



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANNA JULYANA VIANA CHIANCA BRILHANTE

**ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE ENZIMAS DE
XANTHOMONAS AXONOPODIS PV CITRI POTENCIALMENTE
UTILIZADAS PARA O CATABOLISMO DE COMPOSTOS
AROMÁTICOS DERIVADOS DA LIGNINA**

CAMPINAS

2021

ANNA JULYANA VIANA CHIANCA BRILHANTE

**ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE ENZIMAS DE *XANTHOMONAS*
AXONOPODIS PV CITRI POTENCIALMENTE UTILIZADAS PARA O
CATABOLISMO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS DERIVADOS DA
LIGNINA**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Dra. Priscila Oliveira de Giuseppe

Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR)

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA ANNA JULYANA VIANA CHIANCA
BRILHANTE E ORIENTADA PELA DRA. PRISCILA
OLIVEIRA DE GIUSEPPE.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B769a Brilhante, Anna Julyana Viana Chianca, 1996-
Análise estrutural e funcional de enzimas de *Xanthomonas axonopodis pv citri* potencialmente utilizadas para o catabolismo de compostos aromáticos derivados da lignina / Anna Julyana Viana Chianca Brilhante. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Priscila Oliveira de Giuseppe.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Álcool desidrogenase. 2. Aldeído desidrogenase. 3. Biotransformação. 4. Lignina. 5. Compostos aromáticos. I. Giuseppe, Priscila Oliveira de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Structural and functional analysis of enzymes from *Xanthomonas axonopodis pv citri* potentially used for the catabolism of aromatic compounds derived from lignin

Palavras-chave em inglês:

Alcohol dehydrogenase
Aldehyde dehydrogenase
Biotransformation
Lignin

Aromatic compounds

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Priscila Oliveira de Giuseppe [Orientador]

Marco Antonio Seiki Kadowaki

Ronaldo Alves Pinto Nagem

Data de defesa: 17-08-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4216-312>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4305996955105221>

Campinas, 17 de agosto de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Priscila Oliveira de Giuseppe

Prof. Dr. Marco Antonio Seiki Kadowaki

Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular da Unicamp.

*Dedico este trabalho a todos que me
ajudaram a chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio de toda minha família e de todos meus amigos. Agradeço especialmente aos meus pais por me ajudarem, mais uma vez, a concretizar um grande sonho.

Agradeço também à toda família LNBR/CNPEM que me recebeu de braços e mentes abertas, sempre dispostos a ajudar. Além disso, agradeço o suporte técnico e material, essencial para a execução deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. George Rocha, Dra. Camila Santos, Dra. Letícia Zanphorlin, Dra. Mariana Morais e Dr. André Damásio, agradeço pelas importantes considerações feitas ao projeto ao longo de seu desenvolvimento.

Aos doutores Ronaldo Nagem e Marco Kadowaki, agradeço a disposição em colaborar participando da banca de defesa desta dissertação.

Aos membros do *Biological Conversion of Lignin Group - BCoolL*, Damaris Martim, Augusto Lima, Bárbara Reis e Cláudia de Souza, agradeço a companhia e a colaboração nessa jornada de grandes desafios e aprendizados. Em especial, agradeço à nossa orientadora, Dra. Priscila Giuseppe, pela paciência, pelos ensinamentos, pela atenção e pelo carinho que sempre nos dedica.

Às equipes do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC-LNBio/CNPEM), do Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (RoboLab-LNBio/CNPEM), das instalações da Central Analítica (CA) e de Caracterização de Macromoléculas (MAC) do LNBR/CNPEM, e da linha MANACÁ do LNLS-Sirius/CNPEM, agradeço pela disponibilização da infraestrutura e pelo apoio técnico fornecido para a realização do projeto.

A todos os professores, técnicos e demais funcionários associados ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, agradeço pelo suporte e pela excelência de ensino.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de Mestrado associada a este projeto e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da linha de pesquisa na qual este trabalho está inserido.

*“Conheça todas as teorias, domine
todas as técnicas, mas ao tocar uma
alma humana, seja apenas outra alma
humana.”*

Carl Jung

RESUMO

A lignina, um heteropolímero aromático de origem vegetal, figura como segunda maior fonte de carbono orgânico não fóssil na biosfera. Porém, sua recalcitrância e heterogeneidade estrutural impõem desafios técnicos consideráveis para sua conversão em produtos de maior valor agregado. Bactérias do gênero *Xanthomonas* capazes de catabolizar compostos derivados da lignina são uma potencial fonte de soluções biotecnológicas para essa questão, mas isso ainda é pouco explorado. No genoma de *X. axonopodis* pv *citri* 306, identificamos os genes XAC0353 e XAC0354, que codificam proteínas ainda não caracterizadas, com baixa identidade de sequência com proteínas de estrutura conhecida, e potencialmente relacionadas a vias cruciais nos processos de conversão da lignina. Ambos codificam oxidorreduções, sendo XAC0353 predito codificar uma álcool desidrogenase e XAC0354 uma aldeído desidrogenase. Por fazerem parte de um operon putativo, formulamos a hipótese de que XAC0353 e XAC0354 atuam em série na bioconversão de aromáticos de lignina, de modo que o produto da primeira (um aldeído) seja o substrato da segunda. Diante disso, este trabalho teve como objetivo elucidar a estrutura e a função dessas proteínas, utilizando como principais abordagens a cristalografia por difração de raios X e a caracterização bioquímico-cinética dos alvos *in vitro*. As proteínas foram expressas em *E. coli* e purificadas à homogeneidade por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Ensaio de DLS e SEC-RALS/LALS indicam que XAC0353 forma dodecâmeros em solução, que podem se dissociar em oligômeros menores, dependendo da composição do meio, e que XAC0354 forma trímeros com tendência a dissociação em dímeros e monômeros. Nos experimentos de cristalização, apenas XAC0353 formou cristais, que difrataram a uma resolução máxima de 3,2 Å. Tentativas de resolução do problema das fases foram bem-sucedidas, mas otimizações serão futuramente realizadas na tentativa de se aumentar a resolução dos dados. Ambas as enzimas têm preferência pelo NAD⁺ como co-substrato. XAC0353 mostrou alta especificidade para o álcool coníferílico ($4,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), sendo inibida por ele a partir de determinadas concentrações ($K_i = 3,3 \pm 0,3 \text{ mM}$). Além disso, ela apresentou atividade contra o álcool 4-hidroxibenzílico ($6,19 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), o álcool vanílico ($3,35 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) e uma atividade residual contra o álcool benzílico. XAC0354 apresentou o seguinte perfil de especificidade: vanilina ($5,30 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ~ 4-hidroxibenzaldeído ($5,02 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) > coniferaldeído ($3,56 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) > 3,4-hidroxibenzaldeído ($1,41 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ~ benzaldeído ($1,30 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) e também apresentou inibição pelo substrato, exceto para o benzaldeído. Diante desses resultados, confirmamos que XAC0353 e XAC0354 podem atuar em série na bioconversão de compostos derivados da lignina, revelando-as como enzimas de potencial interesse biotecnológico. Sugerimos que XAC0353 seja renomeada para álcool coníferílico desidrogenase (*XacCADH1*) e XAC0354, para aril aldeído desidrogenase (*XacALDH1*), dada a variedade de substratos que ela reconhece e metaboliza com semelhante especificidade, característica que favorece sua exploração e otimização através de engenharia enzimática e evolução dirigida. Estudos futuros empregando análises estruturais, mutagênese sítio-dirigida e nocauteamento gênico poderão fornecer maiores informações quanto aos mecanismos que regem a especificidade de substratos/co-substratos e sobre a importância fisiológica dessas enzimas.

ABSTRACT

Lignin is an aromatic heteropolymer of plant origin that figures as the second largest source of non-fossil organic carbon in the biosphere. However, its recalcitrance and structural heterogeneity pose considerable technical challenges for its conversion into higher value-added products. Bacteria of the *Xanthomonas* genus capable of catabolizing compounds derived from lignin are a potential source of biotechnological solutions for this issue, but this is still little explored. In the genome of *X. axonopodis* pv *citri* 306, we identified the genes XAC0353 and XAC0354, which encode uncharacterized proteins, with low sequence identity with proteins of known structure, and potentially related to crucial pathways in the processes of lignin conversion. Both encode oxidoreductases, with XAC0353 being predicted to encode an alcohol dehydrogenase and XAC0354 an aldehyde dehydrogenase. As they belong to a putative operon, we hypothesized that XAC0353 and XAC0354 act in series in the bioconversion of lignin aromatics, so that the product of the first (an aldehyde) is the substrate of the second enzyme. Therefore, this work aimed to elucidate the structure and function of these proteins, using as main approaches X-ray diffraction crystallography and the biochemical-kinetic characterization of the targets *in vitro*. The proteins were expressed in *E. coli* and purified to homogeneity by affinity and size exclusion chromatography. DLS and SEC-RALS/LALS assays indicate that XAC0353 forms dodecamers in solution, which can dissociate into smaller oligomers, depending on the composition of the medium, and that XAC0354 forms trimers with a tendency to dissociate into dimers and monomers. In the crystallization experiments, only XAC0353 formed crystals, which diffracted at a maximum resolution of 3.2 Å. Attempts to solve the phase problem were successful, but optimizations will be carried out in the future to increase the resolution of the data. Both enzymes prefer NAD⁺ as a co-substrate. XAC0353 showed high specificity for coniferyl alcohol ($4.63 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), being inhibited by it above certain concentrations ($K_i = 3.3 \pm 0.3 \text{ mM}$). In addition, it showed activity against 4-hydroxybenzyl alcohol ($6.19 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), vanillyl alcohol ($3.35 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) and a residual activity against benzyl alcohol. XAC0354 showed the following specificity profile: vanillin ($5.30 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ~ 4-hydroxybenzaldehyde ($5.02 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) > coniferaldehyde ($3.56 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) > 3,4-hydroxybenzaldehyde ($1.41 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ~ benzaldehyde ($1.30 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) and showed inhibition by the substrate, except for benzaldehyde. These results confirm that XAC0353 and XAC0354 can act in series in the bioconversion of compounds derived from lignin, revealing them as enzymes of potential biotechnological interest. We suggest that XAC0353 be renamed to coniferyl alcohol dehydrogenase (XacCADH1) and XAC0354 to aryl aldehyde dehydrogenase (XacALDH1), given the variety of substrates it can recognize and metabolize with similar specificity, a characteristic that favors its exploration and optimization through enzymatic engineering and directed evolution. Future studies structural analyses, site-directed mutagenesis and gene knockout may provide more information about the mechanisms that govern substrate/co-substrate specificity and about the physiological importance of these enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da lignina.	17
Figura 2. Estrutura química dos monolignóis e proporção relativa de sua distribuição em diferentes gêneros e tecidos vegetais.....	18
Figura 3. Esquema representativo do conceito de afunilamento biológico.....	19
Figura 4. Identificação de genes potencialmente envolvidos com o catabolismo de compostos derivados da lignina em <i>X. axonopodis pv citri</i>	22
Figura 5. Esquema representativo da unidade transcricional formada pelos genes XAC0352-XAC0354 segundo predições do banco de dados BioCyc (Karp et al, 2017).	23
Figura 6. Curvas padrão do NADH com descrição do R^2 e das equações que definem os parâmetros para cada curva.	46
Figura 7. Eletroforese em gel 0,8% m/v agarose dos genes amplificados do genoma da <i>X. axonopodis pv citri</i> 306.....	47
Figura 8. SDS-PAGE 13% das amostras do teste de expressão.....	48
Figura 9. Dados de purificação da XAC0353.	50
Figura 10. Comparação entre as amostras da primeira e da segunda purificação de XAC0353.....	51
Figura 11. Análise do estado oligomérico de XAC0353 por SEC-RALS/LALS.	53
Figura 12. ΔT_m de cada condição testada no ensaio de <i>termal shift</i>	54
Figura 13. Curvas dos ensaios de desnaturação térmica de XAC0353 por CD.	55
Figura 14. Análise de CD de XAC0353.....	56
Figura 15. Comparação da estrutura secundária de XAC0353 e de FabG de <i>M. smegmatis</i> MC2 155.	57
Figura 16. Predição de regiões intrinsecamente desordenadas em XAC0353.	58
Figura 17. Cristalização de XAC0353.....	59
Figura 18. Testes de atividade da XAC0353 contra álcool vanílico, álcool benzílico, álcool 4-hidroxibenzílico ou álcool coniferílico, utilizando NAD^+ ou $NADP^+$ como co-substratos.	61

Figura 19. Curvas de atividade de XAC0353 em diferentes temperaturas (A) e pHs (B), utilizando álcool benzílico ($C_f = 5 \text{ mM}$) como substrato e NAD^+ ($C_f = 0,5 \text{ mM}$) como co-substrato.....	63
Figura 20. Testes de estabilidade da XAC0353 em diferentes pHs, utilizando álcool benzílico ($C_f = 1 \text{ mM}$) como substrato e NAD^+ ($C_f = 2 \text{ mM}$) como co-substrato.....	64
Figura 21. Efeito de íons e aditivos na atividade da XAC0353.	65
Figura 22. Efeito do DTT na atividade da XAC0353.....	65
Figura 23. Curva de atividade de XAC0353 na presença de álcool benzílico em diferentes concentrações.....	67
Figura 24. Cinética enzimática de XAC0353 com diferentes substratos.	69
Figura 25. Distribuição dos 2214 hits de proteínas (RefSeq) anotadas como álcool coniferílico desidrogenases (PRK12428) entre os 172 gêneros em que se encontram. ..	72
Figura 26. Dados de purificação da XAC0354.....	74
Figura 27. Teste de atividade dos picos 02 e 03, obtidos a partir da cromatografia de exclusão molecular da XAC0354.	75
Figura 28. Raio hidrodinâmico e massa molar (MW) estimados para XAC0354 por DLS ou SEC-RALS/LALS.	75
Figura 29. Análise de XAC0354 por SEC-RALS/LALS.	77
Figura 30. Análises por CD dos picos 02 e 03, obtidos a partir da cromatografia de exclusão molecular de XAC0354.	78
Figura 31. Comparação da estrutura secundária de XAC0354 e da NahF de <i>Pseudomonas putida</i> G7.....	79
Figura 32. SDS-PAGE e predição de regiões desestruturadas da XAC0354.....	80
Figura 33. Atividade da XAC0354 contra o benzaldeído e a vanilina, utilizando NAD^+ ou NADP^+ como co-substratos.	81
Figura 34. Curvas de atividade de XAC0354 em diferentes pHs (A) e temperaturas (B), utilizando benzaldeído ($C_f = 1 \text{ mM}$) como substrato e NAD^+ ($C_f = 0,5 \text{ mM}$) como co-substrato.....	82
Figura 35. Efeito de íons e aditivos na atividade da XAC0354.	83
Figura 36. Testes de atividade da XAC0354.....	84

Figura 37. Cinética enzimática de XAC0354 com diferentes substratos.	90
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação dos genes XAC0353 e XAC0354.....	27
Tabela 2. Tampões utilizados e respectivo pH.	33
Tabela 3. Preparo dos estoques de substratos e co-substratos.	37
Tabela 4. Concentração de substrato e quantidade total de enzima em 100 µl de reação para cada enzima nos ensaios de atividade inversa.	42
Tabela 5. Concentrações de substrato em 100 µl de reação para cada curva de cinética enzimática.	44
Tabela 6. Quantidade total de enzima em 100 µl de reação para cada substrato nos ensaios de cinética enzimática.....	44
Tabela 7. Raio hidrodinâmico e massa molecular estimados por DLS e SEC-RALS/LALS para amostras de XAC0353.....	52
Tabela 8. Estatísticas da coleta de dados de difração de um dos melhores cristais de XAC0353 analisados.	60
Tabela 9. Atividade de XAC0353 na presença de NADH (2 mM) e diferentes aldeídos (reação inversa).....	66
Tabela 10. Parâmetros cinéticos estimados para XAC0353 com diferentes substratos.	68
Tabela 11. Raio hidrodinâmico e massa molecular estimados por DLS e SEC-RALS/LALS para amostras de XAC0354.....	76
Tabela 12. Atividade de XAC0354 na presença de NADH (5 mM) e diferentes ácidos (reação inversa).....	86
Tabela 13. Parâmetros cinéticos calculados para XAC0354.	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Lignina: desafios e oportunidades.....	17
1.2. <i>Xanthomonas</i> spp.: alvo promissor para a descoberta de estratégias para o catabolismo de compostos derivados da lignina	20
1.3. Identificação de novos genes potencialmente envolvidos com o catabolismo de compostos aromáticos em <i>X. axonopodis pv citri</i>	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Extração do DNA genômico de <i>X. axonopodis pv citri</i> 306.....	26
3.2. Construções Gênicas.....	26
3.2.1. Clonagem em vetor pJET	27
3.2.2. Subclonagem nos vetores de expressão.....	28
3.3. Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	28
3.3.1. Testes de expressão	28
3.3.2. Expressão em larga escala	30
3.4. Purificação.....	30
3.4.1. Cromatografia de afinidade.....	30
3.4.2. Cromatografia de exclusão molecular (SEC).....	31
3.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	32
3.6. <i>Thermal Shift</i>	32
3.7. Dicroísmo Circular (CD).....	34
3.8. SEC-RALS/LALS.....	34
3.9. Ensaio de cristalização.....	35
3.10. Coleta e processamento de dados de difração	36
3.11. Caracterização bioquímico-cinética.....	36
3.11.1. Preparo de substratos e co-substratos	36
3.11.2. Determinação da população ativa e do co-substrato da XAC0354.....	37
3.11.3. Triagem de substratos e co-substratos.....	38

3.11.4. Avaliação da especificidade de co-sustrato em condições otimizadas ...	38
3.11.5. Definição das condições ótimas de pH e temperatura.....	39
3.11.5.1 XAC0353	39
3.11.5.2 XAC0354	40
3.11.6. Ensaio de estabilidade de XAC0353 em diferentes faixas de pH	40
3.11.7. Efeito de íons e DTT sobre a atividade enzimática.....	41
3.11.8. Avaliação da atividade inversa	41
3.11.9. Identificação dos produtos das reações por HPLC	42
3.11.10. Cinética enzimática.....	43
3.11.11. Construção das curvas padrão de NADH	45
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 47
4.1. CAPÍTULO 1: Clonagem e expressão de XAC0353 e XAC0354.....	47
4.1.1. Clonagem e subclonagem	47
4.1.2. Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	48
4.2. CAPÍTULO 2: Desvendando a estrutura e a função de XAC0353.....	48
4.2.1 Purificação.....	48
4.2.2. SEC-RALS/LALS	52
4.2.3. Caracterização biofísica	53
4.2.3.1. Estabilidade térmica	53
4.2.3.2. Estrutura secundária	56
4.2.4. Ensaio de cristalização e experimentos de difração	58
4.2.5. Caracterização bioquímica	60
4.2.5.1 Triagem de substratos e especificidade de co-sustrato.....	60
4.2.5.2. Estabilidade e condições ótimas de pH e temperatura	62
4.2.5.3. Efeito de íons e aditivos	64
4.2.5.4 Avaliação da atividade inversa	66
4.2.6. Cinética enzimática.....	66
4.3. CAPÍTULO 3: Desvendando a estrutura e a função de XAC0354.....	72
4.3.1. Purificação.....	72
4.3.2. SEC-RALS/LALS	76
4.3.3. Caracterização Biofísica.....	77
4.3.3.1. Estrutura secundária e estabilidade térmica	77
4.3.4. Ensaio de cristalização.....	80
4.3.5. Caracterização bioquímica	80
4.3.5.1. Especificidade de co-sustrato	80
4.3.5.2. pH e temperatura ótimos	81
4.3.5.3. Efeito de íons e aditivos	82
4.3.5.4. Triagem de substratos.....	83
4.3.5.5. Avaliação da atividade inversa	85
4.3.6. Cinética enzimática.....	86
 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	 91
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 93

ANEXO 1 : IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS POR HPLC	101
ANEXO 2: TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA	111
ANEXO 3: CERTIDÃO DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO.....	113
ANEXO 4: DECLARAÇÃO DE QUE A DISSERTAÇÃO OU TESE NÃO INFRINGE OS DISPOSITIVOS DA LEI Nº 9610/98, NEM O DIREITO AUTORAL DE QUALQUER EDITORA.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lignina: desafios e oportunidades

A lignina, encontrada na parede secundária de determinados tipos celulares vegetais, é um heteropolímero aromático (Fig. 1) constituído, principalmente, pelos álcoois aromáticos denominados *p*-cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S), conhecidos como monolignóis (Barros et al, 2015). Na indústria de papel e celulose e de etanol celulósico, milhares de toneladas de resíduos ricos em lignina são produzidas anualmente. Na maioria das vezes, esse subproduto é queimado para a produção de energia, dada à falta de processos consolidados para sua conversão em moléculas de maior valor agregado (Wyman & Ragauskas, 2015). Porém, a riqueza de compostos aromáticos presente na lignina bem como sua abundância fazem dela uma alternativa promissora aos petroquímicos, o que já tem despertado o interesse dos setores de pesquisa e desenvolvimento de indústrias como a Klabin, Fibria e Invista.

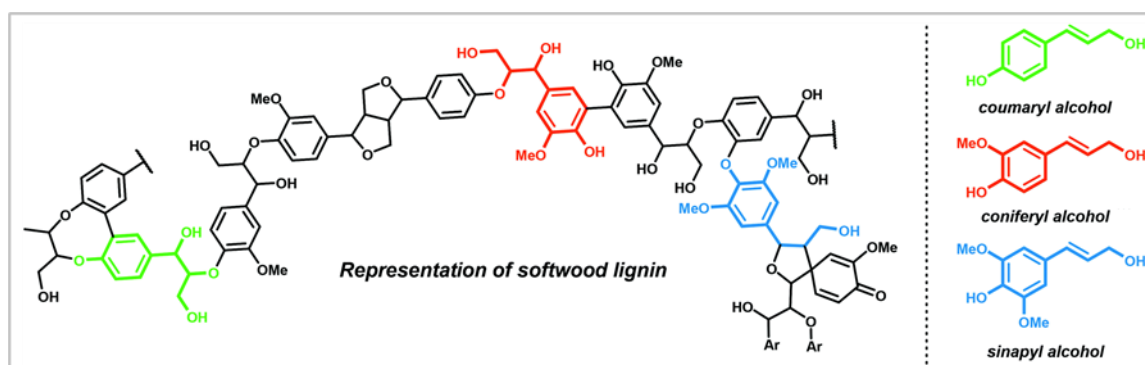


Figura 1. Estrutura molecular da lignina. Destacam-se os principais blocos químicos utilizados para sua síntese. Esses blocos diferem entre si pelo número de metoxilas (-OMe) presentes no anel aromático. Subunidades do tipo H (derivadas do álcool *p*-cumarílico) estão destacados em verde, do tipo G (derivadas do álcool coniferílico) em vermelho e do tipo S (derivadas do álcool sinapílico) em azul. Adaptado de Kärkäs et al (2016).

Um dos principais desafios tecnológicos para a conversão da lignina em bioquímicos é a heterogeneidade dos compostos oriundos de sua fragmentação, o que impõe limitações para se chegar em produtos de alta pureza com alto rendimento (Beckham et al, 2016). Essa heterogeneidade origina-se, principalmente, das diferentes proporções de H, G e S nas matérias-primas utilizadas (Fig. 2) - pois variam de espécie para espécie e de tecido para tecido -, da variedade na abundância relativa das ligações

que conectam esses blocos químicos (del Río et al, 2015) e do processo empregado no pré-tratamento da matéria-prima (Liu et al, 2019).

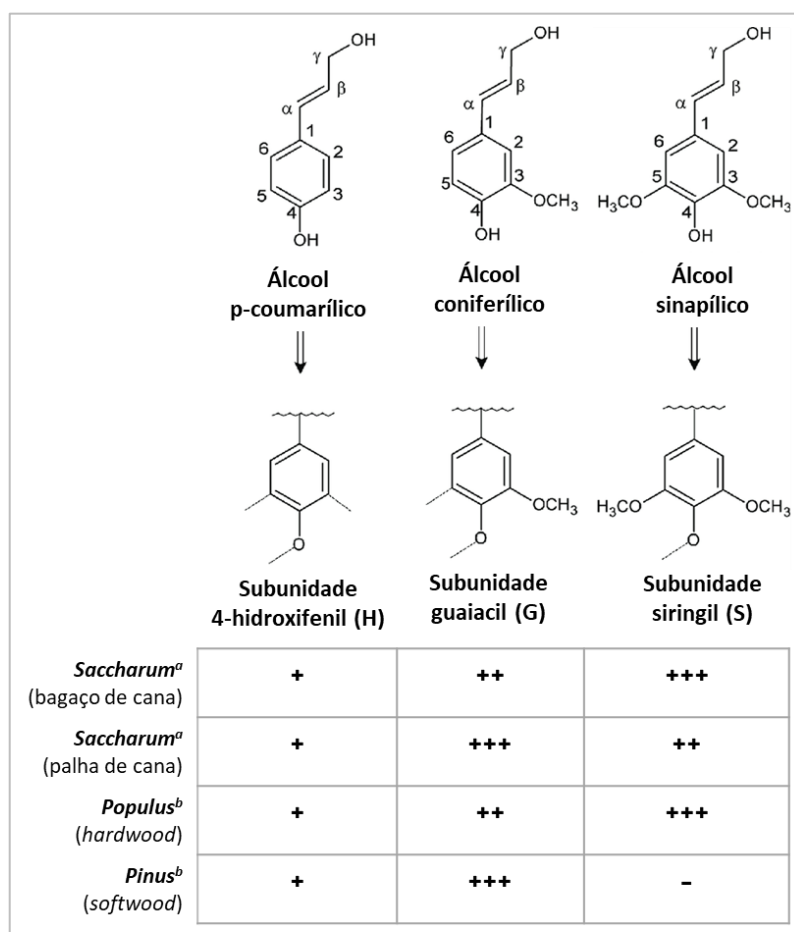


Figura 2. Estrutura química dos monolignóis e proporção relativa de sua distribuição em diferentes gêneros e tecidos vegetais, evidenciando a variação na abundância relativa desses compostos entre espécies e tecidos. Quando incorporados à lignina, as subunidades são referidas como 4-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Os símbolos indicam ausência (-) ou abundância relativa (+, ++, +++) desses blocos químicos de acordo com os valores descritos por (del Río et al, 2015)^a e (Xu et al, 2019)^b. Imagem adaptada de (Schoenherr, Ebrahimi & Czermak, 2018), (Macrae, Robinson & Sadler, 1993).

Diante desse obstáculo, pesquisadores têm buscado soluções inspiradas na natureza para a valorização da lignina por vias biológicas, podendo abranger três processos: despolimerização da lignina, degradação de compostos aromáticos e biossíntese de produtos de interesse (Liu et al, 2019). Nesse contexto, um fator preponderante é o processo nomeado por Beckham e colaboradores de afunilamento biológico (Fig. 3), pelo qual alguns microrganismos, principalmente bactérias, convertem uma variedade de compostos aromáticos, através de vias metabólicas, em intermediários

químicos que podem ser afunilados para moléculas mais centrais do metabolismo de carbono - como o protocatecuato e o catecol (Beckham et al, 2016).

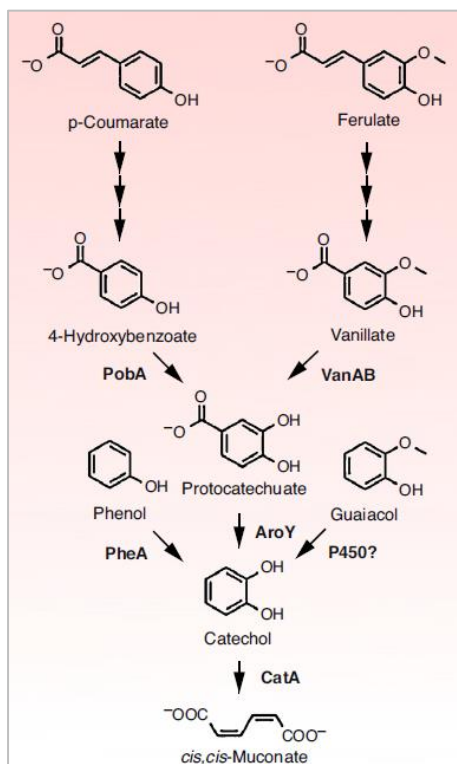


Figura 3. Esquema representativo do conceito de afunilamento biológico. Alguns compostos modelo de lignina (p-cumarato e ferulato) são convertidos ao intermediário químico central (protocatecuato) e subsequentemente ao composto cis-cis-muconato, que pode ser convertido em ácido adípico (precursor do nylon) ou ácido tereftálico (precursor do PET) por processos químicos. Adaptado de Beckham et al (Beckham et al, 2016).

O primeiro trabalho a demonstrar o conceito de afunilamento biológico foi publicado na PNAS, em 2014, e mostra a conversão de lignina (oriunda de pré-tratamento de biomassa) em polihidroxialcanoatos de cadeia média pela bactéria *Pseudomonas putida* KT2440, que naturalmente cataboliza compostos aromáticos (Linger et al, 2014). Os polihidroxialcanoatos de cadeia média têm aplicações como bioplásticos e podem ser convertidos, por métodos químicos, a hidrocarbonetos combustíveis, mostrando a aplicabilidade do afunilamento biológico para a valorização da lignina (Linger et al, 2014). Num outro trabalho, pesquisadores modificaram o metabolismo de *Pseudomonas putida*, através de engenharia genética, para potencializar a bioconversão de hidrolisados de lignina em ácido *cis,cis* mucônico (precursor do nylon), conseguindo produzir quilogramas desse composto a 98% de pureza em escala piloto (Kohlstedt et al, 2018).

1.2. *Xanthomonas* spp.: alvo promissor para a descoberta de estratégias para o catabolismo de compostos derivados da lignina

Há vários anos, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* 306 tem sido usada como modelo de estudo de sistemas enzimáticos para a desconstrução da parede celular vegetal no nosso laboratório, com o foco em enzimas ativas sobre carboidratos. Durante essas pesquisas, observou-se que, além de um rico repertório de enzimas dedicadas a despolimerização e utilização de polissacarídeos vegetais, essa bactéria também guarda em seu genoma genes dedicados ao metabolismo de compostos aromáticos. Essa observação chamou a atenção, pois esses genes eram similares aos que atuam na bioconversão de lignina em outros microrganismos, indicando que eles talvez desempenhem o mesmo papel em *Xanthomonas*. Buscando por evidências na literatura, encontramos relatos que datam da década de 70 sobre a capacidade de bioconversão de lignina por esse gênero bacteriano. Porém, poucos estudos foram encontrados sobre os mecanismos enzimáticos que as bactérias desse gênero utilizam para esse fim (Wang et al, 2015).

Em 1978, Odier e Monties publicaram o primeiro trabalho sobre biodegradação de lignina de trigo por *Xanthomonas* sp. (Odier & Monties, 1978). Na década de 80, Kern e colaboradores demonstraram que um isolado bacteriano de *Xanthomonas* sp. era capaz de degradar dehidropolímeros de álcool coniferílico (DHP) e complexos lignocelulósicos derivados do milho (Kern, 1984; Kern, Webb & Eggeling, 1984). Num outro trabalho, William e Mahadevan demonstram que várias espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. axonopodis* pv *citri*, são capazes de catabolizar compostos aromáticos derivados da lignina (William & Mahadevan, 1980). Em 1987, Kern e Kirk publicaram outro trabalho mostrando que *Xanthomonas* sp. strain 99 é capaz de degradar ligninas com massa molecular na faixa de 600 a 1000 Da (Kern & Kirk, 1987).

Desde então, observa-se uma lacuna de quase 30 anos nas publicações sobre degradação de lignina por *Xanthomonas* spp. Porém, com o advento das ferramentas ômicas, estudos recentes sobre consórcios microbianos para degradação de biomassa vegetal voltaram a mostrar *Xanthomonas* spp. como bactérias capazes de degradar materiais lignocelulósicos (Jiménez et al, 2016). Em outro estudo, *Xanthomonadaceae* foi um dos apenas 6 taxas (entre 558 avaliados) que tiveram seu crescimento estimulado exclusivamente pela lignina, dentre diversos substratos testados (Goldfarb et al, 2011).

Além de apresentar evidências de sua capacidade de metabolizar compostos derivados da lignina, a bactéria *X. axonopodis* pv *citri* possui outros atributos que fazem dela um candidato atraente para o estudo de vias metabólicas para a valorização da lignina: ela é filogeneticamente distante dos modelos bacterianos mais estudados, favorecendo a descoberta de estratégias inéditas de bioconversão, e ela é cultivável e geneticamente manipulável, permitindo-se avaliar o papel de enzimas e transportadores *in vivo*, usando, por exemplo, estratégias de nocauteamento gênico. Ademais, nossa equipe de trabalho tem acumulado um vasto conhecimento sobre a regulação do metabolismo dessa bactéria por polissacarídeos da parede celular vegetal (manuscrito em preparação), bem como sobre o funcionamento do seu arsenal enzimático dedicado a degradação dos mesmos, permitindo-nos avaliar possíveis estratégias que contemplem o uso de lignina em combinação com outros resíduos vegetais para a produção de um determinado produto como o ácido *cis,cis* mucônico, por exemplo.

1.3. Identificação de novos genes potencialmente envolvidos com o catabolismo de compostos aromáticos em *X. axonopodis* pv *citri*

Analisando o genoma de *X. axonopodis* pv *citri* (da Silva et al, 2002) observamos a presença de dois genes com similaridade remota a enzimas oxidativas localizados próximo do operon que codifica enzimas da via do catabolismo do protocatecuato, um intermediário chave do metabolismo de subunidades do tipo G e H da lignina (Fig. 4). Segundo análises do banco de dados BioCyc (Karp et al, 2017), esses dois genes (XAC0353 e XAC0354) juntamente com XAC0352 formam uma unidade transcricional e são flanqueados por dois reguladores transcricionais do tipo MarR (XAC0351) e pobR (XAC0355), respectivamente (Fig. 5).

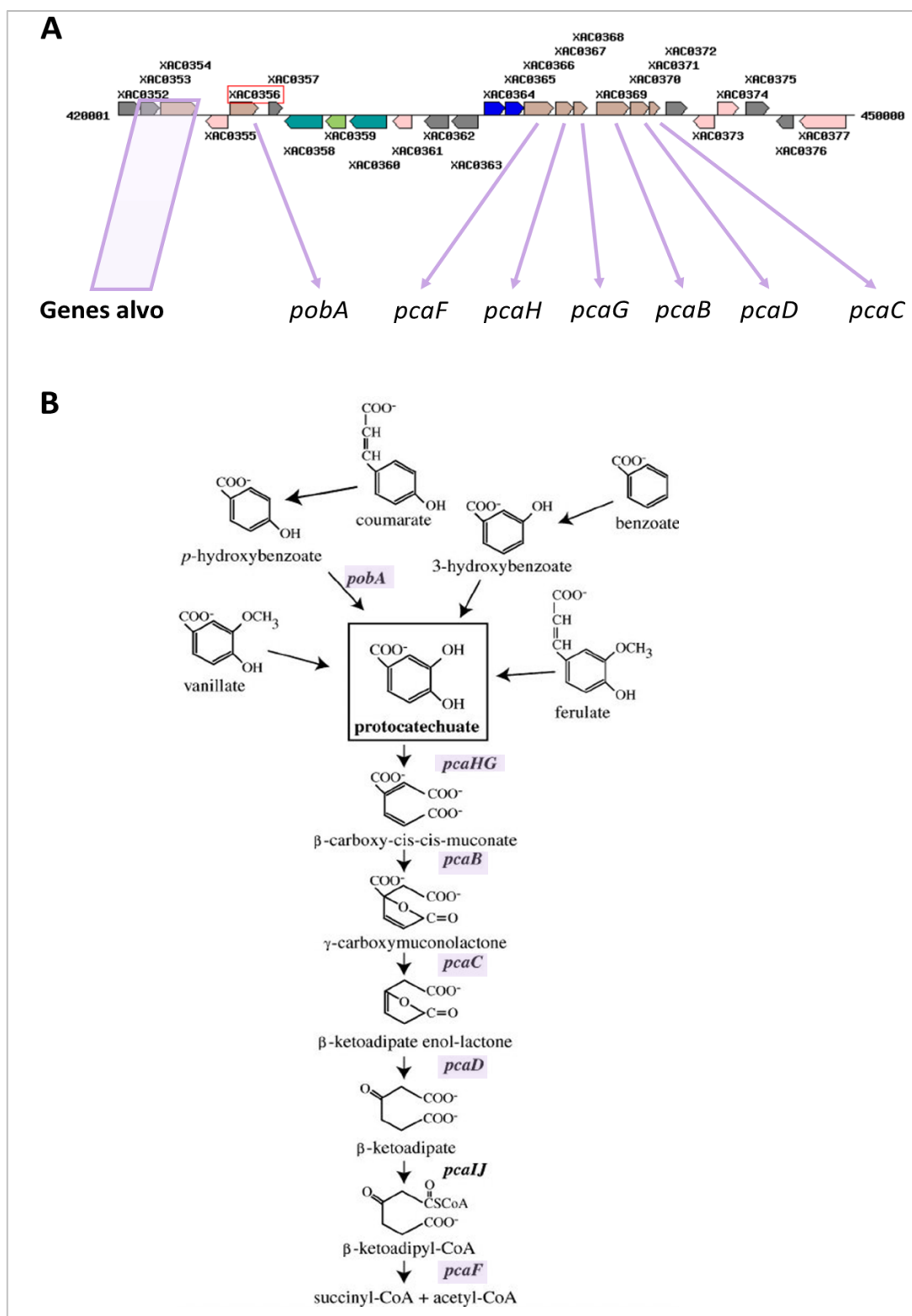


Figura 4. Identificação de genes potencialmente envolvidos com o catabolismo de compostos derivados da lignina em *X. axonopodis* pv *citri*. **A)** Contexto genômico dos genes XAC0353 e XAC0354 (genes alvo), destacando sua proximidade com genes homólogos a membros da via catabólica do protocatecuato caracterizados em outros microrganismos (indicados com setas). **B)** Esquema representativo da via do catabolismo do protocatecuato destacando em roxo os genes identificados no genoma de *X. axonopodis* pv *citri*. Adaptado de Buchan, Neidle & Moran, 2004).

XAC0352 (UniprotKB: Q8PQH3) foi anotado como codificante de uma proteína hipotética conservada, mas análises de bioinformática utilizando a ferramenta HHPRED (Söding, Biegert, & Lupas, 2005) indicam que esse gene potencialmente codifica um transportador de membrana externa. O gene XAC0353 (UniprotKB: Q8PQH2) apresenta homologia remota com genes de álcool desidrogenases, enquanto XAC0354 (UniprotKB: Q8PQH1) é predito codificar uma benzaldeído desidrogenase II.

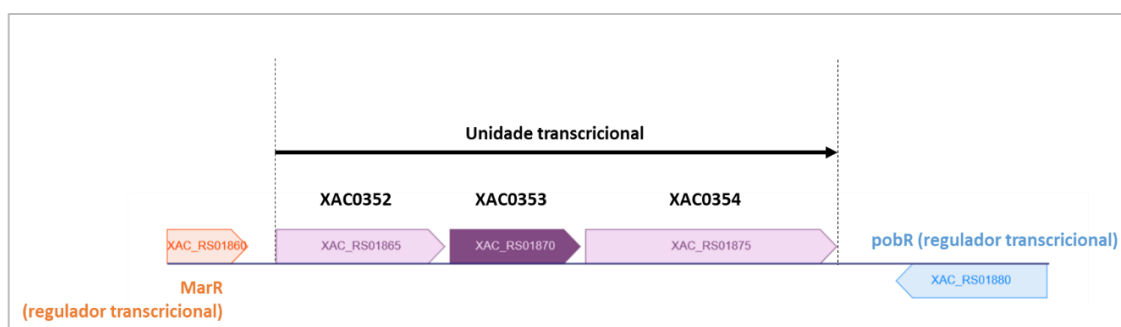


Figura 5. Esquema representativo da unidade transcricional formada pelos genes XAC0352-XAC0354 segundo predições do banco de dados BioCyc (Karp et al, 2017). Note a presença de reguladores transcripcionais *upstream* e *downstream* aos genes que formam esse potencial operon.

XAC0354 apresenta cerca de 50% de identidade com benzaldeído desidrogenases II de *Acinetobacter calcoaceticus* (MacKintosh, & Fewson, 1988a; MacKintosh & Fewson, 1988b) e *Acinetobacter bayli* (ADP1) (Jones et al, 1999), codificadas pelos genes *XylC* (UniProtKB: Q59095) e *AreC* (UniProtKB: Q9XC28), respectivamente. Esses genes estão localizados em operons ao lado de genes de álcool desidrogenases (*XylB* e *AreB*), de modo semelhante a XAC0353 e XAC0354. No operon de *AreC* há um gene de uma benzil esterase, não encontrado no operon de *XylC*. Diante disso, os autores sugerem que *AreC* e vizinhos estão associados ao catabolismo de benzil ésteres e *XylC* estaria associado apenas ao catabolismo de álcoois benzílicos (Jones et al, 1999). *XylC* possui alta especificidade com o benzaldeído, mas também atua sobre outros derivados, como o 4-hidroxibenzaldeído. Para essas enzimas não foram realizados testes com coniferaldeído. Interessantemente, a enzima codificada por *XylB* possui atividade contra o álcool coniferílico, porém, quando XAC0353 é alinhada com *XylB* verifica-se que não há identidade de sequência, indicando origens evolutivas distintas. O mesmo resultado é obtido no alinhamento da XAC0353 com a *AreB*, para qual ainda não há dados sobre a atividade contra o álcool coniferílico. Outras proteínas resultantes da busca por álcool desidrogenases ativas sobre aromáticos correspondem a álcool cinamílico desidrogenases

(CAD; EC 1.1.1.195) de origem vegetal, as quais estão associadas à biossíntese de lignina (Baucher et al, 1996) e catalisam tanto a redução de aldeídos quanto a oxidação de álcoois, dando preferência às reações de redução (Sattler et al, 2009).

Os genes *CalA* (UniProtKB: P0DMP5) e *CalB* (UniProtKB: O86447) de *Pseudomonas sp.* HR199 codificam uma álcool coniferílico desidrogenase (CADH_{HR199}) e uma coniferaldeído desidrogenase (CALDH_{HR199}), respectivamente (Overhage, Priefert & Steinbüchel, 1999). CADH_{HR199} possui 99% de cobertura e 61% de identidade com XAC0353. CALDH_{HR199}, por sua vez, apresenta alta especificidade pelo coniferaldeído e outros derivados de cinamaldeído, mas tem apenas 68% de cobertura e 30 % de identidade com XAC0354. No banco de dados BRENDA (Chang et al, 2021), que contém informações sobre enzimas caracterizadas experimentalmente, CALDH_{HR199} é a única enzima registrada com o número EC 1.2.1.68, correspondente a coniferaldeído desidrogenases. Por outro lado, em uma busca por coniferaldeído desidrogenases no banco de dados *Uniprot*, dois outros genes *CalB* são encontrados, um de *Pseudomonas aeruginosa* (UniProtKB: Q9I6C8) e outro de *Caulobacter vibrioides* (UniProtKB: Q9A777), que apresentam aproximadamente 60% de cobertura e 30% identidade de sequência com XAC0354, enquanto têm cerca de 90% de cobertura e 50% de identidade de sequência com a CALDH_{HR199}. Dessa forma, em nossas análises não encontramos estudos sobre a caracterização de ortólogos de XAC0353 e de XAC0354 que se dispõem em série no genoma de outras bactérias, indicando que o operon formado por XAC0352-53-54 não parece ter um equivalente funcionalmente caracterizado.

Sendo assim, uma das nossas primeiras hipóteses de trabalho é de que XAC0353 e XAC0354 atuam em série, de forma análoga aos pares gênicos XylB/XylC, AreB/AreC e CalA/CalB na bioconversão de compostos aromáticos. Para testar essa hipótese, o presente projeto utilizou uma abordagem bioquímica e estrutural que será integrada a estudos de nocauteamento gênico (em desenvolvimento por outros membros da equipe) a fim de se desvendar a função de XAC0353 e XAC0354. Vale ressaltar que não se encontram na literatura dados funcionais sobre as proteínas codificadas por esses genes, sendo que os homólogos mais próximos já caracterizados apresentam menos de 62% de identidade de sequência com as mesmas. Além disso, tais proteínas apresentam menos de 33% e 39% de identidade, respectivamente, com sequências depositadas no *Protein Data Bank*, evidenciando a grande divergência evolutiva que apresentam com enzimas de estrutura conhecida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste projeto foi elucidar a estrutura e função de duas enzimas de *X. axonopodis pv citri* potencialmente utilizadas para o catabolismo de compostos aromáticos derivados da lignina e que apresentam baixa identidade de sequência com homólogas já caracterizadas, visando contribuir para o conhecimento da diversidade de estratégias moleculares disponíveis na natureza para a transformação da lignina em bioquímicos de interesse industrial.

2.2. Objetivos específicos

- Clonagem dos genes XAC0353 e XAC0354 em vetores de expressão;
- Expressão, purificação, cristalização e determinação da estrutura cristalográfica das enzimas de interesse;
- Caracterização biofísica das enzimas de interesse;
- Ensaios de atividade para determinar a função bioquímica das enzimas de interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extração do DNA genômico de *X. axonopodis pv citri* 306

Colônias de *X. axonopodis pv citri* 306 foram cultivadas em meio LB sem NaCl (LBON – 1% *m/v* peptona de carne, 0,5% *m/v* extrato de levedura), na presença de 100 µg/mL de ampicilina, devido a sua resistência natural a esse antibiótico, a 30 °C e 200 rpm (Vanini et al, 2008). Em seguida, 1 mL do cultivo foi centrifugado a 12.000 *g* por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de H₂O milli-Q esterilizada, sendo posteriormente centrifugado a 15.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 200 µL de H₂O milli-Q esterilizada. A amostra foi mantida em banho-maria a 100 °C por 10 min. Após resfriada em banho de gelo, foi centrifugada a 15.000 *g* por 20 s e o sobrenadante armazenado a -20 °C. A concentração de DNA na amostra foi medida em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*).

3.2. Construções Gênicas

A partir do DNA genômico de *X. axonopodis pv citri* 306, duas construções de cada gene de interesse, XAC0353 (UniProtKB: Q8PQH2) e XAC0354 (Q8PQH1), compreendendo as ORFs completas, foram amplificadas por PCR para clonagem no vetor pJET e posterior subclonagem nos vetores de expressão pET28a (His-tag N-terminal) e pET21b (His-tag C-terminal), utilizando pares de oligonucleotídeos com sítios de restrição (NdeI e XhoI) específicos para esses vetores (Tabela 1). Como estratégia alternativa, introduzimos um sítio de restrição para EcoRI nos oligonucleotídeos diretos para permitir a subclonagem no vetor pGEX-4T-1 (cauda N-terminal de glutathione S-transferase), caso a expressão utilizando os vetores pET não fosse bem-sucedida (Tabela 1).

Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Phusion DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*), seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos amplificados foram extraídos do gel de agarose (0,8%) e purificados utilizando o kit Gel Extraction Kit (Qiagen) de acordo com o manual do fabricante.

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação dos genes XAC0353 e XAC0354. Nas sequências, os sítios de restrição estão destacados em itálico e o códon de parada, em negrito. Enzimas de restrição e seus respectivos sítios: EcoRI (g'aa ttc), NdeI (ca't atg) e XhoI (c'tc gag). Por precaução, o sítio para EcoRI foi introduzido nos primers FW, para permitir a subclonagem no vetor pGEX-4T-1, caso fosse necessário.

Gene (tamanho)	Primer	Sequência 5' → 3'	Vetor de expressão
XAC0353 (765 pb)	XAC0353_FW	<i>gaa ttc cat</i> ATG AAT TTG CAG AAC AAG ACT ATC GTG GTG	pET28a/pET21b
	XAC0353_RV1	<i>ctc gag</i> TTA CAG CGT TGT GGA AGC CAG C	pET28a
	XAC0353_RV2	<i>ctc gag</i> CAG CGT TGT GGA AGC CAG C	pET21b
XAC0354 (1479 pb)	XAC0354_FW	<i>gaa ttc cat</i> ATG AAT GCT CTT ACC AGC GC	pET28a/pET21b
	XAC0354_RV1	<i>ctc gag</i> TTA GAA CGG ATA CTG CGG CAC TTC	pET28a
	XAC0354_RV2	<i>ctc gag</i> GAA CGG ATA CTG CGG CAC TTC	pET21b

3.2.1. Clonagem em vetor pJET

Os produtos das reações de PCR purificados foram ligados ao vetor pJET (*Thermo Scientific*), seguindo o protocolo de clonagem *blunt-end*. Quatro construções foram geradas, duas de cada gene alvo, específicas para cada vetor de expressão a ser testado.

Os vetores de clonagem foram utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico. Após a transformação, as células foram mantidas a 37 °C, 200 rpm por 1 h e, em seguida, plaqueadas em meio LB ágar (1% *m/v* triptona, 1% *m/v* cloreto de sódio, 0,5% *m/v* extrato de levedura, 1,5% *m/v* ágar) seletivo com ampicilina 100 µg/mL (concentração final), sendo incubadas em estufa a 37 °C por 16 h. Colônias selecionadas de cada placa foram inoculadas individualmente em 4 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL e incubadas por 16h, a 37 °C e 200 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas, o meio descartado e os plasmídeos extraídos das bactérias utilizando o kit *Qiaprep Spin Miniprep* (*Qiagen*). Para confirmação dos clones positivos e posterior subclonagem nos vetores de expressão, foi realizada restrição dos produtos extraídos com as enzimas *Fast digest* NdeI e XhoI (*Fermentas*), reagindo por aproximadamente 2 h, a 37 °C. O volume total de cada reação foi de 30 µL, compostos por: 3 µL tampão Fast, 1 µL NdeI, 1 µL XhoI e o volume de DNA correspondente a cerca de 3000 ng da amostra. Após confirmação da clivagem através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) com 1 µL de amostra, o volume restante da reação foi utilizado para uma nova eletroforese, como descrito no item a seguir. As sequências dos fragmentos

amplificados foram confirmadas por sequenciamento do DNA plasmidial utilizando os *primers* específicos de cada construção.

3.2.2. Subclonagem nos vetores de expressão

Para a etapa de subclonagem, os vetores de expressão pET28a e pET21b, que conferem resistência à canamicina e ampicilina, respectivamente, também foram clivados com as enzimas *Fast digest* NdeI e XhoI (*Thermo Scientific*). As reações ocorreram durante 2 h, a 37 °C, para volume total de 30 µL compostos por: 3 µL tampão Fast, 1 µL NdeI, 1 µL XhoI e o volume de DNA correspondente a cerca de 1600 ou 2400 ng da amostra. Em seguida, a clivagem dos vetores foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) com 1 µL de amostra. Após confirmação, os fragmentos correspondentes aos genes e os vetores foram submetidos a uma nova eletroforese, com o volume restante de amostra, para serem extraídos com o kit *Gel Extraction Kit* (*Qiagen*). Posteriormente, foi efetuada a ligação de cada fragmento com seu respectivo vetor por 14 h a 4 °C, utilizando a enzima T4 DNA ligase (*Promega*) para um volume total de 10 µL/reação, de acordo com o protocolo do fabricante.

As construções obtidas foram utilizadas para transformar células de *E. coli* DH5α termo-competentes, posteriormente plaqueadas em meio LB ágar contendo canamicina 50 µg/mL (construções em pET28a) ou ampicilina 100 µg/mL (construções em pET21b) para seleção dos transformantes. Clones positivos foram confirmados a partir da análise de restrição do DNA plasmidial a 37 °C, durante 30 min, após este ser extraído com o kit *Qiaprep Spin Miniprep* (*Qiagen*). O volume total de cada reação foi de 10 µL (1 µL tampão *Fast* + 0,5 µL NdeI + 0,5 µL XhoI + volume de DNA correspondente a cerca de 150 ng da amostra). As sequências dos insertos foram confirmadas por sequenciamento do DNA plasmidial utilizando-se os *primers* específicos de cada construção e os *primers* T7, que se anelam aos vetores pET.

3.3. Expressão heteróloga em *E. coli*

3.3.1. Testes de expressão

As construções obtidas em vetor de expressão foram utilizadas para transformar, por choque térmico, três diferentes linhagens de *E. coli*: BL21 (DE3) ΔSlyD contendo o

plasmídeo pRARE II, C41 (DE3) e SHuffle. A linhagem BL21 (DE3) é utilizada para obtenção de alto rendimento na expressão de proteínas recombinantes. Como não possui as proteases OmpT e Lon, o nível de degradação da proteína heteróloga na célula é bastante reduzido (Terp, 2006). O *knockout* do gene da proteína peptidil prolil cis-trans isomerase SlyD (Δ SlyD) nessa linhagem previne a contaminação da proteína alvo pela proteína SlyD durante a cromatografia de afinidade, uma vez que a SlyD é rica em resíduos vizinhos de histidina, apresentando afinidade pela resina de Ni^{2+} imobilizado (Mokhonov et al, 2018). Já a presença do plasmídeo pRARE II confere a essa linhagem uma maior produção de tRNA contendo códons raros, que podem ser necessários para síntese da proteína heteróloga (Burgess-Brown et al, 2008). A linhagem C41 (DE3) é derivada da BL21 (DE3), mas é mais eficiente na expressão de proteínas tóxicas e proteínas de membrana (Dumon-Seignovert, Cariot & Vuillard, 2004). Já a linhagem SHuffle, também desprovida das proteases OmpT e Lon, foi engenheirada para promover o enovelamento correto de proteínas ricas em fontes dissulfeto (Anton et al, 2016). Todas essas linhagens contêm o gene da T7 RNA polimerase, cuja expressão ocorre na presença do agente indutor IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo). A T7 RNA polimerase, por sua vez, reconhece a região promotora de alguns vetores de expressão – como o pET, utilizado neste trabalho - dirigindo a expressão da proteína-alvo, que também acontece sob indução do IPTG.

A partir das colônias transformantes, preparou-se um pré-inóculo em 2 mL de meio LB, contendo canamicina 50 $\mu\text{g/mL}$ ou ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$, mantido por 16 h a 37 °C, 200 rpm. O inóculo foi realizado em tubos contendo 5 mL de meio LB com o respectivo antibiótico. As culturas foram mantidas a 37 °C, 200 rpm por cerca de 1 h. No momento em que a densidade ótica em 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) atingiu aproximadamente 0,4, as culturas passaram a ser incubadas a 20 °C, 200 rpm. Quando atingiram uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,6-0,8, foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo, Sigma Aldrich) para uma concentração final de 0,5 mM. O período de incubação ocorreu durante 16 horas, a 20 °C e 200 rpm.

As culturas resultantes foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 *g*, 4 °C, e os pellets obtidos foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (tampão 1), contendo NaCl 0,3 M e fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4). As células foram lisadas em sonicador *Sonics Vibra-Cell*TM utilizando a ponteira *Stepped Microtip* (REF 630-0422), com amplitude de 20% e 2 pulsos de 15 segundos com 30 segundos de intervalo. Alíquotas de 20 μL foram coletadas, para cada amostra de extrato total, e adicionadas a 10 μL de

tampão de amostra 3x concentrado (94,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 3% (m/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 7,5% (v/v) de β -mercaptoetanol e 0,015% (m/v) de azul de bromofenol), sendo aquecidas a 90 °C por 3 minutos. As amostras restantes foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 25 μ L de resina *Ni-NTA Superflow* (Qiagen), que foi mantido em agitação por 15 min a 4 °C. Após centrifugação por 3 minutos a 700 g, o sobrenadante foi removido e a resina foi lavada com 150 μ L tampão 2 (tampão 1 contendo 50 mM de imidazol), sendo mantida em agitação por 15 min a 4 °C. As amostras foram novamente centrifugadas por 3 minutos a 700 g e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de tampão de amostra 1x concentrado, para liberar as proteínas ligadas na resina para o meio aquoso. As amostras foram então centrifugadas a 12000 rpm, por 3 minutos, aquecidas a 90 °C pelo mesmo intervalo de tempo, e centrifugadas novamente nas mesmas condições. A análise da expressão foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, 13%) das duas amostras (extrato total e extrato solúvel pós resina). O marcador de massa molecular utilizado foi *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

3.3.2. Expressão em larga escala

As linhagens SHuffle e BL21 (DE3) Δ SlyD + pRARE II foram utilizadas para expressão em larga escala das proteínas XAC0353 (clonada no pET28a) e XAC0354 (clonada no pET21b), respectivamente. As células foram transformadas e cultivadas em dois erlenmeyers de 2 L contendo 500 mL de meio LB cada (total = 1 litro/linhagem/experimento) contendo o antibiótico correspondente, tal como descrito na seção anterior. As culturas resultantes foram centrifugadas por 15 minutos, 8000 rpm a 4 °C. Os *pellets* de células foram armazenados a -20 °C para posterior etapa de purificação.

3.4. Purificação

3.4.1. Cromatografia de afinidade

Para a purificação das proteínas alvos, um *pellet* correspondente a 500 mL de cultura foi ressuscitado em 40 mL de tampão A (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, pH 7,4), 400 μ L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 M,

200 μ L de benzamidina 1 M e 250 μ L de DNase (5 mg/mL). As células foram incubadas sob agitação, a 4 °C, durante 15 min. Em seguida, foram lisadas em sonicador Sonics Vibra-Cell™ durante 15 minutos, com 30% de amplitude em pulsos de 15 s com intervalos de 45 s, mantendo-se as amostras em banho de gelo. O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 30000 g, 4 °C. O sobrenadante foi então coletado e filtrado em filtro de seringa 0,45 μ m (MILLEX®).

A proteína alvo presente no extrato solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade a níquel em coluna HiTrap® Chelating HP 5 mL (*GE Healthcare*), acoplada ao sistema ÄKTA-FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography* – Amersham Biosciences). O sistema foi previamente equilibrado com tampão A e a eluição das proteínas de interesse foi realizada através de um gradiente não linear com tampão B (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7,4). O gradiente consistiu nas seguintes etapas: degrau em 10% B (em 3 volumes de coluna, CV), degrau em 16% B (2 CV), gradiente de 16 a 100% B (20 CV), e degrau em 100% B (4 CV). Amostras de 1,8 mL foram coletadas. O processo foi monitorado no comprimento de onda 280 nm e as amostras analisadas através de SDS-PAGE 13% em condições desnaturantes (Laemmli, 1970).

3.4.2. Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

As cromatografias de exclusão molecular foram realizadas em coluna Superdex 200 16/60 (*GE Healthcare*) acoplada ao sistema ÄKTA-FPLC, previamente equilibrada com o tampão (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 ou HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5). Para evitar a precipitação das proteínas alvo, essas foram dialisadas contra o tampão da exclusão molecular antes de serem concentradas em filtro Amicon Ultra-15 10.000 MW (*Millipore*) para a injeção na coluna. As corridas foram realizadas com fluxo de 1 mL/min e amostras de 1,8 mL foram coletadas. Em seguida, frações representativas dos picos observados foram analisadas em SDS-PAGE 13% e por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), como descrito a seguir. As de menor polidispersividade foram agrupadas e concentradas em filtro Amicon Ultra-15 10.000 MW (*Millipore*). Como o congelamento de alíquotas (80 μ L) em -80 °C não alterou a concentração e o perfil de DLS das proteínas alvo, essas foram alíquotadas e armazenadas em -80 °C para posteriores análises, quando necessário.

A quantificação das amostras concentradas foi determinada pela medida da absorção da amostra em 280 nm (Edelhoch, 1967), utilizando o coeficiente de absortividade molar ε (XAC0353 = 33.460 M⁻¹ cm⁻¹ e XAC0354 = 43.555 M⁻¹ cm⁻¹) calculado a partir da sequência de aminoácidos da proteína de interesse utilizando a ferramenta *ProtParam* (Gasteiger et al, 2003) no site *Expasy* (<http://us.expasy.org/>).

Além das análises de DLS, as amostras purificadas foram submetidas a ensaios de desnaturação térmica, dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*), cristalização e atividade enzimática.

3.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz permite analisar o grau de homogeneidade estrutural da amostra e calcular o raio hidrodinâmico de proteínas puras. Para realizar as medidas, foram utilizadas amostras concentradas (>1 mg/mL) ou frações geradas a partir da cromatografia de exclusão molecular. Os dados foram obtidos a 18 °C no *Malvern Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), com um laser de 633 nm, em uma cubeta de quartzo com ângulo de espalhamento de 90°. Os raios hidrodinâmicos foram obtidos a partir da extrapolação do coeficiente de difusão translacional (Dt), de acordo com a equação de Stokes-Einstein, após um número de medições definido automaticamente pelo *software* do equipamento.

3.6. Thermal Shift

A estabilidade da proteína XAC0353 em diferentes condições de pH, concentração de sal e temperatura foi avaliada através da técnica de *Thermal Shift* - também conhecida como *Differential Scanning Fluorimetry (DSF)*. Para isso, efetuou-se uma triagem de 23 tampões (*JBS Solubility Kit*, Jancarik et al (2004)), cobrindo a faixa de pH entre 3 e 10, combinados com 4 concentrações de NaCl (600 mM, 300 mM, 150 mM e 50 mM). Para o preparo das reações, foram utilizados o tampão (concentração final = 20 mM), a solução de NaCl, o SYPRO Orange (10x, *Thermo Fisher Scientific*) e a proteína (2 µM). Os tampões utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Tampões utilizados e respectivo pH.

Tampão	pH	Tampão	pH
<i>Glycine</i>	3.0	<i>Ammonium Acetate</i>	7.0
<i>Sodium Citrate</i>	3.2	<i>MOPS</i>	7.0
<i>PIPPS</i>	3.7	<i>Sodium / Potassium Phosphate</i>	7.0
<i>Sodium Citrate</i>	4.0	<i>Tris</i>	7.5
<i>Sodium Acetate</i>	4.5	<i>EPPS</i>	8.0
<i>Sodium / Potassium Phosphate</i>	5.0	<i>Imidazole</i>	8.0
<i>Sodium Citrate</i>	5.5	<i>Bicine</i>	8.5
<i>Sodium / Potassium Phosphate</i>	6.0	<i>Tris</i>	8.5
<i>Bis-Tris</i>	6.0	<i>CHES</i>	9.0
<i>MES</i>	6.2	<i>CHES</i>	9.5
<i>ADA</i>	6.5	<i>CAPS</i>	10.0
<i>Bis-Tris Propane</i>	6.5		

Em todos os ensaios, as reações (25 µl/reacção) foram preparadas em placas ópticas de 96 poços 0,1 mL (*Applied Biosystems*), posteriormente cobertas com película óptica (*Applied Biosystems*) para aplicação no equipamento. O termociclador (*Applied Biosystems ViiA 7 system*) foi programado no modo *Melt curve*, seleccionando *Other* no menu do reagente para detecção do alvo e *Standard* para as propriedades da corrida. ROX foi seleccionado como repórter e *None* para o *quencher* e para a referência passiva. A curva de *melting* foi defininda com o protocolo seguinte: 15 °C por 2 min, seguido por um aumento de 1 °C/min até atingir 85 °C, finalizando com 2 min a 85 °C. Os dados brutos foram extraídos no formato MS-Excel. A fluorescência arbitrária foi plotada em função da temperatura e o cálculo da T_m (temperatura de *melting*) foi realizado através da equação de Boltzman utilizando o programa Origin(Pro) (Version 2021b, OriginLab Corporation).

3.7. Dicroísmo Circular (CD)

Esta técnica foi utilizada para analisar os conteúdos de estrutura secundária e acessar informações sobre a estabilidade térmica das enzimas-alvo. Os experimentos foram realizados em espectropolarímetro J-810 da Jasco. As medidas foram realizadas no UV distante no intervalo de 195-260 nm, a cada 0,5 nm, usando cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico e proteína a uma concentração de 5 µM, preparada a partir diluição de amostras concentradas em tampão fosfato, para diminuir a concentração de sal e prevenir o aumento da voltagem do equipamento, de modo que a concentração do tampão na solução final foi fosfato de sódio 10 mM e NaCl 75 mM. Os parâmetros da coleta foram: taxa de scan de 50 nm/min, tempo de resposta de 1 s, sensibilidade de 100 mdeg, 20 acumulações. Os experimentos de desnaturação térmica foram conduzidos usando taxa de aquecimento de 1 °C/min e monitorados em comprimentos de onda fixos (208 nm e 218 nm) no intervalo de 15 a 85 °C.

Após serem corrigidas pela subtração do espectro de CD do tampão, as medidas foram convertidas de elipticidade para elipticidade molar residual média ($[\theta]_{\lambda}$) pela fórmula: $[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{10 \times d \times c}$, onde θ_{obs} = elipticidade (graus), **MRW** = massa molecular residual média (Da), calculada dividindo-se a massa molecular da proteína expressa pelo seu número de resíduos, **d** = caminho ótico (cm) e **c** = concentração de proteína (g/mL). Para a determinação da temperatura de *melting* (T_m), os dados de elipticidade relativos à desnaturação térmica foram normalizados em termos de fração desenovelada e plotados em função da temperatura. A partir das curvas geradas, foi realizado o cálculo da T_m utilizando-se a equação de Boltzman no programa Origin(Pro) (Version 2021b, OriginLab Corporation).

3.8. SEC-RALS/LALS

Para estimar o estado oligomérico de XAC0353 e XAC0354, experimentos de cromatografia de exclusão molecular (do *inglês size-exclusion chromatography* - SEC) acoplada a detectores de espalhamento estático de luz em ângulo reto (do *inglês right angle light scattering* - RALS) e em baixo-ângulo (do *inglês low angle light scattering* - LALS) foram efetuados utilizando uma coluna analítica de exclusão molecular Superdex 200 HR 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada a um sistema OmniSEC (Malvern Panalytical),

composto por um módulo dedicado a etapa de cromatografia líquida (OmniSEC RESOLVE), um módulo contendo múltiplos detectores (OmniSEC REVEAL) e um software para a coleta e processamento dos dados.

Um total de 80 µL de cada enzima (1 mg/mL), previamente purificadas por SEC em tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM; pH 7,5), foram injetados a cada corrida. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão e as corridas foram realizadas a 18 °C com um fluxo de 0,4 mL/min. Foram realizadas 3 corridas, a partir da mesma alíquota, para cada enzima-alvo. Os dados foram analisados através do software do próprio sistema OmniSEC, utilizando albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) como padrão para calibrar o sistema. A BSA foi dissolvida no tampão da corrida a uma concentração de 5 mg/mL e submetida à análise seguindo o mesmo protocolo das demais amostras, exceto pela concentração de proteína na amostra injetada (5 mg/mL). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), situado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

3.9. Ensaios de cristalização

As amostras concentradas das proteínas alvo foram submetidas à triagem inicial de condições de cristalização com diferentes kits comerciais. O método empregado foi difusão de vapor em gota sentada, utilizando-se 0,5 µL de proteína e 0,5 µL de solução de cristalização, equilibrados com 80 µL de solução do reservatório. Seis kits foram testados: Crystal Screen HT (Hampton Research), Wizard Screens I e II (Emerald Biosystems), PACT (Nextal/Qiagen), JCSG (Nextal/Qiagen), SaltRx (Hampton Research) e Precipitant Synergy (Emerald Biosystems).

Na primeira tentativa de cristalização da XAC0353, foi utilizada uma amostra concentrada a 10 mg/mL, purificada em tampão fosfato (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Na segunda tentativa, a proteína, purificada em tampão HEPES (20 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7,5), estava com uma concentração de 13 mg/mL e foi suplementada com NAD⁺ para concentração final de 0,5 mM. Para a XAC0354, a amostra, também purificada em tampão HEPES e acrescida de NAD⁺ 0,5 mM, estava a uma concentração de 20 mg/mL.

Os ensaios foram realizados no ROBOLAB (LNBIO-CNPEM) com o auxílio de sistemas automatizados para o preparo de formulações (*Matrix Maker – Emerald*

BioSystems), preparo das placas (*HoneyBee 963 - Digilab Global*) e visualização das gotas (*Rock Imager 1000 - Formulatrix*). Microplacas de 96 poços Crystal EX™ (Corning) foram utilizadas, sendo mantidas a 18 °C em salas climatizadas com temperatura controlada.

3.10. Coleta e processamento de dados de difração

Dados de difração de raios X foram coletados na linha MANACÁ do Sirius (Campinas, SP, Brasil) a 100 K, utilizando cristais de XAC0353 crescidos na condição que continha cacodilato de sódio 0,1 M (pH 6,5) e citrato trissódico 1 M. Um total de 3600 imagens foram coletadas por conjunto, cada uma com intervalo de rotação $\Delta\phi$ de 0,1° e tempo de exposição de 0,1 s. A transmissão do feixe foi atenuada para 7,5 %. O comprimento de onda foi fixado em 1,37 Å e a distância do detector até a amostra foi de 230 mm. Os dados foram processados utilizando o pacote de programas XDS (Kabsch, 2010), através da interface gráfica XDSGUI (SBGrid Consortium, 2021). Para a etapa de Substituição Molecular foi utilizado o programa PHASER (McCoy et al, 2007) do pacote PHENIX (Liebschner et al, 2019). Um modelo conjunto (*ensemble*) de busca foi criado usando a ferramenta *ensemblar.phenix* a partir das cadeias polipeptídicas presentes nos arquivos PDBs 4I5G (Lerchner et al, 2013), 5T2U (Blaise et al, 2017) e 2DKN (Nakamura et al, 2006), as quais foram sobrepostas e editadas de forma a excluir regiões com R.M.S.D (do inglês *Root Mean Square Deviation*) > 3 Å.

3.11. Caracterização bioquímico-cinética

3.11.1. Preparo de substratos e co-substratos

Os estoques de compostos aromáticos (substratos) e de co-substratos (NAD⁺, NADP⁺ e NADH) utilizados neste trabalho foram preparados nas concentrações e condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Preparo dos estoques de substratos e co-substratos.

Substrato	Concentração	Solvente/Preparo
3,4-dihidroxibenzaldeído	15 mM	Água, temperatura ambiente
4-hidroxibenzaldeído	15 mM	Água, temperatura ambiente
Ácido 4-hidroxibenzóico	15 mM	Água, temperatura ambiente
Ácido benzóico	5 mM	Água; submetidos a ultrasonicador com aquecimento, seguido por aquecimento a 45 °C por 15 min, a 750 rpm
Ácido ferúlico	5 mM	
Ácido vanílico	11 mM	Água (20% etanol), temperatura ambiente
Álcool 4-hidroxibenzílico	15 mM	Água, temperatura ambiente
Álcool benzílico	15, 25 ou 50 mM	Água, temperatura ambiente
Álcool coniferílico	5 mM	Água, temperatura ambiente
Álcool vanílico	15 mM	Água, temperatura ambiente
Coniferaldeído	7 mM	Água alcalina (pH 9,8); submetido a ultrasonicador com aquecimento
Siringaldeído	15 mM	Água; aquecido a 65 °C até solubilizar
Vanilina	15 mM	Água, temperatura ambiente
NAD⁺, NADP⁺ e NADH	1 a 20 mM	Dissolvidos em tampão bicine (20 mM, pH 8)

3.11.2. Determinação da população ativa e do co-substrato da XAC0354

Para avaliar qual a população ativa da XAC0354, foram utilizadas amostras de proteína concentrada após purificação em tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5), correspondentes aos picos 02 e 03 da SEC. As reações (volume final = 100 µL) continham co-substrato (NAD⁺ ou NADP⁺) 0,5 mM, benzaldeído 1 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8) e enzima 15 µM. As reações foram realizadas em triplicata, incubadas por 30 min, a 30 °C, e interrompidas por aquecimento a 95 °C por 5 min. A formação de NAD(P)H foi monitorada pela absorbância em 340 nm, a partir de alíquotas de 100 µL de cada reação, por leitura em placa de 96 poços no leitor de placas *Infinite® 200 PRO* (TECAN), utilizando as configurações de leitura padrão do equipamento. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

3.11.3. Triagem de substratos e co-substratos

Para XAC0353, álcool vanílico, álcool benzílico, álcool 4-hidroxibenzílico e álcool coniferílico foram testados na presença de NAD^+ ou NADP^+ . Para a XAC0354, os ensaios foram realizados utilizando benzaldeído, vanilina, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, 3,4-dihidroxibenzaldeído ou coniferaldeído na presença de NAD^+ . Os testes ocorreram através de reações contendo tampão bicina 20 mM (pH 8), co-substrato 0,5 mM (NAD^+ ou NADP^+), substrato 1 mM e enzima 15 μM , em um volume final de 100 μL . Todos os substratos foram diluídos em água (Tabela 3). A duração das reações foi de 30 min, a 30 °C, sendo interrompidas por aquecimento a 95 °C por 5 min ou pela adição de 100 μL de acetonitrila, seguida por centrifugação a 14000 rpm, durante 10 min a 4 °C, e transferência de 100 μL do sobrenadante para uma placa de 96 poços para a leitura de absorção ou fluorescência, como descrito a seguir.

A atividade oxidoredutase pode ser medida indiretamente pela formação de NAD(P)H , através de absorbância a 340 nm ou pela emissão de fluorescência em 458 nm, após excitação a 340 nm (Mallinson et al, 2018; Held, 2007). Como o benzaldeído não absorve luz no comprimento onda de 340 nm, pode-se monitorar, sem interferências, a formação de NADH pelo aumento da absorbância da reação em 340 nm. No entanto, a vanilina e os demais substratos testados também absorvem luz nesse comprimento de onda, mas não emitem fluorescência nessas condições. Por isso, na maior parte dos ensaios bioquímicos realizados neste trabalho, a produção de NAD(P)H foi monitorada pela emissão de fluorescência em 458 nm, após excitação a 340 nm.

As medidas de absorbância e fluorescência foram realizadas através de leitura em placa de 96 poços no leitor de placas *Infinite® 200 PRO* (TECAN), utilizando as configurações de leitura padrão do equipamento. As medidas de fluorescência foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

3.11.4. Avaliação da especificidade de co-susbtrato em condições otimizadas

Com o objetivo de avaliar a especificidade de co-substrato em condições otimizadas, quanto à concentração de substrato, co-substrato e enzima, foram realizadas reações com NAD^+ ou NADP^+ em condições definidas a partir dos ensaios de cinética enzimática e das condições ótimas de reação, como descrito nos próximos tópicos.

Para a XAC0354 foram preparadas reações (volume final = 100 μ L), contendo co-substrato (NAD^+ ou NADP^+) 5 mM, benzaldeído ou vanilina 1 mM e tampão bicina 20 mM (pH 8,5). Para a XAC0353, as reações (volume final = 100 μ L) continham co-substrato (NAD^+ ou NADP^+) 2 mM, álcool benzílico ou álcool coniferílico 1 mM, tampão glicina 100 mM (pH 9,5) e DTT 1 mM. A concentração de enzima nas reações respeitava as condições de linearidade para cada substrato, como descrito na seção 3.11.10. Os ensaios foram efetuados em triplicata, durante 10 min, a 30 °C, adicionando-se 100 μ L de acetonitrila para encerrar a reação.

A formação de NAD(P)H foi monitorada pela emissão de fluorescência, como descrito anteriormente, após centrifugar as amostras por 10 min a 14000 rpm, 4 °C, utilizando-se alíquotas de 100 μ L de cada reação. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

3.11.5. Definição das condições ótimas de pH e temperatura

3.11.5.1 XAC0353

Para determinação da temperatura ótima, reações (volume total = 100 μ L) contendo XAC0353 0,75 μ M, NAD^+ 0,5 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8) e álcool benzílico 5 mM, foram preparadas em placas de 96 poços e incubadas em termociclador nas temperaturas de 10 a 70 °C, variando 5 ou 10 °C entre cada ponto.

Para avaliar o pH ótimo, as reações (volume total de 100 μ L) foram incubadas a 30 °C, contendo XAC0353 0,75 μ M, NAD^+ 0,5 mM, álcool benzílico 5 mM e o respectivo tampão a uma concentração final de 20 mM. Para tamponar as reações, foram utilizados os tampões acetato (pH 4 a 5,5), HEPES (pH 7), bicina (pH 7,6 a 9), glicina-NaOH (pH 9,5) e CAPS (pH 10 a 11).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O tempo de reação foi de 30 minutos, sendo interrompida por uma etapa a 95 °C durante 5 min, para o ensaio de temperatura, ou pela adição de 100 μ L de acetonitrila, para o ensaio de pH. A formação de NADH foi monitorada pela emissão de fluorescência, como descrito anteriormente, a partir de alíquotas de 100 μ L de cada reação, após centrifugação por 10 min a 14000 rpm e 4 °C. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

3.11.5.2 XAC0354

As reações para determinação da temperatura ótima foram realizadas em triplicata, com um volume total de 100 μ l, contendo XAC0354 15 μ M, NAD^+ 0,5 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8) e benzaldeído 1 mM. O preparo das reações foi realizado em placas de 96 poços, as quais foram incubadas nas temperaturas de 10 a 60 $^{\circ}\text{C}$, variando 10 $^{\circ}\text{C}$ entre cada ponto, em termociclador.

Os ensaios de pH também foram realizados em triplicata, a 30 $^{\circ}\text{C}$, com volume total de 100 μ l, contendo XAC0354 5 μ M, NAD^+ 0,5 mM, e benzaldeído 5 mM. As reações foram tamponadas com tampão acetato 20 mM (pH 4 a 5,5), tampão bicina 20 mM (pH 7,6 a 9), tampão HEPES 20 mM (pH 7) ou tampão CAPS 20 mM (pH 10).

Para os dois ensaios, o tempo de reação foi de 30 minutos, sendo interrompida por uma etapa a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. A formação de NADH foi monitorada pela absorbância em 340 nm, como descrito anteriormente, a partir de alíquotas de 100 μ L de cada reação, após diluição em 100 μ L de água miliQ e centrifugação por 10 min a 14000 rpm e 4 $^{\circ}\text{C}$. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

3.11.6. Ensaio de estabilidade de XAC0353 em diferentes faixas de pH

Para os testes de estabilidade, a atividade da enzima foi avaliada em pH 8,5, mais próximo do fisiológico, após sua pré-incubação (5 min) em tampões com pHs 9,5 e 10. Em um segundo ensaio, realizado em triplicata, a proteína foi pré-incubada por diferentes intervalos de tempo (5, 10 e 20 min) em tampão pH 9,5 e depois diluída no meio reacional. As reações foram realizadas na concentração saturante de NAD^+ definida previamente (2 mM), a 30 $^{\circ}\text{C}$ e utilizando álcool benzílico (1 mM) como substrato. Em cada ensaio, a pré-incubação foi realizada com uma alíquota de enzima a uma concentração de 100 μ M. Em seguida, a enzima foi diluída para 10 μ M no tampão da reação (tampão bicina 80 mM, pH 8,5) e adicionada às reações (concentração final = 0,5 μ M). As reações foram interrompidas pela adição de 100 μ L de acetonitrila. Alíquotas de 100 μ L foram utilizadas para monitorar a formação de NADH pela emissão de fluorescência, como descrito anteriormente, após centrifugar as amostras por 10 min a 14000 rpm e 4 $^{\circ}\text{C}$. Para pré-incubação das amostras, foram utilizados os tampões glicina-NaOH (pH 9,5) e CAPS (pH

10) a uma concentração de 100 mM. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

3.11.7. Efeito de íons e DTT sobre a atividade enzimática

O efeito de íons na atividade da XAC0353 foi avaliado através de reações (100 µl), contendo XAC0353 0,75 µM, NAD⁺ 0,5 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8,5), álcool benzílico 5 mM e sais de cátions divalentes 1 mM ou EDTA (agente quelante) 1 mM. As reações, preparadas em triplicata, foram incubadas por 30 min, a 30 °C, e interrompidas pela adição de 100 µL de acetonitrila. Ensaios de linearidade com álcool coniferílico na presença ou na ausência de DTT 1 mM foram realizados para avaliar o efeito desse agente redutor na atividade de XAC0353. As reações (T = 30 °C) continham XAC0353 0,025 µM, álcool coniferílico 1 mM, NAD⁺ 2 mM e tampão glicina-NaOH 100 mM (pH 9,5). O ensaio foi realizado a 30 °C e as reações foram interrompidas pela adição de 100 µL de acetonitrila, após os tempos de 5, 8 e 12 minutos. A formação de NADH foi monitorada pela emissão de fluorescência, a partir de alíquotas de 100 µL de cada reação, após centrifugar as amostras por 10 min a 14000 rpm e 4 °C.

Para avaliar o efeito de íons e DTT na atividade da XAC0354, foram preparadas reações (100 µL), contendo XAC0354 5 µM, NAD⁺ 0,5 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8,5), benzaldeído 5 mM e sais de cátions divalentes, EDTA ou DTT a uma concentração de 1 mM. As reações foram incubadas por 30 min, a 30 °C, e interrompidas por aquecimento a 95 °C por 5 min. A formação de NADH foi monitorada pela absorbância em 340 nm, a partir de alíquotas de 100 µL de cada reação, após diluição em 100 µL de água miliQ e centrifugação por 10 min a 14000 rpm e 4 °C.

Todas as medidas de atividade foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima). Para os ensaios foram utilizados os seguintes sais: CoCl₂, MgCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ e CaCl₂.

3.11.8. Avaliação da atividade inversa

Ensaios de atividade na presença de NADH foram realizados com XAC0353 e XAC0354 para investigar se essas enzimas também catalisam a reação no sentido inverso, ou seja, se elas são capazes de reduzir aldeídos e ácidos, respectivamente. As reações (100 µL) foram realizadas em triplicata e incubadas a 30 °C, por 10 min, sendo

interrompidas pela adição de 100 μL de acetonitrila. As reações com a XAC0353 foram realizadas em pH 9,5 (tampão glicina-NaOH 100 mM), contendo NAD^+ 2 mM e DTT 1 mM. Já as reações com a XAC0354 foram compostas por NAD^+ 5 mM e realizadas em pH 8,5 (tampão bicina 20 mM). A concentração dos substratos utilizados e a quantidade de enzima na reação estão descritas na Tabela 4. Alíquotas de 100 μL foram utilizadas para monitorar o consumo de NADH pela emissão de fluorescência, como descrito nos tópicos acima, após centrifugar as amostras por 10 min a 14000 rpm e 4 °C. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

Tabela 4. Concentração de substrato e quantidade total de enzima em 100 μL de reação para cada enzima nos ensaios de atividade inversa.

Enzima	Substrato	Quantidade de enzima (μg)
XAC0354	Ác. Benzoico 1 mM	1,3
	Ác. Vanílico 0,1 mM	0,7
	Ác. 4-hidroxibenzaldeído 0,1 mM	0,7
	Ác. Ferúlico 0,1 mM	0,7
XAC0353	Benzaldeído 1 mM	7,2
	Vanilina 0,3 mM	7,2
	4-hidroxibenzaldeído 0,25 mM	7,2
	Coniferaldeído 0,1 mM	0,36

3.11.9. Identificação dos produtos das reações por HPLC

A identidade dos produtos gerados pela atividade desidrogenase de XAC0353 e XAC0354 foi confirmada por análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC). Reações (500 μL) contendo substrato 0,2 mM, NAD^+ 1 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8,5) e 5 μM (XAC0353) ou 1,25 μM (XAC0354) de enzima foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 min, sendo posteriormente aquecidas por 5 min a 95 °C. Antes da aplicação no equipamento, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e filtradas em filtro de seringa Millex 0,22 μm . As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Ultimate 3000 (*Thermo*) equipado com detector UV-visível em 274 nm, coluna

analítica Acclaim C18 3 μm , 4,6 x 150 mm na temperatura de 30 °C. O eluente utilizado foi 0,3% ácido acético em água (A) e metanol (B) e fluxo de análise de 0,5 mL/min no seguinte gradiente: t=0 a 40 min: 15% B e 85% A a 30% (B) e 70% A; t= 40 a 55 min: 30% B e 70% A; t= 55 a 55,1 min: 30% B e 70% A a 15% B e 85% A; t= 55, 1 a 60 min 15% B e 85% A. A operação do equipamento e o suporte no desenvolvimento da metodologia foram realizados pela equipe da instalação da Central Analítica do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR/CNPEM).

3.11.10. Cinética enzimática

Para os ensaios de cinética enzimática, álcool vanílico, álcool 4-hidroxibenzílico e álcool coniferílico foram utilizados como substratos da XAC0353, enquanto benzaldeído, vanilina, 4-hidroxibenzaldeído, 3,4-dihidroxibenzaldeído e coniferaldeído foram os substratos utilizados para a XAC0354. Reações (volume final = 100 μL) contendo concentrações crescentes de substrato (Tabela 5) foram realizadas a 30 °C, por 10 min, em triplicata, sendo interrompidas pela adição de 100 μL de acetonitrila. As reações com a XAC0353 foram realizadas em pH 9,5 (tampão glicina-NaOH 100 mM), contendo NAD^+ 2 mM e DTT 1 mM. Já as reações com a XAC0354 foram compostas por NAD^+ 5 mM e realizadas em pH 8,5 (tampão bicina 20 mM). A concentração de NAD^+ na reação foi definida através de ensaios de atividade variando-se a concentração de substrato e de NAD^+ , sendo escolhida aquela a partir da qual foi verificada saturação da enzima por esse co-substrato.

Testes iniciais com diferentes tempos e concentrações de enzima foram realizados a fim de se definir a concentração de enzima ideal para garantir condições lineares de resposta, isto é, quando a velocidade da reação é constante dentro do intervalo de tempo analisado. Assim, os ensaios enzimáticos foram realizados com concentrações de enzima que respeitassem as condições de linearidade para cada substrato, que correspondem aos valores apresentados na Tabela 6. Após o término da reação, estabelecido pela adição de 100 μL de acetonitrila, as amostras foram centrifugadas por 10 min, a 14000 rpm, 4 °C, e alíquotas de 100 μL foram coletadas para leitura em placa de 96 poços no leitor de placas *Infinite® 200 PRO* (TECAN), utilizando as configurações de leitura padrão do equipamento. Para o benzaldeído, foi feita a leitura da absorbância a 340 nm. Para os demais substratos, foi mensurada a emissão de fluorescência em 458 nm, após excitação

a 340 nm. Todas as medidas foram corrigidas pela subtração das leituras das respectivas reações “branco” (sem enzima).

Tabela 5. Concentrações de substrato em 100 µl de reação para cada curva de cinética enzimática.

Substrato	Concentrações (mM)/100µl
Benzaldeído	0,05/0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6/1,0/2,0/3,0/5,0
Vanilina	0,01/0,02/0,03/0,04/0,05/0,075/0,1/0,15/0,2/0,35/0,5/0,75/1,0
4-hidroxibenzaldeído	0,01/0,03/0,05/0,075/0,1/0,15/0,2/0,25/0,35/0,45/0,5/0,75/1,0
3,4-dihidroxibenzaldeído	0,05/0,1/0,15/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6/0,75/1,0/1,5/2,0/3,0/4,0
Coniferaldeído	0,01/0,03/0,05/0,1/0,15/0,2/0,25/0,35/0,75/1,0/1,5/2,0/2,25
Álcool vanílico	0,01/0,05/0,1/0,15/0,3/0,45/0,6/0,75/1,0/1,5/2,0/3,0
Álcool 4-hidroxibenzílico	0,01/0,03/0,05/0,75/0,1/0,25/0,4/0,5/0,75/1,0/2,0/2,5
Álcool coniferílico	0,006/0,01/0,025/0,35/0,05/0,1/0,35/0,5/0,75/1,0/1,5/2,0

Tabela 6. Quantidade total de enzima em 100 µl de reação para cada substrato nos ensaios de cinética enzimática. Os valores estão de acordo com as concentrações de enzima que respeitam as condições de linearidade para cada substrato.

Enzima	Substrato	Quantidade (µg)/100µl
XAC0354	Benzaldeído	1,2
	Vanilina	0,6
	4-hidroxibenzaldeído	0,6
	3,4-dihidroxibenzaldeído	1,2
	Coniferaldeído	0,6
XAC0353	Álcool vanílico	1,4
	Álcool 4-hidroxibenzílico	1,4
	Álcool coniferílico	0,07

Os valores de absorbância ou fluorescência obtidos foram correlacionados com aqueles encontrados para curva padrão de NADH previamente construída (como descrito abaixo), permitindo calcular a quantidade de NADH produzido pela enzima em cada reação. As atividades enzimáticas foram representadas como v_0/E_T (s^{-1}), onde v_0 indica a velocidade inicial de reação ($\mu\text{mol/s}$) e E_T , a quantidade total de enzima em μmol , considerando a massa do protômero (XAC0353 = 29,3 kDa e XAC0354 = 52,5 kDa)

calculada a partir da sequência de aminoácidos da proteína recombinante utilizando o *ProtParam* (Gasteiger et al, 2005).

O cálculo dos parâmetros cinéticos para o benzaldeído, o álcool 4-hidroxibenzílico e o álcool vanílico nos respectivos intervalos de concentração descritos na Tabela 5 foi efetuado utilizando o modelo de Hill, definido pela função $y = k_{cat} \frac{x^n}{k_{0,5}^n + x^n}$, onde k_{cat} = constante catalítica, $k_{0,5}$ = concentração de substrato correspondente a saturação de 50% dos sítios ativos e n = coeficiente de Hill (ou de cooperatividade). Para os demais substratos, foi utilizado o modelo de inibição pelo substrato, descrito pela função $y = \frac{k_{cat} \cdot x}{K_{0,5} + x(1 + x/K_i)}$, na qual k_{cat} = constante catalítica, $k_{0,5}$ = concentração de substrato correspondente a saturação de 50% dos sítios ativos e k_i = constante de inibição. O *fitting* das curvas foi feito utilizando o programa Origin(Pro) (Version 2021b, OriginLab Corporation).

3.11.11. Construção das curvas padrão de NADH

Curvas padrão de NADH foram construídas para medida da absorbância em 340 nm e da emissão de fluorescência em 458 nm, após excitação a 340 nm. Os ensaios para cada curva foram executados com concentrações de NADH variando de 0,005 a 2 mM. As medidas foram realizadas após adição de 100 µL de acetonitrila. Alíquotas (100 µL) dessa mistura foram coletadas para leitura em placa de 96 poços no leitor de placas *Infinite® 200 PRO* (TECAN), utilizando as configurações de leitura padrão do equipamento.

Os valores de absorbância *versus* [NADH] (Fig. 6A) foram plotados e o coeficiente de regressão linear foi obtido através da linha de tendência da reta, calculada no Microsoft Excel. Já para os dados de fluorescência (Fig. 6B) o *fitting* da curva foi calculado a partir de um modelo logístico de 4 parâmetros, definido pela equação: $\text{Intensidade} = \frac{a-d}{1 + (\frac{x}{c})^b} + d$, onde a é a resposta teórica quando [NADH] = 0, b é a inclinação da curva no ponto de inflexão, c é a [NADH] no ponto de inflexão e d é a resposta teórica à [NADH] infinita (Mallison et al, 2018; Held, 2007). A intensidade é representada em RFU, unidade de fluorescência relativa (do Inglês, *Relative Fluorescence Unit*), que corresponde à quantidade de luz coletada pelo instrumento.

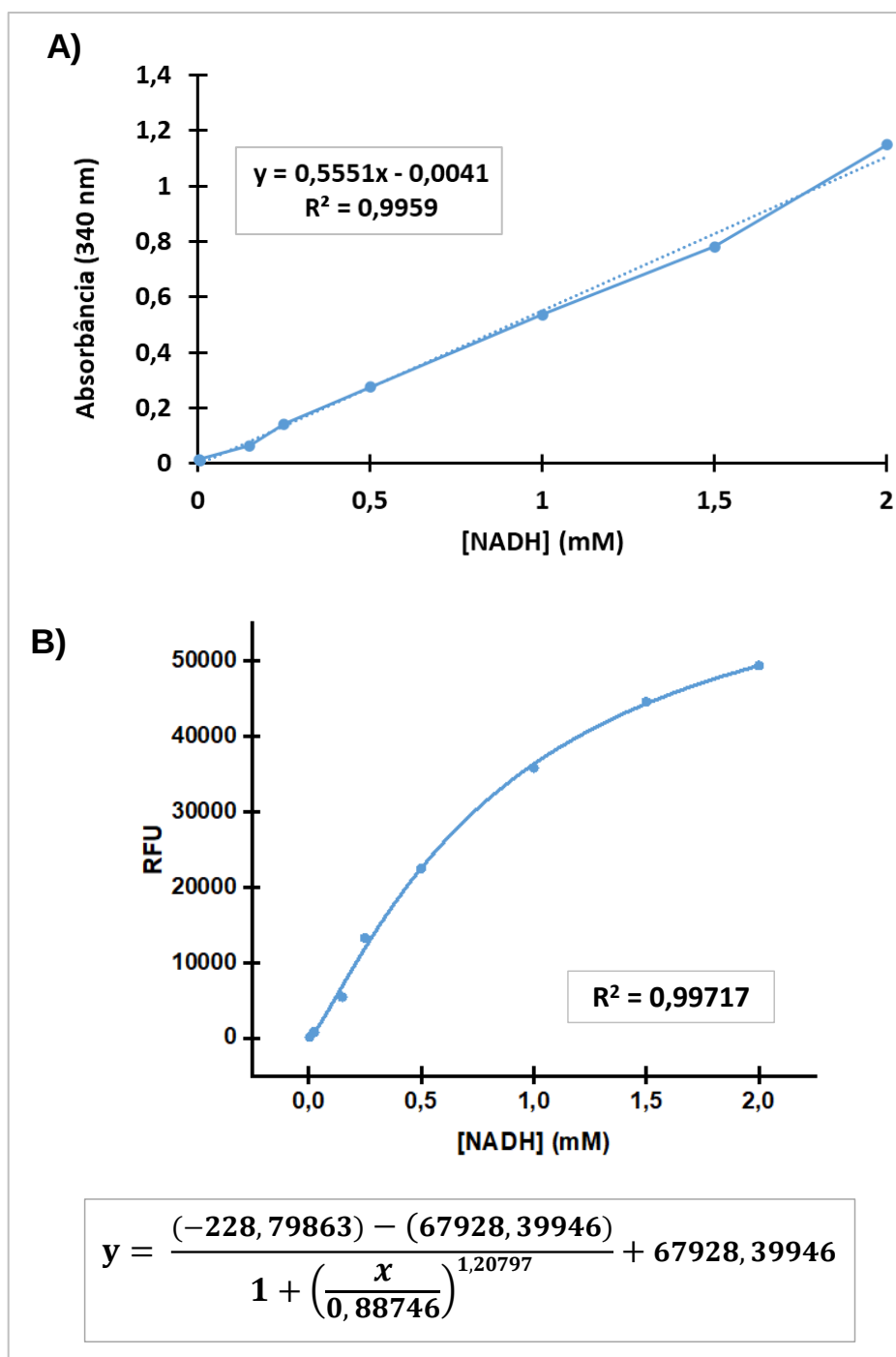


Figura 6. Curvas padrão do NADH com descrição do R^2 e das equações que definem os parâmetros para cada curva. A) Valores de absorbância (340 nm) *versus* [NADH] (pontos) e linha de tendência da reta (linha pontilhada). Dados referentes a medida de uma única amostra por ponto. **B)** *Fitting* da curva (linha contínua) calculado a partir dos valores de fluorescência em 458 nm (pontos), após excitação a 340 nm; Dados referentes à média de duas amostras por ponto. RFU: unidade de fluorescência relativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CAPÍTULO 1: Clonagem e expressão de XAC0353 e XAC0354

4.1.1. Clonagem e subclonagem

Os genes de *X. axonopodis pv citri* 306 foram amplificados a partir do DNA genômico por reações de PCR, como apresentado na Figura 7. Após clonagem das 4 construções em vetor pJET, todas foram subclonadas nos vetores de expressão pET28a e pET21b, exceto a construção XAC0353 em pET21b, cujas tentativas de subclonagem falharam devido à ineficiência das etapas de digestão e ligação. Como testes posteriores de expressão com a construção XAC0353-pET28a apresentaram bons rendimentos de produção da proteína alvo solúvel, optamos por seguir os estudos dessa enzima apenas com essa construção.

A estratégia de se desenhar duas construções para cada enzima, posicionando-se a cauda de histidinas no N-terminal ou no C-terminal, baseou-se em estudos que observaram diferentes efeitos da posição da cauda sobre a solubilidade e a cristalização para uma variedade de proteínas (Woestenenk et al, 2004; Savitsky et al, 2010).

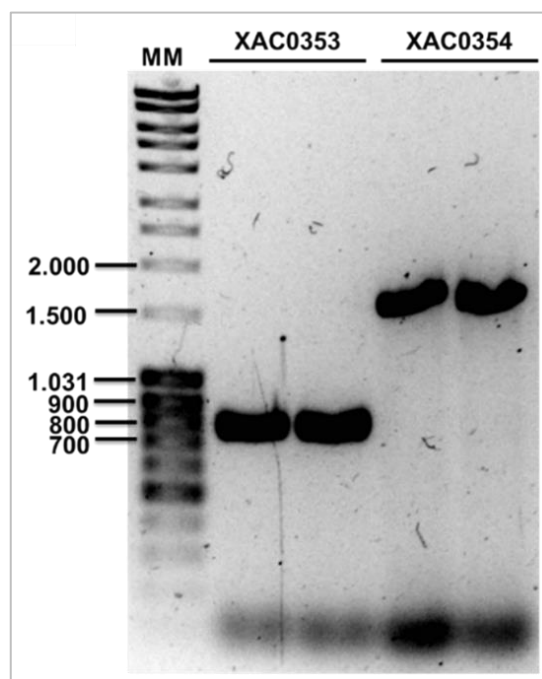


Figura 7. Eletroforese em gel 0,8% *m/v* agarose dos genes amplificados do genoma da *X. axonopodis pv citri* 306. Produtos de PCR correspondentes às diferentes construções dos genes XAC0353 (765 pb) e XAC0354 (1479 pb) para clonagem em pET28a e pET21b, respectivamente. MM: marcador molecular, pb (*Thermo Scientific*).

4.1.2. Expressão heteróloga em *E. coli*

Para XAC0354, todas as combinações de construção (pET28a ou pET21b) e linhagens de *E. coli* testadas resultaram na produção da proteína alvo com alto rendimento na fração solúvel, exceto a combinação *E. coli* C41/pET28a, cujo rendimento ficou abaixo do observado para as outras combinações (Fig. 8A e B). Destacou-se com rendimento máximo a combinação BL21 (DE3) ΔSlyD pRARE II/pET21b, selecionada para expressão em larga escala. Para XAC0353, apenas a cepa SHuffle super-expressou a proteína nos testes realizados (Fig. 8C), sendo, portanto, escolhida para a etapa de expressão em larga escala.

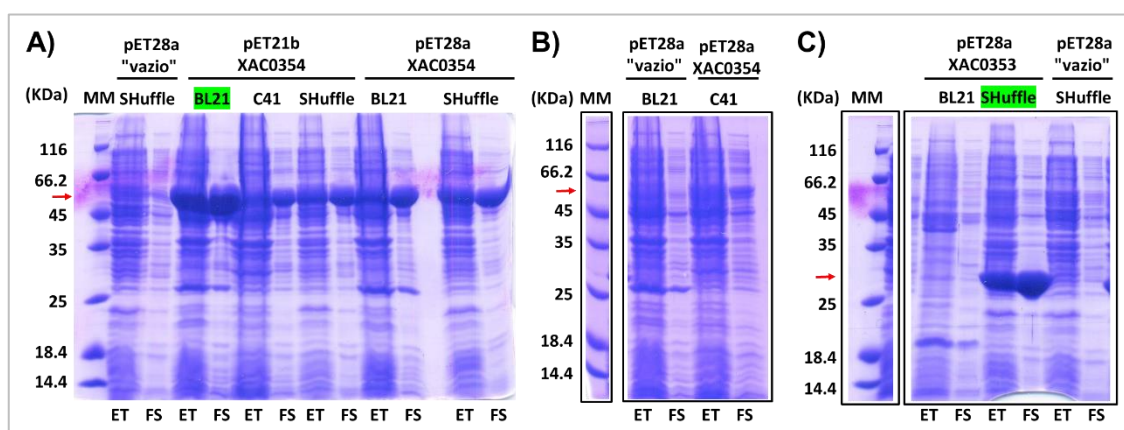


Figura 8. SDS-PAGE 13% das amostras do teste de expressão. A imagem indica o vetor de expressão, a proteína e a linhagem de cada amostra. Nas canaletas foram aplicados 10 µL do padrão de massa molecular (MM - Fermentas), 10 µL das amostras de extrato bruto total (ET), e 10 µL das frações solúveis (FS), enriquecidas com a proteína alvo por pré-incubação em resina Ni-NTA. As amostras indicadas como pET28a “vazio” são os controles negativos não induzidos. Setas vermelhas indicam a faixa de massa molecular das proteínas heterólogas (XAC0353 = 29,3 kDa e XAC0354 = 52,53 kDa). Destaca-se em verde as linhagens escolhidas para expressão em larga escala. MM: marcador de massa molecular (*Thermo Scientific*).

4.2. CAPÍTULO 2: Desvendando a estrutura e a função de XAC0353

4.2.1 Purificação

A fim de se obter uma amostra pura, homogênea e monodispersa, XAC0353 foi submetida a duas etapas de purificação: cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Na primeira, o cromatograma apresentou 2 picos e 1 platô, o qual correspondia à proteína de interesse (Fig. 9A). Com o objetivo de investigar eventuais

diferenças quanto à homogeneidade estrutural entre a região inicial e final desse platô, foram preparadas duas amostras, reunindo-se as frações 41 a 44 (SEC1) e 45 a 51 (SEC2), para serem submetidas à segunda etapa de purificação. Visto que o cromatograma da amostra SEC1 (Fig. 9C) apresentou dois picos com baixa resolução, tentamos concentrar o mix de frações da SEC2, com a intenção de se obter maior resolução. Entretanto, a proteína já se encontrava em seu limite de saturação nessas condições, e a amostra SEC2 (Fig. 9E) apresentou o mesmo perfil cromatográfico da SEC1, indicando que não há diferenças significativas em termos de distribuição de estados oligoméricos entre as amostras referentes ao início e ao fim do platô observado durante a cromatografia de afinidade.

Dados de DLS (Fig. 9F) indicaram que as frações 1, 3 e 5 do primeiro pico da SEC1 (volume de eluição = 65 mL) apresentaram alta polidispersividade (37,1 a 40,4%) e raio hidrodinâmico estimado entre 6 e 8 nm. Além disso, a massa estimada para essas frações está entre 326 e 350 kDa, o que corresponderia a um dodecâmero, considerando a massa de XAC0353 (29,3 kDa). Por outro lado, as misturas das frações 9 a 12 (SEC1) e 7 a 10 (SEC2), pertencentes ao pico predominante (volume de eluição ~ 74 mL), apresentaram polidispersividade inferior a 25% e raio hidrodinâmico de aproximadamente 5 nm, evidenciando alta homogeneidade estrutural e um tamanho compatível com partículas de massa estimada entre 177 e 196 kDa, o que sugere a presença de um hexâmero. Essa estimativa difere do estado oligomérico estimado para a CalA de *P. sp.* HR199, homóloga mais próxima da XAC0353 (60% de identidade), que provavelmente corresponde a um dímero formado por duas subunidades de 27 kDa (Steinbuchel, Priefert & Rabenhorst, 2003).

Em purificações posteriores, optou-se por trocar o tampão da cromatografia de exclusão molecular de fosfato para HEPES, visto que o co-substrato NAD^+ apresenta menor estabilidade em tampão fosfato (Anderson & Anderson, 1963). Além disso, optou-se também por trocar o NaCl por KCl para padronização com o tampão escolhido para a enzima XAC0354 (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5). Interessantemente, ao mudar de tampão, o pico de eluição com maior intensidade na cromatografia de exclusão molecular mudou de ~74 mL para ~60 mL em coluna Superdex 200 16/60 (Fig. 10A) e o raio hidrodinâmico médio analisado por DLS também aumentou, resultando em massas compatíveis com a presença de dodecâmeros de XAC0353, como observado para o pico de menor intensidade na SEC1 (Tabela 7 e Fig. 10B e C). A mudança do tampão fosfato para o tampão HEPES pode ter propiciado condições mais favoráveis à formação de

dodecâmeros. Análises de SEC-RALS/LALS, realizadas com amostras também purificadas em tampão HEPES, corroboram esses dados, como discutido na seção a seguir (Figura 10 e Tabela 7).

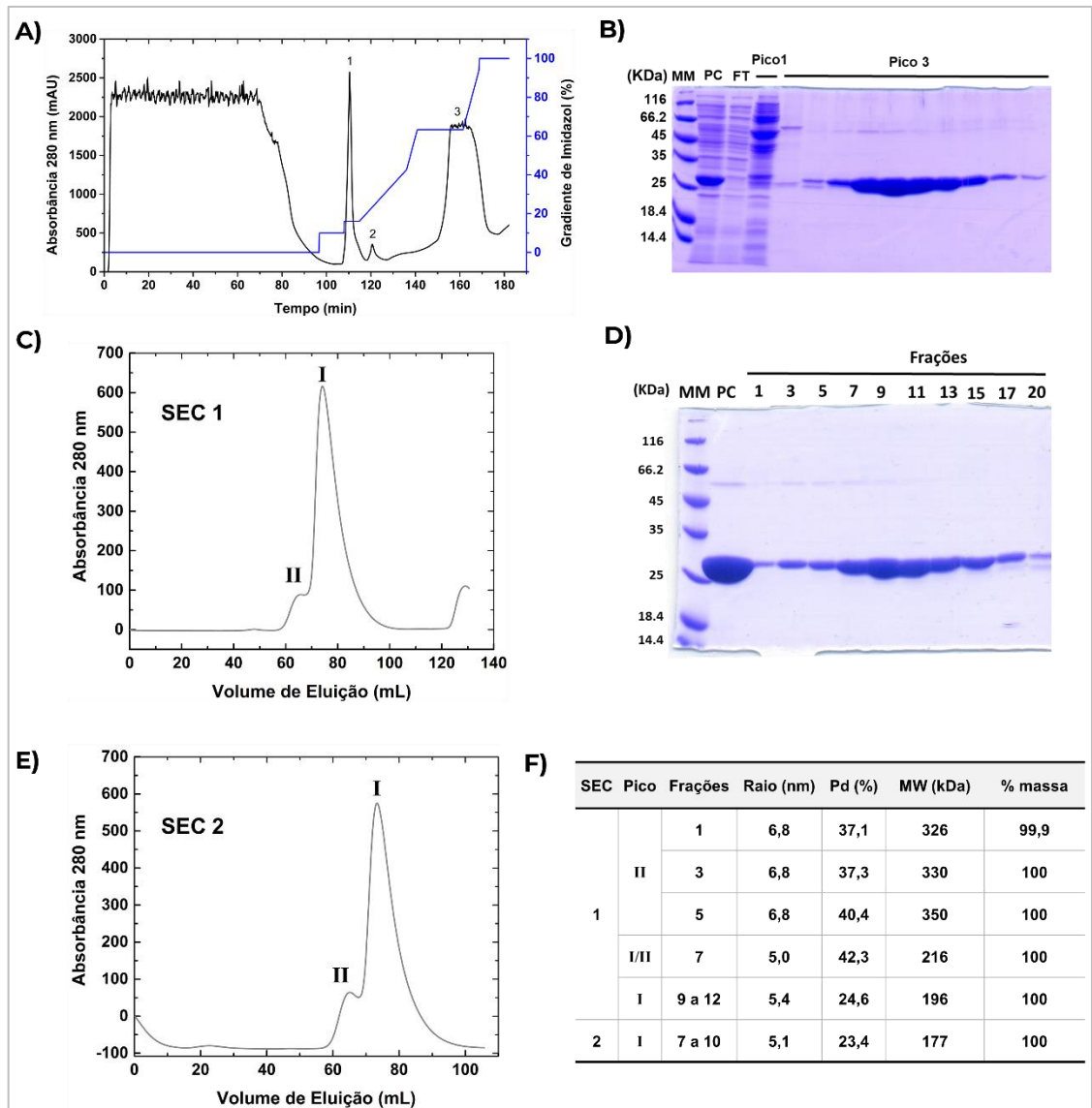


Figura 9. Dados de purificação da XAC0353. **A)** Cromatograma da cromatografia de afinidade. Frações do platô (3) foram reunidas e submetidas à etapa de cromatografia de exclusão molecular. **B)** Análise por SDS-PAGE 13% da purificação por afinidade. MM = marcador de massa molecular, PC = pré-coluna (extrato solúvel submetido à etapa de purificação), FT = *flow-through*. **C)** Cromatograma de exclusão molecular das frações 41 a 44 (SEC1). **D)** Análise por SDS-PAGE 13% da SEC1. **E)** Cromatograma de exclusão molecular das frações 45 a 51 (SEC2). As cromatografias de exclusão molecular foram realizadas em tampão fosfato (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). **F)** Dados obtidos a partir das medidas de DLS de frações das SEC1 e 2. Raio = raio hidrodinâmico (Rh) médio, Pd = polidispersividade da distribuição de tamanhos em porcentagem, MW = massa estimada a partir do raio hidrodinâmico médio, % massa = fração em massa do respectivo componente em relação à distribuição total de tamanhos.

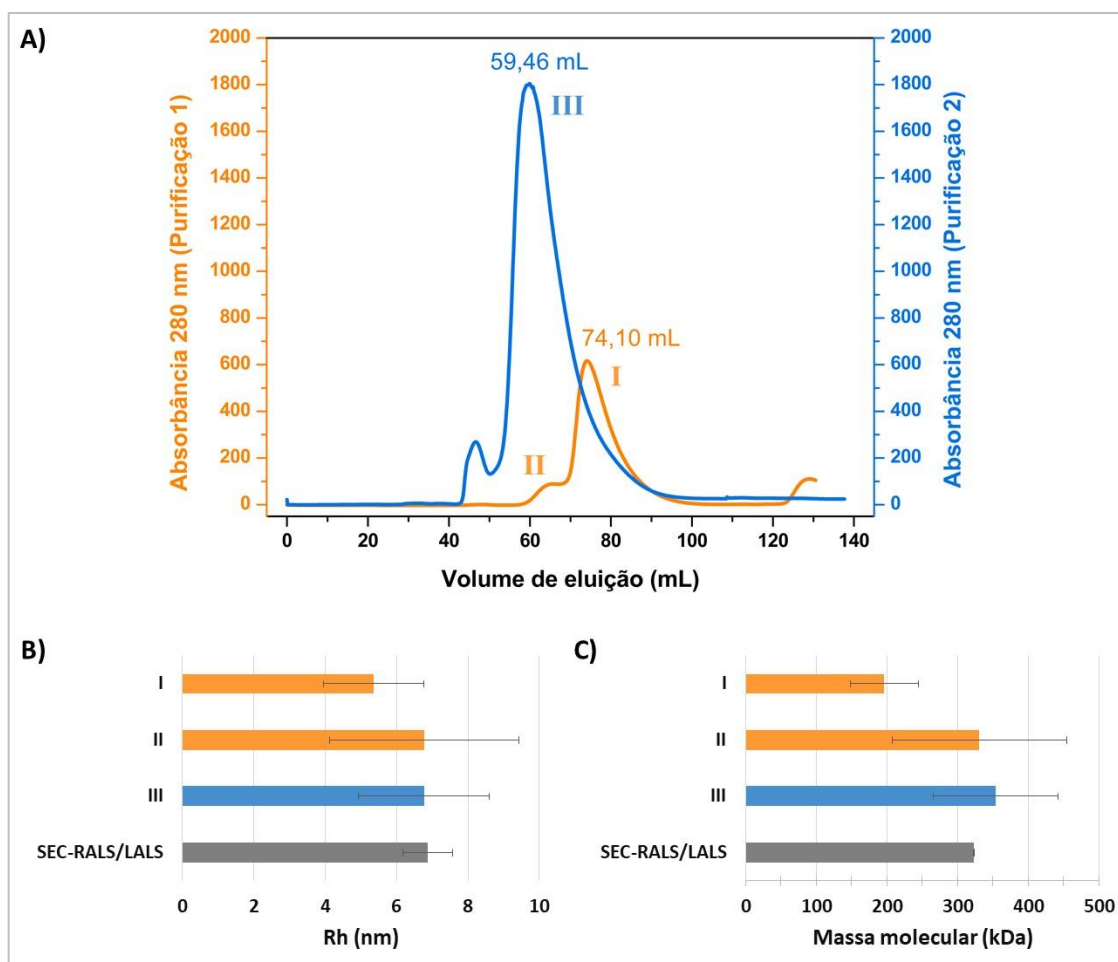


Figura 10. Comparação entre as amostras da primeira e da segunda purificação de XAC0353. **A)** Cromatogramas de exclusão molecular. A primeira purificação (linha laranja) foi realizada em tampão fosfato (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) e a segunda (linha azul), em tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5). Comparando-se os cromatogramas, observa-se um deslocamento do pico de maior intensidade. **B)** Raio hidrodinâmico e **C)** massa molecular estimados por DLS para amostras da primeira e da segunda purificação (laranja e azul) ou estimados por SEC-RALS/LALS para a amostra que foi submetida à análise (purificada em tampão HEPES). Em laranja estão os dados de amostras dos dois picos da purificação 1 (I e II) e em azul a análise da amostra referente ao pico principal da purificação 2 (III). Em cinza está a análise de SEC-RALS/LALS de amostras equivalentes a porção central do pico III.

Tabela 7. Raio hidrodinâmico e massa molecular estimados por DLS e SEC-RALS/LALS para amostras de XAC0353. Dados referentes a amostras da primeira e da segunda purificação (Fig. 10) e à amostra que foi submetida à análise por SEC-RALS/LALS (Fig. 11). As amostras foram nomeadas de acordo com a figura 10. ^a O tampão foi utilizado tanto na purificação da amostra analisada quanto na corrida das análises de SEC-RALS/LALS. ^b Desvio padrão calculado com base nos resultados de três análises independentes realizadas com a mesma amostra.

Amostra (análise)	Tampão da purificação	Rh (nm)	MW (kDa)
I (DLS)	Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4	5,36 ± 1,40	196,3 ± 48,2
II (DLS)		6,77 ± 2,65	330,7 ± 123,2
III (DLS)	HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5 ^a	6,77 ± 1,83	353,8 ± 88,8
SEC-RALS/LALS		6,88 ± 0,70 ^b	322,3 ± 0,3 ^b

4.2.2. SEC-RALS/LALS

A Figura 11 mostra o gráfico representativo das análises de XAC0353 por SEC-RALS/LALS em tampão HEPES. O raio hidrodinâmico médio e a massa molecular estimados a partir dessas análises foram de 6,88 nm e 322,3 kDa, respectivamente. Esses valores coincidem com os valores do raio hidrodinâmico e da massa molecular estimados por DLS para as amostras II e III (volume de eluição 65 e 60 mL, respectivamente) (Tabela 7 e Fig. 10B e C), correspondentes a um possível dodecâmero. Isso indica que XAC0353 formou, majoritariamente, dodecâmeros no tampão HEPES contendo KCl (pH 7,5). Esses dados sugerem que o estado oligomérico de XAC0353 é influenciado pela composição do meio, fenômeno ainda não observado para enzimas homólogas já caracterizadas, mas descrito na literatura para diversas outras proteínas (Halavaty et al, 2015; Spinozzi et al, 2012).

Embora os dados de DLS sugiram que os dodecâmeros de XAC0353 se dissociam em hexâmeros no tampão fosfato contendo NaCl (pH 7,4), a estrutura quaternária desses oligômeros menores ainda precisa ser validada por técnicas de maior precisão como o SEC RALS/LALS. Além disso, dados estruturais de maior resolução (como os obtidos pela técnica de SAXS e de cristalografia de raios X) serão cruciais para se descobrir o formato desses oligômeros e quais regiões da proteína estabilizam suas interfaces.

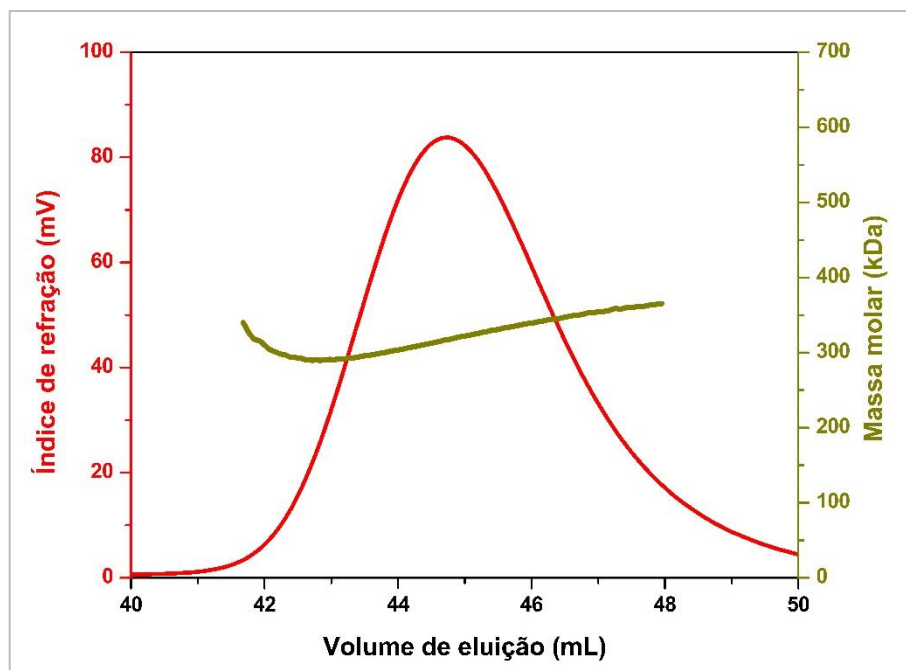


Figura 11. Análise do estado oligomérico de XAC0353 por SEC-RALS/LALS. A massa ($322,3 \pm 0,3$ kDa) e o raio ($6,88 \pm 0,70$ nm) estimados a partir dessa análise indicam que XAC0353 formou majoritariamente dodecâmeros no tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5). A curva vermelha representa o índice de refração da proteína eluída de uma coluna analítica de exclusão molecular Superdex 200 HR 10/300 GL. A linha amarela escura representa a massa molar estimada para a proteína eluída, calculada a partir das medidas de RALS/LALS.

4.2.3. Caracterização biofísica

4.2.3.1. Estabilidade térmica

Para se avaliar condições favoráveis à estabilidade de XAC0353 esta foi submetida a diferentes condições de pH, tipo de tampão e concentração de sal, e seu desenovelamento térmico foi monitorado utilizando a técnica de *thermal shift*. Nessa técnica, a temperatura de desenovelamento (T_m) da proteína, ou seja, a temperatura em que metade da amostra está desnaturada, pode ser inferida a partir do ponto de inflexão do perfil de fluorescência da sonda Sypro Orange, a qual interage com regiões hidrofóbicas da proteína, que ficam mais expostas mediante desnaturação. Comparando-se a diferença entre a T_m da proteína em diferentes condições em relação a uma condição referência (ΔT_m), pode-se avaliar em qual delas a proteína apresenta melhor estabilidade, a qual correlaciona-se com o aumento da chance de sucesso nos ensaios de cristalização (Boivin, Kozak & Meijers, 2013; Reinhard et al 2013; Gao, Oerlemans & Groves, 2020).

Como referência, foi utilizada a amostra da proteína no tampão da SEC (20 mM fosfato de sódio e 150 mM NaCl, pH 7,4), cuja T_m foi de 34 °C. Das amostras cujos dados permitiram o cálculo da T_m , grande parte mostrou acréscimo de mais de 5 °C nesse valor (Fig. 12), chegando a mais de 20 °C para os tampões Citrato de Sódio (pH 5,5/150 mM NaCl), Bis-Tris (pH 6,0/300 mM NaCl) e Tris (pH 7,0/300 mM NaCl) e mais de 25 °C para o Citrato de Sódio (pH 5,5/50 mM NaCl). Apenas as condições ADA (pH 6,5/50 mM NaCl) e Bis-Tris (pH 6,0/50mM NaCl) tiveram redução na T_m . Observando-se os resultados, não é possível estabelecer um padrão de correlação entre a T_m obtida e cada parâmetro individual das condições testadas, ou seja, a estabilidade da XAC0353 parece depender de uma combinação de fatores.

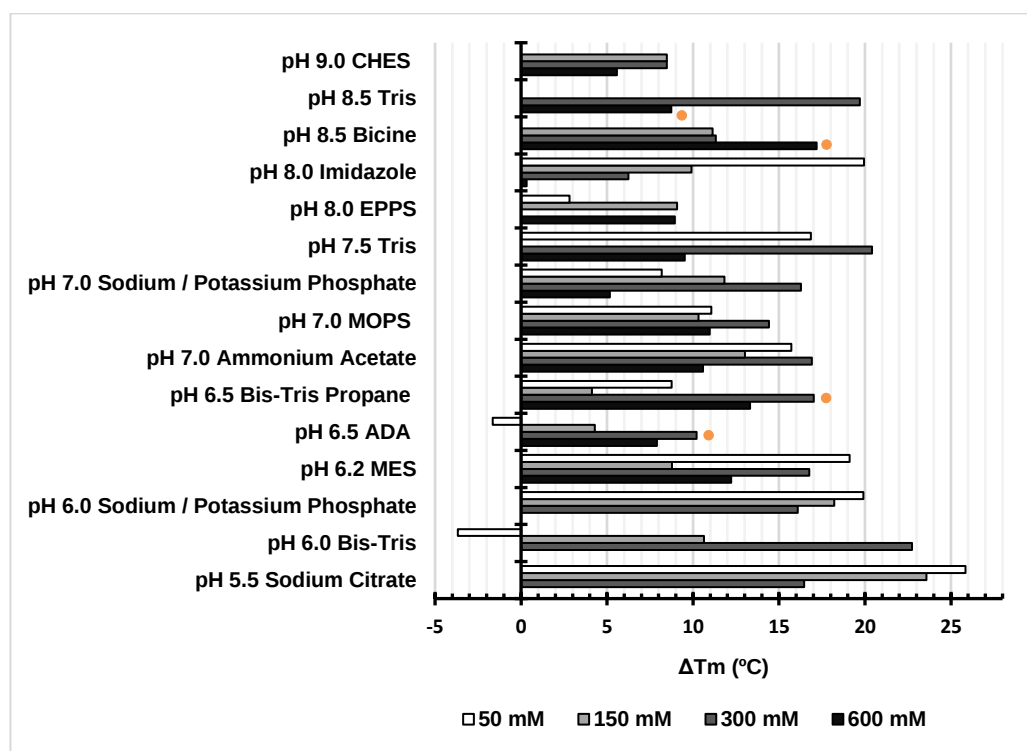


Figura 12. ΔT_m de cada condição testada no ensaio de *thermal shift*. ΔT_m = diferença entre a T_m de cada tampão JBS testado e a T_m obtida para o tampão 20 mM fosfato de sódio e 150 mM NaCl, pH 7,4 (34,3 °C). O gradiente branco-preto refere-se às diferentes concentrações de NaCl. Círculos laranjas ilustram exemplos de condições de mesma força iônica e pH que apresentaram ΔT_m diferentes entre si.

Além do pH e da força iônica, outros fatores que podem influenciar a estabilidade térmica de proteínas são a ligação de metais ou de outros componentes do meio como, por exemplo, a molécula tamponante, em algum sítio exposto na superfície da proteína. Esses fatores podem ter influenciado nossos resultados, visto que condições de mesmo

pH e força iônica resultaram em variações de T_m diferentes (Fig. 12). Mais estudos serão necessários para se avaliar se essas variações de T_m se correlacionam com diferenças de estado oligomérico de XAC0353, uma vez que este é influenciado pelo meio como descrito nas seções anteriores.

Como na técnica de *thermal shift* monitora-se o desenovelamento com uma sonda extrínseca, que é sensível a exposição de superfícies hidrofóbicas mediada tanto pela desestabilização da estrutura terciária quanto pela eventual desestabilização de interfaces hidrofóbicas presentes em estruturas quaternárias, optou-se por medir a T_m de XAC0353 pela técnica de CD, a qual não depende de sondas extrínsecas pelo fato de monitorar a perda de estruturas secundárias da proteína a partir de propriedades óticas que as caracterizam.

Visto que a técnica de CD é sensível a altas concentrações de sais, as medidas foram realizadas no tampão referência diluído duas vezes (10 mM fosfato de sódio e 75 mM NaCl, pH 7,4). Os perfis de desnaturação térmica monitorados em dois comprimentos de onda (208 nm e 218 nm), que tem maior influência do sinal de α -hélices e folhas β , respectivamente) resultaram em valores de T_m de 35 °C e 35,6 °C (Fig. 13), que corroboram a T_m estimada por *thermal shift* no tampão referência (34 °C). Esses valores estão próximos da temperatura ótima ao crescimento de *X. axonopodis pv citri* 306, que é de aproximadamente 30 °C (Sumares et al, 2016) e da temperatura ótima da atividade dessa enzima (30 °C), como descrito na seção 4.2.5.

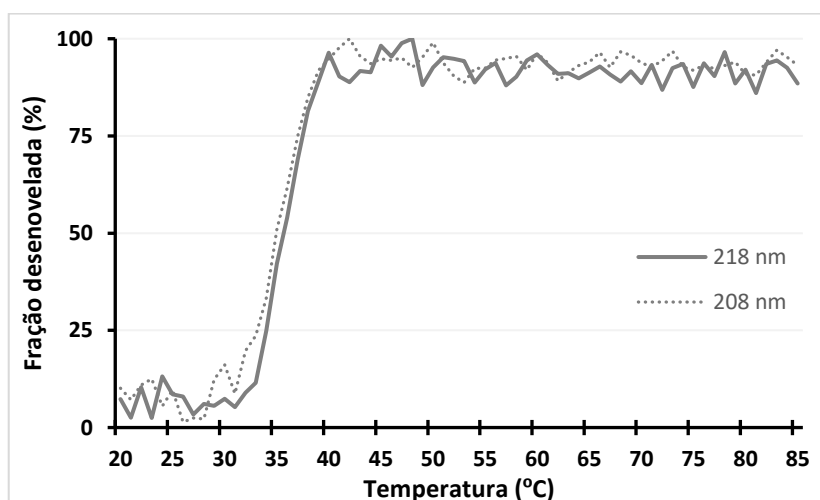


Figura 13. Curvas dos ensaios de desnaturação térmica de XAC0353 por CD. Os perfis de desnaturação térmica monitorados nos comprimentos de onda 208 nm e 218 nm, que tem maior influência do sinal de α -hélices e folhas β , respectivamente, resultaram em valores de T_m de 35 °C e 35,6 °C.

4.2.3.2. Estrutura secundária

O espectro de CD de XAC0353 (Fig. 14A) apresentou um perfil característico de estruturas ricas em α -hélice, marcado pela presença de bandas negativas em 208 e 222 nm. A deconvolução do espectro pelo programa CDNN (Böhm, Muhr & Jaenicke, et al, 1992), no intervalo de 195 a 260 nm, estima que a quantidade relativa de α -hélices corresponde a 46,4%. Folhas β e voltas β compreendem 10,5% e 14,4%, respectivamente, enquanto estruturas do tipo *random coil* constituem 25,2%. Essa predominância de α -hélices está de acordo com o modelo teórico da estrutura secundária de XAC0353 (Fig. 15A) predito pelo programa PSIPRED v4.1 (Jones, 1999; Buchan & Jones, 2019). Nesse modelo, observam-se regiões de α -hélice intercaladas com fitas β , assemelhando-se à composição da homóloga mais próxima de XAC0353 com estrutura depositada no PDB (Fig. 15B), uma β -cetoacil-ACP (*acyl carrier protein*) redutase (FabG) de *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (PDB 5T2U), que pertence à família das desidrogenases/redutases de cadeia curta (Blaise et al, 2017).

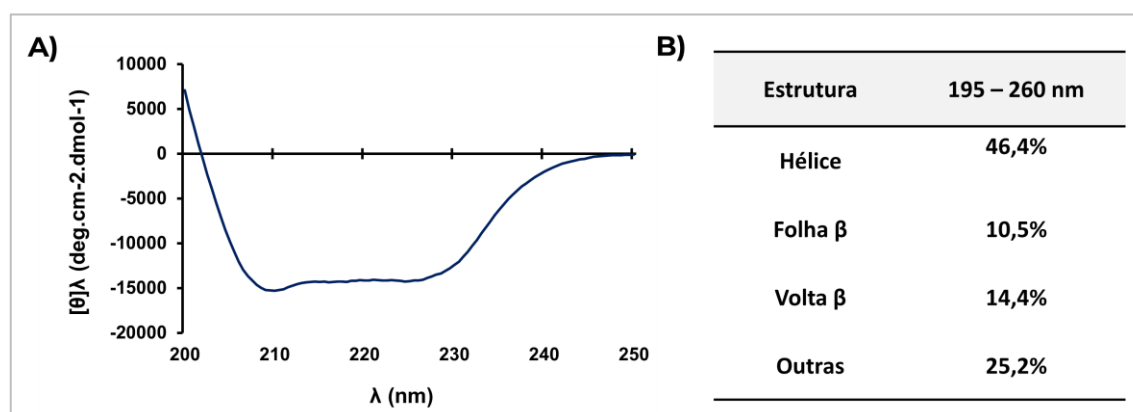


Figura 14. Análise de CD de XAC0353. A) Espectro de CD de XAC0353 (200 – 250 nm). **B)** Quantidade relativa de estrutura secundária predita pela deconvolução do espectro no programa CDNN (Böhm, Muhr & Jaenicke, 1992), no intervalo de 195 nm a 260 nm.

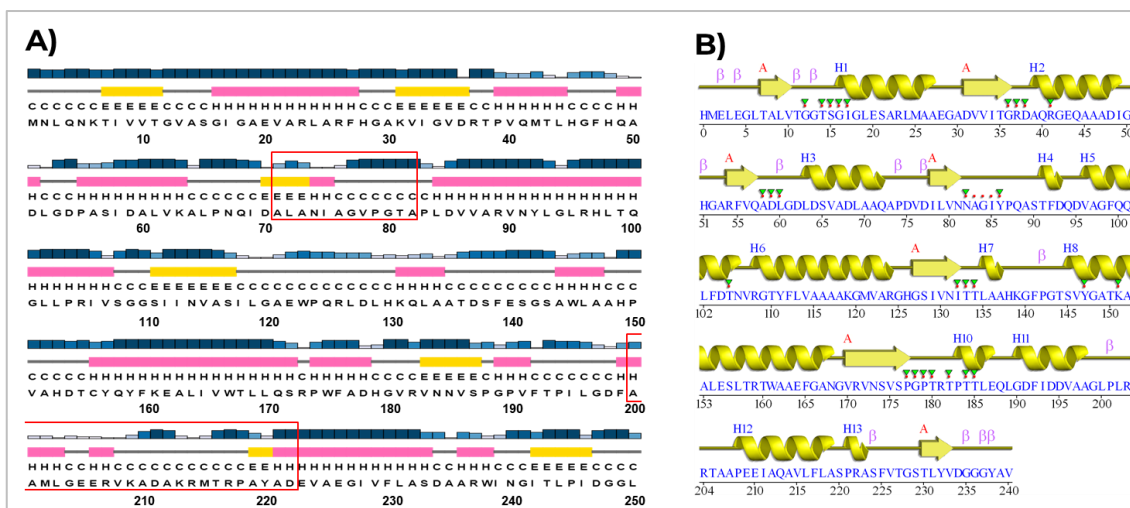


Figura 15. Comparação da estrutura secundária de XAC0353 e de FabG de *M. smegmatis* MC2 155. A) Esquematização da estrutura secundária de XAC0353 predita pelo programa PSIPRED v4.1 (Jones, 1999; Buchan & Jones, 2019). Cilindros rosas representam alfa-hélices (H), setas amarelas indicam fitas beta (E) e linhas pretas representam regiões desenoveladas (C). O grau de confiabilidade da predição (azul) é mostrado acima da representação da estrutura secundária. Números indicam posições de aminoácidos na sequência primária. Os retângulos vermelhos demarcam as regiões intrinsecamente desestruturadas identificadas pelo programa PONDR (Li et al, 1999). B) Estrutura secundária da FabG de *M. smegmatis* MC2 155 (PDB 5T2U; Blaise et al, 2017), extraída do PDBsum (Laskowski et al, 2018).

Com o objetivo de se extrair mais informações estruturais sobre XAC0353, análises adicionais da sua estrutura primária foram realizadas. Através de uma análise no programa foldIndex, avaliou-se a presença de regiões intrinsecamente desestruturadas (IDRs, do inglês *Intrinsically Disordered Regions*), identificadas com base na hidrofobicidade residual média e na carga total da proteína (Prilusky et al, 2005). Na Fig. 16A, observa-se o resultado dessa análise, o qual não relata a presença de IDRs em XAC0353. Por outro lado, a análise realizada no programa PONDR (Li et al, 1999), que utiliza redes neurais para predição de ordem ou desordem com base na composição de aminoácidos e em propriedades de suas cadeias laterais (Li et al, 1999), indicou dois possíveis segmentos desordenados na estrutura de XAC0353 (Fig. 16B), um contendo 12 resíduos (71 a 82) e outro, 23 (200 a 222).

Na predição do PSIPRED (Fig. 15A), o primeiro segmento desordenado predito pelo PONDR contém uma região de *coil*, de confiabilidade considerável, e outra região em que uma fita β está conjugada a uma α -hélice curta, porém de menor confiabilidade. O segundo segmento, por sua vez, é predito conter duas α -hélices e uma fita β curta, com baixo grau de confiabilidade, e uma região de *coil* mais longa, com maior grau de confiabilidade. Interessantemente, quando XAC0353 é alinhada à FabG de *M. smegmatis*

MC2 155, esse segundo segmento corresponde à parte de uma região descrita, na FabG (resíduos 177 a 207), como um *loop* flexível interrompido por uma α -hélice curta (Blaise et al, 2017). Blaise e colaboradores observaram que, na estrutura cristalográfica da FabG complexada NADP⁺, esse *loop* movimenta-se e sua estrutura modifica-se pela formação de estruturas secundárias adicionais. Tais modificações permitem o posicionamento correto dos resíduos que estabelecem ligações de hidrogênio com o NADP. Os autores ainda sugerem que o substrato da FabG se liga à proteína antes do co-substrato e, após a ligação deste, o *loop* flexível funciona como uma tampa, cobrindo o sítio catalítico. Esse fenômeno também foi reportado em outras proteínas da mesma família, indicando a importância funcional dessa região e sugerindo que sua maior flexibilidade exerce um papel crucial na dinâmica da interação com o co-substrato.

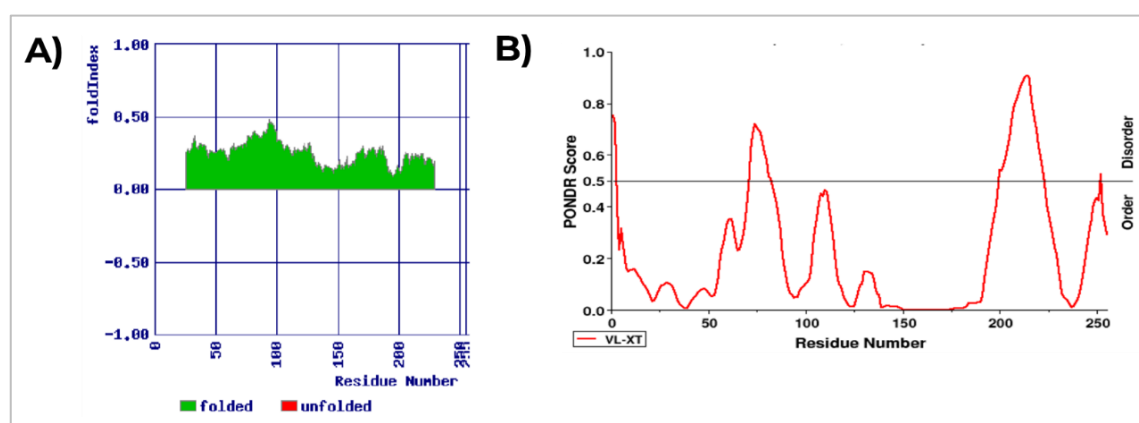


Figura 16. Predição de regiões intrinsecamente desordenadas em XAC0353. Resultados das análises de predição de regiões proteicas intrinsecamente desestruturadas na sequência de XAC0353 realizadas, respectivamente, pelos programas foldIndex (A) e PONDR (B).

4.2.4. Ensaios de cristalização e experimentos de difração

Nos dois ensaios de cristalização de XAC0353, apenas uma condição mostrou-se promissora para a formação de cristais. Essa condição foi observada para a amostra purificada em tampão HEPES e incubada com 0,5 mM de NAD⁺, a qual gerou esferulitas na presença de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 6,5) e citrato trissódico 1 M (Fig. 17). A formação de cristais nessa condição corrobora os dados do ensaio de *thermal shift*, visto que as condições que apresentaram os maiores valores de ΔT_m , isto é, que conferiram maior estabilidade à enzima, também continham citrato de sódio e estavam numa faixa de pH um pouco abaixo de 6,5.

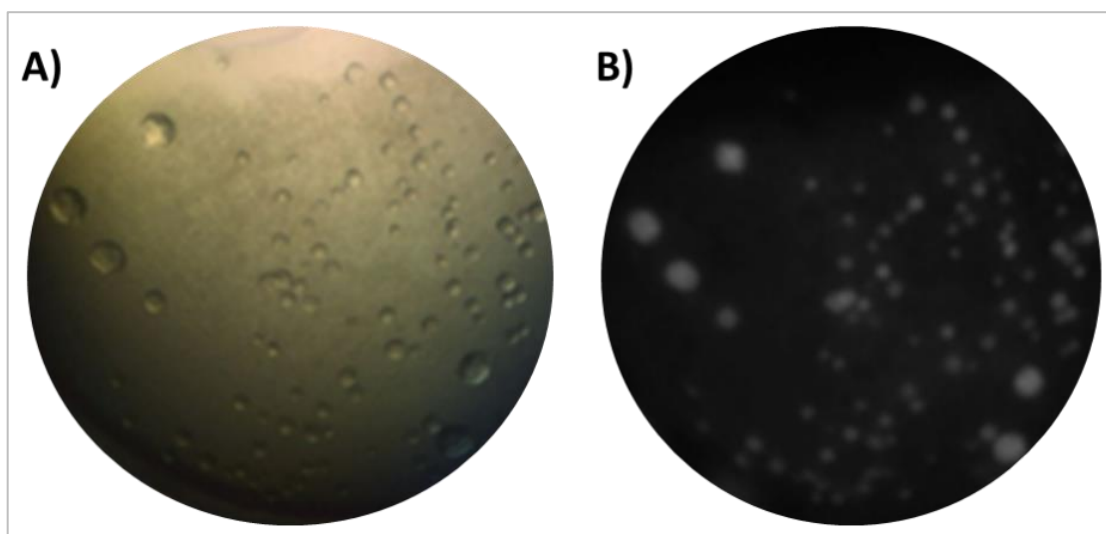


Figura 17. Cristalização de XAC0353. (A) Esferulitas formadas na presença de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 6,5) e citrato trissódico 1 M, a partir da amostra de XAC0353 incubada com 0,5 mM de NAD^+ , visualizadas através de luz UV em **(B)**.

Para se avaliar a qualidade dos cristais obtidos, experimentos de difração foram realizados na linha Manacá do Sirius, e um conjunto de dados foi coletado (Tabela 8). Os cristais de XAC0353 analisados pertencem ao grupo espacial $I4_132$ e difrataram a uma resolução máxima de 3,2 Å. Tentativas de solução do problema das fases por Substituição Molecular foram bem-sucedidas (*translation function Z-score* = 41.3). Entretanto, dada a baixa resolução dos dados, novas tentativas de cristalização da proteína sem a cauda de histidinas e de coleta de dados diminuindo a atenuação do feixe serão realizadas, a fim de se obter dados de melhor resolução antes de prosseguir com a etapa de refinamento da estrutura.

Tabela 8. Estatísticas da coleta de dados de difração de um dos melhores cristais de XAC0353 analisados. Estatísticas para a camada de maior resolução estão entre parênteses. O critério de corte da resolução máxima desses dados se baseou no critério de $CC_{1/2} > 50\%$, que indica que existe mais de 50% de correlação entre as intensidades de duas metades aleatórias desse conjunto de dados, apesar da baixa precisão das medidas individuais, principalmente na última camada, como evidenciado pelo fator R-meas. Correlações significativas ao nível de 0,1% estão marcadas com *.

Comprimento de onda (Å)	1,37
Intervalo de resolução (Å)	47,2 – 3,2 (3,4 – 3,2)
Grupo espacial	I 4 ₁ 3 2
Célula unitária (Å, °)	a=b=c=275.4 $\alpha=\beta=\gamma=90$
Reflexões totais	2366053 (390045)
Reflexões únicas	29619 (4692)
Multiplicidade	80 (83)
Completeza (%)	99,9 (99,7)
I/sigma(I) médio	10,4 (1,3)
Wilson B-factor	107,40
R-meas (%)	54,2 (485,0)
CC_{1/2} (%)	99,8* (55,4*)

4.2.5. Caracterização bioquímica

4.2.5.1 Triagem de substratos e especificidade de co-substrato

A atividade enzimática da XAC0353 foi avaliada para os compostos álcool vanílico, álcool benzílico, álcool 4-hidroxibenzílico e álcool coniferílico, utilizando NAD^+ ou $NADP^+$ como co-substrato. A oxidação do substrato pode ser observada pelo aumento da fluorescência em 458 nm, após excitação à 340 nm, correspondente à conversão do co-substrato a sua forma reduzida (NADH). Como observado na Fig. 18A, XAC0353 foi capaz de oxidar todos os substratos testados na presença de NAD^+ . Por outro lado, não houve atividade significativa para as reações contendo $NADP^+$. Assim, XAC0353 pode ser classificada como uma álcool desidrogenase dependente de NAD^+ . A

conversão dos álcoois em seus respectivos aldeídos foi confirmada por análises de HPLC de reações com alguns dos substratos testados (anexo 1).

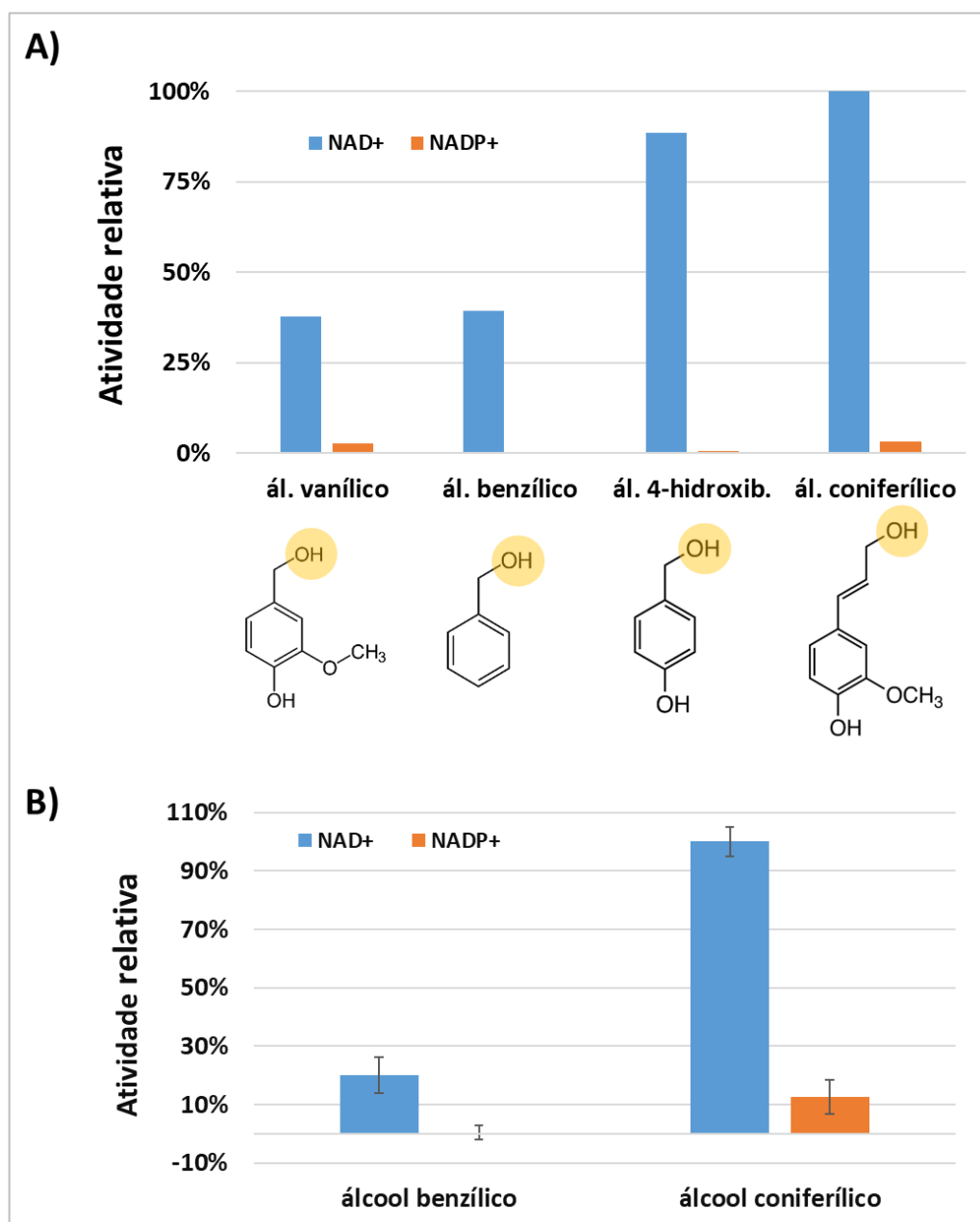


Figura 18. Testes de atividade da XAC0353 contra álcool vanílico, álcool benzílico, álcool 4-hidroxibenzílico ou álcool coniferílico, utilizando NAD^+ ou NADP^+ como co-substratos. A) Triagem inicial. As reações continham tampão bicina 20 mM (pH 8), co-substrato (NAD^+ ou NADP^+) 0,5 mM, substrato 1 mM e enzima 15 μM , em um volume final de 100 μL , e foram realizadas a 30 $^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos, sendo interrompidas pela adição de 100 μL de acetonitrila. Dados referentes a medida de uma única amostra por reação. **B)** Ensaio em condições otimizadas. O ensaio foi realizado respeitando condições de linearidade de resposta e monitorando-se a formação de NAD(P)H pela emissão de fluorescência a 458 nm, após excitação a 340 nm. Dados são mostrados como média e desvio padrão de triplicatas.

Após definição dos parâmetros ótimos de reação, discutidos nas próximas seções, testes de atividade da XAC0353 em condições otimizadas foram realizados utilizando NAD^+ ou NADP^+ (0,5 mM) como co-substrato e álcool benzílico ou álcool coniferílico como substrato (1 mM). O resultado obtido nesse ensaio (Fig. 18B) corrobora com aquele encontrado na triagem anterior (Fig. 18A), reforçando a preferência da enzima por NAD^+ .

Para a homóloga mais próxima da XAC0353, a CalA de *P. putida* HR199 (60% de identidade), apenas atividade com álcool coniferílico na presença de NAD^+ foi descrita (Steinbuchel, Priefert & Rabenhorst, 2003). Estudos indicam que um resíduo de ácido aspártico é altamente conservado em álcool desidrogenases de cadeia curta (SDRs) que têm preferência pelo NAD(H) , sendo substituído por um resíduo de treonina em SDRs que preferem NADP(H) (Nakanishi et al, 1997). No entanto, uma 3-hidroxiesteroide desidrogenase/carbonil redutase de *Pseudomonas* sp. B-0831 (UniProtKB: Q59718; PDB 2DKN), que conserva o resíduo de ácido aspártico (Asp32), possui dupla atividade piridina, isto é, utiliza tanto NAD^+ quanto NADP^+ , embora apresente preferência pelo NAD^+ (Nakamura et al, 2006). Os autores sugerem que essa dualidade se deve à presença de uma Arg33, que diminuiria a interação desfavorável do Asp32 com o grupo fosfato do NADP(H) , sendo determinante para a dupla atividade piridina. Contraditoriamente, XAC0353 também possui resíduos equivalentes a Asp32 e Arg33 da enzima de *Pseudomonas* sp. B-0831, mas só demonstrou atividade significativa com o NAD^+ , o que abre espaço para maiores investigações sobre os determinantes estruturais da interação de SDRs com seus co-substratos.

4.2.5.2. Estabilidade e condições ótimas de pH e temperatura

Nos ensaios de pH e temperatura, utilizando álcool benzílico como substrato, XAC0353 mostrou atividade ótima em 30 °C e pH 10 (Fig. 19). Sua homóloga mais próxima (61% de identidade) que também pertence ao grupo SDR, a CalA de *Pseudomonas* sp. HR199, apresentou atividade ótima a uma temperatura de 42 °C e pH 10.9 (Steinbuchel, Priefert & Rabenhorst, 2003), valores um pouco maiores do que os encontrados para XAC0353, mas ainda numa faixa compatível. Esses valores também se assemelham aos dados descritos para a CADH II de *Streptomyces* sp. NL15-2K (Nishimura et al, 2011), uma álcool coniferílico desidrogenase de cadeia média (MDR), que tem atividade máxima a uma temperatura de 40 °C e em pH básico (8,5). Apesar de serem mesofílicas e atuarem em pH básico, XAC0353 não apresenta similaridade de

sequência significativa com CADH II, de acordo com análises comparativas utilizando a ferramenta BLASTp.

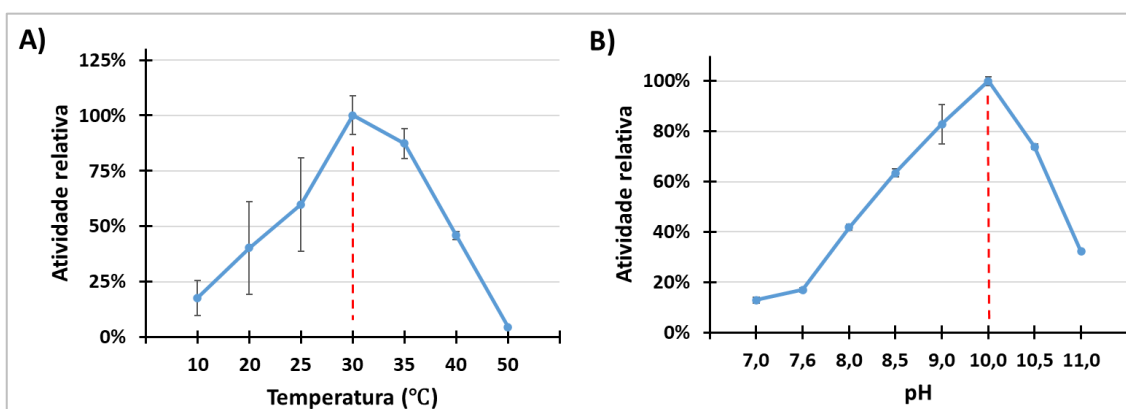


Figura 19. Curvas de atividade de XAC0353 em diferentes temperaturas (A) e pHs (B), utilizando álcool benzílico ($C_f = 5 \text{ mM}$) como substrato e NAD^+ ($C_f = 0,5 \text{ mM}$) como co-substrato. Os ensaios de pH foram realizados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e os ensaios de temperatura, em pH 8. O tempo de reação para ambos os ensaios foi de 10 minutos. A linha tracejada vermelha indica os máximos observados. Pontos representam a média de triplicatas e barras verticais representam o desvio padrão.

Como XAC0353 apresentou atividade ótima em pH mais extremo (pH 10), realizamos primeiramente ensaios para investigar a estabilidade da enzima nesse pH ao longo do tempo, usando como controle um pH ligeiramente menos básico (pH 9,5). No primeiro ensaio, avaliamos a atividade da enzima em pH 8,5, mais próximo do fisiológico, após sua pré-incubação (5 min) em tampões com pHs 9,5 e 10. Esse teste mostrou uma maior proporção de enzimas ativas na alíquota pré-incubada em pH 9,5 em relação a amostra pré-incubada em pH 10 (Fig. 20A). No segundo ensaio, a proteína foi pré-incubada por diferentes intervalos de tempo em tampão pH 9,5 e manteve-se estável por até 10 min de pré-incubação nesse pH (Fig. 20B). Essa observação foi confirmada por ensaios de linearidade, onde a atividade da enzima foi monitorada ao longo do tempo em pH 9,5 (Fig. 22, detalhes na próxima seção). Diante desses resultados, o tempo de 10 min, a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH 9,5 (tampão Glicina-NaOH 100 mM) foram definidos como condição padrão para os ensaios de cinética enzimática da XAC0353.

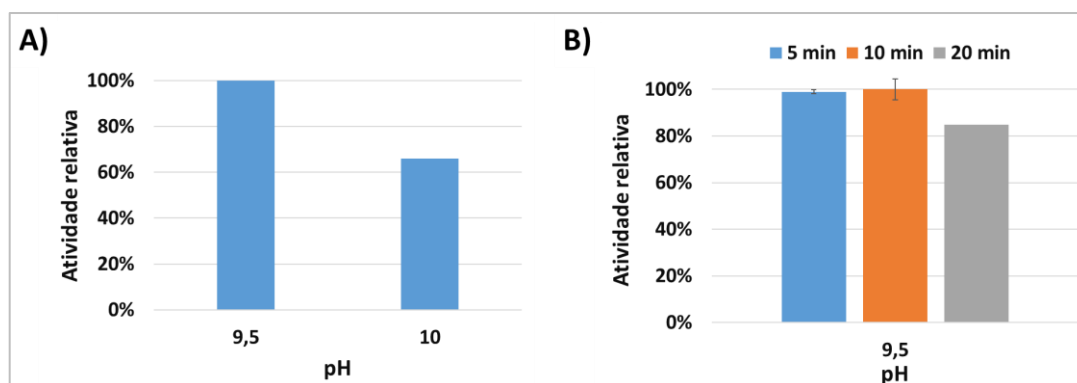


Figura 20. Testes de estabilidade da XAC0353 em diferentes pHs, utilizando álcool benzílico (Cf = 1 mM) como substrato e NAD⁺ (Cf = 2 mM) como co-substrato. A) Atividade relativa observada em reações realizadas em pH 8,5 após pré-incubação da enzima (5 min) em tampão pH 9,5 ou 10. **B)** Atividade relativa observada em reações realizadas em pH 8,5 após pré-incubação da enzima por 5, 10 ou 20 minutos em pH 9,5. Em B, os dados são apresentados como média e desvio padrão de triplicatas.

4.2.5.3. Efeito de íons e aditivos

A Fig. 21 mostra os resultados da atividade de XAC0353 na presença dos íons Co²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺ e do EDTA (agente quelante) a uma concentração final de 1 mM. A atividade de XAC0353 não foi ativada nem inibida na presença de Mg²⁺, Ca²⁺ e EDTA, indicando que essa enzima não sofre influência desses íons nem é cátion-dependente. Por outro lado, Zn²⁺, Cu²⁺ e Co²⁺, reduziram a atividade de XAC0353 em cerca de 20-30%, quando comparada ao controle sem aditivos. De acordo com a literatura, em ensaios contendo a mesma concentração de íons (1 mM), a atividade da CADH II de *Streptomyces sp.* NL15-2K foi ainda mais afetada pelos íons Cu²⁺ e Zn²⁺, sendo completamente inibida pelo Cu²⁺ e significativamente inibida pelo Zn²⁺, enquanto Mg²⁺ e Ca²⁺ não exerceram efeito sobre sua atividade, assim como observado para XAC0353 (Nishimura et al, 2011). Os autores sugerem que o efeito desses íons está relacionado com a presença de um grupo sulfidríla no sítio ativo da enzima. De fato, no sítio ativo da CADH II existem dois resíduos de cisteína, que contém o grupo sulfidríla. Entretanto, na sequência da XAC0353 há apenas uma cisteína, que não faz parte do sítio ativo. Por outro lado, outros trabalhos relatam que o Zn²⁺ pode induzir a precipitação de proteínas (Zaworski & Gill, 1988) e o Cu²⁺ pode interagir com grupos químicos encontrados nos resíduos de aspartato, glutamato e histidina (Festa & Thiele, 2011), aminoácidos bastante presentes na sequência da XAC0353.

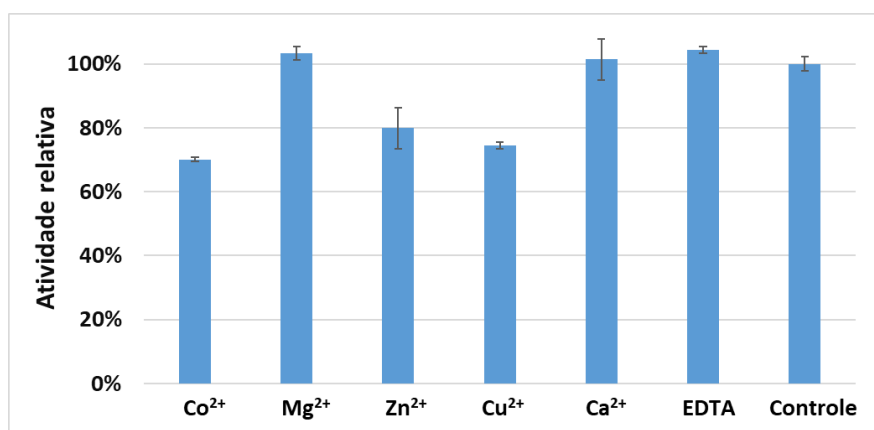


Figura 21. Efeito de íons e aditivos na atividade da XAC0353. As reações (volume final = 100 μ L) continham XAC0353 0,75 μ M, NAD⁺ 0,5 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8,5), álcool benzílico 5 mM e sais de cátions divalentes ou EDTA (agente quelante) 1 mM. Dados são apresentados como média e desvio padrão de triplicatas.

Além do efeito de íons e do EDTA, a influência do agente redutor DTT (ditiotreitól) na atividade da XAC0353 foi avaliada através de ensaios de linearidade com o álcool coniferílico na presença ou na ausência de DTT 1 mM. Como observado na Fig. 22, a enzima apresentou maior atividade na presença de DTT, o que pode ser explicado por uma influência do DTT na estabilidade da enzima, como já foi relatado para uma álcool benzílico desidrogenase codificada pelo plasmídeo-TOL de *Pseudomonas putida* (Shaw & Harayama, 1990) e para a CADH II de *Streptomyces sp.* NL15-2K (Nishimura et al, 2011), ou pela prevenção da auto-oxidação do álcool coniferílico. Além de diminuir a concentração de substratos disponíveis, a auto-oxidação do álcool coniferílico gera o agente oxidante peróxido de hidrogênio (Pomar et al, 2002). Por esse motivo, os ensaios cinéticos da XAC0353 foram realizados com DTT 1 mM na reação.

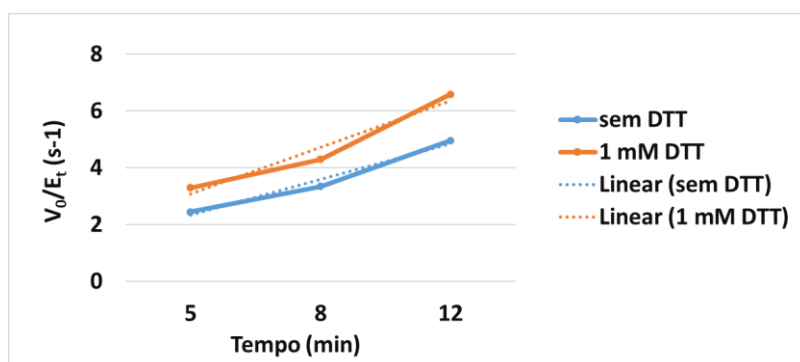


Figura 22. Efeito do DTT na atividade da XAC0353. Ensaio de linearidade com álcool coniferílico na presença ou na ausência de DTT 1 mM. As reações ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) continham XAC0353 0,025 μ M, álcool coniferílico 1 mM, NAD⁺ 2 mM e tampão glicina-NaOH 100 mM (pH 9,5). Linhas pontilhadas representam as retas de regressão linear calculadas para os valores de V_0/E_t (linhas sólidas). (V_0 =velocidade inicial; E_t =concentração de enzima).

4.2.5.4 Avaliação da atividade inversa

Além da oxidação de álcoois em aldeídos, algumas CADHs, como a CADH II de *Streptomyces sp.* NL15-2K (Nishimura et al, 2011), também catalisam a reação no sentido inverso, ou seja, realizam a redução de aldeídos. Com o objetivo de investigar se XAC0353 também catalisa essa reação, ensaios de atividade na presença de NADH foram realizados. A Tabela 9 mostra os valores de atividade para cada aldeído testado em comparação com a atividade de XAC0353 contra os respectivos álcoois, numa mesma concentração de substrato. Nas condições testadas, a atividade com vanilina, 4-hidroxibenzaldeído e coniferaldeído representou 11% ou menos da atividade observada na reação com os álcoois correspondentes. Entretanto, esse valor foi de 53% para o benzaldeído, sugerindo que XAC0353 talvez catalise a redução desse aldeído, ainda que em menor eficiência do que a reação de oxidação do álcool benzílico. Vale destacar que, de todos os álcoois testados, o álcool benzílico foi o substrato menos preferencial de XAC0353, de forma que as atividades medidas para esse substrato (reação direta) já estão muito próximas do erro, assim como as atividades medidas na direção inversa para todos os substratos aldeídos analisados.

Tabela 9. Atividade de XAC0353 na presença de NADH (2 mM) e diferentes aldeídos (reação inversa). Os valores são comparados à atividade da enzima contra os álcoois correspondentes (reação direta). Os dados das reações diretas e inversas correspondem a reações realizadas com concentrações equivalentes de substrato e sob as mesmas condições (30 min, 30 °C, pH 9,5). Note que a atividade estimada para a reação inversa está muito próxima ou até menor do que o erro experimental. Atividade relativa = atividade inversa/atividade direta.

Reação inversa		Reação direta		Atividade relativa
Substrato	Atividade (s ⁻¹)	Substrato	Atividade (s ⁻¹)	
Vanilina	0,02 ± 0,02	Ál. vanílico	0,149 ± 0,008	11%
4-hidroxibenzaldeído	0,04 ± 0,01	Ál. 4-hidroxibenzílico	0,40 ± 0,05	11%
Coniferaldeído	0,42 ± 1,30	Ál. coniferílico	6,56 ± 0,21	6%
Benzaldeído	0,10 ± 0,05	Ál. benzílico	0,19 ± 0,06	53%

4.2.6. Cinética enzimática

Embora tenha apresentado atividade contra o álcool benzílico, a saturação da enzima pelo substrato não foi atingida, mesmo a uma concentração de 25 mM de substrato (Fig. 23). A princípio, isso pode indicar que XAC0353 possui uma afinidade muito baixa para o álcool benzílico e desempenhe apenas uma atividade residual contra esse substrato.

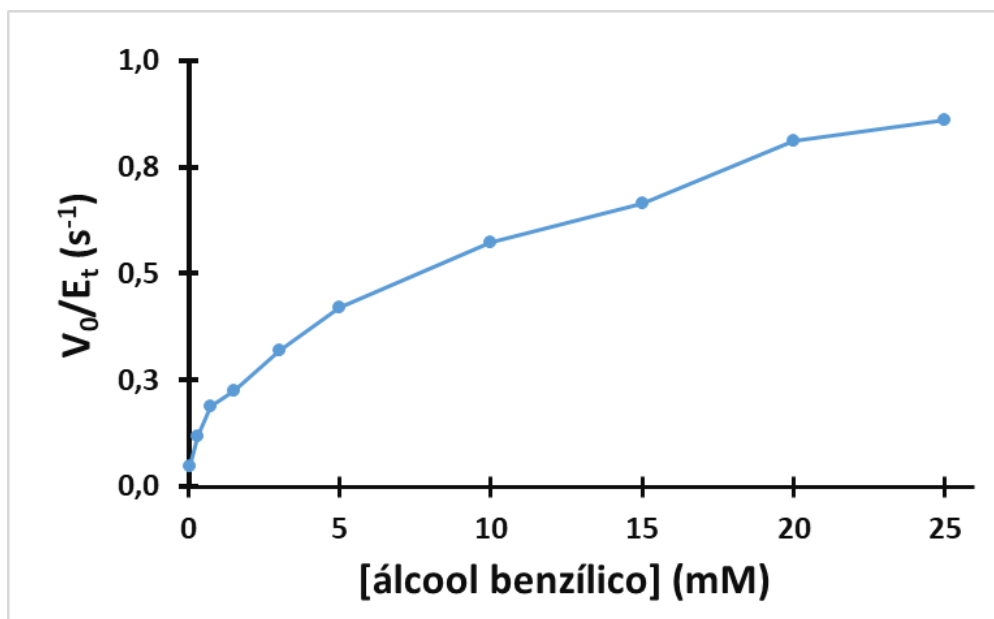
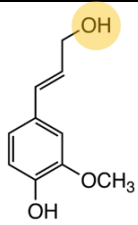
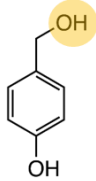
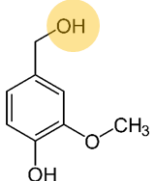


Figura 23. Curva de atividade de XAC0353 na presença de álcool benzílico em diferentes concentrações. Observa-se que a saturação da enzima pelo substrato não foi atingida, indicando que XAC0353 possui uma afinidade muito baixa para o álcool benzílico e desempenhe apenas uma atividade residual contra esse substrato. V_0 =velocidade inicial; E_t =concentração de enzima.

Já para os outros substratos testados, observa-se que XAC0353 mostrou alta especificidade para o álcool coniferílico ($4,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), enquanto os valores da constante de especificidade ($k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{0,5}^{\text{app}}$) foram consideravelmente menores para o álcool 4-hidroxibenzílico ($6,19 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) e o álcool vanílico ($3,35 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) (Fig. 24, Tabela 10). Comparando-se apenas os valores de $K_{0,5}^{\text{app}}$ desses dois últimos substratos (Tabela 10), podemos inferir que a enzima possui maior afinidade pelo álcool vanílico. Isso sugere que o grupo metoxi no carbono 3 do anel, presente apenas no álcool vanílico, pode favorecer a afinidade da enzima pelo substrato. Por outro lado, os valores de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ evidenciam a importância da cadeia lateral α,β -insaturada para a eficiência catalítica da enzima, visto que a ausência desse grupo funcional conferiu à reação com álcool vanílico um *turnover* 40 vezes menor quando comparado à reação com álcool coniferílico. Além disso, a presença dessa cadeia pode estar relacionada com a inibição da enzima pelo substrato, uma vez que foi observada inibição apenas pelo álcool coniferílico ($K_i = 3,3 \pm 0,3 \text{ mM}$) dentre os substratos testados.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos estimados para XAC0353 com diferentes substratos. Para o álcool coniferílico, os valores foram calculados utilizando o modelo de inibição pelo substrato; para os demais substratos, foi utilizado o modelo de Hill. Em amarelo, destaca-se o grupo álcool sobre o qual a enzima atua. N.A.: não se aplica.

Substrato	k_{cat}^{app} (s ⁻¹)	$K_{0,5}^{app}$ (mM)	K_i (mM)	$k_{cat}^{app}/K_{0,5}^{app}$ (s ⁻¹ .M ⁻¹)
 Álcool coniferílico	7,6 ± 0,1	0,016 ± 0,001	3,3 ± 0,3	4,63 x 10 ⁵
 Álcool 4-hidroxibenzílico	0,48 ± 0,01	0,077 ± 0,007	N.A.	6,19 x 10 ³
 Álcool vanílico	0,183 ± 0,005	0,054 ± 0,005	N.A.	3,35 x 10 ³

Na literatura, encontramos duas isoformas de álcool coniferílico desidrogenases de *Streptomyces sp.* NL15-2K que já foram bioquimicamente caracterizadas, CADH I e CADH II (Nishimura et al, 2011). Usando a sequência N-terminal dessas enzimas como isca, conseguimos recuperar suas sequências proteicas completas em *Streptomyces sp.* NL15-2K usando a ferramenta BLASTp (Sequence ID: WP_124436497.1 e BAN09098.1, respectivamente) e compará-las com a de XAC0353. Intrigantemente elas não apresentam similaridade de sequência significativa com XAC0353. Embora também atue contra o álcool coniferílico (1,23 x 10³ s⁻¹.M⁻¹), CADH I mostrou alta especificidade pelo álcool cinamílico (1,06 x 10⁵ s⁻¹.M⁻¹), que possui estrutura similar ao álcool coniferílico, mas sem grupos substituintes nas posições 3 e 4 do anel. CADH II também possui atividade contra esses dois álcoois, mas apresentou maior especificidade para o álcool coniferílico, exibindo um k_{cat}/K_m igual a 5,36 x 10⁵ s⁻¹.M⁻¹, na mesma ordem de grandeza que XAC0353 apresentou para esse substrato. No entanto, comparando-se a

afinidade (K_m) e o *turnover* (k_{cat}) de CADH II e XAC0353 para o álcool coniferílico, observa-se que XAC0353 apresentou valores de K_m e k_{cat} cerca de 8 e 9 vezes menores, respectivamente. Assim, apesar de CADH II e XAC0353 possuírem uma constante de especificidade semelhante para o álcool coniferílico, a afinidade pelo substrato e a taxa de conversão substrato/produto diferem significativamente, sendo favorecido o aumento da afinidade pelo substrato acompanhado pela redução do *turnover* em XAC0353 em comparação com a CADH II. Visto que elas não possuem similaridade de sequência significativa entre si, a distinção nessas propriedades está provavelmente relacionada a diferenças estruturais que afetam a dinâmica do ciclo catalítico e a interação da enzima com o substrato. Para CADH I e CADH II não foi avaliada atividade contra o álcool vanílico e o álcool 4-hidroxibenzílico (Nishimura et al, 2011).

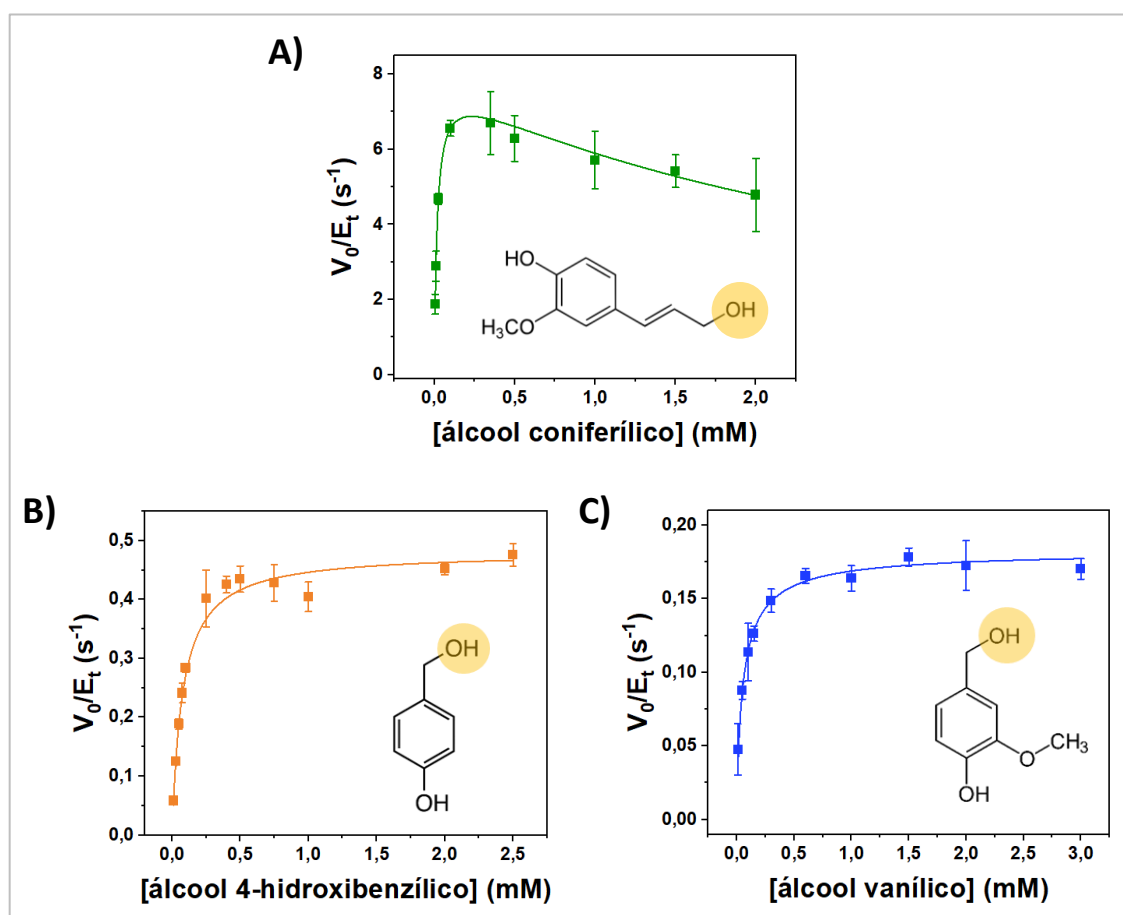


Figura 24. Cinética enzimática de XAC0353 com diferentes substratos. As curvas foram obtidas utilizando 2 mM de NAD⁺ e diferentes concentrações de substrato. (V_0 =velocidade inicial; E_t =concentração de enzima). Pontos representam a média de triplicatas, com desvio padrão indicado por barras verticais. Linhas representam o *fit* dos dados com o modelo de Hill (exceto para o álcool coniferílico; modelo de inibição pelo substrato). As fórmulas moleculares dos substratos são apresentadas e círculos amarelos destacam o grupo álcool que é oxidado a aldeído pela enzima.

Em outro estudo, uma álcool coniferílico purificada de *Rhodococcus erythropolis* (CADH_{Re}) apresentou um $K_{0,5}$ de 0,645 mM para o álcool coniferílico e também foi inibida por ele, com um K_i de 18,3 mM (Jaeger, Eggeling & Sahm, 1981). Esses valores são cerca 40 e 5 vezes maiores, respectivamente, do que o $K_{0,5}$ e o K_i da XAC0353 para o álcool coniferílico. Ou seja, XAC0353 tem maior afinidade por esse substrato e é inibida por ele em uma menor concentração, indicando uma correlação positiva entre a afinidade pelo substrato e sua potência de inibição. Assim como XAC0353, CADH_{Re} também mostrou atividade contra o álcool vanílico, correspondendo a 14% da atividade com o álcool coniferílico (Jaeger, Eggeling & Sahm, 1981). Porém esse dado deve ser observado com cautela, visto que essa comparação se baseia em atividade relativa e não em comparação de parâmetros cinéticos. No caso de XAC0353, a constante catalítica estimada para o álcool vanílico representa apenas 2,4% da constante catalítica estimada para o álcool coniferílico.

A XylB de *Acinetobacter calcoaceticus* (UniprotKB: Q59096) é uma álcool benzílico desidrogenase que também apresentou elevada eficiência catalítica para outros alcóois aromáticos (MacKintosh & Fewson, 1988b). Dentre eles estão o álcool cinamílico, que não possui grupos substituintes além da cadeia lateral α,β -insaturada, e alguns que possuem grupos metoxi ou hidroxí nas posições 3 e/ou 4 do anel: álcool coniferílico, álcool 4-hidroxibenzílico, álcool vanílico e álcool 3,4-dimetoxibenzílico. Os valores de k_{cat}^{app}/K_m^{app} para esses substratos foram da ordem de ($\sim 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), impulsionados por altos valores de k_{cat}^{app} (48 a 156 s^{-1}) (MacKintosh & Fewson, 1988b). Comparando-se os valores de k_{cat}^{app} com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que XylB foi mais eficiente contra o álcool 4-hidroxibenzílico, o álcool vanílico e o álcool coniferílico do que a XAC0353. Em termos de K_m^{app} , XAC0353 apresenta maior afinidade pelos substratos álcool coniferílico e álcool vanílico do que XylB. Assim como a CADH II de *Streptomyces sp.* NL15-2K (Nishimura et al, 2011), XylB não compartilha identidade de sequência significativa com XAC0353, mas CADH II e XylB apresentam 98% de cobertura e cerca de 31% de identidade entre si. Isso evidencia que, apesar de apresentarem a mesma função e possuírem atividade contra alguns substratos em comum, XAC0353 apresenta um elevado distanciamento filogenético em relação a CADH II e a XylB, podendo ter evoluído de forma a convergirem para funções semelhantes a partir de genes ancestrais distintos.

É importante destacar que ainda há poucos dados na literatura descrevendo as propriedades bioquímicas de álcool coniferílico desidrogenases, e a escassez é maior para as enzimas pertencentes ao grupo SDR (*short chain dehydrogenase/reductase*). Boa parte dos dados sobre álcool coniferílico desidrogenases (CADHs) referem-se à membros do grupo MDR (Riveros-Rosas et al, 2003). Além disso, a classificação dessas enzimas ainda é um pouco controversa. Por exemplo, a CADH II de *Streptomyces sp.* NL15-2K (UniProtKB: M5AJW4; Nishimura et al, 2011) pertence ao grupo MDR (Hedlund, Jörnval & Persson, 2010) e está associada a dois números E.C. no banco de dados de enzimas já caracterizadas (BRENDA, Chang et al, 2021), o **E.C. 1.1.1.90** e o **E.C. 1.1.1.194**. O primeiro corresponde a **aril-álcool desidrogenases**, enzimas dependentes de NAD⁺ descritas como “*tendo ampla especificidade para álcoois primários com anel aromático ou ciclohex-1-eno, mas com baixa ou nenhuma atividade para álcoois alifáticos de cadeia curta*”. Já o segundo corresponde a **álcool coniferílico desidrogenases**, descritas como sendo “*específicas para o álcool coniferílico, que não possuem atividade sobre o álcool cinamílico, álcool 4-cumarílico ou álcool sinapílico*”. O E.C. 1.1.1.194 foi fundado com base em dados de enzimas NADP⁺ dependentes, envolvidas com a síntese de lignina, que catalisam preferencialmente a reação inversa, ou seja, a redução de coniferaldeído em álcool coniferílico (Wyrambik, & Grisebach 1975). Sendo assim, a classificação de CADH II apenas no E.C. 1.1.1.90 parece ser a mais adequada.

Até o presente momento, existem 2214 sequências depositadas no banco de dados RefSeq (*Reference sequence database*, O'Leary et al, 2016), incluindo XAC0353, que foram agrupadas na subfamília de álcool coniferílico desidrogenases do NCBI *Protein Family Model* (NF009092) – o qual utiliza perfis de HMM (*Hidden Markov Models*), BLAST e dados do CDD (*Conserved Domain Database*) como ferramentas para categorizar famílias de proteínas. Essa subfamília é identificada pelo código PRK12428 no CCD e pertence ao grupo SDR. As sequências pertencentes a esse *cluster* abrangem um total de 172 gêneros, mas 67% delas estão distribuídas em apenas 6 (Fig. 25): *Pseudomonas* (21%), *Mycobacterium* (15%), *Rhizobium* (11%), *Mycolicibacterium* (9%), *Xanthomonas* (6%) e *Mesorhizobium* (5%). Nesse universo, apenas uma delas consta como proteína curada no banco de dados UniProtKB, a calA de *Pseudomonas sp.* HR199 (Overhage, Steinbüchel & Priefert, 2002 e UniprotKB: P0DMP5), para qual não há dados cinéticos disponíveis. Uma outra CADH que pertence a esse *cluster* e possui referências na literatura é a codificada pelo gene *calA* de *Pseudomonas nitroreducens* Jn1

(Balgir & Kalra, 2014). Embora o gene tenha sido clonado, apenas análises *in silico* de sua sequência proteica foram relatadas até então. Diante disso, pode-se afirmar que este é o primeiro trabalho a publicar dados cinéticos para uma CADH pertencente ao grupo SDR, revelando que essa enzima também é ativa em outros álcoois aromáticos, embora com menor eficiência.

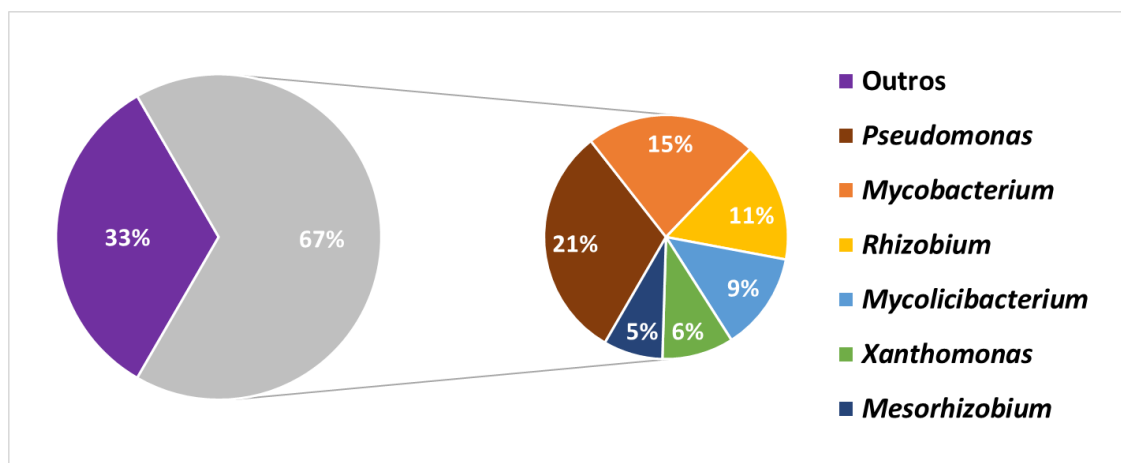


Figura 25. Distribuição dos 2214 hits de proteínas (RefSeq) anotadas como álcool coníferílico desidrogenases (PRK12428) entre os 172 gêneros em que se encontram. Do total de sequências (gráfico à esquerda), 67% (em cinza) estão distribuídas em apenas 6 gêneros (gráfico à direita).

4.3. CAPÍTULO 3: Desvendando a estrutura e a função de XAC0354

4.3.1. Purificação

Na primeira cromatografia de afinidade da XAC0354, o cromatograma exibiu um platô (Fig. 26A), provavelmente oriundo da saturação da coluna, que começou a eluir a partir da concentração de 30% do tampão B (20 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7,4). As frações correspondentes à proteína alvo, de acordo com análises de SDS-PAGE (Fig. 26B) foram submetidas à diálise seguida de SEC, ambas em tampão fosfato (20 mM Fosfato, 15 mM NaCl, pH 7,4). O perfil cromatográfico da SEC exibiu 3 picos que eluíram nas faixas de 50 mL, 70 mL e 80 mL (Fig. 26C). Através de análises de SDS-PAGE (Fig. 26D), verificou-se que tanto o pico 2 quanto o pico 3 apresentavam uma banda única correspondente ao tamanho esperado para XAC0354.

As amostras de XAC0354 analisadas após purificação por SEC (Fig. 26E) apresentaram polidispersividade relativamente alta, indicando que há uma mistura de

estados oligoméricos nas frações analisadas. De fato, parte majoritária das frações do pico 2 (pico principal, de maior intensidade) analisadas apresentou raio hidrodinâmico (R_h) médio estimado de 5 nm e massa molecular entre 160 e 200 kDa, o que está dentro das massas estimadas para um trímero ou um tetrâmero, respectivamente, visto que o monômero da XAC0354 heteróloga possui massa igual a 52,5 kDa. Já as frações iniciais do pico 3 (pico secundário, de menor intensidade) tiveram R_h estimado de aproximadamente 3,8 nm e massa molecular entre 70 e 124 kDa, valores que se aproximam da massa de um monômero e um dímero, respectivamente. Entretanto, as medidas das frações finais do pico 3 (F39 e F41) indicaram valores próximos aos observados para o pico 2. Aparentemente, parte da população das frações em que os monômeros/dímeros foram isolados pode voltar a formar trímeros/tetrâmeros, sugerindo que XAC0354 exibe um equilíbrio dinâmico entre estados oligoméricos. Considerando que a técnica de DLS possui baixa resolução (Stetefeld, McKenna & Patel, 2016) e é realizada um tempo depois da separação das amostras pela SEC, análises de SEC-RALS/LALS foram realizadas para melhor investigar o estado oligomérico da XAC0354, como discutido na próxima seção. Essa técnica é mais precisa e faz um monitoramento *on-line* do estado oligomérico da amostra, ou seja, as medidas são realizadas assim que a amostra é eluída da coluna.

Para verificar qual das populações (pico 02 ou 03) de XAC0354 continha a enzima ativa, um ensaio de atividade utilizando benzaldeído como substrato e NAD^+ ou $NADP^+$ como co-substrato foi realizado. Como observado na Fig. 27, o pico 02 corresponde à população ativa da enzima, indicando que sua atividade é influenciada pelo seu estado oligomérico. Em purificações posteriores foi utilizado o tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5) para realização da diálise e da SEC. O perfil apresentado pelas amostras purificadas em tampão HEPES no DLS foi similar ao das analisadas em tampão fosfato (Fig. 28, Tabela 11), fortalecendo a hipótese de que XAC0354 apresenta um equilíbrio entre diferentes estados oligoméricos. A troca de tampão foi motivada pelo sucesso nos ensaios de cristalização de uma benzaldeído desidrogenase purificada em tampão HEPES contendo KCl, com pH 7,5 (Zahniser et al, 2017) e pela instabilidade do NAD^+ em tampão fosfato (Anderson & Anderson, 1963).

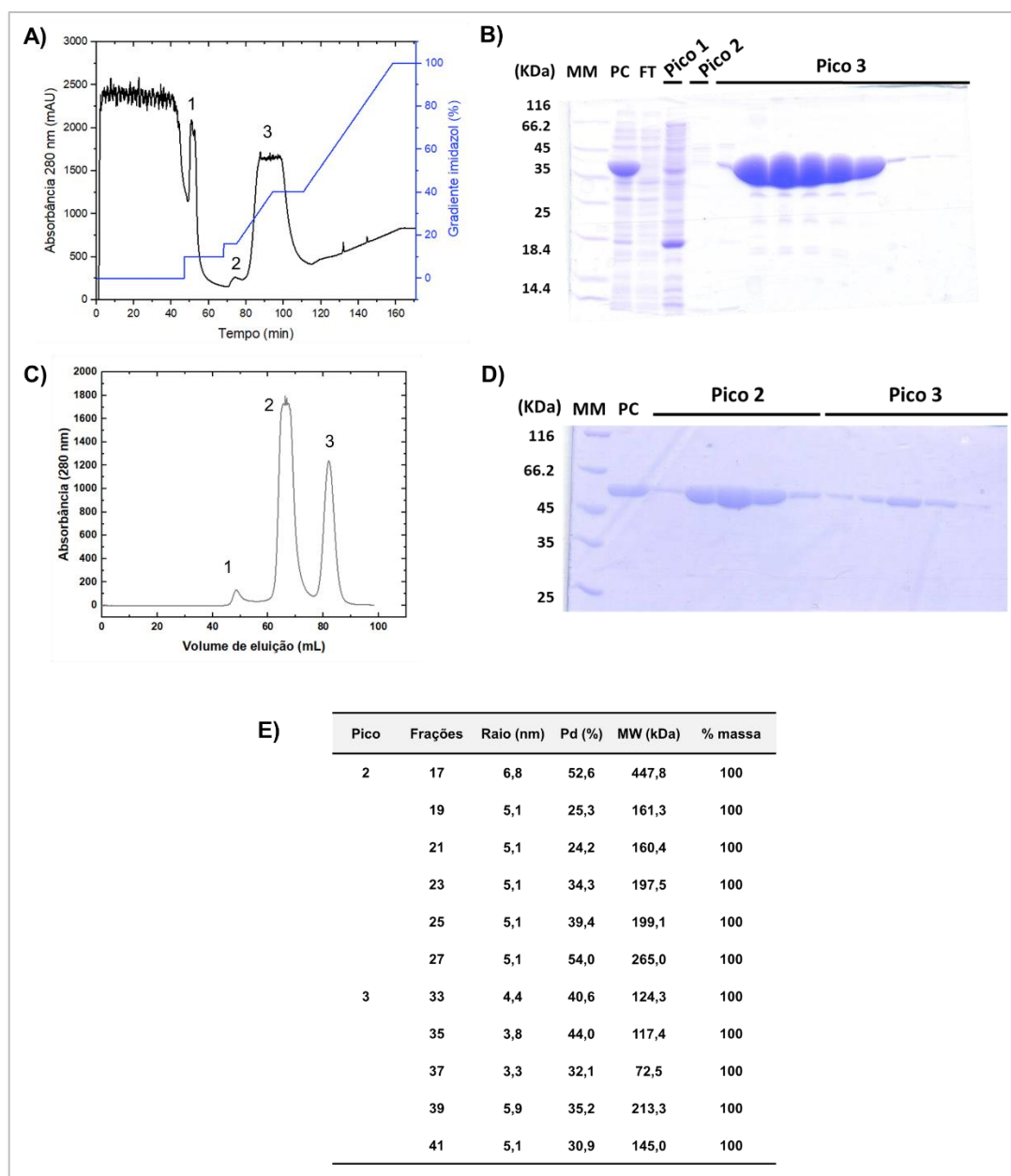


Figura 26. Dados de purificação da XAC0354. **A)** Cromatograma da cromatografia de afinidade. Frações do platô (3) foram reunidas e submetidas à etapa de cromatografia de exclusão molecular. **B)** Análise por SDS-PAGE 13% da purificação por afinidade. MM = marcador de massa molecular, PC = pré-coluna (extrato solúvel submetido à etapa de purificação), FT = *flow-through*. **C)** Cromatograma da SEC. **D)** Análise por SDS-PAGE 13% de frações coletadas durante a SEC. **E)** Dados obtidos a partir das medidas de DLS de frações da SEC. Raio = raio hidrodinâmico médio, Pd = polidispersividade da distribuição de tamanhos em porcentagem, MW = massa estimada a partir do raio hidrodinâmico médio, % massa = fração em massa do respectivo componente em relação à distribuição total de tamanhos.

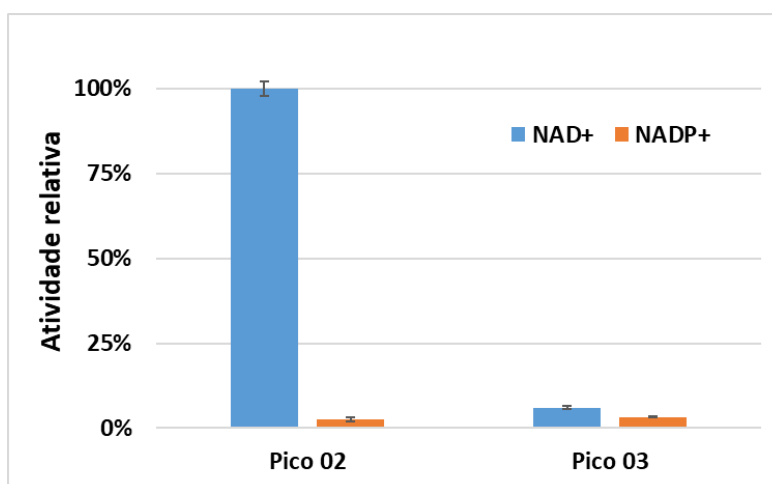


Figura 27. Teste de atividade dos picos 02 e 03, obtidos a partir da cromatografia de exclusão molecular da XAC0354. As reações (volume final = 100 μ L), continham co-substrato (NAD⁺ ou NADP⁺) 0,5 mM, benzaldeído 1 mM e enzima 15 μ M, sendo incubadas por 30 min, a 30 °C, e interrompidas por aquecimento a 95 °C por 5 min. A formação de NAD(P)H foi monitorada pela absorbância em 340 nm. Barras indicam o desvio padrão referente a triplicatas.

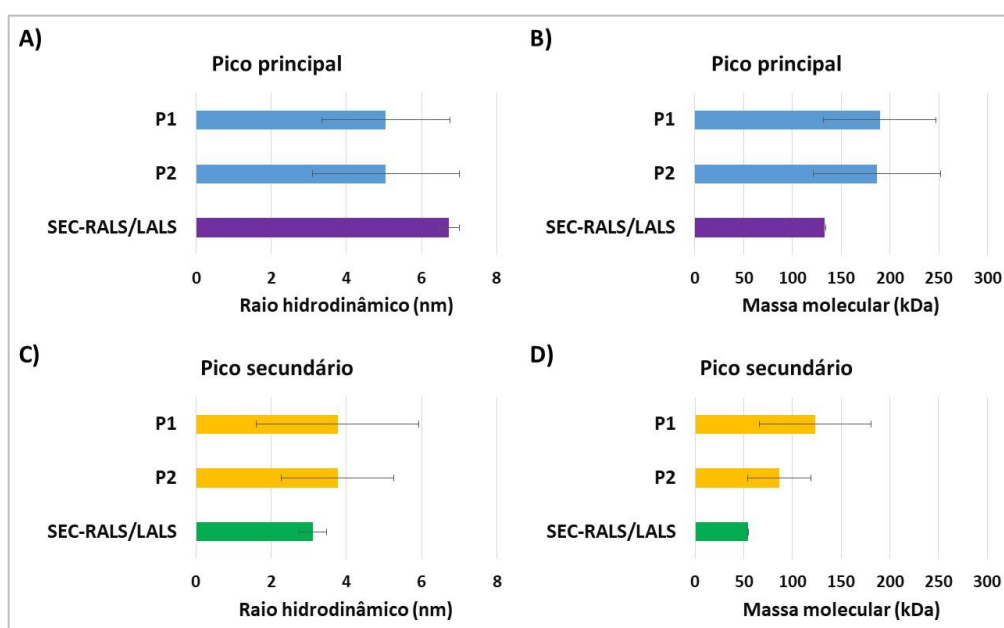


Figura 28. Raio hidrodinâmico e massa molar (MW) estimados para XAC0354 por DLS ou SEC-RALS/LALS. A) Raio hidrodinâmico e B) massa molecular estimados para amostras correspondentes ao pico de maior intensidade da primeira (P1) e da segunda purificação (P2), analisadas por DLS (azul), ou para a amostra que foi submetida à análise de SEC-RALS/LALS (roxo). Em C) e D) estão dispostos os valores de raio hidrodinâmico e massa molecular, respectivamente, para o pico de menor intensidade das purificações P1 e P2 estimados por DLS (em amarelo) e de uma amostra equivalente analisada por SEC-RALS/LALS (em verde). Tampão fosfato (Fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) foi utilizado na primeira purificação. Tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5) foi usado na segunda purificação e na eluição da amostra analisada por SEC-RALS/LALS.

Tabela 11. Raio hidrodinâmico e massa molecular estimados por DLS e SEC-RALS/LALS para amostras de XAC0354. Dados referentes a amostras da primeira e da segunda purificação e à amostra que foi submetida à análise por SEC-RALS/LALS. ^aO tampão foi utilizado tanto na purificação da amostra analisada quanto na corrida das análises de SEC-RALS/LALS. ^bDesvio padrão calculado com base nos resultados de três análises independentes realizadas com a mesma amostra.

Pico	Amostra (análise)	Tampão da purificação	Rh(nm)	MW (kDa)
Principal	Purificação 1 (DLS)	Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4	5,05 ± 1,70	189,6 ± 57,8
	Purificação 2 (DLS)	HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5 ^a	5,05 ± 1,95	186,7 ± 65,4
	SEC-RALS/LALS		6,73 ± 0,28 ^b	133,0 ± 1,0 ^b
Secundário	Purificação 1 (DLS)	Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4	3,76 ± 2,16	123,7 ± 57,3
	Purificação 2 (DLS)	HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5 ^a	3,76 ± 1,48	86,3 ± 32,3
	SEC-RALS/LALS		3,11 ± 0,35 ^b	54,3 ± 0,4 ^b

4.3.2. SEC-RALS/LALS

As análises de SEC-RALS/LALS de XAC0354 (Fig. 29) foram realizadas com uma amostra previamente purificada em tampão HEPES/KCl, correspondente ao pico 2 observado na cromatografia de exclusão molecular preparativa em que foi utilizada uma coluna Superdex 200 16/60. Interessantemente, essa amostra exibiu dois picos de eluição na corrida das análises de SEC-RALS/LALS em uma coluna analítica de exclusão molecular Superdex 200 HR 10/300 GL. Observa-se, na Figura 29, que a estimativa de massa molar decai ao longo da eluição do primeiro pico e fica estável no segundo. No início do primeiro pico, a massa média estimada tende a um trímero, enquanto no final tende a um dímero. No segundo pico, a massa estimada corresponde a um monômero. Esses dados corroboram a hipótese de que XAC0354 exibe um equilíbrio de rápida transição entre estados oligoméricos.

A existência de mais de um estado oligomérico também foi observada para vanilina desidrogenase de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (VDH_{ATCC13032}, UniprotKB: Q8NMB0), que revelou diferentes populações após separação por cromatografia de exclusão molecular, com valores de massa aparente correspondentes a monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros (Ding et al, 2015). A partir das análises de

DLS não foi possível afirmar com precisão quais estados oligoméricos estão de fato presentes na amostra de XAC0354. Contudo, os resultados das análises de SEC-RALS/LALS, uma técnica mais precisa e acurada, indicam que XAC0354 provavelmente transita entre as formas monomérica, dimérica e trimérica em solução (Fig. 29, Tabela 11). Diferentemente do que foi descrito para VDH_{ATCC13032}, a forma tetramérica não foi identificada para XAC0354 através da técnica de SEC-RALS/LALS.

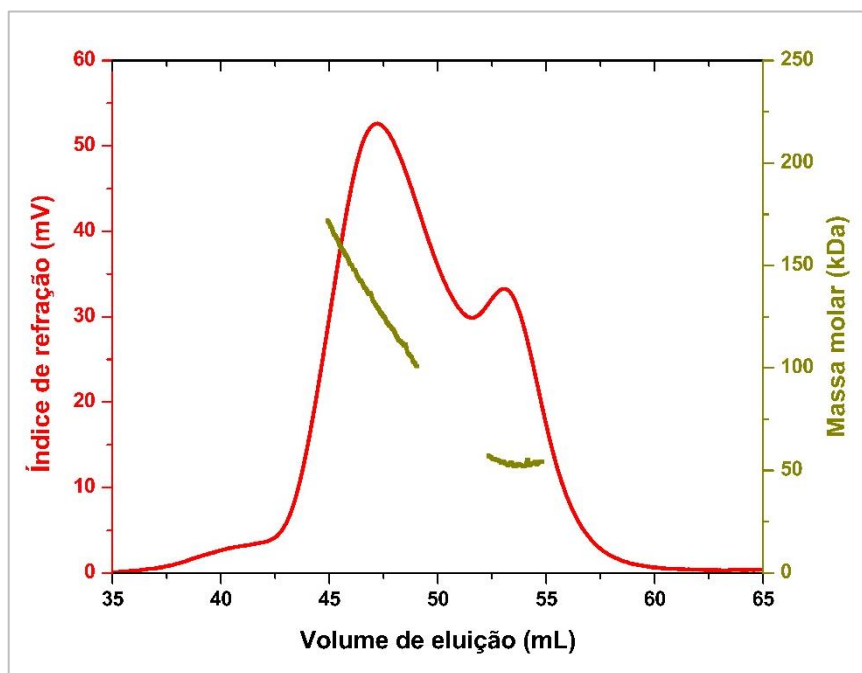


Figura 29. Análise de XAC0354 por SEC-RALS/LALS. A massa e o raio hidrodinâmico estimados a partir dessa análise indicam que XAC0354 provavelmente transita entre as formas monomérica, dimérica e trimérica em solução. No início do primeiro pico, a massa média estimada tende a um trímero (~150 kDa), enquanto no final tende a um dímero (~100 kDa). No segundo pico, a massa estimada corresponde a um monômero (~50 kDa). As análises foram realizadas com uma amostra previamente purificada em tampão HEPES (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,5). A curva vermelha representa o índice de refração da proteína eluída de uma coluna analítica de exclusão molecular Superdex 200 HR 10/300 GL. A linha amarela escura representa a massa molar estimada para a proteína eluída, calculada a partir das medidas de espalhamento estático de luz em ângulo reto e em baixo-ângulo.

4.3.3. Caracterização Biofísica

4.3.3.1. Estrutura secundária e estabilidade térmica

Os perfis de CD para as amostras correspondentes aos picos 02 e 03 da XAC0354, obtidos a partir da cromatografia de exclusão molecular, estão apresentados na Fig. 30A.

Ambos apresentam um pico positivo na região de 200 nm e picos negativos nas regiões de 208 e 222 nm, apresentando um perfil típico de proteínas do tipo α/β . Quando comparados entre si, percebe-se que o perfil do pico 03, que possivelmente corresponde à um monômero, apresenta valores menos negativos na região entre 208 e 222 nm. Essas diferenças podem estar relacionadas à maior abundância de regiões desestruturadas na forma monomérica da proteína, que provavelmente são estabilizadas pelas interfaces presentes nas formas oligoméricas.

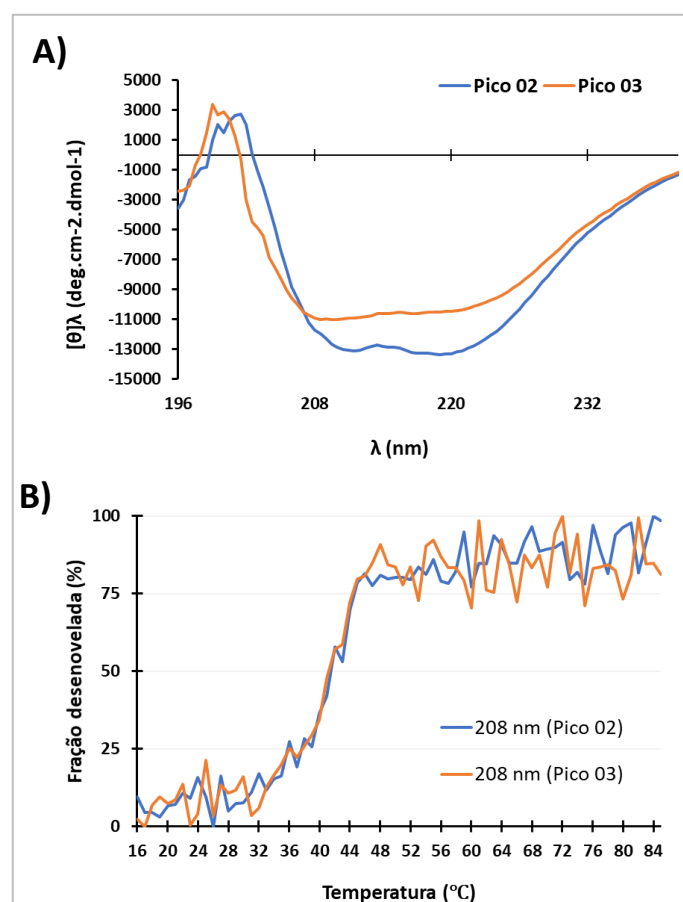


Figura 30. Análises por CD dos picos 02 e 03, obtidos a partir da cromatografia de exclusão molecular de XAC0354. A) Espectro de CD (196 – 250 nm). B) Curvas dos ensaios de desnaturação térmica. Os valores de Tm obtidos a partir do monitoramento em 208 nm, que tem maior influência do sinal de α -hélices, foram de 41,3 °C e 40,7 °C para o pico 02 e para o pico 03, respectivamente.

O perfil de CD observado para XAC0354 corrobora com o modelo teórico da sua estrutura secundária (Fig. 31A) predito pelo programa PSIPRED v4.1 (Jones, 1999; Buchan & Jones, 2019). Assim como a XAC0353, são observadas regiões de α -hélice intercaladas com fitas β , topologia também comum à outras aldeído desidrogenases, como

a NahF de de *Pseudomonas putida* G7 (Fig. 31B) (Coitinho et al, 2012; Coitinho et al, 2016).

Experimentos de desnaturação térmica foram realizados com o objetivo de calcular a T_m da XAC0354 e avaliar se há diferença quanto a estabilidade térmica entre os picos 02 e 03 (Fig. 30B). Os valores de T_m obtidos a partir do monitoramento em 208 nm, que tem maior influência do sinal de α -hélices, foram de 41,3 °C e 40,7 °C para o pico 02 e para o pico 03, respectivamente. Esses valores diferem ligeiramente entre si, indicando que não há grande perda da estabilidade devido à mudança do estado oligomérico. Quando comparados aos valores de T_m obtidos para a XAC0353 (~35 °C), percebe-se que a XAC0354 é mais estável nas condições testadas. Em relação ao seu organismo de origem, XAC0354 apresenta uma temperatura aproximadamente 10 °C acima da temperatura ótima ao crescimento de *X. axonopodis* pv *citri* 306 (Sumares et al, 2016).

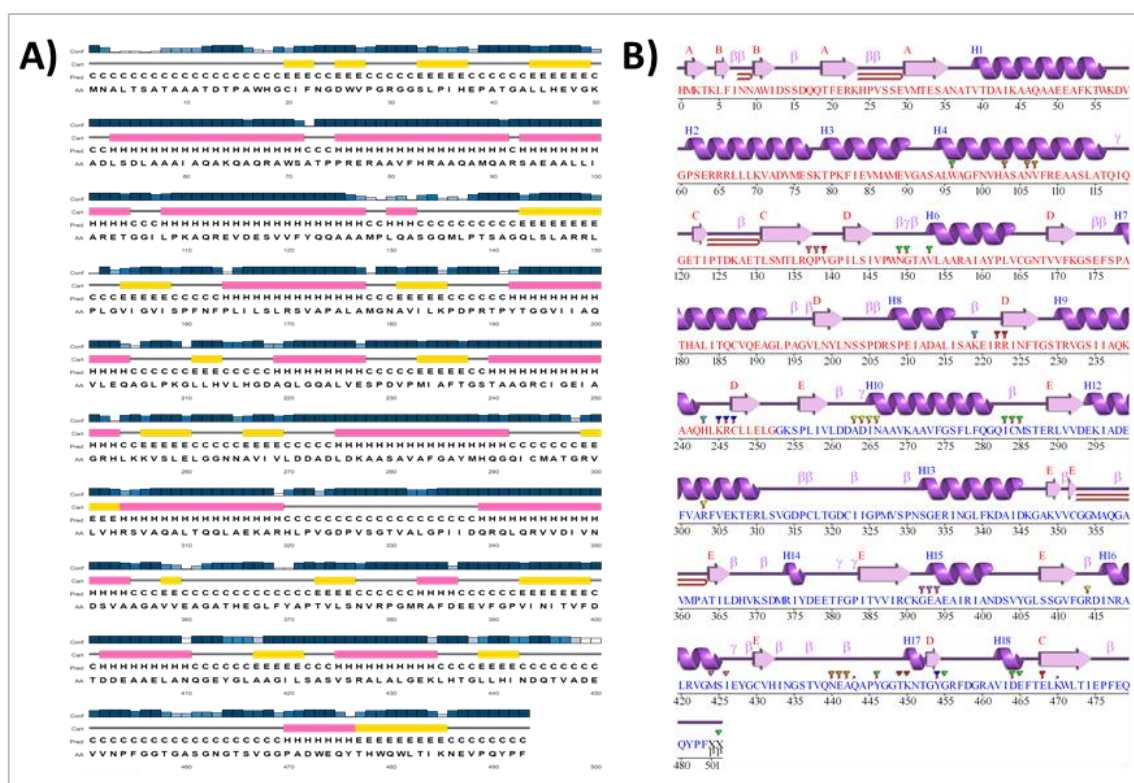


Figura 31. Comparação da estrutura secundária de XAC0354 e da NahF de *Pseudomonas putida* G7. A) Esquematização da estrutura secundária de XAC0354 predita pelo programa PSIPRED v4.1 (Jones, 1999; Buchan & Jones, 2019). Cilindros rosas representam alfa-hélices (H), setas amarelas indicam fitas beta (E) e linhas pretas representam regiões desenoveladas (C). O grau de confiabilidade da predição (azul) é mostrado acima da representação da estrutura secundária. Números indicam posições de aminoácidos na sequência primária. **B)** Estrutura secundária da NahF de *P. putida* G7, (PDB 4JZ6; Coitinho et al, 2012; Coitinho et al, 2016), extraída do PDBsum (Laskowski et al, 2018).

4.3.4. Ensaios de cristalização

Nos ensaios de cristalização da XAC0354, nenhuma condição experimental mostrou-se promissora, uma vez que a maioria das amostras precipitou completamente ou gerou precipitados granulares, apesar da alta pureza química da amostra enviada para a cristalização (Fig. 32A). Novas triagens, com a construção com a cauda N-terminal, ou variando-se a temperatura, concentração inicial de proteína, ou proporção de solução de proteína: solução do poço, poderão ser realizados futuramente para se superar esse desafio experimental. Análises da sequência primária da XAC0354 foram realizadas no programa PONDR (Li et al, 1999) e indicaram a existência de diversas regiões desestruturadas ao longo de toda a proteína (Fig. 32B), o que pode estar relacionado à dificuldade de se obterem cristais para a XAC0354.

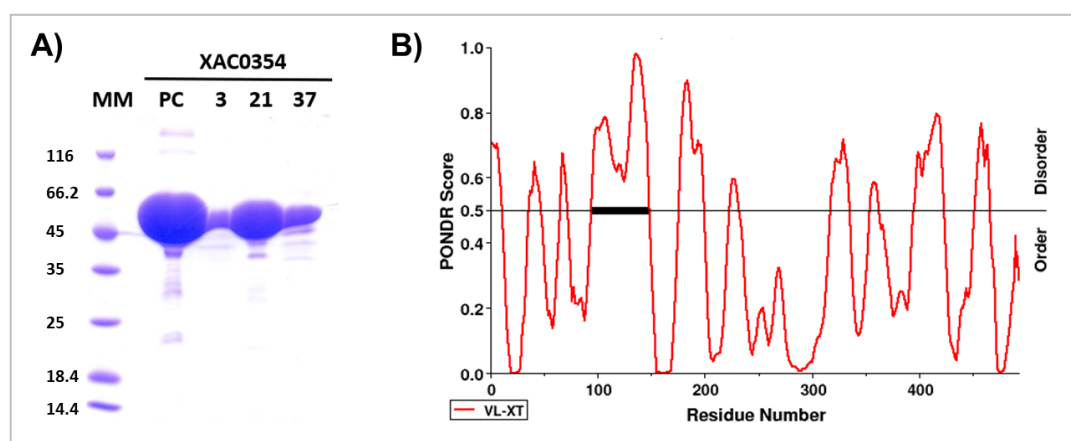


Figura 32. SDS-PAGE e predição de regiões desestruturadas da XAC0354. A) Análise de SDS-PAGE das frações 3, 21 e 37 representativas dos picos 01, 02 e 03, respectivamente. Nos ensaios de cristalização foram utilizadas apenas as amostras com menor polidispersividade do pico 02. MM: marcador molecular; PC: pré-coluna B) Resultados das análises de predição de regiões proteicas intrinsecamente desestruturadas na sequência de XAC0354 realizadas pelo PONDR (Li et al, 1999).

4.3.5. Caracterização bioquímica

4.3.5.1. Especificidade de co-substrato

Como abordado na seção sobre a purificação de XAC0354 (4.3.1.), um ensaio de atividade indicou que o pico 02 do cromatograma da SEC corresponde à população ativa dessa enzima (Fig. 27). Para confirmar sua preferência pelo NAD^+ , testes de atividade

com amostras do pico 02 em condições otimizadas foram realizados utilizando NAD^+ ou NADP^+ (0,5 mM) como co-substrato e benzaldeído ou vanilina como substratos (1 mM). Como observado na Fig. 33, XAC0354 não apresentou atividade significativa com NADP^+ , em contraste com a atividade observada quando NAD^+ foi utilizado como co-substrato, confirmando que XAC0354 é uma aldeído desidrogenase dependente de NAD^+ e corroborando com os dados apresentados na Fig. 27.

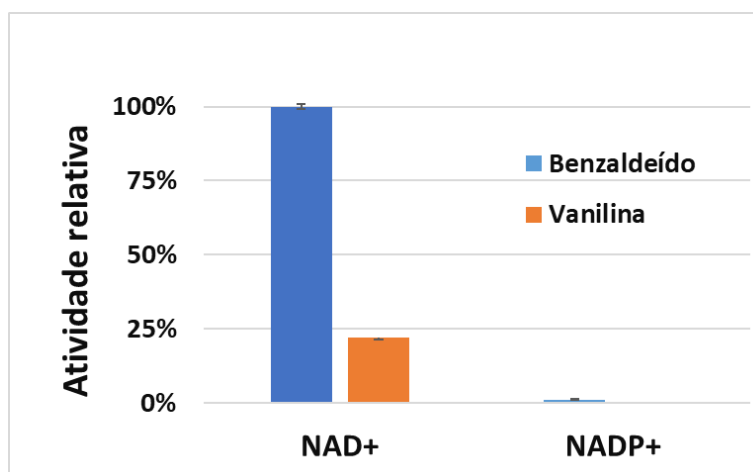


Figura 33. Atividade da XAC0354 contra o benzaldeído e a vanilina, utilizando NAD^+ ou NADP^+ como co-substratos. Esses ensaios foram realizados 30 °C em pH 8,5 respeitando condições de linearidade de resposta e monitorando-se a formação de NAD(P)H por emissão de fluorescência a 458 nm, após excitação a 340 nm. Dados são mostrados como média e desvio padrão de triplicatas.

4.3.5.2. pH e temperatura ótimos

Nos ensaios de atividade utilizando benzaldeído como substrato e variando-se o pH e a temperatura (Fig. 34), XAC0354 apresentou atividade ótima em 30 °C e numa faixa de pH entre 7 e 10, com atividade ligeiramente maior entre 8,5 e 9,0. Esses dados assemelham-se aos encontrados para outras aldeído desidrogenases, que geralmente atuam em pH básico, como a BZD_{Ac} (MacKintosh & Fewson, 1988a), e a uma temperatura de 30 °C, como a $\text{VDH}_{\text{ATCC13032}}$ (Ding et al, 2015).

Diante disso, para a execução dos ensaios de cinética enzimática, a temperatura de 30 °C e o pH 8,5 (Tampão Bicine 20 mM) foram definidos como condição padrão.

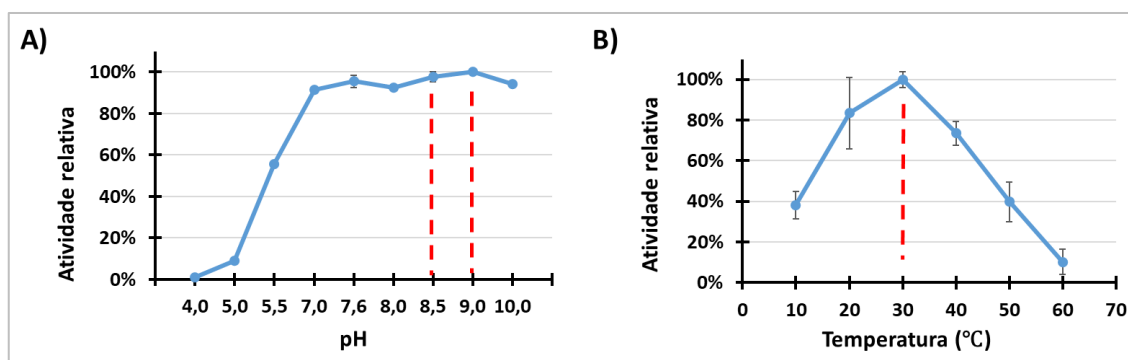


Figura 34. Curvas de atividade de XAC0354 em diferentes pHs (A) e temperaturas (B), utilizando benzaldeído ($C_f = 1 \text{ mM}$) como substrato e NAD^+ ($C_f = 0,5 \text{ mM}$) como co-substrato. Os ensaios de pH foram realizados a 30°C e os ensaios de temperatura, em pH 8. A linha tracejada vermelha indica os máximos observados. Pontos representam a média de triplicatas e barras verticais representam o desvio padrão.

4.3.5.3. Efeito de íons e aditivos

Um ensaio de atividade foi realizado para verificar o efeito dos íons Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} e do EDTA (agente quelante) e do DTT (agente redutor) na atividade da XAC0354 (Fig. 35). Dentre todos os fatores testados, o DTT foi o único que aumentou a atividade da XAC0354, quando comparado ao controle sem aditivos, indicando que um ambiente redutor é mais favorável à ação dessa enzima. Isso já era esperado, pelo fato dessa enzima atuar no citoplasma bacteriano, o qual tende a ser mais redutor (Ruddock & Klappa, 1999). Além disso, um dos resíduos catalíticos de XAC0354 é uma cisteína, que é sensível à inativação por oxidação, indicando que a maior atividade em presença de DTT pode estar relacionada a reativação de uma parcela inativa da população de cisteínas catalíticas eventualmente oxidadas durante o processo de purificação.

Os demais fatores reduziram sua atividade em mais de 10%, sendo a maior redução causada pelo Zn^{2+} , que pode ser explicada pela tendência desse cátion em induzir a precipitação de proteínas (Zaworski & Gill, 1988). A atividade da enzima na presença de outros cátions e do agente quelante EDTA ficaram semelhantes entre si e próximas do controle, indicando que essa enzima não é cátion-dependente e não é estimulada pelos íons testados. Esses dados são consistentes com os achados para outras benzaldeído desidrogenases, cujas atividades também não são modificadas pela presença de cátions divalentes (Livingstone et al, 1972; MacKintosh & Fewson, 1988a).

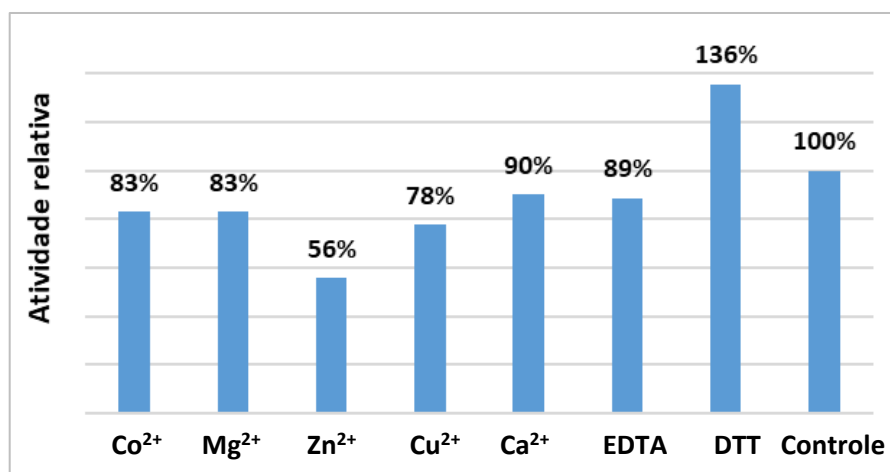


Figura 35. Efeito de íons e aditivos na atividade da XAC0354. As reações (volume final = 100 μ L) continham XAC0354 5 μ M, NAD⁺ 0,5 mM, tampão bicina 20 mM (pH 8,5), benzaldeído 5 mM e sais de cátions divalentes, EDTA (agente quelante) ou DTT 1 mM.

4.3.5.4. *Triagem de substratos*

Para a triagem, vanilina, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, 3,4-dihidroxibenzaldeído e coniferaldeído foram utilizados como substratos, por serem metabólitos intermediários conhecidos do metabolismo de moléculas derivadas de lignina, exceto o 3,4-dihidroxibenzaldeído, que foi utilizado por corresponder à versão desmetilada da vanilina. A reação com o benzaldeído foi utilizada como controle, dada a função predita para XAC0354 de benzaldeído desidrogenase.

Nas triagens iniciais, a atividade de XAC0354 contra a vanilina e o 4-hidroxibenzaldeído foi detectada qualitativamente pela redução da absorbância da amostra em 340 nm, indicativa do consumo desses substratos (Fig. 36A). Porém, subsequentemente adotou-se outro método de detecção de atividade pois, nesses casos, o espectro de absorção do substrato se sobrepõe ao do co-produto (NADH), interferindo com eventuais análises quantitativas. Como o benzaldeído não absorve luz em 340 nm, a atividade de XAC0354 contra esse substrato foi inferida pelo aumento da absorbância nesse comprimento de onda, indicativa da formação de NADH (Fig. 36A).

Para os demais substratos, a produção de NADH foi mensurada pela emissão de fluorescência na faixa de 458 nm, após excitação a 340 nm, visto que apenas o NADH emite fluorescência nessa faixa. Como verificado na Fig. 36B, apenas para o siringaldeído não houve atividade significativa, indicando que XAC0354 não é capaz de reconhecer aldeídos derivados de subunidades do tipo S da lignina, os quais apresentam grupos metoxila nas posições 3 e 5 do anel aromático. Diante disso, todos os compostos testados,

exceto o siringaldeído, foram selecionados para realização de ensaios cinéticos. A conversão dos aldeídos em seus respectivos ácidos foi confirmada por análises de HPLC (anexo 1).

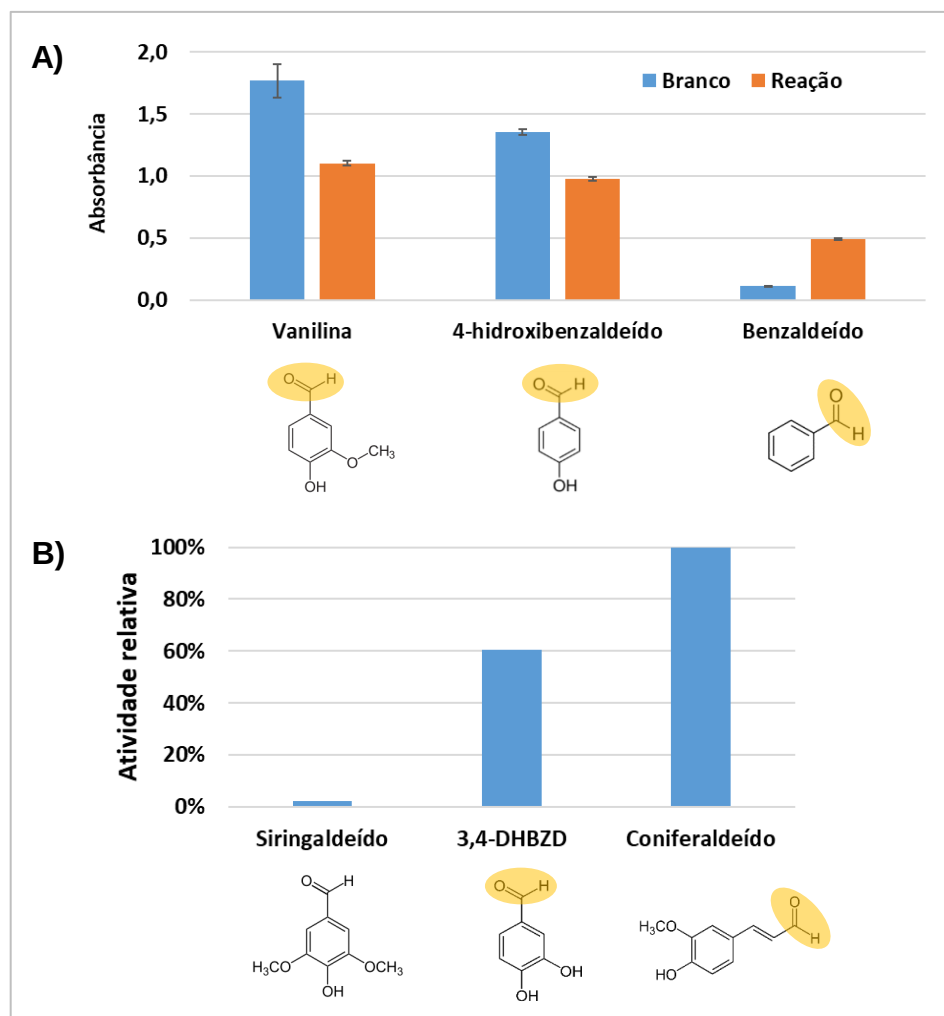


Figura 36. Testes de atividade da XAC0354. A) Medidas de absorbância das reações contra vanilina, 4-hidroxi-benzaldeído e benzaldeído. As reações foram preparadas com tampão bicina 20 mM (pH 8), NAD^+ 0,5 mM, substrato 1 mM e enzima 15 μM , em um volume final de 100 μL , sendo interrompidas por aquecimento a 95 $^{\circ}\text{C}$, durante 5 minutos. Esses ensaios foram realizados em triplicata e as barras indicam o desvio padrão. **B)** Atividade relativa das reações contra siringaldeído, 3,4-dihidroxi-benzaldeído (3,4-DHBZD) e coniferaldeído, medidas por fluorescência. As reações foram preparadas da mesma maneira que em A, mas foram interrompidas pela adição de 100 μL de acetonitrila. Todos os ensaios foram realizados a 30 $^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos. Em amarelo, destaca-se o grupo aldeído sobre o qual a enzima atua.

Esse perfil de substratos difere do que foi descrito para a coniferaldeído desidrogenase de *Pseudomonas sp.* HR199 (CALDH_{HR199}), a qual atua em série com a álcool coniferílico desidrogenase CADH_{HR199} (Overhage, Priefert & Steinbüchel, 1999),

homóloga de XAC0353 (99% de cobertura e 61% de identidade). CALDH_{HR199} não demonstrou atividade contra a vanilina e catalisa a oxidação do coniferaldeído e do sinapaldeído - um composto similar ao coniferaldeído, mas com três grupos substituintes, pois possui um grupo metoxila adicional na posição 3 do anel (Achterholt, Priefert & Steinbüchel, 1998). O perfil de substratos de XAC0354 aproxima-se mais daquele encontrado para vanilina desidrogenases que também oxidam o coniferaldeído, como a VDH_{ATCC13032}, de *C. glutamicum* ATCC 13032 (Ding et al, 2015) e a vdh de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (Fleige et al, 2013), as quais compartilham, respectivamente, cerca de 40% e 50% de identidade de sequência com XAC0354, com mais de 90% de cobertura. Por outro lado, a CALDH_{HR199} apresenta cerca de 30% de identidade de sequência com XAC0354, com apenas 68% de cobertura. Dessa forma, verifica-se que XAC0354 possui maior identidade de sequência com vanilina desidrogenases que também oxidam o coniferaldeído, o que se correlaciona com a similaridade entre os perfis de substratos dessas enzimas.

4.3.5.5. Avaliação da atividade inversa

Biocatalisadores capazes de reduzir ácidos carboxílicos a aldeídos têm sido amplamente explorados como alternativa aos processos químicos sintéticos que dependem de aditivos e condições elevadas de temperatura e pressão (Venkitasubramanian et al, 2008). Diante desse cenário, também realizamos ensaios com XAC0354 na presença de NADH para investigar se essa enzima seria capaz de catalisar a atividade inversa à oxidação de aldeídos, isto é, a redução de ácidos. Na Tabela 12, estão dispostos os valores de atividade para cada ácido testado em comparação com a atividade de XAC0354 contra os respectivos aldeídos, numa mesma concentração de substrato. A atividade relativa (reação inversa/reação direta) foi de 2% para o ácido benzóico, 16% para os ácidos vanílico e 4-hidroxibenzílico, e 36% para o ácido ferúlico. Esses valores sugerem que XAC0354 é praticamente incapaz de reduzir o ácido benzóico, mas, aparentemente, apresentou uma baixa atividade redutora contra os ácidos vanílico, 4-hidroxibenzílico e ferúlico, sendo maior para este último. A atividade inversa não foi investigada para outras homólogas de XAC0354 citadas neste trabalho (Coitinho et al, 2016; Ding et al, 2015; Gosling, Zachariou & Straffon et al, 2008; MacKintosh & Fewson, 1988b).

Tabela 12. Atividade de XAC0354 na presença de NADH (5 mM) e diferentes ácidos (reação inversa). Os valores foram comparados à atividade da enzima contra os aldeídos correspondentes (reação direta). Os dados das reações diretas e inversas correspondem a reações realizadas com concentrações equivalentes de substrato e sob as mesmas condições (30 min, 30 °C, pH 8,5). Note que para o ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido benzóico, a atividade estimada para a reação inversa está muito próxima ou até menor do que o erro experimental. Atividade relativa = atividade inversa/atividade direta.

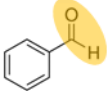
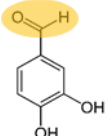
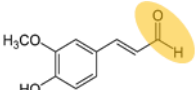
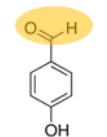
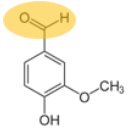
Reação inversa		Reação direta		Atividade relativa
Substrato	Atividade (s ⁻¹)	Substrato	Atividade (s ⁻¹)	
ác. vanílico	0,23 ± 0,34	Vanilina	1,46 ± 0,05	16%
ác. 4-hidroxibenzóico	0,37 ± 0,20	4-hidroxibenzaldeído	2,34 ± 0,15	16%
ác. ferúlico	0,76 ± 0,11	Coniferaldeído	2,13 ± 0,06	36%
ác. benzóico	0,09 ± 0,43	Benzaldeído	4,02 ± 0,10	2%

4.3.6. Cinética enzimática

Os cálculos da razão $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{0,5}^{\text{app}}$ (Tabela 13, Fig. 37) – considerada uma constante de especificidade - resultaram em valores na mesma ordem de grandeza ($\sim 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) para os substratos benzaldeído e 3,4-dihidroxibenzaldeído e cerca de 1 ordem de grandeza maior ($\sim 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) para os substratos coniferaldeído, vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) e 4-hidroxibenzaldeído. Considerando-se os valores absolutos da constante de especificidade, os dados sugerem que XAC0354 é mais específica contra a vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) e o 4-hidroxibenzaldeído, seguidos pelo coniferaldeído, e menos específica contra o benzaldeído e o 3,4-hidroxibenzaldeído. Esses dados contrariam a predição inicial de que ela seja uma benzaldeído desidrogenase, visto que, dos substratos testados, esse resultou na menor constante de especificidade.

Comparando-se os substratos 3,4-dihidroxibenzaldeído e vanilina, que diferem entre si apenas pela metilação na hidroxila 3, observa-se que a presença desse grupo metil conferiu à vanilina valores de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ e $K_{0,5}^{\text{app}}$ 7 vezes e 20 vezes menores, respectivamente. Isso significa que, embora o *turnover* tenha diminuído, a afinidade da enzima pela vanilina foi 20 vezes maior, indicando que a metilação na hidroxila 3 favoreceu a interação entre a enzima e o substrato. Em relação ao grupo 4-hidroxila, observa-se que sua presença provocou pouca diferença nos valores de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$, mas reduziu em 3 vezes o $K_{0,5}^{\text{app}}$ quando comparamos os dados cinéticos do benzaldeído e do 4-hidroxibenzaldeído, indicando aumento da afinidade da enzima pelo substrato na presença desse grupo funcional.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos calculados para XAC0354. Os valores foram obtidos a partir de curva de saturação com 5 mM de NAD⁺ e diferentes concentrações de substrato (Fig. 37). Para o benzaldeído, os valores foram calculados utilizando o modelo de Hill; para os demais substratos, foi utilizado o modelo de inibição pelo substrato. Em amarelo, destaca-se o grupo aldeído sobre o qual a enzima atua. N.A.: não se aplica.

Substrato	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (s ⁻¹)	$K_{0,5}^{\text{app}}$ (mM)	K_i (mM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{0,5}^{\text{app}}$ (s ⁻¹ .M ⁻¹)
 Benzaldeído	4,1 ± 0,1	0,29 ± 0,02	N.A.	1,3 x 10 ⁴
 3,4-dihidroxibenzaldeído	15,3 ± 5,1	1,0 ± 0,4	0,08 ± 0,03	1,4 x 10 ⁴
 Coniferaldeído	7,1 ± 0,8	0,20 ± 0,03	0,23 ± 0,04	3,6 x 10 ⁴
 4-hidroxibenzaldeído	4,7 ± 0,2	0,09 ± 0,01	0,56 ± 0,06	5,0 x 10 ⁴
 Vanilina	2,2 ± 0,1	0,042 ± 0,006	1,0 ± 0,1	5,3 x 10 ⁴

Dados da literatura mostram que uma 4-hidroxibenzaldeído desidrogenase (hcaB) de *Acinetobacter baylyi* ATCC 33305 apresentou valores de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_m^{\text{app}}$ na ordem de ($\sim 10^5 \text{ s}^{-1}.\text{M}^{-1}$) para todos os substratos testados, exceto para o coniferaldeído, com o qual não possui atividade (Gosling, Zachariou & Traffon et al, 2008), o que contrasta com o perfil observado para XAC0354. Para hcaB, 4-hidroxibenzaldeído e 3,4-dihidroxibenzaldeído foram identificados como os substratos preferenciais, com constantes de especificidade praticamente idênticas, enquanto para XAC0354 observou-se uma constante de especificidade cerca de 4 vezes maior para 4-hidroxibenzaldeído em comparação ao 3,4-hidroxibenzaldeído. XAC0354 possui aproximadamente 90% de cobertura e baixa identidade de sequência com hcaB ($\sim 36\%$), o que se correlaciona com as diferenças de perfis de especificidade observadas.

Dentre as homólogas mais próximas (~34% de identidade) de XAC0354 com estrutura depositada no PDB estão a vanilina desidrogenase de *C. glutamicum* ATCC 13032 (VDH_{ATCC13032}) (Ding et al, 2015; PDB 3R64) e a salicilaldeído desidrogenase NahF de *Pseudomonas putida* G7 (Coitinho et al, 2016; Coitinho et al, 2012; PDB 4JZ6). A atividade dessas enzimas foi avaliada contra uma grande variedade de substratos, com exceção do coniferaldeído, mas alguns dos substratos testados para os quais elas apresentaram atividade também são substratos da XAC0354. VDH_{ATCC13032} apresentou valores de k_{cat}/K_m iguais a 8×10^5 , $7,7 \times 10^5$ e $5,9 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ para a vanilina, o 3,4-hidroxibenzaldeído e o 4-hidroxibenzaldeído, respectivamente, o que difere do perfil de especificidade da XAC0354 (vanilina ~ 4-hidroxibenzaldeído > 3,4-hidroxibenzaldeído). Para a NahF, o valor de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_m$ para o benzaldeído ($2 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) foi maior que para o 4-hidroxibenzaldeído ($3 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), o oposto do que observamos para XAC0354. Os valores da constante de especificidade encontrados para essas enzimas também são pelo menos uma ordem de grandeza maior do que os valores apresentados pela XAC0354, mas comparações entre enzimas são mais precisas e acuradas quando ambas são analisadas sob as mesmas abordagens experimentais. Além disso, resta-nos investigar a influência da cauda de histidinas tanto na estabilidade da estrutura quaternária quanto na atividade de XAC0354 para termos uma melhor compreensão se sua presença e localização na estrutura (N- ou C-terminal) afeta o equilíbrio dinâmico entre diferentes estados oligoméricos e as propriedades cinéticas da enzima.

Através das curvas de saturação da enzima XAC0354 (Fig. 37), foi observada inibição pelo substrato para todos os compostos testados, exceto para o benzaldeído. O 3,4-dihidroxibenzaldeído apresentou a menor constante de inibição (K_i), indicando maior potencial inibitório, seguido pelo coniferaldeído, 4-hidroxibenzaldeído e vanilina. Nos estudos com a 4-hidroxibenzaldeído desidrogenase (hcaB) de *Acinetobacter baylyi* (ATCC 33305), observou-se inibição da enzima pela vanilina em concentrações superiores a 100 μM (Gosling, Zachariou & Straffon et al, 2008). No caso da XAC0354, a vanilina reduz a atividade da enzima pela metade a uma concentração dez vezes maior ($K_i = 1 \text{ mM}$), indicando que ela é mais resistente a inibição pela vanilina do que a enzima hcaB.

Estudos relatam benzaldeído desidrogenases cuja atividade também é inibida pelo substrato. A benzaldeído desidrogenase II de *A. calcoaceticus* (XylC), por exemplo, tem elevada afinidade ($K_{0,5}^{\text{app}} = 6,8 \times 10^{-4} \text{ mM}$) e especificidade ($k_{\text{cat}}/K_{0,5}^{\text{app}} = 1,26 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

$^1\text{M}^{-1}$) pelo benzaldeído e é inibida por ele a uma concentração de 1×10^{-4} mM (MacKintosh & Fewson, 1988b). XylC também apresentou alta eficiência catalítica contra o cinamaldeído e o 4-hidroxibenzaldeído, mas não foi ativa com a vanilina e o 3,4-dihidroxybenzaldeído. Assim, apesar de compartilharem cerca de 50% de identidade de sequência, XylC apresentou um perfil de atividade e de inibição pelo substrato diferente do perfil revelado para XAC0354, visto que esta não é inibida pelo benzaldeído e possui atividade contra a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído.

Dessa forma, observa-se que XAC0354, assim como suas homólogas já caracterizadas, é uma aldeído desidrogenase que atua sobre múltiplos substratos aromáticos. Entretanto, seu perfil de especificidade com os substratos analisados apresenta particularidades que indicam que essa enzima possui adaptações moleculares divergentes de suas homólogas de função conhecida. Além disso, como nos nossos ensaios não se observaram valores de $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{0,5}^{\text{app}}$ da ordem de 10^6 ou superior, como observado para algumas homólogas atuando sobre seus substratos preferenciais. Sendo assim, a ampliação do painel de substratos testados talvez seja necessária para se ter uma visão mais abrangente sobre a especificidade de substratos de XAC0354.

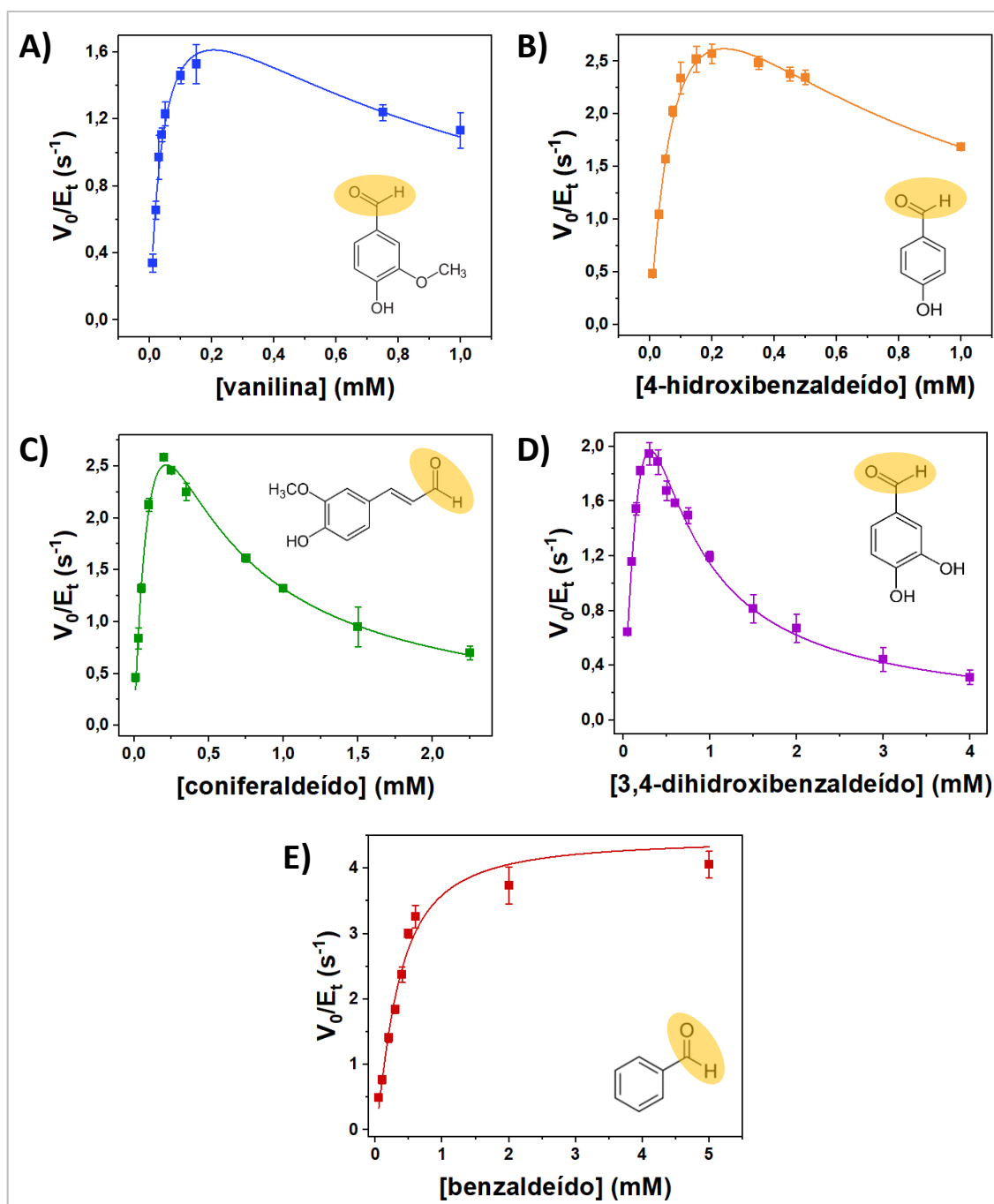


Figura 37. Cinética enzimática de XAC0354 com diferentes substratos. As curvas foram obtidas utilizando 5 mM de NAD^+ e diferentes concentrações de substrato. (V_0 =velocidade inicial; E_t =concentração de enzima). Pontos representam a média de triplicatas, com desvio padrão indicado por barras verticais. Linhas representam o *fit* dos dados com o modelo de inibição pelo substrato (exceto para o benzaldeído; modelo de Hill). As fórmulas moleculares dos substratos são apresentadas e elipses amarelas destacam o grupo aldeído que é oxidado a ácido carboxílico pela enzima.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesse trabalho conseguimos confirmar a hipótese inicial de que XAC0353 e XAC0354 codificam desidrogenases com funções bioquímicas que as permitem atuar em série em vias periféricas do catabolismo de aromáticos derivados da lignina, oxidando uma variedade de compostos oriundos das subunidades do tipo G e H que compõem esse biopolímero. Dos substratos testados, XAC0353 oxida preferencialmente álcool coniferílico, e com gradativa menor especificidade os álcoois 4-hidroxibenzílico ~ vanílico > benzílico, gerando como produtos coniferaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, e benzaldeído, respectivamente. XAC0354 é capaz de oxidar todos eles nos respectivos ácidos, apresentando maior especificidade para vanilina ~ 4-hidroxibenzaldeído > coniferaldeído > benzaldeído (~ 3,4-hidroxibenzaldeído). Para ambas as enzimas, a presença dos grupo 4-hidroxila no substrato parece ter um papel importante na afinidade. Como a enzima codificada pelo gene XAC0353 apresentou alta especificidade pelo álcool coniferílico, sugerimos que ela seja renomeada para álcool coniferílico desidrogenase (*XacCADH1*). Dada a variedade de substratos que a enzima codificada por XAC0354 reconhece e metaboliza com semelhante especificidade, sugerimos que ela seja renomeada para aril aldeído desidrogenase (*XacALDH1*). A multi-especificidade que *XacALDH1* apresenta favorece a sua exploração e otimização através de abordagens de engenharia enzimática e evolução dirigida.

Além de revelar a função bioquímica dessas enzimas, os dados cinéticos aqui apresentados podem ser úteis para a simulação de fluxos metabólicos naturais ou em microrganismos racionalmente modificados com a inserção desses genes. Eles também revelam que essas enzimas podem ser inibidas acima de uma dada concentração de seus substratos, principalmente os preferenciais, o que pode servir de mecanismo regulatório de suas funções na bactéria.

Na parte estrutural, conseguimos avançar no entendimento da estrutura quaternária de XAC0353 e XAC0354. Interessantemente, nossos resultados indicam que XAC0353 forma dodecâmeros em solução que podem se dissociar em oligômeros menores, sendo essa transição fortemente influenciada pela composição do meio. Mais estudos serão necessários para melhor entender os mecanismos que regulam essa transição. XAC0354 apresentou um equilíbrio dinâmico entre trímeros/dímeros e monômeros que, quando deslocado para a forma monomérica, reduz consideravelmente a atividade enzimática. Estudos futuros serão realizados para avaliar se esse equilíbrio é

uma característica intrínseca dessa enzima ou pode ter influência da presença da cauda de histidinas presente na construção.

A partir dos resultados obtidos, esse trabalho amplia a compreensão sobre a diversidade de estratégias moleculares disponíveis na natureza para a bioconversão de lignina, melhora o entendimento sobre o catabolismo de aromáticos em *Xanthomonas*, e expande o portfólio de enzimas caracterizadas com potencial aplicação para valorização da lignina. Nos próximos projetos do grupo, a elucidação da estrutura dessas enzimas será contemplada com o objetivo de compreender a relação estrutura-função dessas enzimas, desvendar os mecanismos moleculares que regem a especificidade de substratos/co-substratos, e gerar conhecimento instrumental para a engenharia enzimática e metabólica de plataformas microbianas para a bioconversão da lignina em produtos de interesse industrial. Assim, pretendemos contribuir ainda mais com o fortalecimento das bases do conhecimento que apoiam a transição, cada vez mais urgente, de tecnologias baseadas em fósseis para tecnologias de base renovável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achterholt, S., Priefert, H., & Steinbüchel, A. (1998). Purification and characterization of the coniferyl aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. strain HR199 and molecular characterization of the gene. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4387-4391.
- Anderson, B. M., & Anderson, C. D. (1963). The effect of buffers on nicotinamide adenine dinucleotide hydrolysis. *J Biol Chem*, 238, 1475-1478.
- Anton, B. P., Fomenkov, A., Raleigh, E. A., & Berkmen, M. (2016). Complete genome sequence of the engineered *Escherichia coli* SHuffle strains and their wild-type parents. *Genome announcements*, 4(2), e00230-16.
- Balgir, P. P., & Kalra, D. (2014). Domain Analysis and Isolation of Coniferyl Alcohol Dehydrogenase Gene from *Pseudomonas nitroreducens* Jin1. *Biotechnology Journal International*, 684-695.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of botany*, 115(7), 1053-1074.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M. T., Petit-Conil, M., ... & Boerjan, W. (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant physiology*, 112(4), 1479-1490.
- Beckham, G. T., Johnson, C. W., Karp, E. M., Salvachúa, D., & Vardon, D. R. (2016). Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Current opinion in biotechnology*, 42, 40-53.
- Blaise, M., Van Wyk, N., Banères-Roquet, F., Guérardel, Y., & Kremer, L. (2017). Binding of NADP⁺ triggers an open-to-closed transition in a mycobacterial FabG β -ketoacyl-ACP reductase. *Biochemical Journal*, 474(6), 907-921.
- Böhm, G., Muhr, R., & Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 191-195.
- Boivin, S., Kozak, S., & Meijers, R. (2013). Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein expression and purification*, 91(2), 192-206.
- Buchan, A., Neidle, E. L., & Moran, M. A. (2004). Diverse organization of genes of the β -ketoacid pathway in members of the marine *Roseobacter* lineage. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1658-1668.
- Buchan, D. W., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. *Nucleic acids research*, 47(W1), W402-W407.
- Burgess-Brown, N. A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., & Gileadi, O. (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein expression and purification*, 59(1), 94-102.

- Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, S., Hofmann, J., Koblitz, J., Schomburg, I., ... & Schomburg, D. (2021). BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D498-D508.
- Coitinho, J. B., Costa, D. M. A., Guimaraes, S. L., de Góes, A. M., & Nagem, R. A. P. (2012). Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(1), 93-97.
- Coitinho, J. B., Pereira, M. S., Costa, D. M., Guimarães, S. L., Araújo, S. S., Hengge, A. C., ... & Nagem, R. A. (2016). Structural and kinetic properties of the aldehyde dehydrogenase NahF, a broad substrate specificity enzyme for aldehyde oxidation. *Biochemistry*, 55(38), 5453-5463.
- da Silva, A. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., ... & Kitajima, J. P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417(6887), 459-463.
- del Río, J. C., Lino, A. G., Colodette, J. L., Lima, C. F., Gutiérrez, A., Martínez, Á. T., ... & Rencoret, J. (2015). Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy*, 81, 322-338.
- Ding, W., Si, M., Zhang, W., Zhang, Y., Chen, C., Zhang, L., ... & Shen, X. (2015). Functional characterization of a vanillin dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific reports*, 5(1), 1-7.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). *Protein expression and purification*, 37(1), 203-206.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6(7), 1948-1954.
- Festa, R. A., & Thiele, D. J. (2011). Copper: an essential metal in biology. *Current Biology*, 21(21), R877-R883.
- Fleige, C., Hansen, G., Kroll, J., & Steinbüchel, A. (2013). Investigation of the *Amycolatopsis* sp. Strain ATCC 39116 Vanillin Dehydrogenase and Its Impact on the Biotechnical Production of Vanillin. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 81-90.
- Gao, K., Oerlemans, R., & Groves, M. R. (2020). Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophysical reviews*, 12(1), 85-104.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). The Proteomics Protocols Handbook: Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.

- Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Hanson, C. A., Santee, C. A., Bradford, M. A., Treseder, K. K., ... & Brodie, E. L. (2011). Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in microbiology*, 2, 94.
- Gosling, A., Zachariou, M., & Straffon, M. (2008). Purification and characterisation of a 4-hydroxy benzaldehyde dehydrogenase cloned from *Acinetobacter baylyi*. *Enzyme and microbial technology*, 43(6), 417-422.
- Halavaty, A. S., Rich, R. L., Chen, C., Joo, J. C., Minasov, G., Dubrovskaya, I., ... & Anderson, W. F. (2015). Structural and functional analysis of betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(5), 1159-1175.
- Hedlund, J., Jörnvall, H., & Persson, B. (2010). Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC bioinformatics*, 11(1), 1-16.
- Held, P. (2007). Determination of NADH Concentrations with the Synergy TM 2 Multi-Detection Microplate Reader using Fluorescence or Absorbance. BioTek, (1), 6. Retrieved from http://www.biotek.com/resources/docs/NADH_App_Note.pdf
- Jaeger, E., Eggeling, L., & Sahm, H. (1981). Partial purification and characterization of a coniferyl alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis*. *Current Microbiology*, 6(6), 333-336.
- Jancarik, J., Pufan, R., Hong, C., Kim, S. H., & Kim, R. (2004). Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(9), 1670-1673.
- Jiménez, D. J., de Lima Brossi, M. J., Schückel, J., Kračun, S. K., Willats, W. G. T., & van Elsas, J. D. (2016). Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics-and metasecretomics-based approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(24), 10463-10477.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology*, 292(2), 195-202.
- Jones, R. M., Collier, L. S., Neidle, E. L., & Williams, P. A. (1999). areABC genes determine the catabolism of aryl esters in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Journal of bacteriology*, 181(15), 4568-4575.
- Kabsch, W. (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), 133-144.
- Kärkäs, M. D., Matsuura, B. S., Monos, T. M., Magallanes, G., & Stephenson, C. R. (2016). Transition-metal catalyzed valorization of lignin: the key to a sustainable carbon-neutral future. *Organic & biomolecular chemistry*, 14(6), 1853-1914.

- Karp, P. D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C. A., Latendresse, M., Kothari, A., ... & Subhraveti, P. (2017). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1085-1093.
- Kern, H. W. (1984). Bacterial degradation of dehydropolymers of coniferyl alcohol. *Archives of microbiology*, 138(1), 18-25.
- Kern, H. W., & Kirk, T. K. (1987). Influence of molecular size and ligninase pretreatment on degradation of lignins by *Xanthomonas* sp. strain 99. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), 2242-2246.
- Kern, H. W., Webb, L. E., & Eggeling, L. (1984). Characterization of a Ligninolytic Bacterial Isolate: Taxonomic Relatedness and Oxidation of Some Lignin. Related Compounds. *Systematic and applied microbiology*, 5(4), 433-447.
- Kohlstedt, M., Starck, S., Barton, N., Stolzenberger, J., Selzer, M., Mehlmann, K., ... & Wittmann, C. (2018). From lignin to nylon: cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metabolic engineering*, 47, 279-293.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein science*, 27(1), 129-134.
- Lerchner, A., Jarasch, A., Meining, W., Schiefner, A., & Skerra, A. (2013). Crystallographic analysis and structure-guided engineering of NADPH-dependent *Ralstonia* sp. Alcohol dehydrogenase toward NADH cosubstrate specificity. *Biotechnology and bioengineering*, 110(11), 2803-2814.
- Li, X., Romero, P., Rani, M., Dunker, A. K., & Obradovic, Z. (1999). Predicting protein disorder for N-, C-and internal regions. *Genome Informatics*, 10, 30-40.
- Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., ... & Adams, P. D. (2019). Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(10), 861-877.
- Linger, J. G., Vardon, D. R., Guarnieri, M. T., Karp, E. M., Hunsinger, G. B., Franden, M. A., ... & Beckham, G. T. (2014). Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12013-12018.
- Liu, Z. H., Le, R. K., Kosa, M., Yang, B., Yuan, J., & Ragauskas, A. J. (2019). Identifying and creating pathways to improve biological lignin valorization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105, 349-362.
- Livingstone, A., Fewson, C. A., Kennedy, S. I. T., & Zatman, L. J. (1972). Two benzaldehyde dehydrogenases in bacterium NCIB 8250. Distinguishing properties and regulation. *Biochemical Journal*, 130(4), 927-935.

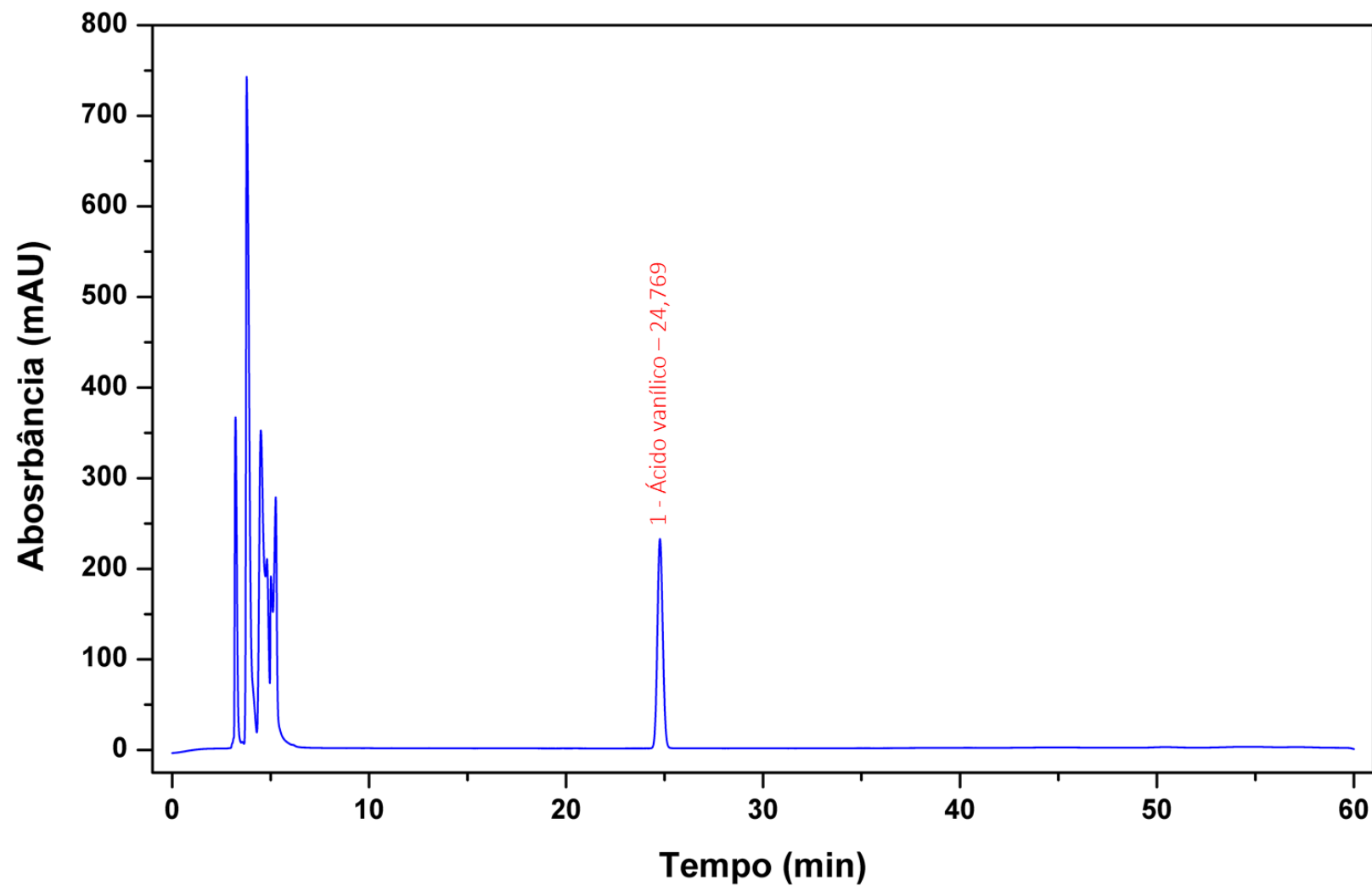
- MacKintosh, R. W., & Fewson, C. A. (1988a). Benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase II from *Acinetobacter calcoaceticus*. Purification and preliminary characterization. *Biochemical Journal*, 250(3), 743-751.
- MacKintosh, R. W., & Fewson, C. A. (1988b). Benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase II from *Acinetobacter calcoaceticus*. Substrate specificities and inhibition studies. *Biochemical Journal*, 255(2), 653.
- Macrae, R., Robinson, R. K., & Sadler, M. J. (1993). Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition.
- Mallinson, S. J., Machovina, M. M., Silveira, R. L., Garcia-Borràs, M., Gallup, N., Johnson, C. W., ... & McGeehan, J. E. (2018). A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., & Storoni, L. C. 524 Read RJ. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 525(40), 658-674.
- Mokhonov, V. V., Vasilenko, E. A., Gorshkova, E. N., Astrakhantseva, I. V., Novikov, D. V., & Novikov, V. V. (2018). SlyD-deficient *Escherichia coli* strains: A highway to contaminant-free protein extraction. *Biochemical and biophysical research communications*, 499(4), 967-972.
- Nakamura, S., Oda, M., Kataoka, S., Ueda, S., Uchiyama, S., Yoshida, T., ... & Ohkubo, T. (2006). Apo-and holo-structures of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. B-0831: Loop-helix transition induced by coenzyme binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31876-31884.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., & Hara, A. (1997). Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2218-2222.
- Nishimura, M., Kohno, K., Nishimura, Y., Inagaki, M., & Davies, J. (2011). Characterization of two isozymes of coniferyl alcohol dehydrogenase from *Streptomyces* sp. NL15-2K. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(9), 1770-1777.
- Odier, E., & Monties, B. (1978). Biodégradation de la lignine de ble par. *Xanthomonas* 23, *Ann. Microbiol.*, 129, 361.
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., ... & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, 44(D1), D733-D745.
- Overhage, J., Priefert, H., & Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4837-4847.

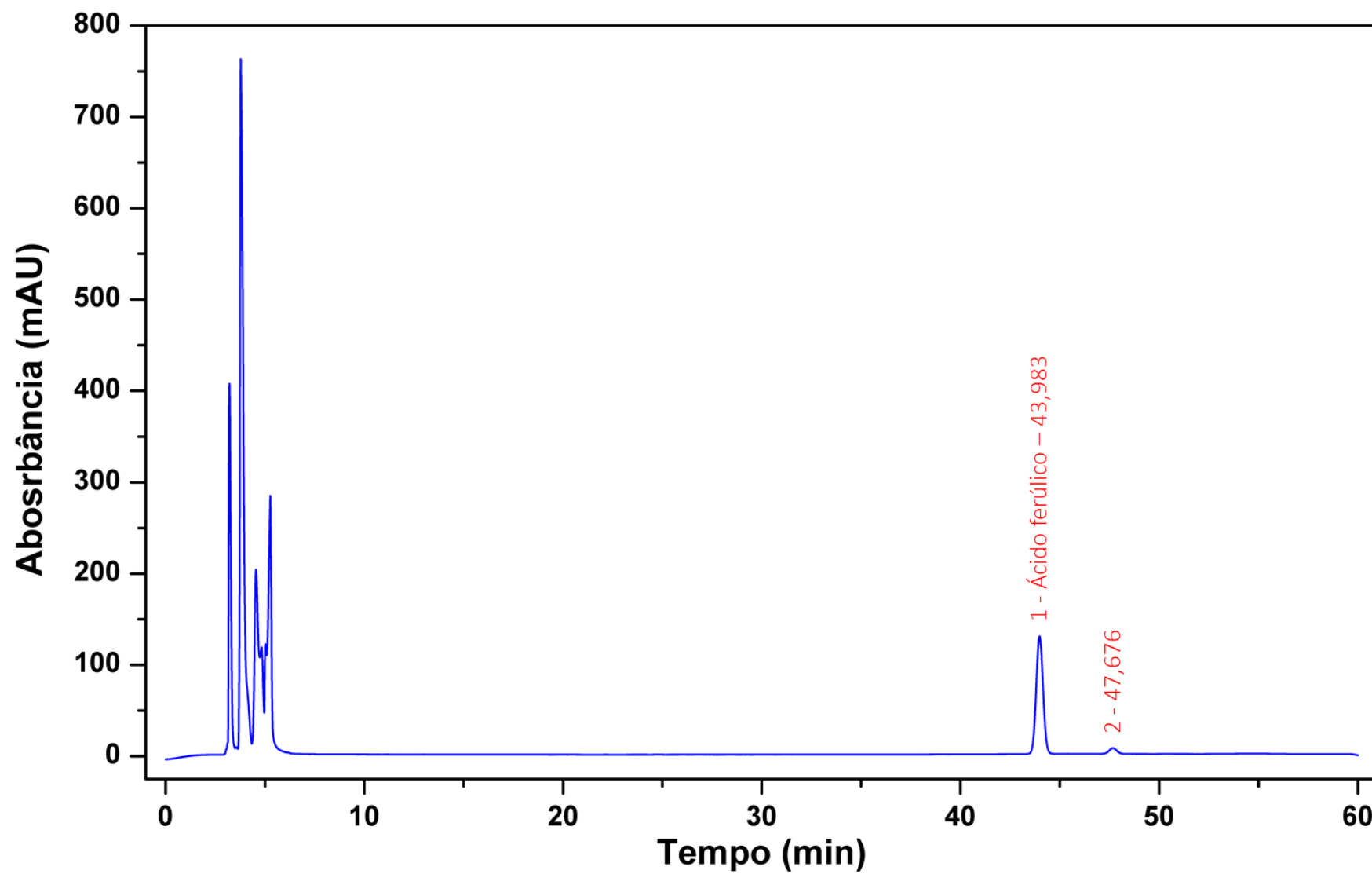
- Overhage, J., Steinbüchel, A., & Priefert, H. (2002). Biotransformation of eugenol to ferulic acid by a recombinant strain of *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4315-4321.
- Pomar, F., Caballero, N., Pedreño, M. A., & Ros Barceló, A. (2002). H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS letters*, 529(2-3), 198-202.
- Prilusky, J., Felder, C. E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E. H., Man, O., Beckmann, J. S., ... & Sussman, J. L. (2005). FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, 21(16), 3435-3438.
- 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(2), 209-214.
- Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J. P., & Piña, E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European journal of biochemistry*, 270(16), 3309-3334.
- Ruddock, L. W., & Klappa, P. (1999). Oxidative stress: Protein folding with a novel redox switch. *Current biology*, 9(11), R400-R402.
- Sattler, S. E., Saathoff, A. J., Haas, E. J., Palmer, N. A., Funnell-Harris, D. L., Sarath, G., & Pedersen, J. F. (2009). A nonsense mutation in a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the sorghum brown midrib6 phenotype. *Plant physiology*, 150(2), 584-595.
- Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C. D., Marsden, B. D., Mahajan, P., Burgess-Brown, N. A., & Gileadi, O. (2010). High-throughput production of human proteins for crystallization: the SGC experience. *Journal of structural biology*, 172(1), 3-13.
- SBGrid Consortium. (2021). Supported applications XDSEGUI. Retrieved March 19, 2021, from <https://sbgrid.org/software/titles/xdsegui>
- Schoenherr, S., Ebrahimi, M., & Czermak, P. (2018). Lignin degradation processes and the purification of valuable products. *Lignin-Trends and Applications*.
- Shaw, J. P., & Harayama, S. (1990). Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *European journal of biochemistry*, 191(3), 705-714.
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W244-W248.
- Spinozzi, F., Mariani, P., Mičetić, I., Ferrero, C., Pontoni, D., & Beltramini, M. (2012). Quaternary structure heterogeneity of oligomeric proteins: a SAXS and SANS study of the dissociation products of *Octopus vulgaris* hemocyanin. *PloS one*, 7(11), e49644.

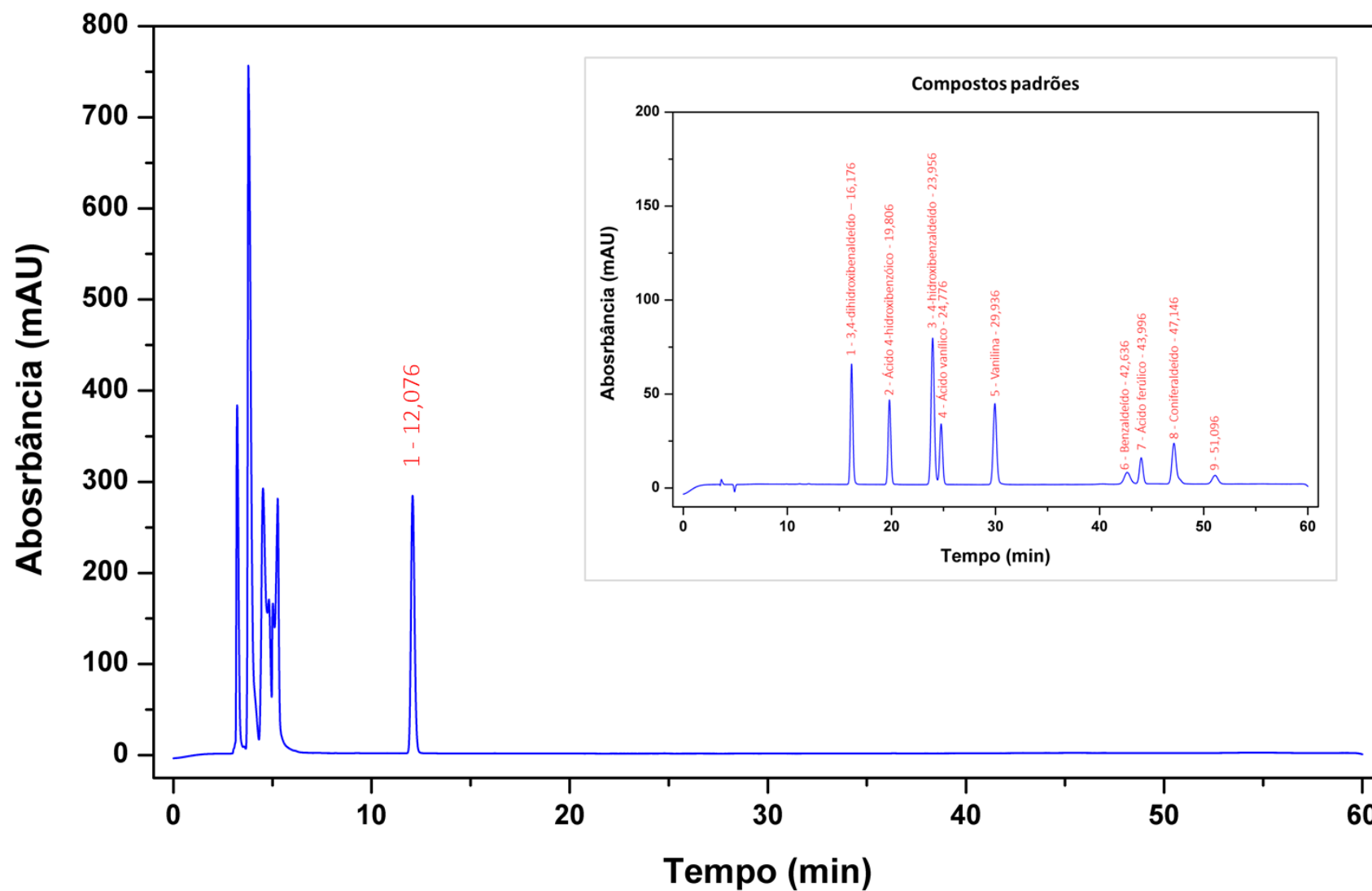
- Steinbuchel, A., Priefert, H., & Rabenhorst, J. (2003). (12) *Patent Application Publication* (10) Pub . No.: US 2003 / 0124222 A1 *Patent Application Publication*. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US20030228670A1/en>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8(4), 409-427.
- Sumares, J. A., Morão, L. G., Martins, P. M., Martins, D. A., Gomes, E., Belasque Jr, J., & Ferreira, H. (2016). Temperature stress promotes cell division arrest in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Microbiologyopen*, 5(2), 244-253.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211-222.
- Vanini, M. M. T., Spisni, A., Sforça, M. L., Pertinhez, T. A., & Benedetti, C. E. (2008). The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein–protein interaction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(4), 2051-2064.
- Venkatasubramanian, P., Daniels, L., Das, S., Lamm, A. S., & Rosazza, J. P. (2008). Aldehyde oxidoreductase as a biocatalyst: reductions of vanillic acid. *Enzyme and microbial technology*, 42(2), 130-137.
- Wang, J. Y., Zhou, L., Chen, B., Sun, S., Zhang, W., Li, M., ... & He, Y. W. (2015). A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity. *Scientific reports*, 5(1), 1-13.
- William, F., & Mahadevan, A. (1980). Degradation of aromatic compounds by *Xanthomonas* species/Abbau aromatischer Verbindungen durch *Xanthomonas*-Arten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 738-744.
- Woestenenk, E. A., Hammarström, M., van den Berg, S., Härd, T., & Berglund, H. (2004). His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *Journal of structural and functional genomics*, 5(3), 217-229.
- Wyman, C. E., & Ragauskas, A. J. (2015). Lignin bioproducts to enable biofuels. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 9(5).
- Wyrambik, D., & Grisebach, H. (1975). Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. *European Journal of Biochemistry*, 59(1), 9-15.
- Xu, Z., Lei, P., Zhai, R., Wen, Z., & Jin, M. (2019). Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 1-19.
- Zahniser, M. P., Prasad, S., Kneen, M. M., Kreinbring, C. A., Petsko, G. A., Ringe, D., & McLeish, M. J. (2017). Structure and mechanism of benzaldehyde dehydrogenase

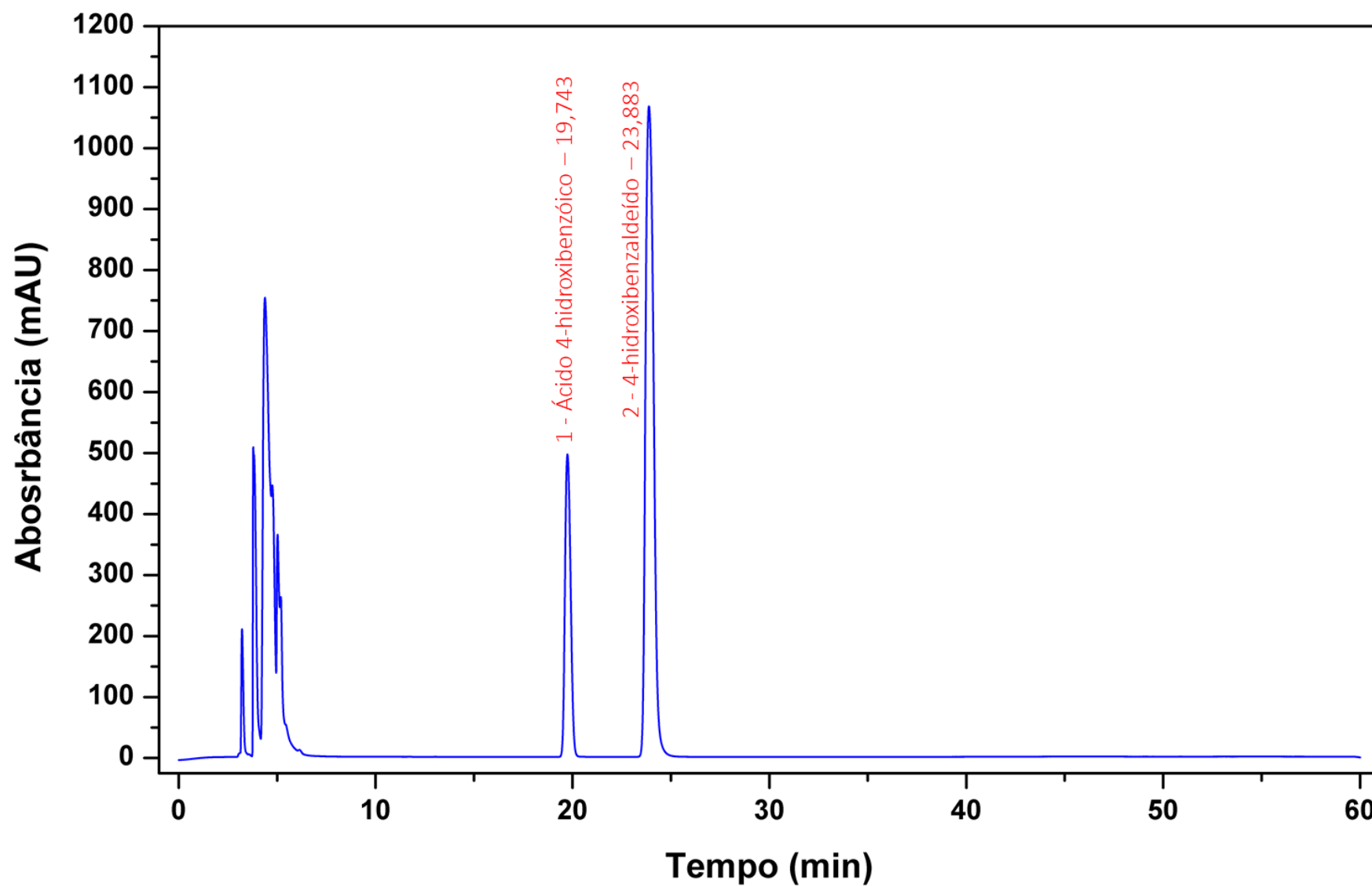
from *Pseudomonas putida* ATCC 12633, a member of the Class 3 aldehyde dehydrogenase superfamily. *Protein Engineering, Design and Selection*, 30(3), 273-280.

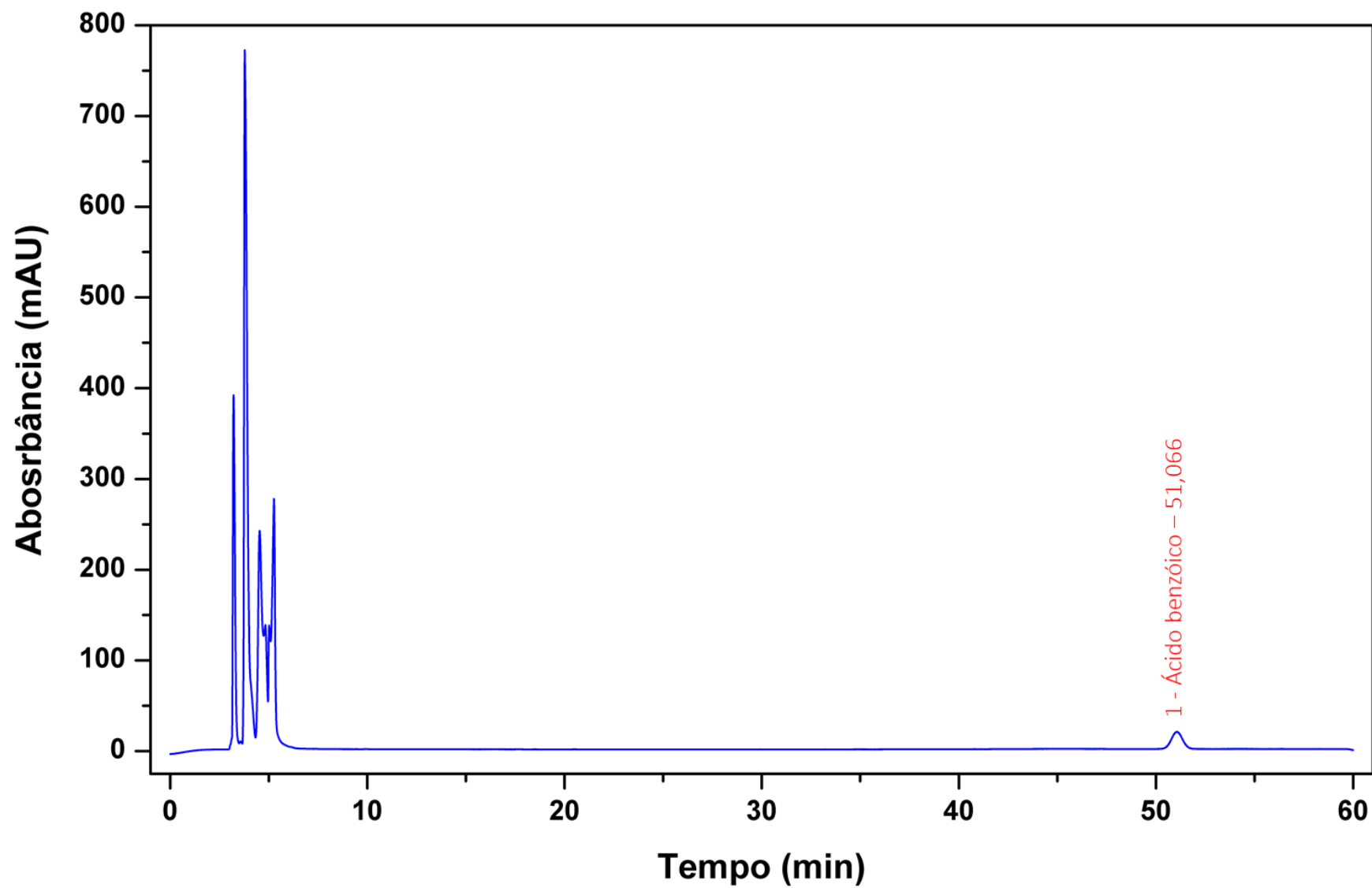
Zaworski, P. G., & Gill, G. S. (1988). Precipitation and recovery of proteins from culture supernatants using zinc. *Analytical biochemistry*, 173(2), 440-444.

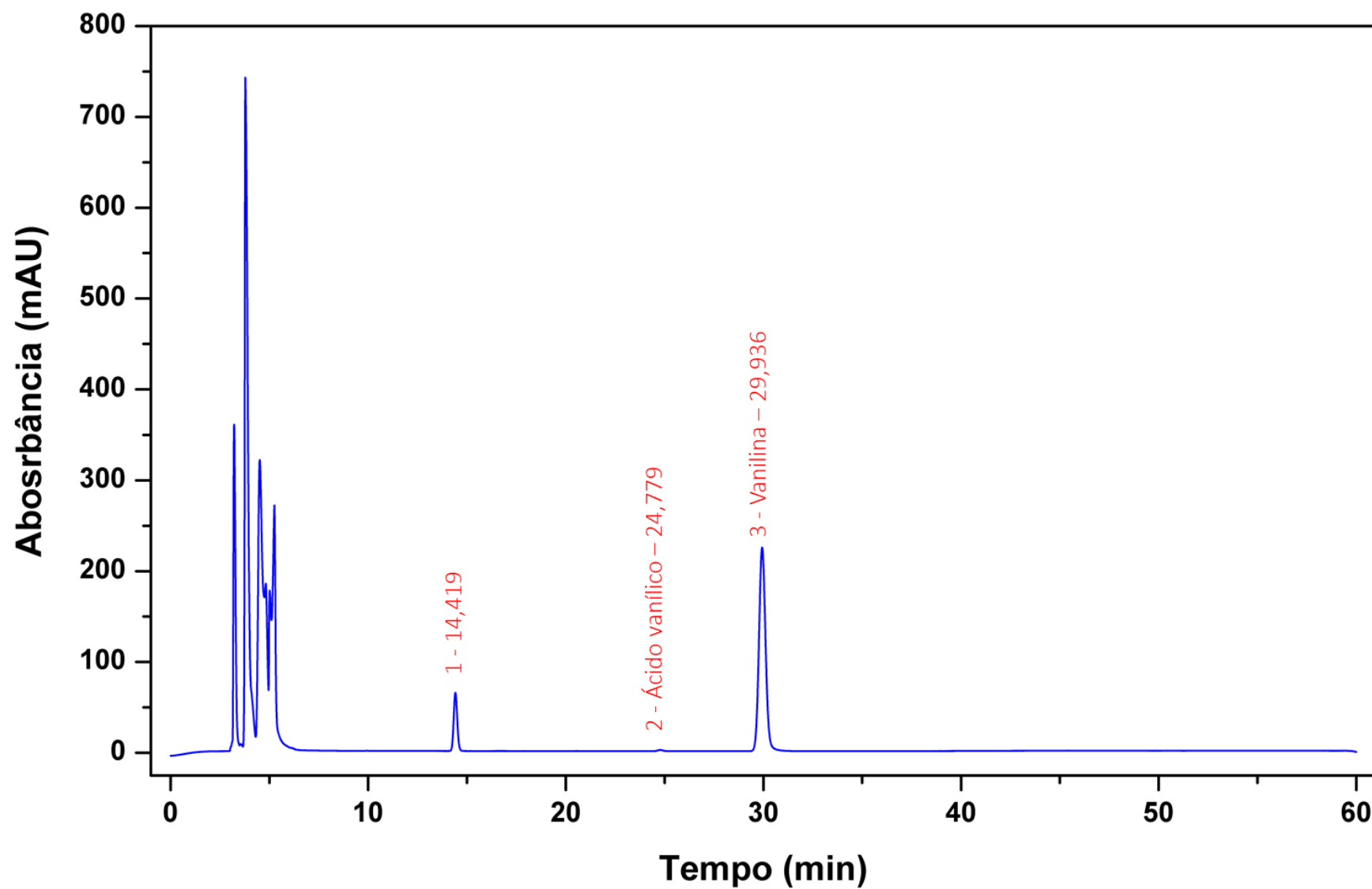
ANEXO 1 : IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS POR HPLC**XAC0354 – Substrato: vanilina/Produto: ácido vanílico**

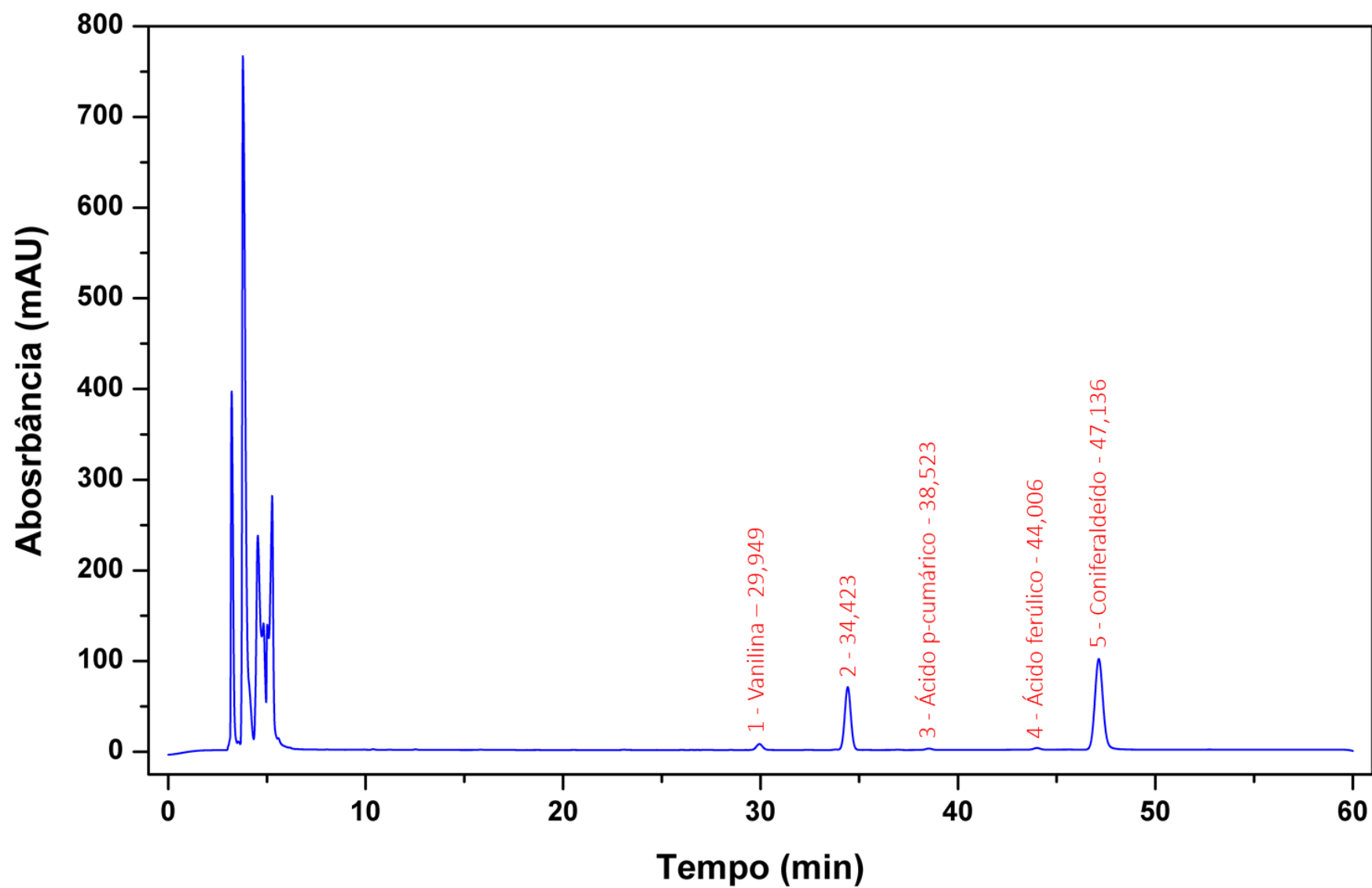
XAC0354 – Substrato: coniferaldeído/Produto: ácido ferúlico

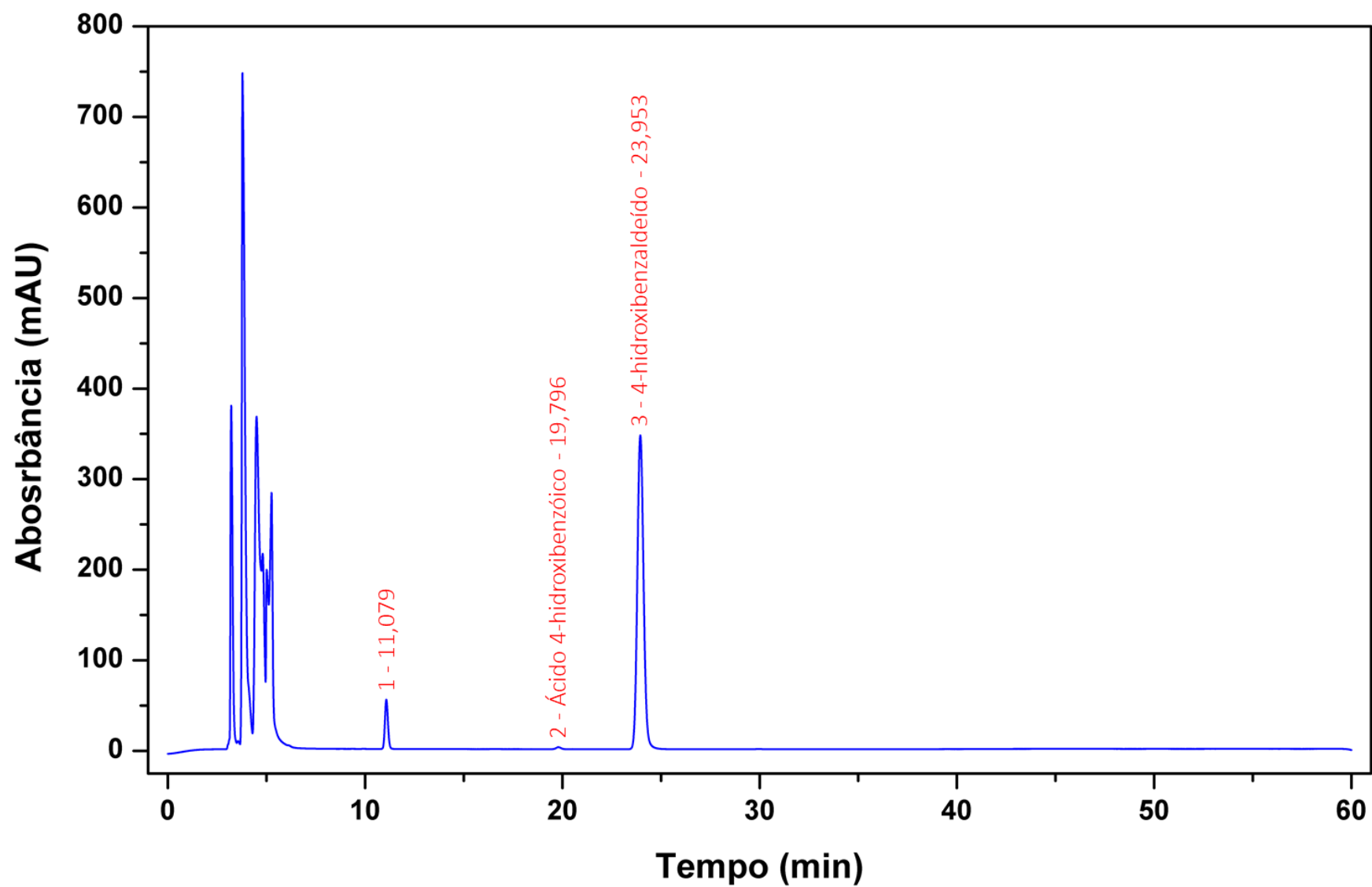
XAC0354 – Substrato: 3,4-dihidroxibenzaldeído/Produto: ác. 3,4-dihidroxibenzóico

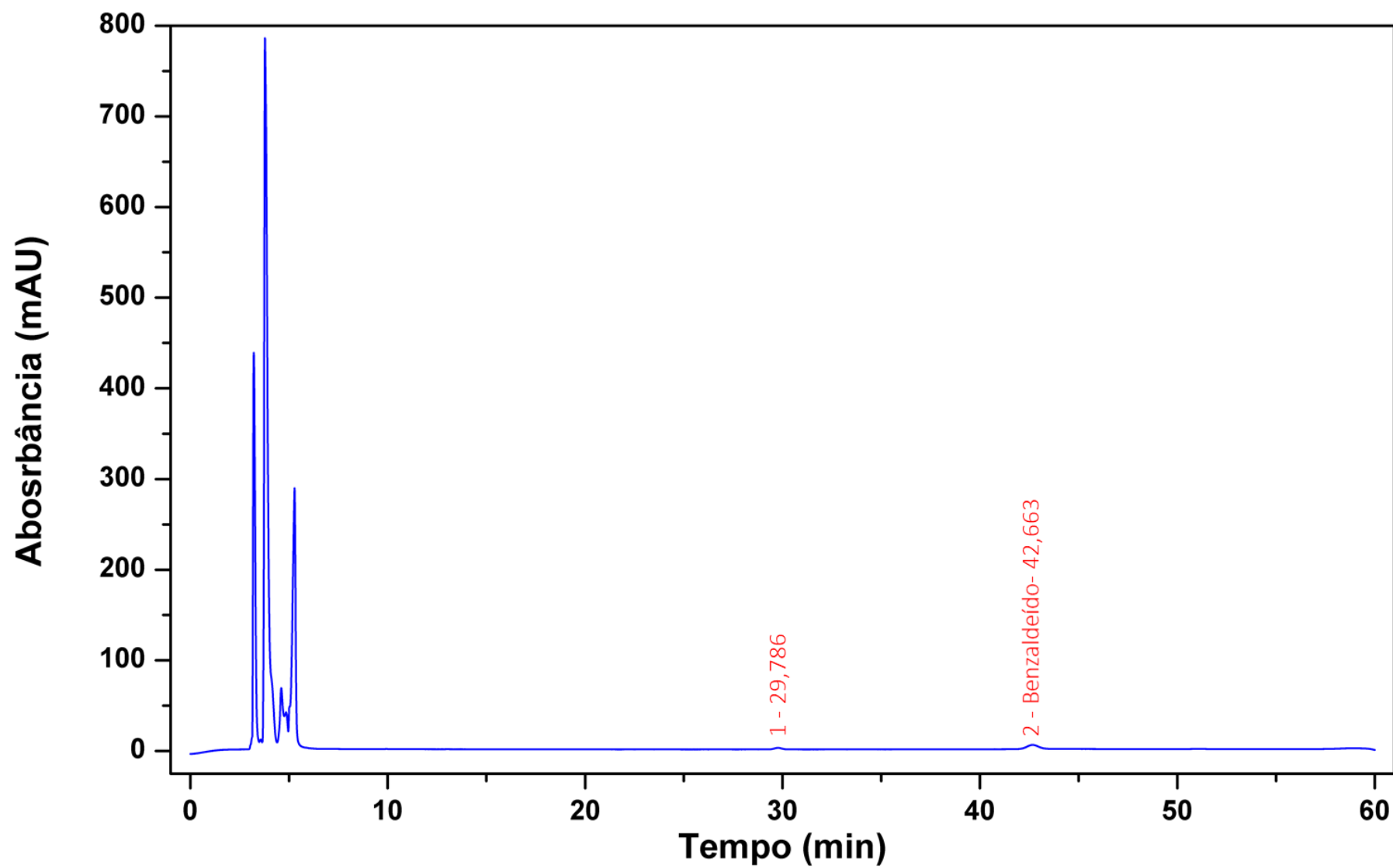
XAC0354 – Substrato: 4-hidroxibenzaldeído/Produto: ác. 4-hidroxibenzóico

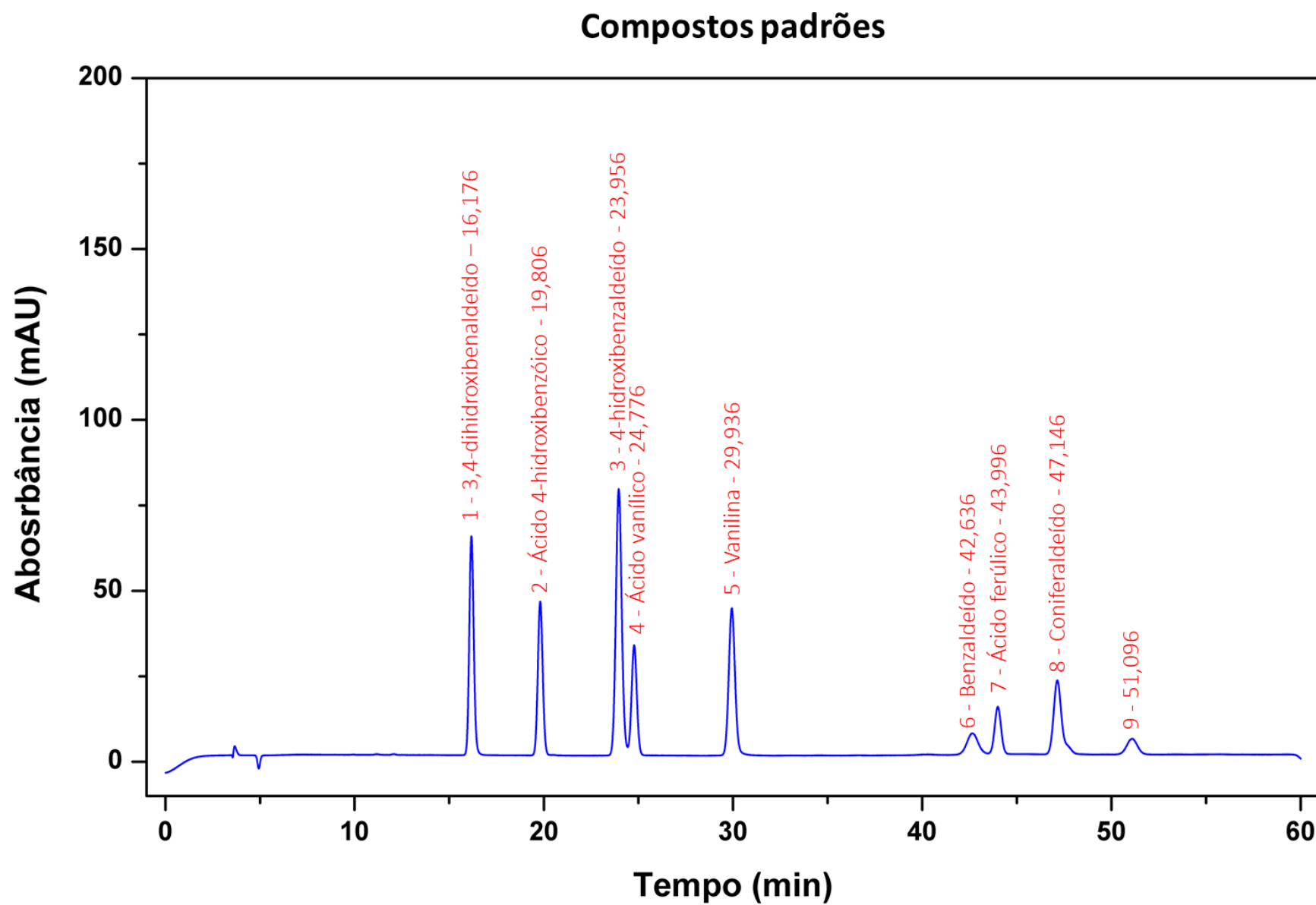
XAC0354 – Substrato: benzaldeído/Produto: ácido benzóico

XAC0353 – Substrato: álcool vanílico/Produto: vanilina

XAC0353 – Substrato: álcool coniferílico/Produto: coniferaldeído

XAC0353 – Substrato: ál. 4-hidroxibenzílico/Produto: 4-hidroxibenzaldeído

XAC0353 – Substrato: álcool benzílico/Produto: benzaldeído



ANEXO 2: TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2019-07

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: Investigação das rotas metabólicas utilizadas por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* para a utilização de compostos aromáticos derivados da lignina

2. Pesquisador responsável: Priscila Oliveira de Giuseppe

3. Experimentador(es):

Damaris Batião Martin, Anna Julyana Brilhante, Douglas Antonio Alvaredo Paixão

Nível do treinamento do experimentador: ☐ Iniciação científica, ☐ [AJB]-mestrado, ☐ [DBM]-doutorado, ☐ [doutorado direto], ☐ [pós-doutorado], ☐ [nível técnico], ☐ [DAAP]-outro, especifique: especialista

4. Unidade operativa: ☐ LNLS ☐ LNNano ☒ CTBE ☐ LNBio

5. Maior Classe de risco de OGM deste projeto: ☒ Risco I ☐ Risco II ☐ Risco III ☐ Risco IV

6. O projeto é confidencial? ☒ não ☐ sim

7. No caso de projeto confidencial, o título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? ☐ não ☐ sim

8. Qual é o objetivo do projeto? os objetivos desse projeto consistem em (1) avaliar a capacidade da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* cepa 306, também chamada de *Xanthomonas citri* susp. *citri* cepa 306, de utilizar compostos aromáticos derivados da lignina como fonte de carbono, (2) avaliar quais vias metabólicas são ativadas por esses compostos, (3) identificar as enzimas chaves desse processo, (4) caracterizar a estrutura e função de enzimas de função desconhecida que participem dessas vias.

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM. (1) *X. citri* 306 KO1, risco I, (2) *X. citri* 306 KO2, (3) Ecoli-XAC0353, *E. coli*, *X. citri* 306, XAC0353, risco I (4) Ecoli-XAC0354, *E. coli*, *X. citri* 306, XAC0354, risco I.

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM: (1) deleção do gene XAC0352, potencial transportador de compostos aromáticos, (2) deleção dos genes XAC0353-XAC0354 para validação da via de degradação de compostos aromáticos. (3 e 4) expressão heteróloga de genes para purificação das enzimas e caracterização bioquímica e estrutural por cristalografia de raios-X.

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? Não.

12. Algum OGM é agente patogênico esporulante? ☒ Não ☐ Sim: _____

13. Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar? ☒ Não ☐ Sim: _____

14. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva. Os OGMs 2 e 3 apresentam resistência ao antibiótico canamicina. Nenhum transgene confere infectividade ou patogenicidade ao organismo receptor.

15. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma avaliação médica periódica para experimentadores? ☒ Não ☐ Sim. Que tipo de avaliação? (Ex: consulta com médico, exames laboratoriais etc...) Qual periodicidade? Onde será realizada esta avaliação?

16. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma vacinação preventiva para experimentadores? ☒ Não ☐ Sim. Qual periodicidade? Onde será realizada esta vacinação?

17. No caso de uma eventual contaminação com organismos patogênicos ou toxinas, descreva medidas emergenciais para tratamento de pessoas envolvidas, descontaminação de equipamentos, instalações e meio ambiente.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2019-07

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

18. Projetos que façam uso de organismos ou genes associados ao patrimônio genético brasileiro precisam de cadastro na plataforma SISGEN (www.sisgen.gov.br). É de total responsabilidade do pesquisador responsável esse cadastramento e cumprimento da legislação. O projeto envolve manipulação, transferência, modificação, armazenamento, coleta de Organismos e derivados relativos ao patrimônio genético brasileiro? (X) SIM, () Não. No caso de responder sim, mencionar a seguir quais os códigos de acesso do cadastro no SISGEN: A8702DF

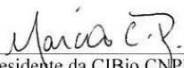
O pesquisador principal tem conhecimento de que conforme a RDC 50 de 21/02/2002 da Anvisa, é responsável por determinar a classificação de riscos de seu projeto, assim como determinar EPIs e medidas de segurança necessárias para prevenir a contaminação de experimentadores, equipamentos, instalações, terceiros e meio ambiente. O pesquisador responsável também precisará providenciar rotina para realização de exames médicos e laboratoriais para sua equipe, bem como vacinações quando aplicável. Todos os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados pelo pesquisador principal, que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

Assinatura eletrônica do pesquisador responsável:

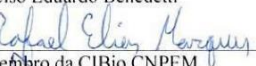
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 6/5/2019.

Parecer final: ☒ -projeto aprovado, [] -projeto recusado, [] -projeto com deficiências.

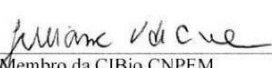
comentários da CIBio:

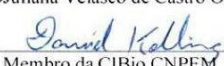

Presidente da CIBio CNPEM
Marcio Chaim Bajgelman

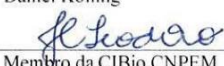

Membro da CIBio CNPEM
Celso Eduardo Benedetti

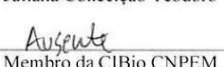

Membro da CIBio CNPEM
Rafael Elias Marques Pereira Silva


Membro da CIBio CNPEM
Douglas Galante


Membro da CIBio CNPEM
Juliana Velasco de Castro Oliveira


Membro da CIBio CNPEM
Daniel Kolling


Membro da CIBio CNPEM
Juliana Conceição Teodoro


Membro da CIBio CNPEM
Diego Stefani Teodoro Martinez

ANEXO 3: CERTIDÃO DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A8702DF

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A8702DF**
 Usuário: **CNPEM**
 CPF/CNPJ: **01.576.817/0001-75**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Xanthomonas axonopodis pv citri

Título da Atividade: **Investigação das rotas metabólicas utilizadas por Xanthomonas axonopodis pv citri para a utilização de compostos aromáticos derivados da lignina**

Equipe

Priscila Oliveira de Giuseppe	CNPEM
Gabriela Felix Persinoti	CTBE
Douglas Antonio Alvaredo Paixão	CTBE
Anna Julyana Brilhante	CTBE
Damaris Batião Martim	CTBE
Augusto Rodrigues Lima	CNPEM
Barbara Carvalho dos Reis	CNPEM

Data do Cadastro: **10/04/2019 10:05:08**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:46** de **24/03/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

**ANEXO 4: DECLARAÇÃO DE QUE A DISSERTAÇÃO OU TESE
NÃO INFRINGE OS DISPOSITIVOS DA LEI Nº 9610/98, NEM O
DIREITO AUTORAL DE QUALQUER EDITORA**

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE ENZIMAS DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV CITRI* POTENCIALMENTE UTILIZADAS PARA O CATABOLISMO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS DERIVADOS DA LIGNINA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 17 de agosto de 2021.

Assinatura : Anna Julyana Viana Chianca Brilhante
Nome do(a) autor(a): **Anna Julyana Viana Chianca Brilhante**
RG n.º 4051175

Assinatura : Priscila Ol. de Giuseppe
Nome do(a) orientador(a): **Priscila Oliveira de Giuseppe**
RG n.º 41092927-X