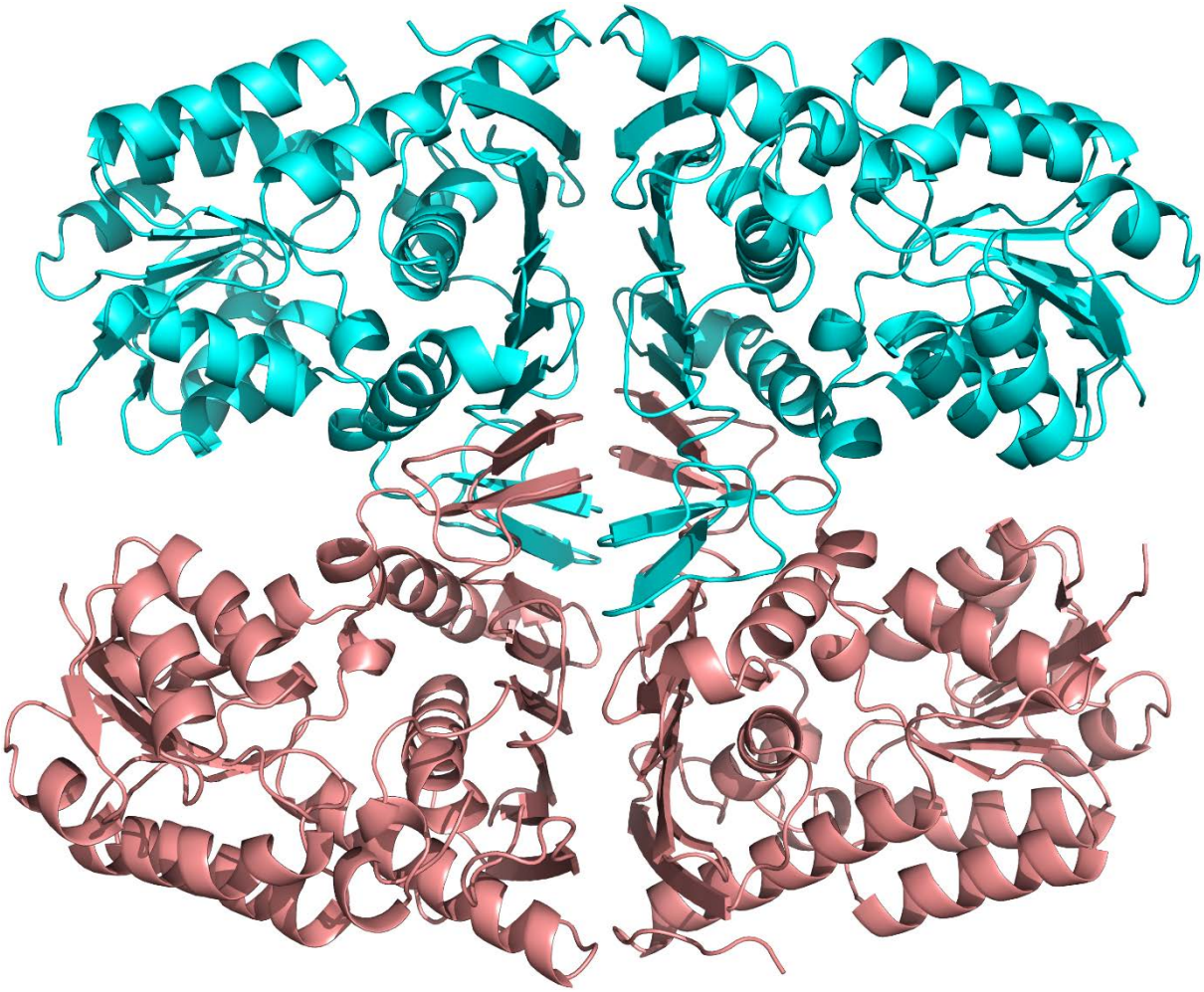


Figura 21. Tetrâmero de GenD2 gerado por operações de simetria.
As cores rosa e azul representam cada dímero do tetrâmero. A imagem evidencia a extensa interface de interação formada pelas regiões de folhas-β de cada molécula de GenD2 para a formação do tetrâmero. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

A enzima GenD2 tem sua atividade como tetrâmero, como demonstrado no experimento de gel filtração analítica (Figura 14) e também corroborado pela literatura que apresenta desidrogenases NAD^+ dependentes com esse tipo de enovelamento quaternário (EVENTOFF; ROSSMANN, 1976, HANUKOGLU; 2015, BOTTONS; 2002). Pode ser descrita como um tetrâmero de dímeros. O tetrâmero apresenta quatro moléculas de NAD^+.

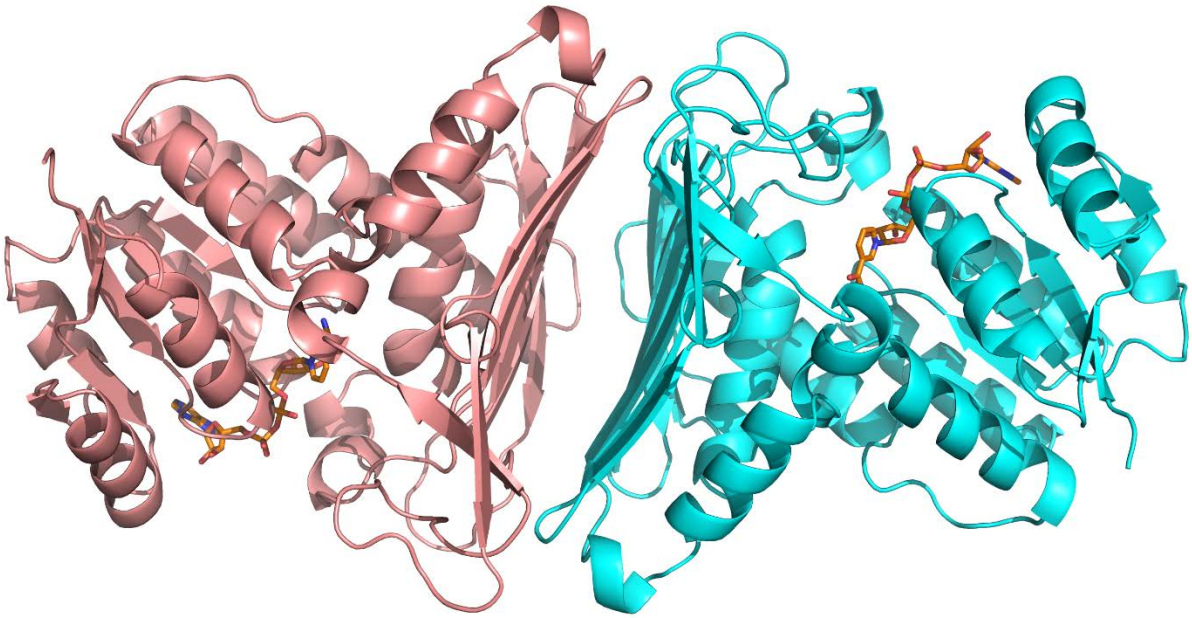


Figura 22. Dímero de GenD2 em complexo com o cofator NAD^+.
Cada molécula de GenD2 está representado de uma cor (rosa e azul). O NAD^+ é representado pela cor laranja e se encontra no domínio Rossmann Fold. A imagem evidencia a interação realizada pelo domínio contendo uma folha-β de cada protômero para formar um dímero. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

A molécula de GenD2 apresenta dois domínios, um deles contém oito fitas-β formando uma folha que realizará a interação com a folha-β da segunda molécula para formar o primeiro dímero. O outro domínio é o clássico Rossmann Fold, um enovelamento composto por sete fitas-β paralelas alternadas com cinco α-hélices. No primeiro motivo β α β, o mais conservado em enzimas NAD^+ / NADH dependentes, é onde se encontra o sítio de ligação ao NAD^+, no loop entre a primeira fita-β e a primeira α-hélice há três glicinas conservadas no padrão GGGFMG na enzima GenD2 (Figura 23), padrão encontrado na literatura, em enzimas semelhantes, como GXGXXG (CHRISTOPHER et al.; 2002)

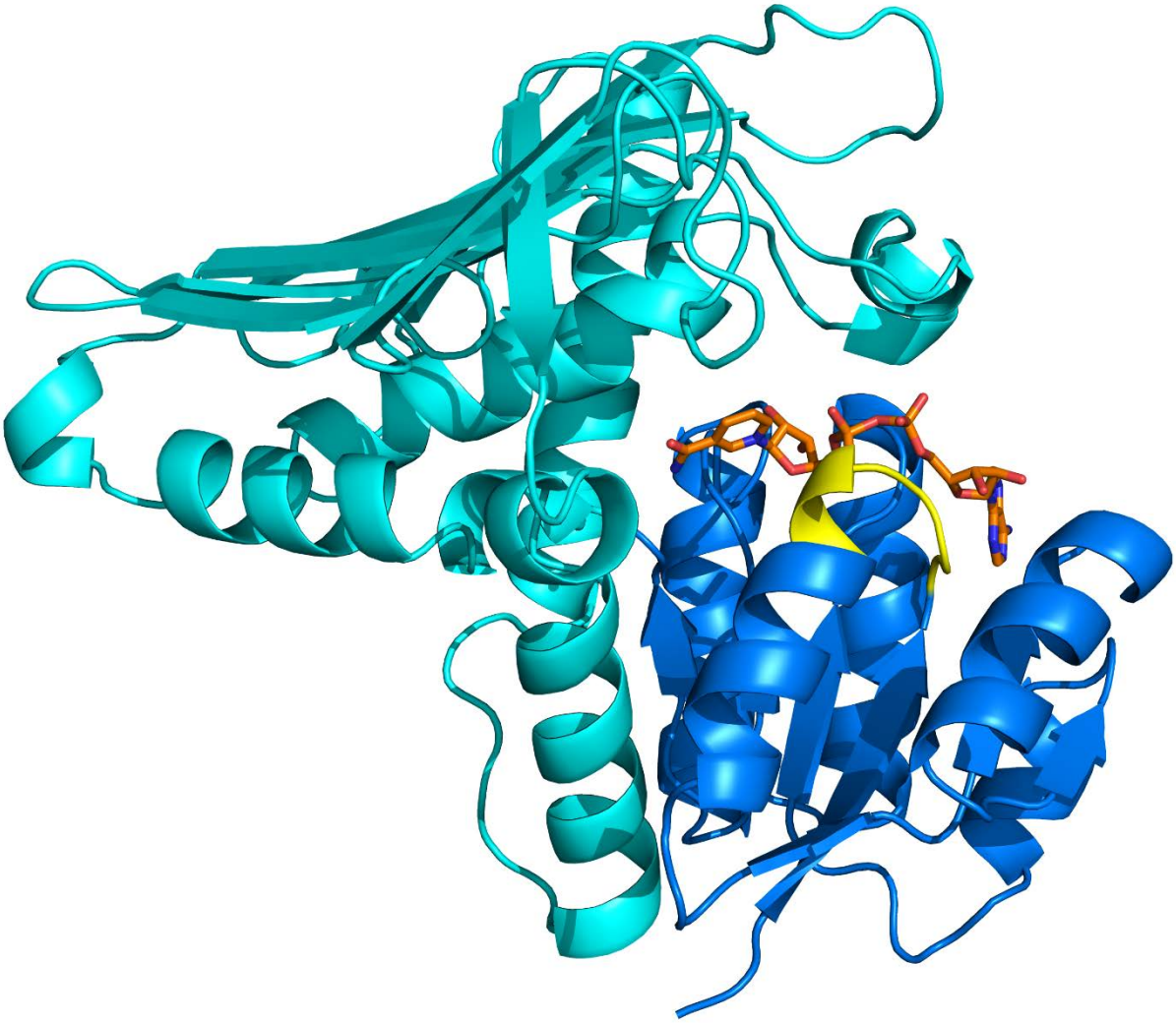


Figura 23. Monômero de GenD2 em complexo com o cofator NAD^+.
Em azul claro está representado o domínio de ligação à outra enzima composto por uma extensa folha-β, em azul escuro está o Rossmann Fold ligado ao NAD^+ representado pela cor laranja. Em amarelo está a região de glicinas conservadas. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

Foi realizada uma sobreposição da enzima GenD2 com a oxidoredutase de *Desulfitobacterium hafniense*, a enzima de maior semelhança depositada no Protein Data Bank, código: 3DB2, (Figura 24) o RMSD entre as moléculas é de 2,2 Å, evidenciando a baixa similaridade entre as duas, sendo de apenas 27%. Isso explica a grande dificuldade em resolver a estrutura por substituição molecular à partir do modelo de apenas uma molécula simelhante.

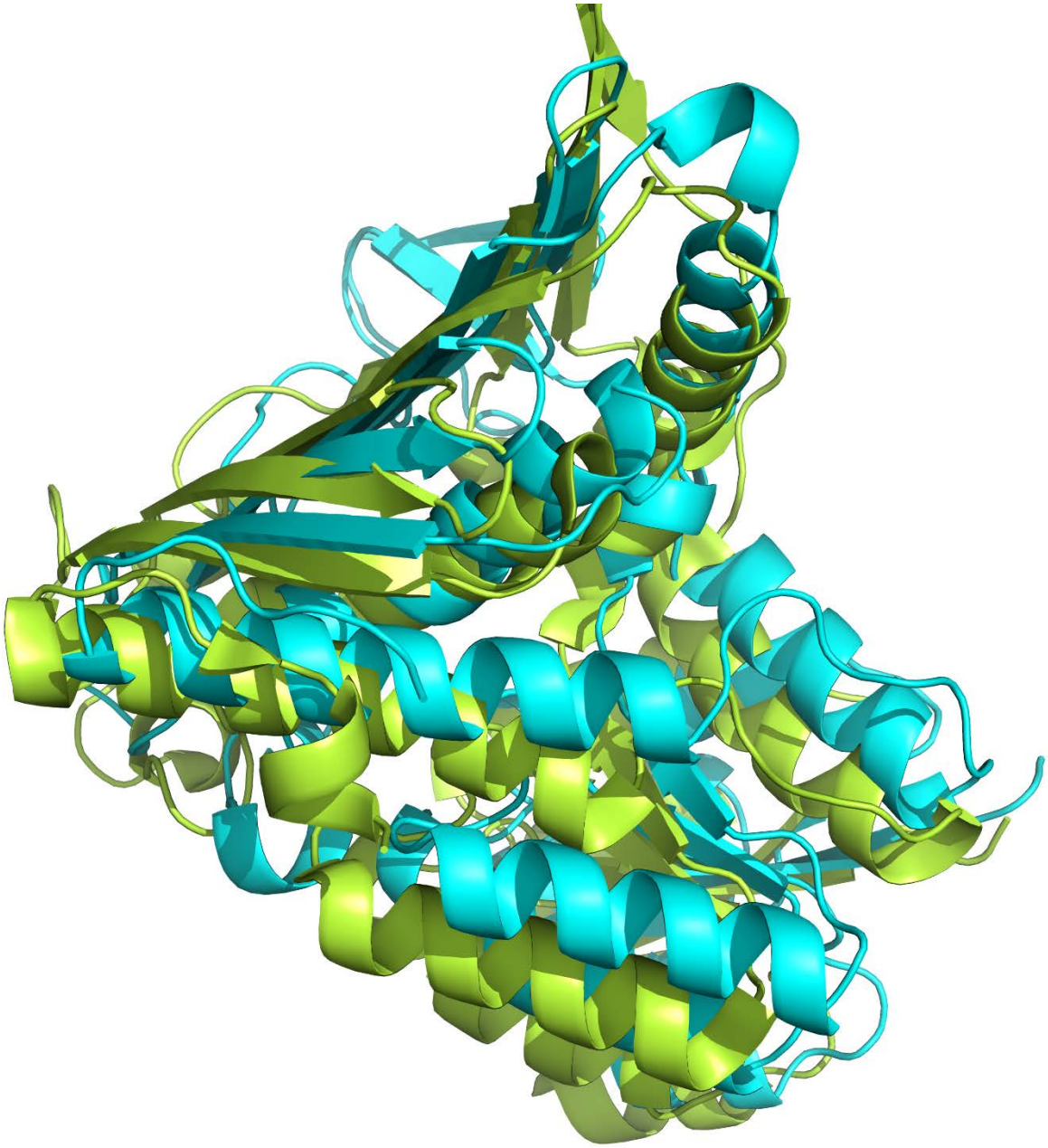


Figura 24. Molécula de GenD2 em sobreposição com a oxidoredutase de *Desulfitobacterium hafniense* PDB: 3DB2. Em azul claro está representada a molécula de GenD2, em verde a 3DB2, o RMSD entre as moléculas é de 2,2 Å, evidenciando sua baixa similaridade (de apenas 27%). Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

4.5.2-GenB2

Os cristais da GenB2 foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) junto ao CNPEM para coleta de dados de difração por Raios X, com a utilização da linha de luz MX2. Os dados da coleta e do refinamento da estrutura são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Dados estatísticos de coleta e refinamento cristalográfico da enzima GenB2 em complexo com gentamicina X2.

Comprimento de onda (Å)		1,0
Resolução (Å)		39,74 - 1,66 (1,719 - 1,66)
Grupo espacial		C 2 2 2_1
Parâmetros de célula unitária	a, b, c (Å)	75,407 104,187 104,653
	α, β, γ (°)	90 90 90
Reflexões Totais		462306 (44735)
Reflexões Únicas		48784 (4780)
Multiplicidade		9,5 (9,4)
Completeza (%)		1,00 (0,99)
I/σ (I)		14,73 (1,91)
Fator temperatura (Wilson) (Å^2)		20,74
R-merge		0,114 (1,618)
R-meas		0,1203 (1,711)
R-pim		0,044 (0,543)
CC1/2		0,999 (0,617)
R-work		0,1724 (0,2714)
R-free		0,1916 (0,3287)
Número de átomos	Proteína	3183
	Ligante	49
	Resíduos da proteína	412
RMS (Å)	Ligações	0,009
	Ângulos	0,96
Ramachandran (%)	Favoráveis	99
	Permitidos	0,95
	Não permitidos	0
Rotâmeros não permitidos (%)		1,5
Clash score		4,66
Fator temperatura (Å^2)	Média	23,57
	Proteína	22,81
	Ligantes	32,07
	Solvente	30,99

Estatísticas para a camada de maior resolução são mostradas em parênteses.

Dentre os tipos de enovelamento de enzimas PLP dependentes, somente o tipo I é bastante esclarecido, devido à grande quantidade de enzimas que se apresentam nessa classe. Muitas características deste grupo também são observadas nos outros tipos de enovelamento, com poucas exceções, porém cruciais. Existem pouquíssimos exemplares do enovelamento do tipo III com estrutura resolvida depositado no PDB, portanto informações acerca desse tipo de enovelamento ainda estão sendo construídas (SCHNEIDER, et al, 2000, ELIOT; KIRSCH, 2004, DAJNOWICZ, et al, 2017).

A enzima GenB2 em complexo com PMP e gentamicina X2 apresentou uma molécula na unidade assimétrica e o mesmo grupo espacial da apoenzima ($C\ 2\ 2\ 2_1$). Como característica de enzimas PLP dependentes é um dímero e o sítio de ligação está voltado para a interface entre as moléculas, o sítio ativo tem contribuição dos resíduos de cada protômero sendo um dímero obrigatório, como todas as enzimas PLP dependentes com o enovelamento do tipo III (ELIOT; KIRSCH, 2004). A figura 25 representa um dímero, formado pela operação de simetria cristalina. Nota-se os sítios ativos localizados na interface entre os dois monômeros.

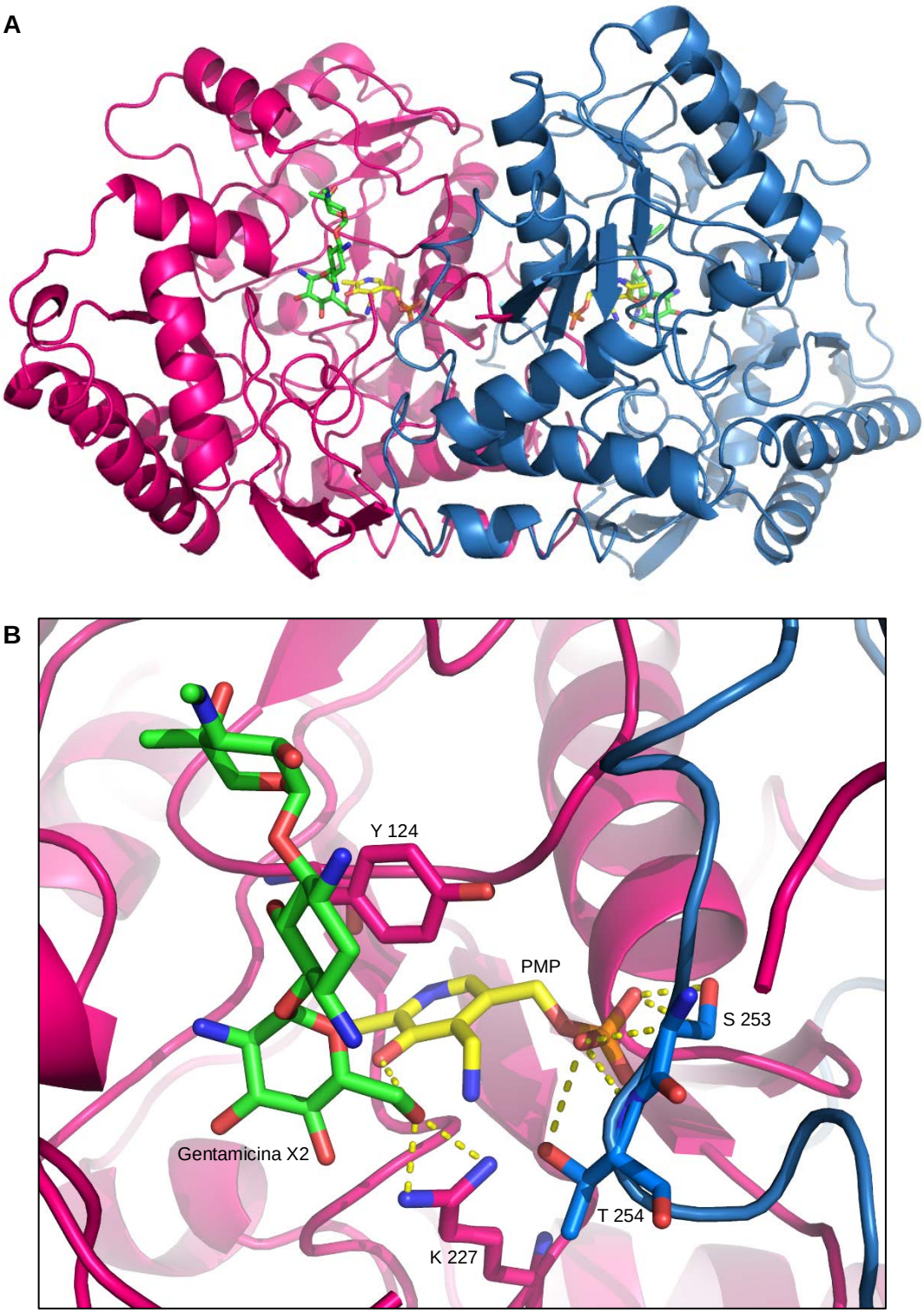


Figura 25. Dímero de GenB2 evidenciando o sítio ativo.
A - As cores rosa e azul representam cada subunidade do dímero. **B** - Destaque no sítio ativo com os resíduos: lisina 227, e tirosina 124 em rosa e os resíduos do segundo protômero serina 253 e treonina 254 em azul. A gentamicina X2 está representada em verde e o cofator piridoxamina-5'-fosfato em amarelo. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

O sítio de ligação apresenta uma α-hélice central, onde o grupo fosfato do PMP se ancora na porção N terminal. Essa α-hélice está envolta parcialmente por uma folha-β formada por seis fitas-β (quatro paralelas e duas antiparalelas). A lisina 227 possivelmente forma uma base de Schiff entre a porção do anel pirimidínico (Figura 25 B), essa é uma característica importante, já que uma lisina formando a base de Schiff é onipresente em enzimas PLP/PMP dependentes (ELIOT; KIRSCH, 2004). A mesma porção do anel pirimidínico ainda faz ligação com o anel purpurosamina da gentamicina X2.

Através da análise da superfície de potencial eletrostático do dímero, como mostrado na figura 26, é possível visualizar o anel piridoxamina do PMP em amarelo bastante enterrado no interior da proteína. Essa região entre os monômeros, que faz parte do bolsão catalítico, é carregada positivamente favorecendo a interação com o cofator, de caráter eletronegativo, ancorado por uma rede de ligações de hidrogênio.

A cavidade do sítio ativo, onde se encontra posicionada a gentamicina X2, é bastante ampla e predominantemente eletronegativa, o que é explicado pelo fato de o substrato da enzima ser um aminoglicosídeo, que é carregado positivamente devido à grande quantidade de grupos aminas (Figura 26). O fato de a cavidade do sítio ativo ser bastante larga, pode explicar tanto a dificuldade de se obter esse complexo, uma vez que vários cristais foram testados, e também um valor pouco mais elevado atribuído ao fator temperatura para o ligante (32,07 $Å^2$), já que foi observada uma ocupância de 0,76 para a gentamicina X2, valor um tanto baixo, mas justificável pelo amplo sítio.

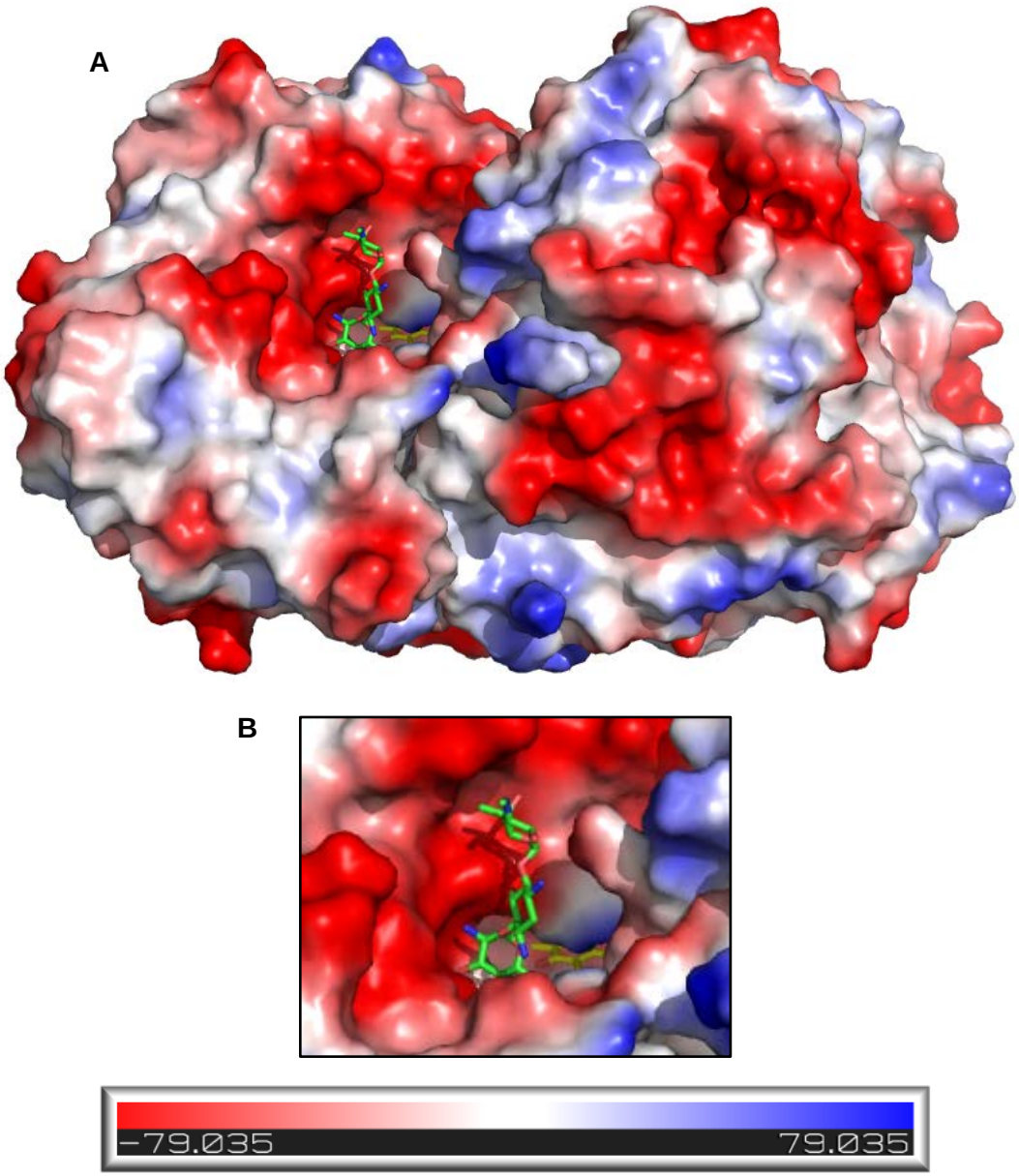


Figura 26. Superfície de potencial eletrostático da holoenzima GenB2.
A cor vermelha representa as regiões mais eletronegativas e a cor azul as regiões mais eletropositivas. A gentamicina X2 está representada em verde e mais enterrado na proteína, em amarelo, o cofator piridoxamina-5'-fosfato. **A** – Holoenzima. **B** – Imagem ampliada do sítio ativo. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

Na figura 27 podemos ver as interações realizadas no sítio ativo entre a gentamicina X2, a piridoxamina-5'-fosfato e os resíduos da enzima GenB2.

No anel purpurosamina da gentamicina X2, o grupo hidroxila da posição C6' faz uma interação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral da lisina 227, e também com o anel pirimidínico do PMP. O mesmo anel purpurosamina ainda faz outras ligações em outras

posições, com a hidroxila do resíduo tirosina 342, com os dois oxigênios da carboxila do ácido aspártico 339, com o nitrogênio da cadeia lateral da lisina 202, com o oxigênio da cadeia lateral da glutamina 390, com o oxigênio da carbonila da cisteína 389 e com o oxigênio δ 1 do ácido aspártico 392. Também realiza interações através da água 139 com a lisina 202, ácido aspártico 339 e as glutaminas 340 e 390.

O anel central 2-desoxiestreptamina, importante na ação antibacteriana dos aminoglicosídeos, conforme já descrito por CARTER et al, 2000; realiza uma interação hidrofóbica do tipo *staking* π com o anel aromático da tirosina 124. Este mesmo anel ainda faz uma interação com o oxigênio δ 2 do ácido aspártico 392, fixando sua posição no sítio ativo.

A hidroxila do anel pirimidínico do PMP estabelece uma interação com o oxigênio ligado ao carbono 6’ do anel purpurosamina da gentamicina X. O grupo fosfato é quem estabelece duas interações com os resíduos do outro protômero, uma ligação de aproximadamente 2,5 Å com a serina 253 e outra de 3 Å com a treonina 254. Essas interações do grupo fosfato com os resíduos do outro monômero é bastante característico e é encontrado na maioria absoluta das enzimas PLP/PMP dependentes. Por esse motivo essas enzimas geralmente apresentam-se como um dímero funcional (ELIOT; KIRSCH, 2004).

As figuras 27 e 28 ilustram as interações realizadas no sítio ativo e suas distâncias, entre o PMP, a gentamicina X2 e os resíduos relacionados.

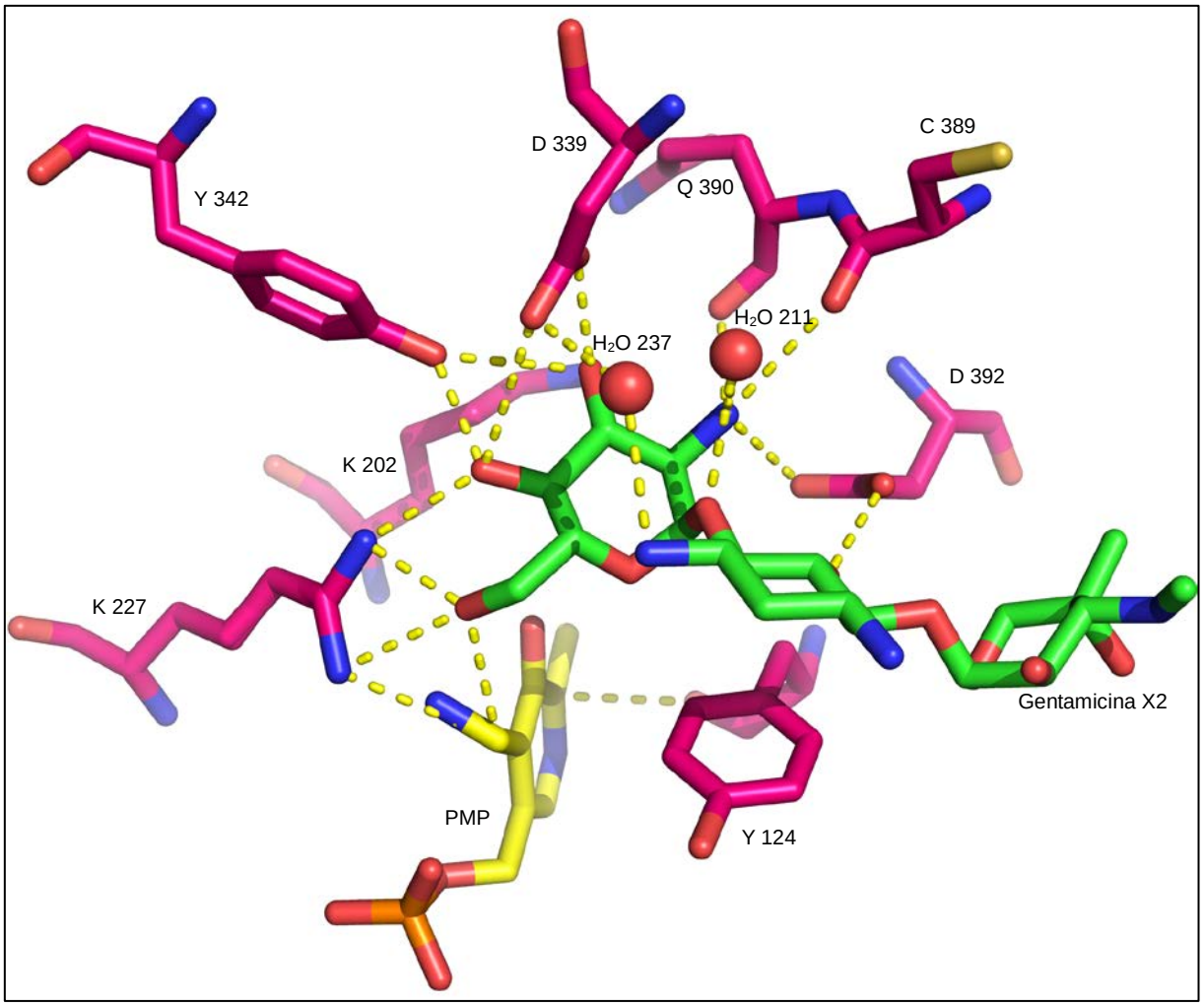


Figura 27. Sítio ativo evidenciando os resíduos envolvidos na interação.
Na cor rosa são apresentados os resíduos da GenB2, em verde a gentamicina X2 e em amarelo a piridoxamina-5'-fosfato. Ênfase na lisina 227 conservada em enzimas dependentes de PLP/PMP mostrando duas conformações, e na interação hidrofóbica do tipo *staking* π entre o anel purpurosamina da gentamicina X2 e a tirosina 124. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002).

Na figura 27 é possível visualizar a interação hidrofóbica *staking* π entre o anel aromático da tirosina 124 e o anel 2-desoxiestreptamina da gentamicina X2, que é idêntico ao anel do substrato da enzima, de gentamicina $C2_a$, indicando que possivelmente essa é a posição do substrato no sítio ativo. Há muitos resíduos interagindo com a porção purpurosamina, o anel onde a enzima atua.

A gentamicina X2 difere da gentamicina $C2_a$ por apresentar duas hidroxilas nas posições C3' e C4' além de conter somente uma hidroxila na posição C6', enquanto que a gentamicina $C2_a$ apresenta na posição C6' um grupo amina e um grupo metil que sofrerá a epimerização. Essas diferenças podem ter causado um impedimento estérico entre os resíduos do sítio ativo e

a molécula de gentamicina X2, causando um distanciamento entre elas que possivelmente não ocorre com o substrato.

A enzima GenB2 atua prioritariamente como epimerase, porém pode ter ação de aminotransferase em outro substrato (HUANG et al, 2014). Em enzimas que realizam transaminação, o piridoxal-5-fosfato (forma ativa da vitamina B6) se liga covalentemente à uma lisina, essa ligação posteriormente é quebrada e uma L-metionina transfere seu grupo amina, transformando o PLP em Piridoxamina-5-fosfato, o PMP então realizará uma ligação covalente com o substrato da enzima transferindo seu grupo amina e voltando a ser PLP. Em enzimas PLP/PMP dependentes que realizam epimerização, o PMP, que está no estado intermediário da reação, sofre uma inativação para que o mesmo não possa transferir seu grupo amina, e o resíduo que realizará o deslocamento de elétrons necessário para a epimerização será uma tirosina. (AWDA R., et al. 2017). Em nossa estrutura da GenB2, de acordo com a proximidade à lisina 227 e ao substrato, possivelmente é a tirosina 342 que realiza a epimerização nessa enzima.

A figura 28 é uma representação plana da região do sítio ativo, mostrando os resíduos que interagem com a gentamicina X2 e suas distâncias.

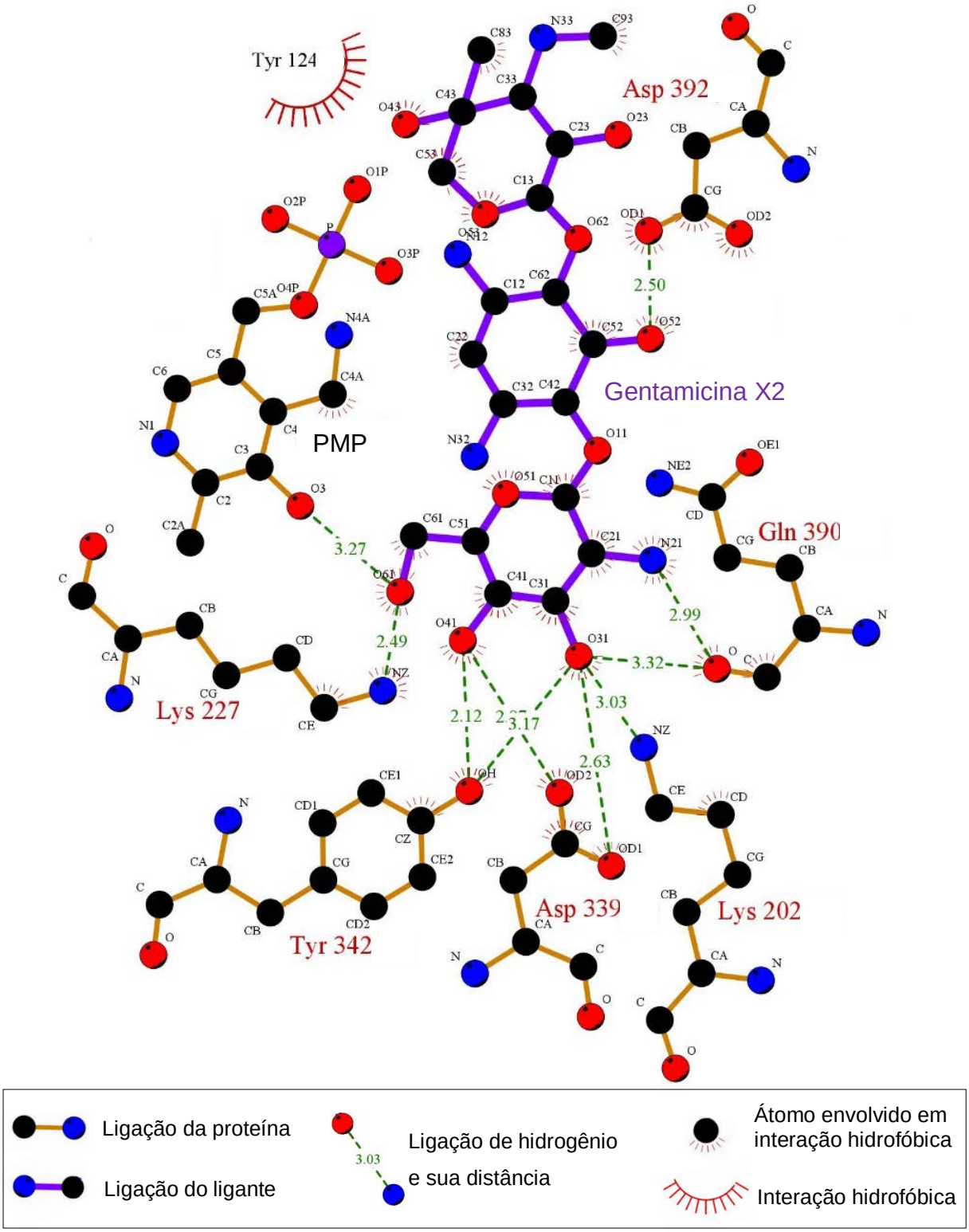


Figura 28. Imagem plana do sítio ativo e as interações estabelecidas nele.
Os resíduos estão identificados e as distâncias (em verde) estão em Å. Em roxo está representada a gentamicina X2.

O mecanismo catalítico da enzima GenB2 ainda não pôde ser completamente esclarecido, uma vez que para tal será necessário a obtenção da enzima com seu substrato natural e um aminoácido doador do grupo amina, possivelmente uma L-metionina (HUANG et

al, 2014). Essas informações serão necessárias para desvendar sua atuação como epimerase e indicar o possível papel de aminotransferase dessa enzima na biossíntese de gentamicina.

Já é bem estabelecido que uma lisina conservada é crucial para a atividade da enzima (SCHNEIDER, et al, 2000, ELIOT; KIRSCH, 2004, DAJNOWICZ, et al, 2017). Na estrutura resolvida, a lisina 227 se apresentou em dupla conformação (Figura 29-**A**); uma possível hipótese para essa dupla posição seria uma mudança conformacional desse resíduo entre as ligações com PLP e PMP, uma vez que poderia haver moléculas da enzima complexada com ambos os cofatores durante a formação dos cristais. Outra possibilidade é que essa dupla conformação esteja relacionada com a reação de epimerização, já que em uma das posições a enzima está mais próxima do PMP e em outra está mais próxima da tirosina 324, que acreditamos ser o resíduo que se liga à posição C6' realizando a transferência de elétrons necessária para a epimerização dessa região.

A densidade apresentada em nosso modelo pode ser claramente atribuída ao PMP (Figura 29-**B**), devido a presença do grupo amina e a ausência de densidade para o grupo aldeído, presente em piridoxal-5'-fosfato (PLP). Apesar de ter sido adicionado PLP aos ensaios de cristalização, a adição de gentamicina X2 pode ter influenciado no estado do cofator, o alterando para PMP, ou então, devido ao fato dessa enzima realizar epimerização prioritariamente à transaminação, existe a possibilidade de a enzima se ligar ao PLP e rapidamente o converter em PMP para inativá-lo não permitindo a transferência do grupo amino.

Na figura 29-**C**, está representada a densidade eletrônica para a gentamicina X2, evidenciando sua presença na estrutura. Os dois anéis idênticos aos anéis do substrato, 2-desoxiestreptamina e garosamina, apresentaram boas ocupâncias; no anel purpurosamina é possível visualizar as hidroxilas, ausentes no substrato da GenS2, e uma ocupância mais baixa, possivelmente causada pelo impedimento estérico que a gentamicina X2 causou nessa enzima.

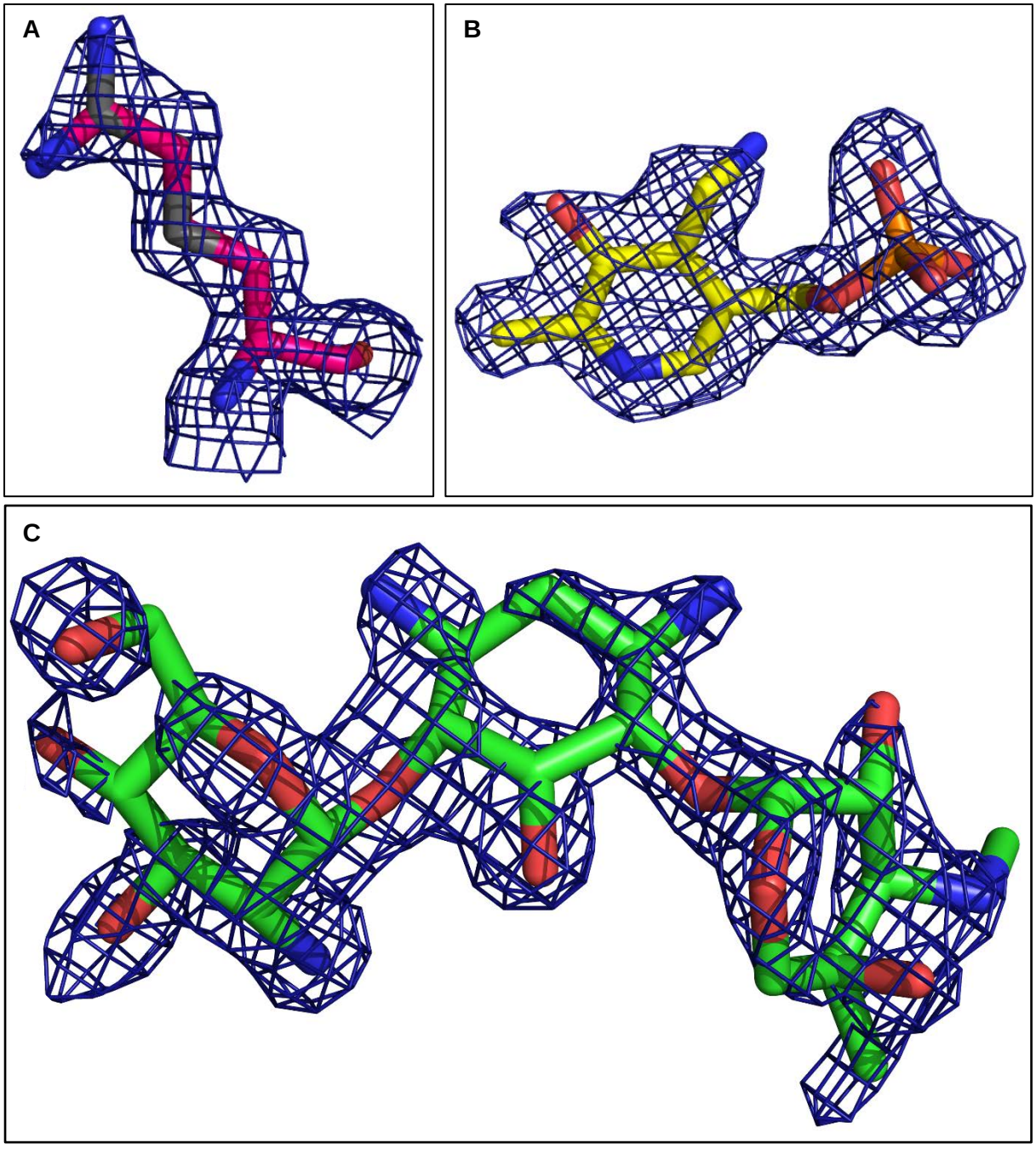


Figura 29. Mapa de densidade eletrônica da lisina (**A**), Piridoxamina-5'-fosfato (**B**) e gentamicina X2 (**C**).
A – Nas cores rosa e cinza é possível visualizar a sobreposição da dupla conformação da lisina 227, a densidade eletrônica mostra as duas posições possíveis para a região do grupo amina. **B** – Densidade eletrônica evidenciando presença de PMP. **C** – Densidade eletrônica evidenciando a presença da gentamicina X2. Figura criada usando PyMol (DeLANO, 2002). (Mapa de densidade eletrônica 2Fo - Fc contornado a 0,8 σ).

5 CONCLUSÃO

Apesar de muitas tentativas, não foi possível obtenção de cristais da enzima GenS2.

Foi determinada a estrutura da enzima GenD2 em complexo com seu cofator NAD^+, a 2,4 Å, foi comprovada ser um tetrâmero com quatro moléculas de NAD^+ por tetrâmero e sua seletividade pelo cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo. A enzima apresenta dois domínios, um rico em fitas-β que realizará a ligação ao outro protômero e outro com o enovelamento Rossmann Fold que mantem o padrão de lisinas conservadas onde se liga o cofator.

A enzima GenB2 em complexo com o cofator piridoxamina-5'-fosfato e com a gentamicina X2 foi resolvida com a resolução de 1,7 Å, foi observada ser um homodímero obrigatório, com dois sítios ativos e resíduos de ambos os protômeros interagindo com os ligantes. A gentamicina X2 se encontrou posicionada em um largo bolsão catalítico carregado negativamente. Os avanços obtidos na caracterização de seu sítio ativo contribuem para o entendimento da atividade da enzima uma vez que foi localizado seu sítio ativo e sua interação com um substrato bastante semelhante ao substrato natural da enzima.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P.D., et al. (2011) The Phenix software for automated determination of macromolecular structures, **Methods**, 55, 94-106.

AMARAL, M.D. (2015) Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients, **J Intern Med**, 277, 155-166.

AMERSHAM BIOSCIENCES. GE: Gel Filtration Principles and Methods. 18-1022-18 ed. England: Rak Design Ab, 2002. Disponível em: <file:///C:/Users/natal/Downloads/GE gelfiltration Principles and methods.pdf>.

ARYA, D.P. (2006) AmiAmynoglycoside antibiotics: from chemical biology to drug discovery. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA.

AWDA, R., et al. (2017) Structural insights into the substrate recognition and reaction specificity of the PLP-dependent fold-type I isoleucine 2-epimerase from Lactobacillus buchneri, **Elsevier**, **Biochimie** 137 (2017) 165-173.

BLUNDELL, T. L. & Johnson, L. N. Preparation of heavy atom derivatives. In Protein Crystallography (**Academic Press**, London, 1976), pp. 183–239.

BOTTOMS, C.A., Smith, P.E., Tanner, J.J. (2002). A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. **Protein Sci**. 11, 2125–2137.

BRÜNGER, A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, **Nature**, 355, 472-475.

CARTER, A.P., et al. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, **Nature**, 407, 340-348.

CIULLI, A.; ABELL, C. Fragment-based approaches to enzyme inhibition. **Curr Opin Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 489-96, Dec 2007. ISSN 0958-1669.

Collaborative Computational Project, N.m. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 50, 760-763.

CHOTHIA, C. & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO** J. 5, 823–826.

COX, E.C., WHITE, J.R. and FLAKS, J.G. (1964) STREPTOMYCIN ACTION AND THE RIBOSOME, **Proc Natl Acad Sci** U S A, 51, 703-709.

CHRISTOPHER A., et al. A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. **Protein Science** (2002), 11:2125–2137.

CUCCARESE, M.F., et al. (2013) A novel use of gentamicin in the ROS-mediated sensitization of NCI-H460 lung cancer cells to various anticancer agents, **ACS Chem Biol**, 8, 2771-2777.

---

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

DeLANO, W.L. (2002) Pymol Molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. A.C. Eliot, J.F. Kirsch, Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations, Annu. Rev. **Biochem**. 73 (2004) 383e415,

DAJNOWICZ, Steven et al. (2017) Direct visualization of critical hydrogen atoms in a pyridoxal 5′-phosphate enzyme, **Nature Communications**, 955.

EMSLEY, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, Acta **Crystallogr D Biol Crystallogr**, 60, 2126-2132.

EVANS, P. (2006) Scaling and assessment of data quality, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 62, 72-82.

EVANS, P.R. and Murshudov, G.N. (2013) How good are my data and what is the resolution?, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 69, 1204-1214.

EVENTOFF, W., M. G. Rossmann. 1976. The structure of dehydrogenases. Trends Biochem. **Sci**. 1:227-230.

LONG, F, A.Vagin, P.Young and G.N.Murshudov "BALBES: a Molecular Replacement Pipeline " **Acta Cryst**. D64 125-132(2008)

FITZGERALD, R.J. and BERNHEIM, F. (1948) The reversal of the bacteriostatic action of streptomycin by urea, **J Biol Chem**, 172, 845.

FUSINITA van den Ent & Jan Löwe (2003) Expression of selenomethionine substituted proteins in non-methionine auxotrophic E. coli. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QH, disponível em: <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/JYL/methods/SeMet%20recipe.doc.pdf>

GUO, J., et al. (2014) Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis, **Chem Biol**, 21, 608-618.

HAINRICHSON, M., Nudelman, I. and Baasov, T. (2008) Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases, Org **Biomol Chem**, 6, 227-239.

HONG, W.R., et al. (2009) Molecular cloning and sequence analysis of the sisomicin biosynthetic gene cluster from Micromonospora inyoensis, **Biotechnol Lett**, 31, 449-455.

HUANG, C., et al. (2015) Delineating the biosynthesis of gentamicin x2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex, **Chem Biol**, 22, 251-261.

HANUKOGLU , Israel (2015). Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, February 2015

KABSCH, W. (2010) XDS, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 66, 125-132.

KEEGAN R.M., Winn M.D. MrBUMP: An automated pipeline for molecular replacement. Acta Crystallogr. Sect. **D Biol. Crystallogr.** 2008;64:119–124. doi: 10.1107/S0907444907037195.

KHAREL, M.K., et al. (2004) Molecular cloning and characterization of a 2-deoxystreptamine biosynthetic gene cluster in gentamicin-producing Micromonospora echinospora ATCC15835, **Mol Cells**, 18, 71-78.

KUDO, F. and Eguchi, T. (2009) Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics, **J Antibiot** (Tokyo), 62, 471-481.

LAKSHMI, N. and Kumar, A.G. (1989) In vitro comparative activity of kanamycin, gentamicin and sisomicin--a new aminoglycoside, against clinical isolates, **Indian J Pathol Microbiol**, 32, 207-212.

LERNER S. A., Seligsohn R., Matz G. J. (1977) Comparative clinical studies of ototoxicity and nephrotoxicity of amikacin and gentamicin **The American Journal of Medicine**, 62: 919–923.

LESLIE, A.G. (2006) The integration of macromolecular diffraction data, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 62, 48-57.

LINDE, L. and Kerem, B. (2008) Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases, **Trends Genet**, 24, 552-563.

LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetic by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 560-566, 2001.

LIU, X., Thomas, J.R. and Hergenrother, P.J. (2004) Deoxystreptamine dimers bind to RNA hairpin loops, **J Am Chem Soc**, 126, 9196-9197.

LLEWELLYN, N.M. and Spencer, J.B. (2006) Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics, **Nat Prod Rep**, 23, 864-874.

MAAROUF, M., et al. (1995) Ribosomes of Leishmania are a target for the aminoglycosides, **Parasitol Res**, 81, 421-425.

MCCOY A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., and Read R.J. J Appl. Phaser crystallographic software. **Crystallogr** 40, 658-674 (2007).

MCCOY, A.J. (2007) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser, **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 63, 32-41.

MCPHERSON, Alexander, and Jose A. Gavira. “Introduction to Protein Crystallization.” **Acta Crystallographica. Section F**, Structural Biology Communications 70.Pt 1 (2014): 2–20.

MIZUTANI, R. et al. Spatiotemporal development of soaked protein crystal. **Sci.** Rep. 4, 5731; DOI:10.1038/srep05731 (2014).

MURSHUDOV, G.N., et al. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, **Acta Crystallogr D** Biol Crystallogr, 67, 355-367.

NAGEM, R. A. P., Dauter, Z. & Polikarpov, I. (2001). **Acta Cryst**. D57, 996-1002.

Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe, **Acta Crystallogr D** Biol Crystallogr, 57, 1367-1372.

OGLE, J.M., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures, **Trends Biochem Sci**, 28, 259-266.

PALOMINO J, PACHÓN P. Aminoglucósidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 21: 105-115, 2003. Links to: CrossRef. Try link to: Google. Similars in: SciELO Network.

PARK, J.W., et al. (2008) Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set, **Proc Natl Acad Sci** U S A, 105, 8399-8404.

PARK, J.W., et al. (2011) Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation, **Nat Chem Biol**, 7, 843-852.

PARK, S.R., et al. (2013) 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways, **Nat Prod Rep**, 30, 11-20.

PATRO, S. Y., & Przybycien, T. M. (1996). Simulations of reversible protein aggregate and crystal structure. **Biophysical Journal**, 70(6), 2888–2902.

POPOVIC, B., et al. (2006) Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis, **Proteins**, 65, 220-230.

PRAYLE, A. and Smyth, A.R. (2010) Aminoglycoside use in cystic fibrosis: therapeutic strategies and toxicity, **Curr Opin Pulm Med,** 16, 604-610.

REINHARD, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., & Weiss, M. S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. **Acta Crystallographica Section F**: Structural Biology and Crystallization Communications, 69(Pt 2), 209–214.

TAYLOR, G. L. Introduction to phasing. **Acta Crystallogr. D** Biol. Crystallogr. 66, 325–338 (2010).

SAMBROOK J, Russell D (2001) Molecular Cloning: **A Laboratory Manual, 3rd edn.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCAPIN, Giovanna. Molecular replacement then and now. International Union of Crystallography, **Acta Crystallographica Section D**: Biological Crystallography, 11(69), p. 2266-2275. (2013).

SCHNEIDER G., Käck H., Lindqvist Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. **Structure**. 2000; 8(1):R1–R6.

UNWIN, J., et al. (2004) Gene cluster in Micromonospora echinospora ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex, **J Antibiot** (Tokyo), 57, 436-445.

VAGIN, A. and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP, **Acta Crystallogr D** Biol Crystallogr, 66, 22-25.

VAGUINE, A.A., Richelle, J. and Wodak, S.J. (1999) SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model, **Acta Crystallogr D** Biol Crystallogr, 55, 191-205.

WALDEN, Helen. "Selenium Incorporation Using Recombinant Techniques." **Acta Crystallographica Section D**: Biological Crystallography 66.Pt 4 (2010): 352–357. PMC. Web. 14 Apr. 2016.

WALSH, C. (2003) Antibiotics: actions, orgins, resistance. **American Society for Microbiology,** Washington.

WEINSTEIN, M.J., et al. (1963) GENTAMICIN, A NEW BROAD-SPECTRUM ANTIBIOTIC COMPLEX, **Antimicrob Agents Chemother** (Bethesda), 161, 1-7.

WINN M. D. et al. Acta. Cryst. D67, 235-242 (2011) **Overview of the CCP4 suite and current developments** [doi:10.1107/S0907444910045749]

XAVIER Robert, Patrice Gouet; Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, **Nucleic Acids Research,** Volume 42, Issue W1, 1 July 2014, Pages W320–W324, https://doi.org/10.1093/nar/gku316

YU Y, Zhang Q and Deng Z. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics F1000Research 2017, 6(F1000 Faculty Rev):723 (doi: 10.12688/f1000research.11104.1)