

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
DUAS LIPOXIGENASES DE *Shewanella woodyi*

Jhoanne Hansen

Bióloga

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
DUAS LIPOXIGENASES DE *Shewanella woodyi***

Jhoanne Hansen

Orientador: Profa.Dra. Maria Benincasa Vidotti

Coorientador: Profa. Dra. Angeles Manresa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária

Hansen, Jhoanne
H249c Clonagem, expressão e caracterização de duas lipoxigenases de
Shewanella woodyi / Jhoanne Hansen. -- Jaboticabal, 2013
v, 124 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Maria Benincasa Vidotti

Coorientadora: Angeles Manresa

Banca examinadora: Ana Claudia Barana, Vanildo Luiz Del
Bianchi, Mariana Carina Frigieri, Janete Aparecida Desiderio

Bibliografia

1. Ácido araquidônico. 2. Ácido linoleico. 3. Caracterização
enzimática. 4. Expressão de genes. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:547

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JHOANNE HANSEN – nascida em Rio das Pedras (SP), em 05 de agosto de 1985, graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no câmpus de Jaboticabal (SP) no ano de 2008. Em 2009 ingressou no curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no câmpus de Jaboticabal (SP).

“A Ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa ignorância.”

Felicité Robert de Lamennais

À Profª Drª Àngels Manresa,
pelo total apoio que me deu
ao longo de todo o doutorado,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A la Prof^a Dr^a Àngels Manresa per la co-tutoria. Per haber-me integrat al seu grup de recerca, per l'exemple d'investigador que ha estat i amb el qual em quedo com a model, per l'entusiasme amb que treballa i que em contagiava en els meus moments de desànim. Per tot el que he après amb ella de tècniques i de ciència, però també d'aspectes humans de la vida (les més importants i les que portaré sempre amb mi). Per haver cregut en la meua capacitat, i per haver-me ajudat a avançar més enllà del que li tocava professionalment. Per totes les “bronques” amb les que em va fer evolucionar tant com a investigadora com a persona. Moltíssimes gràcies!

(A Prof^a Dr^a Àngels Manresa pela co-orientação. Por ter me integrado em seu grupo de pesquisa, pelo exemplo de pesquisadora com o qual tenho como modelo, pelo entusiasmo com que trabalha e que me contagiava em meus momentos de desânimo. Por tudo que aprendi com ela de técnicas e ciência, mas também de aspectos humanos da vida (os mais importantes e que levarei sempre comigo). Por ter acreditado em minha capacidade, e por ter me ajudado profissionalmente mais do que le cabia. Por todas as “brincas” que me fizeram evoluir tanto como pesquisadora como pessoa. MUITÍSSIMO obrigada!)

A Prof^a Dr^a Maria Benincasa Vidotti pela orientação, pelo apoio, por ter acreditado em minha capacidade, pelo exemplo de dedicação, competência e ética profissional e por ter me aberto as portas para estar em um grupo de pesquisa de excelência.

A la Prof^a Dr^a Montse Busquets per l'atenció i ajuda al llarg del desenvolupament del projecte de doctorat.

(A Prof^a Dr^a Montse Busquets pela atenção e ajuda ao longo do desenvolvimento do projeto de doutorado.)

Als meus companys del Departament de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, per haver fet que aquests tres últims anys fossin menys difícils: Cesar, Nacho, Vicent, Andreu, Ariadna, Guillem, Ariadna-Tofa, Gisele, Giovanna, Danielle, Gladys, Francesca, Carla, Jonathan i Laura, gràcies per la companyia, amistat i dedicació! Per proporcionar-me un

ambient saludable i de cooperació al laboratori. Gràcies pels moments de riure, pels consells i per tota l'ajuda! Especialment a la Noelia i a la Monica, per l'amistat i suport en els meus millors i pitjors moments.

(Aos meus companheiros do Departamento de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, por terem feito com que estes últimos três anos fossem menos difíceis: Cesar, Nacho, Vicent, Andreu, Ariadna, Guillem, Ariadna-Tofa, Gisele, Giovanna, Danielle, Gladys, Francesca, Carla, Jonathan e Laura, obrigada pela companhia, amizade e dedicação! Por proporcionarem um ambiente saudável e de cooperação no laboratório. Obrigada pelos momentos de risada, pelos conselhos e por toda ajuda! Especialmente a Noelia e Monica, pela amizade e suporte nos meus melhores e piores momentos.)

A l'Albert, per tot l'ajut en l'execució del projecte i elaboració de la tesi - i per la paciència que va tenir a aguantar el meu mal humor tots aquests mesos,

(A Albert, por toda ajuda na execução do projeto e elaboração da tese – e pela paciência em aguentar meu mau-humor todos estes meses.)

As minhas amigas, as de toda uma vida e as dos últimos anos: Kokotinha, Barrosa, Danada, Cinthia, Camila, Fernanda, TchuTchu, K-quinha, Michaela, Marina, Michelle, Carol, Camila Caporale, Maira, Claudia, Margolzata, Skaiste, Michèle Smits. Em especial àquelas que foram minha família de alma em Barcelona: Graciela, Elaine e Daniela. Sem vocês eu não teria chegado até o final. Obrigada por todos os conselhos e bons momentos compartilhados!

A Karla Stropa pela ajuda no desenvolvimento de parte do projeto.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FCAV pela paciência, esclarecimento e condução nas tarefas de atendimento às normas regulamentares.

A Lucia Muñoz i Rosa López per l'ajuda em els temes administratius i burocràtics.

(A Lucia Muñoz e Rosa López pela ajuda nos temas administrativos e burocráticos.)

A Maria Jesus i Carmen, per l'ajuda tècnica i paciència com els meus centenes de material a esterilitzar.

(A Maria Jesus e Carmen, pela ajuda técnica e paciência com as centenas de material a esterilizar.)

A Prof^a Dr^a Eliana Lemos pela oportunidade de integrar um projeto de cooperação internacional.

A Prof^a Dr^a Lucia Carareto Alves e Prof^a Dr^a Marcia Mutton pela supervisão no estágio-docência realizado na FCAV.

Als professors del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitària, pels consells i col·laboració en el desenvolupament d'aquesta tesi.

(Aos professores do Departamento de Microbiologia i Parasitologia Sanitària, pelos conselhos e colaboração no desenvolvimento desta tese.)

Al Prof Dr EH Oliw (Universitat d'Uppsala, Suècia) per l'assessorament en les anàlisis químiques i estructurales.

(Ao Prof Dr EH Oliw (Universitat d'Uppsala, Suècia) pelo assessoramento nas análises químicas e estruturais.)

A minha família, que mesmo de longe – e sem entender nada do meu trabalho – me apoiou e incentivou da maneira que lhes era acessível, e sempre respeitou todas as minhas decisões. Em especial aos meus sobrinhos Marina, Diego, Alice e Felipe, que inconscientemente me ajudavam a renovar as energias e seguir adiante.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior - Capes, pelas bolsas durante a realização deste trabalho.

A la Comisió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia CIRIT i Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnologia CICYT, pel suport financer per al desenvolupament del projecte.

A Deus e todos os espíritos de luz que me acompanham.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS.....	4
3.1.1. Biotransformações microbianas.....	5
3.1.2. Biotransformação de lipídeos por microrganismos.....	8
3.2. <i>Shewanella woodyi</i>	10
3.3. LIPOXIGENASES.....	11
3.3.1. Nomenclatura.....	12
3.3.2. Mecanismos de ação das lipoxigenases.....	14
3.3.3. Funções das lipoxigenases.....	16
3.3.4. Lipoxigenases em eucariotos.....	20
3.3.5. Lipoxigenases em procariotos.....	25
3.3.6. Estudo filogenético das lipoxigenases.....	31
3.4. SISTEMAS DE CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. MICRORGANISMOS.....	36
4.2. MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	37
4.3. VETORES.....	38
4.4. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....	40
4.4.1. Extração de DNA genômico.....	40
4.4.2. Extração de DNA plasmídico.....	40
4.4.3. Desenho e síntese de oligonucleotídeos.....	41
4.4.4. Amplificação <i>in vitro</i> do DNA através de PCR.....	42
4.4.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	43
4.4.6. Purificação de DNA em bandas de gel de agarose.....	43
4.4.7. Preparação de células competentes.....	44
4.4.8. Clonagem em vetor pGemT- easy.....	44
4.4.9. Digestão dos clones positivos.....	45
4.4.10. Clonagem em vetor pET28a (+).....	45
4.5. EXPRESSÃO DE LIPOXIGENASES RECOMBINANTES E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS.....	46

4.5.1.	Sistema de indução e expressão.....	46
4.5.2.	Dosagem de proteínas.....	47
4.5.3.	Purificação parcial das enzimas recombinantes.....	47
4.5.4.	Eletroforese (SDS-PAGE).....	48
4.5.5.	Determinação da atividade enzimática – Método espectrofotométrico.	49
4.5.6.	Detecção dos produtos gerados pela transformação enzimática por cromatografia de camada delgada.....	50
4.6.	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS.....	51
4.6.1.	Atividade sobre os diferentes substratos.....	51
4.6.2.	Determinação da concentração ótima de enzima.....	51
4.6.3.	Determinação da concentração ótima de substrato.....	52
4.6.4.	Determinação do pH ótimo de reação.....	52
4.6.5.	Determinação da temperatura ótima de reação.....	52
4.6.6.	Determinação da estabilidade térmica das enzimas.....	52
4.6.7.	Influência de diferentes íons bivalentes na atividade enzimática.....	53
4.6.8.	Determinação das constantes cinéticas.....	53
4.7.	DETERMINAÇÃO DO METAL PRESENTE NO CENTRO CATALÍTICO.....	53
4.8.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS GERADOS PELA REAÇÃO ENZIMÁTICA	
4.8.1.	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)....	54
4.8.2.	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (MS-MS)...	54
4.9.	SEQUÊNCIAS DE LIPOXIGENASES UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	56
4.9.1.	Programas de bioinformática.....	56
4.9.2.	Alinhamentos de sequências.....	56
4.9.3.	Programas e métodos utilizados nas árvores filogenéticas.....	57
4.9.4.	Análise estrutural da sequência de aminoácidos	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1.	AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS GENES CODIFICANTES DE LIPOXIGENASE.....	58
5.1.1.	Genoma completo de <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 e localização dos genes ACA87683.1 e ACA87192.1.....	58
5.1.2.	Extração do DNA genômico de <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908.....	62
5.1.3.	Amplificação dos genes ACA87683.1 e ACA87192.1 por PCR.....	62
5.1.4.	Digestão dos clones positivos.....	63
5.1.5.	Clonagem dos insertos de interesse em vetor de expressão pET28a (+)	64
5.2.	EXPRESSÃO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS.....	65

5.2.1. Sistema de indução e expressão.....	65
5.2.2. Purificação do extrato bruto proteico.....	71
5.3. DETECÇÃO DOS PRODUTOS GERADOS PELA CATÁLISE ENZIMÁTICA POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	75
5.4. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS.....	76
5.4.1. Atividade sobre diferentes substratos.....	76
5.4.2. Determinação da concentração ótima de enzima.....	77
5.4.3. Determinação da concentração ótima de substrato.....	78
5.4.4. Determinação do pH ótimo de reação.....	80
5.4.5. Determinação da temperatura ótima de reação.....	82
5.4.6. Determinação da estabilidade térmica da enzima.....	83
5.4.7. Influência dos diferentes íons bivalentes na atividade enzimática.....	84
5.4.8. Determinação das constantes cinéticas.....	86
5.5. DETERMINAÇÃO DO METAL PRESENTE NO CENTRO CATALÍTICO.....	88
5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS DE REAÇÃO ENZIMÁTICA.....	88
5.7. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	92
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
8. APÊNDICES.....	125

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS LIPOXIGENASES DE *Shewanella woodyi*

RESUMO - Lipoxigenases são enzimas que catalizam a oxido-redução de ácidos graxos poliinsaturados que contém em sua estrutura um ou mais grupos cis 1,4-pentadieno, produzindo hidroperóxidos através da incorporação de um oxigênio molecular. Durante anos a presença de lipoxigenase foi considerada exclusivamente eucariótica, presente em mamíferos, plantas, pequenos invertebrados marinhos e fungos. A função biológica dessas enzimas tem sido amplamente estudada. Porém, pouco tem sido descrito em organismos procariotos. O presente estudo teve por objetivos clonar e caracterizar bioquimicamente duas lipoxigenases de *Shewanella woodyi* ATCC 51908, caracterizar os produtos de reação destas enzimas e realizar um estudo filogenético e estrutural, comparando-as com lipoxigenases de eucariotos e procariotos. Parâmetros enzimáticos dessas enzimas foram descritos. A influência do pH e temperatura na atividade catalítica foram estudadas. Também foi determinado a preferência por substrato e o efeito da adição de vários íons divalentes que podem interferir na atividade catalítica. A enzima SWPrecLox de *S. woodyi* apresentou temperatura e pH ótimos de 31°C e 8,0, respectivamente. Demonstrou afinidade por ácido linoleico, com uma Km de 0,47 mM e Vmax de 2,78 mmols min⁻¹ mg⁻¹. A enzima SWAraCLOX teve ácido araquidônico como substrato preferente, com valores de Km 0,20 mM e Vmax 1,6 mmols min⁻¹ mg⁻¹. Atividade ótima foi alcançada com 27°C e pH 7,0. A partir das estruturas moleculares das lipoxigenases de *Plexaura homomalla* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram criados hipotéticos modelos estruturais de SWPrecLOX e SWAraCLOX.

Palavras-chave: ácido araquidônico, ácido linoleico, caracterização enzimática, expressão de genes

CLONING, EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF TWO LIPOXYGENASES OF *Shewanella woodyi*

ABSTRACT - Lipoxygenases are enzymes that catalyze the oxido-reduction of polyunsaturated fatty acids in their structure that contains one or more groups cis 1,4-pentadiene, producing hydroperoxides from the incorporation of molecular oxygen. For years, the presence of lipoxygenases was considered a eukaryotic feature, present in mammals, plants, small marine invertebrates and fungi. The present study aimed to clone and characterize biochemically two lipoxygenases from *Shewanella woodyi* ATCC 51908, characterize the reaction products of these enzymes and conduct a phylogenetic and structural analysis, comparing them with eukaryotes and prokaryotes lipoxygenases. The biological function of these lipoxygenases has been widely studied. However, only few have been described in prokaryotes. Enzymatic parameters of these enzymes have been described. The influence of the pH and the temperature on the catalytic activity has been studied. Also has been studied the substrate preference and the effect of the addition of several divalent cations that can enhance or eliminate the catalytic activity. The enzyme SWPrecLox of *S. woodyi* showed temperature and pH optimum were 31 °C and 8,0, respectively. Demonstrated substrate affinity for linoleic acid, with Km 0,47 mM and Vmax 2,78 mmols min⁻¹ mg⁻¹. The enzyme SWAraLox has arachidonic acid as preferred substrate, with Km 0,20 mM and Vmax 1,6 mmols min⁻¹ mg⁻¹. Optimum activity was reached at 27 °C and pH 7,0. From the molecular structures of lipoxygenase *Plexaura homomalla* and *Pseudomonas aeruginosa*, were created a hypothetical structural model of the SWPrecLox and SWAraLox.

Keywords: arachidonic acid, linoleic acid, enzymatic characterization, gene expression

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos possuem a habilidade de catalisar diversas reações orgânicas simultaneamente, o que lhes confere uma importância considerável na indústria. Biotransformação microbiana consiste na transformação de um composto químico em outro, utilizando um biocatalizador como mediador dessa conversão. Pode-se utilizar desde células inteiras até enzimas purificadas no processo de biotransformação. Esta última é mais recomendada, uma vez que não há acúmulo de produtos secundários e as reações paralelas são menos comuns (ISHIGE, HONDA e SHIMIZU, 2005).

Neste trabalho há um enfoque na biotransformação por oxido-redução, onde uma ligação C-H é alterada com a finalidade de obter uma ligação C-OOH. Este tipo de reação ocorre em vários organismos, desde bactérias até mamíferos, e está presente no metabolismo oxidativo de diversos compostos orgânicos, como por exemplo, lipídeos. As reações de oxido-redução de ácidos graxos são utilizadas para obtenção de derivados hidroxilados que apresentam propriedades tensioativas, antimicrobianas, ou para utilização em fragrâncias, lubrificantes e antibióticos.

Lipoxigenases são enzimas que catalizam a oxido-redução de ácidos graxos poliinsaturados que contém em sua estrutura um ou mais grupos 1,4-cis pentadieno, produzindo hidroperóxidos a partir da incorporação de oxigênio molecular. Este grupo de enzimas está presente em animais (KUHN, 2000), plantas (FEUSSNER e WASTERACK, 2002), fungos (SU e OLIW, 1998), alguns organismos marinhos (BRASH, 1999) e, recentemente, constatou-se a presença em alguns micro-organismos (BUSQUETS et al., 2004; VANCE et al., 2004).

Dentre as funções biológicas das lipoxigenases de eucariotos, estão a formação de mediadores biológicos e sinais moleculares, como a síntese de ácido jasmônico em plantas e leucotrienos em animais, reações de peroxidação, modificando a estrutura de membranas, mobilização de lipídeos, para serem utilizados como fonte energética e biotransformação de endobióticos e xenobióticos. O papel biológico que desempenham as lipoxigenases em organismos procariotos

ainda não está elucidado, pois são recentes os estudos acerca dessa enzima em bactérias. Experimentalmente são poucas as enzimas lipoxigenases procarióticas que foram estudadas, a maior parte das pesquisas são realizadas com os produtos de reação dessas enzimas. Assim, pouco se sabe a respeito de sua estrutura, mecanismo de ação e função biológica.

Estudos preliminares a este trabalho levaram à obtenção de uma lipoxigenase recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, e posterior cristalização estrutural desta. Através de estudos da estrutura desta enzima, verificou-se que há uma diferença entre o domínio N-terminal de lipoxigenases procarióticas e eucarióticas. Desta maneira, fez-se necessário adquirir maiores conhecimentos sobre esta enzima presente nos organismos procariotos, e através de pesquisas bioinformáticas, escolheu-se as hipotéticas lipoxigenases da bactéria *Shewanella woodyi* ATCC 51908 para este estudo.

2. OBJETIVOS

Clonar e expressar os genes ACA87683.1 – 15-lipoxygenase Precursor e ACA87192.1 – Arachidonate 15-lipoxygenase de *Shewanella woodyi* ATCC51908, com a finalidade de confirmar sua atividade lipoxigenase

Caracterizar bioquimicamente ambas as enzimas.

Caracterizar os produtos gerados pela transformação do substrato pelas enzimas.

Realizar um estudo filogenético das sequências aminoacídicas de ambas as enzimas e compará-las com outras lipoxigenases, tanto de procarioto como eucarioto.

Realizar análise estrutural das enzimas tendo como modelos de estrutura uma lipoxigenase eucariótica e uma procariótica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS

As primeiras referências aos processos de biotransformações datam de finais do século XIX e princípios do século XX onde se descrevem reações enzimáticas em solventes orgânicos. Logo entrou em um estado de latência até metade da década de 50, quando foi desenvolvida a síntese de cortisona a partir de transformações microbianas, e trabalhos com esterases e desidrogenases.

A partir de então, graças ao conhecimento adquirido sobre os sistemas biológicos e a fisiologia dos micro-organismos, o uso desses organismos na transformação de substâncias se tornou constante, aumentando consideravelmente o número de pesquisas sobre o tema (Figura 1). Quando se analisa a evolução das publicações científicas sobre biotransformações em geral e específicas em micro-organismos, observa-se um alto incremento destas nos últimos 20 anos.

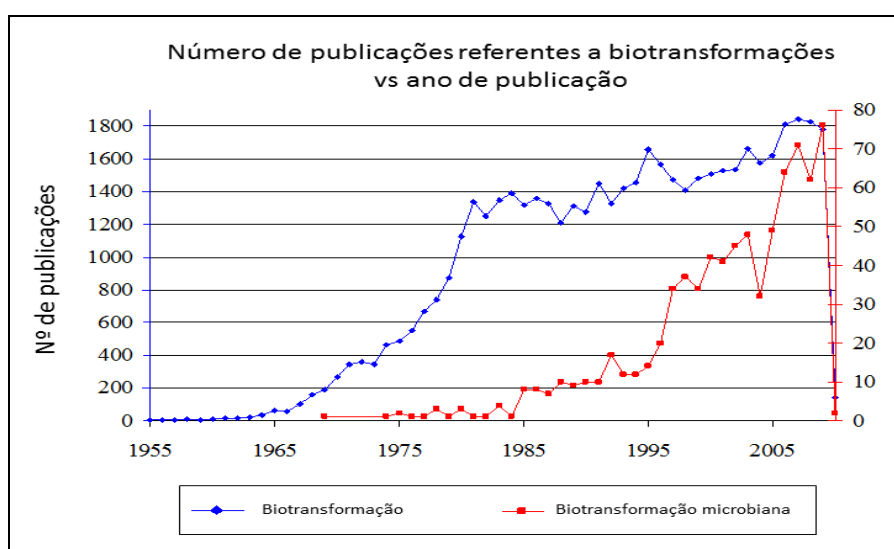


Figura 1: Evolução das publicações científicas referentes à biotransformações (fonte: SciFinder Scholar).

Sob o ponto de vista ambiental, as biotransformações microbianas têm grande importância. Com o aumento da contaminação ambiental, a preocupação com o meio ambiente e sua recuperação tornou-se interesse mundial. O desenvolvimento sustentável e os meios de obtenção de energia limpa são temas altamente discutidos, e têm sido cada vez mais utilizados pela indústria e sociedade em geral. Para os ambientes já degradados, tem-se buscado soluções viáveis e de baixo custo para a recuperação destes. Uma das possibilidades de recuperação de ambientes contaminados é a utilização de transformações microbianas, uma vez que os micro-organismos estão presentes em todos os tipos de ambientes, e possuem alto potencial para a degradação de compostos contaminantes.

As biocatálises também estão envolvidas na síntese a grande escala de compostos essenciais à bioquímica e à biomedicina, assim como na criação de novos materiais biodegradáveis através do uso de resíduos como fonte de energia.

3.1.1. Biotransformações microbianas

Biotransformação microbiana consiste na transformação de um composto químico em outro com pouca ou nenhuma toxicidade, utilizando um biocatalizador como mediador dessa conversão. O potencial dos micro-organismos em limpar solo, água e sedimentos contaminados consiste numa tecnologia eficiente e ambientalmente segura de descontaminação (ABBONDANZI, 2006). Esta conversão pode ter uma ou mais etapas, já que os micro-organismos são muito comuns em transformações que impliquem em mais de uma reação enzimática em sequência (DEMAIN, 2000).

A capacidade de catalisar muitas reações orgânicas a uma só vez faz com que os micro-organismos tenham uma aplicação industrial muito interessante e fundamental para determinadas reações. As biotransformações possuem características atrativas do ponto de vista industrial, pois a capacidade de realizar reações com síntese química são difíceis e muito custosas, como por exemplo a produção de produtos quirais ou a hidroxilação de carbonos não ativos. Elas

também permitem evitar o uso de condições extremas, como altas temperaturas e pressões, e, em geral, reduzem notavelmente os resíduos gerados.

Em se tratando de biotransformações, elas podem ser feitas utilizando-se células inteiras de micro-organismos ou enzimas purificadas obtidas destes. O uso de células inteiras são viáveis, porém possuem algumas desvantagens quando comparadas às enzimas purificadas: problemas de permeabilidade de substratos através das membranas, acúmulo de produtos secundários e reações paralelas as quais podem alterar os produtos (ISHIGE, HONDA e SHIMIZU, 2005). Assim, recomenda-se trabalhar com enzimas purificadas obtidas de determinados micro-organismos. As enzimas, apesar de necessitarem de condições de trabalho mais restringidas, como pH ajustado, presença de co-fatores, temperatura estável, ainda são mais recomendáveis que células inteiras. No entanto, um catalizador que seja específico a um único composto é economicamente inviável. Deste modo, uma enzima ideal é aquela que possui o espectro amplo de substrato desejado através da retenção de sua especificidade natural com respeito a regiosseletividade e estereosseletividade (FABER e KROUTIL, 2005).

Tabela 1: Tipos de enzimas e suas funções.

Tipos de enzimas
Oxido-redutases
Responsáveis por reações de óxido-redução.
Transferases
Responsáveis por transferir grupos funcionais de uma molécula a outra.
Hidrolases
Realizam reações de hidrólise.
Liases
Rompimento e formação de ligações C-C, C-O e C-N, distintas às reações redox e de hidrólise. Normalmente eliminam ou adicionam duplas ligações.
Isomerases
Realizam reações de isomerização.
Ligases
Envolvidas na formação de ligações, com gasto de ATP.

A grande variedade de compostos químicos presentes na natureza faz com que as biotransformações sejam muito amplas, e as enzimas que dela participam sejam de diversas classes. Na tabela 1 encontram-se os diferentes tipos de enzimas e suas funções biológicas. Neste trabalho há um enfoque na biotransformação por hidroperoxidação, um tipo de reação de oxido-redução, onde uma ligação C-H é alterada com a finalidade de obter uma ligação C-OOH (Figura 2). A reação de hidroperoxidação faz parte do metabolismo oxidativo de muitos compostos

orgânicos, e ocorre nas mais diversas formas de vida, desde bactérias até mamíferos.

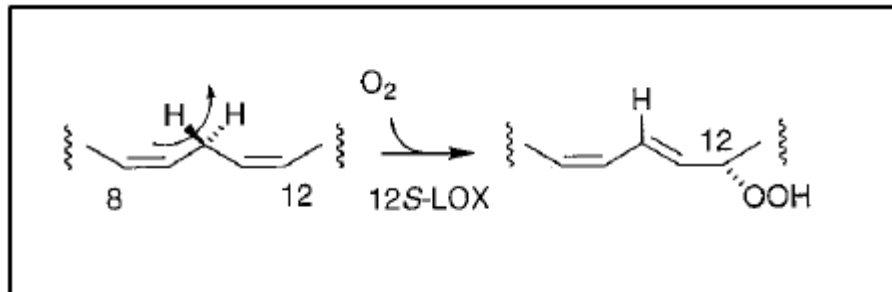


Figura 2: Exemplo de reação de hidroxilação – abstração de um átomo de hidrogênio e inserção de oxigênio pela enzima lipoxigenase.

As reações de oxidação também são amplamente utilizadas na produção industrial de materiais. Porém, são de difícil obtenção, pois a maior parte das enzimas hidroxilasas está associada a membranas, formando complexos proteicos, o que dificulta o isolamento da enzima e, quando isolada, costuma ser instável (HOLLAND e WEBER. 2000).

Atualmente, as pesquisas se centram em rastrear novos genes de micro-organismos isolados de ambientes naturais pouco usuais, como micro-organismos termófilos, psicrófilos, halófilos, dentre outros, com a finalidade de se obter enzimas que catalizam novas reações ou enzimas com comportamento mais estável em condições extremas de temperatura, pH, solventes, etc (TURNER e SCHNEIDER, 2000).

3.1.2. Biotransformação de lipídeos por micro-organismos

Óleos vegetais são substratos eficientes para as fermentações a escala industrial, já que são de baixo custo, renováveis e deles se obtêm produtos com valor agregado tanto pelo uso alimentício quanto por outros âmbitos. Esses óleos estão compostos geralmente por ácidos graxos saturados e insaturados, com

exceção do óleo de rícino, composto basicamente de ácido ricinoleico. Estes substratos são susceptíveis à transformações por micro-organismos, obtendo novos produtos que apresentem uma reatividade e funcionalidade melhorada, como ácidos graxos monohidroxilados, dihidroxilados, trihidroxilados, esfingolipídeos, amidos graxos, poliésteres, lactonas, entre outros compostos (KUO, KANESHIRO e HOU, 2002).

As biotransformações dos ácidos graxos podem ocorrer tanto em posição terminal, subterminal, como em meio da cadeia. As duas primeiras são bem conhecidas, já que estão envolvidas nas rotas de biosíntese e biodegradação dos próprios ácidos graxos e de alcanos e hidrocarbonetos, tal como a α -hidroxilação na posição 2 do ácido palmítico por *Arthrobacter simplex*, gerando α -hidroxipalmítico, a β -hidroxilação presentes nos polihidroxi alcanos, sintetizadas por uma variedade de micro-organismo (ANDERSON e DAVES, 1990), ou a ω -hidroxilase de *Pseudomonas oleovorans* que atua sobre ácidos graxos saturados de 8, 10, 12, 14 e 18 átomos de carbono (KUO, KANESHIRO e HOU, 2002).

As reações que ocorrem no meio da cadeia são inúmeras devido a grande quantidade de ligações C-C e são altamente específicas para esta região da molécula, devido à posição do substrato no centro ativo da enzima (KUHN, 2000). As modificações mais comuns são realizadas por oxidoredutases, como a lipoxigenase ou o complexo P450, mas também há outras modificações químicas realizadas por micro-organismos que podem afetar o centro da cadeia dos ácidos graxos, como, por exemplo, as metiltransferases de fosfolipídeos de *Mycobacterium phlei*, ou a isomerase de *Pseudomonas* sp. responsável pela produção do ácido trans- Δ^{10} -octadecenóico a partir de ácido oleico (HAMMOND 1988).

As reações de oxidação através de células inteiras ou enzimas são utilizadas para obtenção de derivados oxidados que apresentam propriedades tensioativas, antimicrobianas, ou para utilização em fragrâncias, lubrificantes e antibióticos.

3.2. *Shewanella woodyi*

Shewanellaceae são membros comumente encontrados em comunidades complexas, em sistemas aquáticos, que são quimicamente estratificadas numa base permanente ou sazonal (HÖFLE e BRETTAR, 1996). Devido à alta competitividade desses ambientes, e para sobreviver com os recursos ali disponíveis, *Shewanellaceae* desenvolveu sistemas reguladores potentes (FREDRICKSON et al., 2008), o que as tornam micro-organismos com um grande potencial biotecnológico. Nas últimas décadas, as bactérias dessa família têm sido amplamente estudadas, uma vez que desempenham um papel co-metabólico importante na biorremediação de poluentes orgânicos halogenados, degradação de petróleo bruto, redução de óxidos de magnésio e ferro, e habilidade em produzir altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (MYERS e NEALSON, 1988; PETROVSKIS et al., 1994; RUSSELL e NICHOLS, 1999; IVANOVA et al., 2004). Membros dessa família são gram-negativos, quimiorganotróficos, possuem forma de bastão e mobilidade. Não formam endosporos ou microcistos, e são aeróbios ou anaeróbios facultativos. Espécies dessa família foram isolados em águas costeiras, mar aberto e fechado, e invertebrados de ambiente marinho (IVANOVA et al., 2004).

Shewanella woodyi

Shewanella woodyi são bactérias da família *Shewanellaceae*, ordem *Alteromonadales*, classe gama-proteobacteria. Foram originalmente isoladas de *Mastigoteuthis flammea* (molusco de água salgada), água e sedimento do Mar de Alboran (mistura do Mar Mediterrâneo com Oceano Atlântico). São luminescente, obrigatoriamente respiratória, hastes não-esporulantes, com 0,4 - 1,0µm por 1,4 - 2,0µm, e cada célula possui um único flagelo polar, desembainhado. As células utilizam oxigênio, nitrato e nitrito como aceptores de elétrons e possuem atividades catalase e oxidase. A temperatura ideal de crescimento é de 25°C, podendo variar de 4 a 25°C. Todas as cepas produzem gelatinase, e a maioria das cepas

produzem amilase, mas não produzem lipase, quitinase ou agarase. O tipo da estirpe é ATCC 51908 (MAKEMSON et al., 1997).

Seu genoma completo está depositado na base de dados GenBank, sob o número de referência CP000961.1. Segundo a sequência que ali se encontra, *Shewanella woodyi* possui três genes codificadores de lipoxigenase: Arachidonate 15-lipoxygenase (ACA87192.1), Hypothetical protein (ACA86597.1) e Precursor protein (ACA87683.1). Porém, nenhum deles até o momento comprovado experimentalmente.

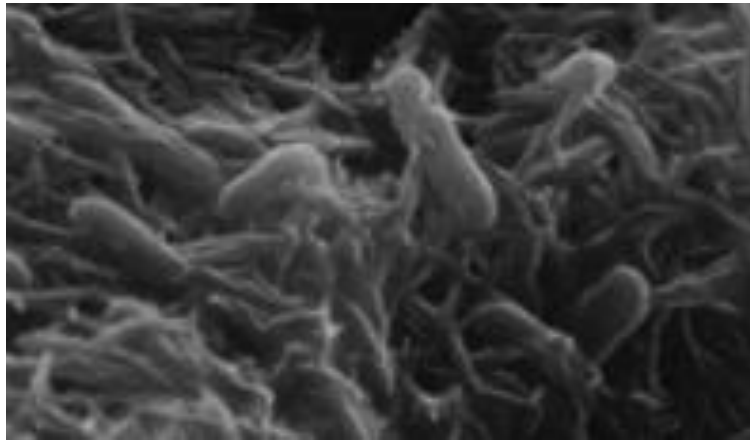


Figura 3: *Shewanella woodyi*, microscopia eletrônica (BacMap Genome Atlas).

3.3. LIPOXIGENASES

Lipoxigenases são enzimas que catalizam a oxido-redução de ácidos graxos poliinsaturados que contém em sua estrutura um ou mais grupos 1,4-cis pentadieno, produzindo hidroperóxidos a partir da incorporação de oxigênio molecular. A primeira lipoxigenase descrita na literatura foi reportada como uma enzima envolvida na oxidação de lipídeos em plantas de soja (ANDRE e HOU, 1932).

Este grupo de enzimas é encontrado em animais, sobretudo mamíferos (KUHN, 2000), plantas (FEUSSNER e WASTERNAK, 2002), fungos (SU e OLIW, 1998), alguns organismos marinhos (BRASH, 1999) e, recentemente, constatou-se a presença em alguns micro-organismos (BUSQUETS et al., 2004; VANCE et al., 2004).

As características que permitem classificá-las como uma família de enzimas são:

- A extração anterofacial do hidrogênio e a adição do oxigênio mostradas na conversão das duplas ligações 1(Z), 4(Z) dos ácidos graxos poli-insaturados a 1,3 (E,Z)-dienil-5-hidroperóxido (KÜHN, 1986).
- A identidade dos alinhamentos de sequências por pares é de 21 – 27% entre lipoxigenases de plantas e animais, de 43 – 86% entre lipoxigenases de plantas, e de 39 – 93% entre lipoxigenases de animais (PRIGGE, 1996).
- Os resíduos aminoacídicos que servem como ligantes do ferro catalítico (Fe^{2+} - Fe^{3+}) estão altamente conservados, tanto em lipoxigenases de eucariotos como de procariotos (VIDAL-MAS, 2005).
- Diversas lipoxigenases, tanto animais como vegetais, apresentam similaridades importantes quanto à estrutura genômica (CHEN , 1994).

3.3.1. Nomenclatura

As lipoxigenases de plantas são classificadas de acordo com a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados ácido linoleico (C18:2 insaturações) e ácido linolênico (C18:3 insaturações), ao contrário das lipoxigenases de mamíferos, onde o substrato mais comum é o ácido araquidônico (C20:4 insaturações). Desta maneira, as lipoxigenases de plantas são classificadas de acordo com a especificidade de oxigenação do ácido linoleico, oxidado nos carbonos 9 e 13, classificando a enzima

em 9-LOX ou 13-LOX. As enzimas lipoxigenases de mamíferos podem ser classificadas de acordo com sua posição específica de oxigenação do ácido araquidônico. Assim, obtemos quatro famílias: 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX e 15-LOX. Porém, esta classificação se vê falha devido à crescente diversidade da família de lipoxigenase. Além do parâmetro de especificidade de oxigenação, deve-se levar em conta a estrutura do substrato, o alinhamento entre enzima e substrato no centro ativo, condições de reação e características físico-químicas, pois todos estes parâmetros podem interferir no hidroperóxido formado.

Uma característica a ser levada em conta para classificar as subfamílias de lipoxigenases é a enantioseletividade, ou seja, dependendo da posição relativa que ocupa o hidrogênio que se elimina e o oxigênio que se adiciona com relação ao plano da dupla ligação entre carbonos. Deste modo, as lipoxigenases podem ser classificadas também como R ou S (KÜHN, 2000).

Uma classificação mais abrangente que se pode dar às lipoxigenases de plantas é utilizando como base sua estrutura primária. De acordo com sua similaridade de sequência, lipoxigenases de plantas podem ser agrupadas em duas sub-famílias de genes: as que não possuem peptídeo-sinal e contem uma sequência com alta similaridade entre si (> 75%), chamadas LOXs tipo 1; já as LOXs tipo 2 são aquelas que apresentam peptídeo-sinal em sua extensão N-terminal e uma sequência com similiaridade moderada (~35%) (FEUSSNER e WASTERACK, 2002).

Algumas lipoxigenases apresentam a característica de formar uma mistura de produtos, como por exemplo a lipoxigenase de reticulócitos de mamíferos, que catalisam a oxigenação nos carbonos C-12 e C-15, com as proporções variando dependendo da espécie (BRASH, 1999 – minireview).

Quanto à classificação de lipoxigenases de procariotos, como não se tem definido o substrato preferente, devido à escassez de trabalhos realizados em esse âmbito, a classificação se baseia nos parâmetros utilizados às lipoxigenases de plantas e mamíferos.

3.3.2. Mecanismo de ação das lipoxigenases

O mecanismo de ação das lipoxigenases se baseia em três passos consecutivos representados na Figura 4.

O primeiro passo consiste na extração estereoseletiva de um hidrogênio do grupo 1,4-cis,cis-pentadieno para formar um radical pentadienil. O segundo passo corresponde a produção de uma redistribuição dos elétrons na posição +2 (na direção ao metil-terminal), ou -2 (na direção ao carboxi-terminal) acompanhada da conjugação do grupo dieno em cis-trans. O terceiro e último passo é a inserção do oxigênio molecular de forma estereoespecífica (S- ou R-) e a consequente redução do radical hidroperóxido (PRIGGE et al., 1997).

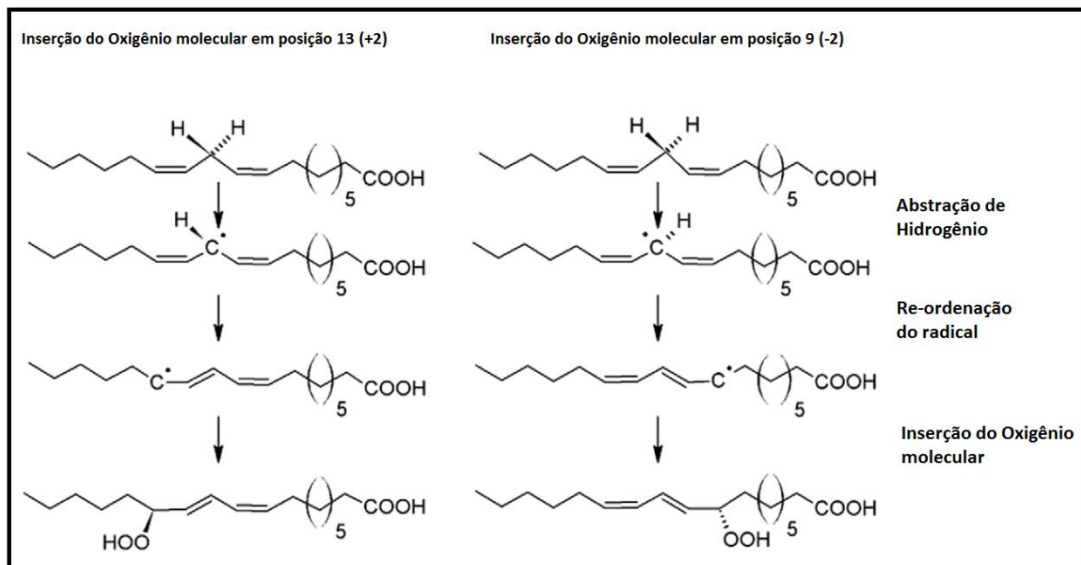


Figura 4: Mecanismo de reação e regio-especificidade da lipoxigenase. Adaptação de Andreou (ANDREOU e FEUSSNER, 2009).

Durante a catálise há uma ativação do substrato pela perda de um próton e inserção da molécula de oxigênio. Neste processo de oxidorredução há a participação do íon de Fe^{3+} ativado coordenando na enzima para a abstração do

átomo de Hidrogênio que passa a Fe^{2+} (inativo). A inserção do oxigênio faz com que se forme um radical $\text{C-OO}\cdot$, que será o composto que regenerará o Fe^{2+} o qual se passará a forma Fe^{3+} novamente, a forma ativa. Este mecanismo de auto-regeneração da forma ativa do átomo de ferro da lipoxigenase é ilustrado na Figura 5.

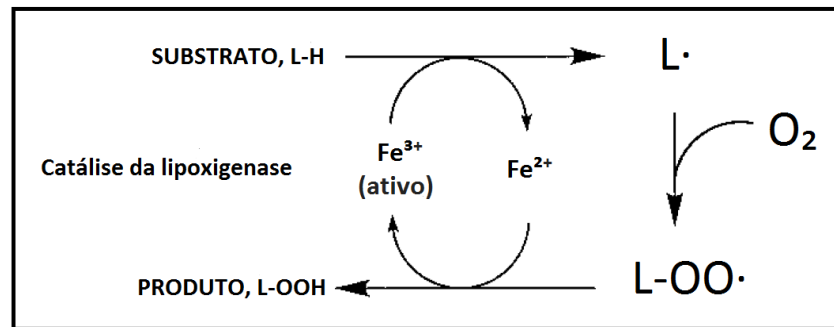


Figura 5: Catálise da lipoxigenase. Adaptação de Brash (BRASH, 1999).

Há proposto dois mecanismos gerais de interação do ferro com o substrato (PRIGGE et al., 1997) (Figura 6). Ambos os mecanismos se iniciam com a forma ativa da lipoxigenase, Fe^{3+} . A ativação ocorre através da oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} por produto, gerando um radical livre de uma molécula de produto (COREY e NAGATA, 1987).

No mecanismo que se mostra na Figura 6 (via superior), o Fe^{3+} oxida o grupo 1,4-pentadieno para formar um radical pentadienil. A reação com o oxigênio molecular produz um radical peroxil que reoxida o Fe^{2+} e forma o produto hidroperoxidado. O segundo mecanismo (Figura 6, via inferior) o Fe^{3+} ajuda na desprotonação do dieno fazendo uma ligação direta com os carbonos resultantes. A reação continua com a inserção do dioxigênio na ligação Fe-C seguida pela ruptura da ligação Fe-O . Esse mecanismo é interessante já que permite explicar de uma maneira natural a regioespecificidade e a estereoespecificidade da enzima. Em ambos os casos, os dois mecanismos são similares. A abstração do hidrogênio é produzida pela transferência de prótons a um grupo de base não apresentada na

Figura 6, graças à proximidade do Fe^{3+} , já seguida pela formação de uma ligação Σ ferro-carbono ou através de uma transferência de um elétron ao ferro (resultando em um radical livre intermediário).

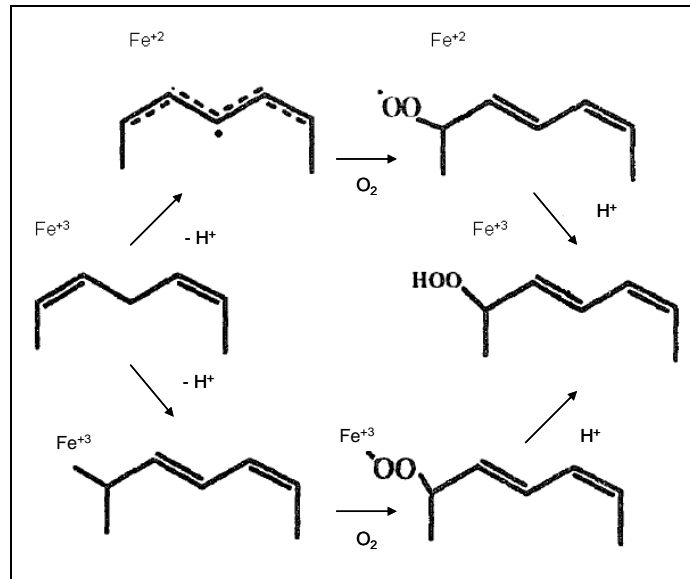


Figura 6: Esquema dos dois mecanismos de interação Ferro – substrato propostos por Pridge e Nagata.

3.3.3. Funções das lipoxigenases

As funções biológicas das lipoxigenases estão ligadas à sua especificidade, à sua localização, ou ao organismo que a contém.

Formação de mediadores biológicos ou de sinais moleculares. Geralmente se caracteriza pela síntese de um hidroperóxido específico a partir de um ácido graxo livre. O produto da lipoxigenase pode atuar tanto como um intermediário ou como um produto final de uma via metabólica. Na Figura 7 encontram-se os principais substratos da lipoxigenase e os produtos hidroperóxidos obtidos da catálise enzimática (JOO e OH, 2012).

Em plantas, lipoxigenases estão envolvidas na biossíntese de ácido jasmônico e aldeídos responsáveis por sinalizações - em mecanismo de defesa (NEMCHENKO et al., 2006; QUAGLIA et al., 2012, SENTHILRAJA et al., 2013), crescimento e desenvolvimento de plantas (SANTINO et al., 2003) e maturação do fruto (ZHANG et al., 2006). Em mamíferos, lipoxigenases participam na cascata de ácido araquidônico para a biossíntese de leucotrienos, e envolvidos na biossíntese de lipoxinas, que estão implicadas na patogenicidade de várias doenças inflamatórias, como artrites, psoríases e asma bronquial (KANTARCI e VAN DYKE, 2005). Os medicamentos atuais para asma incluem inibidores de 5-LOX e antagonistas dos receptores de leucotrienos (DRAZEN, 1999).

Um exemplo de produtos da lipoxigenase que atue como produto final é a síntese de 12-HETE (ácido hidroxieicosatetraeônico) por parte da 12(S)-lipoxigenase. A transformação do ácido araquidônico a 12(S)-HETE foi demonstrada pela primeira vez em plaquetas humanas e de bovino, em meados da década de 1970 (MORGAN et al, 2010). São muitas as atividades biológicas como moléculas de sinalização que se podem atribuir a HETEs e HEPTEs (ácido hidroperoxieicosatetraeônico). Os produtos finais podem provocar ações rápidas e potentes ou funcionar como sinalizador de ações lentas. Como exemplo de ações rápidas, podemos citar a intervenção na modulação da neurotransmissão (PIOMELLI et al., 1987) e envolvimento na reatividade plaquetária, o que pode levar a casos de hemostasia e trombose (YEUNG e HOLINSTAT, 2011). A diferenciação e sobrevivência celular são exemplos de ações lentas nas quais participam 12-HETE (YU et al., 1995; TANG et al., 1996).

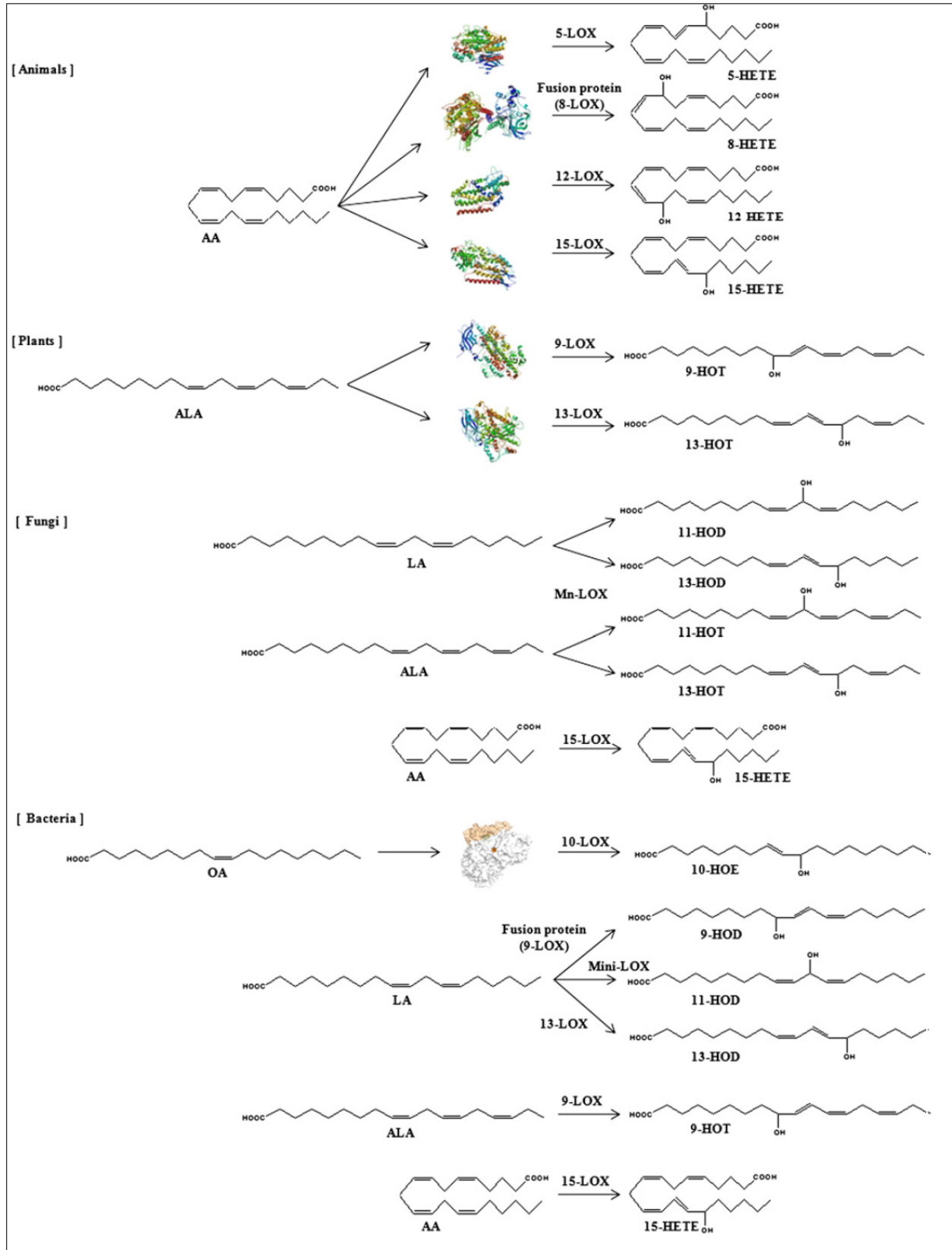


Figura 7: Principais substratos e os produtos hidroperóxidos obtidos da ação enzimática da enzima lipoxigenase (JOO e OH, 2012).

Reações de peroxidação – modificação de estrutura de membrana. Associa-se com o metabolismo de substratos esterificados e produz uma mistura de produtos hidroperoxidados (Figura 4). Nas reações de peroxidação, ocorrem alterações físicas na célula ou alteração dos peróxidos. Neste caso, a estrutura em si do hidroperóxido não tem tanta importância como os efeitos que causa na membrana celular e a oxigenação secundária provocada pela peroxidação lipídica (BRASH, 1999).

Uma classe interessante de produtos lipídicos derivados de 12 - e 15-LOX são os eicosanóides esterificados formados pela oxidação enzimática direta dos fosfolípidios de membrana (DOBRIAN et al., 2011). Primeira evidência para a formação destes produtos foi documentada em eosinófilos por Brinckmann et al. (1998). Embora essas lipoxigenases sejam consideradas como enzimas citosólicas, com um aumento de cálcio intracelular elas podem ligar-se aos fosfolípidios de membrana, de forma reversível (BRINCKMANN et al., 1998; KUHN et al., 2006). Em células hematopoiéticas e de plaquetas, 15- e 12-LOX, respectivamente, têm a capacidade de translocar as membranas celulares na presença de agonistas, tais como o cálcio ionóforo, a trombina ou o colágeno, o que aumenta a atividade de oxigenação dos ácidos graxos pelas enzimas (MASKREY et al., 2007).

Mobilização de lipídios. Outro papel biológico das lipoxigenases é a oxidação de ácidos graxos insaturados esterificados em triglicéridos, processo envolvido na germinação de algumas plantas oleaginosas (FEUSSNER et al., 2001; FEUSSNER et al., 1997). Após a conversão para 13-hidroperóxido, os ácidos graxos tornam-se disponíveis para a β -oxidação e consequente utilização como fonte de energia para o embrião em desenvolvimento.

Biotransformação de endobióticos e xenobióticos. Além das três funções descritas por Brash (1999), as lipoxigenases estão envolvidas em muitas reações presentes no metabolismo de xenobióticos. Lipoxigenase parece ser o único catalisador que ativa a benzidina, uma substância potencialmente carcinogênica, no

fígado de ratos e humanos, dando início ao processo de degradação (KULKARNI , 2001). Quatro mecanismos foram descritos na oxidação de xenobióticos por lipoxigenases: reação dependente de hidroperóxido, reação mediada por radicais peroxils, reações dependentes de transferência de elétrons, reação de oxidação direta (KULKARNI, 2001).

Como se nota, as funções biológicas das lipoxigenases estão bem descritas em organismos eucariotos. Quanto ao papel dessas enzimas em procariotos, na literatura ainda não se descreveu com segurança qual desempenham. Sabe-se que está ligada à produção de lactonas que funcionam como moléculas de sinalização (GUO et al., 2012; HUANG e SCHWAB, 2011). Alguns autores sugerem, no caso de micro-organismos patógenos, estar relacionado com a defesa do hospedeiro e inflamação, através da alteração de mediadores químicos presentes em animais (VANCE et al., 2004). Em plantas, induzir respostas primárias às infecções por organismos patógenos (OLIW, 2002). Os estudos realizados com a lipoxigenase de *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram que a enzima possui característica tensoativas, o que pode-se inferir que haja uma função de biodisponibilizar compostos lipofílicos para seu próprio uso como fonte de carbono e energia (GUERRERO et al., 1997).

3.3.4. Lipoxigenases em eucariotos

O estudo de lipoxigenases em eucariotos foi amplamente realizado nos últimos anos. Existem diversos grupos de pesquisa que se dedicam a pesquisar lipoxigenases, especialmente as vegetais e animais, desde seu mecanismo de ação e papel biológico, até estudos mais aprofundados sobre a estrutura cristalina dessas enzimas. Também há trabalhos referentes à lipoxigenases de fungos, porém em número mais reduzido.

Lipoxigenase de fungos

Um dos estudos iniciais de LOX fúngica foi de *Pleurotus ostreatus*, onde a enzima foi obtida através da purificação por um processo que envolvia cromatografia de gel filtração, de afinidade e de troca iônica, e subsequentemente caracterizada. Apresentou como produtos finais ácido 13-hidroperóxido-9Z, 11E-octadienóicos (KURIBAYASHI et al., 2002).

Wadman et al. (2009) caracterizaram as oxilipinas produzidas por *Aspergillus niger* e as compararam com as produzidas por *Aspergillus nidulans*.

A primeira lipoxigenase recombinante de um basidiomiceto foi construída a partir do genoma de *Pleurotus sapidus*, e expressada heterologicamente em *Eschechiria coli*. A enzima apresentou alta atividade catalítica na presença de ácido linoleico, gerando 13S-hidroperóxido como produto. É a primeira LOX descrita que aceita hidrocarbono terpeno como substrato (PLAGEMANN et al., 2013).

Lipoxigenase de plantas

Lipoxigenases de plantas também são amplamente estudadas há anos, e há um aporte muito grande de conhecimento acerca desta enzima com respeito ao mecanismo de ação, papel biológico e estrutura cristalina.

A primeira estrutura tridimensional de uma lipoxigenase foi adquirida de uma 1-LOX de soja, onde 2 cavidades do principal domínio foi descrito (BOYINGTON et al., 1993).

Diversas lipoxigenases de oliva (*Olea europaea* L.) foram caracterizadas bioquimicamente. Uma 13-LOX foi estudada e apresentou peso molecular de 98 kDa e atividade máxima a pH 6,0 (LORENZI et al., 2006). Duas lipoxigenases isoformes foram separadas por precipitação salínica e cromatografia de troca iônica. Ambas as

enzimas apresentaram peso molecular em torno de 95 kDa, e produziram 13-hidroperóxidos a partir de ácido linoleico e α -linolênico (WILLIANS e HARWOOD, 2008). Dois clones de cDNA, Oep1LOX2 e Oep2LOX2, foram isolados de oliva (*Olea europaea* cv. Picual) e suas sequências de aminoácidos estudadas, demonstrando que as enzimas clonadas são do tipo 2-LOX, produzem 13-hidroperóxidos de ácido linoleico e ácido linolênico (PADILLA et al., 2009). Outro clone de cDNA foi isolado de oliva, Oep2LOX1, e a sequência aminoacídica mostrou uma alta similaridade com LOX tipo-1. Esta enzima recombinante apresentou como substrato preferível ácido linolênico, gerando como produto 9-hidroperóxidos, enquanto que com ácido linoleico, produziu uma mistura de 9- e 13-hidroperóxidos numa proporção de 4:1 (PADILLA et al., 2012).

Com a conclusão do genoma de pepino (*Cucumis sativus* L.), alguns estudos puderam ser realizados acerca de lipoxigenases. Foram identificadas 23 prováveis sequências que determinam a expressão de lipoxigenases e, de acordo com análises dessas sequências, estão conservados cinco sítios de ligação ao Ferro, incluindo duas Histidinas de consenso do domínio LOX. Também se verificou a presença de lipoxigenase em diversos tecidos vegetais de pepino, sugerindo que a enzima desempenha variadas funções (LIU et al., 2011). Através da técnica de RT-PCR, verificou-se que 13 dos 23 genes responsáveis pela expressão de lipoxigenase em pepino (*Cucumis sativus* L.) eram detectáveis, e que 12 deles apresentaram diferentes padrões de expressão no exocarpo, endocarpo e polpa. Quando submetidos a condições de estresse, revelaram transcrições diferenciais, o que indica suas diversas funções em respostas a estresse e desequilíbrio hormonal (YANG et al., 2012).

Uma lipoxigenase recombinante de milho foi construída e caracterizada bioquimicamente, demonstrando que a enzima apresentou maior atividade em pH 7,5. Analisando os produtos gerados através de HPLC e GC-MS, verificou-se a formação de 99% de 9S-hidroperóxido a partir de ácido linoleico. 13-hidroperóxido também foi produzido, mas em menor escala (cerca de 1%) e nas formas S- e R- na proporção de 2:3 (OSIPOVA et al., 2010). Outras lipoxigenases recombinantes de milho, ZmLOX4 e ZmLOX5, foram estudadas a nível molecular e bioquímico. Os

genes foram expressados em diferentes partes da planta - ZmLOX4 nas raízes e meristema apical e ZmLOX5 nos órgãos acima do solo. Ambos os genes responderam de maneira diferente ao ataque de inseto, sugerindo que eles podem ter papéis fisiológicos diferentes no crescimento e desenvolvimento da planta (PARK et al., 2010).

Um estudo com lipoxigenases de trigo (*Triticum aestivum* L.) comparou dois genes de lipoxigenase (TaLOX1 e TaLOX2) com outras 143 sequências de LOXs de outras plantas, e a partir disso realizou-se um estudo filogenético, onde constatou-se que LOXs de plantas podem ser classificadas em duas subfamílias – classificadas de acordo com a ausência (subfamília I) e a presença (subfamília II) de um segmento de peptídeo de cloroplasto (FENG et al., 2010).

Seis lipoxigenases recombinantes de *Arabidopsis* foram incubadas com NAE 18:2 e NAE 18:3 (N-acyl ethanolamine, poliinsaturado que serve como substrato alternativo para oxidação de lipídios, essencial no desenvolvimento de sementes) como substratos, e duas delas (AtLOX1 e AtLOX5) apresentaram atividade 9-LOX e as demais (AtLOX2, AtLOX3, AtLOX4 e AtLOX6) atividade 13-LOX (KILARU et al., 2011).

Também analisou-se a lipoxigenase presente na fruta do abacateiro. A enzima foi extraída, parcialmente purificada, e alguns parâmetros foram estudados. Verificou-se que a LOX de abacate tem como substratos preferíveis ácido linoleico e ácido linolênico, e apresentou ótima atividade a 40°C, em pH 6,5 e a 0,20 mM de concentração do íon Cálcio (JACOBO-VELÁZQUEZ et al., 2010).

Kanamoto et al. (2012) identificaram genes que codificam lipoxigenase em hepáticas, sugerindo que esta enzima não se encontra presente somente em plantas superiores, mas também em briófitas.

Lipoxigenase de mamíferos

A lipoxigenase de mamíferos 15-LOX tipo-reticulócitos foi largamente estudada com relação às propriedades enzimáticas, regulação celular da atividade de lipoxigenase e papel biológico da enzima (KUHN et al, 2002). Essa enzima apresenta uma especificidade muito ampla a substratos, como ácido α -linolenico, ácido linoleico e ácido araquidônico. Com este último, a enzima pode sofrer inativação suicida, embora este mecanismo seja ainda incerto (GAN et al., 1995). Quanto à regulação celular da 15-LOX tipo-reticulócitos, ela pode se dar por regulação transcricional, translacional e pós-translacional. A ação biológica que desempenha essa enzima, segundo a literatura, é de diferenciação celular, intermediária no processo de inflamação, desenvolvimento de asma bronquial, carcinogênese e aterogênese.

Radmark et al. (2007) estudaram a regulação da expressão e a atividade enzimática de uma 5-LOX, que catalisa os dois primeiros passos na biossíntese dos leucotrienos, um grupo de mediadores pró-inflamatórios lipídicos derivados do ácido araquidônico. O conhecimento da bioquímica desta enzima tem potenciais implicações para o tratamento de várias doenças. Verificaram que, no que diz respeito ao controle da atividade da enzima, ele está relacionado com o domínio N-terminal da 5-LOX.

Estudando a estrutura da enzima 5-LOX de humano foi encontrada uma sequência desestabilizada que está envolvida na orientação do carbono terminal que se liga ao sítio catalítico. Foi relatada a estrutura cristalina de resolução de 2,4 Angstroms estabilizada por essa sequência (GILBERT et al., 2011).

LOFTUS et al. (2011) clonaram uma 5-LOX canina, e através de estudos filogenéticos, verificaram que a sequência tem de 86 a 92% de homologia com outras espécies, demonstrando uma alta sequência conservada.

Através de métodos de espectrometria de massas e cromatografia quiral, foram analisados metabólitos produzidos em ovários de *Mytilus edulis*, e verificou-se

a presença de 11(R)- e 12(S)-hidroxilados, formados por enzimas lipoxigenases. Concluiu-se que gônadas femininas de *Mytilus edulis* expressam 11(R)- e 12(S)-lipoxigenases em diferentes estágios ovarianos (COFFA e HILL, 2000).

Estudos de lipoxigenases com finalidades terapêutica têm sido realizados no âmbito da medicina investigativa. A inibição da produção de LOXs nos animais pode vir a ter um grande potencial como tratamento de diversas doenças. O aumento da expressão de 5-lipoxigenase no sistema nervoso de ratos foi correlacionado com um agravamento do desenvolvimento do Alzheimer. Assim, uma inibição farmacológica dessa LOX poderia ser um tratamento contra esta doença (CHU et al., 2013). 12-lipoxigenase (12-LOX) tem sido relatada como sendo um gene importante na proliferação de células cancerígenas e na sobrevivência e metástases de tumores. A inibição da 12-LOX conduziu à redução do número de células de carcinoma hepatocelular, parcialmente causadas por um aumento da apoptose, o que torna um potencial alvo molecular para a prevenção e tratamento de carcinoma hepatocelular (XU et al, 2012).

3.3.5. Lipoxigenases em procariotos

Os progressos no estudo de LOX procariotas nos últimos anos se limitam a poucos micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa*, e as cianobactérias *Nostoc punctiforme* (*Anabaena*), *Cyanothece* sp, e *Acaryochloris marina*. As pesquisas estão focadas em elucidar a sequência genética e a caracterização das propriedades catalíticas da enzima, mas pouco se estuda a respeito de sua função bioquímica nos micro-organismos analisados ou a respeito da participação em determinadas vias metabólicas.

O desenvolvimento de técnicas de sequenciamento genômico propiciou identificar a presença do gene da lipoxigenase em diversas bactérias, em especial

proteo- e cianobactérias. Porém, o papel biológico que desempenham nesses microorganismos ainda não está elucidado.

Vance et al. (2004) verificaram a presença de uma 15-LOX- araquidônica em *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01, convertendo ácido araquidônico em ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE). Mediante análise da sequência de todo genoma da PA01, constatou-se que esta LOX apresenta homologia a LOX de eucariotos. A partir da base de dados “GenBank” se encontrou uma similaridade de 43,6% com respeito a 15-LOX- araquidônica tipo 2 de *Homo sapiens*, e 25,7% em relação a nível proteico. Os resultados demonstram que o patógeno *P. aeruginosa* está equipado para sintetizar mediadores químicos antiinflamatórios de eucariotos.

Oxilipinas e LOXs foram isoladas e analisadas em *Nostoc punctiforme* (PCC73102) (LANG e FEUSSNER, 2007). O DNA isolado gerou sequências de duas LOX distintas, chamadas de NpLox1 e NpLox2, e foram identificadas como 13-LOX de ácido linoleico. Através da sonicação das células, foi possível obter mais hidroperóxidos derivados da ação da LOX e oxilipinas não esterificadas do que quando as células não eram danificadas. No entanto, a quantidade de hidroperóxidos derivados da atividade da 13-LOX encontrados foi a mesma tanto em células rompidas como inteiras. Estes resultados indicam que a 13-LOX se expressam em *N. punctiforme* através do dano celular.

Recentemente se identificou em *Nostoc* sp PCC 7120 uma LOX bifuncional com atividade linoleato-diol-sintase, com estereoespecificidade R e a singularidade de ter uma alanina (Ala) no sítio que determina a especificidade quiral ao invés da altamente conservada glicina (Gly) (ANDREOU et al., 2008). Assim, caracterizou-se a atividade catalítica da porção C-terminal dessa LOX bifuncional. Para isto, este domínio LOX foi expressado em *E.coli* e purificado, e realizou-se mutações para verificar se a substituição da alanina por aminoácidos menores ou maiores alterariam a estereoespecificidade da enzima. Uma mutação da Ala por uma Gly não alterou a estereoespecificidade dos produtos, enquanto que a mutação por valina (Val) ou isoleucina (Ile) modificou tanto a regio- quanto a enantioseletividade da enzima. Quanto às constantes cinéticas, estas não foram alteradas de forma significativa quando a Ala foi substituída por Gly ou Val, mas apresentou uma V_{max}

(10E,12E)-9,14-dihidroxi-10,12- octadecadienoico como produto principal a partir de ácido linoleico e ácido (10E,12E,14E)-9,16- dihidroxi-10,12,14-octadecatrienoico como produto principal a partir de ácido α -linolênico (ALA), sendo este último o substrato preferido (ANDREOU et al, 2008). Extratos solúveis de *Nostoc* sp. apresentaram mais hidroperóxidos derivados da atividade de 9-LOX em células rompidas do que em células intactas, mas não se detectou produtos referentes a atividade de NspLOX. Como em todo o genoma de *Nostoc* sp. não há outra sequência de LOX, sugere-se que as oxilipinas encontradas podem ser produtos endógenos da NspLOX. Assim, NspLOX é uma 9R-LOX, que se desvia da especificidade do sítio Coffa, já que possui Ala em seu sítio ativo, mas gera produto R em vez de S. Isto sugere que, ou mais de um resíduo de aminoácido está envolvido na determinação da estereoespecificidade das LOXs, neste caso um aminoácido de cadeia maior levaria a atividade de 9S-LOX, ou que esta LOX “conta”os carbonos a partir do extremo metilo do substrato para inserir a primeira molécula de oxigênio.

A cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120 também apresenta em seu genoma o gene correspondente a uma LOX (ZHENG et al., 2008). A sequência codifica uma proteína de fusão similar a uma hemoproteína catalasa com uma LOX pequena presente no C-terminal. Esta mini-LOX contém ferro não-heme em seu sítio ativo e apresenta alta atividade com ácido linoleico e ácido linolênico, gerando os respectivos 9R-hidroperóxidos, a imagem espelho dos produtos da 9S-LOX das plantas. Uma mutação dirigida no sítio ativo com Ala, tipicamente conservada com Gly em R-LOX, revelou que essa substituição com Gly mantém a especificidade 9R, enquanto que a substituição por Val muda a oxigenação a 13S, implicando que a Ala represente o equivalente funcional da Gly em outras R-LOXs. Zheng et al. (2008) verificaram que esta mini-LOX, apesar de não possuir o domínio β -barril e sequência adicional, é cataliticamente completa. As LOXs de mamíferos e plantas estão relacionadas em sequência apenas pelo domínio catalítico de *Anabaena*. Verificou-se que a proteína de fusão completa e o domínio LOX isolado converte ácido linoleico e ácido linolênico a 9R-hidroperóxidos, o mesmo ocorre com o ácido araquidônico, que foi convertido a seu produto equivalente para um ácido graxo de 20 carbonos, 11R-HPETE (ZHENG et al, 2008).

A cianobactéria *Acaryochloris marina* também apresenta uma proteína com atividade LOX, codificada como proteína de fusão com uma hemoproteína similar a catalasa, e se notou atividade enzimática do domínio LOX. Gao et al. (2010) expressaram em proteínas recombinantes em *E. coli* a proteína completa e o domínio C-terminal com atividade LOX. Verificaram que o domínio LOX de *A. marina* contém os típicos ligantes de um ferro com disposição não-heme – três histidinas, uma asparagina e uma isoleucina no C-terminal. Verificaram também que *A. marina* possui Gly586 em seu sítio Coffa, originando produtos R-específicos. O domínio LOX de *A. marina* oxigenou os ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados na posição n-7 e com estereoespecificidade R. O ácido α -linoleico e o ácido estearidônico (C18.4 ômega-3) foram transformados nos correspondentes 12-(R)-hidroperóxidos, o ácido eicosapentanóico em 14-(R)-hidroperóxido e o ácido docosahexanóico em 16-(R)-hidroperóxido. Os ácidos graxos ômega-6 poliinsaturados foram oxigenados formando o ácido 9-(R)-hidroperoxi-octadecadienoico a partir de AL, e ácido 11-(R)-hidroperoxi-eicosatetraenoico a partir de AA. O ácido estearidônico – ácido graxo predominante em *A. marina* – quando transformado metabolicamente pela proteína completa (domínio LOX e hemoproteína similar a catalasa) produz uma oxidação 12R, com subsequente conversão pelo domínio similar a catalasa a um epóxido aleno, provavelmente um precursor ou derivado da ciclopentanona ou ciclopentenona envolvidos na via do jasmonato, ou outras moléculas de sinalização interna (GAO et al., 2010).

Cyanothece sp é outra cianobactéria que apresenta em seu genoma genes homólogos a genes de LOX. Andreou et al. (2010) clonaram e expressaram um desses genes, o qual chamaram CspLOX2. Verificaram que se tratava de uma mini-LOX que catalisa a conversão do ácido linoleico a ácido 11-(R)-hidroperoxioctadecadienoico, um hidroperóxido bisalílico, como produto maioritário. CspLOX2 também origina uma mistura de produtos de lipoxigenação típicos, contendo, por exemplo, hidroperóxidos 9R e 13S. Esse hidroperóxido bisalílico apenas havia sido descrito anteriormente para uma LOX do fungo *Gaeumannomyces graminis*, que utiliza Mn em seu sítio ativo. No entanto, CspLOX utiliza Fe no lugar de Mn. Se concluiu que CspLOX é uma nova mini-LOX que possui

ferro não-heme e catalisa a formação de hidroperóxidos dialílicos, o que, até então era comum em LOX com Mn em seu sítio ativo.

Garreta et al. (2011) obtiveram o primeiro cristal de uma LOX bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. O cristal apresentou uma estrutura com um domínio único, sem o domínio N-terminal PLAT, que aparece nos cristais de LOX até agora descritos. A LOX de *P. aeruginosa* contém duas hélices α antiparalelas (α 2A e α 2B) formadas pela inserção de 90 resíduos e adjacente à entrada da cavidade do substrato, podendo ter como função ser uma “tampa” – e que não havia sido descrita anteriormente. Apresentou também a presença de um condutor secundário com forma de cavidade, que permitiria o acesso do oxigênio molecular no centro ativo da enzima. A estrutura cristalina da LOX de *P. aeruginosa* 42A2 ainda revelou uma forte interação entre a cavidade catalítica da enzima e um fosfolipídio - a cadeia alifática de 18 carbonos do fosfolipídio chega até o sítio ativo enquanto a outra cadeia alifática de 14 carbonos atua com a nova estrutura de hélices α antiparalelas (Figura 9).

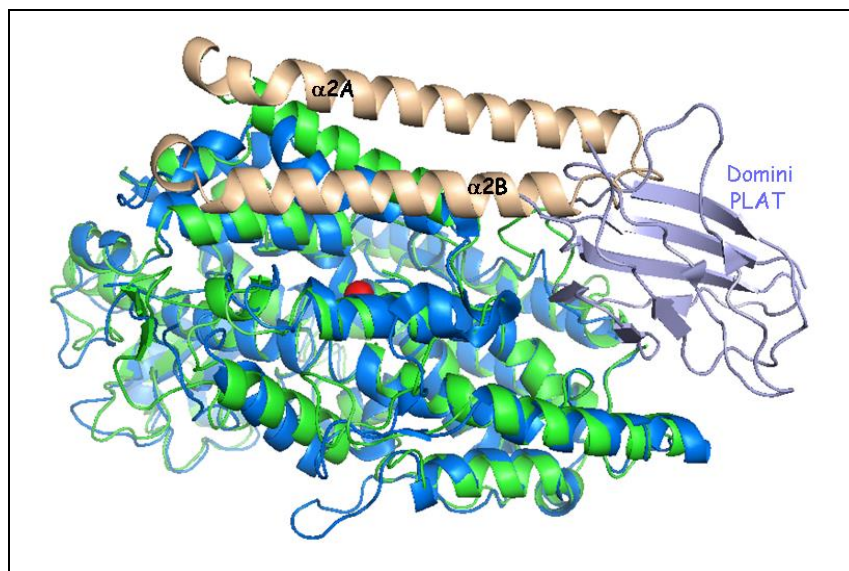


Figura 9: Superposição de estruturas de LOXs de *Plexaura homomolla* (em azul), e *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (em verde), em rosa se observam as 2 hélices antiparalelas (α 2A e α 2B) de *P. aeruginosa* formadas pela inserção de 90 resíduos, e a falta do domínio N-terminal PLAT, presente em *Plexaura homomolla* ausente em *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (GARRETA et al., 2011).

3.3.6. Estudo filogenético das lipoxigenases

A determinação da estrutura primária de muitas proteínas permite realizar relações evolutivas entre elas. Em um estudo evolutivo ideal as proteínas são alinhadas por sua sequência de forma linear e comparadas por sua estrutura terciária. Mas isso nem sempre é possível, pois não se conhece a estrutura terciária de muitas proteínas.

Para realizar uma análise filogenética e evolutiva se analisam as mutações produzidas ao longo do tempo sobre determinada sequência. Em diferentes estudos filogenéticos de lipoxigenases se observa distintas agrupações, dependendo de sua origem, da sua localização ou sua especificidade, já que as lipoxigenases possuem conservados somente os resíduos do centro ativo.

Diversos autores se dedicaram a estudar a filogenia das lipoxigenases, tanto de plantas como de mamíferos.

Cheng et al. (2006) clonaram dois genes de lipoxigenase de *Populus deltoides* e, com base nessas sequências e outras adquiridas no banco de dados, realizaram um estudo filogenético. Lipoxigenases tipo 2 13-LOX foram identificadas como um grupo. Estudos anteriores indicam que estas LOXs são responsáveis pelo desenvolvimento de resistência e tolerância ao estresse na planta – os clones de *Populus deltoides* se encontram neste grupo. Esse grupo foi dividido em 2 sub-espécies: um apresentou LOX de dicotiledôneas e monocotiledônias, e o outro somente de dicotiledôneas. Outro grupo identificado foi o de LOX tipo 1, relacionados com desenvolvimento de resistência em plantas, mediando atividade anti-microbiana via síntese de oxilipinas.

Feng et al. (2010) compararam um cluster de 47 sequências de aminoácidos que geram lipoxigenases de plantas. Formaram-se dois grupos muito bem definidos: o primeiro grupo, contendo 33 membros, os quais não continham peptídeo-sinal de cloroplastos, e o segundo grupo, com 14 membros, os quais tinham uma sequência

de cloroplastos. No primeiro grupo, observou-se a formação de dois sub-grupos, G1, composto exclusivamente de LOXs de dicotiledôneas, e G2, exclusivamente de monocotiledôneas. Já no segundo grupo, se observa G3 e G4, ambos com lipoxigenases de mono e dicotiledôneas.

Quanto a estudos filogenéticos de lipoxigenases de procaríotos, muito pouco se há agregado até então. Andreou e Feussner (2009) geraram uma árvore filogenética a partir de sequências de lipoxigenases de mamíferos, plantas, briófitas, corais, algas e cianobactérias. Dentre as plantas, estas se dividiram em 3 grupos: 13(S)-LOX legumes, 13(S)-LOX tipo 2 e 9(S)-LOX tipo 1. As lipoxigenases de mamíferos formaram um grupo a parte, que ficou entre dois grupos de lipoxigenase de procaríotos, o 9(R)-LOX e 13(S)-LOX (Figura 10).

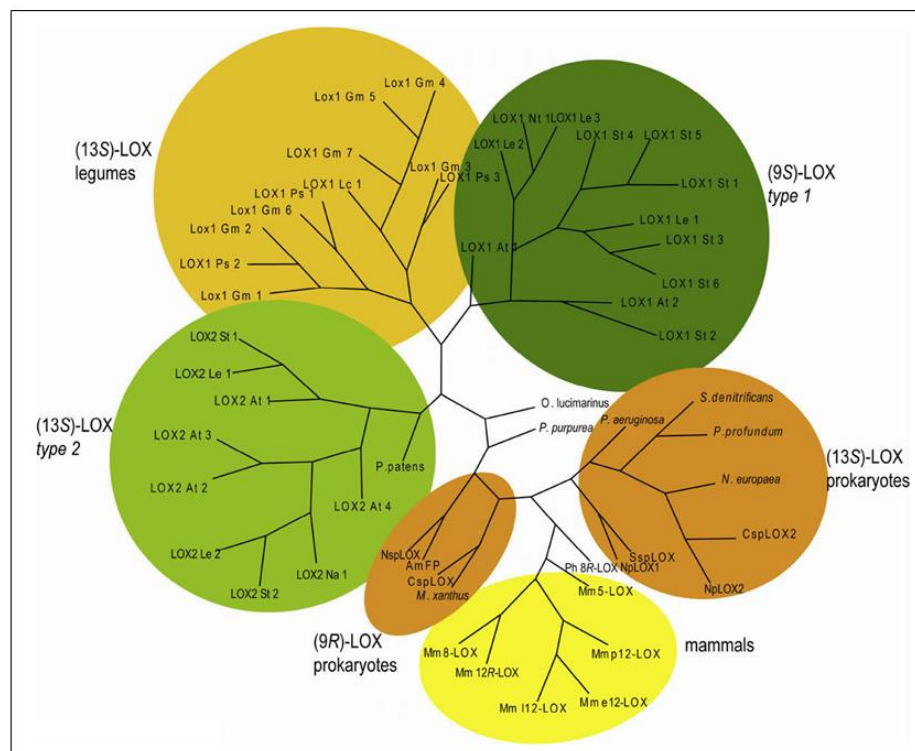


Figura 10: Análise filogenética de proteína LOX de plantas, mamíferos, fungos, corais, algas e cianobactérias (ANDREOU e FEUSSNER, 2009).

Os genes de lipoxigenase de Cianobactérias também foram estudados (KOEDUKA et al., 2007). Os genes de lipoxigenase de *Nostoc punctiforme* foram clonados e expressados em *Escherichia coli*, obtendo-se a proteína recombinante. Esta, quando incubada com ácido linoleico, resultava num hidroperóxido 13-S. Alinhamentos realizados com outras LOXs indicaram que três histidinas, a isoleucina C-terminal, e o quinto ligante (H327, H332, H510, I630, y N514 em NpLOX1, y H245, H250, H427, e N431 em NpLOX2), todos relacionados com a coordenação do ferro não-heme, estão adequadamente situados. No entanto, em NpLox, a isoleucina C-terminal está trocada por uma valina (Figura 11).

Neste estudo também verificou-se que a diferença entre as LOXs de *P. aeruginosa* e as NpLox é que as primeiras contêm uma sequencia N-terminal que as tornam enzimas secretáveis, enquanto a NpLox são enzimas solúveis em citoplasma.

NpLOX1	-----MTALSPDHSI	10
NpLOX2	-----MKPYLPQNDPD	11
PaLOX	<u>MKRRSVLLSGVALSGTALANDS</u> IFFSPLKYLGAEQQRSIDASRSLLDNLTPPSLPQYDNI	60
NpLOX1	S----SSSTHTLDIARQEQYQVNYNHIPSTAMVDRI SITEEFTTNWYFLLAQQLRVLFINT	66
NpLOX2	P----TRQILLERNQGEYEFDYDFLVPMAMLKNVPSIENFSTKYIAERTLETAELPFINM	67
PaLOX	AGKLARFAVLTSKILAYVVTENFANVKGVPMARSVPLGELPNVDWLLKTAGVIVELIVNS	120
NpLOX1	LIVNRGNQDSKSTRDDVERFILEALLKGAVPARISILARILQIIPQLLKEISKDFRELD	126
NpLOX2	LAVK-----TRSLWDPLD-----	80
PaLOX	FASLPASAAAQFERIPAGLNGDLEAARQVHEAL EEAKNDPAAAGSLLRFTELTQTRVIA	180
NpLOX1	DLFHSILKENGIAILRDAIKRIITLLYEGOPTGHATS LKDYENIFPVISLPATAKTYQED	186
NpLOX2	-----ELQDYEDYFPVLPKPNITKTYQSD	104
PaLOX	LLTRVGLLVDDILKSASNLVTQ-----GGQCDGLNRFRAVFGTLRLPEVADSEFRDD	231
NpLOX1	EVFAYMRVAGYNPVTIKRVTTLSDRFPVTDEHYQAVMGTDDSLAAAGIEGRLYLADYKIL	246
NpLOX2	DSFCEQLCGANPEVIRRIEQMPDGFAFTILELEQKFGDSINLVEKLANGNLYVADYRAL	164
PaLOX	EAFAYMRVAGPNPLIRRVDAIPANFPVIGEEQFRVMGADDSLEAAASRRLYLIDYAEIL	291
NpLOX1	DGAING----TFPFEQKYLAPIALFALPK--GSDPTRLRPVAIQCGQTPGPDYPTVTPN	301
NpLOX2	AFVKGK----SYERGKFLPTPIAFFCWRSSGFS DRGQLVPIVIQINPADGKQSOLITPF	220
PaLOX	CKLAPSGAVDKLLTGTGFAYAPIALFALGK----DRARLLPVAIQCGQDPATHPMFVRPA	347
NpLOX1	SGK----YAWLFAKTIVQIADANIHEAVTHLARHLLVGVFAIATARQLPLTHPLRILLR	357
NpLOX2	DDP----LTWFHAKLCVQIADANHHHEMSSHLCRTHFVMEPFATVITARQLAENHPLSILLK	276
PaLOX	ESESPLYGWQMAKTIVVLVAEENYHEMFVHLAOTHLVSEAFCLATORLAPSHPLHVLILA	407
	▲ ▲	
NpLOX1	PHFDSITLAINDAQORILIAPEGGVDRLLSSSIDNSRVLAVLGLQSYSFNSTILPNQFQR	417
NpLOX2	PHFRFMLANNDLARKRLISRGGPVDELLAGTIQESLQIVVNAYTEWSLDQFSLPTELKNR	336
PaLOX	PHFEGTLFVNEGAARILLPSAGFIDVMAAPIOQTQATAGGNRLGDFYRGMPLPESLKAR	467
	◆	
NpLOX1	GVDDPNLLEIYPYRDDALLIWNATHQVWVDYLNIIYTTDEDIQKDRALQAWAAEIPAYDG	477
NpLOX2	GMDDPNLEPHYPYRDDGLLWNAIKKFEVSEYLOIYYKTPQDLAEDLELQSWVQELVVSQSG	396
PaLOX	NVDDPAALPDYYPYRDDGLLWNAIRQWAAADVAVYYASDGDVTADVELAAWVGEVIGSG-	526
NpLOX1	GRIPDFGEGDGGIKTLNYLIDATLII FTASAQHAAVNFPOKDIMCYAAAIPLAGYLPAST	537
NpLOX2	GRVKGTSER--INTLDQLVDATAVIFTCGPOHAAVNYSQYLYMTFMNMLPAAAYKQMTS	454
PaLOX	----KVAGFRPITGRSOLVEVLTVMVIFTASAQHAAVNFPOPSMPTYAPATCAMSAAPAPD	582
	▲ ▲	
NpLOX1	LKREVTEDYLNILPFLDQARQYNI LSLGVSYYNKLGEYEQGYFTDEKVKP-----	590
NpLOX2	EGTIPDRKSLLSFLPSPKQTADQLSILFTLSAYRYDRLGYLD-KFLDPEAQD-----	506
PaLOX	SPSGKSEADWLKMMPPALVALEKVNIIYHLLGSVYHGRLGDYRCITGFYPYAPVFSDRRVITAS	642
NpLOX1	--LLQAFQSHLQOVENTIKQRNLHRPP--YEYLLPSKIPOSINI	630
NpLOX2	--VLARFQOELNEARETELNKSRLLINYNLKPRLVNTNSTSV	547
PaLOX	GGPLERFQARLKEVEATIRTRNQARRKPYEYLLPSRIPASTNI	685
	▲	

Figura 11: Sequência de alinhamentos de NpLOX1, NpLOX2, *P. aeruginosa* LOX (KOEDUKA et al., 2007).

Também foi feita uma análise filogenética das sequências dos genes de NpLox, demonstrando uma alta homologia com a sequência de LOX de *P. aeruginosa*, e estas enzimas formam uma subfamília diferente de outras LOX de procariontes.

3.4. SISTEMAS DE CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Atualmente, diversos sistemas de expressão de proteínas heterólogas foram desenvolvidos e disponibilizados no mercado, seja procarióticos ou eucarióticos. Dentre os eucarióticos destacam-se aqueles constituídos por leveduras, geralmente *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*, e células de mamíferos, aves e insetos transfectadas com vetores virais apropriados. Nos sistemas procarióticos destacamos a utilização de *Escherichia coli* no processo de expressão proteica (WALSH, 1998). Este sistema é o mais comumente usado na produção de proteínas recombinantes heterólogas. No âmbito comercial, diversas proteínas de interesse terapêutico são produzidas utilizando-se esse método: insulina, hormônio de crescimento, dentre outras, obtendo-se alto nível de expressão. Isto certamente se deve ao fato de serem de fácil manipulação, crescerem em curto espaço de tempo e necessitarem meios relativamente simples. Os processos de extração e purificação da proteína recombinante são menos complexos e apesar de não permitirem modificações pós-traducionais, a expressão de proteínas em *E. coli* tem apresentado grande êxito. (LUGOVSKAYA et al., 2006).

A escolha do processo para a síntese e purificação de proteínas recombinantes é determinada por uma variedade de critérios, onde destacam-se as propriedades biológicas intrínsecas da proteína desejada, a finalidade de sua obtenção e a viabilidade econômica do método.

Se por um lado os sistemas procariotos são detentores de inúmeras vantagens, com destaque para a sua maior simplicidade e grande capacidade de produção de proteínas heterólogas, podem não funcionarem apropriadamente, dependendo do material genético molecular que transcreve essa proteína, e da natureza da proteína a ser expressa. As bactérias são hospedeiras mais comuns para expressão de proteínas recombinantes. No entanto, não possuem sistema de endomembranas e não realizam modificações pós-traducionais, o que pode impedir o correto processamento de proteínas a serem expressas (CREGG, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRO-ORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas:

Shewanella woodyi ATCC 51908, obtida da coleção de micro-organismos da Facultat de Farmacia, Universidad de Barcelona, Espanha.

Escherichia coli DH5 α : Apresenta um genótipo F⁻ *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (rk⁻ mk⁻) *glnV44 deor* Δ (*lacZYA-argF*)u169 [Φ 80d Δ (*lacZ*)M15]. Permite a complementação com o extremo N-terminal da β -galactosidase, e é recomendada em experimentos de clonagem.

Escherichia coli BL21(DE3): Apresenta um genótipo F⁻ *ompT hsdS_B* (rB⁻, mB⁻) *gal dcm* λ (DE3). Cepa de *E.coli* que permite uma eficiente expressão proteica de diversos vetores que possuam o promotor da RNA polimerase T7. A RNA polimerase é fornecida pelo bacteriófago λ DE3, o qual está integrado no cromossomo da bactéria BL21.

Escherichia coli BL21(DE3) pLys: Apresenta o genótipo F⁻ *ompT hsdS_B*(rB⁻ mB⁻) *gal dcm* (DE3)pLysS (Cam^R). Cepa que expressam T7 lisozima, e suprimem a expressão basal de RNA poimerase T7, estabilizando recombinantes pET que codificam proteínas alvo.

Escherichia coli BLR: Essa cepa é um derivado *recA* da BL21(DE3), que pode melhorar o rendimento da expressão e estabilizar o plasmídeo que contém a sequência alvo.

4.2. MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Utilizou-se o meio caldo marinho (Difco –Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) na concentração de 55,1g/L para crescimento da cepa de *Shewanella woodyi* ATCC 51908. Para crescimento em placas de petri da cepa de *S. woodyi*, foram utilizados placas contendo ágar marinho na concentração 37,4g/L (Difco –Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Para o cultivo, manutenção e experimentos de transformação das cepas de *E.coli*, utilizou-se meio Luria-Bertani (LB). Este foi preparado nas seguintes concentrações: 10g/L de triptona (Oxoid – Oxoid Ltd., Cambridge, UK), 10g/L de NaCl (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 5g/L de extrato de levedura (Oxoid – Oxoid Ltd., Cambridge, UK), ajustando a pH 7,0. Para crescimento em placas de petri das cepas de *E. coli* se utilizou placas de meio sólido adicionando-se ao LB ágar bacteriológico a uma concentração final de 15 g/L.

Para seleção e manutenção dos clones recombinantes de *E. coli*, os meios foram suplementados com antibióticos:

- Ampicilina: preparou-se uma solução concentrada de 100 mg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em água destilada. A solução foi esterilizada por filtração e adicionada ao meio a uma concentração final de 100 µg/mL.
- Kanamicina: preparou-se uma solução concentrada de 100 mg/mL de kanamicina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em água destilada. A solução foi esterilizada por filtração e adicionada ao meio a uma concentração final de 100 µg/mL.

Para a seleção dos clones recombinantes mediante o sistema de α -complementação (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 2001), utilizou-se placas de

meio LB sólido suplementadas com IPTG - isopropil- β -D-tiogalactosidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranoside (Fermentas –Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Foram preparadas soluções concentradas de IPTG em água destilada a 100 mg/mL e X-Gal em dietilformamida a 50 mg/mL. As concentrações finais de IPTG e X-Gal nas placas eram de 100 μ g/mL e 40 μ g/mL, respectivamente (Promega Co., Madison, WI, USA).

No caso da cepa de *S. woodyi* ATCC 51908 cultivada em caldo marinho, o crescimento se deu em mesa agitadora a 25°C, agitação de 150 rpm, por 16 horas. Para o cultivo líquido de *E. coli* recombinante, o crescimento foi a 37°C a 150 rpm, por 16 horas.

4.3. VETORES

Utilizou-se o vetor pGEM-T Easy (Promega Co., Madison, WI, USA) para clonar fragmentos de DNA obtidos a partir de PCR. Este vetor apresenta-se preparado, aberto com EcoV e com uma Timina adicionada ao terminal 5', o que aumenta sua eficiência, pois previne a recircularização do vetor e facilita a inserção do produto de PCR. Este vetor contém promotores de RNA polimerase T7 e SP6, que flanqueiam uma múltipla região de clonagem em peptídeo α codificante da enzima β -galactosidade – inativando α peptídeo pode-se rastrear os clones recombinantes através da coloração azul/branca. O vetor pGEMTeasy contém 3000pb, e contém o gene que codifica resistência à ampicilina (Figura 12).

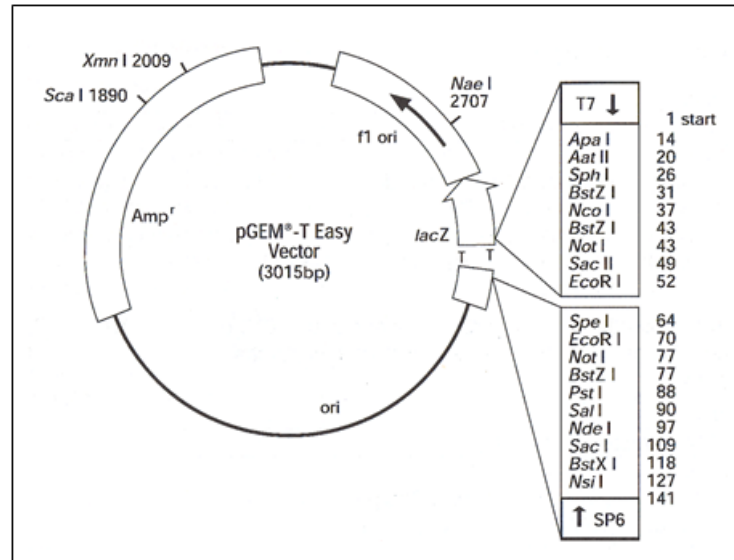


Figura 12: Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy

Como vetor de expressão utilizou-se pET28a(+) (Novagen - Merck KGaA, Darmstadt, Germany), que possui kanamicina como marcador de seleção (Figura 13). Contém no amino-terminal uma região que codifica seis Histidinas depois da região de clonagem, o que promove posteriormente a possibilidade de purificar a enzima recombinante com cromatografia de afinidade em coluna carregada de níquel. Esse vetor possui 5369pb e conta com uma zona de clonagem sob influência do promotor T7 regulado pelo repressor lac e induzido pela adição de d'isopropil- β -D-tiogalactosidase (IPTG).

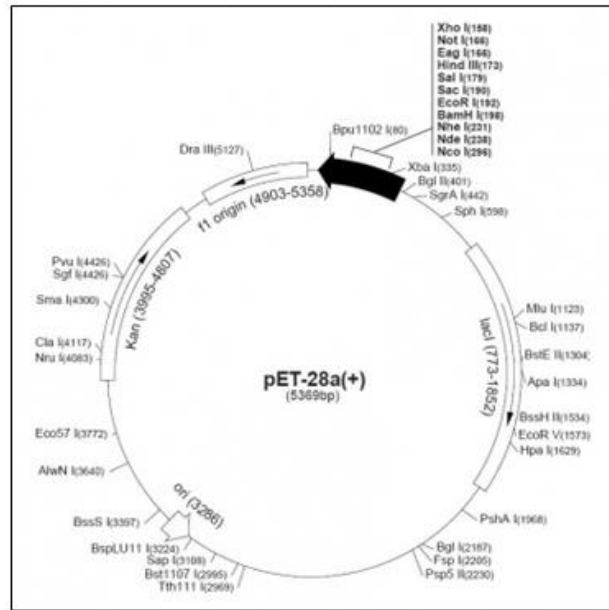


Figura 13: Mapa do vetor pET-28a

4.4. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA

4.4.1. Extração do DNA genômico

S. woodyi ATCC 51908 foi crescida em caldo marinho, a uma temperatura de 25°C, agitação de 150rpm, por 16 horas. Em seguida uma alíquota de 10mL de cultivo contendo as células foi utilizada para extração do DNA genômico da bactéria. Este material foi centrifugado a 8,000g, durante 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células suspensas, segundo o protocolo de “*DNA Purification Kit Wizard Genomic*” (Promega Co., Madison, WI, USA).

4.4.2. Extração do DNA plasmídico

E.coli recombinante foi crescida em meio Luria-Bertani, a uma temperatura de 37°C, agitação de 150 rpm, por 16 horas. Em seguida uma alíquota de 10 mL de

cultivo contendo as células foi utilizada para extração do DNA plasmidial da bactéria. Este volume de cultivo foi centrifugado a 8,000g, durante 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células contendo o plasmídeo de interesse suspendidas segundo o protocolo de “*DNA Purification System Minipreps*” (Promega Co., Madison, WI, USA).

4.4.3. Desenho e síntese de oligonucleotídeos

Os nucleotídeos foram desenhados com base na sequência nucleotídica de *Shewanella woodyi* ATCC 51908 depositada no banco de dados genômico NCBI. Foram calculadas as temperaturas de desnaturação (T_m), formação de dímeros, falsos positivos, zonas de autohibridação. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das zonas codificantes correspondentes à extremidade C-terminal e N-terminal das prováveis lipoxigenases de *S. woodyi* ATCC 51908, com a ajuda do programa “Vector NTI® Advance Software”. A síntese foi realizada por Sigma-Aldrich Espanha (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Na tabela 1 se descrevem as sequências nucleotídicas utilizadas neste trabalho.

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos desenhados a partir das zonas codificantes correspondentes à extremidade C-terminal e N-terminal das prováveis lipoxigenases de *S. woodyi* ATCC 51908, utilizados para amplificar os genes de interesse.

	Oligonucleotídeos
Lipoxigenase Precursora - <i>Sense</i>	TTA GTT ATG ACT AAT AAG AAT GAC AAT C
Lipoxigenase Precursora - <i>Antiense</i>	TCC CTT ATT AGT TCC AAG GAC TTA C
Lipoxigenase Araquidônica - <i>Sense</i>	ACG CGC ATG AGA GAT AAC TCA TTA C
Lipoxigenase Araquidônica - <i>Antisense</i>	CTC TTT GAG TTA GAT GCT TAT GCT ATT GG

4.4.4. Amplificação *in vitro* do DNA através de PCR

Utilizou-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificar *in vitro* os genes de lipoxigenase de *S. woodyi* ATCC 51908, os quais foram confirmados no banco de dados genômico NCBI.

A reação realizou-se em termociclador QCyler (Antarus Biotech Inc.), com os seguintes elementos:

- desoxiribonucleotídeos (dNTP) 2.5mM
- AmpliTaq Gold DNA Polimerase (Applied Biosystems, Paisley, UK) 2.5 U/ul
- primers *sense* e *antisense* 50uM
- DMSO
- DNA 30 ng/ul
- H₂O bidestilada estéril até um volume final de reação de 60 ul.

As diferentes condições de amplificação variam de acordo com os primers utilizados e com o fragmento a amplificar. Na Tabela 3 encontram-se as condições utilizadas:

Tabela 3: Condições utilizadas para amplificação dos genes *Lox_Precursor* e *Lox_Araquidônica*.

ETAPA	Lox_Precursora		Lox_Araquidônica	
	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura
início	5'	95°C	5'	95°C
desnaturação	45''	94°C	45''	94°C
hibridação	1'	50°C	1'	55°C
extensão	1' 30''	72°C	1' 30''	72°C
extensão final	10''	72°C	10''	72°C
finalização	∞	4°C	∞	4°C

4.4.5. Eletroforeses de DNA em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR, as mini-preparações de DNA plasmidial bem como as digestões com enzimas de restrição, foram eletroforicamente separados em gel de agarose 0,8 a 1% (p/v) preparado em tampão tris-acetato-EDTA (TAE). Após a corrida, o gel foi submergido por aproximadamente 30 minutos em tampão TAE contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg/mL, e o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta.

4.4.6. Purificação de DNA em bandas de gel de agarose

Os produtos de PCR e de restrições enzimáticas foram retirados do gel de agarose com o auxílio de um bisturi, e purificados utilizando-se o kit comercial “*Wizard SV Gel and PCR clean up system*” (Promega Co., Madison, WI, USA).

4.4.7. Preparação de células competentes

A partir de um pré-cultivo de 20 mL de *Escherichia coli* incubada a 150rpm, 37°C, por 12 horas, em meio Luria-Bertani, foram inoculados 10 mL em um erlenmeyer com 50 mL de meio Luria-Bertani, e incubados nas mesmas condições até chegar a uma densidade optica de 0,4 a 600nm (fase exponencial). O cultivo foi mantido a 0°C durante 10 minutos, e logo em seguida centrifugado durante 15 minutos, a 4°C, a 2.700g. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 30 mL de CaCl₂ 50 mM. A suspensão celular foi incubada a 0°C durante 20 minutos, e tornou-se a centrifugar a 4°C, 2.700g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 3,5 mL de CaCl₂ a 50 mM com 15% de glicerol (v/v). As células foram mantidas em gelo por 1 hora, aliqüotadas em microtubos e armazenadas a -80°C para posterior utilização.

4.4.8. Clonagem em vetor pGem-Teasy

Os genes SWPrecLOX e SWAraCLOX foram inicialmente clonados no plasmídeo pGEM-Teasy (Promega Co., Madison, WI, USA). O pGEM-T Easy Vector é um vetor de clonagem que é adquirido linearizado e suas extremidades 5' possuem timidinas, as quais viabilizam a ligação de produtos de PCR diretamente, pois a enzima Taq polimerase acrescenta uma adenina na extremidade 3' dos produtos de PCR, que pareiam com as timidinas do vetor, possibilitando a ligação. Além disso, este vetor, como visto na Figura 12, traz o gene *lacZ* da β-galactosidase, possibilitando a identificação das colônias que apresentam o plasmídeo recombinante de interesse, pois, quando o produto da PCR é ligado ao vetor, o gene da β-galactosidase fica interrompido e a enzima, por isso, fica inativa, gerando colônias brancas. Do contrário, o gene fica contínuo e a enzima funcional, de forma que, quando expressa, catalisa a reação de hidrólise do X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactosídeo), um análogo cromogênico da lactose, formando colônias azuis.

A ligação dos produtos de PCR ao pGEM-Teasy foi feita incubando-se 30ng do vetor, 70ng de cada produto de PCR, 3U de T4 DNA ligase mais Rapid Ligation Buffer 1X (30 mM de Tris- Cl pH 7,9, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 0,5 mM de ATP e 5% PEG) em um volume total de 10 µL em cada reação, a 24°C, por aproximadamente 24 h.

Após a ligação, 2µL deste meio reacional foi utilizado para transformar por choque térmico células competentes de *E. coli* DH5α. Estas foram plaqueadas em meio Luria Bertani - LB (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extrato de levedura e 0,5% (p/v) NaCl) com ampicilina (100 µg/mL), 20 µL de X-Gal (50mg/mL) e 100 µL de IPTG (100 mM) espalhados sobre o meio. Algumas colônias brancas, escolhidas ao acaso, foram submetidas à confirmação da clonagem de sequenciamento e confirmação da presença do inserto. Após a confirmação dos clones, escolheu-se um de cada gene para ser submetido à clonagem no vetor pET28a(+).

4.4.9. Digestão dos clones positivos

Foram feitas mini-preparações dos clones em investigação, seguindo o protocolo do *Kit Wizard Miniprep System* (Promega Co., Madison, WI, USA). As digestões dos plasmídeos foram conduzidas por 16h a 37°C utilizando-se a enzima *NotI* (Hoffmann-La Roche Ltd.). Os produtos das digestões foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em TAE.

4.4.10. Clonagem em vetor pET 28a (+)

O produto da digestão do clone em pGEM-Teasy com a enzima *NotI*, purificados conforme o item 4.6, foram ligados ao vetor pET-28a(+) digerido com a mesma enzima. Para esta ligação foram incubados por 24 h a 16°C,

aproximadamente 30 ng de pET-28a(+) digerido com *NotI*, 20 ng de inserto e 3U de T4 DNA Ligase.

Células de *E. coli* BL21pLys, *E.coli* BLR e *E.coli* BL21 foram submetidas a tratamento com Ca^{2+} para tornarem-se competentes, ou seja, transitoriamente permeáveis a moléculas de DNA, assim como a *E.coli* DH5 α , descrito no item 4.7.

Após a ligação, 2 μL deste meio reacional foram utilizados para transformar por choque térmico as células competentes. Algumas colônias, escolhidas ao acaso, foram submetidas à confirmação da clonagem através de PCR de amplificação com oligonucleotídeos específicos, e posterior sequenciamento.

4.5. EXPRESSÃO DE LIPOXIGENASES RECOMBINANTES E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS

4.5.1. Sistema de indução e expressão

Uma colônia isolada da bactéria contendo os plasmídeos de interesse, cultivada em placas com meio LB com o antibiótico específico, foi inoculada em 50mL do respectivo meio líquido também contendo o antibiótico adequado. Este inóculo foi incubado a 37°C, sob agitação (150 rpm) por aproximadamente 24h. Após este tempo, esta cultura foi inoculada em uma concentração de 5% em um novo cultivo, o qual foi também conduzido com o meio LB contendo o antibiótico adequado, a 37°C sob agitação (150 rpm) até atingir uma Abs_{600nm} de aproximadamente 0,4. Ao atingir a absorbância desejada, adicionou-se o indutor IPTG a concentrações finais entre 0,015mM e 1mM. As amostras foram incubadas entre as temperaturas de 16°C a 37°C, sob agitação (150rpm) por 18 h. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 8000.g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em tampão adequado e armazenadas a -20°C. As células estocadas foram descongeladas e submetidas a ultrassom a 60 W de potência em 3 ciclos de 60 s em sonicador Branson/250, para serem lisadas. Após lise, foram centrifugadas por 40 min a 8000.g a 4°C, o sobrenadante coletado (chamado SN1) e o precipitado suspendidos em 60mL de tampão fosfato de sódio

0,5 M pH 7,5, no caso da enzima recombinante SWAraCLOX, e tampão borato 0,2M pH 8,0, no caso de SWPreCLOX, com N-lauril sarcosina na proporção de 0,2% do detergente. A amostra foi incubada a 23°C, 150rpm, por 16 horas, e centrifugada a 8,000g por 40min, gerando as frações SN2 (segundo sobrenadante) e P2 (segundo precipitado).

Para todas as condições testadas, paralelamente foram incubadas duas amostras controle distintas, que consistiam em uma cepa de *E. coli* sem a presença do plasmídeo recombinante, a qual foi submetida às mesmas condições de temperatura e concentração de indutor que o material de trabalho e o clone recombinante (contendo o plasmídeo com o gene de lipoxigenase), porém sem a indução por IPTG.

4.5.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada através da mediação por nanodrop (Thermo Scientific – Nanodrop 1000 Spectrophotometer).

4.5.3. Purificação parcial das enzimas recombinantes

Para a purificação das enzimas recombinantes foram utilizados as técnicas de cromatografia de troca iônica e, subsequentemente, cromatografia de afinidade. Para a cromatografia de troca iônica utilizou-se uma coluna HiTrap Q-Sepharose (Amershan Biosciences/GE Helthcare), equilibrada com 5 volumes de tampão fosfato 50mM a pH 7,5, os extratos proteicos aplicados a um fluxo de 1mL/min, a coluna lavada com mais 5 volumes de tampão fosfato 50mM a pH 7,5, e a enzima eluída com um gradiente salino de NaCl na concentração de 300mM a 800mM. As frações foram recuperadas em tubos de 1mL. As frações que apresentaram atividade foram centrifugadas em filtros de membranas 30,000 NMWL (Millipore – Billerica, MA, USA) para a retirada do sal e eram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade. Nesta etapa utilizou-se coluna Histrap Chelating – 5 mL

(Amershan Biosciences/GE Helthcare), previamente lavada com 3 volumes de água padrão ultra puro, para a retirada do etanol (utiliza-se etanol 20% (v/v) durante o armazenamento da coluna). Já carregada com sulfato de níquel 100mM, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão fosfato de sódio 50mM a pH 7,0, e as frações ativas obtidas da purificação anterior foram aplicadas na coluna, esta foi lavada com 5 volumes de tampão fosfato de sódio 50mM a pH 7,0, e as amostras eluídas com solução de fosfato de sódio 50mM a pH 7,0 com imidazol a concentrações entre 250mM e 400mM. Foram recuperadas alíquotas de 1mL, e as frações que apresentavam atividade enzimática armazenadas a 4°C para futuros ensaios de caracterização bioquímica e SDS-PAGE.

4.5.4. Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida é a técnica aplicada para detecção e análise de proteínas expressas em genes clonados. A eletroforese de proteínas em gel de acrilamida se baseia na separação de proteínas presentes em uma amostra. Tem-se utilizado o sistema MINIPROTEAN-II (BioRad SA) acoplado a uma fonte de energia Power Pac 300 (BioRad SA).

A proporção dos tipos de géis pode ser visualizada na Tabela 4 (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 2001).

Tabela 4: Elementos para gel desnaturante.

Gel <i>Stacking</i> 5% (5mL de gel)		Gel <i>resolving</i> 12% (10mL de gel)	
Acrilamida 30%	0,83mL	Acrilamida 30%	4,0mL
Tampão stacking	0,63mL	Tampão resolving	2,5mL
SDS	50µL	SDS	100µL
Persulfato de amônio	50µL	Persulfato de amônio	100µL
TEMED	5µL	TEMED	4µL
Água destilada	3,4mL	Água destilada	3,3mL

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 30 mA, a 24°C, tendo como tampão de corrida 50 mM Tris-HCl; 150 mM Glicina e 0,1% (p/v) SDS (LAEMMLI, 1970). Após o término da corrida, os géis foram corados com solução de Coomassie (metanol 40% (v/v); ácido acético glacial 10% (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)) por aproximadamente 15 h e descorados em solução de ácido acético 10% (v/v) por aproximadamente 2 h.

4.5.5. Determinação da atividade enzimática – Método espectrofotométrico

O método espectrofotométrico se baseia na medição do incremento de absorbância a 234nm provocada pelo grupo dieno conjugado com hidroperóxido, no momento em que a enzima é colocada em contato com o substrato (BEM-AZIZ et al, 1970). A velocidade da reação é medida através do aumento da absorbância conforme a formação do produto da reação. Define-se uma unidade de lipoxigenase com o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto ao utilizar ácido linoleico ou ácido araquidônico dissolvido em tampão borato 20 mM a pH 8,5 ou tampão fosfato 50 mM a pH 7,5, respectivamente.

O substrato foi preparado utilizando-se 10 µl de ácido linoleico ou ácido araquidônico e 10 µl de etanol 95% em 10 mL de água bidestilada estéril. Uma alíquota de 2 mL dessa solução foi adicionada a 10 mL do tampão específico ao ácido utilizado. Esta solução final foi preparada no momento da determinação da atividade, e armazenada em recipiente protegido da luz.

Para a detecção da presença de enzima na amostra, foi utilizado como condições padrão a concentração de 350µM de substrato e 0,1mg/mL de enzima, segundo metodologia de Vidal-Mas (2005). Como branco utilizou-se solução de substrato a concentração final de 350 µM, volume de extrato de proteína a uma concentração de 0,1mg/mL desnaturada a 80°C, Tween a uma concentração final de 0,5% e quantidade de tampão até volume final de 1,0mL, em cubeta de quartzo. Na cubeta onde se aplicou a amostra para observar a atividade enzimática, além de

solução de substrato a concentração final de 350 μM , adicionou-se quantidade de extrato de proteína purificada que variaram entre 50 μl e 200 μl (concentração final de 0,1mg/mL), Tween a uma concentração final de 0,5% e quantidade de tampão até atingir volume final total de 1 mL. A medição da absorbância ocorre a uma longitude de 234nm durante de 3 minutos. Ao longo da zona linear, a partir da pendente se calculou as unidades de lipoxigenase presente na amostra. A determinação da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro.

4.5.6. Detecção dos produtos gerados pela biotransformação enzimática por cromatografia de camada delgada

Para detectar as reações de biotransformação realizadas pelas enzimas, utilizou-se a técnica de cromatografia de camada delgada (TLC) onde se podem separar os diferentes ácidos graxos depois da transformação pelas enzimas e, desta maneira, detectar a proporção de substratos transformados.

O ensaio de atividade foi realizado em microtubos de 1,5 mL de volume. Às soluções proteicas suspendidas em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,50 ou tampão borato 20 mM a pH 8,5 adicionou-se 1 μl do substrato ácido araquidônico, no caso da enzima SWAraCLOX e 1 μl de ácido linoleico com a enzima SWPreCLOX, e incubou-se 16 horas a temperatura de 24°C. Realizou-se então uma extração orgânica com acetato de etila. A amostra foi depositada em camada delgada de sílica gel 60 ALUGRAM® SIL G/UV254 (Panreac, Barcelona, Espanha), esta depositada em uma fase móvel composta por hexano : éter etílico : ácido acético glacial na proporção 75:15:10. Após secagem da sílica, pulverizou-se uma solução 10% de ácido fosfomolibdico em metanol para visualização dos produtos da reação.

4.6. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS

Para realizar a caracterização enzimática utilizou-se o método espectrofotométrico de detecção de atividade de incremento de absorbância a 234nm, descrito no item 5.6. Os parâmetros analisados foram temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica, atividade sobre diferentes substratos, parâmetros cinéticos da enzima e substrato preferível. Os tampões utilizados foram tampão borato 20mM a pH 8,5 para medições com ácido linoleico e tampão fosfato 50 mM a pH 7,5 para medições com ácido araquidônico. Todas as medições foram realizadas em 5 repetições.

4.6.1. Atividade sobre diferentes substratos

Com o objetivo de determinar em que substrato as enzimas recombinantes demonstram maior atividade, foram realizados ensaios de atividade enzimática com ácido araquidônico, ácido linoleico, ácido α -linolênico e ácido γ -linolênico. Os substratos foram utilizados com uma concentração final de 0,3 mM e as enzimas a 0,1mg/mL. Para a caracterização da enzima recombinante SWPrecLOX foi utilizado o tampão borato 20mM a pH 8,5, e para a enzima SWAraCLOX o tampão fosfato 50 mM a pH 7,5.

4.6.2. Determinação da concentração ótima de enzima

Para se determinar a concentração em que as enzimas recombinantes apresentam atividade ótima, foram realizados ensaios com o substrato preferível a uma concentração de 0,3 mM. As concentrações de enzima analisadas variaram de 0,02 mg/mL a 0,12 mg/mL.

4.6.3. Determinação da concentração ótima de substrato

Depois de fixar um valor de concentração de enzima ótima, foram realizados ensaios para verificar a concentração de substrato ótima para detecção de atividade enzimática. As concentrações de substrato variaram de 0,01mM a 1,0 mM.

4.6.4. Determinação do pH ótimo de reação

Para determinar a influência do pH na atividade das enzimas recombinantes, mediu-se a atividade enzimática por espectrofotômetro com tampões em diferentes pHs. Os valores de pH analisados variaram de 4,0 a 7,0 em tampão citrato-fosfato 20 mM e de 6,0 a 8,0 em tampão fosfato 50 mM. Todas as medições foram realizadas a uma concentração constante de substrato de 0,4 mM, concentração final constante de enzima de 0,1mg/mL.

4.6.5. Determinação da temperatura ótima de reação

Para determinar a influência da temperatura na atividade enzimática, foram realizadas a diferentes temperaturas, que variaram de 21°C a 39°C. Todas as medições foram realizadas a uma concentração constante de substrato de 0,4 mM, concentração final constante de enzima de 0,1mg/mL.

4.6.6. Determinação da estabilidade térmicas da enzimas

Para verificar a estabilidade térmica das enzimas recombinantes, estas foram incubadas durante 5 minutos a diferentes temperaturas que variaram de 22°C a 70°C. Todas as medições foram realizadas a uma concentração constante de substrato de 0,4 mM, concentração final constante de enzima de 0,1mg/mL.

4.6.7. Influência de diferentes íons bivalentes na atividade enzimática

Para determinar a influência de determinados metais na atividade das enzimas recombinantes, foi medida a atividade por espectrofotômetro com a adição dos metais, separadamente, a uma concentração final de 1 mM. Todos os sais se encontravam na forma de cloreto e foram dissolvidos em água, exceto o sal de estrôncio e de ferro, que foram dissolvidos em etanol 96%.

Os metais utilizados foram: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CdCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

4.6.8. Determinação das constantes cinéticas

Determinaram-se as constantes cinéticas de velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m) medindo a atividade a diferentes concentrações de substrato a pH ótimo de reação, a 24°C e a uma concentração constante de enzima de 0,1mg/mL. Para a medição da enzima recombinante SWPrecLOX foi utilizado o tampão borato 20mM a pH 8,5, e para a enzima SWAraCLOX o tampão fosfato 50 mM a pH 7,5. Todas as medições foram realizadas em 5 repetições. Calcularam-se estas constantes cinéticas a partir da representação de dobros-recíprocos (Linewaver-Burk) da equação de Michaelis-Menten. Utilizou-se o programa Lucenz III v. 1.02 (Alan Clark, 2002).

4.7. DETERMINAÇÃO DO METAL PRESENTE NO CENTRO CATALÍTICO

A determinação do metal presente no centro catalítico das enzimas SWPrecLOX e SWAraCLOX foi realizada através de ICP-MS (Espectrometria de massa com fonte de plasma de acoplamento indutivo), com um modelo AGILENT 7500ce. Este tipo de espectrometria de massa é capaz de detectar metais em

concentrações muito baixas como uma parte em 10¹² (partes por trilhão). A técnica consiste na ionização da amostra com plasma indutivamente acoplado e em seguida, usando um espectrômetro de massa, a separação e quantificação desses íons. Para o ensaio, 1 mL de amostra (SWPrecLOX a 4 mg/mL e SWAraCLOX a 3 mg/mL) foi colocada num reactor Teflon com 1 mL de HNO₃ (altamente concentrado) e 1 mL de H₂O₂ durante 48 horas a 90° C. Em seguida, foram adicionados 22 mL de água Milli-Q e posterior análise quantitativa dos metais Ferro e Manganês.

4.8. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS GERADOS PELA REAÇÃO ENZIMÁTICA

4.8.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

A separação cromatografia foi realizada em um cromatógrafo líquido PerkinElmer (USA) Series 200 acoplado à um espectrômetro de massas quádruplo-único PE SCIEX API 150 EX (Applied Biosystems, USA). A couluna utilizada foi Tracer Kromasil 100 C8 column (250 mm x 46 mm, 5 μm) (Teknokroma, Spain). A separação ocorreu com um gradiente de eluição contendo A: acetonitrilo (0,1% v/v de ácido acético), B: Acetona (0,1% de ácido acético, v/v) a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e gradiente (tempo,% B): (0,35), (25,100), (30,100), (35,35), (40,35). Todos os dados apresentados foram obtidos com uma fonte de ionização APCI em modo negativo com os seguintes parâmetros: temperatura do vaporizador de 400 ° C, nebulizador atual 3 mA, potência de 25 V, com foco potencial -110 V, a entrada potencial -10 V e nitrogênio como nebulizador e cortina de gás com 10 e 12, as unidades arbitrárias. Os dados de varredura foram obtidas por digitalização a partir de m / z 100-2000 amu. Na análise dos produtos oxidados, os íons selecionados foram aqueles que correspondem à diferentes oligômeros sintetizados. Todos os

dados foram registrados usando Analista de Software v 1.4.2 (Applied Biosystems, EUA).

4.8.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos são obtidos usando-se diazometano. Uma solução de éter diazometano foi adicionado gota a gota até que a coloração amarela persistisse. O excesso de diazometano e solventes foram removidos com nitrogênio líquido. Os ésteres trimetil sil metil (TMS) correspondentes derivados foram formados através da reação de 5 mg de amostra com 1 mL de piridina, 0,2 mL de hexametildisilano e 0,1 mL de trimetilclorosilano. A reação ocorreu a 24°C durante 2 horas, sob agitação, e logo em seguida foram adicionados 5 mL de hexano e 5 mL de água. A fase aquosa foi extraída com vários volumes de hexano, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro.

Os TMSs derivados de β -hidroximetilesteres obtidos foram dissolvidos em 350 μ L de clorofórmio para análise em cromatografia de gases – espectrometria de massa (GC-MS). A análise foi realizada com Trace DSQ equipado com uma coluna HP5 (*cross-linked* 5% Phesilicone, Hewlett-Packard) (25 m x 0.20 mm id x 0.50 μ m) e um detector de espectrometria de massa modelo TRACE DSQ (Thermo Finnigan, Waltham, MA, EUA) próprio para digitalizar a partir de m/z 60-700 a.m.u. A temperatura foi programada de 35°C (2 min) a 310°C (10 min) a 8°C/min. A temperatura do injetor foi de 250°C em modo de injeção de divisão (1:30) e a linha de transferência do detector a 280°C. Um μ L de solução de derivados TMS foi injetado. A massa molecular dos monómeros foi determinada por ionização química, utilizando metano como gás ionizante.

4.9. SEQUÊNCIAS DE LIPOXIGENASES UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para o estudo filogenético das lipoxigenases utilizaram-se sequências de proteínas de origem procariótica depositadas na base de dados GenBank.

4.9.1. Programas de bioinformática

Utilizaram-se diversos programas de bioinformática para realizar os alinhamentos, as árvores filogenéticas e os estudos evolutivos das sequências estudadas.

4.9.2. Alinhamentos de sequências

Para fazer os alinhamentos das diversas sequências utilizadas neste trabalho se utilizou o programa bioinformático Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), programa de alinhamento de sequências nucleotídicas ou aminoacídicas que produz alinhamentos múltiplos de sequências divergentes biologicamente significativas. Este programa calcula o melhor alinhamento para as sequências selecionadas, e mostra as identidades, similaridades e diferenças obtidas em função disso.

Os alinhamentos aplicados ao conjunto de programas PALM 4.3 foram modificados eliminando-se de todas as sequências, aqueles codóns que não mais codifiquem para duas ou menos sequências (ou seja, nas demais sequências o programa de alinhamento introduziu gaps).

4.9.3. Programas e métodos utilizados nas árvores filogenéticas

A partir das sequências alinhadas, pelo programa MEGA 5.1 (TAMURAKA e DUDLEY et al. 2007) integrado ao CLUSTAL W, são geradas as árvores filogenéticas pelas sequências analisadas. Obtêm-se estas árvores utilizando a matriz de distância de Jukes-Cantor e o método de agrupamento Neighbour-Joining, de maneira que as árvores não apresentem raiz e não mostrem as relações genéticas entre as diferentes sequências. O nível de confiança da árvore é determinado por uma análise de “bootstrapping” de 1000 réplicas (o programa mostra os valores obtidos nos nós da figura).

4.9.4. Análise estrutural da sequência de aminoácidos

Para análise estrutural foi utilizado o programa Phyre2 (Protein Homology/AnalogY Recognition Engine) disponibilizado em internet (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Este programa permite a predição de estruturas proteicas com base em um modelo estrutural eleito ou dentre os modelos presentes no banco de dados o que mais se assemelha à sequência de interesse.

Foram usados como modelo estrutural uma lipoxigenase procariótica, de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (código de acesso PDB: 4G32) e uma lipoxigenase eucariótica de *Plexaura homomalla* (código de acesso PDB: 2FNQ).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS GENES CODIFICANTES DE LIPOXIGENASE

5.1.1. Genoma completo de *Shewanella woodyi* ATCC 51908 e localização dos genes ACA87683.1 e ACA87192.1

O genoma completo de *Shewanella woodyi* ATCC 51908 é formado de 5.935.403 pb, dando origem a 5.042 genes (Figura 14). O gene ACA87683.1 – 15-lipoxygenase Precursor se encontra em posição 4.176.030 a 4.178.300pb e ACA87192.1 – Arachidonate 15-lipoxygenase em posição 3.569.308 a 3.571.485pb (Figuras 15 e 16).

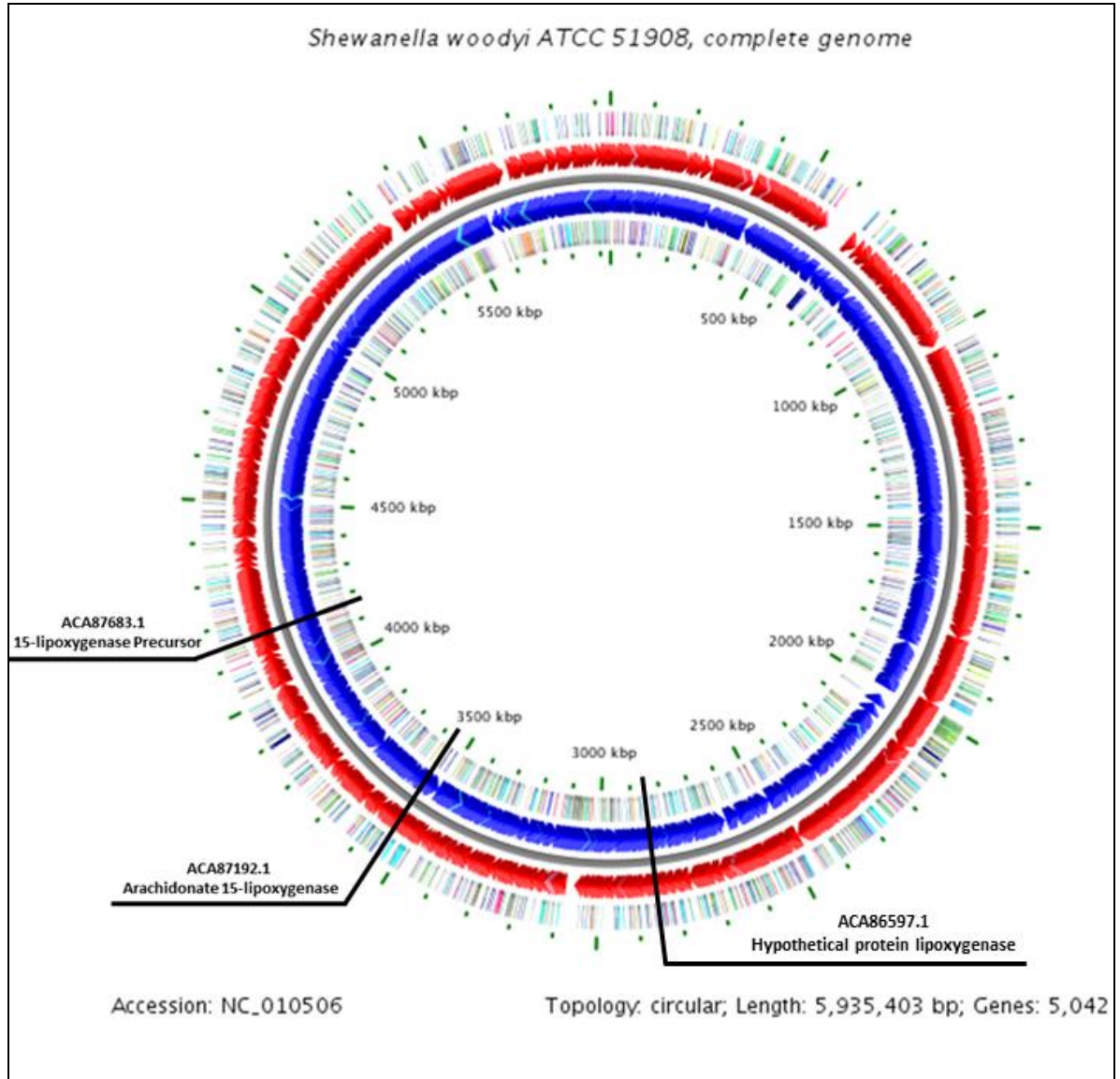


Figura 14: Genoma completo de *Shewanella woodyi* ATCC 51908, com os genes ACA87683.1 e ACA87192.1 situados no mapa genômico nas posições 4.176.030pb e 3.569.308pb, respectivamente.

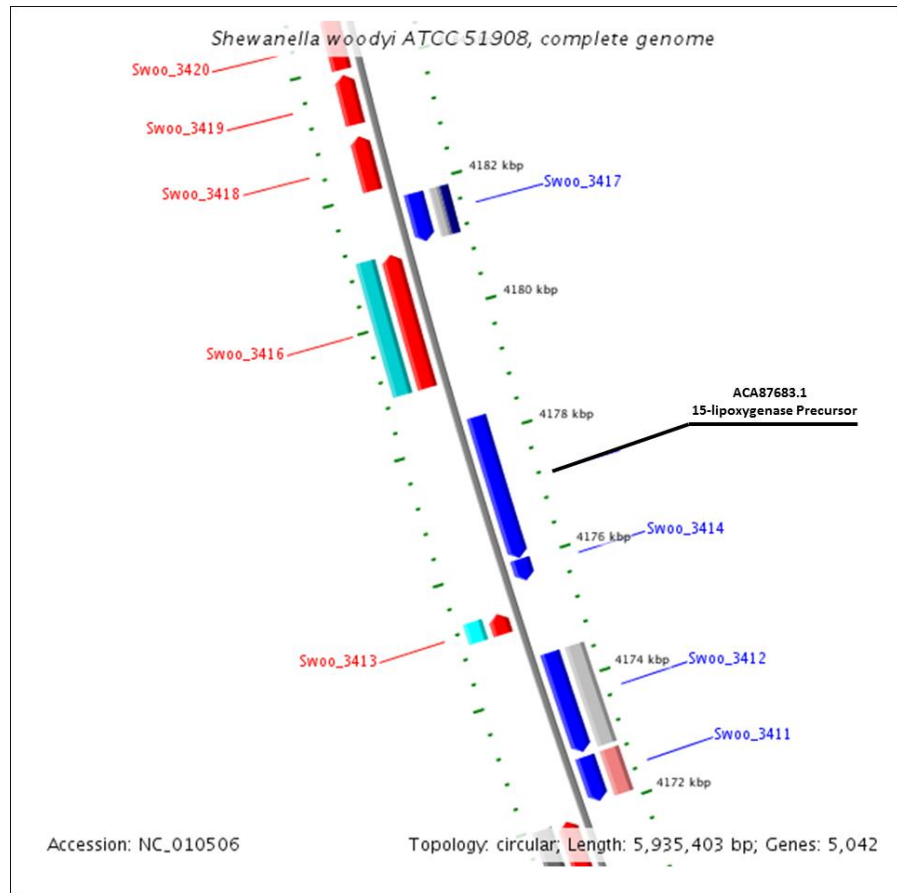


Figura 15: Gene ACA87683.1 - 15-lipoxygenase Precursor localizado na posição 4.176.030 a 4.178.300pb do genoma completo de *Shewanella woodyi* ATCC 51908.

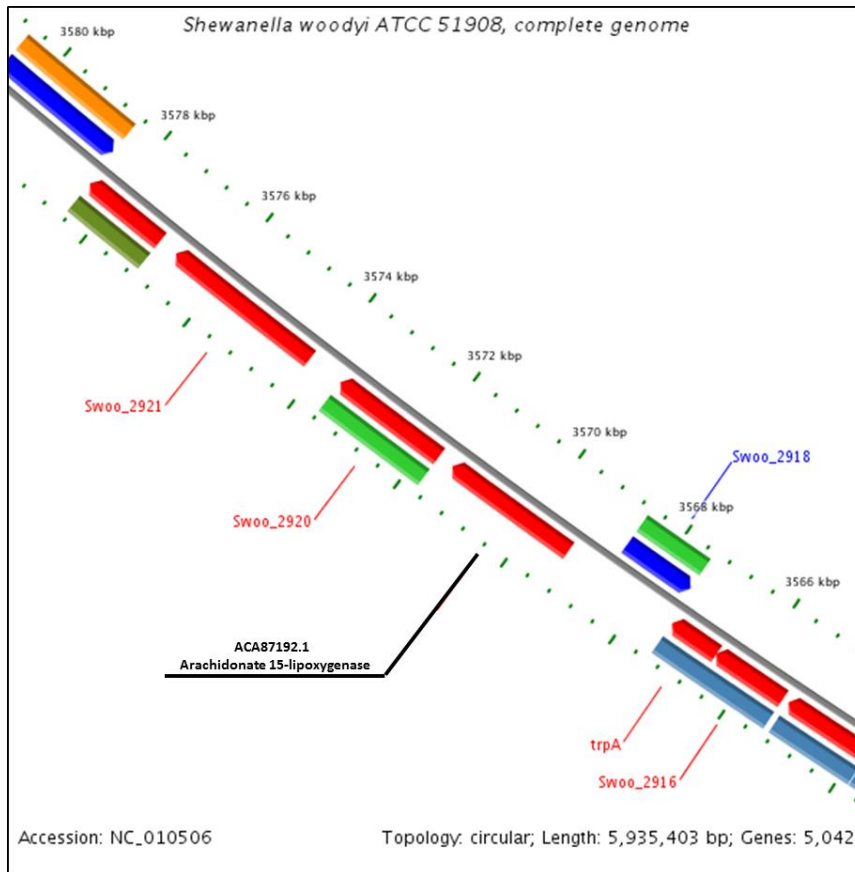


Figura 16: Gene ACA87192.1 – Arachidonate 15-lipoxygenase localizado na posição 3.569.308 a 3.571.485pb do genoma completo de *Shewanella woodyi* ATCC 51908.

O micro-organismo *Shewanella woodyi* ATCC 51908, segundo a sequência genômica depositada no banco de dados GenBank – NCBI, possui três genes responsáveis pela tradução de distintas lipoxigenases. Porém estes dados não foram comprovados experimentalmente até o presente momento. De acordo com análise filogenética realizada previamente (ver Resultados e Discussão, item 5.7.), foram escolhidos dois desses genes para estudo experimental, um que se encontra filogeneticamente mais próximo à outras lipoxigenases bacterianas, e outro fora dessa posição (Figura 37).

5.1.2. Extração do DNA genômico de *Shewanella woodyi* ATCC 51908

Após cultivo do micro-organismo em meio marinho, a 25°C, 150 rpm, por 12 horas, se extraiu o DNA genômico de 10 mL de cultivo com o auxílio do “*DNA Purification Kit Wizard Genomic*” (Promega Co., Madison, WI, USA), obtendo-se o material genético na concentração de **235,7 ng/μl** de DNA, com um valor de índice 260/280 de 1,92, indicando que havia baixa concentração de proteína com respeito à amostra de DNA.

5.1.3. Amplificação dos genes ACA87683.1 e ACA87192.1 por PCR

A partir da sequência dos genes ACA87683.1 e ACA87192.1 (Arachidonate 15-lipoxygenase precursor e Arachidonate 15-lipoxygenase, respectivamente) da base de dados GenBank de *Shewanella woodyi*, se desenhou os oligonucleotídeos correspondentes aos extremos 5' e 3' de cada gene e realizou-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificar in vitro os genes de lipoxigenase, separadamente, em termociclador. Os produtos da PCR foram eletroforicamente separados e analisados em gel de agarose 0,8% (Figura 17a e b).

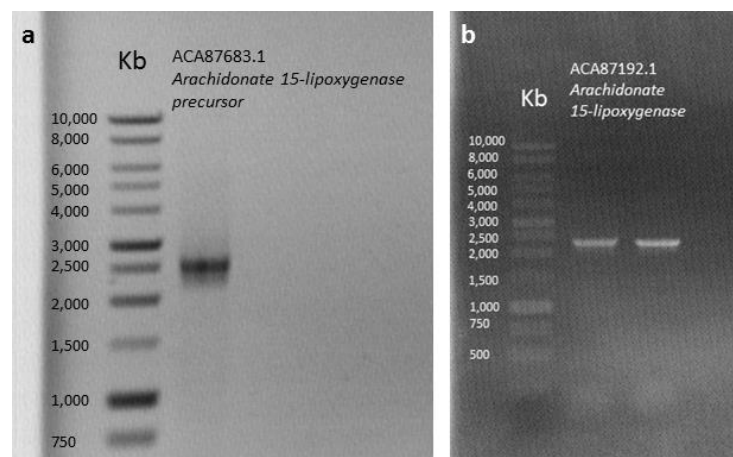


Figura 17: a. Amplificação do gene ACA87683.1 (*15-lipoxygenase precursor*) de *S. woodyi* a partir de oligonucleotídeos específicos. b. Amplificação do gene ACA87192.1 (*Arachidonate 15-lipoxygenase*) de *S. woodyi* a partir de oligonucleotídeos específicos.

Os produtos da PCR foram retirados do gel de agarose com o auxílio de um bisturi, e purificados utilizando-se o kit comercial “*Wizard SV Gel and PCR clean up system*” (Promega Co., Madison, WI, USA). Obtiveram-se os materiais genéticos na concentração de **50,3 ng/μl** de DNA para o gene *15-lipoxygenase precursor* (SW_Prec) e **52,5 ng/μl** de DNA para o gene *Arachidonate 15-lipoxygenase* (SW_Arac).

5.1.4. Digestão dos clones positivos

Os insertos foram eletroforéticamente separados e analisados em gel de agarose 0,8% (Figura 18a e b), e posteriormente purificados com o kit comercial “*Wizard SV Gel and PCR clean up system*” (Promega Co., Madison, WI, USA). Observou-se uma parcial digestão pela enzima *NotI* através dos fragmentos alcançados. Os fragmentos obtidos possuíam tamanho de aproximadamente 5200pb (pGEMTeasy/SW_Prec e pGEMTeasy/SW_Arac), 3000pb (vetor pGEMTeasy linearizado) e 2200pb (insertos SW_Prec e SW_Arac).

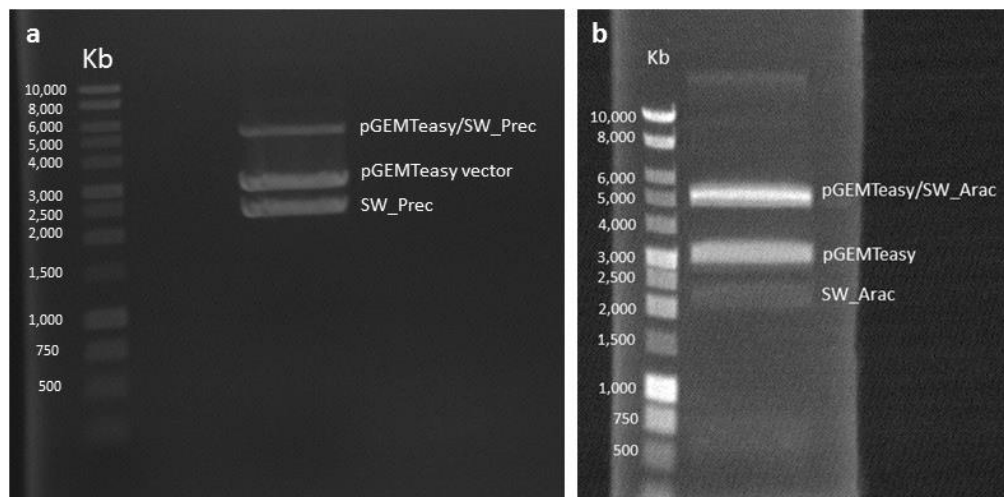


Figura 18: a. Digestão do clone pGEMTeasy/SW_Prec com enzima de restrição *NotI*. b. Digestão do clone pGEMTeasy/SW_Arac com enzima de restrição *NotI*.

5.1.5. Clonagem dos insertos de interesse em vetor de expressão pET28a(+)

Estudos preliminares de expressão enzimática realizados com lipoxigenase de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 aportaram conhecimento quanto ao vetor de expressão mais adequado a se utilizar com esta enzima (VIDAL-MAS et al, 2005). Por se tratar de genes de tamanho similares, utilizou-se o mesmo vetor de expressão para clonagem de lipoxigenase de *S. woodyi*. Também se encontra na literatura clonagens realizadas com esse vetor de expressão (XU et al, 2007).

Uma vez isolados e purificados os insertos, estes foram inseridos em vetor de clonagem pET28a(+), previamente digerido com a mesma enzima de restrição (*NotI*) e purificado a partir de um gel de agarose. Como observado na Figura 19, o fragmento correspondeu ao vetor pET28a(+) linearizado, apresentando tamanho de aproximadamente 5300pb, enquadrando com a longitude do fragmento esperada. A construção foi transformada em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21pLys e *E.coli* BLR através do método de choque térmico, plaqueadas em meio LB – Luria Bertani com kanamicina na concentração final de 100µg/mL, e colônias foram selecionadas ao acaso. Estas foram submetidas à confirmação da clonagem através de PCR de amplificação dos genes de interesse com os respectivos oligonucleotídeos de amplificação e eletroforeticamente separados e analisados em gel de agarose 0,8% (Figura 20a e b), e posterior sequenciamento (Apêndice A). Na Figura 20a e b observa-se os fragmentos correspondentes ao genes SW_Prec e SW_Arac, respectivamente. Ambos apresentaram longitude de aproximadamente 2200pb, correspondentes ao tamanho esperado. Desta maneira, foram obtidas as construções pET28a/SW_Prec e pET28a/SW_Arac. Como não foi detectada nenhuma diferença de expressão enzimática posteriormente entre as diferentes cepas de *E. coli* utilizadas, o clone eleito para continuação do trabalho foi em *E. coli* BL21 (DE3), devido a metodologia empregada por Vidal-Mas et al. (2005).

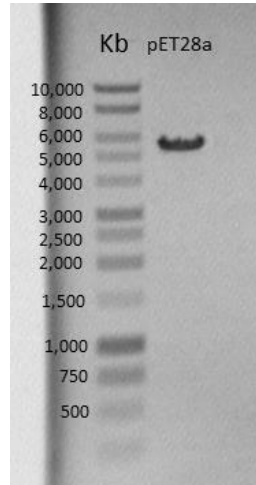


Figura 19: Vetor pET28a(+) linearizado com enzima de restrição *NotI*.

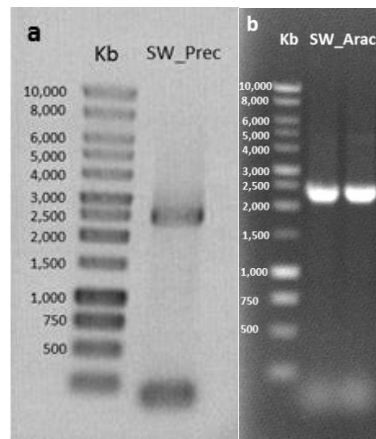


Figura 20: a. Amplificação da construção pET28a/SW_Prec. b. Amplificação da construção pET28a/SW_Arac.

5.2. EXPRESSÃO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS

5.2.1. Sistema de indução e expressão

Os clones pET28a/SW_Prec e pET28a/SW_Arac foram inoculados, separadamente, em 50 mL de meio LB contendo kanamicina na concentração final

de 100µg/mL. Estes inóculos foram incubados a 37°C, sob agitação (150 rpm) por aproximadamente 24 h. Após este tempo, estas culturas foram inoculadas, separadamente, em uma concentração de 5% em novos cultivos, os quais foram também conduzidos com o meio LB contendo kanamicina na concentração final de 100µg/mL, em erlenmeyers de 2000 mL, contendo 350 mL de meio cada, a 37°C sob agitação (150 rpm) até atingir uma Abs_{600nm} de aproximadamente 0,4. Ao atingir a absorvância desejada, adicionou-se o indutor IPTG, baixou-se a temperatura e as células estiveram por determinado tempo expressando as enzimas de interesse, a agitação de 150 rpm. Os parâmetros concentração de IPTG, temperatura de expressão e tempo de indução foram modificados com a finalidade de se melhorar a produção das lipoxigenases.

As Tabelas 6 e 7 mostram os diferentes parâmetros testados, a quantidade de proteína total expressada em cada uma das condições e a atividade específica das lipoxigenases SWPrecLOX SWAraçLOX, respectivamente.

Tabela 6: Concentração de proteínas totais e atividade específica da enzima SWPrecLOX obtidas em diferentes concentrações de IPTG e temperatura. Em cinza os parâmetros que apresentaram maior atividade lipoxigenase.

Temperatura (°C)	IPTG (mM)	Tempo de indução (horas)	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg enzima)
16°C	0,015	2	43,9	1677
		4	54,5	3991
		18	91,5	4773
	0,1	2	38,6	2633
		4	62,1	4650
		18	84,1	5636
	1	2	40,2	1344
		4	57,7	3110
		18	76,6	3978
18°C	0,015	2	35,8	1513
		4	55,1	3617
		18	77,0	2228
	0,1	2	28,0	3890
		4	67,9	4406
		18	96,9	10756
	1	2	32,4	2341
		4	56,0	5038
		18	82,9	8244
20°C	0,015	2	41,3	-
		4	55,8	4468
		18	75,2	7602
	0,1	2	37,3	2002
		4	51,0	5674
		18	94,0	9962
	1	2	38,9	-
		4	49,6	7904
		18	88,3	8829
23°C	0,015	2	32,7	2236
		4	46,3	4911
		18	76,4	6978
	0,1	2	28,9	1524
		4	47,3	5559
		18	67,3	8936
	1	2	28,5	2576
		4	49,0	6467
		18	58,7	7567
37°C	0,015	2	22,9	3098
		4	37,5	3343
		18	39,3	4763
	0,1	2	20,1	3669
		4	33,6	6122
		18	35,0	6767
	1	2	21,2	2746
		4	26,2	3862
		18	30,4	6586

Tabela 7: Concentração de proteínas totais e atividade específica da enzima SWAraCLOX obtidas em diferentes concentrações de IPTG e temperatura. Em cinza os parâmetros que apresentaram maior atividade lipoxigenase.

Temperatura (°C)	IPTG (mM)	Tempo de indução (horas)	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg enzima)
16°C	0,015	2	35,2	3779
		4	60,1	4989
		18	74,7	5600
	0,1	2	36,4	2568
		4	58,9	6668
		18	81,2	7234
	1	2	35,1	1669
		4	62	4477
		18	75,5	8292
18°C	0,015	2	41,7	2981
		4	58,8	4353
		18	77,3	6988
	0,1	2	45,2	3947
		4	63,6	4180
		18	81	9457
	1	2	42,1	2577
		4	55,7	6011
		18	76,4	7350
20°C	0,015	2	48,3	3341
		4	59,9	4218
		18	80,4	6559
	0,1	2	48,9	3790
		4	62,6	4559
		18	77,5	10269
	1	2	49,2	5467
		4	58,3	5558
		18	72,4	7891
23°C	0,015	2	47,1	3724
		4	60,2	6142
		18	73,9	8793
	0,1	2	54	4463
		4	65,4	6700
		18	89,7	12457
	1	2	52,1	4571
		4	70,4	6981
		18	80,7	9308
37°C	0,015	2	59,7	2417
		4	75,3	3679
		18	83,4	6444
	0,1	2	54,1	2782
		4	67,2	6484
		18	80,1	7143
	1	2	58,3	3533
		4	62	5266
		18	84,4	7044

Como se vê nas Tabelas 6 e 7, as condições que mais favoreceram a expressão de proteína foram temperatura de indução a 18°C e 0,1mM de IPTG para SWPrecLOX e 23°C e 0,1mM de IPTG para SWAraçLOX. A partir desse estudo, fixamos esses valores como condições ótimas de expressão para cada uma das enzimas.

Influência da concentração de indutor

O vetor de expressão pET28a(+) possui condições padrão de expressão, pré-determinadas pelo fabricante. A concentração ideal do indutor provavelmente está ligado à capacidade deste de penetrar a célula e à uma possível toxicidade que cause nesta, porém isto não está completamente elucidado (MARBACH e BETTENBROCK, 2012). O intuito do experimento foi buscar condições distintas às pré-determinadas que favorecessem a expressão enzimática, ao mesmo tempo que reduzisse a quantidade de indutor, levando à uma economia deste. Estudos verificaram que a redução de IPTG no sistema de expressão pode aumentar, ou pelo menos não modifica, a quantidade de enzima recombinante produzida. Na expressão de uma glutamato mutase S, a redução de IPTG a 0,2mM aumentou em três vezes a quantidade de enzima produzida (WENG et al., 2006). Resultados favoráveis também foram observados na expressão de uma amidase recombinante, onde a redução do indutor para 0,4mM, adicionado na fase exponencial de crescimento celular, aumentou a produção da enzima (OLAOFÉ et al., 2010). Aumento na expressão de enzimas com redução de IPTG também foram observados com protease ClpP (EINSFELDT et al., 2011).

Influência da temperatura

Apesar da bactéria *E. coli* ser um dos principais hospedeiros para a expressão heteróloga, pode apresentar alguns problemas de expressão, como diferenças entre códons do organismo hospedeiro e do original, problemas de transcrição e tradução, ausência de modificações pós-traducionais, toxicidade da

proteína e formação de corpos de inclusão (HANNING et al, 1998). Alguns desses problemas estão diretamente relacionados com a temperatura na qual as células se encontram no momento da indução. Moura et al. (2013) ao testarem diferentes condições de expressão de uma lipase recombinante de *Pyrococcus furiosus* em *E. coli*, verificaram que a melhor temperatura de indução foi de 30°C. Chen e Reddanna (1998), ao expressarem uma lipoxigenase de batata a 37°C, a obtinham em corpos de inclusão, ou seja, com sua estrutura quaternária prejudicada, e biologicamente inativa. Abaixando a temperatura entre 15 e 20°C, a quantidade de enzima ativa era aumentada. Foi descrita experiência similar com a expressão heteróloga de RTA (RNA N-glicosidade) (ZHAN e CHEN, 2004). No caso de lipoxigenase de *Pseudomonas aeruginosa*, a indução realizada a altas temperaturas favorecia a formação de agregados proteicos, e a enzima se apresentava inativa. Assim, a expressão se deu a 18°C, condição esta que a enzima lipoxigenase era expressa em grande quantidade e biologicamente ativa (VIDAL-MAS et al., 2005). Com as lipoxigenases SWPrecLOX e SWAraCLOX, a expressão a altas temperaturas não favorecia a produção de enzima, uma vez que não se notava atividade catalítica nas amostras recuperadas. Já a baixas temperaturas observou-se atividade quando em contato com seus respectivos substratos (Tabelas 6 e 7).

A expressão de proteínas em *E. coli* na forma de corpos de inclusão é um limitante na produção de proteínas heterólogas, pois usualmente a molécula se encontra biologicamente inativa, tendo que passar por um processo custoso e demorado de *refolding*, onde seu desdobramento inicial é recuperado. Porém alguns autores verificaram que os corpos de inclusão podem conter uma grande porcentagem de proteína que mantinham seu desdobramento, ou seja, mesmo em corpos de inclusão apresentavam atividade catalítica (PETERNEL et al., 2008). Jevsevar et al. (2005) verificaram que mais de 40% de G-CSF (granulócito fator de estimulação de colônia) obtidos através de fermentação e extraídos de corpos de inclusão não estavam desnaturadas e apresentavam atividade, enquanto que por cultura em balão de agitação a porcentagem de proteína ativa foi menor. Com procedimentos de espectroscopia por infravermelho foi possível reconhecer que os corpos de inclusão podem apresentar proteínas com desdobramentos corretos, biologicamente funcionais (VENTURA e VILLAVARDE, 2006) e que os polipeptídeos

expressos em *E. coli* recombinante na forma de agregados não necessariamente perdem a atividade biológica, seja em citoplasma (GARCIA-FRUITOS et al., 2005) ou periplasma (ARIE et al., 2006).

5.2.2. Purificação do extrato bruto proteico

Após determinação das condições ótimas de temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução para a expressão das proteínas, deu-se início à produção intensa de extrato proteico, em erlenmeyers de 2000 mL, com 350 mL de cultivo cada. A cada expressão enzimática, eram produzidos no total 2,5L de cultivo, que após centrifugados e as células suspensas no tampão adequado à enzima trabalhada, geravam 60mL de células. Estas eram rompidas por sonicação, centrifugadas e novamente suspensas em 60mL de tampão com a adição de N-laurilsarcosina, para separar as proteínas possivelmente agregadas às membranas celulares. Esse meio era mantido em agitação (150 rpm) a 23°C, por 12 horas, e logo em seguida centrifugado, e o sobrenadante recuperado (PETERNEL et al, 2008 adaptado) . Assim, a cada 2,5L de meio de cultivo, obtinha-se 60 mL de extrato bruto proteico. Este passava por duas etapas de purificação: cromatografia de troca iônica, em uma coluna aniônica *Q-Sepharose High Performance*, e em seguida as frações que apresentavam atividade eram passadas por cromatografia de afinidade, em uma coluna *HisTrap FF crude*.

Como descrito no item 4.5.3 de Material e Métodos, a amostra de extrato bruto proteico foi parcialmente purificada em coluna de cromatografia de troca iônica. As amostras que inicialmente apresentavam uma concentração de **96,9 mg/mL** e **117,2 mg/mL** para SWPrecLOX e SWAraCLOX, respectivamente, após a purificação estavam a uma concentração de **3,84 mg/mL** e **4,37mg/mL** para as respectivas enzimas, a um volume de 10 mL (Tabelas 8 e 9). Esta amostra foi utilizada no segundo passo de purificação.

Como descrito no item 4.5.3. de Material e Métodos, a amostra obtida da purificação do extrato bruto proteico em cromatografia de troca iônica, foi carregada em coluna de cromatografia de afinidade *HisTrap FF crude*. Após a purificação, obteve-se uma amostra parcialmente purificada a uma concentração de **1,23mg/mL** e **0,82mg/mL** para SWPrecLOX e SWAraCLOX, respectivamente, a um volume de 6 mL (Tabelas 8 e 9). Ambas as técnicas de purificação apresentaram um rendimento total de 69,14% e um grau de purificação de 506,5 para a enzima SWPrecLOX (Tabela 8). Já a purificação da enzima SWAraCLOX apresentou um rendimento de 75% e u grau de purificação de 1076 (Tabela 9). Esta fração enzimática foi analisada por SDS-page (Figura 21) e utilizada na caracterização bioquímica e biotransformações realizadas posteriormente.

Tabela 8: Purificação da enzima SWPrecLOX em cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade e seu rendimento.

	Extrato celular	Cromatografia de troca iônica	Cromatografia de afinidade	Total
Proteínas totais (mg/mL)	96,9	3,84	1,23	-
Atividade (U/mL)	3581	15175	24758	-
Atividade específica (U/mg de enzima)	39,74	3951,82	20128,50	-
Rendimento etapa (%)	100	70,62	97,9	69,14
Grau de purificação	1,0	99,44	5,09	506,5

Tabela 9: Purificação das enzimas SWPrecLOX e SWAracLOX em cromatografia de afinidade e seu rendimento.

	Extrato celular	Cromatografia de troca iônica	Cromatografia de afinidade	Total
Proteínas totais (mg/mL)	117,2	4,37	0,82	-
Atividade (U/mL)	2973	11888	22390	-
Atividade específica (U/mg de enzima)	25,36	2720,3	27304,8	-
Rendimento etapa (%)	100	66,5	113	75
Grau de purificação	1,0	107	10	1076

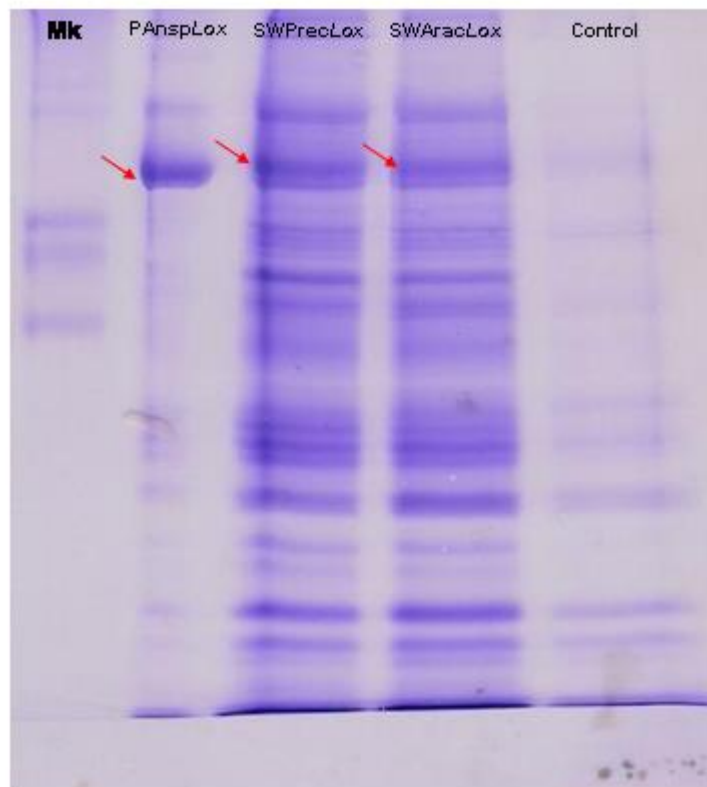


Figura 21: SDS-PAGE onde (Mk) Marcador Prestained Protein MW Marker (Fermentas –Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), (1) Controle positivo – LOX de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 , (2) LOX parcialmente purificada SWPrecLOX, (3) LOX parcialmente purificada SWAracLOX, (3) Controle negativo

Duas metodologias distintas foram necessárias para obter uma fração parcialmente purificada das enzimas recombinantes SWPrecLOX e SWAraCLOX. A princípio utilizou-se somente a purificação por cromatografia de afinidade, pois com a presença da sequência de histidinas nas enzimas acreditava-se que seria possível obtê-las purificadas. Porém somente esta técnica não foi suficiente, e não foi possível detectar exatamente o problema da purificação. Infere-se que pelo fato do extrato bruto proteico conter muitas proteínas inespecíficas, estas não permitiam uma boa aderência da proteína recombinante ao níquel presente na coluna. Desta maneira utilizou-se primeiro a cromatografia de troca iônica, com a finalidade de obter uma amostra mais limpa, e logo em seguida foi submetida a cromatografia de afinidade. É usual empregar-se mais de uma técnica para a purificação de enzimas. Gilbert et al. (2011) para purificar uma lipoxigenase recombinante humana utilizaram uma coluna de afinidade contendo Ni^{2+} e em seguida uma Superdex 200pg. A lipoxigenase de *Pleurotus ostreatus* foi submetida à uma coluna de gel filtração, à cromatografia de afinidade e finalizada sua purificação em cromatografia de troca iônica (KURIBAYASHI et al., 2002). Lipoxigenase de *Persea americana* Mill foi obtida parcialmente purificada após passar por precipitação com sulfato de amônio e em seguida a cromatografia de troca iônica (JACOBO_VELAZQUES et al., 2010).

Como se vê na Tabela 9 - e confirma-se pela imagem das proteínas em gel de poliacrilamida na Figura 21, a eficiência de expressão das enzimas foi baixa, não obtendo-se uma sobreexpressão enzimática. Células de *E. coli* podem passar por diversos tipos de stress causados pela presença de plasmídeo recombinante, o que pode levar a uma ineficaz expressão proteica. Hoffmann e Rinas (2004) discutem os tipos de estresse causado por expressão recombinante em *E. coli*. Um plasmídeo de expressão induz uma alta carga metabólica sobre a célula, o que pode ser interpretado como um sinal de estresse. Este sinal ativa os mecanismos de resposta ao stress no hospedeiro, como choque térmico, *starvation* e respostas SOS, ativando, entre outras coisas, a produção de protease, numa tentativa de minimizar a origem do estresse. Outra possível causa da baixa expressão das enzimas seria que, em maior quantidade no periplasma da célula, a lipoxigenase apresentasse

caráter tóxico, e assim, sua maquinaria de expressão teria problemas e seria cessada (SCHLEGEL et al, 2012).

5.3. DETECÇÃO DOS PRODUTOS GERADOS PELA CATÁLISE ENZIMÁTICA POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

Para detectar as reações de biotransformação realizadas pelas enzimas, utilizou-se a técnica de cromatografia de camada delgada (TLC) onde se podem separar os diferentes ácidos graxos depois da transformação pelas enzimas e, desta maneira, detectar a proporção de substratos transformados.

O ensaio de atividade foi realizado em microtubos de 1,5 mL de volume, segundo metodologia descrita em Material e Métodos, item 4.5.6. Como se observa na Figura 22, são identificados como produtos de reação enzimática ácidos graxos oxidados, ao passo que na amostra controle não houve reação enzimática.

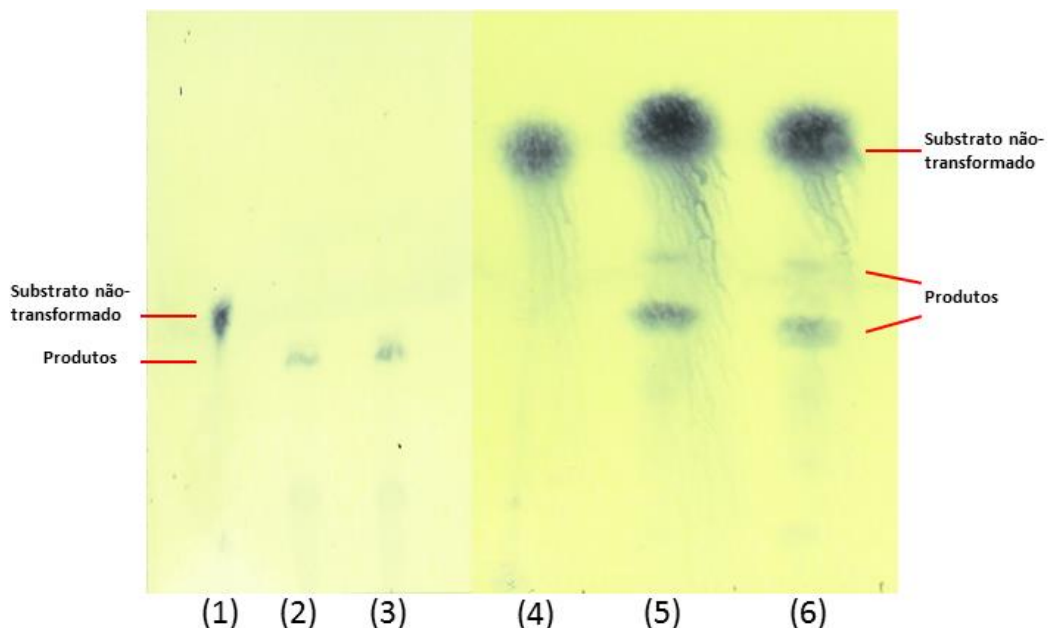


Figura 22: Cromatografia de camada delgada para detecção dos ácidos graxos oxidados, produtos de reação das enzimas SWPrecLOX e SWAracLOX, utilizando fase móvel composta de hexano, éter etílico e ácido acético na proporção 75:15:10. (1) ácido araquidônico sem transformação, (2) e (3) produtos obtidos da transformação do ácido araquidônico pela enzima SWArac_LOX, (4) ácido linoleico sem transformação, (5) e (6) produtos obtidos da transformação do ácido linoleico pela enzima SWPrecLOX.

5.4. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS

Para realizar a caracterização enzimática utilizou-se o método espectrofotométrico de detecção de atividade de incremento de absorbância a 234nm. Os parâmetros analisados foram temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica, atividade sobre diferentes substratos, influência de íons divalentes e parâmetros cinéticos da enzima.

5.4.1. Atividade sobre diferentes substratos

Com o objetivo de determinar com qual substrato as enzimas recombinantes demonstram maior atividade, foram realizados ensaios de atividade enzimática com ácido araquidônico, ácido linoleico, ácido α -linolênico e ácido γ -linolênico. Os ensaios foram realizados em condições padrão, onde os substratos foram utilizados a uma concentração final de 0,3 mM e cada enzima a 0,1 mg/mL (VIDAL-MAS et al. 2005), segundo protocolo descrito em Material e Métodos, item 4.6.1. O substrato que apresentou a maior atividade enzimática foi caracterizado como substrato preferível, e foi dado o valor de 100% de atividade. Com relação a esse valor, calculou-se a porcentagem de atividade dos demais, apresentadas na Figura 23. Como observa-se na Figura 23, o substrato preferível da enzima SWPrecLOX foi o ácido linoleico (100%), seguido dos ácidos araquidônico (87%), gama-linolênico (62%) e linolênico (34%). A enzima SWAraCLOX apresentou maior atividade com ácido araquidônico (100%), sendo este considerado seu substrato preferível. Em seguida os ácidos gama-linolênico (58%), linoleico (43%) e linolênico (26%).

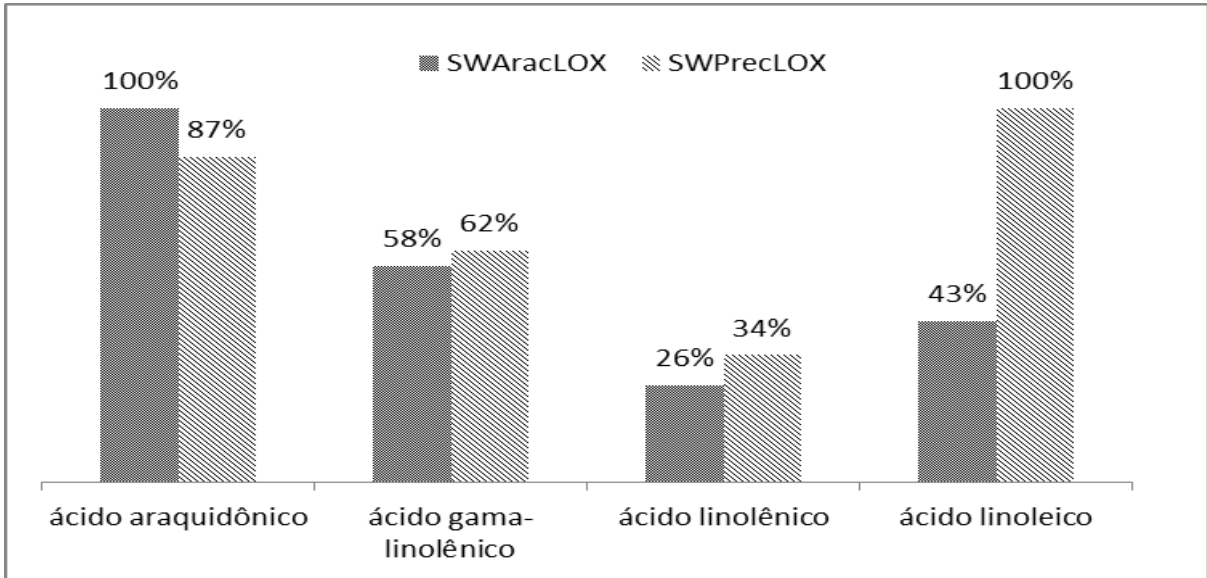


Figura 23: Atividade enzimática das enzimas recombinantes SWPreCLOX e SWAraCLOX de *S. woodyi* com diferentes substratos.

5.4.2. Determinação da concentração ótima de enzima

Para se determinar a concentração em que as enzimas recombinantes apresentam atividade ótima, foram realizados ensaios com o substrato preferível a uma concentração de 0,3 mM. As concentrações de enzima analisadas variaram de 0,015 mg/mL a 0,13 mg/mL, e a que apresentou maior atividade foi a **0,1mg/mL**, tanto com SWPreCLOX como SWAraCLOX. As Figuras 24 e 25 mostram os valores de incremento de absorvância obtidos, e a concentração de enzima ideal para a atividade da lipoxigenase SWPreCLOX e SWAraCLOX, respectivamente.

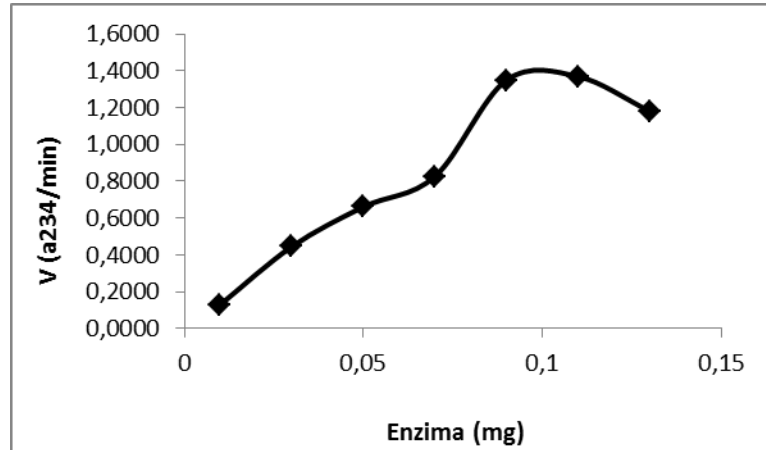


Figura 24: Determinação da concentração ótima de proteína SWPrecLOX para reação enzimática, tendo como substrato ácido linoleico a uma concentração padrão de 0,3mM.

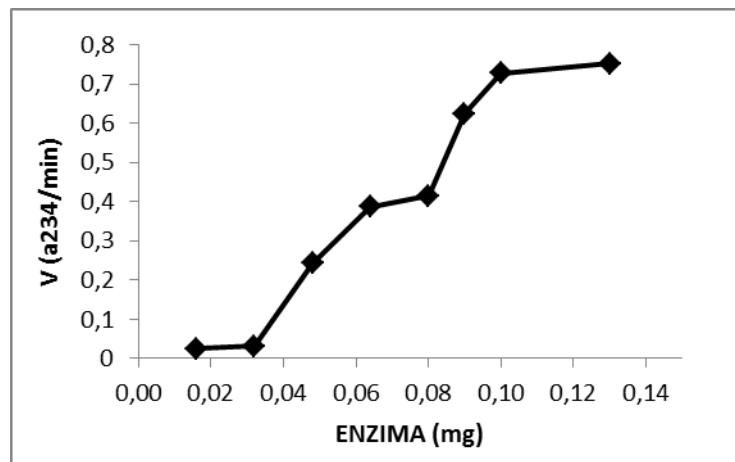


Figura 25: Determinação da concentração ótima de proteína SWAraCLOX para reação enzimática, tendo como substrato ácido araquidônico a uma concentração padrão de 0,3mM.

5.4.3. Determinação da concentração ótima de substrato

Depois de fixar o valor de **0,1 mg/mL** de enzima como concentração ótima, foram realizados ensaios para verificar a concentração de substrato ideal para detecção de atividade enzimática. As concentrações de substrato variaram de

0,01mM a 0,5 mM. O valor que apresentou maior atividade foi **0,4mM** de substrato para ácido linoleico com a enzima SWPrecLOX e **0,35mM** para ácido araquidônico com a enzima SWAraCLOX.

As Figuras 26 e 27 mostram todos os valores de velocidade de reação enzimática obtidos com as diferentes concentrações de substratos das enzimas SWPrecLOX e SWAraCLOX, respectivamente.

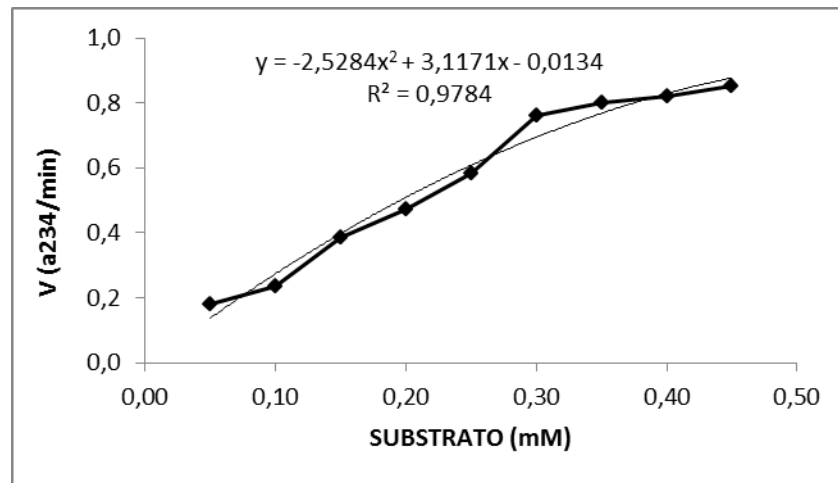


Figura 26: Determinação da concentração ótima de substrato para reação enzimática de SWPrecLOX, a uma concentração de 0,1mg/mL, tendo como substrato ácido linoléico.

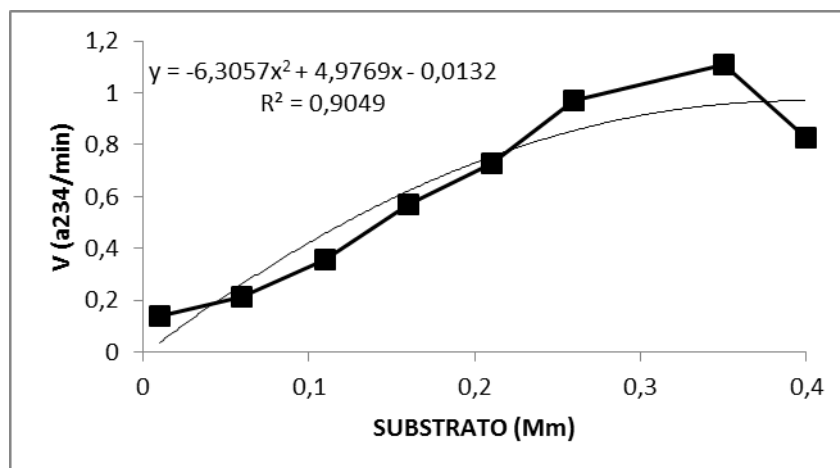


Figura 27: Determinação da concentração ótima de substrato para reação enzimática de SWAraCLOX, a uma concentração de 0,1mg/mL, tendo como substrato ácido araquidônico.

5.4.4. Determinação do pH ótimo de reação

Para determinar a influência do pH na atividade das enzimas recombinantes, se mediu a atividade enzimática por espectrofotômetro com tampões em diferentes pHs. Dependendo do pH desejado, se utilizou diferentes tampões, com a finalidade de solubilizar melhor o substrato. Foi utilizado o substrato preferente de cada enzima recombinante, ou seja, ácido linoleico para SWPrecLOX e ácido araquidônico para SWAraçLOX. Os valores de pH analisados variaram de 4,0 a 7,0 em tampão citrato-fosfato 20 mM e de 6,0 a 8,0 em tampão fosfato 50 mM. Todas as medições foram realizadas a uma concentração constante de substrato de 0,4 mM para SWPrecLOX e 0,35mM para SWAraçLOX, concentração final constante de enzima de 0,1 mg/mL, a 24°C.

A Figura 28 mostra todos os valores obtidos com os diferentes pHs provados.

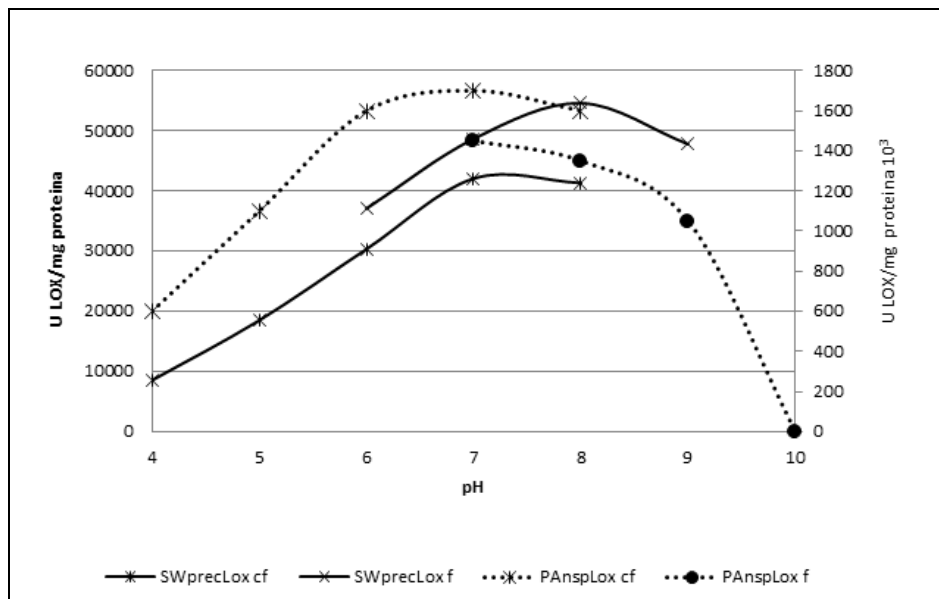


Figura 28: Valores de pH ideais para atividade das enzimas recombinantes SWPrecLOX e SWAraçLOX de *S. woodyi*.

SwPrecLOX demonstrou atividade enzimática entre pH 7,0 e 9,0, apresentando atividade máxima a pH 8,0. A lipoxigenase de *Pleurotus ostreatus* (KURIBAIASHI et al., 2002) e a lipoxigenase recombinante de milho ZmLOX5 (PARK et al., 2010) apresentaram o mesmo valor de pH ótimo. Já a lipoxigenase SWAraCLOX demonstrou ótima atividade entre pH 6,0 e 8,0, atingindo seu máximo a pH 7,0. Valores similares de pH ótimo são descritos na literatura: LOX de *Olea europaea* a pH 6,0 (LORENZI et al., 2006), lipoxigenase recombinante 13-LOX da mesma espécie a pH 6,75 (PADILLA et al., 2009), 9-LOX de milho a pH 7,5 (OSIPOVA et al., 2010), lipoxigenase de *Persea americana Mill* a pH 6,5 (JACOBO-VELAZQUEZ et al., 2010), de *Marchantia polymorpha* L. a pH 7,0 (KANAMOTO et al., 2012), de gérmen de trigo a pH 6,5 (XU et al., 2012) e de *Pleurotus sapidus* a pH 7,0 (PLAGEMANN et al., 2013). Dentre o grupo de lipoxigenases de procaríotos, podemos citar a LOX de *Nostoc* sp., que apresentou atividade enzimática entre pH 7,0 e 10,0 (LANG et al., 2008) e a lipoxigenase recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, com valor de 7,0 (VIDAL-MAS et al., 2005).

Algumas lipoxigenases apresentam valor de pH ótimo mais baixo, entre 5,0 e 6,0. Lipoxigenase de *Aspergillus niger* demonstrou valor de pH 5,0 (HALL e HUSSON, 2004), de feijão a pH 5,6 (CLEMENTE et al, 2000), de músculo de porco a pH 5,5 (GATA et al, 1996) e de pétala de rosa a pH 4,8 (FUKUCHI-MIZUTANI et al, 2001). Valores de pH baixos são menos comuns dentre as enzimas lipoxigenase, que costumam ter seu pH ótimo neutro ou básico.

Dentre os pHs básicos que encontramos descritos na literatura como ótimos para lipoxigenase, está o de *Thermoactinomyces vulgaris*, a pH 11,0 (INY et al, 1993), *Fusarium proliferatum* com pH 10,5 (BISAKOWSKI et al, 1998) e o de soja a pH 9,5 (PIAZZA, 1996).

O valor de pH ideal para lipoxigenase pode variar, como se vê, entre condições ácida e básicas. Isso vai depender da espécie em questão, do substrato a ser transformado e em que parte do organismo se encontra a enzima. Por exemplo, em plantas senescentes a atividade enzimática de LOX de pétalas costuma ser mais intensa a pH ácido, enquanto que LOX de outras partes da planta o pH ideal é neutro ou básico (FUKUCHI-MIZUTANI et al, 2001).

5.4.5. Determinação da temperatura ótima de reação

Para determinar a influência da temperatura na atividade enzimática, foram realizadas medições de atividade com os substratos preferíveis de cada enzima (ácido linoleico para SWPrecLOX e ácido araquidônico para SWAraCLOX) a diferentes temperaturas, que variaram de 21°C a 39°C. A concentração das enzimas foram de 0,1 mg/mL.

A Figura 29 mostra os valores de atividade obtidos nas diferentes temperaturas.

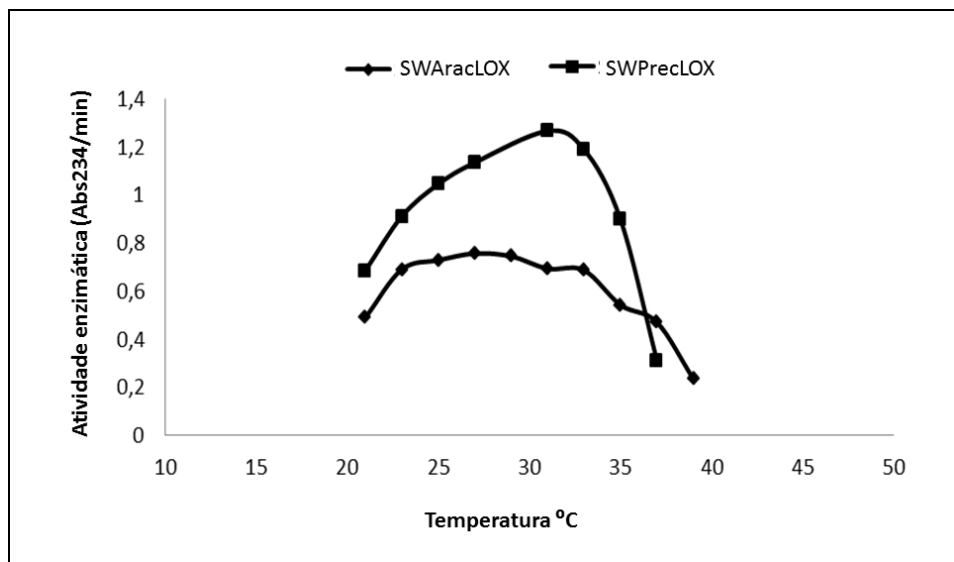


Figura 29: Determinação da temperatura ótima de reação das enzimas recombinantes SWPrecLOX e SWAraCLOX de *S. woodyi*. Atividade enzimática medida através do método espectrofotométrico com ácido linolêico a 0,4mM e ácido araquidônico a 0,35mM.

SWPrecLOX teve sua maior atividade a temperatura de 31°C, mantendo-a a 85% até 37°C. SWAraCLOX manteve sua atividade a temperatura entre 23°C e 33°C, apresentando como temperatura ótima 27°C. Similarmente, lipoxigenase de *Pleurotus ostreatus* (KUROBAIASHI, 2002), e LOX recombinante de *Pseudomonas*

aeruginosa 42A2 (VIDAL-MAS et al., 2005) apresentaram atividade máxima a 25°C. A maioria das lipoxigenases descritas demonstraram ser mais termotolerantes. Duas enzimas recombinantes de *Olea europaea*, 13-LOX apresentaram como temperatura ótima 35°C e 45°C (PADILLA et al., 2009). Lipoxigenase de abacate foi mais ativa a 40°C (JACOBO-VELAZQUEZ et al., 2010), a de gérmen de trigo a 45°C (XU et al., 2012) e a de *Pleurotus sapidus* a 35°C (PLAGEMANN et al., 2013). Em mamíferos a temperatura ideal para atividade enzimática de LOX é normalmente em torno de 37°C (HAGMANN et al., 1995; MCDONNELL et al., 2001). Temperaturas ótimas mais baixas apresentadas pelas lipoxigenases recombinantes de *S. woodyi* podem ser devido ao fato de que este micro-organismo seja de habitat marinho, ou seja, se encontra em ambientes com temperatura mais baixas que as demais espécies citadas, todas de ambientes terrestres. Desta maneira, a ação ótima da enzima LOX nesse organismo está adaptada à temperatura em que vive, de valores mais baixos.

5.4.6. Determinação da estabilidade térmica da enzima

Para verificar a estabilidade térmica das enzimas recombinantes, estas foram incubadas durante 5 minutos a diferentes temperaturas que variaram de 22°C a 70°C. Foram realizadas medições em espectrofotômetro com os substratos preferíveis de cada enzima (ácido linoleico para SWPrecLOX e ácido araquidônico para SWAraçLOX) a uma concentração constante de 0,4mM e uma concentração de enzima constante de 0,1mg/mL. Para a medição da enzima recombinante SWPrecLOX foi utilizado o tampão borato 20mM a pH 8,5, e para a enzima SWAraçLOX o tampão fosfato 50 mM a pH 7,5. A Figura 30 mostra os resultados de atividade enzimática obtidos.

SWPrecLOX se manteve estável entre 22°C e 38°C. A partir de 38°C teve sua atividade drasticamente reduzida. SWAraçLOX apresentou estabilidade entre 22°C e

36°C. A partir de 38°C também apresentou uma redução considerável de sua atividade enzimática. Lipoxigenase de *Olea europaea* se manteve estável até 60°C, apesar de apresentar redução de atividade (LORENZI et al., 2006). Já a de gérmen de trigo permaneceu ativa até 55°C (XU et al., 2012).

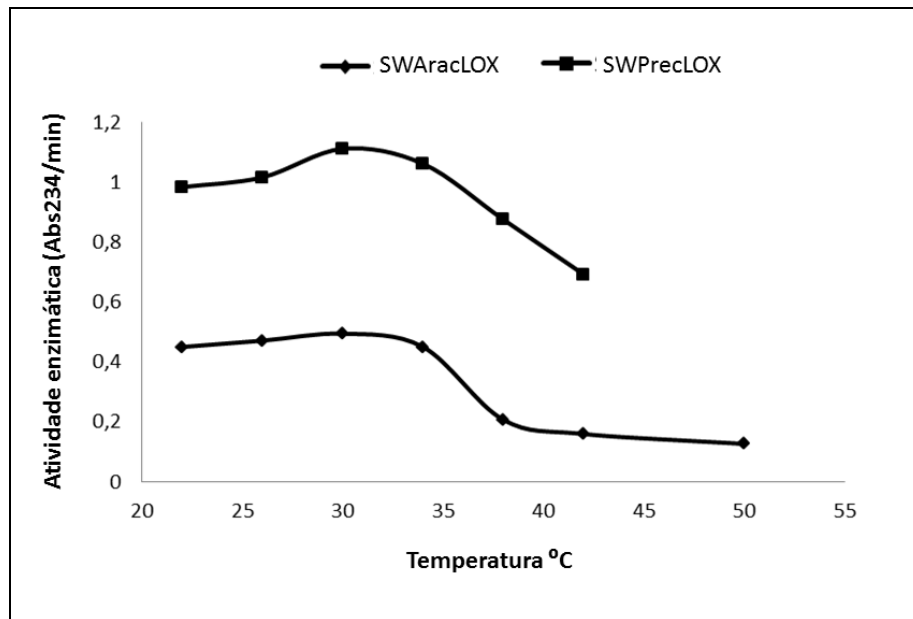


Figura 30: Determinação da estabilidade térmica das enzimas recombinantes SWPrecLOX e SWAraçLOX de *S. woodyi*. Atividade enzimática medida através do método espectrofotométrico com ácido linoleico a 0,4mM e ácido araquidônico a 0,35mM.

5.4.7. Influência de diferentes íons bivalentes na atividade enzimática

Para determinar a influência de determinados metais na atividade das enzimas recombinantes, foi medida a atividade por espectrofotômetro com a adição dos metais, separadamente, a uma concentração final de 1 mM. Os metais utilizados foram: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CdCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A concentração de enzima e substrato foi constante. Foi calculada a porcentagem de atividade enzimática com relação ao

controle, ou seja, sem nenhum metal adicionado. A Figura 31 mostra a porcentagem de atividade na presença de cada um dos metais com relação ao controle.

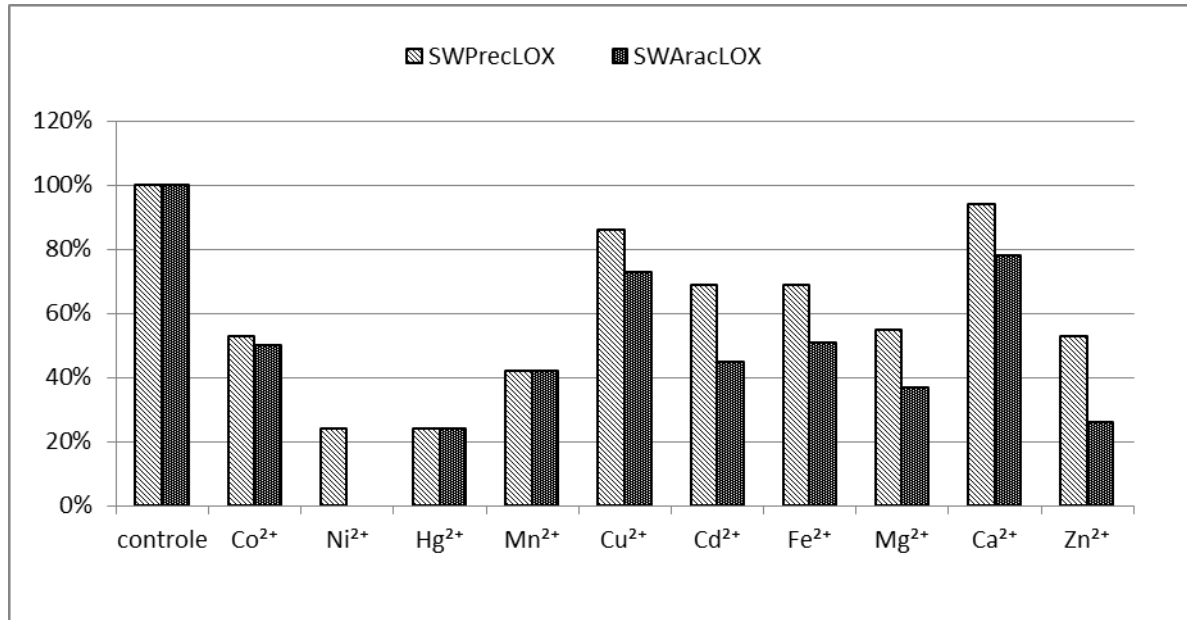


Figura 31: Influência de diferentes íons bivalentes na atividade das enzimas recombinantes SWPrecLOX e SWAraCLOX de *S. woodyi*. Atividade enzimática medida através do método espectrofotométrico com ácido linolêico a 0,4mM e ácido araquidônico a 0,35mM.

Como se vê, nenhuma das duas enzimas recombinantes teve sua atividade enzimática aumentada na presença íons metálicos, ao contrário da LOX recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, que em presença de Ca²⁺ e Zn²⁺ apresentou um acréscimo na atividade (VIDAL-MAS et al., 2005). Os íons que menos influenciaram a atividade de SWPrecLOX foram Ca²⁺ e Cu²⁺, que mantiveram cerca de 90% da atividade da enzima. Ni²⁺ e Hg²⁺ foram os íon que mais inibiram a atividade de SWPrecLOX, diminuindo-a a aproximadamente 20%. SWAraCLOX teve sua atividade totalmente inibida por Ni²⁺ e bruscamente alterada por Hg²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺. Os íons que menos influenciaram a atividade enzimática de SWAraCLOX foram Ca²⁺, que manteve cerca de 78% da atividade, e Cu²⁺, com 72% de atividade. A atividade de lipoxigenase de *Pleurotus ostreatus* foi estimulada na presença de Cu²⁺, enquanto que os íons Co²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺ e Ca²⁺ a inibiram (KURIBAIASHI et al., 2002). O íon divalente Mn²⁺ estimulou a atividade de lipoxigenase de *Phaseolus*

vulgaris (SICILIA et al., 2005), enquanto inibiu a atividade da enzima em arroz (OHTA et al., 1992).

Lipoxigenase recombinante de *Olea europaea*, Oep2LOX2, foi totalmente inativada na presença de Hg^{2+} , e teve sua atividade diminuída a 49% em presença de Cu^{2+} . Outra enzima recombinante da mesma espécie, Oep1LOX2, foi parcialmente inativada por Hg^{2+} (60%) (PADILLA et al., 2009). Oep2LOX1, outra LOX recombinante de *Olea europaea*, apresentou 31% de inativação em presença de Fe^{3+} e 53% com Cu^{2+} , e foi parcialmente inativada com Hg^{2+} (17%) e Mn^{2+} (24%). Efeitos de incremento e inibição da atividade de lipoxigenases parecem estar relacionados com a interação dos íons metálicos com os resíduos de aminoácidos presentes ou próximos ao centro ativo (PADILLA et al., 2012).

5.4.8. Determinação das constantes cinéticas

Determinaram-se as constantes cinéticas de velocidade máxima (V_{max}), constante de Michaelis-Menten (K_m), constante de catálise e constante de eficiência catalítica medindo-se a atividade a diferentes concentrações de substrato a pH ótimo de reação, a 24°C e a uma concentração constante de enzima de 0,1mg/mL. Calcularam-se estas constantes cinéticas a partir da representação de dobros-recíprocos (Lineweaver-Burk) da equação de Michaelis-Menten (Figuras 32 e 33). Utilizou-se o programa Lucenz III v. 1.02 (ALAN CLARK, 2002). Na Tabela 10 estão reunidos todos os valores obtidos das constantes cinéticas das enzimas SWPrecLOX e SWAraçLOX.

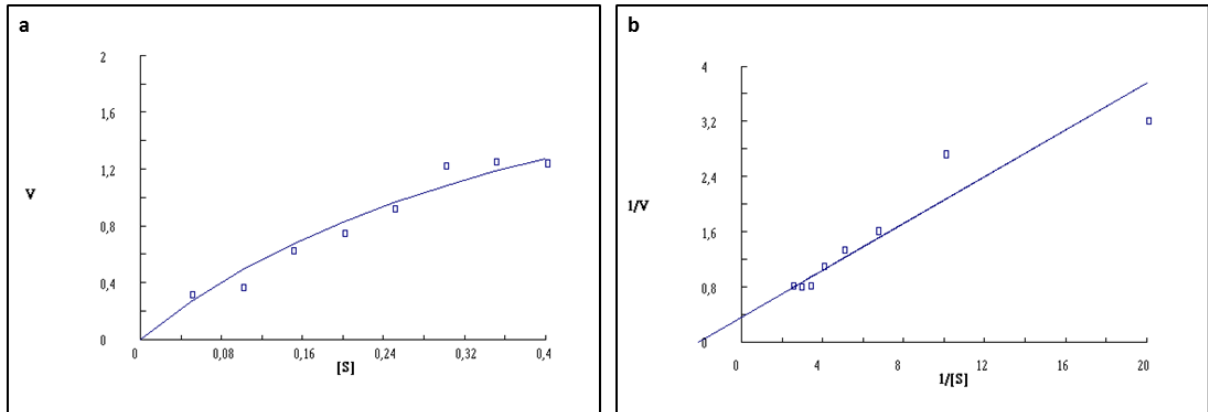


Figura 32: a. Representação da velocidade de reação da enzima SWPrecLOX de acordo com a concentração de substrato ácido linoleico. b. Representação de Lineweaver-Burk de SWPrecLOX com ácido linoleico.

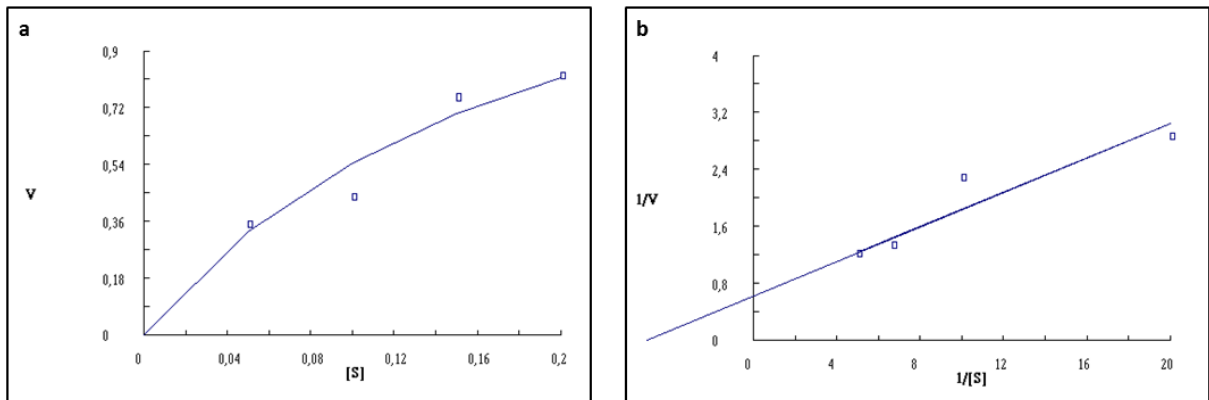


Figura 33: a. Representação da velocidade de reação da enzima SWPrecLOX de acordo com a concentração de substrato ácido linoleico. b. Representação de Lineweaver-Burk de SWPrecLOX com ácido linoleico.

Tabela 10: Constantes cinéticas das lipoxigenases recombinantes SWPrecLOX e SWAraçLOX.

	Km (mM)	Vmax (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Constante de catálise (s ⁻¹)	Constante de eficiência catalítica (μM ⁻¹ s ⁻¹)
SWPrecLOX – ácido linoleico	0,47 +/- 0,17	2,78 +/- 0,27	39,3 x 10 ³	83,8
SWAraçLOX – ácido araquidônico	0,20 +/- 0,19	1,61 +/- 0,34	22,8 x 10 ³	114,0

5.5. DETERMINAÇÃO DO METAL PRESENTE NO CENTRO CATALÍTICO

Estudo de plasma indutivamente acoplado à espectrometria de massa, realizada para elucidar a presença de manganês ou de ferro, indicou que a enzima SWPrecLOX continha 0,15 moles de Fe^{2+} por mol de enzima e pequenas quantidades de Mn^{2+} (10 mmol) por mol de proteína. O mesmo ocorreu com SWAraçLOX, que apresentou 0,15 moles de Fe^{2+} por mol de enzima e 20mmol de Mn^{2+} por mol de enzima. Com esses resultados, conclui-se que ambas as proteínas possuem Ferro em seu centro catalítico.

5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS DE REAÇÃO ENZIMÁTICA

O produto obtido da biotransformação de ácido linoleico (C18:2) por SWPrecLOX foi analisado por HPLC LightScattering e LC-MS-MS. O tempo de retenção em HPLC LightScattering para ácido linoleico foi de 13,06 min e para o produto de transformação com SWPrecLOX foi de 6,19min (Figura 34).

Simultaneamente, as amostras foram analisadas em LC-MS/MS, onde o produto de transformação do ácido linoleico por SWPrecLOX apresentou um sinal de m/z 311 (M^-) na análise completa, um sinal de m/z 293 ($\text{M}^- -18$) sobre espectro completo de ms2 311.2 e sinais de m/z 275 ($\text{M}^- -18 -18$) e m/z 249 ($\text{M}^- -18 -44$) sobre o espectro completo de ms3 311.2/293.2.

O espectro de MS/MS (m/z 311 \rightarrow análise completa) de ácido 11-hidroxi-12R,13R-epoxi-9Z-octadecenóico (Figura 34), mostrou forte sinal de m/z 293 ($\text{M}^- -18$), m/z 211 ($\text{OOC}-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}=\text{CH-C}(\text{OH})-\text{CH}_2$) e m/z 197 ($\text{OOC}-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}=\text{CH-CHO}$) acompanhado por outros sinais de m/z 275 ($\text{M}^- -2 \times 18$), m/z 249 (311 -44 -18), m/z 227 ($\text{OOC}-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}=\text{CH-CH}(\text{OH})-\text{CHO}$), m/z 181 ($\text{OOC}-(\text{CH}_2)_6$ -

CH=CH-CH=CH₂). m/z 169 ($\text{OOC}-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}=\text{CH}_2$) e m/z 129 ($\text{HCO-CH}(\text{O}^-)\text{-C}_5\text{H}_{11}$). Vários íons (por exemplo, m/z 227, 211, 129) sugerem que há ocorrido uma migração de epóxido do ácido 11-hidroxi-12R,13R-epoxi-9Z-octadecenóico (OLIW et al., 2006).

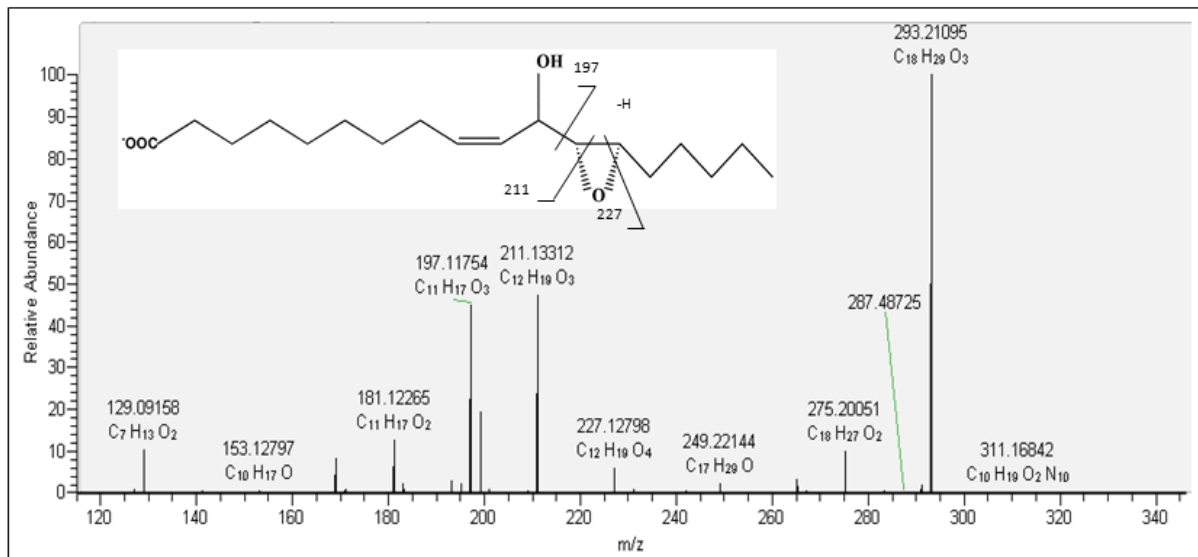


Figura 34: Análise MS/MS (m/z → análise completa) de ácido 11-hidroxi-12R,13R-epoxi-9Z-octadecenóico, produto da biotransformação do ácido linoleico.

O produto de biotransformação do ácido araquidônico (C₂₀:4) por SWAraCLOX, ácido 13-hidroxi-14R,15R-epoxi-5Z,8Z,11Z-eicosatetraenóico, apresentou um sinal de m/z 335 (M^-) na análise completa, um sinal de m/z 317 ($\text{M}^- - 18$) sobre o espectro completo ms2 335.2 e sinais de m/z 299 ($\text{M}^- - 2 \times 18$) e m/z 173 ($\text{M}^- - 18 - 44$) sobre o espectro completo ms3 335.2/317.2.

O espectro de MS/MS (m/z 335 → análise completa) de ácido 13-hidroxi-14R,15R-epoxi-5Z,8Z,11Z-eicosatetraenóico (Figura 35) mostrou sinal de m/z 317 ($\text{M}^- - 18$), m/z 291 ($\text{M}^- - 44$), m/z 273 ($\text{M}^- - 18 - 44$) e m/z 235 ($\text{OOC}-(\text{CH}_2)_3\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{CH-C}(\text{OH})\text{-CH}_2$).

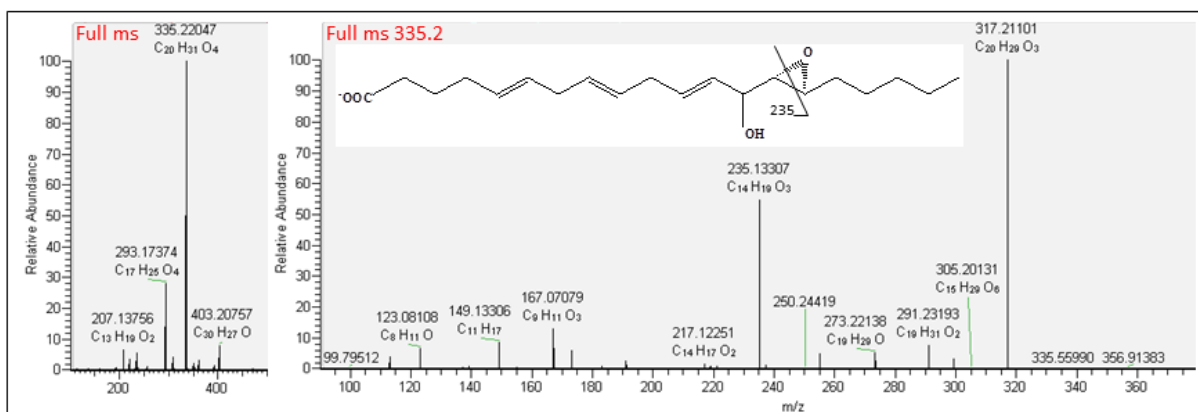


Figura 35: Análise MS/MS ($m/z \rightarrow$ análise completa) de ácido 13-hidroxi-14R,15R-epoxi-5Z,8Z,11Z-eicosatetraenóico, produto da biotransformação do ácido araquidônico.

Os fragmentos detectados das amostras de biotransformação do ácido linoleico e ácido araquidônico foram definidos como epóxi-alcoóis. Estes produtos são obtidos quando ácido linoleico ou ácido araquidônico sofrem hidroperoxidação (Figura 36A). Estes hidroperoxídios sofrem a perda do grupo hidroxila, obtendo um produto radicalizado (Figura 36B). Este produto radicalizado leva a obtenção de ácido 11-hidroxi-12R,13R-epoxi-9Z-octadecenóico, no caso da biotransformação do ácido linoleico, e 13-hidroxi-14R,15R-epoxi-5Z,8Z,11Z-eicosatetraenóico, quando o substrato é ácido araquidônico (Figura 36C).

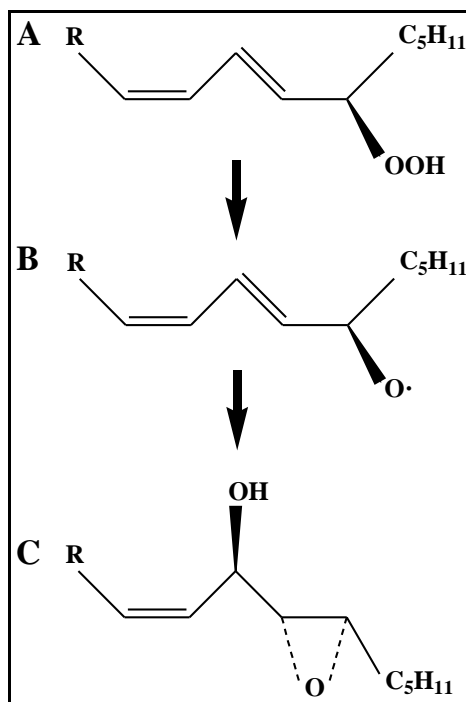


Figura 36: Biotransformação de um hidroperóxido a epoxy-álcool.

Diferentes produtos obtidos da biotransformação dos ácidos linoleico e araquidônico tem sido descritos na literatura, porém apenas detectaram-se epoxy-alcoóis - ácido 11-hidroxi-12R,13R-epoxi-9Z-octadecenóico e ácido 13-hidroxi-14R,15R-epoxi-5Z,8Z,11Z-eicosatetraenóico.

A partir desses resultados, podemos concluir que a reação hidroperoxidação do ácido linoleico pode ter ocorrido sobre o carbono 13 deste ácido e não sobre o carbono 9, o que nos permite catalogar a lipoxigenase de *S. woodyi* como uma 13-lipoxigenase.

O resultado da biotransformação do ácido araquidônico mostra um sinal a m/z 235, que pode ser explicado da mesma maneira que no caso do ácido linoleico. A lipoxigenase de *S. woodyi* atua sobre o grupo pentadieno dos carbonos 11 e 15, localizando o grupo hidroperóxido sobre carbono 15. Este hidroperóxido perderá o grupo hidróxido como na Figura 36, e o radical livre resultante será transformado

para o 14, 15 epóxido, introduzindo um grupo hidróxi sobre o carbono 13 (Figura 36). Os espectros de MS completa (Figura 35), mostra um sinal a m/z 235, de ácido 13-hidroxi-14R,15R-epoxi-5Z,8Z,11Z-eicosatetraenóico. O espectro total ms2 335,2 mostra um sinal de m/z 317 que representa a perda de uma molécula de água e um sinal a m/z 235, que representa o fragmento derivado da decomposição da molécula entre os carbonos 14 e 15. Este sinal é característico para o produto que contém o grupo 14,15-epóxi e o grupo hidroxila no carbono 13. O espectro completo ms3 335/317 (não representado) apresenta os sinais a m/z 299 ($M^- -2 \times 18$), representando a perda de uma segunda molécula de água, e m/z 273 ($M^- -18 -44$), representando uma perda de $-COO^-$.

5.7. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Preliminarmente aos estudos experimentais, foi realizada análise filogenética de diversas sequências aminoacídicas de lipoxigenases de diferentes organismos, tanto eucariotos como procariotos, com a finalidade de verificar em que posição se encontravam as enzimas lipoxigenase de *Shewanella woodyi* ATCC 51908 (Figura 37), e a partir de aí planejou-se a clonagem e expressão dos genes. Para a elaboração desta árvore filogenética, utilizou-se sequências de diferentes lipoxigenases de nove animais, dez plantas, sete fungos e vinte e cinco procariotos (Apêndice B).

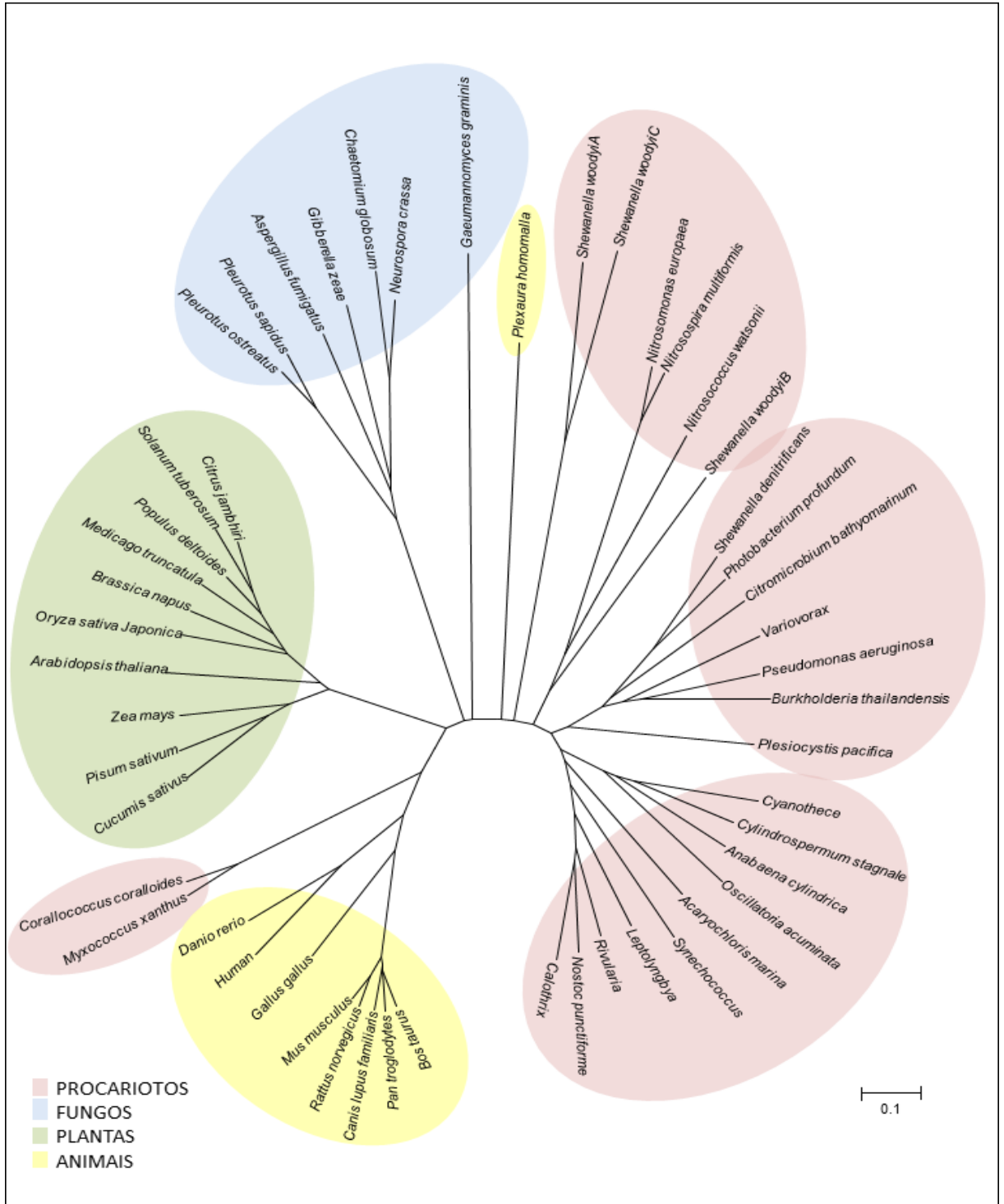


Figura 37: Análise da sequência de aminoácidos selecionadas de lipoxigenases de Proteobactérias e Cianobactérias, utilizando-se o método de Neighbor-Joining. Árvore mais parcimoniosa obtida com a soma dos comprimentos das ramificações = 16.59068198 é mostrada. A árvore está desenhada à escala, com comprimentos das ramificações nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram computadas utilizando-se o método de correção de Poisson. A análise envolveu 29 sequências de aminoácidos. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA5.

Como observado na Figura 37, as sequências de plantas e animais se alinham de maneira satisfatória, formando dois grupos muito bem definidos, com exceção da lipoxigenase de *Plexaura homomalla*, que se encontra separada do grupo de LOX animais. O mesmo ocorre no grupo de lipoxigenases fúngicas, que se agrupam em seis sequências, ficando a lipoxigenase de *Gaeumnnomyces graminis* distante filogeneticamente das demais. Quanto às lipoxigenases de procariotos, observa-se a formação de dois subgrupos, um formado por LOX de cianobactérias e outro por proteobactérias, e diversas sequências de proteobactérias distantes filogeneticamente uma das outras, demonstrando haver pouca homologia entre essas lipoxigenases. Duas LOX de *S. woodyi* se encontram na mesma ramificação, e por isso a escolha de somente uma delas para seguir com os estudos experimentais. A terceira lipoxigenase de *S. woodyi* se encontra na ramificação juntamente com as lipoxigenases de *Nitrosomonas europaea*, *Nitrospira multiformes* e *Nitrosococcus watsonii*, e distante filogeneticamente das demais LOX de *S. woodyi*, sendo também eleita para confirmação experimental.

A partir da análise da árvore filogenética completa, realizou-se uma específica somente com sequências de proteínas de origem procariótica (Figura 38). O código da base de dados GenBank para cada uma dessas sequências e os organismos que contém a referências estão presentes na Tabela 10. Das 38 sequências descritas como possíveis lipoxigenases presentes no banco de dados, 29 delas possuíam as características comuns às lipoxigenases, que são a sequência de resíduos de aminoácidos WxxAK, cinco resíduos coordenando o átomo de ferro, sendo três histidinas, uma asparagina ou histidina e o C-terminal, que em eucariotos é uma isoleucina (GAFFNEY, 1996) (Tabela 12). Algumas destas características não foram detectadas em 9 das 38 sequências de lipoxigenase originais encontradas no banco de dados, e estas foram excluídas da análise filogenética (ver Tabela 11), uma vez que todas estas características são bem conservadas em todas as lipoxigenases estudadas.

Tabela 11: Lista de organismos procariotos que contém lipoxigenase e número de acesso no GenBank para sequência de nucleotídeos da LOX. Os micro-organismos são agrupados em cianobactérias, proteobactérias e bacteroidete. Os organismos sombreados foram utilizados para construção da árvore filogenética (Figura 38).

MICRO-ORGANISMO	TIPO DE LOX	GENBANK	REF
<i>Phylum Proteobacteria</i>			
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	Arachidonate 15-lipoxygenase	ACA87192.1	
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	Hypothetical protein Swoo_2318	ACA86597.1	
<i>Shewanella violacea</i> DSS12		BAJ02412.1	
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	Arachidonate 15-lipoxygenase	ABE54964.1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42 A2 NCIMB40045	Linoleate oxigen reductase	AAL85880.2	Garreta et al., 2011
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622		YP_629994.1	
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718		NP_841292.1	
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK		ZP_01218321.1	
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Arachidonate 15-lipoxygenase precursor	ABC36974.1	
<i>Burkholderia thailandensis</i> Bt4	Arachidonate 15-lipoxygenase precursor	ZP_02388609.1	
<i>Citromicrobium bathyomarinum</i> JL354	Arachidonate 15-lipoxygenase precursor	ZP_06863039.1	
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259		YP_005368711.1	
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259	Arachidonate 15-lipoxygenase precursor	YP_005368710.1	
<i>Nitrosococcus watsonii</i> C-113	Arachidonate 15-lipoxygenase	YP_003760561.1	
<i>Nitrosospora multiformis</i> ATCC 25196	Arachidonate 15-lipoxygenase	ABB73840.1	
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	Arachidonate 15-lipoxygenase	ZP_01906444.1	
<i>Phylum Cyanobacteria</i>			
<i>Variovorax</i> sp. CF313		ZP_10568041.1	
<i>Thiocapsa marina</i> 5811	Arachidonate 15-lipoxygenase	ZP_08768587.1	
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142		YP_001804062.1	
<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017		YP_001515175.1	Gao et al., 2010
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Hypothetical protein	ZP_00106490.1	Lang and Feussner, 2008
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Hypothetical protein all8020	NP_478445.1	Andreou et al. 2008
<i>Calothrix</i> sp. PCC 630		YP_007138537.1	
<i>Rivularia</i> sp. PCC 7116		AFY58433.1	
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304		YP_007086119.1	
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	Arachidonate 15-lipoxygenase	AFZ57795.1	
<i>Anabaena flos-aque</i>	Linoleate-9-lipoxygenase		Murakami et al., 1992
<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417		AFZ28027.1	
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375		ZP_18908774.1	
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	Arachidonate 15-lipoxygenase	YP_007070211.1	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335		ZP_05039643.1	
<i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605		AFY92607.1	
<i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> PCC 7420		ZP_05027527.1	
<i>Microcoleus vaginatus</i> FGP-2	Arachidonate 15-lipoxygenase	ZP_08495591.1	
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9808	Arachidonate 15-lipoxygenase	ZP_18840635.1	
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112	Arachidonate 15-lipoxygenase	YP_007117702.1	
<i>Phylum Bacteroidete</i>			
<i>Indibacter alkaliphilus</i> LW1		ZP_11015180.1	

Tabela 12: Alinhamento dos resíduos de aminoácidos que determinam a especificidade das lipoxigenases de Proteobactérias e Cianobactérias. A sequência de aminoácidos WxxAK, os ligantes de ferro (três histidinas, uma asparagina e o resíduo C-terminal) e o resíduo determinante da estereoespecificidade da enzima (alanina ou glicina) estão marcados em cinza.

Organismo		Sequência WXXAK	Ligantes de ferro	Estereoespecificidade	Ligantes de ferro	Resíduo C-terminal
Proteobacteria						
α	<i>Citromicrobium bathyomarinum</i> JL354	EKQWG WEMAK LVVQV 327	LFA HL ARTHLVI 346	NDAA A NS 384	SAQ H ASV N FPQ 523	PSL I PC S T N I 646
β	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	---L W L A A K TFAQV 253	L V T H AT R I H Y V M 272	N H Q H T F L 310	TAF H SC I H F N Q 452	PR I IP N GV T V 565
β	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	SAY W A W Q M A K T V V Q C 377	M F V H L A R T H L V T 396	N E L A A L T 434	SAQ H A A V N F S Q 572	PS R IP A ST N I 695
β	<i>Burkholderia thailandensis</i> Bt4	SAY W A W Q M A K T V V Q C 359	M F V H L A R T H L V T 378	N E L A A L T 416	SAQ H A A V N F S Q 554	PS R IP A ST N I 677
β	<i>Nitrosospira multiformis</i> ATCC 25196	---L W L T A K M F AQV 241	L Y T H AT R I H Y V M 260	N H Q H T F L 298	TAF H SC I H F N Q 440	PR F IP N GV T I 553
β	<i>Variovorax</i> sp. CF313	E A W W A W Q S A K T A V Q V 349	M F V H L G R T H L M S 368	N E A A T L I 406	SAQ H A A V N FPQ 546	PS R IP S ST N I 669
γ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2 NCIMB40045	D L Y W G W Q M A K T V V Q V 366	M F V H L A Q T H L V S 385	N E G A A R I 423	SAQ H A A V N FPQ 562	PS R IP A ST N I 685
γ	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 - A	D N E W T W K M A K N T F T T 431	V V D H L S - T H V F L 448	N F T G I F F 486	S V N H A L G N F S - 641	P S T M T V S P N 756
γ	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 - B	P L G V K W Q I A K A F V Q N 392	T V A H L G A C H L T I 411	N D G A I H S 449	SAQ H A S V N Y A Q 607	P S M V P N S I S I 725
γ	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 - C	N D Y S W W Q M A K S T L T T 393	V V D H L S - T H I Y L 410	N H I G V F S 448	S V N H A L D R F F - 599	P S S I T V S P N 714
γ	<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	A A F W Q W Q A A M S T V Q V 302	L F V H L G R T H L L I 321	N N S A A G S 359	SAQ H A A V N FPQ 498	PS N IP M S N I 618
γ	<i>Shewanella violacea</i> DSS12	--P N F M F A K I H V Q C 522	F L Y H L G L A H L A I 541	N F L A R Q T 579	S A F H S A I N FPQ 724	P E N I A A S N I 839
γ	<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	S E Y W Q W Q A A M T M V Q V 298	L F V H L G R T H L V I 317	N N S A A G S 355	SAQ H A A V N FPQ 494	PS K IP P S N I 614
γ	<i>Nitrosococcus watsonii</i> C-113	---L D W F V A K L C V Q I 228	L G T H F A R T H V M 247	N D L G R T R 285	A P L H S A L N F A Q 427	P S E I I N S N T 539
γ	<i>Thiocapsa marina</i> 5811	---G L W L A V K T F T Q S 643	V V E H L L S T H L I V 662	N T S A R T Q 700	T A G H A A V N NGQ 846	P K Q V P Q S I V T 962
δ	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	---Y D W L A A K I Y L R C 355	M V S H A L R T H F V A 374	N E G A R K G 412	S V Q H A A V N Y L Q 556	P D R I P C G I T V 675
δ	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM2259	---H D W L A A K I Y L R C 356	M V G H A L R T H F V A 375	N E G A R K G 413	S V Q H A A V N Y L Q 557	A D R I P C G I T V 676
δ	<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	---V W E L A K L H I Q C 379	L I S H L G L T H L L I 398	N E S A I T S 436	SAQ H A S V N FPQ 588	PS R V P Q S I N I 706
Cyanobacteria						
	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	S Q G E P W M S A K N I V Q M 407	L I S H L G R T H L V V 426	N Y G A H A F 463	SAQ H A A V N FPQ 611	P T N I P Q S I N I 726
	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	S E Q W A W L M A K T I V Q I 350	L I S H L G R T H L L I 369	N N A A I S G 407	SAQ H A A V N F S Q 559	P N K I P Q S I N I 672
	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	S G K Y A W L F A K T I V Q I 316	A V T H L A R T H L L V 335	N D A A Q R I 373	SAQ H A A V N FPQ 517	PS K IP Q S I N I 630
	<i>Calothrix</i> sp. PCC 630	S P Q Y A W M F A K T V V H I 315	A V S H L G R T H L F V 334	N E E A Q R A 372	SAQ H A A V N FPQ 517	PS R IP Q S I N I 631
	<i>Rivularia</i> sp. PCC 7116	S D K Y A W L F A K T I V Q I 316	A V T H L G R T H L L V 335	N D A A Q R R 373	SAQ H A A V N FPQ 518	PS K IP Q S I N I 631
	<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	---S W M V A K T I L Q M 410	L V S H L G Q T H L V I 429	N Y G A H K T 467	SAQ H A A M N FPQ 615	PS Q IP Q S I N I 727
	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	---T W M T A K N I V Q M 385	L V S H L G R T H L V I 404	N Y G A H K S 441	SAQ H A A V N FPQ 589	PS R IP Q S I N I 702
	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	T N A D T W M T A K N I V Q M 399	L I S H L G R T H L V V 418	N Y G A H T S 455	SAQ H A A V N FPQ 603	P T N I P Q S I N I 719
	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	S N P Y A W L C A K T I V Q V 311	A V T H L A R T H L F I 330	N N E A Q A K 368	SAQ H A A V N FPQ 517	P K N I P Q S I N I 630
	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	S N K Y A W L C A K T A V Q I 313	A V T H L A R T H L F M 332	N D S A Q A K 370	SAQ H A A V N FPQ 514	PS L IP Q S I N I 627
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	S G R Y A W L A A K T A V Q I 430	A I T H L A R T H L L I 449	N F G A N K I 487	S V Q H A A V N FPQ 633	S Y N I P Q S I N I 748

Como mostrado na Tabela 12, em lipoxigenases proteobacterianas, o metal do sítio ativo é coordenado por três histidinas (H), uma asparagina (N) e um último aminoácido, que pode ser uma histidina (H), uma valina (V), uma asparagina (N) ou uma treonina (T). Em cianobactérias, o metal é coordenada por três histidinas (H) e uma asparagina (N), e há sempre uma isoleucina (I) na posição terminal. Esta estrutura é bem conservada em lipoxigenases de plantas (incluindo as citosólicas e plastídicas).

Para fazer os alinhamentos das diversas sequências utilizadas neste trabalho se utilizou o programa bioinformático Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), programa de alinhamento de sequências nucleotídicas ou aminoacídicas que produz alinhamentos múltiplos de sequências divergentes biologicamente significativas.

A partir das sequências alinhadas, pelo programa MEGA 5.1 (TAMURAKA, et al, 2007) integrado ao CLUSTAL W, foram geradas as árvores filogenéticas pelas sequências analisadas. A árvore filogenética foi obtida pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), com a soma do comprimento das ramificações = 10.32281263. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson (ZUCKERKANDL e PAULING, 1965) e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por site. O nível de confiança da árvore é determinado por uma análise de “bootstrapping” de 1000 réplicas.

A Figura 38 apresenta a árvore filogenética gerada a partir das sequências de aminoácidos dos procariotos citados acima.

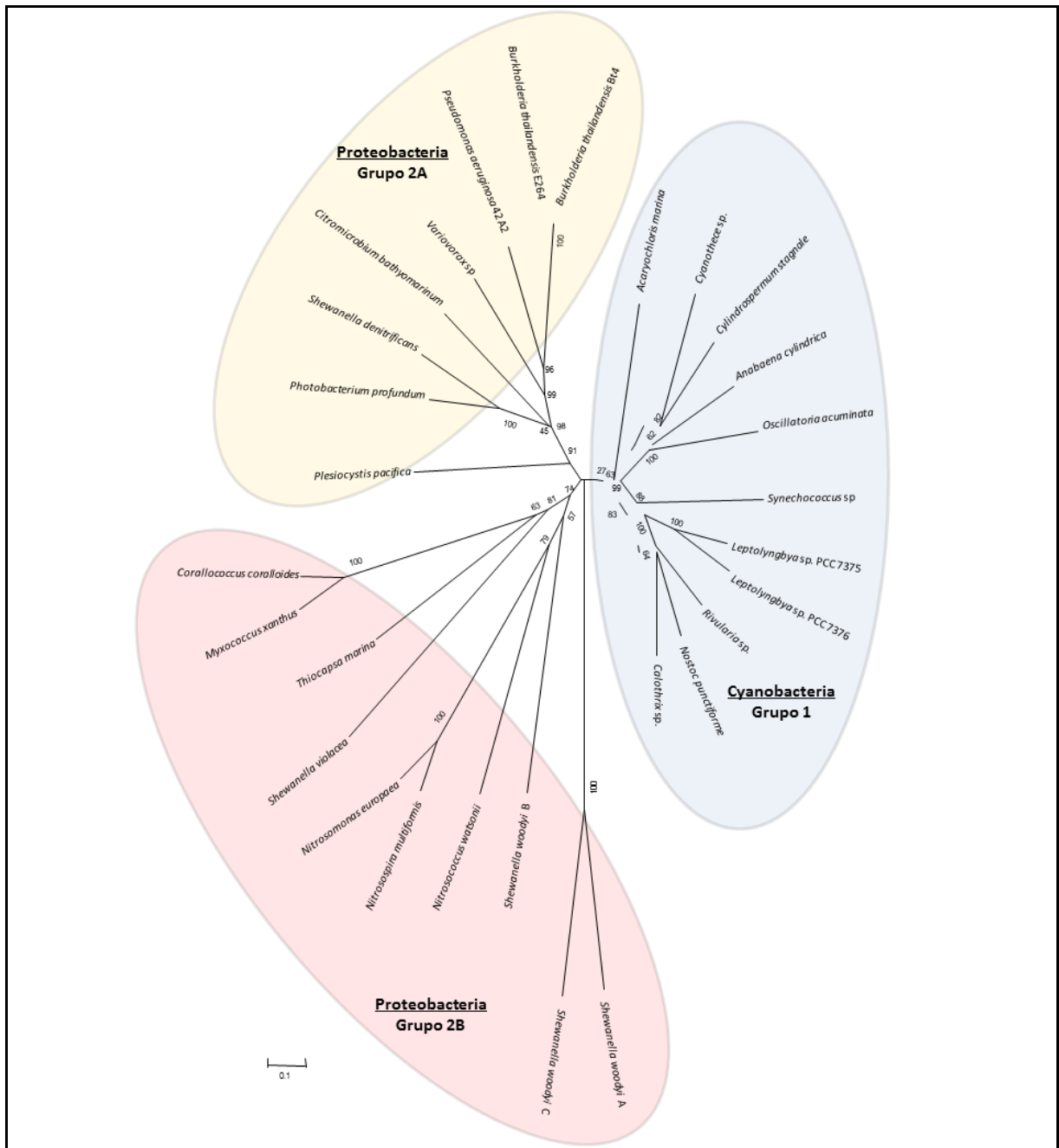


Figura 38: Análise da sequência de aminoácidos selecionadas de lipoxigenases de Proteobactérias e Cianobactérias, utilizando-se o método de Neighbor-Joining. Árvore mais parcimoniosa obtida com a soma dos comprimentos das ramificações = 10.32281263 é mostrada. A árvore está desenhada à escala, com comprimentos das ramificações nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram computadas utilizando-se o método de correção de Poisson. A análise envolveu 29 sequências de aminoácidos. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA5.

A árvore filogenética mostra três grupos de lipoxigenases procariotas (Figura 38). As lipoxigenases de cianobactérias foram bem agrupadas (grupo 1) - e

diferenças nas características de aminoácidos não foram encontradas, sugerindo uma origem comum. Este resultado está de acordo com a teoria endossimbiótica, a qual descreve a origem dos plastídios de cianobactérias semelhantes que vivem no interior de células hospedeiras eucarióticas (MCFADDEN, 2001), sugerindo que estas lipoxigenases podem ser a origem de lipoxigenases de plantas, já que não há diferenças entre estes dois grupos (ANDREOU et al. 2009). Em contraste, lipoxigenases de proteobactéria foram divididas em dois grupos (grupo 2A e 2B). O grupo 2A, com as ramificações mais curtas do que as do grupo 2B, contém quatro classes de Proteobactéria (α , β , γ , δ) e formam um grupo bem definido, semelhante ao das lipoxigenases de cianobactéria, com alanina (A) como o resíduo estereoespecífico determinante (S) e isoleucina (I), como resíduo C-terminal (Tabela 11).

Já o grupo 2B contém três classes de Proteobactéria (β , γ , δ), mas as ramificações dentro deste grupo são muito mais profundas em comparação com o grupo 2A, indicando uma maior distância filogenética. Observa-se que, assim como na árvore filogenética de LOX eucariotas e procariotas (Figura 37), a enzima SWPrecLOX aparece juntamente com uma hipotética enzima LOX de *Shewanella woodyi*, em uma ramificação separada das demais LOX de proteobactérias do grupo 2B. Já a SWAraCLOX se encontra na mesma ramificação que as demais lipoxigenases deste grupo. Apesar da maioria das sequências que formam este grupo apresentarem os critérios de serem lipoxigenases (resíduos do C-terminal, resíduos de ferro-ligante e a sequência WxxAK) (Tabela 12), elas não foram experimentalmente caracterizadas até o momento. Assim, trabalhos experimentais são necessários para descrever a natureza destas proteínas com segurança.

Coffa e Brash (2004) demonstraram que, em eucariotas, o aminoácido conservado em S-lipoxigenases é a alanina e em R-LOX, glicina. Em cianobactérias, o resíduo de determinação de estereoespecificidade é a alanina, indicando uma S-LOX (Tabela 12). No entanto, Andreou et al. (2008) relataram que os produtos de

reação da lipoxigenase de *Nostoc* sp. PCC7120 foram R (9R e 13R), embora o resíduo conservado seja a alanina. Já o produto de *Nostoc punctiforme* é 13S, obedecendo ao critério de estereoespecificidade (KOEDUKA et al., 2007). Situação semelhante é verificada em *Anabaena flos-aque*, que contem uma R-LOX (MURAKAMI et al., 1992). Em *Cyanothece* sp., os produtos de Csplos2 (YP_0023732439) apresentaram ambas estereoconfigurações (9R e 13S) (ANDREOU et al., 2010). Já no caso de *Pseudomonas aeruginosa*, esta apresentou somente uma S-LOX (LU et al., 2012). O resíduo de aminoácido que determina a estereoespecificidade dos diferentes alinhamentos incluídos na tabela 6 sugere que há mais diversidade entre lipoxigenases de procariotos que eucariotos, uma vez que o controle da estereoseletividade depende apenas dos resíduos alanina e glicina.

Apesar das técnicas de sequenciação genômica terem proporcionado a inclusão de aproximadamente 3.700 genomas bacterianos no Genome Online Database (GOLD), somente 38 deles apresentam o gene que codifica a enzima lipoxigenase e estão depositados no banco de dados NCBI. Isto pode ser devido a elevada variação na estrutura primária da lipoxigenase que afeta todos os aminoácidos, com exceção dos resíduos altamente conservados que atuam como ligantes do metal do centro catalítico (Tabela 12). Todos esses genes sequenciados no NCBI pertencem à bactérias gram-negativas, sendo que 18 deles pertencem ao filo Cyanobacteria, 19 ao filo Proteobacteria e 1 ao filo Bacteroidete. No entanto, somente algumas delas estão caracterizadas bioquimicamente.

O papel biológico das lipoxigenases até o momento não foi elucidado. Curiosamente, esta enzima só foi identificada no genoma de bactérias gram-negativas ambientais, sendo nenhuma delas patogênica.

O alinhamento heterogêneo pode ser a razão pela qual lipoxigenases não foram detectadas em bactérias gram-positivas e no reino de Archea. O filo Cyanobacteria habitam todos os ecossistemas da Terra, ocorrem como células planctônicas ou nas colônias filamentosas, em ambientes marinhos ou de água doce - e até mesmo em rochas ou no solo úmido (COHEN e GUREVITZ, 2006). O filo Proteobacteria, outro grupo onde consta a presença de lipoxigenase, mostra capacidades versáteis de degradação e quimiliototrofia (ex *Nitrosomonas*, *Nitrospira*)

associada a plantas. Também inclui gêneros como *Shewanella*, que ocorrem em sedimentos, ambientes marinhos e alimentos em decomposição. Notavelmente, embora a classe γ -Proteobacteria contenha patógenos importantes, como por exemplo *Salmonella* e *Neisseria*, até agora nenhuma das lipoxigenases detectadas provém de micro-organismos patógenos.

Uma possível função biológica das lipoxigenases presentes em bactérias pode ser facilitar a plasticidade dinâmica das membranas. Isso pode ser uma vantagem para a colonização de uma ampla gama de ambientes onde as bactérias se adaptaram e também na interação com organismos eucariotos. Sabe-se que a chave para manter a dinâmica e a funcionabilidade das membranas é garantir a presença de ácidos graxos poliinsaturados (VANCE et al. 2004; WASTERACK et al. 2002). No caso de Cianobactérias, o ácido graxo predominante (acima de 27%) é o ácido linolêico (C18:2). Em *Microcystis aeruginosa* foram encontrados ácidos graxos poliinsaturados como ácido α -linolênico (C18: 3), ácido γ -linolênico (C18: 3) e ácido cis-11-eicosenóico (C20: 1) (SHARATHCHANDRA e RAJASHEKHAR 2011). Gao et al. (2010) relataram ácidos poliinsaturados octadecenóicos em *Acaryochloris marina* (cerca de 44%), enquanto *Nostoc* foi descrita com um elevado teor de C18: 3 (até 41%). No caso de *Shewanella*, observou-se a produção de ácidos poliinsaturados (ω -3) para adaptação a diminuição da temperatura ambiente, por meio da modulação da composição da sua membrana lipídica (HAU e GRALNICK, 2007).

Dentre as 29 sequências de aminoácidos utilizadas na confecção da árvore filogenética, 7 delas foram escolhidas com base em sua posição na árvore, e foi realizado um alinhamento estrutural juntamente com 2 lipoxigenases eucarióticas (*Homo sapiens* LOX PDBcode 3O8Y e *Glycine max* LOX PDBcode 1YGE), onde as sequências WxxAK e os ligantes do átomo de ferro foram identificados e alinhados (Figura 39a).

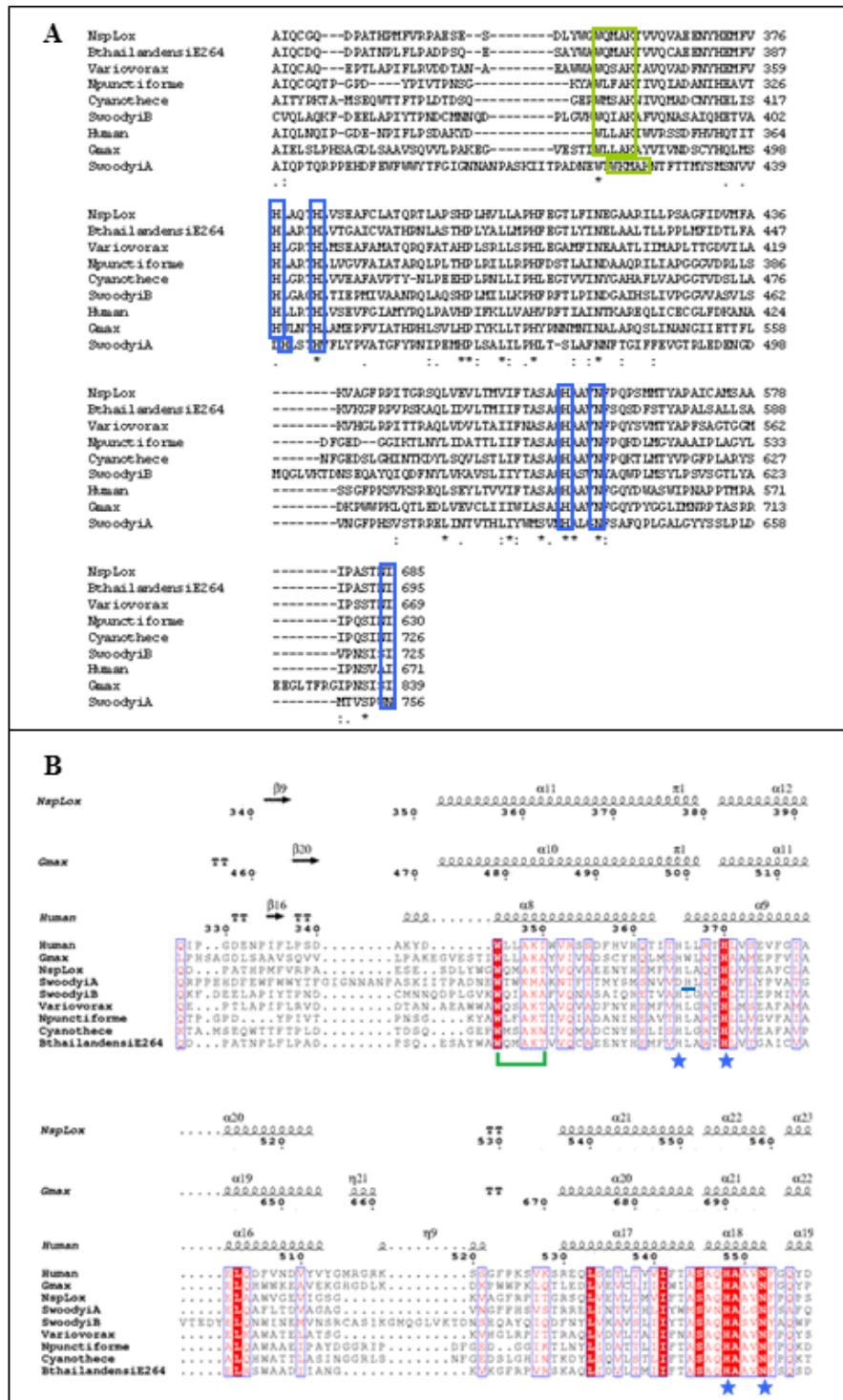


Figura 39: a. Alinhamento de múltiplas seqüências de resíduos de aminoácidos determinando especificidade posicional de lipoxigenases de Proteobactérias (ver Tabela X), Cianobactérias (ver Tabela X), Glycine max (NP_001236153.1) e Homo sapiens (NP_000689.1), usando o programa ClustalW2.1. b. Alinhamento estrutural de várias lipoxigenases procariotas, utilizando Pseudomonas aeruginosa 42A2 (código PDB 4G32), G. max (código PDB 1YGE) e H. sapiens (código PDB 3O8Y) como modelos, através do programa ESPript - Easy Sequencing in PostScript. Seqüência WxxAK em verde; ligantes do átomo de ferro em azul.

A sequência conservada de WxxAK aparecem numa α -hélice de 20-27 aminoácidos de comprimento, que contém a primeira histidina de coordenação do ferro catalítico. Esta α -hélice aparece conservada em todas as três estruturas (animais, plantas e micro-organismos) (Figura 39a). A segunda histidina de coordenação do ferro também aparece conservada nas três estruturas, e se encontra logo após esta α -hélice (Figura 39b).

Os outros dois resíduos responsáveis pela coordenação de ferro são duas histidinas, ou uma histidina e uma asparagina - e eles também aparecem conservados na sequência e alinhamento estrutural (Figura 39a e b). Nas três estruturas usadas como modelo, estes resíduos de coordenação do ferro estão numa α -hélice de 7-8 aminoácidos de comprimento (Figura 39b).

O quinto resíduo responsável pela coordenação do ferro é o resíduo do C-terminal (uma isoleucina na maioria das sequências), o qual, embora estruturalmente conservado, não aparece em qualquer estrutura reconhecível, como uma α -hélice ou folha β . Este alinhamento mostra a natureza altamente conservada destes resíduos na família de proteínas lipoxigenase, mas não permite detectar as diferenças dentro da subfamília de lipoxigenases bacterianas. Assim, novos alinhamentos estruturais foram realizadas utilizando três seqüências lipoxigenase procariotas intimamente relacionadas na árvore filogenética.

O alinhamento estrutural foi realizado com o programa ESPript, Easy Sequencing in PostScript (GOUET et al., 1999), permitindo a rápida visualização das sequências alinhadas e lendo os arquivos de estrutura secundária para produzir uma síntese de sequência e informação estrutural. Foram utilizados três modelos estruturais: *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (PDBcode 4G32 não disponível até o momento) (GARRETA, 2011) (Figura 40) para LOX procariotas, *Glycine max* lipoxigenase (PDBcode 1YGE) (Figura 41) para LOX de plantas e *Homo sapiens* lipoxigenase (PDBcode 3O8Y) (Figura 42) para LOX de mamíferos. O modelo estrutural de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 foi utilizado por ser a única enzima lipoxigenase cristalizada até o momento, ou seja, com sua estrutura real conhecida.

Nestes alinhamentos, as diferenças estruturais são evidentes entre lipoxigenases eucarióticas e procarióticas (Figuras 40, 41 e 42) e podem ser observadas nos primeiros 200 resíduos. A principal diferença é que a lipoxigenase de procarionto tem apenas um domínio em vez de dois, como nas lipoxigenases de eucariotos (Figura 43) (GARRETA, 2011).



Figura 40: Alinhamento estrutural dos primeiros 200 resíduos de aminoácidos, aproximadamente, de lipoxigenases de *P. aeruginosa* 42A2 (AAL85880.2), *Variovorax* sp. (ZP_10568041.1) e *Burkholderia thailandensis* E264 (ABC36974.1), utilizando como modelo estrutural a sequência aminoácídica de *P. aeruginosa* 42A2 (código PDB 4G32).

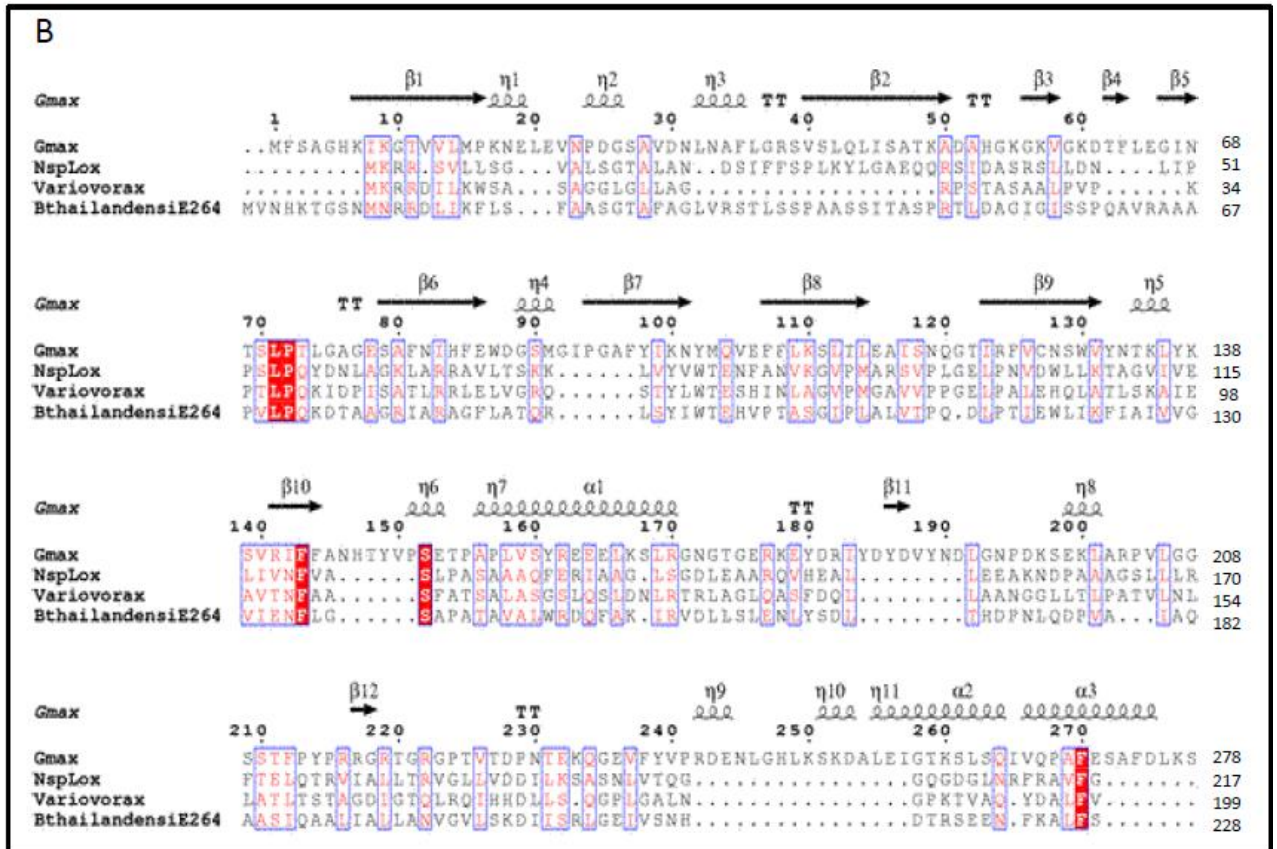


Figura 41: Alinhamento estrutural dos primeiros 200 resíduos de aminoácidos, aproximadamente, de lipoxigenases de *P. aeruginosa* 42A2 (AAL85880.2), *Variovorax* sp. (ZP_10568041.1) e *Burkholderia thailandensis* E264 (ABC36974.1), utilizando como modelo estrutural a sequência aminoácídica de *G. max* (código PDB 1YGE).

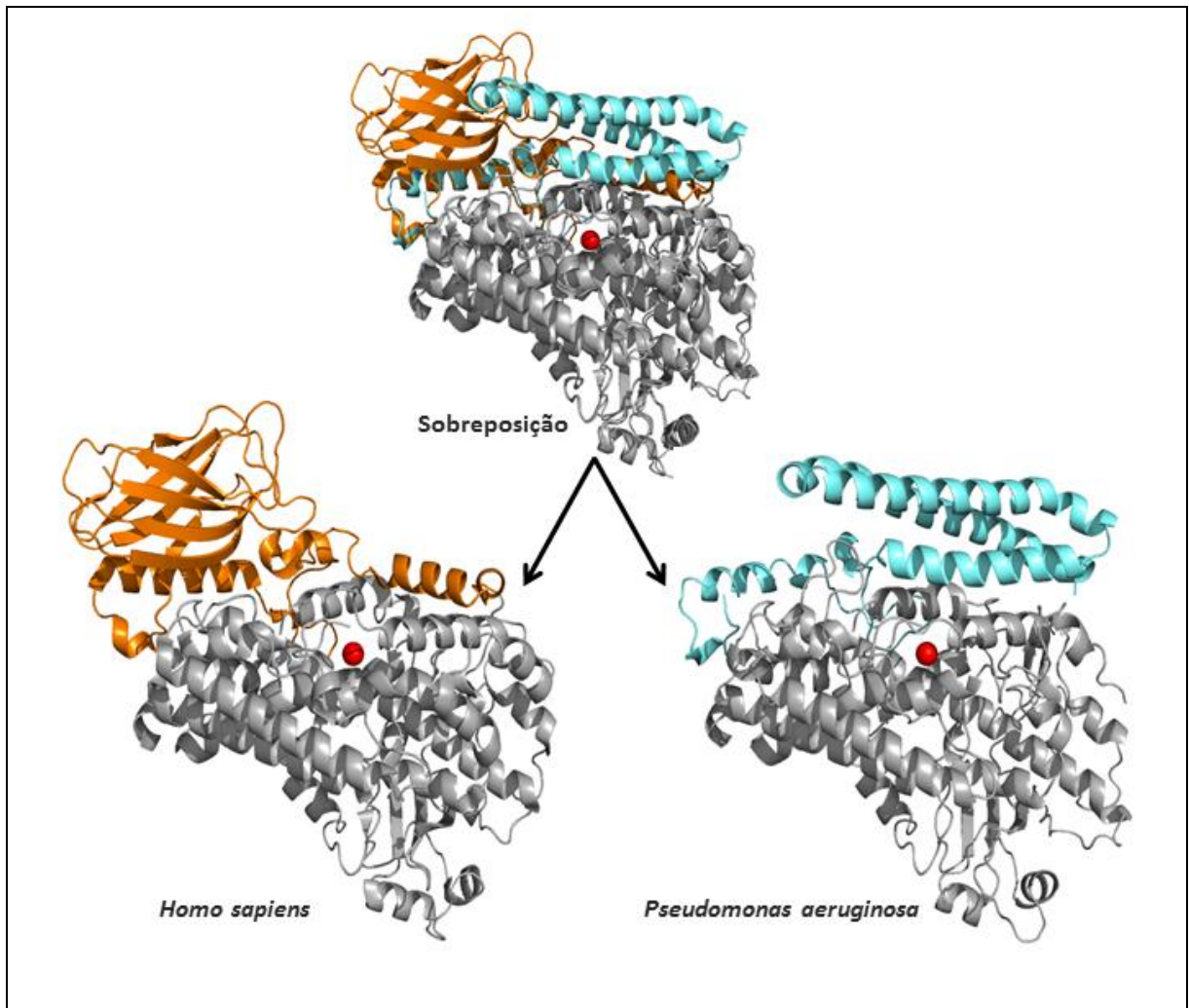


Figura 43: Sobreposição e estruturas moleculares individuais de lipoxigenase eucariótica (*Homo sapiens*, código PDB 3O8Y) e lipoxigenase procariótica (*Pseudomonas aeruginosa* 42A2, código PDB 4G32). A estrutura homóloga da lipoxigenase que corresponde ao domínio catalítico das lipoxigenases eucarióticas esta representada em cinza. O domínio N-terminal característico de eucariotos está em laranja. Os primeiros 200 resíduos de aminoácido (duas α -hélices antiparalelas que substituem o domínio N-terminal de LOX de eucariotos) da lipoxigenase procariótica estão em azul. A esfera vermelha representa o átomo de ferro do centro ativo da proteína. Ilustração por PyMOLv1.3.

O domínio N-terminal presente nas lipoxigenases eucarióticas parece ser substituído por duplas α -hélices antiparalelas nas lipoxigenases procariotas. Isso explica por que a homologia específica dos primeiros 200 aminoácidos das lipoxigenases procariotas é fraca, uma vez que cerca de 15% do alinhamento estrutural deles coincidem com a estrutura de lipoxigenase de *Pseudomonas*

aeruginosa (Figura 40), mas apenas cerca de 2% quando a modelo de estrutura é diferente de lipoxigenase procariótica (Figuras 41 e 42).

As estruturas hipotéticas das enzimas LOX de *S. woodyi* foram analisadas através do programa Phyre2 – Protein Homology/Analogy Recognition Engine v2.0, tendo como modelo estrutural as lipoxigenases de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (PANspLOX) (Figura 44 e 46) e a de *Plexaura homomalla* (Figura 45 e 47).

O modelo estrutural de *P. aeruginosa* 42A2 foi selecionado por ser esta a única enzima lipoxigenase de bactéria que se encontra cristalizada. Já o modelo de *Plexaura homomalla* por ser uma lipoxigenase eucariota, e também por ser a que apresenta maior homologia com as LOXs de *S. woodyi* quando se realiza um alinhamento estrutural contra todos os modelos presentes no banco de dados PDB. Ao realizar este alinhamento, a estrutura de *Plexaura homomalla* é indicada com homologia mais próxima de lipoxigenases de *S. woodyi*. Isto ocorre devido ao fato do modelo estrutural de PANspLOX não estar disponibilizado no banco de dados PDB, pois o trabalho referente à este modelo estrutural todavia não está publicado. Porém, ao realizar-se alinhamentos estruturais, a sequência de aminoácidos de SWPrecLOX e SWAraCLOX se ajustam melhor ao modelo estrutural de PANspLOX – **24%** de identidade e **593** aminoácidos alinhados com 100% de confiança de SWPrecLOX com PANspLOX, contra **21%** de identidade e **612** aminoácidos alinhados com 100% de confiança de SWPrecLOX com LOX de *Plexaura homomalla*. Já a sequência de SWAraCLOX apresenta **31%** de identidade e **622** aminoácidos alinhados com 100% de confiança com PANspLOX, contra **29%** de identidade e **544** aminoácidos alinhados com 100% de confiança com LOX de *P. homomalla*. Desta maneira, com ambas enzimas LOXs de *S. woodyi*, verificamos que há maior homologia com a lipoxigenase de *P. aeruginosa* do que com a de *Plexaura homomalla*, o que é esperado, uma vez que são lipoxigenases de procariotos.

No entanto, verifica-se que em SWPrecLOX, ocorre alinhamento de maior número de aminoácidos com a sequência da lipoxigenase de eucarioto do que com a PANspLOX (**612** aminoácidos alinhados com *Plexaura homomalla* contra **593** aminoácidos alinhados com PANspLOX). Isto provavelmente ocorra devido ao fato

da sequência primária da enzima SWPrecLOX ser maior que a de PANspLOX, contendo 71 aminoácidos a mais, contra 51 aminoácidos a mais que a lipoxigenase de *Plexaura homomalla*. Essa diferença de 19 aminoácidos alinhados se vê justamente na porção N-terminal da enzima e, quando modelado com PANspLOX, verifica-se que existem diferenças no domínio α -hélice, onde esta se vê com problemas de alinhamento estrutural (Figura 44). Com esta observação, pode-se inferir que há diferenças estruturais na porção N-terminal das enzimas SWPrecLOX e PANspLOX, onde a α -hélice presente no domínio único de LOX de *P. aeruginosa* é menor quando comparada à provável α -hélice de SWPrecLOX. Isto leva a pensar na hipótese de que esta última seja uma transição entre lipoxigenases de procariotos e eucariotos, não possuindo os dois domínios presentes em eucariotos (α -hélice e folhas- β), porém apresentando uma α -hélice maior que a de LOXs de *P. aeruginosa*, que, através de processos evolutivos, pode ter levado à estrutura de duplo domínio encontrada atualmente em lipoxigenases eucarióticas.

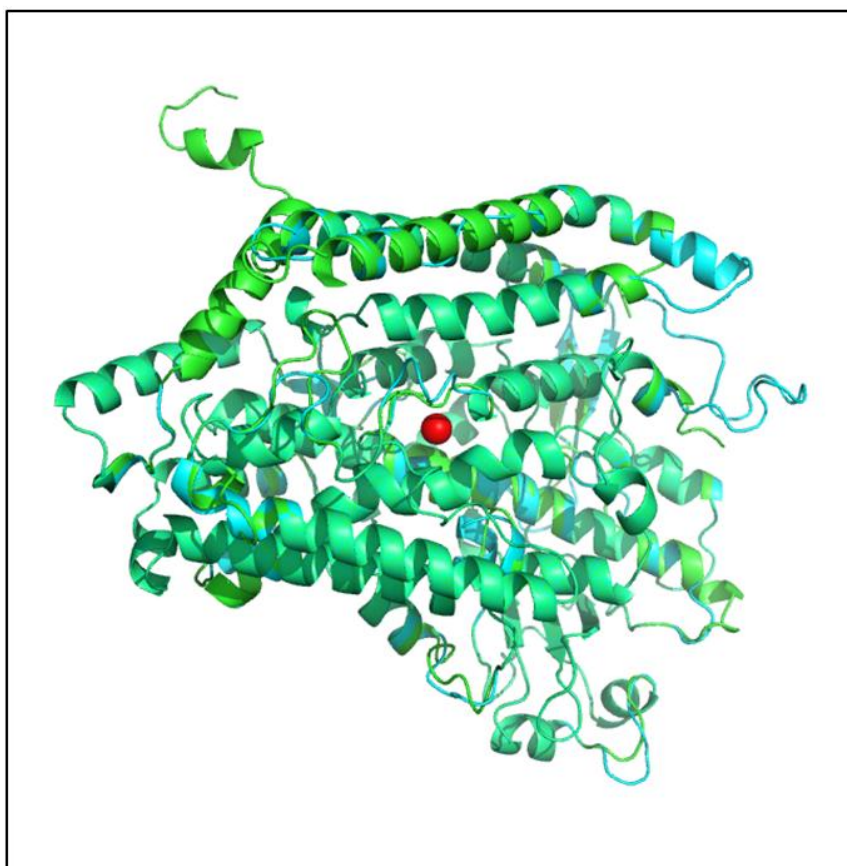


Figura 44: Sobreposição de estruturas moleculares de lipoxigenase SWPrecLOX tendo como modelo estrutural lipoxigenase procariótica (*Pseudomonas aeruginosa*

42A2, código PDB 4G32). A estrutura molecular de SWPrecLOX está representada em azul. Em verde, a enzima lipoxigenase de *P. aeruginosa* 42A2. A esfera em vermelho representa o átomo de ferro do centro catalítico das enzimas. Ilustração por PyMOLv1.3.

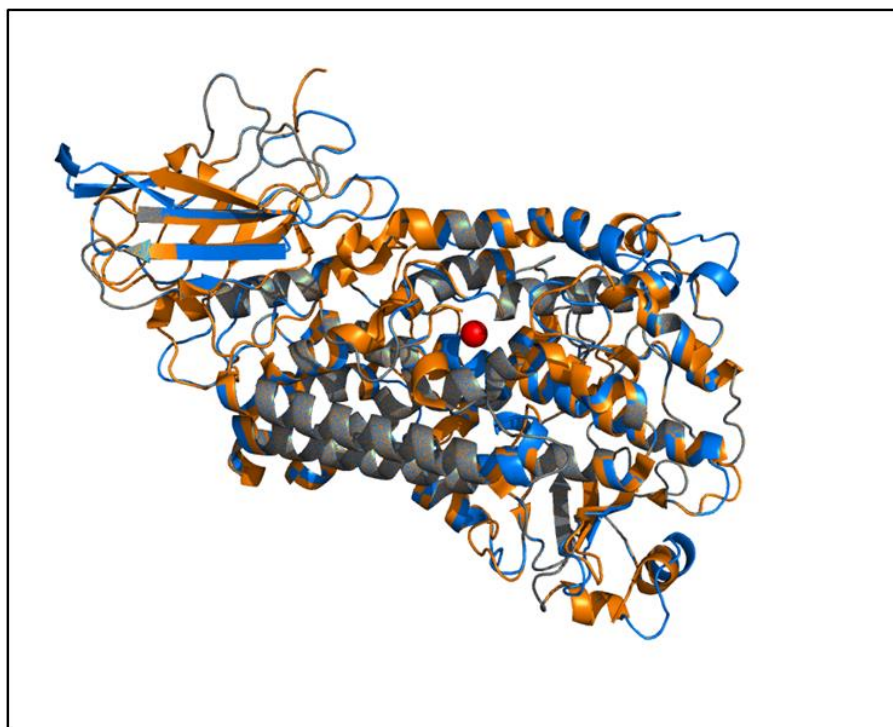


Figura 45: Sobreposição de estruturas moleculares de lipoxigenase SWPrecLOX tendo como modelo estrutural lipoxigenase eucariótica (*Plexaura homomalla*, código PDB 2FNQ). A estrutura molecular de SWPrecLOX está representada em azul. Em laranja, a enzima lipoxigenase de *P. homomalla*. A esfera em vermelho representa o átomo de ferro do centro catalítico das enzimas. Ilustração por PyMOLv1.3.

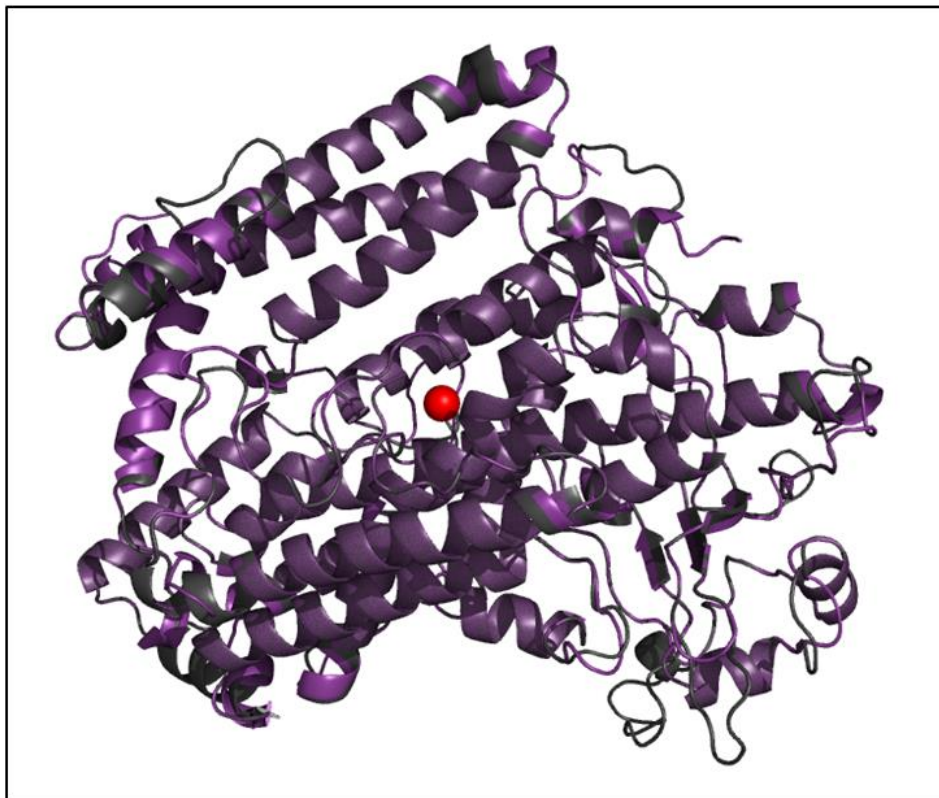


Figura 46: Sobreposição de estruturas moleculares de lipoxigenase SWAraCLOX tendo como modelo estrutural lipoxigenase procariótica (*Pseudomonas aeruginosa* 42A2, código PDB 4G32). A estrutura molecular de SWAraCLOX está representada em negro. Em roxo, a enzima lipoxigenase de *P. aeruginosa* 42A2. A esfera em vermelho representa o átomo de ferro do centro catalítico das enzimas. Ilustração por PyMOLv1.3.

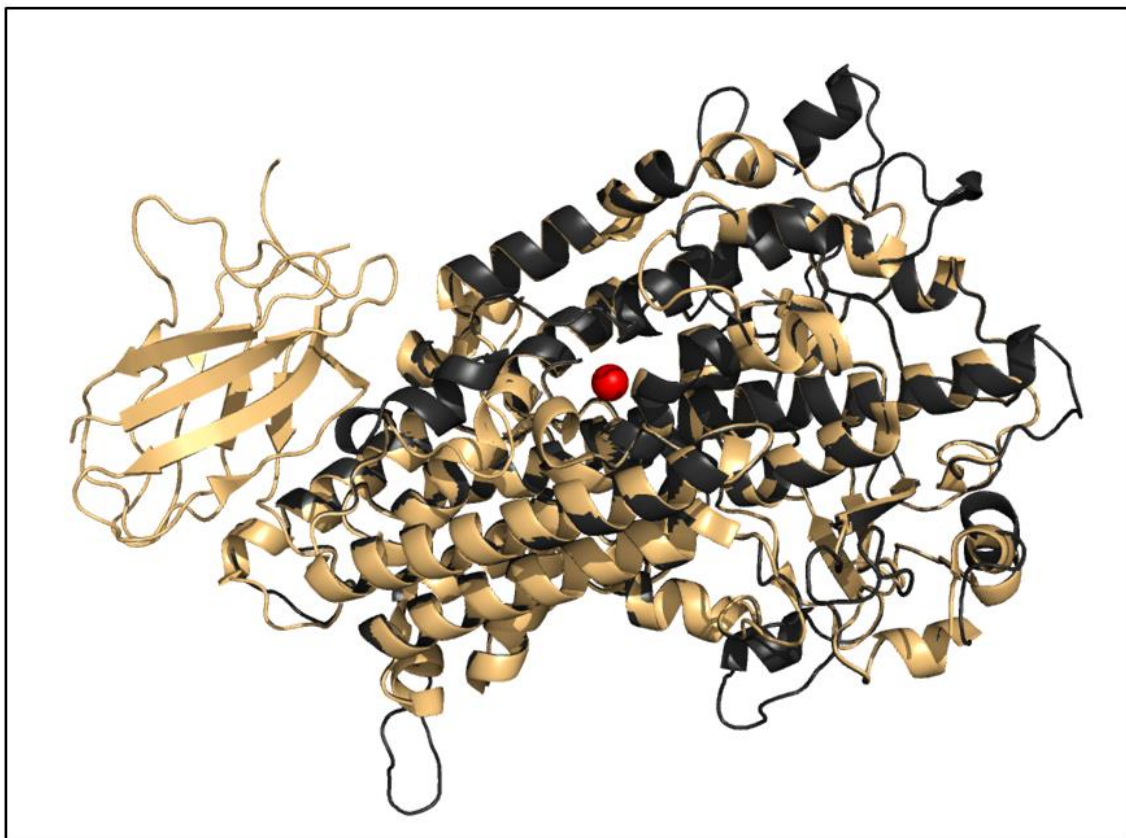


Figura 47: Sobreposição de estruturas moleculares de lipoxigenase SWAraCLOX tendo como modelo estrutural lipoxigenase eucariótica (*Plexaura homomalla*, código PDB 2FNQ). A estrutura molecular de SWAraCLOX está representada em negro. Em marrom, a enzima lipoxigenase de *P. homomalla*. A esfera em vermelho representa o átomo de ferro do centro catalítico das enzimas. Ilustração por PyMOLv1.3.

6. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foram expressados os genes de duas lipoxigenases de *Shewanella woodyi*, ACA87683.1 - SWPrecLOX – *Arachidonate 15-lipoxygenase Precursor* e ACA87192.1 - SWAraCLOX – *Arachidonate 15-lipoxygenase*. Confirmou-se que ambas as enzimas apresentam comportamento de uma lipoxigenase. Foi otimizado o sistema de expressão obtendo-se as enzimas na concentração final de aproximadamente 1,2mg/mL e 0,8mg/mL para SWPrecLOX e SWAraCLOX, respectivamente.

- SWPrecLOX possui como temperatura ótima de reação 31°C e pH 8,0. Seu substrato preferível é o ácido linoleico, tendo como V_m 2,78mM min⁻¹ mg⁻¹ e K_m 0,47mM. Sua atividade é inibida principalmente pelos íons níquel, mercúrio, cobalto, manganês e magnésio.

SWAraCLOX apresenta maior atividade sob temperatura de 27°C e pH 7,0. Ácido araquidônico é seu substrato preferível, apresentando V_m 7,62mM min⁻¹ mg⁻¹ e K_m 2,04mM. Os íons que inibiram sua atividade foram níquel, mercúrio, cádmio, magnésio, cobalto, zinco e manganês.

- Segundo análises filogenéticas, as enzimas lipoxigenases de procariotos se agrupam em três sub-grupos: um grupo muito bem definido de cianobactérias, outro contendo proteobactérias que apresentam similaridades filogenéticas e um terceiro sub-grupo, formado também de proteobactérias, onde estas apresentam distâncias filogenéticas altas. A enzima SWAraCLOX se encontra filogeneticamente mais próxima de outras lipoxigenases procarióticas, enquanto que SWPrecLOX se vê mais distante filogeneticamente, porém ambas apresentam maior similaridade estrutural com lipoxigenase de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. Assim, pode-se sugerir que esta LOX seja uma estrutura de transição entre lipoxigenase de procarioto e eucarioto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBONDANZI, F.; BRUZZI, L.; CAMPISI, T.; FREZZATI, A.; GUERRA, R.; IACONDINI, A. Biotreatability of polycyclic aromatic hydrocarbons in brackish sediments: Preliminary studies of an integrated monitoring. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57, p. 214–221, 2006.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.
- ANDRE, E.; HOU, K. W. The presence of a lipid oxidase in soybean glycine soya. **Academy of Sciences**, v.194, p. 645–7, 1932.
- ANDREOU, A.Z.; VANKO, M.; BEZAKOVA, L.; FEUSSNER, I. Properties of a mini 9Rlipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1832–1837, 2008.
- ANDREOU, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1504–1510, 2009.
- ANDREOU, A.; GÖBEL, A.; HAMMOND, R.C.; FEUSSNER, I. A bisallyc mini-lipoxygenase from Cyanobacterium *Cyanothece* sp. that has an iron as cofactor. **JBC** doi: 10.1074/jbc.M109.094771, 2010.
- BEN-AZIZ, A.; GROSSMAN, S.; ASCARELLI, I.; BUDOWSKI, P. Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme proteins. **Analytical Biochemistry**, V. 34, P. 88-100, 1970.
- BISAKOWSKI, B.; KERMASHA, S. Characterization of Purified Lipoxygenase Extracts from *Fusarium proliferatum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2382-2388, 1998.
- BOYINGTON, J. C.; GAFFNEY, B. J.; AMZEL, L. M. The there-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. **Science**, v. 260, p. 1482-1486, 1993.
- BRASH, R. A. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23679-23682, 1999.
- BRINCKMANN, R.; SCHNURR, K.; HEYDECK, D.; ROSENBAACH, T.; KOLDE, G.; KUHN, H. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. **Blood**, v. 91, p. 64–74, 1998.
- BUSQUETS, M.; VIDAL-MAS, J.; RODRÍGUEZ, E.; GUERRERO, A.; MANRESA, A. "Isolation and characterization of a lipoxygenase from *Pseudomonas* 42A2 responsible for the biotransformation of oleic acid into (S)-(E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid." **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 2, p. 129-39, 2004.

CHEN, X.S.; JENKINS, N. A.; COPELANDS, N. G.; FUNKSN, C. D. cDNA Cloning, Expression, Mutagenesis of C-terminal Isoleucine, Genomic Structure, and Chromosomal Localizations of Murine 12-Lipoxygenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13979-13987, 1994.

CHEN, X.; P. REDDANNA. Expression, Purification, and Characterization of a Recombinant 5-Lipoxygenase from Potato Tuber. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, p. 438-443, 1998.

CHENG, Q.; ZHANG, B.; ZHUGE, Q.; ZENG, Y.; WANG, M.; HUANG, M. Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoids*. **Plant Science**, v. 170, p. 1027–1035, 2006.

CHU, J.; LI, J.; CEBALLOS-DIAZ, C.; GOLDE, T.; PRATICÒ, D. The Influence of 5-Lipoxygenase on Alzheimer's Disease-Related Tau Pathology: In Vivo and In Vitro Evidence. **Society of Biological Psychiatry** <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.012>, 2013.

CLEMENTE, A.; OLÍAS, R. Purification and Characterization of Broad Bean Lipoxygenase Isoenzymes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1070- 1075, 2000.

COREY, E. J.; NAGATA, R. Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 26, p. 8107-8108, 1987.

COFFA G.; BRASH, A. R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in olipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. **PNAS**, v. 101, p. 15579–15584, 2004.

COFFA, G.; HILL, E. M. Discovery of an 11(R)- and 12(S)-Lipoxygenase Activity in Ovaries of the Mussel *Mytilus edulis*. **Lipids**, v. 35, p. 1195–1204, 2000.

COHEN Y.; GUREVITZ; M. In: Dworkin M, Falkow S (eds) *The Cyanobacteria—ecology, physiology molecular genetics in the prokaryotes*, **Springer**, Berlin, v. 4, p. 1074–1098, 2006.

CREEG, J. M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FERNANDEZ, J. M.; HOEFFLER, J. P. (Ed.). *Gene expression systems: using nature for the art of expression*. **New York: Academic Press**, p. 157-209, 1999.

DEMAIN, A. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 26-31, 2000.

DOBRIAN, A. D.; LIEB, D. C.; COLE, B. K.; TAYLOR-FISHWICK, D. A.; CHAKRABARTI, S. K.; NADLER, J. L. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. **Progress in Lipid Research**, v. 50, p. 115–131, 2011.

DRAZEN, J. M.; O'BYRNE, P. M. Treatment of Asthma with Drugs Modifying the Leukotriene Pathway. **England Journal of Medicine**, v. 340, n.3, p. 197-206, 1999.

EINSFELDT, K.; SEVERO JÚNIOR, J. B.; ARGONDIZZO, A. P. C.; MEDEIROS, M. A.; ALVES, T. L. M.; ALMEIDA, R. V.; LARENTIS, A. L. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. **Vaccine**, v. 29, p. 7136–7143, 2011.

FABER, K.; KROUTIL, W. New enzymes for biotransformations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 181-187, 2005.

FENG, B.; DONG, Z.; XU, Z.; AN, X.; QIN, H.; WU, N.; WANG, D.; WANG, T. Molecular analysis of lipoxygenase (LOX) genes in common wheat and phylogenetic investigation of LOX proteins from model and crop plants. **Journal of Cereal Science**, v. 52, p. 387-394, 2010.

FEUSSNER, I.; KUHN, H.; WASTERNAK, C. Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate β -oxidation? **FEBS Letters**, v. 406, p. 1–5, 1997.

FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **TRENDS in Plant Science**, v. 6, n. 6, p. 268-273, 2001.

FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The Lipoxygenase Pathway. **Annual Review Plant Biology**, v. 53, p. 275–97, 2002.

FREDRICKSON, J. K.; ROMINE, M. F.; BELIAEV, A. S.; AUCHTUNG, J. M.; DRISCOLL, M. E.; GARDNER, T. S.; NEALSON, K. H.; OSTERMAN, A. L.; PINCHUK, G.; REED, J. L.; RODIONOV, D. A.; RODRIGUES, J. L. M.; SAFFARINI, D. A.; SERRES, M. H.; SPORMANN, A. M.; ZHULIN, I. B.; TIEDJE, J. M.. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. **Nature reviews, Microbiology**, v. 6, 2008.

FUKUCHI-MIZUTANI, M., ISHIGURO, K. Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence. **Plant Science**, v. 160, p. 129-137, 2001.

GAFFNEY, B. J. Lipoxygenases: structural principles and spectroscopy. **Biophysics and Biomolecular Structures**, v. 25, p. 431-59, 1996.

GAN, Q. F.; WITKOP, G. L.; SLOANE, D. L.; STRAUB, K. M.; SIGAL, E. Identification of a specific methionine in mammalian 15-lipoxygenase which is oxygenated by the enzyme product 13-HPODE: dissociation of sulfoxide formation from self-inactivation. **Biochemistry**, v. 34, p. 7069–79, 1995.

GAO, B.; BOEGLIN, E.; BRASH, A.R. Omega fatty acids are oxygenated at the -7 carbon by the lipoxygenase domain of a fusion protein in the cyanobacterium *Acaryochloris marina*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1801, p. 58-63, 2010.

GARCIA-FRUITOS, E.; GONZALES-MONTALBAN, N.; MORELL, M.; VERA, A.; FERRAZ, R. M.; ARIS, A. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 27, 2005.

GARRETA, A. Cristal·lització de la lipoxigenase de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 i estudi filogenètic de les subfamílies de les lipoxigenases. PhD thesis. University of Barcelona, Spain, 2010.

GATA, J., PINTO, M. Lipoxygenase Activity in Pig Muscle: Purification and Partial Characterization." **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 2573-2577, 1996.

GILBERT, N. C.; BARTLETT, S. C.; WAIGHT, M. T.; NEAU, D. B.; BOEGLIN, W. E.; BRASH, A. R.; NEWCOMER, M. E. The Structure of Human 5-Lipoxygenase. **Science**, v. 331, p. 217-219, 2011.

GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D. I.; METOZ, F. ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, p. 305, 1999.

GUERRERO, A.; CASALS, I. Oxidation of oleic acid to (E)-10-hydroperoxy-8-octadecenoic acid and (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acids by *Pseudomonas sp.* 42A2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1347, p. 75-81, 1997.

GUO, Y.; SONG, H.; WANG, Z.; DING, Y. Expression of POX2 gene and disruption of POX3 genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the gamma-decalactone production. **Microbiological Research**, v. 167, n. 4, p. 246-252, 2012.

HAGMANN, W., GAO, X. 12-Lipoxygenase in Lewis lung carcinoma cells: molecular identity, intracellular distribution of activity and protein, and Ca(2+)- dependent translocation from cytosol to membranes. **Prostaglandins**, v. 49, n.1, p. 49-62, 1995.

HALL, C.; HUSSON, F. Characterization of an enriched lipoxygenase extract from *Aspergillus niger* in terms of specificity and nature of flavour precursors production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 201–209, 2004.

HAMMOND, R. Enzymic modification at the mid-chain fatty acids. **Fat Science Technology**, v. 90, n. 1, p. 18-27, 1988.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 54–60, 1998.

HAU, H. H.; GRALNICK, J. A. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. **Annual Review Microbiology**, v. 61, p. 237–258, 2007.

HOFFMANN, F.; RINAS, U. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 89, p. 73–92, 2004.

HÖFLE, M. G.; BRETTAR, I. Genotyping of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea by use of low-molecular-weight RNA profiles. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1383–1390, 1996.

HOLLAND, H. L.; WEBER, H. Enzymatic hydroxylation reactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 547–553, 2000.

HUANG, F. C.; SCHWAB, W. Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. **BMC Biotechnology**, v.11, p. 30, 2011.

INY, D.; PINSKY, A. Lipoxygenase of thermophilic bacteria *Thermoactinomyces vulgaris* properties and study on the active site. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, p. 1325-1330, 1993.

ISHIGE, T.; HONDA K.; SHIMIZU, Z. "Whole organism biocatalysis." **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 174-180, 2005.

IVANOVA, E. P.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1773–1788, 2004.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; HERNÁNDEZ-BRENES, C.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BENAVIDES, J. Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) lipoxygenase. **Food Research International**, v. 43, p. 1079–1085, 2010.

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; PODOBNIK, B.; GRDADOLNIK, J.; MENART, V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Program**, v. 21, p. 632-639, 2005.

JOHN C. MAKEMSON, J. C.; FULAYFIL, N. R.; LANDRY, W.; VAN ERT, L. M.; WIMPEE, C. F.; WIDDER, E. A; CASE, J. F. *Shewanella woodyi* sp. nov., an Exclusively Respiratory Luminous Bacterium Isolated from the Alboran Sea. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1034-1039, 1997.

JOO, E. C.; OH, D. K. Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1524-1532, 2012.

KANAMOTO, H.; TAKEMURA, M.; OHYAMA, K. Cloning and expression of three lipoxygenase genes from liverwort, *Marchantia polymorpha* L., in *Escherichia coli*. **Phytochemistry**, v. 77, p. 70–78, 2012.

KANTARCI, A., VAN DYKE, T.E. Lipoxins in chronic inflammation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 14, p. 4–12, 2003.

KANTARCI, A., VAN DYKE, T.E. Resolution of inflammation in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 2168–2174, 2005.

KILARU, A.; HERRFURTH, C.; KEEREETAWEEP, J.; HORNUNG, E.; VENABLES, B. J.; FEUSSNER, I.; CHAPMAN, K. D. Lipoxygenase-mediated Oxidation of Polyunsaturated N-Acylethanolamines in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 17, p. 15205–15214, 2011.

KOEDUKA, T.; KAJAWARA, T.; MATSUI, K. Cloning of lipoxygenase genes from a Cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 315-19, 2007.

KÜHN, H.; RAPAPORT, S. M. The stereochemistry of the reactions of lipoxygenase and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxigenases and related enzymes. **Advance Enzymology**, v. 88, p. 273-311, 1986.

KUHN, H. Structural basis for the positional specificity of Lipoxygenases. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 62, p. 255–270, 2000.

KUHN, H.; O'DONNELL, V. B. Inflammation and immune regulation by 12/15- lipoxygenases. **Progress in Lipid Research Journal**, v. 45, p. 334–56, 2006.

Kulkarni, A. P. Lipoxygenases. In: Handbook of Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics, Ioannides C. (ed.), Wiley, Chichester.

KULKARNI, P. Lipoxygenase – a versatile biocatalyst for biotransformation of endobiotics and xenobiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58 p. 1805–1825, 2001.

KUO, T.; KANESHIRO T.; HOU, C.T. Microbiological conversions of fatty acids to value-added products. **New York Marcel Deker Incorporation**, p. 605-628, 2002.

KURIBAYASHI, T.; KAISE, H.; UNO, C.; HARA, T.; HAYAKAWA, T.; JOH, T. Purification and Characterization of Lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1247-1253, 2002.

LAEMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4 bacteriophage. **Nature**, London, v. 227, p. 680-681, 1970.

LANG, I.; FEUSSNER, I. Oxylipin formation in *Nostoc punctiforme* (PCC73102). **Phytochemistry**, v. 68, p. 1120–1127, 2007.

LANG, I.; GÖBEL, A.; HEILMANN, I.; FEUSSNER, I. A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity in *Nostoc* sp PCC 7120. **Biochemical Journal**, v. 410, p. 347-357, 2008.

LIU, S. Q.; LIU, X. H.; JIANG, L. W. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the lipoxygenase gene family in cucumber. **Genetic Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2613-2636, 2011.

LOFTUS, J. P.; MORGAN, S. K.; WAKSHLAG, J. J. Cloning and antibody recognition analysis of the canine 5-lipoxygenase gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p. 276–279, 2011.

LORENZI, V.; MAURY, J.; CASANOVA, J.; BERTI, L. Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 450–454, 2006.

LU, X.; ZHANG, J.; LIU, S.; ZHANG, D.; XU, Z.; WU, J.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Overproduction, purification and characterization of extracellular lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, doi:10.1007/s00253-012-4457-6, 2012.

LUGOVSKAYA, N. N.; SCHERBAKOV, A. V.; YAKOVLEVA, A. S.; TSYVANYUK, M. A.; MUDRAK, N. S.; DRYGIN, V. V.; BORISOV, A. V. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods*, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 292–296, 2006.

MAKEMSON, J. C.; FULAYFIL, N. R.; LANDRY, W.; VAN ERT, L. M.; WIMPEE, C. F.; WIDDER, E. A.; CASE, J. F. *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1034–1039, 1997.

MARBACH, A.; BETTENBROCK, K. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. **Journal of Biotechnology**, v. 157, p. 82–88, 2012.

MASKREY, B. H.; BERMUDEZ-FAJARDO, A.; MORGAN A. H.; STEWART-JONES, E.; DIOSZEGHY, V.; TAYLOR, G. W. Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 20151–63, 2007.

MCDONNELL, M., DAVIS, W. Characterization of the murine epidermal 12/15-lipoxygenase. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 63, p. 93–107, 2001.

MORGAN, L. T.; THOMAS, C. P.; KUHN, H.; O'DONNELL, V. B. Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. **Biochemistry Journal**, v. 431, n. 1, p. 141–148, 2010.

MOURA, M. V. H.; DOBLER, L.; GUTARRA, M. L. E.; ALMEIDA, R. V. Studying the expression of a lipase from *Pyrococcus furiosus* using response surfaces. **Protein Expression and Purification**, v. 88, p. 26–32, 2013.

MURAKAMI, N.; SHIRAHASHI, H.; NAGATSU, A.; SAKAKIBARA, J. Two unsaturated 9R-hydroxy fatty acids from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* f. *flos-aquae*. **Lipids**, v. 27, p. 776–778, 1992.

MYERS, C. R.; NEALSON, K. H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. **Science**, v. 240, p. 1319–1321, 1988.

NEMCHENKO, A., KUNZE, S., FEUSSNER, I., KOLOMIETS, M. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3767–3779, 2006.

OHTA, H., SHIRANO, Y. cDNA cloning of rice lipoxygenase L-2 and characterization using an active enzyme expressed from the cDNA in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 2, p. 331-336, 1992.

OLAOFEA, O. A.; BURTONA, S. G.; COWANB, D. A.; HARRISON, S. T. L. Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 19–24, 2010.

OLIW, E. H. Plant and fungal lipoxygenases. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v. 68, p. 313-323, 2002.

OSIPOVA, E. V.; CHECHETKIN, I. R.; GOGOLEV, Y. V.; TARASOVA, N. B. Recombinant Maize 9-Lipoxygenase: Expression, Purification, and Properties. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 7, p. 861-865, 2010.

PADILLA, M. N.; HERNÁNDEZ, M. L.; SANZ, C.; MARTÍNEZ-RIVAS, J. M. Functional Characterization of Two 13-Lipoxygenase Genes from Olive Fruit in Relation to the Biosynthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 57, p. 9097–9107, 2009.

PADILLA, M. N.; HERNÁNDEZ, M. L.; SANZ, C.; MARTÍNEZ-RIVAS, J. M. Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. **Phytochemistry**, v. 74, p. 58–68, 2012.

PARK, Y. S.; KUNZE, S.; NI, X.; FEUSSNER, I.; KOLOMIETS, M. V. Comparative molecular and biochemical characterization of segmentally duplicated 9-lipoxygenase genes ZmLOX4 and ZmLOX5 of maize. **Planta**, v. 231, p. 1425–1437, 2010.

PETERNEL, S.; GRDADOLNIK, J.; GABERC-POREKAR, V.; KOMEL, R. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 34-42, 2008.

PETROVSKIS, E. A.; VOGEL, T. M.; ADRIAENS, P. Effects of electron acceptors and donors on transformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* MR-1. **FEMS - Microbiology Letters**, v. 121, p. 357–364, 1994.

PIAZZA, G. Immobilization of soybean lipoxygenase and promotion of fatty acid and ester oxidation. Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes. **Champaign, Illinois**, p. 198-208, 1996.

PIOMELLI, D.; DALE, N.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; BELARDETTI, F. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 38-43, 1987.

PLAGEMANN, I.; ZELENKA, K.; ARENDT, P.; RINGEL, P. D.; KRINGS, U.; BERGER, R. G. LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 99–104, 2013.

PRIGGE, S. T.; GAFFNEY, B. J.; AMZEL, L. M. Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases. **Proteins**, v. 24, n. 3, p. 275-91, 1996.

PRIGGE, S.; BOYINGTON, J.; FAIG, M.; DOCTOR, K. S.; GAFFNEY, B. J.; AMZEL, L. M. Structure and mechanism of lipoxygenases. **Biochimie**, v. 79, n. 11, p. 629-636. (1997).

QUAGLIA, M.; FABRIZI, M.; ZAZZERINI, A.; ZADRA, C. Role of pathogen-induced volatiles in the *Nicotiana tabacum* and *Golovinomyces cichoracearum* interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 9 – 20, 2012.

RADMARK, O.; WERZ, O.; STEINHILBER, D.; SAMUELSSON, B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 7, 2007.

RUSSELL, N. J.; NICHOLS, D. S. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. **Microbiology**, v. 145, p. 767–779, 1999.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory**, 2001.

SANTINO, A.,DEPAOLIS, A., GALLO, A., QUARTA, A., CASEY, R., MITA, G. Biochemical and molecular characterisation of hazelnut (*Corylus avellana*) seed lipoxygenases. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4365–4375, 2003.

SCHLEGEL, S.; LÖFBLUM, J.; LEE, C.; HJELM, A.; KLEPSCH, M.; STROUS, M.; DREW, D.; SLOTBOOM, D. J.; GIER, J. Optimizing Membrane Protein Overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 423, p. 648-659, 2012.

SENTHILRAJA, G.; ANAND, T.; KENNEDY, J.S.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and entomopathogenic fungus bioformulation enhance the expression of defense enzymes and pathogenesis-related proteins in groundnut

plants against leafminer insect and collar rot pathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 82, p. 10-19, 2013.

SHARATHCHANDRA, K.; RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater Cyanobacteria. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, p. 83–97, 2011.

SICILIA, F., MATTEI, B. Characterization of a membrane-associated apoplastic lipoxygenase in *Phaseolus vulgaris* L. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1748, p. 9-19, 2005.

SU, C.; OLIW, E. H. Studies on linoleic acid 8R-dioxygenase and hydroperoxide isomerase of the fungus *Gaeumannomyces graminis*. **Lipids**, v. 30, n. 1, p. 43-50, 1995.

TANG, D. G.; CHEN, Y. Q.; HONN, K. V. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, v. 93, n. 11, p. 5241–5246, 1996.

TURNER, N.; SCHNEIDER, M. Biocatalysis and biotransformation. Biocatalysis-molecular, structural and synthetic advances. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 65-67, 2000.

VANCE, R. E.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N.; MEKALANOS, J. J. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. **PNAS**, v. 101, n. 7, p. 2135-2139, 2004.

VENTURA, S.; VILLAVERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends Biotechnology**, v. 24, p. 179-185, 2006.

VIDAL-MAS, J.; MANRESA, A. Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 245–251, 2005.

WADMAN, M. W.; VRIES, R. P.; KALKHOVE, S. C.; VELDINK, G. A.; Vliegenthart, J. F. G. Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 59-68, 2009.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology**. London: Wiley, p. 94, 1998.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 72, p. 165–221, 2002.

WENG, Y.; HSU, F.; YANG, W.; CHEN, H. Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 465–469, 2006.

WILLIAMS, M.; HARWOOD, J. L. Characterisation of lipoxygenase isoforms from olive callus cultures. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2532–2538, 2008.

XU, S.; MCKEEVER, B. M.; WISNIEWSKI, D.; MILLER, K.; SPENCER, R. H.; CHU, L.; UJJAINWALLA, F.; YAMIN, T.; EVANS, J. F.; BECKERA, J. W.; FERGUSON, A. D. Expression, purification and crystallization of human 5-lipoxygenase-activating protein with leukotriene-biosynthesis inhibitors. **Acta Crystallographica**, v. 63, p. 1054–1057, 2007.

XU, X.; YUAN, G.; DENG, J.; GUO, H.; XIANG, M.; YANG, F.; GE, W.; CHEN, S. Inhibition of 12-lipoxygenase reduces proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v. 11, p. 193-202, 2012.

YANG, X. Y.; JIANG, W. J.; YU, H. J. The Expression Profiling of the Lipoxygenase (LOX) Family Genes During Fruit Development, Abiotic Stress and Hormonal Treatments in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). **International Journal Molecular Science**, v. 13, p. 2481-2500, 2012.

YEUNG, J.; HOLINSTAT, M. 12-Lipoxygenase: A Potential Target for Novel Anti-Platelet Therapeutics. **Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 154–164, 2011.

YU, K.; BAYONA, W.; KALLEN, C. B.; HARDING, H. P.; RAVERA, C. P.; MCMAHON, G.; BROWN, M.; LAZAR, M. A. Differential Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptors by Eicosanoids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 23975–23983, 1995.

ZHANG, Y., CHEN, K.S., ZHANG, S.L., FERGUSON, I. The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 67–74, 2003.

ZHANG, B., CHEN, K.S., BOWEN, J., ALLAN, A., ESPLEY, R., KARUNNAIRTNAM, S., FERGUSON, I. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3825–3836, 2006.

ZHENG, Y.; BOELING, W.E.; SCHNEIDER, C.; BRASH, A.R. A 49-KDa mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp PCC 7120 retains catalytically complete functionality. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 283, p. 5138-5147, 2008.

ZHAN, J.; Y. CHEN. Expression of ricin a chain and ricin A chain-KDEL in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 197–201, 2004.

APÊNDICES

Apêndice A

- Sequenciamento do gene SWPrecLOX-pET28a(+)

gb|CP000961.1| Shewanella woodyi ATCC 51908, complete genome
Length=5935403 Features in this part of subject sequence:
Lipoxigenase Score = 1341 bits (726), Expect = 0.0
Identities = 750/772 (97%), Gaps = 1/772 (0%) Strand=Plus/Minus

Query 167 TGGATTCGCCTGAGTATCTTAAGCTCCAAGAGCAGTTAGCCCTGTATGAAGACTTACGTA 226
Sbjct 4178269 TGGATTCGCCTGAGTATCTTAAGCTCCAAGAGCAGTTAGCCCTGTATGAAGACTTACGTA 4178210
Query 227 AAAATGGCGTTCCANAAAGTANTGCGCTCACAANAANTGCTTTCTCCGATGGGAGTATGG 286
Sbjct 4178209 AAAATGGCGTTCCAGAAAGTAGTGCCTCACAAGAAGTGCTTTCTCCGATGGGAGTATGG 4178150
Query 287 AGCGAGCAGCGGCCAATGATTACCAAAGGCTTTGCCCGTAGATCCTGATAATCCTAACT 346
Sbjct 4178149 AGCGAGCAGCGGCCAATGATTACCAAAGGCTTTGCCCGTAGATCCTGATAATCCTAACT 4178090
Query 347 ATCAACCTGGCGCCGTTACTGGTGTGGCATGCATGAACTTCCTGAGTTTCCCTTTCTCTG 406
Sbjct 4178089 ATCAACCTGGCGCCGTTACTGGTGTGGCATGCATGAACTTCCTGAGTTTCCCTTTCTCTG 4178030
Query 407 TTCTGCCGAGGATTCAGATACTACCAGTGGATTTTGGCGTAAGCAGTTGGTACAACCTTG 466
Sbjct 4178029 TTCTGCCGAGGATTCAGATACTACCAGTGGATTTTGGCGTAAGCAGTTGGTACAACCTTG 4177970
Query 467 CATCTGAAAATAAAGTGGCATGATTTTGACCGCTTAGACGGCAGCCAGTGCATGGCAACA 526
Sbjct 4177969 CATCTGAAAATAAAGTGGCATGATTTTGACCGCTTAGACGGCAGCCAGTGCATGGCAACA 4177910
Query 527 TCAACTCTGATGAGGTGAGTAACAACACGCTTTGGACAATTCGAGGAACGGCAGCATCCC 586
Sbjct 4177909 TCAACTCTGATGAGGTGAGTAACAACACGCTTTGGACAATTCGAGGAACGGCAGCATCCC 4177850
Query 587 GTGCCGATAGGGCGCAAGAGGGAAGTTTTGGTGTGCGATGATGCTTGCTTACAGCGTGAAG 646
Sbjct 4177849 GTGCCGATAGGGCGCAAGAGGGAAGTTTTGGTGTGCGATGATGCTTGCTTACAGCGTGAAG 4177790
Query 647 ATGATTGGCAGTTATTCNATGCCAGTTTTTCGATATGTAAGCGCCAACCTTANCCCGCTTAN 706
Sbjct 4177789 ATGATTGGCAGTTATTCNATGCCAGTTTTTCGATATGTAAGCGCCAACCTTANCCCGCTTAN 4177730
Query 707 TGTTAATTGGTGGGCTGCATTGNTGTGCGNGTTAATATTCCTGCTCTCTAANTTNATTG 766
Sbjct 4177729 TGTTAATTGGTGGGCTGCATTGNTGTGCGGGTTAATATTCCTGCTCTCTAAGTTAATTG 4177670
Query 767 AGCTTATCTTAACAGGAGGTGATGCCNAGTTTGANATCATCGAACCTATCACCTCGGCTG 826
Sbjct 4177669 AGCTTATCTTAACAGGAGGTGATGCCAAGTTTGGAGATCATCGAACCTATCACCTCGGCTG 4177610
Query 827 TGCCCCCTGTGCGTGTCCATGATGCACAANATCTGCTTTTT-ATCCNTATGATACTGACT 885
Sbjct 4177609 TGCCCCCTGTGCGTGTCCATGATGCACAAGATCTGCTTTTTTATCCATATGATACTGACT 4177550
Query 886 CAAATGGNCNACGNTCNATGACCCACAGTATCCTAAACCCNCNTGGCATGa 937
Sbjct 4177549 CAAATGGCCAACGCATCGATGACCCACAGTATCCTAAACCCACATGGCATGA 4177498

Apêndice B: Organismos utilizados para análise filogenética, e seus respectivos códigos de acesso na base de dados GenBank.

	Código GenBank
Fungos	
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	XP_001225066.1
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	XP_382392.1
<i>Neurospora crassa</i>	CAD37061.1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_746844.1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BAL46153.1
<i>Pleurotus sapidus</i>	CCV01581.1
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> R3-111a-1	EJT75659.1
Plantas	
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	NP_001067011.1
<i>Populus deltoides</i>	AAZ57445.1
<i>Cucumis sativus</i>	AAA79186.1
<i>Medicago truncatula</i>	ABE89490.2
<i>Zea mays</i>	AAL73499.1
<i>Solanum tuberosum</i>	CAA65268.1
<i>Citrus jambhiri</i>	BAB84352.1
<i>Brassica napus</i>	AAO03559.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB56692.1
<i>Pisum sativum</i>	CAA55318.1
Animais	
<i>Bos taurus</i>	GI:5070263
<i>Homo sapiens</i>	GI:85067500
<i>Rattus norvegicus</i>	GI:23463277
<i>Canis familiaris</i>	GI:57086637
<i>Mus musculus</i>	GI:40363263
<i>Pan troglodytes</i>	GI:114669183
<i>Gallus gallus</i>	GI:118116654
<i>Danio rerio</i>	GI:113673261
<i>Plexaura homomolla</i>	GI:1477763
Procariotos	

<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	ACA87683.1
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	ACA87192.1
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	ACA86597.1
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	ABE54964.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42 A2 NCIMB40045	AAL85880.2
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	YP_629994.1
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	NP_841292.1
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	ZP_01218321.1
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	ABC36974.1
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259	YP_005368711.1
<i>Nitrosococcus watsonii</i> C-113	YP_003760561.1
<i>Nitrosospira multiformis</i> ATCC 25196	ABB73840.1
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	ZP_01906444.1
<i>Variovorax</i> sp. CF313	ZP_10568041.1
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	YP_001804062.1
<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	YP_001515175.1
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	ZP_00106490.1
<i>Calothrix</i> sp. PCC630	YP_007138537.1
<i>Rivularia</i> sp. PCC7116	AFY58433.1
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC6304	YP_007086119.1
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	AFZ57795.1
<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	AFZ28027.1
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	ZP_18908774.1
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	ZP_05039643.1
<i>Citromicrobium bathyomarinum</i> JL354	ZP_06863039.1