



Tábata Peres Cardoso

Análise Estrutural de Halogenases Encontradas em Clusters
Gênicos da Biossíntese de Antibióticos Glicopeptídicos

São José do Rio Preto
2015

Tábata Peres Cardoso

Análise Estrutural de Halogenases Encontradas em Clusters
Gênicos da Biossíntese de Antibióticos Glicopeptídicos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcio Vinicius Bertacine Dias

São José do Rio Preto
2015

Cardoso, Tábata Peres
Análise estrutural de halogenases encontradas em clusters
gênicos da biossíntese de antibióticos glicopeptídicos/ Tábata
Peres Cardoso -- São José do Rio Preto, 2015.
105 f. : il. ; tabs

Orientador: Marcio Vinícius Bertacine Dias
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia médica. 2. Agentes Anti-infecciosos. 3.
Streptomyces. 4.Composto organo-halogenados. 5. Produtos
Naturais. 6. Expressão Gênica. I. Dias, Marcio Vinicius
Bertacine. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV.
Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Tábata Peres Cardoso

Análise Estrutural de Halogenases Encontradas em Clusters
Gênicos da Biossíntese de Antibióticos Glicopeptídicos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Gabriel Padilla
USP – São Paulo

Dr. Daniel Maragno Trindade
LNBio– Campinas

São José do Rio Preto
10 de agosto de 2015

“Que a importância de uma coisa não se mede com fita métrica nem com balanças nem barômetros etc. Que a importância de uma coisa há que ser medida pelo encantamento que a coisa produza em nós”

Manoel de Barros

Dedico este trabalho aos meus pais,
Angela e Valter, os quais dedicaram a suas
vidas em favor da minha.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, porque Ele é bom e justo e graças a demonstração magna de amor, hoje desfruto da vida com esperança e confiança. Agradeço pelas oportunidades concedidas, carinho e proteção contínua. Sem Ele, nada disso teria sentido.

Agradeço ao meu orientador, prof Drº Marcio Dias, o qual abriu as portas da pesquisa para mim e com grande maestria se tornou o melhor exemplo. Por todo seu esforço, por toda sua dedicação, por toda confiança depositada, por toda paciência exercitada e principalmente por todos os ensinamentos transmitidos, a minha eterna gratidão!

Aos meus amigos de grupo, que prontamente me acolheram no laboratório e compartilharam comigo o que aprenderam. Priscila Burry, Larissa de Sá, João Ribeiro e Carol Wilson, obrigada pela convivência no “puxadinho” e fora dele também. Vocês são especiais!

A Larissa de Sá pelas clonagens realizadas. A Larissa Menezes que foi um instrumento utilizado por Deus.

Aos amigos, os quais me proporcionaram o privilégio de compartilhar momentos que certamente enriqueceram minha vida. Arina Perez, Fernanda Costa, Angela Saito, Aline Cardoso, Maria Eugênia, Mayara Miyachiro, Paulo Madeira, Samira Zouhir, David Neves, Daniel Trindade e Fernanda Buchli, obrigada por todas as conversas, conselhos, risadas e por se tornarem minha família em Campinas. Vocês são especiais! A Jackeline Zanella e a Drª Juliana Fattorri por me ensinarem utilizar os equipamentos de análises além da excelente amizade e carinho desenvolvido.

Ao Dr. Arthur Cordeiro e grupo, por me acolherem.

Ao Drº Andrew Truman pelo acolhimento no JIC e orientação durante projeto desenvolvido. A Drª Natália Miguel-Vior por todos os ensinamentos e também por toda paciência bem como os momentos. Aos amigos do departamento de biologia molecular do JIC. Aos amigos do LNBio, por todos os dias de convívio.

Aos amigos do GEA, Eslo, Moises, Nelson, Michelle, Sissi, Flores, Janete, Marcos e Laura, por cada sábado de deleite.

Aos amigos da minha cidade natal, Priscila Carvalho, Emily Sartori, Renata Apollinário e Daniel Pires, por sempre serem meus amigos.

Aos meus pais e familiares, que me amam incondicionalmente.

Ao CNPEM, pela infra-estrutura oferecida durante o desenvolvimento do projeto.
A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Sumário

1	Introdução	18
1.1	Produtos naturais halogenados	19
1.2	Halogenases	23
1.2.1	Atividade relacionada à halogenação	24
1.2.2	Classes de Halogenases	25
1.3	Antibióticos Glicopeptídicos	34
1.3.1	Classificações dos Antibióticos Glicopeptídicos	35
1.3.2	Biossíntese dos glicopeptídeos	38
1.4	Biossíntese combinatorial aplicada a glicopeptídeos	41
2	Objetivos	44
3	Materiais e Métodos	45
3.1	Obtenções de cepas, purificação de DNA genômico e clonagem de halogenases dos clusters gênicos de antibióticos glicopeptídicos (StaI, StaK, Orf8 e ComH)	45
3.2	Expressão e Purificação das halogenases StaI, StaK, Orf8 e ComH	47
3.3	Teste de Expressão das halogenases StaK e Orf8	49
3.4	<i>Western Blotting</i> com anticorpo anti-His	49
3.5	Ensaio de Cristalização	49
3.6	Análises Biofísicas das halogenases ComH e StaI	50
3.6.1	Dicroísmo Circular– CD	50
3.6.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	51
3.7	Proteólise Limitada com Tripsina	51
3.8	Modelagem Molecular por Homologia	51
3.9	Ensaio de complementação realizados no laboratório do Dr. Andrew Truman no centro de pesquisa John Innes Centre- Norwich, UK.	52
3.9.1	Cepas produtoras dos antibióticos	52
3.9.2	Complementação com genes <i>staI</i> e <i>staK</i> de <i>S. toyocaensis</i>	53
3.9.3	Aquisição de dados LC-ESI-MS	53
4	Resultados e Discussão	53
4.1	Expressão inicial das halogenases StaI, StaK e Orf8 em pET28a	55
4.2	Expressão e Purificação das proteínas ComH, StaI e StaK e visualização em <i>Western Blotting</i> .	56
4.3	Teste de expressão das halogenases Orf8 e StaK em diferentes cepas de <i>E. coli</i> .	63
4.4	Expressão e purificação da proteína StaK	65
4.5	Testes de cristalização da ComH e da StaI	67

4.6	Ensaio Espectrométrico	69
4.6.1	Dicroísmo Circular – CD	69
4.6.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	71
4.7	Purificação e Ensaio Espectrométrico da proteína StaI em novas condições padronizadas pelos resultados de DLS.	75
4.7.1	Expressão e Purificação	75
4.7.2	Ensaio Espectrométrico da proteína StaI	78
4.8	Proteólise Limitada com Tripsina para proteína StaI	80
4.9	Modelagem Molecular por Homologia	81
4.10	Resultados obtidos dos ensaios de complementação genes <i>staI</i> e <i>staK</i> de <i>Streptomyces toyocaensis</i> .	87
4.10.1	PCR Targeting	88
4.10.2	Conjugação e produção	90
4.10.3	Análises de Massa	91
5	Conclusão	96
6	Referências Bibliográficas	97

Lista de Tabelas

TABELA 1. DADOS DO DICROÍSMO CIRCULAR PARA PROTEÍNAS COMH E STAI.....	71
TABELA 2. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DLS DAS HALOGENASES COMH E STAI A 1MG/ML EM TAMPÃO SEUS TAMPÕES ORIGINAIS.	71
TABELA 3. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DLS DA HALOGENASE COMH A 1MG/ML EM DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÕES.	72
TABELA 4. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DLS DA HALOGENASE STAI A 1MG/ML EM DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÕES.	73
TABELA 5. DADOS DO DICROÍSMO CIRCULAR PARA PROTEÍNAS STAI.	79
TABELA 6. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DLS DAS HALOGENASE STAI A 1MG/ML EM TAMPÃO SEU ORIGINAL.	79
TABELA 7. RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NAS SEQUÊNCIAS DAS HALOGENASES STAI E STAK.	83
TABELA 8. VALORES OBTIDOS SEGUNDO GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA ESCOLHA DOS MODELOS GERADOS PARA STAI E STAK.	83

Lista de Figuras

FIGURA 1. COMPOSTOS NATURAIS CLORADOS. A) REBECAMICINA; B) SALINOSPORAMIDA; C) CLOROTETRACICLINA; D) CLORANFENICOL; E) VANCOMICINA	20
FIGURA 2. COMPOSTOS ORGANOHALOGENADOS COM SEUS RESPECTIVOS PRODUTORES. PRODUTOS NATURAIS BROMADOS REPRESENTADOS POR PLAKORTAMINE C E CJ-19.784. COMPOSTOS IODADOS TIROXINA E TASIHALIDE A E REPRESENTANDO OS FLUORADOS, NUCLEOCIDINA E FLUORACETONA.....	22
FIGURA 3. MECANISMO CATALÍTICO DE HALOPEROXIDASES HEME-DEPENDENTE (ADAPTADO DE (NEUMANN ET AL., 2008).	27
FIGURA 4. MECANISMO CATALÍTICO DE HALOPEROXIDASES VANÁDIO-DEPENDENTE (ADAPTADO DE (NEUMANN ET AL., 2008).	28
FIGURA 5. BIOSÍNTESE DE PIRROLNITRINA. DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PRNA, B, C E D. (ADAPTADO DE (KIRNER ET AL., 1996).	29
FIGURA 6. ENZIMA REBH SENDO UTILIZADA NA FORAMAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 7-CLORATRIPTOFANO NA BIOSÍNTESE DE REBECAMICINA (YEH ET AL., 2005).....	31
FIGURA 7. ESTRUTURA DE UMA FLAVINA DEPENDENTE CLOROHALOGENASE (PRNA). A MOLÉCULA DE FAD E O 7-CLOROTRIPTOFANO (PRODUTO DESTA ENZIMA) É MOSTRADO EM STICK, À MOLÉCULA DE CLORO É MOSTRADO COMO UMA ESFERA ROSA. O DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DA FLAVINA ESTÁ EM SALMÃO E O DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DO SUBSTRATO EM AZUL (DONG ET AL., 2005).	31
FIGURA 8. MECANISMO DE AÇÃO DE HALOGENASE NÃO-HEME FERRO-DEPENDENTE (ADPATADO DE (VAILLANCOURT ET AL., 2006).	33
FIGURA 9. REAÇÃO DE CATÁLISE DE UMA METILTRANSFERASES (MURPHY ET AL., 2003).....	34
FIGURA 10. REAÇÃO DE CATÁLISE POR UM FLUORINASE (DENG ET AL., 2006).....	34
FIGURA 11. OS CINCO DIFERENTES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS GLICOPEPTÍDICOS. OS RETÂNGULOS EM AZUL NA VANCOMICINA E AVOPARCINA MOSTRAM AS POSIÇÕES DOS RESÍDUOS 1 E 3 QUE SÃO DIFERENTES ENTRE O GRUPO I E II. OS CÍRCULOS EM VERMELHO MOSTRAM A LIGAÇÃO ÉTER ENTRE OS RESÍDUOS 1 E 3, QUE SÃO AROMÁTICOS NA RISTOCETINA (GRUPO III) E TEICOPLANINA (GRUPO IV) E O CÍRCULO EM VERDE MOSTRA A PRESENÇA DA CADEIA ALIFÁTICA NA TEICOPLANINA (GRUPO IV). O RETÂNGULO EM VERDE NA COMPLESTATINA MOSTRA A PRESENÇA DE UM TRIPTOFANO LIGADO AO AMINOÁCIDO CENTRAL.	37
FIGURA 12. ESTRUTURA DO ANTIBIÓTICO A 47934. SETAS INDICAM CATÁLISE PELAS HALOGENASES STAI E STAK. (ADAPTADO DE(POOTOOLAL ET AL., 2002).	43
FIGURA 13. GÉIS DE AGAROSE MOSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CORRESPONDENTES A A) <i>ORF8*</i> (1, 2), B) <i>STAK</i> (1 E 2) E <i>STAI</i> (3, 4) (OS GÉIS FORAM EDITADOS PARA FACILITAR A VISUALIZAÇÃO DAS BANDAS)	54
FIGURA 14. PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DOS GENES <i>ORF8*</i> , <i>STAI</i> , E <i>STAK</i> . 1, MARCADOR 1KB, 2, <i>ORF8*</i> CLONADA EM PET28A(+), 3, CONTROLE PARA <i>ORF8*</i> , 4, <i>STAI</i> CLONADA EM PET28A(+), 5, <i>STAI</i> CLONADA EM PET20A, 6, <i>STAI</i> CONTROLE, 7, <i>STAK</i> CLONADA EM PET20A(+), 8, <i>STAK</i> CLONADA EM PET20A, 9, <i>STAK</i> CLONADA EM PET28A(+), 10, <i>STAK</i> CLONADA EM PET28A(+), 11, <i>STAK</i> CONTROLE.....	55
FIGURA 15.1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR, 2, <i>ORF8*</i> LISADO, 3, <i>ORF8*</i> PELLET, 4, <i>STAK</i> LISADO, 5, <i>STAK</i> , PELLET, 6, <i>STAI</i> LISADO, 7, <i>STAI</i> , PELLET.....	55
FIGURA 16. CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A ENZIMA COMH. EM VERMELHO AS FRAÇÕES COLETADAS. FORAM UTILIZADAS COMO AMOSTRAS PARA A ANÁLISE EM SDS-PAGE 15% AS FRAÇÕES 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15; EM VERDE A CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO B; EM AZUL A ABSORBÂNCIA A 280 NM.....	56

FIGURA 17. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DA COMH(1-7) M- MARCADOR DE 250 KD (BIO-RAD), 1- SOBRENADANTE, 2- PELLET, 3- <i>FLOW THROUGH</i> , 4 A 14- AMOSTRAS DA COMH REFERENTE ÀS FRAÇÕES 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 RESPECTIVAMENTE; SETA INDICA EXPRESSÃO DA HALOGENASE COM TAMANHO APROXIMADO DE 50KD.....	57
FIGURA 18. CROMATOGRAMA OBTIDO DA PURIFICAÇÃO POR EXCLUSÃO MOLECULAR DA ENZIMA COMH.....	58
FIGURA 19. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DAS FRAÇÕES DA PURIFICAÇÃO POR EXCLUSÃO MOLECULAR DA ENZIMA COMH REFERENTE ÀS FRAÇÕES DOS PICOS NA FIGURA 7. M- MARCADOR DE PESO MOLECULAR 250KD (BIO-RAD), 1 A 11 FRAÇÕES 2, 4, 6, 13, 15, 19, 21, 23, 25, 28, 30, 32.	58
FIGURA 20. CROMATOGRAMA DA PROTEÍNA STAI. EM AZUL A ABSORBÂNCIA A 280NM; EM VERMELHO AS FRAÇÕES COLETADAS PELO SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS; EM VERDE CONCENTRAÇÃO DE TAMPÃO B (COM IMIDAZOL).	59
FIGURA 21. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DA STAI (4-10) M- MARCADOR DE 1 KD (BIO-RAD), 1- LISADO E 8- PELLET, 2 –PELLET , 3- <i>FLOW THROUGH</i> , 4 E 10- AMOSTRAS DA STAI REFERENTE ÀS FRAÇÕES 3, 5, 7, 9, 11, 13.....	59
FIGURA 22. CROMATOGRAMA OBTIDO DA PURIFICAÇÃO POR EXCLUSÃO MOLECULAR DA STAI. AS SETAS INDICAM QUAIS FRAÇÕES FORAM UTILIZADAS COMO AMOSTRAS NO GEL SDS-PAGE 15% (FIGURA 23)	60
FIGURA 23. VISUALIZAÇÃO DO GEL SDS-PAGE 15% REPRESENTANDO RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR DA STAI, 1 MARCADOR 1KD (BIO-RAD), 2, 3, E 4 O LISADO, PELLET E <i>FLOW THROUGH</i> RESPECTIVAMENTE, 5-11 AS FRAÇÕES 2, 4, 12, 14, 17, 19, 25 OBTIDAS PELO CROMATOGRAMA DA EXCLUSÃO MOLECULAR.....	60
FIGURA 24. CROMATOGRAMA OBTIDO DA ENZIMA STAK. EM VERMELHO AS FRAÇÕES COLETADAS; EM VERDE A CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO B; EM AZUL A ABSORBÂNCIA, A 280 NM.	61
FIGURA 25. GEL SDS-PAGE 15% DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA STAK, 1, MARCADOR MOLECULAR 1KD (BIO-RAD), 2, 3, E 4 O LISADO, PELLET E <i>FLOW THROUGH</i> RESPECTIVAMENTE, 5-9 AS FRAÇÕES 8, 10, 18, 24, 30 OBTIDAS NA PURIFICAÇÃO.	62
FIGURA 26. VISUALIZAÇÃO DA MEMBRANA DE <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO ANTICORPOS ANTI-HIS REALIZADO PARA A CONFIRMAÇÃO DA ENZIMA STAK, 1,O LISADO E 2, O PELLET.	62
FIGURA 27. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DO LISADO DAS PROTEÍNAS ORF8* E STAK. M- MARCADOR DE 250 KD (BIO-RAD), 1- ORF8* ROSETTA NÃO INDUZIDO, 2- ORF8* ORIGAMI NÃO INDUZIDO, 3- ORF8* ARTIC EXPRESS NÃO INDUZIDO, 4-STAK ROSETTA NÃO INDUZIDO, 5- STAK ORIGAMI NÃO INDUZIDO, 6- STAK ARTIC EXPRESS NÃO INDUZIDO, 7- ORF8* ROSETTA 37º-4H, 8- ORF8* ORIGAMI 37º - 4H, 9- STAK ROSETTA 37º-4H, 10- STAK ORIGAMI 37º-4H, 11- ORF8* ROSETTA 18º OVER NIGHT, 12- ORF8* ORIGAMI 18º <i>OVER NIGTH</i> , 13- STAK ROSETTA 18º <i>OVER NIGHT</i> , 14- STAK ORIGAMI 18º <i>OVER NIGHT</i>	63
FIGURA 28. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DO PELLET DAS PROTEÍNAS ORF8* E STAK. M- MARCADOR DE 250 KD (BIO-RAD), 1- ORF8* ROSETTA NÃO INDUZIDO, 2- ORF8* ORIGAMI NÃO INDUZIDO, 3- ORF8* ARTIC EXPRESS NÃO INDUZIDO, 4-STAK ROSETTA NÃO INDUZIDO, 5- STAK ORIGAMI NÃO INDUZIDO, 6- STAK ARTIC EXPRESS NÃO INDUZIDO, 7- ORF8* ROSETTA 37º-4H, 8- ORF8* ORIGAMI 37º - 4H, 9- STAK ROSETTA 37º-4H, 10- STAK ORIGAMI 37º-4H, 11- ORF8* ROSETTA 18º OVER NIGHT, 12- ORF8* ORIGAMI 18º <i>OVER NIGTH</i> , 13- STAK ROSETTA 18º <i>OVER NIGHT</i> , 14- STAK ORIGAMI 18º <i>OVER NIGHT</i>	64
FIGURA 29. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DO LISADO E PELLET DAS PROTEÍNAS ORF8* E STAK. M- MARCADOR DE 250 KD (BIO-RAD), 1- ORF8* ARTIC EXPRESS 18º <i>OVER NIGHT</i> LISADO, 2- STAK ARTIC EXPRESS 18º <i>OVER NIGHT</i> LISADO, 3- ORF8* ARTIC EXPRESS 18º <i>OVER NIGHT</i> PELLET, 4- STAK ARTIC EXPRESS 18º <i>OVER NIGHT</i> PELLET.	64
FIGURA 30. CROMATOGRAMA OBTIDO PARA PROTEÍNA STAK. EM AZUL A ABSORBÂNCIA A 280NM. EM VERMELHO AS FRAÇÕES COLETADAS, AS QUE SE REFEREM AO PICO FORAM ANALISADAS EM SDS-PAGE 15%. EM VERDE A CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO 50 MM TRIS-HCL, 100 MM NACL E 500 MM DE IMIDAZOL.	66
FIGURA 31. PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PROTEÍNA STAK NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO POR EXCLUSÃO MOLECULAR (COLUNA HILOAD SUPERDEX 16/200 EQUILIBRADA EM SOLUÇÃO TAMPÃO 50MM TRIS-HCL PH 7,8; 100MM DE NACL).	66
FIGURA 32. GEL SDS-PAGE 15% DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE E EXCLUSÃO MOLECULAR DA PROTEÍNA STAK. A. AMOSTRAS REFERENTES A PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE AO NÍQUEL. M,	

MARCADOR MOLECULAR 1KD (BIO-RAD), 2, 3, E 4 O <i>PELLET</i> , LISADO E <i>FLOW THROUGH</i> RESPECTIVAMENTE, 5-9 AS FRAÇÕES 8,10,18, 24, 30 OBTIDAS NA PURIFICAÇÃO. B. AMOSTRA REFERENTE AO PICO OBTIDO NA PURIFICAÇÃO EXCLUSÃO DE PESO MOLECULAR. M MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KD (BIO-RAD) (GEL EDITADO PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO).	67
FIGURA 33. FOTOGRAFIA DO CRISTAL OBTIDO EM CONDIÇÃO COMPOSTA DE 0,1 M DE CHES PH 9.0 E 30% PEG400. (A) EXPOSTO À VISUALIZAÇÃO NATURAL E (B) EXPOSTO A VISUALIZAÇÃO POR LUZ ULTRA VIOLETA.	69
FIGURA 34. FOTOGRAFIA DO CRISTAL OBTIDO NA CONDIÇÃO COMPOSTA POR 0,1M DE ACETATO DE SÓDIO PH 4,5, 0,2 M DE SULFATO DE LÍTIO, 50% PEG 400, (A) EXPOSTO A VISUALIZAÇÃO NATURAL E (B) EXPOSTO A VISUALIZAÇÃO POR LUZ ULTRA VIOLETA.	69
FIGURA 35. DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA STAI. CURVA DE CD EXPERIMENTAL COM A PROTEÍNA 5MMOL/L EM TAMPÃO 50MM CHES E 100 MM NACL, PH 9,0.	70
FIGURA 36. DICROÍSMO CIRCULAR DA COMH. CURVA DE CD EXPERIMENTAL COM A PROTEÍNA 5MMOL/L EM TAMPÃO 50MM TRIS-HCL E 100 MM NACL, PH 7,8.	70
FIGURA 37. CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A ENZIMA STAI. EM VERMELHO AS FRAÇÕES COLETADAS. FORAM UTILIZADAS COMO AMOSTRAS PARA A ANÁLISE EM SDS-PAGE 15% AS FRAÇÕES REFERENTE AOS PICOS; EM VERDE A CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO B; EM AZUL A ABSORBÂNCIA A 280NM.	76
FIGURA 38. CROMATOGRAMA OBTIDO DA PURIFICAÇÃO POR EXCLUSÃO MOLECULAR DA STAI. FRAÇÕES REFERENTES AOS PICOS FORAM UTILIZADAS COMO AMOSTRAS NO GEL SDS-PAGE 15% (FIGURA 39).	77
FIGURA 39. GEL SDS-PAGE 15% CONTENDO AMOSTRAS DA STAI. M- MARCADOR DE 250 KD (BIO-RAD), 1- <i>PELLET</i> , 2- SOBRENADANTE, 3- <i>FLOW THROUGH</i> , 4 A 10- AMOSTRAS DA STAI REFERENTE ÀS FRAÇÕES 7, 12, 16 28, 41, 46, 65, RESPECTIVAMENTE, DO CROMATOGRAMA DE AFINIDADE. 11 A 14 – AMOSTRAS DA STAI REFERENTE AS FRAÇÕES 2, 9, 21, 32, OBTIDAS APÓS CROMATOGRÁFICA EXCLUSÃO DE PESO MOLECULAR. SETA INDICA EXPRESSÃO DA HALOGENASE COM TAMANHO APROXIMADO DE 50 KD.	77
FIGURA 40. DICROÍSMO CIRCULAR DA PROTEÍNA STAI. CURVA DE CD EXPERIMENTAL COM A PROTEÍNA 5MMOL/L EM TAMPÃO 50MM CHES E 100 MM NACL, PH 9,0.	78
FIGURA 41. SDS-PAGE 15% CONTENDO O RESULTADO DA AÇÃO DA TRIPSINA SOBRE A HALOGENASE STAI. NOTA-SE O APARECIMENTO DE UMA BANDA DE APROXIMADAMENTE 50 KDA APÓS A PROTEÓLISE E DE OUTRA BANDA MENOR. M - MARCADORES DE PESO MOLECULAR; TEMPOS DE PROTEÓLISE: 0, 2, 5, 10,20 E 40 MINUTOS E 1:20, 3, E 24 HORAS APÓS A AÇÃO DA ENZIMA. SETA NA COR AMARELA EVIDÊNCIA BANDA QUE SE MANTEVE CONSTANTE. SETA NA COR ROSA INDICANDO BANDA MENOR PROVENIENTE DA DIGESTÃO.	81
FIGURA 42. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA HALOGENASE. A) ALINHAMENTO DA HALOGENASE DE <i>CHONDROMYCES CROCATUS</i> (CNDH) QUE FOI UTILIZADO COM MOLDE PARA A CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DA STAI E DA STAK. NO ALINHAMENTO É POSSÍVEL OBSERVAR UMA ALTA IDENTIDADE SEQUENCIAL ENTRE AS TRÊS PROTEÍNAS, COM EXCEÇÃO DA REGIÃO C TERMINAL QUE É PRATICAMENTE NÃO CONSERVADO EM NENHUMA DAS ESTRUTURAS. ENTRETANTO NA ESTRUTURA DA CNDH, O SEU C TERMINAL É DESORDENADO E NÃO FOI POSSÍVEL SER OBSERVADO NA ESTRUTURA CISTALOGRAFICA. B) ALINHAMENTO DAS HALOGENASES CONHECIDAS PARA A BIOSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS GLICOPEPTÍDICOS. É POSSÍVEL OBSERVAR QUE UMA SÉRIE DE RESÍDUOS SOMENTE NÃO SÃO CONVERSADOS NA STAK E QUE ESSES RESÍDUOS PODEM ESTAR RELACIONADOS COM O RECONHECIMENTO DO SUBSTRATO E SUA ORDENAÇÃO QUE PODE LEVAR A UM PADRÃO DE HALOGENAÇÃO DIFERENTE.	82
FIGURA 43. MODELOS DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DAS HALOGENASES STAI (1) E STAK (2) GERADAS COM BASE NA PROTEINA MOLDE CNDH. ESQUEMA REPRESENTANDO O ENOVELAMENTO DAS HALOGENAS FAD-DEPENDENTES, COM MODULO DENOMINADO 'CAIXA' (MODULO DE LIGAÇÃO AO FAD) E O MODULO ' PIRÂMIDE' (MODULO DE RECONHECIMENTO DO SUBSTRATO).	84
FIGURA 44. SUPERFÍCIE ELETROSTÁTICA. A REFERE-SE A PROTEÍNA STAI E C REFERE-SE A STAK, SETAS INDICAM A REGIÃO DE SULCO. SUPERFÍCIE ELETROSTÁTICA CORTADA PARA VISUALIZAÇÃO DO TÚNEL DE TRASFERÊNCIA DO CLORO. B REFERENTE A STAI E D PARA STAK, SETAS (EM VERMELHO) INDICAM O TÚNEL DE CADA ENZIMA.	85
FIGURA 45. SUPERPOSICAO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS QUE SE APRESENTAM DIFERENTES ENTRE AS SEQUÊNCIAS DA STAK E STAI. EM VERDE, ENCONTRAM-SE OS RESÍDUOS DA STAI. EM AZUL, OS	

RESÍDUOS DA STAK SÃO MOSTRADOS. O ÍON CLORO ESTÁ REPRESENTADO EM COR ROSA E O FAD NA COR AZUL E SÃO REFERENTES AO MODELO DA STAK.....	86
FIGURA 46. PLASMÍDEO PIJ 10257. STAK PREVIAMENTE CLONADO COM NDEI/PACI E STAI COM NDEI/HINDIII. ESTE PLASMÍDEO POSSUI O GENE DE RESISTÊNCIA A HIGROMICINA COMO MARCADOR DE SELEÇÃO.	88
FIGURA 47. 0.8% TAE GEL DE AGAROSE. DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PIJ773 COM ECORI E HINDIII (ROCHE). M- 1KB MARCADOR MOLECULAR (NEB). SETA INDICA O FRAGMENTO CORRESPONDENTE AO MARCADOR DE SELEÇÃO APRAMICINA.	88
FIGURA 48. 0.8% TAE GEL DE AGAROSE REPRESENTANDO QUARTO BANDAS RELACIONADAS COM A AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO CASSETTE APRAMICINA. FOI USADA ENZIMA DNA POLIMERASE HERCULASE II FUSION (AGILENT TECHNOLOGIES) COM 4 DIFERENTES TEMPERATURAS DE MELTING: 1) 62°C, 2) 60.6°C, 3) 57.7°C E 4) 55°C. M- 1 KB MARCADOR DE PESO MOLECULAR (NEB).	89
FIGURA 49. GEL DE AGAROSE MOSTRANDO A DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PIJ10257 COM ENZIMA SACI (ROCHE). SETAS INDICAM O FRAGMENTO (~1.4 KB) QUE CORRESPONDE MARCADOR DE SELEÇÃO APRAMICINA, CONFIRMANDO ASSIM QUE O PLASMÍDEO CONTENDO OS STAK E STAI SÃO APRAMICINA RESISTENTE. COLUNA M- MARCADOR MOLECULAR 1 KB (NEB), COLUNAS 1 A 3 REFEREM-SE AO PLASMÍDEO PIJ10257+ STAI GENE E COLUNAS 4 A 6 AO PLASMÍDEO PIJ10257+ STAK GENE.	89
FIGURA 50. STREAKING DE COLÔNIAS EM PLACAS CONTENDO ANTIBIÓTICO DE RESISTÊNCIA A. <i>AMYCOLATOPSIS ORIENTALIS</i> , PRODUTORA DE VANCOMICINA; B. CEPA <i>AMYCOLATOPSIS</i> SP. MJM2582, PRODUTORA DE RISTOCETINA; C. CEPA <i>ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS</i> , PRODUTORA DE TEICOPLAMINA; D. CEPA <i>ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS</i> , PRODUTORA DE TEICOPLAMINA USANDO HIGROMICINA COMO MARCADOR DE SELEÇÃO.....	90
FIGURA 51. ANÁLISES LC-MS ANÁLISES LC-MS DA PRODUÇÃO PELA CEPA SELVAGEM DE GLICOPEPTÍDEOS: A. <i>AMYCOLATOPSIS ORIENTALIS</i> , PRODUTOR DA VANCOMICINA, TEMPO DE ELUIÇÃO DE 4.37 MIN ; B. <i>AMYCOLATOPSIS</i> SP. MJM2582, PRODUTOR DE RISTOCETINA, TEMPO DE ELUIÇÃO DE 0.52 MIN; C. <i>ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS</i> , PRODUTOR DE TEICOPLAMINA, TEMPO DE ELUIÇÃO DE 5.65 MIN. SETAS INDICAM OS PICOS REFERENTES AO TEMPO DE ELUIÇÃO. CADA ESPECTRO MOSTRA A MONITORIZAÇÃO IÔNICA SELETIVA PARA CADA GLICOPEPTÍDO.	92
FIGURA 52. CROMATOGRAMA LC-MS DA PRODUÇÃO DE GLICOPEPTÍDEO POR <i>AMYCOLATOPSIS ORIENTALIS</i> (CEPA PRODUTORA DE VANCOMICINA) DO MUTANTE CONTENDO GENE STAK. M/Z 1481.30 – 1483.50 REFERE-SE A VANCOMICINA ADICIONADA DE UM HALOGENIO. NÓS SELECIONAMOS TRÊS COLÔNIAS PARA CADA MUTANTE CONSTRUÍDOS COM STAK E OUTRAS TRÊS COLÔNIOAS PARA MUTANTES CONTENDO STAI. ENTRETANTO, ANÁLISES DE MASSA MONSTRAM QUE TODOS OS MUTANTES MANTÊM O MESMO PADRÃO DA CEPA SELVAGEM.....	93
FIGURA 53. CROMATOGRAMA DE MASSA BUSCANDO RISTOCETINA PRODUZIDA POR <i>AMYCOLATOPSIS</i> SP. MJM2582 CONTENDO GENE STAI. O PICO CORRESPONDENTE A PRODUÇÃO DE RISTOCETINA E TAMBÉM A PRODUÇÃO DE RISTOCETINA ACRESCE DE CLORO (M/Z1069.83 – 1071.34) NÃO SE FAZ PRESENTE. O MESMO PADRÃO SE MANTEVE PARA TODOS OS MUTANTES SELECIONADOS. ...	94
FIGURA 54. CROMATOGRAMA (ANÁLISES LC-MS) DA PRODUÇÃO DE TEICOPLAMINA ([M+H] ⁺ = 1878.60 – 1882.00 [M+NA] ⁺ = 1892.00 – 1896.00). TRÊS MUTANTES PARA CADA CONSTRUÇÃO COM STAK E OUTROS TRÊS REFERENTES AS CONSTRUÇÕES COM STAI FORAM SELECIONADOS. UM MUTANTE CONTENDO GENE STAI, É REPRESENTADO NESTA FIGURA INDICANDO NÃO HAVER PICOS CORRESPONDENTES PARA PRODUÇÃO DE TEICOPLAMINA ADICIONADA DE CLORO (M/Z 1913.60 – 11917.00 E M/Z1927.60 – 1931.00).....	94
FIGURA 55. BASE DE PICOS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PARA A PRODUÇÃO DE TEICOPLAMINA UTILIZANDO MEIO E25 PARA CULTIVO E MEIO TM1 PARA PRODUÇÃO. NÃO HÁ PICO QUE SE REFERE A M/Z 1913.60 – 1917.00 OU M/Z 1927.60 – 1931.00, O QUAL CORRESPONDE PARA TEICOPLAMINA ACRESCEIDA DE CLORO.	95

RESUMO

Vários experimentos têm comprovado que compostos naturais podem ter sua atividade biológica alterada devido à presença ou ausência de halogênios ligados. Os antibióticos glicopeptídicos, como a vancomicina e teicoplanina são produtos naturais halogenados que apresentam destacada importância. Halogenases são enzimas que catalizam a transferência de halogênios para um determinado substrato, porém são muito pouco estudadas, principalmente aquelas envolvidas na biossíntese de produtos naturais, como antibióticos glicopeptídicos, mesmo com o seu potencial de aplicação em biologia sintética. Cepas produtoras de glicopeptídeos foram obtidas da coleção NRRL e crescidas em meio TSB. O DNA foi extraído e os genes de 3 diferentes halogenases (*stal* e *staK* de *Streptomyces toyocaensis*, composto 47934 and *Orf8** de *Actinoplanes teichomyceticus*, Teicoplanina) foram clonados em pET28a e pET20a. Um gene sintético foi obtido para enzima ComH (biossíntese de complestatina) e clonado em pET28a. A expressão desses genes foi induzida por IPTG e a purificação se deu em colunas de afinidade e gel filtração. Foram realizados estudos biofísicos (CD e DLS da Stal), bem como modelagem molecular e ensaios de complementação para proteínas StaK e Stal. Três halogenases foram purificadas, Stal, StaK e ComH e apresentaram coloração amarela indicando a co-purificação com FAD. Orf8* apresentou-se somente na fração insolúvel. Análises de CD indicam a presença de α -hélices e folhas- β e foi possível observar o estado de oligomerização e polidispersividade em diferentes condições para halogenase Stal. Os modelos moleculares deram *insights* sobre uma possível diferença de padrão de halogenação catalizada pela Stal e StaK, devido à diferença de resíduos hidrofóbicos que formam os sulcos do sítio ativo. Tentativas de ensaios de cristalização para as enzimas Stal, StaK e ComH foram realizadas. No entanto, apenas a proteína Stal apresentou um único cristal não

reproduzível mesmo com a troca de tampão em passos de purificação

Palavras-chave: Halogenases. Produtos Naturais. Antibióticos Glicopeptídicos. *Streptomyces*. Biotecnologia.

ABSTRACT

Various experiments have shown that natural compounds may have their biologic activity altered by presence or absence of halogens. Glycopeptide antibiotics, such as vancomycin and teicoplanin are halogenated natural products and they have substantial importance in the medicine. Halogenases, are enzymes that catalyses the attachment of halogens to a substrate, however they are not well understood mainly those ones in glycopeptide biosynthesis. Producing glycopeptides strains were obtained from NRRL collection, they were grown in liquid TSB medium and the DNA was extracted. Three different genes for halogenases [(*stal* and *staK* from *Streptomyces toyocaensis* (compound 47934) and *Orf8** from *Actinoplanes teichomyceticus* (Teicoplanin)] were amplified and cloned into pET28a and pET20a. A synthetic gene for *comH* from the biosynthesis of complestatin was obtained and also cloned in the pET28a. The expression of these four genes was carried out with the induction by IPTG and the purification was performed by affinity and molecular exclusion. Samples of soluble and insoluble fractions and chromatographic peaks were analyzed on SDS-PAGE gel. Circular Dichroism (CD) and Dynamic Light Scattering (DLS) studies were performed for Stal and ComH. We have also performed molecular modelling for Stal and StaK enzymes because attempts to crystallise all the soluble halogenases did not return any result (only Stal had a single crystal which showed not reproduzible). ComH, Stal and StaK were purified and they had an yellow colour indicating the co-purification with FAD. *Orf8** was predominantly insoluble. SDS-PAGE gel showed that Stal had high purity already after the affinity purification and the molecular exclusion indicates that it had a tendency to aggregate. By the analysis of CD was possible to observe the structural integrity of Stal and ComH, which shows, as expected, the presence of α -helixes and β -sheets. The

DLS analysis shows the oligomerization state of the sample and some polydispersity in several conditions. The molecular models give some *insights* on the possible difference of halogenation pattern catalysed by Stal and StaK due to the difference of hydrophobic residues that form the groove of the active site. They indicated that Stal and StaK might accommodate the substrate in a different orientation.

Keywords: Halogenases. Natural products. Glycopeptide antibiotic. Streptomyces. Biotechnology.

1 Introdução

A resistência aos antibióticos continua a ser um problema de saúde pública global (COOPER, 2011). De acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2013), bactérias resistentes causam anualmente mais de dois milhões de infecções nos Estados Unidos, com uma taxa de mortalidade de mais de 20.000 pessoas por ano. A Organização Mundial de Saúde (OMS), no seu relatório global sobre vigilância e resistência antimicrobiana em 2014, afirmou que, mesmo em uma era pós-antibiótico, as infecções comuns e lesões menores podem matar. Fato o qual não está longe de ser uma fantasia apocalíptica, em vez disso, é uma possibilidade muito real para o século 21. Foi pensando nisso que em setembro de 2014, o governo dos EUA emitiu uma política nacional a fim de definir uma força-tarefa para combater bactérias resistentes aos antibióticos (CHENG et al., 2015).

A resistência antimicrobiana é uma das principais ameaças à saúde humana. Infelizmente, o que se observou nos últimos anos foi um aumento do número de infecções causadas por tais bactérias resistentes (WALKER et al., 2009). Este fato chama a atenção para a necessidade de descoberta de novos medicamentos ou então a melhoria de antibióticos existentes. Para cada fármaco de sucesso que chega ao mercado, dezenas de milhares de compostos precisam ser selecionados e introduzidos no processo de descoberta de um novo medicamento. No entanto, esforços a fim de melhorar a diversidade dos compostos a serem selecionados são cruciais para aumentar a probabilidade de que um composto se torne um medicamento aprovado. Uma análise das fontes de novas drogas no período de 1981 a 2010 revelou que 64% dos 1.073 medicamentos são ou produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Dotado de extraordinária diversidade estrutural e atividades biológicas inigualáveis, produtos naturais são classificados como metabólitos secundários montados e modificados por vias biossintéticas exclusivas em microrganismos e plantas, os quais têm sido utilizados para o tratamento de várias doenças e estão se tornando uma área de pesquisa fundamental para a descoberta de novos medicamentos (ENFIELD et al., 2014; MAY, 2014; RAJESH et al., 2015)

1.1 Produtos naturais halogenados

A ocorrência natural de produtos organohalogênicos já foi considerada no passado como excêntricos químicos raros ou simplesmente como artefatos ocorridos durante o processo de isolamento dos mesmos. Entretanto, recentemente, eles têm assumido um importante papel no campo dos produtos naturais. Assim o número de compostos organohalogênicos identificados na natureza multiplicou-se por volta de 250 vezes durante o período de 1960 até 2000 (GRIBBLE, 2004). A sua importância e prevalência é notavelmente abundante. Em 2004, mais de 4.500 produtos naturais halogenados já tinham sido descobertos. Destes, 2.300 são compostos clorados, 2.100 bromados, 120 compostos iodados e 30 fluorados. A distribuição de organohalogênios é exatamente proporcional em relação à abundância natural dos halogênios disponíveis para uso no ambiente (GRIBBLE, 2004).

A incorporação de halogênios em produtos naturais altera suas propriedades físicas, incluindo efeitos eletrônicos e estéricos, que podem ser cruciais para a determinação da afinidade e seletividade das interações com alvos biológicos. Muitos dos genes que codificam enzimas incorporadoras de halogênios, ou halogenases, estão presentes em cluster gênicos de rotas biossintéticas específicas de produtos naturais. A halogenação orgânica ocorre em uma faixa muito diversa de família de compostos, sendo desde terpenos a policetídeos e peptídeos não-ribossomais. Geralmente os átomos de halogênio são incorporados em carbonos alifáticos, centros olefínicos, e em uma larga variedade de anéis aromáticos e heterocíclicos (VAILLANCOURT et al., 2006). A cloração é a modificação predominante, seguida por bromação, enquanto a iodação e a fluoretação são raras. Como a presença dos halogênios modifica as propriedades físicas, eles também produzem profundas influências na atividade biológica destes compostos (NEUMANN; FUJIMORI; WALSH, 2008). Portanto não é surpresa encontrar compostos orgânicos halogenados que são moléculas bioativas, sendo que muitas delas com importantes aplicações clínicas em humanos. A vancomicina (Figura 1E), por exemplo, tem sido utilizada historicamente como antibiótico de ultima escolha contra bactérias Gram-positivas resistentes a meticilina. A presença de dois substituintes de cloro na vancomicina é necessária para que a molécula mantenha a sua conformação biológica ativa. Entretanto, cepas de bactérias resistentes à vancomicina já foram isoladas, o que significa que ocorre a necessidade de descoberta de novas drogas para

combater ameaças infecciosas (HARRIS, 1985). Vários outros antibióticos, como diversos glicopeptídeos, a clorotetraciclina (Figura 1C) e o cloranfenicol (Figura 1D) também são exemplos de organohalogênicos com interesse terapêutico (VAILLANCOURT et al., 2006). Outras propriedades úteis de alguns produtos naturais clorados incluem: a atividade antitumoral (rebecamicina [Figura 1A] a partir da bactéria do solo *Lechevalieria aerocolonigenes*, salinosporamida A [Figura 1B], spongistatina, e calicheamicina (YEH; GARNEAU; WALSH, 2005); (FENICAL; JENSEN, 2006; NICOLAOU; SMITH; YUE, 1993) e atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose (maracen A5, produzido por *Sorangium cellulosum*). Produtos naturais clorados, também são encontrados em plantas (o romucosine B12 alcalóide de *Rollinia mucosa*, com atividade anti-agregação plaquetária), insetos (a feromônio sexual 2,6-diclorofenol de carrapatos estrela solitária), e até mesmo vertebrados (composto analgésico epibatidina, extraído do sapo *Epipedobates tricolor*) (GRIBBLE, 2004; (BERGER, 1972); (KUO et al., 2001).

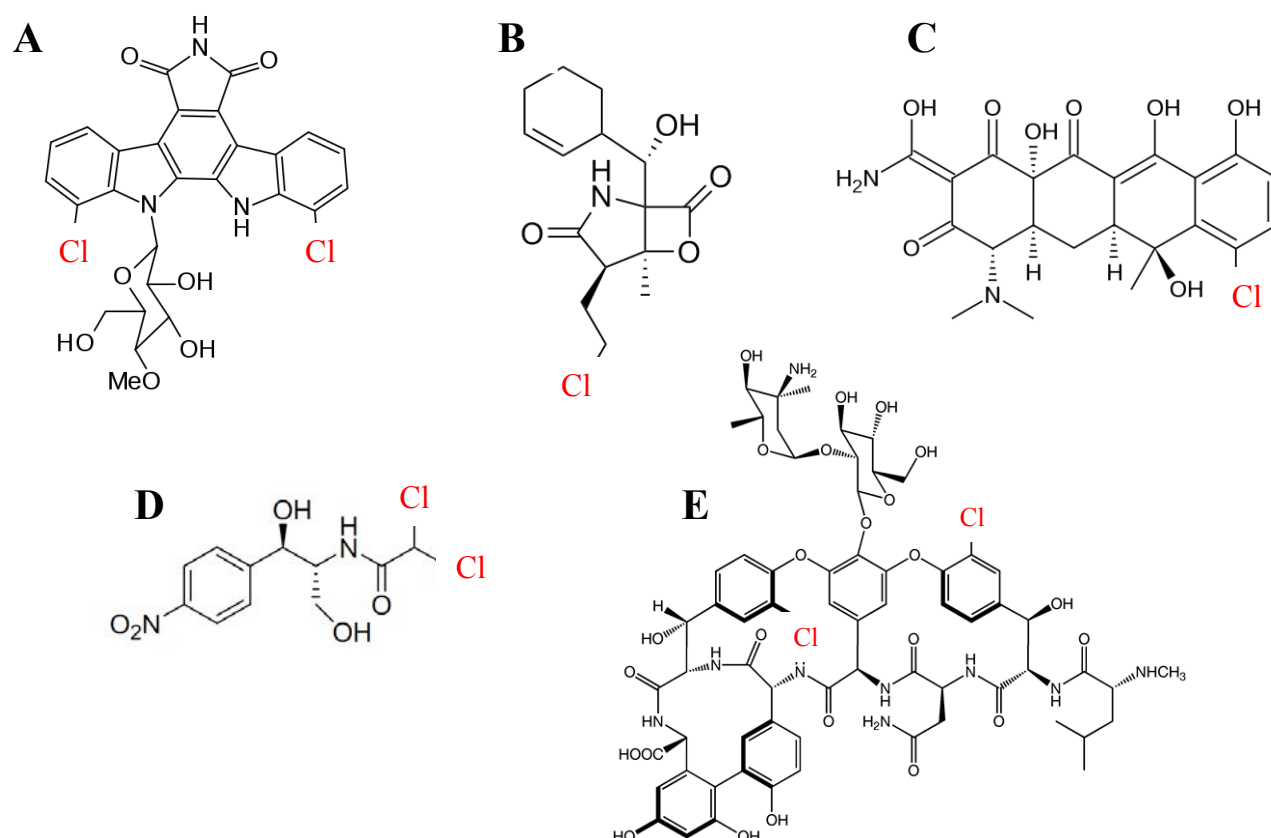


Figura 1. Compostos naturais clorados. A) Rebecamicina; B) Salinosporamida; C) Clorotetraciclina; D) Cloranfenicol; E) Vancomicina

Muitos compostos bromados são isolados de ambientes marinhos por conta da alta concentração relativa de Br⁻ na água do mar. Um exemplo de composto bromado conhecido é o antitumoral placortamina C (Figura 2) , encontrado em associação com a esponja marinha *Plakortis nigra*. Algas marinhas vermelhas são outra fonte prolífica de compostos bromados, tal como o potente inseticida telfairina de *Plocamium telfairia*. Outro gênero de algas vermelhas, *Laurencia*, produz uma incrível variedade de esqueletos moleculares bromados, incluindo as moléculas neoirietetraol, japonenina A, laurefucina e lauralena (GRIBBLE, 2003). Apenas alguns compostos bromados são produzidos por organismos terrestres como é o caso do composto conhecido apenas como CJ-19.784, isolado a partir do fungo *Acanthostigmella* (GRIBBLE, 2004). Um composto bromado particularmente interessante é 2-octil- γ bromoacetoacetato, originalmente isolado a partir de fluido espinal cerebral humano. Embora pouco se saiba sobre sua origem ou biossíntese, esta molécula está relacionada na regulação do sono REM (Movimento Rápido do Olho, do inglês, *Rapid Eye Movement*) (PATRICELLI et al., 1998).

Tiroxina é um conhecido hormônio da tiroide de mamíferos, e o composto iodolactona ocorre nas glândulas da tiroide de cães. Embora os hormônios iodados sejam, provavelmente, os compostos organohalogenados mais conhecidos, há também muitos outros produtos naturais iodados com atividades biológicas úteis (GRIBBLE, 2004; (GRIBBLE, 2003). Um exemplo citado por (AHLERT et al., 2002), é o composto calicheamicina, isolado a partir da bactéria *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis*, é um potente agente antitumoral que se liga aos sulcos do DNA e provoca a clivagem oxidativa da cadeia dupla. Apesar da relativamente baixa concentração de iodeto em água do mar em comparação com o brometo e cloreto, vários produtos naturais iodados foram descobertos em amostras marinhas. Tasihalida A (Figura 2), isolado a partir de uma mistura de cianobactéria do gênero *Symploca* e uma alga vermelha, é um diterpeno iodado. Outra espécie de alga vermelha, *Hypnea valetiae*, produz 5'-desoxi-5-iodotubercidina, um inibidor de adenosina quinase que tem sido utilizada para estudar o metabolismo de nucleotídeos. Além disso, nem todos os produtos naturais halogenados contêm apenas um tipo de halogênio. O composto Placohipaforina A, associada à esponja marinha *Plakortis simplex* e o sesquiterpeno iodado 10-bromo-7-hidroxi-11- iodolaurena da alga marinha *Laurenica nana* contêm ambos, bromo e iodo com substituintes (WILLIAMS, P. G. et al., 2003); CAMPAGNUOLO, 2003 E IZAC, 1979).

Os compostos fluorados não são encontrados em abundância, até 2004 havia 30 exemplos conhecidos. A toxina fluoracetato descoberta a partir de uma planta da África do Sul, *Dichapetalum cymosum*, tem sido utilizado no controle de pragas. Muitas outras plantas são conhecidas por produzir compostos fluorados, incluindo *Dichapetalum braunii*, *Dichapetalum toxicarium*, *Acacia Georginae*, e *Glycine Max* (MURPHY; SCHAFFRATH; O'HAGAN, 2003) A biossíntese de produtos naturais fluorados foi esclarecida através da caracterização da enzima que catalisa a fluoração de S-adensil-L-metionina para produzir 5'-fluoro-5'-desoxiadenosina em *Streptomyces cattleya* (DONG et al., 2004). Este produto é metabolizado em fluoroacetatoaldeído, que provavelmente serve como um precursor para a maioria de outros compostos fluorados. Ainda não foi conclusivamente mostrado se os metabolitos fluorados produzidos por plantas são sintetizados através de um mecanismo semelhante. Esta via também não leva em consideração a biossíntese do antibiótico fluorado nucleocidina (Figura 2) (GRIBBLE, 2004).

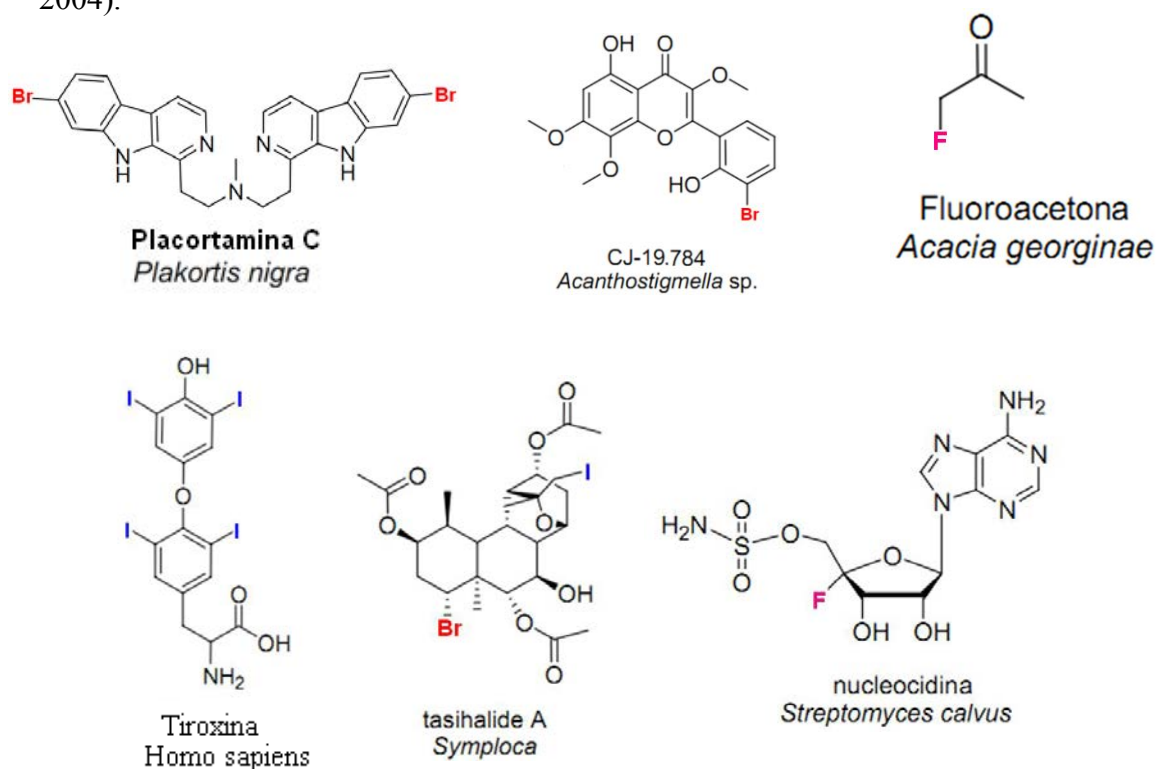


Figura 2. Compostos organohalogenados com seus respectivos produtores. Produtos naturais bromados representados por placortamina C e CJ-19.784. Compostos iodados tiroxina e tasihalide A e representando os fluorados, nucleocidina e fluoracetona.

1.2 Halogenases

O primeiro produto natural halogenado caracterizado foi o 3,5-diiodotirosina, identificado a mais de 200 anos atrás. No entanto, a caracterização da primeira halogenase conhecida, uma haloperoxidase heme-dependente, ocorreu somente na década de 50. Em 1984, a primeira atividade de halogenação de uma enzima vanádio-dependente foi demonstrada no microrganismo marinho *Ascophyllum nodosum* (NEIDLEMAN; GEIGERT, 1987); DUNFORD, 1999; VILTER, 1984). Ambas as haloperoxidasas (vanádio-dependente e heme-dependente) exigem peróxido de hidrogênio e catalisam halogenação de substratos ricos em elétrons. Devido a nenhuma das haloperoxidasas ter poder oxidativo para catalisar reações de fluoração, a existências de outras enzimas de halogenação foi proposta por Neidleman e Geigert em 1986. Somente no ano de 1995, uma outra halogenase, do tipo flavino-dependente, relacionada a biossíntese de tetraciclina foi identificada. Essas halogenases requerem a redução de flavina (FADH₂) e O₂, e com excepcional seletividade e regiosseletividade catalisam halogenações de substratos ricos em elétrons (DAIRI et al., 1995).

Em 2002, a primeira enzima de fluoração, 5'-fluoro-5'-desoxiadenosina sintase (5'-FDAS) foi descoberta e, subsequentemente, caracterizada estruturalmente. 5'-FDAS emprega um mecanismo de halogenação nucleófila e requer o substrato S-adenosil-L-metionina (SAM) (O'HAGAN et al., 2002). Até então, as classes de halogenases conhecidas não poderiam explicar todos os produtos naturais halogenados observados, como no caso do composto tri-clorado barbamida. Em 1999, foi demonstrado que este composto requer um mecanismo de halogenação radical. Em 2005, foi assim, comprovada a atividade das enzimas não-heme ferro-dependente e O₂-dependentes, as primeiras enzimas capazes de halogenar carbonos de centros não ativados (HARTUNG, 1999), (VAILLANCOURT et al., 2006).

As duas classes de halogenases O₂-dependentes, FADH₂-dependentes e não-heme ferro-dependente, são conhecidas como sendo responsáveis por uma grande variedade de reações de halogenação. As halogenases flavina-dependente, em particular, são bastante comuns. Existem ainda vários produtos naturais halogenados para o qual o mecanismo de halogenação não está totalmente esclarecido. Um exemplo é o grupo funcional brometo de alquilo do composto jamaicamida A, um produto natural, a partir de *Lyngbya majascula* (EDWARDS et al., 2004). Ambos os mecanismos de halogenação flavina-dependentes e não-heme ferro-dependente podem ser previsto para

a biossíntese deste grupo funcional, uma vez que o cluster gênico contém os dois tipos de enzimas. Um segundo exemplo é o composto fluorado nucleocidina, os quais os genes biossintéticos ainda são desconhecidos. Porém, resta saber se ainda novos métodos de halogenação ou halogenases serão descobertos. A recente caracterização de uma SAM-dependente que emprega um mecanismo nucleofílico indica que ainda há muito a ser descoberto sobre a halogenação enzimática (FUJIMORI et al., 2007); (GALONIC; VAILLANCOURT; WALSH, 2006).

1.2.1 Atividade relacionada à halogenação

A importância dos átomos halogênicos para a atividade biológica pôde ser observada em vários compostos naturais. Por exemplo, a eficácia terapêutica da salinosporamida A, que é um inibidor do proteassômico, e que está correntemente em testes clínicos para tratamento de mieloma requer a presença do substituinte clorado para a sua atividade e mecanismo de ação (GROLL; HUBER; POTTS, 2006) assim como para a atividade antimicrobiológica do composto rebeccamicina, cujo derivado descloro perde totalmente sua atividade (PEREIRA et al., 1996).

Substituintes halogênicos podem aumentar a lipofilicidade de um composto quando comparado com uma substituinte hidroxila, como evidenciado pelos valores mais positivos de log P (coeficientes de partição hidrofóbica octanol-água). Como exemplo, a atividade da toxina de plantas siringomicina E, a qual depende a inserção na membrana, é completamente abolida se o halogênio é substituído por um grupo hidroxila. A maior lipofilicidade do substituinte cloro pode promover a inserção na bicamada lipídica, enquanto que um grupo hidrofílico, na mesma posição, elimina a sua atividade (GRGURINA et al., 1994).

A eletronegatividade dos halogênios e a natureza covalente polar de uma ligação carbono-halogênio podem interferir nas propriedades de um composto. Flúor, em particular, pode ter um efeito fortemente indutivo em aminas vizinhas, diminuindo a sua basicidade e, portanto, aumentando a biodisponibilidade do composto. Há grandes variações nas propriedades dos diferentes halogênios e os seus respectivos efeitos sobre um determinado esqueleto orgânico (MULLER; FAEH; DIEDERICH, 2007).

Devido à importância que os halogênios têm sobre os compostos naturais, associada à dificuldade encontrada pelos métodos tradicionais de halogenação química, e também devido à falta de especificidade e regioseletividade, as halogenases

apresentam-se como enzimas extremamente promissoras na bioengenharia racional para produção de novos metabólitos utilizando biossíntese combinatorial ou síntese enzimática dentro da crescente área da biologia sintética. A introdução ou alteração de halogênios pode levar ao desenvolvimento de drogas mais eficazes, propriedades farmacocinéticas otimizadas ou mesmo novos mecanismos de ação (NEUMANN et al., 2008). A aplicação de engenharia metabólica utilizando halogenases já tem sido empregada com sucesso para a produção de derivados dos antitumorais indolocarbozoles, rebeccamicina e staurosporina (SANCHEZ et al., 2005). Mais recentemente, Heide e colaboradores, 2008 também obtiveram sucesso na produção de derivados clorobiocina utilizando a halogenase da biossíntese de hormaomicina (HEIDE et al., 2008).

1.2.2 Classes de Halogenases

Atualmente, segundo Vaillancourt e colaboradores, 2006, as halogenases podem ser divididas em:

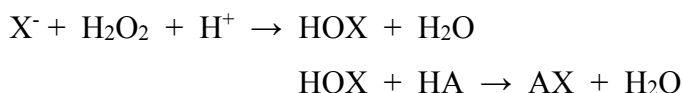
- Haloperoxidases: → heme-dependentes
→ vanádio-dependentes,
- Halogenases oxigênio-dependentes: → flavina-dependentes
→ não-heme ferro-dependentes,
- Halogenases nucleofílicas

1.2.2.1 Haloperoxidases: Heme-dependentes

As haloperoxidases heme-dependentes são encontradas em plantas, fungos, bactérias e animais. Shaw e colaboradores (1961) isolaram e caracterizam estruturalmente a primeira haloperoxidase do fungo *Caldorimyces fumago*, e observaram que ela catalisa a cloração de substratos orgânicos, na presença de íons cloreto e peróxido de hidrogênio, sendo nomeada como cloroperoxidase. No entanto, após esta descoberta, em estudos continuados, foi observado que esta haloperoxidase também utiliza os íons brometo e iodeto nas suas reações de halogenação. Mais tarde, foram detectados e isolados, de algas e algumas bactérias Gram-positivas, várias bromoperoxidases, isto é, enzimas que catalisam a bromação, mas não a cloração, de substratos orgânicos, na presença de peróxido de hidrogênio (BADEN; CORBETT, 1980; MANTHEY; HAGER, 1981; MARSHALL; WRIGHT, 1996; VAN PEE;

LINGENS, 1984). Estas bromoperoxidasas e cloroperoxidasas contêm ferro ligado a uma protoporfirina IX, ou um derivado, como grupo prostético (LITTLECHILD et al., 2002; VAN PEE, 1996).

O mecanismo geral das haloperoxidasas baseia-se na produção enzimática de ácido hipo-halogenoso (HOX), à custa de um peróxido, habitualmente o peróxido de hidrogênio:



Onde X^- pode ser o cloreto, brometo, iodeto ou o pseudo-halogeneto SCN^- (tiocianogênio) (NEIDLEMAN; GEIGERT, 1987). Assim, na presença de peróxido de hidrogênio, por um processo de transferência eletrônica, produz-se o ácido hipo-halogenoso (LIGTENBARG et al. 2003), intermediário bastante reativo, que pode reagir com um receptor nucleofílico (HA), quando presente, para produzir compostos orgânicos halogenados.

O mecanismo de halogenação da cloroperoxidase de *Caudariomyces fumago* e de outras haloperoxidasas heme-dependentes (Figura 3) inicia-se com o peróxido de hidrogênio que fica coordenado ao centro ativo, através da ligação ao ferro (uma protoporfirina IX férrica no centro ativo, Fe III heme) e a um resíduo aminoácido endógeno à proteína, localizado nas proximidades do centro ativo (VAN PEE; UNVERSUCHT, 2003). Este resíduo de aminoácido (que pode ser uma histidina, metionina ou ácido glutâmico) atua como um catalisador ácido-base que primeiro desprotona o peróxido de hidrogênio e subsequentemente protona o peróxido ionizado que se encontra ligado ao ferro hêmico. Após este passo, segue-se uma clivagem heterolítica da molécula de H_2O_2 , com a transferência de dois elétrons do grupo hêmico, originando a formação de uma molécula de água e de um intermediário típico dos peroxidases hêmicos, um complexo radical catiónico oxo-ferril-porfirínico (heme Fe IV=O). Este intermediário instável reage com o íon halogeneto (X^-) para formar um hipotético hipo-halogeneto férrico designado por composto X (heme Fe III-O-X). O composto X, também instável, decompõe-se de forma a dar origem à enzima na sua forma nativa e ao ácido hipo-halogenoso (HOX) (HOFRICHTER; ULLRICH, 2006; WAGENKNECHT; WOGGON, 1997).

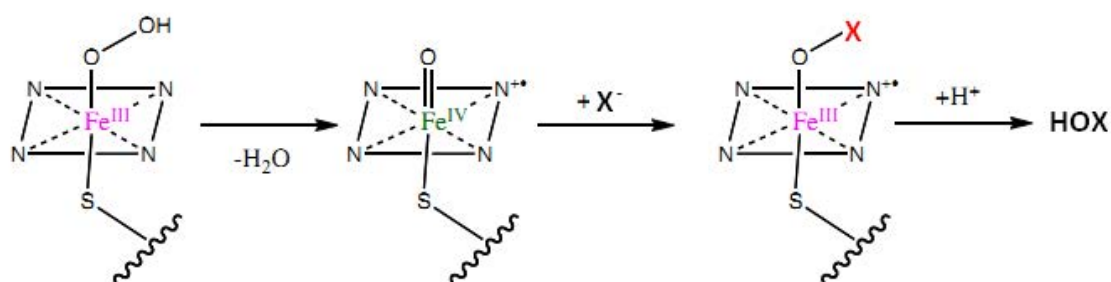


Figura 3. Mecanismo catalítico de haloperoxidases heme-dependente (Adaptado de (NEUMANN et al., 2008).

1.2.2.2 Haloperoxidases: Vanádio-dependentes

As haloperoxidases dependentes de vanádio são metaloenzimas que contêm como cofactor o vanádio mononuclear. Tal como as haloperoxidases hêmicas, estas enzimas catalisam a oxidação de halogenetos na presença de peróxido de hidrogênio. (ALMEIDA et al. 1998; SCHNEIDER et al. 2007).

Atualmente, seis estruturas tridimensionais de haloperoxidases de vanádio são conhecidas:

- Cloroperoxidase dos fungos *C. inaequalis* (MESSERSCHMIDT; WEVER, 1996) e *Emblellisia didymospora* (BARNETT et al., 1998);
- Bromoperoxidases das algas vermelhas *Corallina pilulifera* (OHSHIRO et al., 2002) e *Coralina officinalis* (ISUPOV et al., 2000);
- Bromoperoxidases das algas castanhas *Fucus distichus* (VREELAND et al. 1998) e *A. nodosum* (WEYAND et al., 1999).

Através de um estudo comparativo entre estruturas cristalográficas e de diversos estudos cinéticos, biofísicos, genéticos e mutacionais, foi possível elucidar o mecanismo de ação destas enzimas. (LITTLECHILD et al., 2002; MESSERSCHMIDT; PRADE; WEVER, 1997; MESSERSCHMIDT; WEVER, 1996; RENIRIE et al., 2000; ZAMPELLA et al., 2005).

O mecanismo proposto para a atuação catalítica das haloperoxidases vanádio-dependente é onde o primeiro substrato, o peróxido de hidrogênio se liga à enzima, formando o peroxicomplexo. Após a ligação do peróxido a enzima, ocorre liberação de

uma molécula de H₂O e posterior ligação e oxidação do segundo intermediário, um halogeneto (Figura 4).

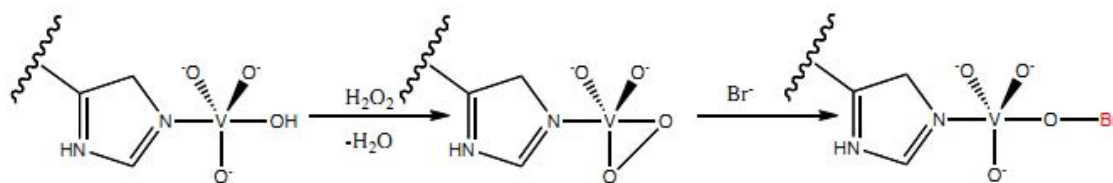


Figura 4. Mecanismo catalítico de haloperoxidases vanádio-dependente (Adaptado de (NEUMANN et al., 2008)).

Uma característica interessante destas enzimas é o fato do estado de oxidação do vanádio se manter inalterado durante todo o ciclo catalítico, ao contrário do que acontece com o ferro nas haloperoxidases heme-dependentes.

As haloperoxidases de vanádio apresentam uma estabilidade operacional notável, podendo reter a sua atividade catalítica durante cerca de um mês, quando armazenados em 60% de metanol, etanol e isopropanol. Mantêm-se ativas quando expostas a temperaturas até 70 °C e a atividade perdida pode ser recuperadas quando são reequilibradas a temperaturas mais baixas (ALMEIDA et al., 2001); NATÁLIO et al. 2005). As estruturas cristalográficas destas haloperoxidases vanádio-dependente revelaram que estas enzimas apresetam uma forma cilíndrica e compacta. Além disso, suas α -hélices são extremamente hidrofóbicas, o que contribui, por sua vez, para uma enorme estabilidade destas enzimas (MACEDO-RIBEIRO et al., 1999).

1.2.2.3 Halogenases oxigênio-dependentes: FADH₂-dependente

Na década de 90, estudos evidenciaram a existência de um novo tipo de enzima halogenante. Esta enzima foi descrita para a biossíntese do antibiótico pirrolnitrina (WIESNER; VAN PEE; LINGENS, 1988). Várias perhidrolases de *Pseudomonas*, produtoras de pirrolnitrina foram isoladas e elas foram consideradas como sendo as responsáveis pelas clorações durante a biossíntese deste antibiótico (ITOH; MORINAGA; NOMURA, 1992; WIESNER; VAN PEE; LINGENS, 1988). No entanto, Kiener et al. (1996) demonstrou que ao deletar o gene da perhidrolase de *Pseudomona fluorescens*, o produto, pirrolnitrina, era formado e não havia qualquer interferência na biossíntese do antibiótico. Comprovando, então, que esta enzima não estava envolvida na biossíntese. Estudos bioquímicos revelaram que dois dos quatro

genes contidos no cluster genômico responsável pela biossíntese da pirrolnitrina estão codificados para a produção de enzimas halogenantes, sugerindo haver novo mecanismo de halogenação uma vez que a hipótese de halogenação via perhidrolases foi descartada (HAMMER et al., 1999). Fazendo uso de um mutante que bloqueia o segundo passo da biossíntese da pirrolnitrina, foi possível demonstrar que o primeiro passo da biossíntese resultava na formação de 7-clorotriptofano e que no terceiro passo biossintético, há a formação de aminopirrolnitrina, a partir da cloração do monodescloroaminopirrolnitrina (Figura 5). Visto que, quando mutantes são bloqueados num dos dois passos de halogenação, não há produção de pirrolnitrina, verificou-se, desta forma, que as duas halogenases não substituem uma a outra, o que levou a concluir que possuem diferentes especificidades relativamente aos substratos que utilizam (KIRNER et al., 1998). Deste modo, foi estabelecido um método para determinar a atividade enzimática destas halogenases, usando os seus substratos naturais. No caso da halogenase que catalisa a cloração do triptofano (PrnA), o substrato foi encontrado com grande facilidade; mas a monodescloroaminopirrolnitrina, o substrato da segunda halogenase (PrnC), foi difícil de se encontrar (VAN PEE, 2001).

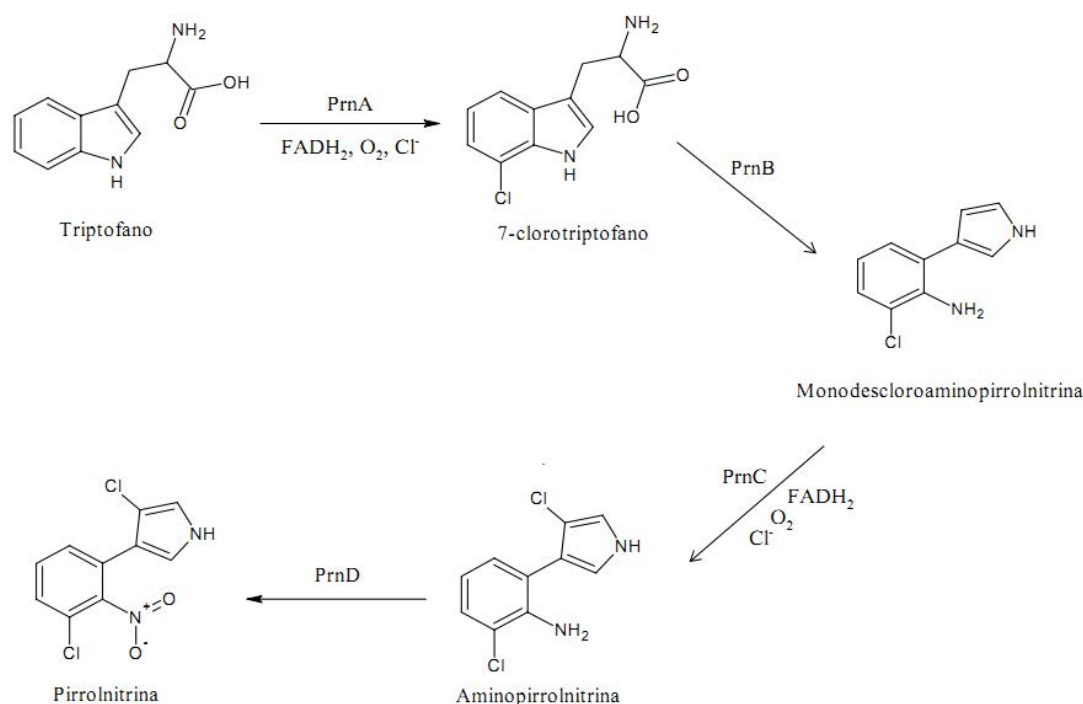


Figura 5. Biossíntese de pirrolnitrina. Demonstração da atividade enzimática de PrnA, B, C e D. (Adaptado de (KIRNER et al., 1996).

Foi observado que estas enzimas necessitam de um cofator para exercerem a sua função de halogenação. Kirner e colaboradores demonstraram em 1996, que a adição de

de NADH era indispensável para obtenção de produtos clorados. Mais tarde, na etapa de purificação, verificou-se que também era necessário acrescentar FAD em complemento a adição de NADH. Contudo, constatou-se que, a triptofano-7-halogenase (PrnA) não era capaz de catalisar a reação de cloração, mesmo estando na presença dos cofatores FAD e NADH. Desta forma, notou-se a necessidade de uma segunda enzima, para que houvesse a cloração, ou seja, uma flavina redutase (KIRNER et al., 1998), cuja função é a redução de FAD a FADH₂ na presença de NADH. As flavina-redutases presentes em *Pseudomonas* produtoras de pirrolnitrina podem ser substituídas pelas enzimas correspondentes em *E. coli*, demonstrando assim que, as halogenases não necessitam de uma flavina-redutase específica. Embora o FMN seja aceito pelas flavina-redutases, o FMNH₂ não é aceito pelas halogenases, ou seja, a substituição de FAD por FMN não resulta na produção de nenhum composto clorado, demonstrando deste modo a especificidade destas enzimas para o FADH₂ (VAN PEE, 2001), UNVERSUCHT et al. 2005).

A reação catalisada pelas halogenases requer FAD na sua forma reduzida (através da reação: $\text{FAD} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{FADH}_2 + \text{NAD}$), íon cloreto e oxigênio molecular como co-substratos. O FADH₂ gerado pela flavina-redutase liga-se a halogenase, reage com O₂, íon cloreto e o substrato, no centro ativo dando origem ao produto clorado (reação: $\text{FADH}_2 + \text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{L-Trp} + \text{H}^+ \rightarrow \text{FAD} + 7\text{-Cl-L-Trp} + 2\text{H}_2\text{O}$) (KELLER et al., 2000).

De modo semelhantes, as enzimas RebF, uma flavina-redutase, e RebH, uma flavina-halogenase, também demonstraram possuir a capacidade para catalisar a produção de 7-clorotriptofano durante a biossíntese do agente quimioterapêutico rebeccamicina (Figura 6) (VAILLANCOURT et al., 2006).

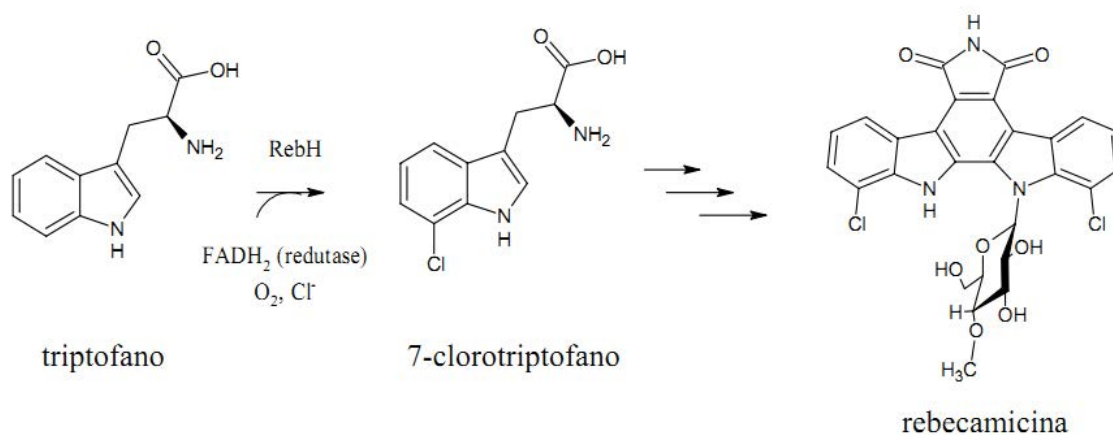


Figura 6. Enzima RebH sendo utilizada na formação do intermediário 7-cloratriptofano na biossíntese de rebecamicina (YEH et al., 2005).

A maioria das bactérias que produzem compostos halogenados apresenta halogenases do grupo das flavino-dependentes ou não heme ferro-dependentes (VAN PEE; PATALLO, 2006). Algumas enzimas pertencentes a esta família já apresentam sua estrutura cristalográfica resolvida, como para PrnA e a RebH, responsáveis pela adição de átomos de cloro nos compostos pirrolnitrina e rebeccamicina (DONG et al., 2005); (BITTO et al., 2008). Essas proteínas são diméricas e cada monômero apresenta uma região de ligação de flavina no N-terminal com homologia as monooxigenases e uma região de reconhecimento de substrato no C-terminal (BLASIAK; DRENNAN, 2009). (Figura 7).

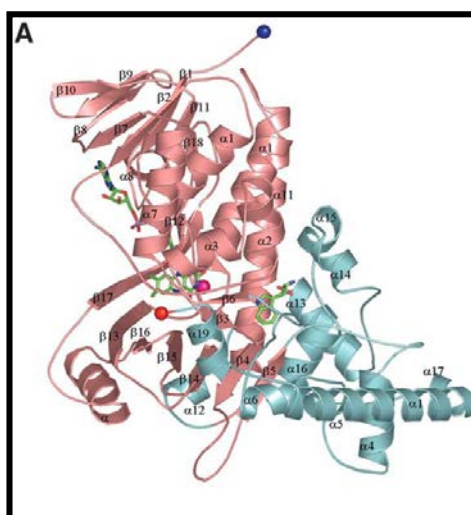


Figura 7. Estrutura de uma flavina dependente clorohalogenase (PrnA). A molécula de FAD e o 7-clorotriptofano (produto desta enzima) é mostrado em stick, à molécula de cloro é mostrado como uma esfera rosa. O domínio de reconhecimento da flavina está em salmão e o domínio de reconhecimento do substrato em azul (DONG et al., 2005).

1.2.2.4 Halogenase Oxigênio-Dependente: Não-Heme Ferro-Dependente

A atividade de uma halogenase dependente do ferro não-heme foi encontrada pela primeira vez por Vaillancourt em 2005. No sequenciamento de vários clusters de produtores de compostos naturais halogenados, não foram identificados halogenases FADH₂-dependentes e as moléculas halogenadas encontradas continham ligações C-Cl em carbonos alifáticos localizados em posições afastadas dos grupos ativadores. O ferro pode ser encontrado em centros catalíticos, como é o caso dos haloperoxidasas heme-dependentes ou heme-monooxigenases, exemplificados pelo citocromo P450; contudo enzimas não-heme ferro-dependentes que descarboxilam o co-substrato α -cetoglutarato são frequentemente encontrados em oxigenases microbianas. O segundo grupo das enzimas dependentes de O₂ são enzimas de não-heme ferro-dependentes de α -cetoglutarato. (CHANG; BUMPUS, 2001; VAILLANCOURT et al., 2006).

A primeira halogenase Fe²⁺ não-heme dependente a ter sua estrutura cristalina resolvida foi a SyrB2, obtida de *Pseudomonas syringae*. O Fe (II) está ligado a dois resíduos de histidina e a um terceiro resíduo portador de um grupo carboxilato, que pode ser aspartato ou glutamato. Esta estrutura é conservada em todas as oxigenases ferro não-hêmicos (FLASHMAN; SCHOFIELD, 2007).

No mecanismo catalítico (Figura 8), o ferro exclui a molécula de água, deixando uma posição de coordenação livre; possibilitando a ligação do oxigênio molecular, nesta posição livre, ao Fe^{II}; o que leva a desencadear a descarboxilação do α -cetoglutarato complexado, originando a formação do complexo Fe^{IV}=O. Esta espécie é a chave do mecanismo (KULIK et al., 2009). Este intermediário abstrai um átomo de hidrogênio do substrato criando um radical carbono-centrado que vai recuperar este radical com um halogênio ou invés de uma hidroxila. Desta maneira, ocorre preferencialmente uma halogenação a uma hidroxilação, e tal seletividade é alcançada devido ao posicionamento do cloro ao substrato mais próximo bem como o potencial redox inferior de um radical cloro em oposição a um radical hidróxido (BLASIAK et al., 2006).

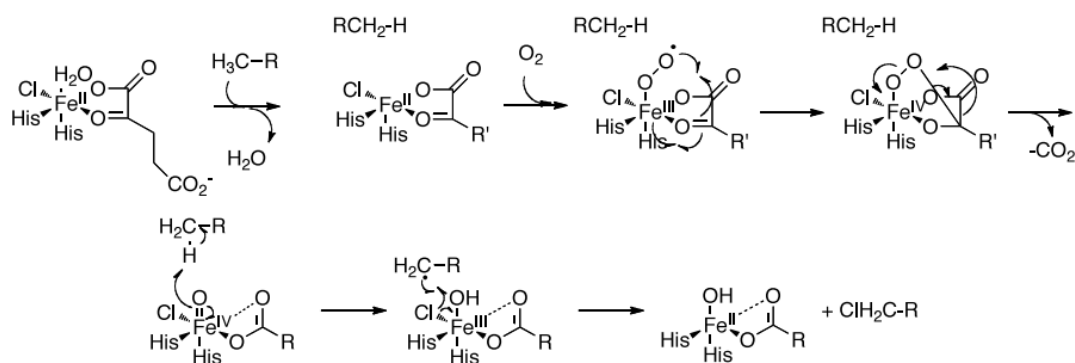


Figura 8. Mecanismo de ação de halogenase não-heme ferro-dependente (Adaptado de (VAILLANCOURT et al., 2006).

1.2.2.5 Halogenases Nucleofílicas

Todas as halogenases nucleofílicas conhecidas, utilizam S-adenosil-metionina (SAM) como substrato eletrofílico no qual os halogênios (F, Br, Cl, I) atuam como nucleófilo. Duas classes são conhecidas: metil-haleto-transferases e fluorinases e clorinase. A classe metil-haleto-transferase ou simplesmente metiltransferases, responsáveis por transferir o grupo metil do (SAM) para um íon cloreto, brometo ou iodeto (Figura 9). Esta classe encontra-se amplamente distribuída em plantas e microrganismos, e tem sido habitualmente utilizadas para fumigação do solo (cloreto de metila e brometo de metila, descobertos pela primeira vez por (WUOSMAA; HAGER, 1990). Alguns destas enzimas são bastante instáveis, tornando, deste modo, a sua purificação e caracterização bastante difíceis. Desde a sua descoberta inicial e a resolução de sua estrutura, a engenharia genética aplicada a estas enzimas tem sido empregada pela indústria, devido ao seu potencial biotecnológico. Em contraste, o segundo tipo de halogenase nucleofílica, uma fluorinase de *Streptomyces cattleya* e clorinase de *Salinispora* utilizam de fluoreto e cloreto, respectivamente, para atacar o carbono 5' do SAM, fornecendo 5'-desoxi-5'-haloadenosina (Figura 10). A enzima fluorinase também catalisa a reação inversa, ou seja, a quebra de ligação C-F. O cloreto também pode ser utilizado por esta fluorinase, dando origem ao 5'-cloro-5-deoxiadenosina, sendo este um raro exemplo de uma substituição nucleofílica biológica. Contudo o equilíbrio destas reacções tende para os substratos iniciais não-halogenados (VAILLANCOURT et al., 2006).

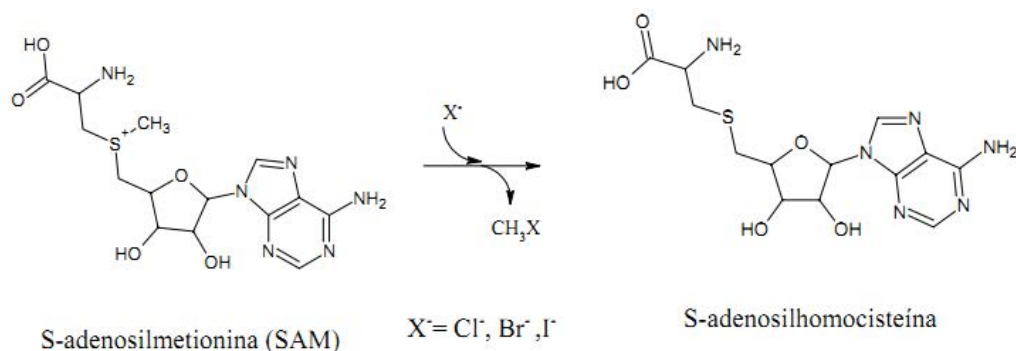


Figura 9. Reação de catálise de uma metiltransferases (MURPHY et al., 2003).

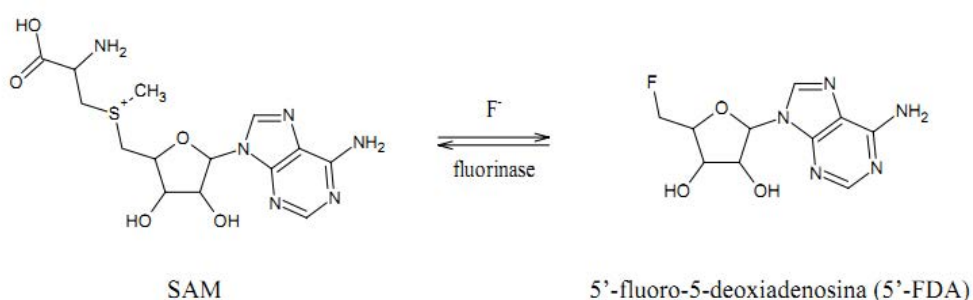


Figura 10. Reação de catálise por um fluorinase (DENG et al., 2006).

1.3 Antibióticos Glicopeptídicos

Entre os compostos halogenados, temos também os antibióticos glicopeptídicos (GPAs), os quais são essenciais para o controle de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas Gram-positivas, principalmente estafilococos resistentes a meticilina (MRSA). Três GPAs estão em uso clínico atualmente: os produtos naturais vancomicina e teicoplanina, e a droga semi-sintética telavancina (Vibativ) aprovado em 2009 pela Food and Drug Administration (FDA) (YIM et al., 2014). A vancomicina foi o primeiro glicopeptídeo a ser descoberto em 1953, obtida da cepa de *Amycolatopsis orientalis* encontradas em uma amostra de solo. Segundo a etimologia da palavra, vancomicina deriva de “Vanquish” que significa vencer, superar, conter, dominar. Ela foi introduzida no mercado cinco anos mais tarde, pela companhia farmacêutica Eli Lilly e desde então, tem sido um pilar para o tratamento de infecções

graves causadas por bactérias Gram-positivas (LEVINE, 2006). Inicialmente, vancomicina era usada de modo brando devido à eficácia de outros antibióticos, como os β -lactâmicos semi-sintéticos, e também por causa dos efeitos colaterais adversos devido a contaminantes presentes em preparações de vancomicina, uma vez que a obtenção da droga numa forma altamente purificada ainda era difícil de se obter. Com o passar dos anos, melhoras foram obtidas na etapa de purificação e houve um elevado aumento da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Assim no final dos anos 70 houve um aumento exponencial no uso e dependência de vancomicina. Na Europa, o antibiótico lipoglicopeptídeo (LGPA) teicoplanina A2 purificado de *Actinoplanes teichomyceticus* também foi introduzido para uso clínico em meados dos anos 1980. Teicoplanina mostrou atividade antibiótica comparável no espectro de vancomicina, mas com uma atividade superior para enterococos e outros organismos. E foi no final dos anos 80, que se registrou o aparecimento das primeiras cepas de enterococos resistentes à vancomicina, o que veio como uma surpresa para a comunidade clínica que cada vez mais utilizava GPAs para tratar doenças infecciosas (KIRST; THOMPSON; NICAS, 1998; WILLIAMS, A. H.; GRUNEBERG, 1984).

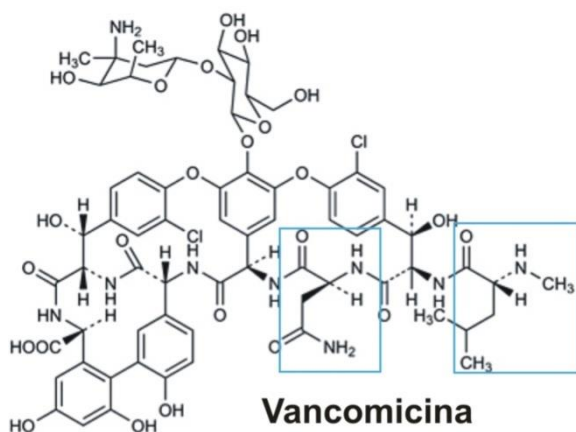
Os antibióticos glicopeptídicos interferem no metabolismo de construção da parede celular das bactérias. Para isso, ligam-se na porção terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo encontrado em precursores de peptidoglicano, interferindo na etapa de transglicosilação e subsequente transpeptidação, inibindo a formação da parede celular bacteriana (COURVALIN, 2006).

1.3.1 Classificações dos Antibióticos Glicopeptídicos

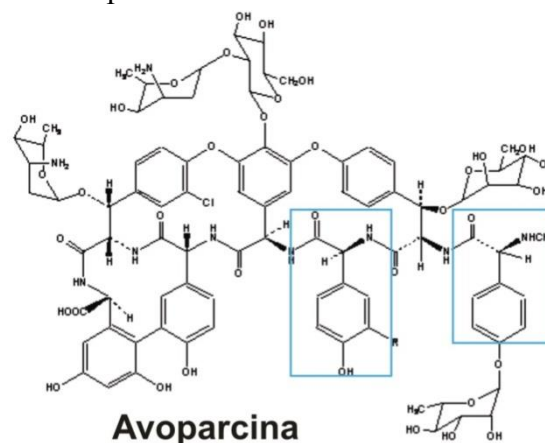
Quimicamente, os antibióticos glicopeptídeos são moléculas complexas constituídas de um núcleo heptapeptídico (aglicone) que é caracterizado pelos extensivos *cross linkings* das cadeias laterais aromáticas e decorado com diferentes glicosilações, acilações e halogenações (NAGARAJAN, 1993). Entretanto, com base em sua estrutura química, os antibióticos glicopeptídicos podem ser classificados em 4 diferentes grupos (LANCINI, 1989). Três grupos são distinguidos pela variação dos resíduos de aminoácido que formam o N-terminal do centro peptídico e um quarto grupo pode ser distinguido como um grupo a parte, devido à presença de um ácido graxo não comum aos outros grupos (NAGARAJAN, 1993). Os antibióticos do grupo I,

que incluem a vancomicina, apresentam dois aminoácidos alifáticos na posição 1 e 3 do peptídeo central; os do grupo II, representado pela avoparcina, apresentam dois resíduos aromáticos; os do grupo III, na qual a ristocetina é um membro, apesar de apresentarem dois resíduos aromáticos na posição 1 e 3 são diferentes do grupo II por apresentarem uma ligação do tipo éter juntando esses aminoácidos; o grupo IV ou teicoplaninas, pode ser considerado um subgrupo do grupo III, uma vez que a única diferença é a presença de um ácido graxo ligado a um aminoaçúcar (NAGARAJAN, 1993); STROHL, 1997). (NICOLAOU et al., 1999). Alguns autores mencionam ainda que os antibióticos glicopeptídeos podem apresentar um grupo V, que seria representado principalmente pela complestatina, por apresentar um triptofano ligado ao aminoácido central (Figura 11).

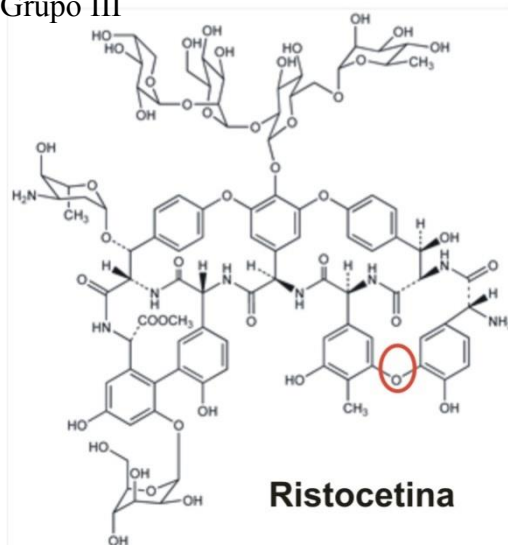
Grupo I



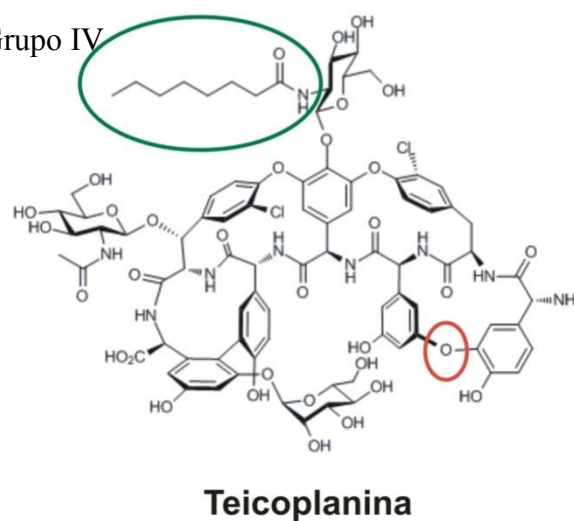
Grupo II



Grupo III



Grupo IV



Grupo V

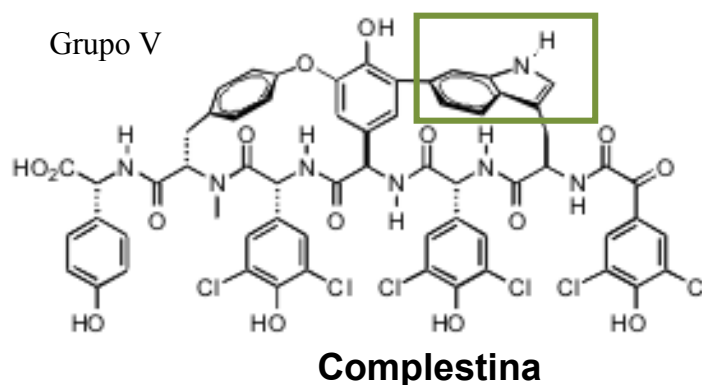


Figura 11. Os cinco diferentes grupos de antibióticos glicopeptídicos. Os retângulos em azul na vancomicina e avoparcina mostram as posições dos resíduos 1 e 3 que são diferentes entre o grupo I e II. Os círculos em vermelho mostram a ligação éter entre os resíduos 1 e 3, que são aromáticos na ristocetina (grupo III) e teicoplanina (grupo IV) e o círculo em verde mostra a presença da cadeia alifática na teicoplanina (grupo IV). O retângulo em verde na complestina mostra a presença de um triptofano ligado ao aminoácido central.

Os estudos realizados por Harris et al., 1985 mostram que compostos da vancomicina monoclorados ou declorados apresetam uma afinidade consideravelmente reduzida na ligação com o peptídeo D-Ala-D-Ala da parede celular microbiana e conseqüentemente uma perda de atividade de mais de 70% contra *S. aureus*.

Entretanto, sabe-se que as halogenases presentes nos clusters gênicos da biossíntese de antibióticos glicopeptídicos não contém a tríade formada por Asp-His-Ser que são freqüentemente encontradas nas não-heme halogenases sugestionando que ela pode ter um novo mecanismo para sua atividade enzimática. Além disso, a seqüência da ComH (relacionada com a biossíntese da complestatina) mostra que ela tem similaridade com epoxidases que faz sugestionar que talvez ela mimetiza o mecanismo desta enzima (CHIU et al., 2001).

1.3.2 Biossíntese dos glicopeptídeos

Muitos clusters gênicos de glicopeptídeos, quase uma dúzia, já foram sequenciados e caracterizados nos últimos 15 anos. Destes, mais da metade foram publicados em anos recentes, são eles: balhimicina (bal), cloroeremomicina (cep), vancomicina (vps), A40926 (dby), A47934 (sta), teicoplamina (tcp/tei) pekiscomicina (pek) e UK-68597 (auk) (YIM et al., 2014).

Uma visão abrangente sobre a biossíntese de glicopeptídeos é possível combinando o conhecimento sobre a biossíntese balhimicina, onde quase todas as etapas biossintéticas foram elucidadas, com o conhecimento das reações específicas analisadas em outros produtores (STEGMANN; FRASCH; WOHLLEBEN, 2010).

A biossíntese de antibióticos glicopeptídicos pode ser dividida em três etapas:

1. Fornecimento de blocos de construção básicos por específicas vias de biossíntese.
2. Ligação de blocos de construção: interligação das cadeias laterais aromáticas e halogenação, todas realizadas provavelmente por um complexo multi enzimático.
3. Modificação do heptapeptído por glicosiltransferases e metiltransferase e, no caso de glicopeptídeos tipo IV, adicionalmente, por aciltransferases e, eventualmente, por sulfotransferases.

Todos os genes necessários para a síntese de aminoácidos não-proteinogênicos (β -Hidroxitirosina [β -HT], (S)-3,5-dihidroxifenilglicina [Dpg] e L-p-hidroxifenilglicina [Hpg]) estão localizados no cluster. O precursor de β -HT é a tirosina, carregada no módulo da peptídeo sintetase, a qual é subsequentemente hidroxilada por uma monooxigenase (OxyD). Finalmente, uma perhidrolase catalisa a liberação de β -HT a partir do módulo de peptídeo sintetase. A atividade destas enzimas foi comprovada com a inativação da peptídeo sintetase e verificação da ausência de β -Ht e posterior suplementação em *A. balhimicina*, com retorno da produção de balhimicina (MULYANI et al., 2010; PUK et al., 2004).

Hpg é um derivado de hidroxifenilpiruvato. Na biossíntese de cloroeremomicina, produzida por *A. orientalis*, três enzimas (ácido p-hidroximandélico sintase, hidroximandelato oxidase e aminotransferase) são necessárias para esta conversão de hidroxifilpiruvato em Hpg (HUBBARD; THOMAS; WALSH, 2000). O aminoácido não-proteinogênico Dpg é sintetizado através de um mecanismo da poliketido-sintase (PKSIII). Quatro genes, que formam um operon (dpgABCD), são requeridos para fornecer Dpg. Quando o gene *dpgA* foi inativado, não foi possível observar a produção de balhimicina. Análises revelaram que DpgA utiliza apenas malonil-CoA como substrato para sintetizar ácido 3,5-di-hidroxifenilacético. O último passo na via de produção de Dpg é a transaminação, assim como na produção de Hpg (PFEIFER et al., 2001).

Posteriormente, os aminoácidos não-proteinogênicos (Hpg, Dpg e β -Ht) e os aminoácidos proteinogênicos (Tyr, Leu, Asn, Ala e Glu) são ligados por um conjunto específico de enzimas (NRPS) de modo a constituir uma sequência de peptídeos, chamado de heptapeptídeo. O heptapeptídeo de antibióticos glicopeptídeos é sintetizado pela Peptídeo Sintetase Não-Ribossomal (NRPS, do inglês *nonribosomal peptide synthetase*). O complexo enzimático NRPS é multimodular e as enzimas trabalham montando os aminoácidos como uma linha de produção. Cada unidade funcional, ou seja, cada módulo corresponderá a um aminoácido. A sequência primária de peptídeo é ditada pela ordem dos módulos da NRPS. Cada módulo NRPS pode codificar vários domínios. Isto inclui, mas não está limitado, os domínios de condensação (C), adenilação (A), de tiolação (T), também conhecida como proteína carreadora peptidil (PCP), epimerização (E) e tioesterase (TE). Domínios C, A e T são essenciais em cada módulo, ao passo que um único domínio, tioesterase, finaliza a síntese e cliva a cadeia peptídica a partir da montagem pela NRPS. Domínios de

adenilação são responsáveis pelo reconhecimento e ativação do substrato, e consequentemente a sua sequência é usada para prever o aminoácido codificado pelo módulo correspondente (MARAHIEL; ESSEN, 2009); (HAHN; STACHELHAUS, 2006). Todos os intermediários da linha de montagem das NRPS formam uma ligação tioéster com o braço 4-fosfopanteteína da PCP. O domínio de condensação catalisa a formação da ligação peptídica entre dois intermediários ligados a PCP adjacentes. O domínio epimerase converte a estereoquímica dos aminoácidos a partir de L- a uma mistura de D- e L- por desprotonação e reprotonação do α -carbono, quando está interligado ao domínio PCP. O domínio condensação é específico para um estereoisômero (MARAHIEL; ESSEN, 2009).

Enquanto o peptídeo está covalentemente ligado ao domínio PCP da NRPS, *crosslinks* oxidativos ocorrem. Três genes de oxigenase (chamados *oxyA / B / C* em *A. balhimycina*) são encontrados e as sequências são similares as P450 monooxigenases. Estudos têm demonstrado que a inativação das enzimas OxyA-C estão envolvidos nas três etapas de conversão do precursor em uma aglicona linear ciclizado de cadeia lateral, o primeiro intermediário biológico ativo. Os substratos das oxigenases são intermediários que estão vinculados as NRPS: OxyB catalisa o fechamento do anel diariléter. Em seguida, OxyA catalisa a segunda ciclização. OxyC finaliza o anel diariléter (GEIB et al., 2008; STEGMANN et al., 2006; ZERBE et al., 2004).

Os glicopeptídeos apresentam diferentes padrões de cloração. A halogenação foi estudada principalmente na biossíntese de balhimicina, que é clorada em ambos resíduos β -Ht. A inativação do gene de *bhaA* levou à produção de desclorobalhimicina indicando que a halogenase FADH₂-dependente era responsável pela cloração de ambos os β -Ht. A partir da ocorrência de intermediários clorados de balhimicina produzidos por mutantes de *A. balhimycina* concluiu-se que os substratos das halogenases são intermediários, os quais estão ligados a NRPS. Assim, as etapas centrais da biossíntese de glicopeptídeos são provavelmente catalisadas por um complexo multi-enzimático que consiste em NRPS, oxigenases e halogenase. Outros clusters da biossíntese de glicopeptídeos demonstraram apresentar uma ou duas halogenases o que corresponde para um estrutura com 1 a 4 cloros. Clusters com uma halogenase são comumente clorados em Bht6 e Tyr/Bht2, enquanto clusters com duas halogenases são observados halogênios em Hpg1, Dpg3 ou Hpg5 (composto A47349 e UK-68597) sugerindo que possa ser predito uma halogenação específica por cada halogenase (WOHLLEBEN; STEGMANN; SUSSMUTH, 2009); (STEGMANN et al., 2010).

O heptapeptídeo resultante dos *crosslinks*, em fase final, pode sofrer ação das enzimas glicosiltransferases, aciltransferases, sulfotransferases e metiltransferases. O cluster biossintético de balhimicina contém três genes que correspondem a glicosiltransferases *bgtfA/B/C*. Foi comprovado, através de análises mutacionais, que a glicosilação ocorre em uma ordem indefinida. As alterações provenientes das ações destes grupos de enzimas podem influenciar nas propriedades biológicas, solubilidade, dimerização, indução de resistência, etc. (WOHLLEBEN et al., 2009); (TRUMAN et al., 2009).

1.4 Biossíntese combinatorial aplicada a glicopeptídeos

A biossíntese combinatorial envolve a engenharia genética das vias biossintéticas naturais para a produção de novos compostos usando a maquinaria biossintética existente em cada organismo, especialmente para obtenção de antibióticos derivados policetídeos e peptídeos não ribossomais (WRIGHT; SUTHERLAND, 2007).

A complexidade estrutural dos produtos naturais, em muitos casos, faz com que seja difícil produzir análogos com atividades medicinais melhoradas. Em contraste, a biossíntese combinatorial explora a promiscuidade de substratos e emprega enzimas e vias modificadas para produzir novos produtos "não naturais", ampliando substancialmente a diversidade estrutural de produtos naturais com potencial de valor farmacêutico. Existem três vantagens da biossíntese combinatorial para a descoberta de medicamentos. Em primeiro lugar, ela ajuda a enriquecer a originalidade e a diversidade de produtos naturais, o que potencialmente melhora as suas características biológicas. Em segundo lugar, oferece uma forma ambientalmente amigável para produzir análogos de produtos naturais, enquanto a síntese química geralmente envolve múltiplos passos de reações de proteção/desproteção, condições adversas, solventes orgânicos tóxicos e resíduos de subprodutos. Em terceiro lugar, através da biossíntese combinatorial, a expressão heteróloga pode se tornar mais eficiente em alguns hospedeiros geneticamente maleáveis levando a um aumento de quantidade do composto, eventualmente resultando em drogas menos caras (SUN et al., 2015).

Em 1985 Hopwood clonou os genes biossintéticos do antibiótico actinorodina de *Streptomyces coelicolor* nos microrganismos produtores de medermicina e di-hidrogranaticina, respectivamente. O actinomiceto *Streptomyces* sp. AM-7161

modificado geneticamente produziu, além de medermicina, grandes quantidades de uma nova substância mederorrodina, a qual contém um grupo hidroxila adicional característico da actinorrodina. Já o *Streptomyces violaceoruber* Tü 22, modificado para produzir di-hidrogranaticina, produziu uma nova substância, di-hidrogranatirodina, preservando as configurações dos precursores nos estereocentros da nova molécula. Este trabalho representa a primeira utilização do conceito de biossíntese combinatorial de produtos naturais e abriu uma nova perspectiva para a diversificação estrutural de produtos naturais de interesse (HOPWOOD et al., 1985).

Outro exemplo mais recente de sucesso para a biossíntese combinatorial foi o trabalho elaborado por (BALTZ et al., 2006), cuja manipulação genética das vias biossintéticas de *Streptomyces roseosporus*, produtor da daptomicina, originou uma plataforma robusta com mais de 60 novos antibióticos lipopetídicos, os quais seriam dificilmente obtidos por síntese química.

Antibióticos glicopeptídicos oferecerem, em particular, uma excelente oportunidade para expansão química através da biossíntese combinatorial, pois as rotas biossintéticas são conhecidas e eles possuem esqueleto estrutural conservado, além de uma ampla diversidade enzimática necessária para síntese dos antibióticos as quais podem ser utilizadas para obtenção de novos derivados (THAKER; WRIGHT, 2015). Os clusters de glicopeptídeos sequenciados até o momento revelam a presença de uma ou duas halogenases. Das halogenações que ocorrem em glicopeptídeos, a cloração é a mais prevalente. Ela influencia na transmissão de estabilidade à molécula durante a fase de montagem e também na dimerização intramolecular de glicopeptídeos em solução.

O antibiótico A47934 (Figura 12), um glicopeptídeo produzido por *Streptomyces toyocaensis* possui modificações na estrutura do antibiótico que são decorrentes de duas halogenases e transferases ativas. Entretanto, essas halogenases identificadas no cluster gênico parecem adicionar três substituintes de cloro para os aminoácidos aromáticos do composto. Este antibiótico, que tem uma estrutura peptídica idêntica à teicoplanina, porém é sulfonado no N-terminal do resíduo de p-hidroxifenilglicina e não é glicosilado. O espectro biológico de A47934 é semelhante ao de outro glicopeptídeo e inclui atividade contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas Gram-positivas. Os dois genes previstos para produzir as halogenases em seu grupo de genes são nomeados *staI* e *staK*. A halogenase *StaI* é homóloga a ORF10 e BhaA de biossíntese de cloroeremomicina e balhimicina, respectivamente (PUK et al, 2002). Assim, acredita-se que a *StaI* deve ter

uma função similar na biossíntese A47934, que catalisa a adição de substituintes de cloro para as posições 2 e 6 do peptídeo intermediário. Experimentos genéticos indicam que β -hidroxitirosina não é um substrato para as halogenases livres e, portanto, a halogenação deve ocorrer na cadeia peptídica em crescimento, ou seja, sobre os intermediários peptídicos ligados à tioésteres com o domínio PCP da peptídeo sintase não-ribossomal (NRPS) (PUK et al., 2004). No entanto, a temporização dos passos de halogenação para a biossíntese de glicopeptídeos não têm até agora sido definidos. StaK também é inferida ser uma halogenase, embora a sua semelhança com outras halogenases do cluster gênico da biossíntese de glicopeptídeos é muito menor (63%) do que a StaI (88%). Assim, acredita-se que a StaK pode halogenar a posição 5 do heptaptídeo, que não é comum para os outros glicopeptídeos. No entanto, não existe qualquer evidência da especificidade das halogenases StaI e StaK, ou mesmo se as duas enzimas são necessárias para a halogenação do intermediário do A47934.

O emprego da técnica de biossíntese combinatorial pode gerar uma boa expectativa na descoberta de novos antibióticos, porém uma das limitações desse método é que o hospedeiro pode não expressar o fragmento de DNA incorporado, ou então, as vias metabólicas concorrentes podem desviar preciosos precursores. Outras dificuldades estão relacionadas à imprevisível especificidade do substrato, eficiência funcional das enzimas de produção, desconhecida especificidade do sistema de efluxo e o potencial de geração de compostos tóxicos incapazes de serem evitados (COATES; HU, 2007). Grandes esforços têm sido feitos no campo da descoberta de drogas, no entanto, a produção de novos compostos ainda é um grande desafio. A biossíntese combinatoria é, sem dúvida, uma importante ferramenta a ser explorada para obtenção de produtos naturais.

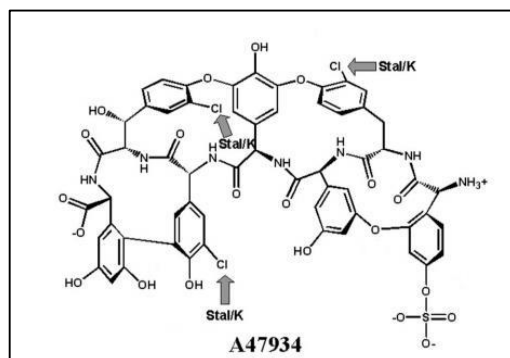


Figura 12. Estrutura do antibiótico A 47934. Setas indicam catálise pelas halogenases StaI e StaK. (Adaptado de POOTOOLAL et al., 2002).

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo iniciar estudos funcionais e estruturais sobre halogenases relacionadas com a produção de antibióticos.

Para isso, os objetivos específicos do trabalho foram:

- clonar, expressar e purificar 4 halogenases relacionadas com a biossíntese de antibióticos glicopeptídicos:

- ComH, halogenase relacionada com a biossíntese da complestatina em *Streptomyces lavendulae*;
- Orf8*, halogenase relacionada com a biossíntese de teicoplanina em *Actinoplanes teichomyceticus*;
- StaK e StaI, halogenases relacionadas com a biossíntese do composto A49734 em *Streptomyces toyocaensis*;

-obter informações espectroscópicas e sobre o estado de oligomerização das amostras destas enzimas;

-realizar testes de cristalização para obtenção de estruturas tridimensionais;

-realizar modelagem para obtenção de *insights* sobre suas especificidades;

-realizar estudos funcionais preliminares para validação da função das mesmas.

Através de uma Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE), obter treinamento em técnicas de biologia molecular e genética de *Streptomyces*, associados à biossíntese combinatorial, realizando ensaios de complementação para halogenases StaK e StaI a fim de investigar a atuação destas em diferentes microrganismos produtores de glicopeptídeos:

-*Amycolatopsis orientalis*, produtor de vancomicina

-*Actinoplanes teichomyceticus*, produtor de teicoplanina

-*Amycolatopsis* sp. MJM258, produtor de ristocetina

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenções de cepas, purificação de DNA genômico e clonagem de halogenases dos clusters gênicos de antibióticos glicopeptídicos (*StaI*, *StaK*, *Orf8** e *ComH*)

O organismo *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, foi adquirido da coleção ARS (NRRL). O organismo *Actinoplanes teichomyceticus*, organismo produtor da teicoplanina foi obtido pelo laboratório do Prof. Peter Leadlay – University of Cambridge –UK e um gene sintético para a *ComH* foi obtido junto a empresa GenScript (USA) clonada no plasmídeo pUC57.

S. toyocaensis foi crescido em 100 mL de meio líquido TSB (*tryptone soya broth*) durante aproximadamente 5 dias e posteriormente peletado e armazenados a -20°C para a extração do DNA genômico, que foi efetuado utilizando o kit de extração de DNA genômico da Promega de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®, empregando-se um volume total de 50 µl. Foram utilizadas as DNA polimerases *Hi-Fidelity* (Life Technologies), PFX50 (Invitrogen) e Herculase (Promega). As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo do fabricante, porém com a adição de 10% de DMSO.

Para a amplificação dos genes *staI* e *staK* da biossíntese do composto A47934 e do gene *orf8** da biossíntese de teicoplanina foram desenhados *primers* para a clonagem tanto em pET28a(+), bem como em pET20a(+) para a variação da posição da cauda de histidina. Os *primers* podem ser observados abaixo com os sítios em negrito sendo referentes aos sítios de clivagem para as enzimas de restrição.

*staI*_NdeIATCGATCG**CATAT**GGACGGCTTGAGCGGCGATCCGTTGC
*staI*_XhoI_p28ATCG**CTCGAGT**CATCCACGGTAGGGAAGCCACTTCATCCC
*staI*_XhoI_p20ATCG**CTCGAGT**CCACGGTAGGGAAGCCACTTCATCCC
*staK*_NdeIATCGATCG**CATAT**GTCGGCAGAGACGTTTCGACGTGGTTCG
*stak*_XhoI_p28ATCG**CTCGAGT**CATCGGGCGTCCTCTCGTTCCTTCGACGC
*staK*_xhoI_p20ATCG**CTCGAGT**CGGGCGTCCTCTCGTTCCTTCGACGC
*orf8*_ndeIATCGATCG**CATAT**GCCGGTGGAAGAGTTCGACGTGGTGG
*orf8*_xhoI_p28ATGC**CTCGAGT**CAGGCGGGACGGTAGGGCAGCC
*Orf8*_xhoI_20ATGC**CTCGAGG**GCGGGACGGTAGGGCAGCC

As condições de amplificação foram realizadas com uma desnaturação inicial de 92°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 72°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos mais uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Ao final dos ciclos, a reação foi resfriada e mantida a uma temperatura de 4°C.

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com 2µl de brometo de etídeo (10mg/mL) e tampão TBE (10,8g Tris, 5,5g ácido bórico e 4 ml EDTA 0,5M pH8.0), sendo posteriormente visualizado sob luz UV. Após a análise, e com o resultado desejado, foi realizada uma purificação do produto de PCR através do Kit DNA Purification System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Como para a ligação em pGEM-T é necessário a presença de poli-A no produto de PCR, nos casos em que a amplificação foi efetuada com enzimas com atividade *proofreading*, como a Herculase e Pfx50, foi realizada um passo extra, na qual o produto de PCR purificado foi incubado a 70°C na presença dATP e Taq polimerase para a adição de base A ao plasmídeo aberto pGEM-T. Para a ligação no vetor de clonagem foi preparada uma reação com volume final de 10 µl, constituído por 0,5 µl pGEM-T (Promega), 2 µl da reação anterior (produto de PCR purificado), 1 µl tampão 2x concentrado T4 DNA ligase, 1 µl da enzima T4 DNA Ligase, 1 µl ATP e 4,5 µl de água mili-Q. Essa reação foi incubada *overnight* a temperatura ambiente.

A transformação do vetor com inserto foi realizada com o uso de células competentes DH5α por choque térmico. Como controle, foi utilizado X-Gal (20 µl X-Gal 20 mg/mL, 20µl IPTG 100mM (20 µl em 100mL de solução) e 60 µl de água mili-Q) nas placas para seleção de colônias positivas.

Os fragmentos gênicos referentes à halogenases StaI, StaK, Orf8* e ComH foram digeridos e inseridos nos vetores pET28a(+) e pET20a(+). Colônias com a presença do plasmídeo foram obtidas, crescidas em meio líquido, os plasmídeos foram extraídos, digeridos pelas mesmas enzimas usadas na clonagem e também posteriormente submetidas ao sequenciamento, sendo possível confirmar a clonagem no vetor de expressão e também a integridade do gene.

Inicialmente, foi realizada a transformação e o crescimento de culturas de 10 mL para produção de plasmídeo. Este foi então, digerido com as enzimas NdeI e XhoI e o fragmento gênico referente ao gene *comH* foi clonado no pET28a(+), também previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. Colônias foram obtidas e

posteriormente crescidas em tubos de cultura com um volume de 10 mL, que foram extraídos também com o Kit isolamento de plasmídeo da Promega. Para a confirmação da clonagem, uma alíquota de plasmídeo foi digerida e após a confirmação do inserto, outra amostra foi submetida ao seqüenciamento, no qual foi possível confirmar a clonagem no vetor de expressão. Optou-se por adquirir um gene sintético para halogenase StaK, junto a empresa GenScript (USA) o qual também foi clonado em pET28a(+), nos mesmo parâmetros referente a clonagem da ComH.

3.2 Expressão e Purificação das halogenases StaI, StaK, Orf8* e ComH

Com a intenção de verificar a expressão das enzimas StaI, StaK e Orf8*, foram realizados testes iniciais de expressão em erlenmeyers de 100 mL com os plasmídeos inseridos por transformação por choque térmico em células BL21(DE3). Estes testes foram realizados, pois não há descrito na literatura qualquer experimento de expressão heteróloga para estas enzimas.

Para realização deste teste de expressão, pré-inóculos de 10 mL foram preparados em tubos de 15 mL com uma concentração final de 30 ug/mL de kanamicina. Estes 10mL foram adicionados aos erlenmeyers de 100 mL e mantidos a 37°C a 200 RPM e quando a OD 600nm atingiu valores de 0,6 a 0,8 foram adicionados 20 uL de IPTG a 1 M e a cultura foi mantida a 18°C a 200 RPM por 20 horas. Após esse tempo, o alíquotas de cultura foram analisadas diretamente em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 15% as células foram lisadas através de sonificador ultrassônico e também utilizando BugBuster®Master Mix (Millipore). As frações solúveis e insolúveis foram separadas. Ambos os géis foram corados com Comassie blue brilhante. Para todos os géis de SDS-PAGE feitos neste trabalho foram utilizados marcadores de peso molecular Bio-Rad.

Testes de expressão não foram realizados para a enzima ComH, tão pouco para StaK (obtido comercialmente) devido ao gene ser sintético e otimizado para expressão em *E. coli* na qual se esperava ter alta expressão.

Após finalização do teste, realizou-se uma expressão em larga escala com as melhores condições encontradas, na qual foram utilizados pré-inóculos de 250 mL de meio de cultura LB (Luria Bertani) e posteriormente utilizou-se 50 mL desse para

inocular frascos contendo um litro de meio LB, que foram mantidos a 37°C a 200 RPM. Quando a OD atingiu valores de 0,6 a 0,8 foram adicionados 1 mL de IPTG a 0.2 M e a indução foi mantida a 18°C a 200 RPM por 20 horas.

As culturas de células foram centrifugadas a 4000 rpm por 25 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 100 µl de PMSF, 100 µl lisozima a 10 mg/mL e 100 µl de DNase a 1 mg/mL, e o *pellet* foi ressuspensionado. Posteriormente foi adicionado o tampão A (50 mM Tris-HCl e 100 mM NaCl, pH 7,8) para todas as construções ou C (50mM CHES e 100 mM NaCl, pH 9,0) para Stal até chegar aproximadamente no volume final de 30 mL. Utilizou-se um sonicador ultrassônico (Branson) por 15 minutos com pulsos de 5 segundos e intervalos de 5 segundos numa frequência de 50% sob banho de gelo para lisar as células. Posteriormente os extratos celulares foram centrifugados a 9000 rpm por 30 minutos a 4 °C.

Um *Akta Purifier* (General Electric) foi utilizado para purificação das proteínas (FPLC- *Fast Protein Liquid Chromatography*). Tampão A e tampão B-(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl e 0,5 M de imidazol, pH 7,8) foram utilizados para purificação de todas as enzimas. Ou ainda no caso da Stal, foram alternativamente utilizados os tampões C e D (50mM CHES e 100 mM NaCl, 500mM de imidazol, pH 9,0). Posteriormente, com informações biofísica obtidas, o tampão para Stal foi alterado para 50 mM de Fosfato de Potássio e 10% de Glicerol, a fim de se obter uma redução na formação de agregados. As purificações foram realizadas em duas etapas, uma por afinidade e outra por exclusão molecular. Para a purificação por afinidade foi utilizada uma coluna HiTrap HP IMAC 5 ml carregada com níquel. Após a injeção da amostra da fração solúvel do lisado celular na coluna e sua lavagem com tampão A ou C (no caso da enzima Stal), foi realizado um gradiente linear com o tampão B ou D (no caso da Stal) de 5 a 100%. As frações correspondentes aos picos foram analisadas através de gel SDS - PAGE 15%. Como controles, também foram adicionados aos géis: *pellets*, sobrenadantes, *flow throughs* e lavagens. Uma vez confirmada a presença de proteína e com a massa correta nos picos da purificação por afinidade, realizou-se uma cromatografia por exclusão molecular (gel filtração) utilizando uma coluna HiLoad Superdex 200 (GE) para polimento final das amostras. A pureza das amostras também foi checada em SDS-PAGE e o picos correspondentes as proteínas foram concentrados e armazenados a -20 °C para realização dos experimentos de cristalização ou biofísicos.

3.3 Teste de Expressão das halogenases StaK e Orf8*

Foi realizado teste de expressão utilizando diferentes células competentes, sendo elas Rosetta™, Origami (DE3) e ArcticExpress (DE3). Para realização deste teste de expressão, pré-inóculos de 10 mL foram preparados em tubos de 15 mL com uma concentração final de 30 ug/mL de canamicina. Estes foram adicionados as erlenmeyers de 100 mL e mantidos a 37° a 200 RPM e quando a OD atingiu valores de 0,6 a 0,8 foram adicionados 20 uL de IPTG a 1 M e a indução foi mantido a 37° a 200 RPM por 4 horas e a 18° por 20 horas. Para célula ArcticExpress, devido ao protocolo de expressão, a indução foi realizada após três horas de incubação a 30°C e posteriormente mantida 13° por 24 horas. Após esse tempo, o extrato celular foi analisado diretamente em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 15% ou as células foram lisadas através de sonicador ultrassônico e as frações solúveis e insolúveis foram separadas. Ambos os géis foram corados com Comassie blue brilhante. Para todos os géis de SDS-PAGE feito neste trabalho foi utilizado marcadores de peso molecular Bio-Rad.

3.4 Western Blotting com anticorpo anti-His

As amostras foram fracionadas em SDS-PAGE, 5% e transferidas eletroforeticamente para uma membrana de PVDF. A membrana foi incubada em solução de bloqueio (PBS 1X 0,01M de NaHPO₄; 0,15M de NaCl, pH 7,2; 5% leite em pó desnatado; 0,1% Tween® 20), por 1 hora, sob agitação, à 4 °C. A membrana foi lavada com tampão TBS- T (0,1%) e a mesma solução, foi feita uma diluição de 1:2000 do anticorpo monoclonal anti-histidina (PentaHis HRP conjugate, Qiagen Kit). A membrana foi incubada na solução com anticorpo por 1 hora a temperatura ambiente e, posteriormente, lavada com solução tampão TBS-T (0,1%) por três vezes, 5 minutos de duração cada lavagem. A revelação foi realizada utilizando uma pastilha de uréia e DAB (Diaminobenzina) dissolvida em 15 mL de água desmineralizada.

3.5 Ensaios de Cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados através do método de difusão de vapor, usando gota sentada a 18°C com a proteínas nas concentrações de 10, 20 e 30

mg/mL, para ComH e StaI em tampão 50mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,8 e posteriormente a 10, 20 e 30mg/ml para StaI, em tampão 50mM CHES e 100 mM NaCl, pH 9,0. Foram utilizadas placas de 96 poços e as gotas foram preparadas pelo robô de cristalização Honeybee 963 (Genomic Solutions) e mantidas a 18 °C em um hotel de placas que coletavam fotos periodicamente.

No reservatório foram aplicados 80 µL de solução; na gota aplicou-se 0,4 µL de proteína e 0,4 µL de solução do reservatório. Os kits utilizados foram: Crystal Screen e Crystal Screen 2 (Hampton Research), Wizard Screens I e II (Emerald Biosystems), PACT (Nextal/QUAIGEN), JCSG (Nextal/QUAIGEN), SaltRx (Hampton Research) e Precipitant Synergy (Emerald Biosystems).

Ensaio de cristalização para proteína StaK também foram executados usando tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,8 e concentração 20 mg/mL, gotas de proteína foram distribuídas pelo robô de cristalização Orix4 (Douglas Instruments) em placas de 96 poços contendo soluções de cristalação JBScreen Family (Jena Bioscience).

3.6 Obtenção de dados biofísicos das halogenases ComH e StaI

3.6.1 Dicroísmo Circular- CD

As medidas de dicroísmo circular foram feitas em um espectropolarímetro JASCO-J810 (Tóquio, Japão), equipado com um controlador de temperatura (Peltier Type Control System PFD 4255, JASCO). Utilizando cubetas circulares de quartzo de 0,05cm de caminho óptico ou cubetas de quartzo retangulares com 1 cm de caminho óptico e as amostras da proteína ComH e StaI em até 10µmol L⁻¹ em tampão 50mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,8 (ComH) e 50mM CHES, 100 mM NaCl, pH 9,0 (StaI). A deconvolução dos dados foi realizada pelo servidor online Dichroweb (WHITMORE; WALLACE, 2004) utilizando o método ou algoritmo K2d.

3.6.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As análises por DLS foram feitas em cubetas de quartzo (ZS2112, QS 3,0 mm, Hellma) em equipamento DLS – Wyatt DynaPro- MS (Protein Solution, LNBio), com a amostra protéica da ComH e StaI em concentração de 1mg/mL em diferentes tampões. As amostras foram previamente centrifugadas por 30 minutos a 10.000RPM a 4°C, e foram realizadas 100 aquisições de 5 segundos a 18°C.

3.7 Proteólise Limitada com Tripsina

A proteólise limitada foi realizada utilizando a enzima tripsina na diluição 1 (tripsina):100 (StaI) (p/p). A reação constituiu-se de um volume de solução proteica correspondente a 200 µg e 1 µL da tripsina 0,2 µg/µL para que a proporção 1:100 fosse respeitada. Os tubos contendo as reações foram incubados à temperatura ambiente. A cada 0, 2, 5, 10, 20 e 40 minutos e a cada 1:20, 3, e 24 horas foi retirado um tubo e a reação interrompida pela adição de 1 µL de PMSF.

3.8 Modelagem Molecular por Homologia

A modelagem molecular por homologia para StaI e StaK foram realizadas utilizando o programa MODELLER (SALI; BLUNDELL, 1993). A seleção das estruturas (templates) para serem utilizadas como moldes para gerar modelos por homologia às proteínas StaI e StaK se deu por uma busca utilizando a ferramenta *on-line* BlastP, empregando as sequências da StaI e StaK contra o *Protein Data Bank* (PDB). Baseado nesta busca, a estrutura proteica selecionada foi a CndH, uma halogenase relacionada com a biossíntese de condrocloreto em *Mixobactéria* (BUEDENBENDER et al., 2009), como código do PDB 3E1T. Para confirmar esta identidade, um segundo alinhamento foi realizado utilizando o programa de alinhamento *on-line* MultiAlin (CORPET, 1988) bem como o alinhamento múltiplo de sequências. Foram gerados 10 modelos para StaI e StaK que foram validados utilizando o programa Procheck (LASKOWSKI; MOSS; THORNTON, 1993). O modelo que apresentou as melhores estatísticas de qualidade estereoquímica foram

utilizados para análise. A inspeção visual dos modelos foi realizada utilizando o programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004) e PyMol (DELANO, 2002).

3.9 Ensaios de complementação realizados no laboratório do Dr. Andrew Truman no centro de pesquisa John Innes Centre- Norwich, UK.

3.9.1 Cepas produtoras des antibióticos

As cepas *Amycolatopsis orientalis*, *Actinoplanes teichomyceticus* e *Amycolatopsis* sp. MJM2582 foram obtidas a partir de NRRL ou através da coleção do John Innes Centre, UK e foram mantidas sob suspensão contendo 20-50% de glicerol em freezer -80°C. Para produção de vancomicina, *Amycolatopsis orientalis* foi primeiramente cultivado em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo uma mola espiral com 25 mL de meio contendo 1,5% de glucose, 2% extrato de batata, 1% de extrato de levedura, 0,2% de CaCO₃, 1% de licor de milho, pH 6,5, durante 2 dias em shaker a 200 rpm. Desta cultura foram utilizados 500 µL para inocular 50 mL de meio de produção (20% de glucose, 5% de peptona, 0,75% de MgSO₄, 1% de NaCl, 0,5% de KCl, 10% solução de metais). Esta cultura foi mantida em Erlenmeyer de 250 mL contendo mola para favorecer a aeração, o qual foi incubado a 30 °C em shaker (200 rpm) durante 6 dias. O mesmo padrão de produção foi mantido para outras cepas produtoras de teicoplanina e ristocetina, com exceção dos meios de cultivos o quais foram adequados para as necessidades de geração dos produtos. Para a produção de teicoplanina, por *Actinoplanes teichomyceticus*, os meios de cultivo utilizados continham (g / L) 10g de glucose, 4g de extrato de levedura, 4 g de peptona, 4g de K₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 0,5g de MgSO₄, pH 7,2 e um outro meio de cultivo denominado E25 Médio (Método Taurino) com 25g de glucose, 4g extrato de carne, 1g proteína de soja, 4g de peptona, 2,5g de NaCl e 5 g CaCO₃. Os meios de produção composto por 20g manose, 5 g de extrato de levedura, 1,5 asparagina, 0,5 MgSO₄, 0,1g de NaCl, 0,1g de CaCl₂ e meio TM1 (Método Taurino) (30g extrato de malte, 10g de glucose, 15g proteína de soja, 5g de extrato de levedura, 4g de CaCO₃. O meio de cultivo adequado para a cultivo da cepa *Amycolatopsis* sp. MJM2582 foi o meio GYM (Glucose Yeast Malte) utilizando 4g Glucose, 4g de extrato de levedura, 10g de extrato de malte, 2 g de CaCO₃. Para

produção do antibiótico ristocetina, o meio utilizado denomina-se SAM (1,5% de glicose, 1,5% de Soytone, 0,5% de NaCl, 0,1% de CaCO₃, 0,25% de glicerol, pH 6,8).

3.9.2 Complementação com genes *staI* e *staK* de *S. toyocaensis*

Complementação foi realizada utilizando o vetor pIJ10257, plasmídeo integrativo utilizado para a expressão de genes que possui promotor constitutivo *PerME**. Para conjugação, foram utilizadas *E.coli* contendo o plasmídeo pUZ8002. *Amycolatopsis orientalis*, *Actinoplanes teichomyceticus* e *Amycolatopsis* sp. MJM2582 exconjugantes foram selecionados através da adição de 0,5 mg de ácido nalidíxico e 1 mg de apramicina em 1 mL de água para cada placa de agar. Complementação ocorre de forma estável nos genomas de *Streptomyces* e apenas um único evento cross-over é necessário (gerando cepa Apr^R) para integração do plasmídeo.

3.9.3 Aquisição de dados LC-ESI-MS

Os espectros foram obtidos utilizando um sistema Thermo Fisher Scientific Surveyor HPLC acoplado a um espectrmetro de massa Thermo Scientific™ LCQFleet™ ion trap equipado com uma fonte de ionização ESI modo positivo. As amostras foram injetadas numa coluna Phenomenex Kinetex XB-C18 (2,1 mm x 50 mm) com uma vazão de 0,35 ml min⁻¹, com detecção UV a 280 nm. A eluição foi realizada com um gradiente linear de 5% CH₃CN em água + 0,1% de ácido fórmico a 95% de CH₃CN ao longo de 10 minutos.

4 Resultados e Discussão

Os genes (*staI*, *staK* e *Orf8**) referentes as três halogenases foram amplificados com sucesso, utilizando uma temperatura de *melting* a 72 °C e adicionando 10% de DMSO. Foi obtido maior sucesso na amplificação com a utilização da enzima *Taq polimerase de alta fidelidade* (HI-FI) (Life Technologies). Além disso, esta enzima

apresenta a vantagem de adicionar a cauda poli-A necessária para a subclonagem no sistema pGEM-T (Promega) (Figura 13).

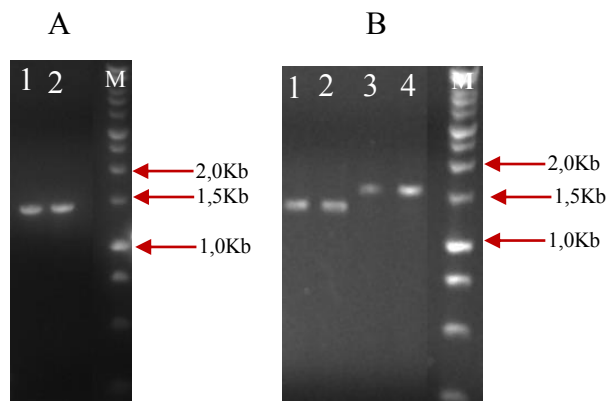


Figura 13. PCR para amplificação dos genes correspondentes a A) *orf8** (1, 2), B) *staK* (1 e 2) e *staI* (3, 4). M, marcador de peso molecular BioRad 1Kb (300 – 10.000bp).

Após a clonagem neste sistema e a seleção de colônias brancas, essas foram crescidas para extração do plasmídeo que foi digerido com as enzimas de restrição específicas mostradas no nome dos *primers* descritos nos Materiais e Métodos (item 3.1) com os sítios de restrição em **negrito** (as enzimas utilizadas foram *NdeI* e *XhoI*). O gene digerido a partir do pGEM-T foi inserido com sucesso nos vetores de expressão pET28a(+) e pET20a(+). Para confirmação da inserção do gene de interesse, colônias foram triadas através do método de PCR de colônia na qual todas as colônias escolhidas foram positivas para o inserto (Figura 14), e posteriormente a integridade do gene foi checada através de seqüenciamento.

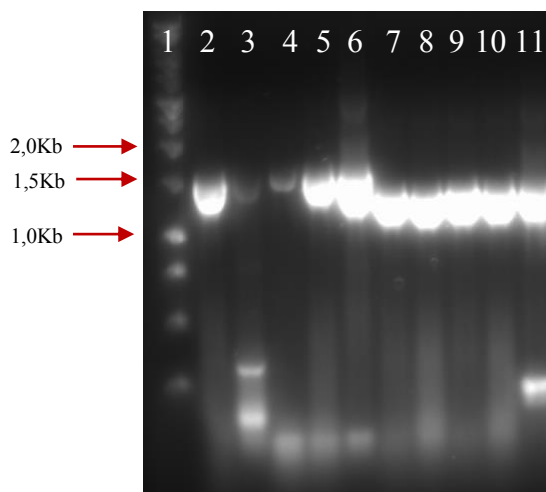


Figura 14. PCR para confirmação da clonagem dos genes *orf8**, *staI*, e *staK*. 1, marcador de peso molecular BioRad 1Kb (300 – 10.000bp)., 2, *orf8** clonada em pET28a(+), 3, controle para *orf8**, 4, *staI* clonada em pET28a(+), 5, *staI* clonada em pET20a, 6, *staI* controle, 7, *staK* clonada em pET20a(+), 8, *staK* clonada em pET20a, 9, *staK* clonada em pET28a(+), 10, *staK* clonada em pET28a(+), 11, *staK* controle.

4.1 Expressão inicial das halogenases StaI, StaK e Orf8 em pET28a

Um teste de expressão foi realizado para StaI, StaK e Orf8* e após as células serem lisadas, foi possível observar em gel de poliacrilamida 15% (Figura 15) as frações solúveis e insolúveis.

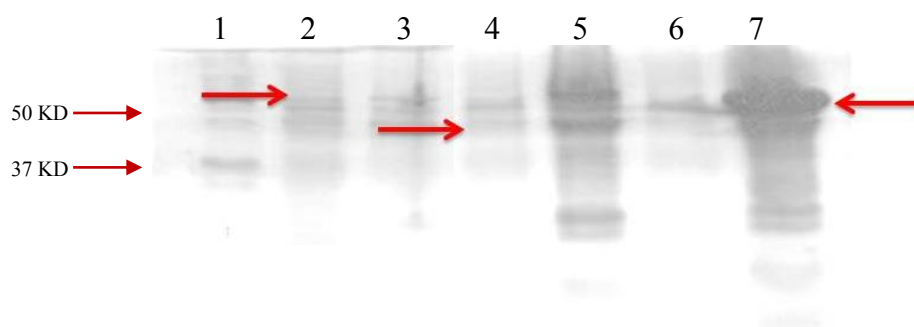


Figura 15. Expressão das enzimas halogenases 1, marcador de peso molecular de 250 kD (10 – 250KD) (Bio-Rad), 2, Orf8* lisado, 3, Orf8* pellet, 4, StaK lisado, 5, StaK, pellet, 6, StaI lisado, 7, StaI, pellet

Apesar da baixa expressão e de não termos preparado controles na ausência de indução, podemos inferir que houve expressão da enzima StaI (colunas 6-7 da figura 15), baseado pelo peso molecular das bandas, e pelo diferente perfil comparado com as outras construções. Entretanto a enzima StaI apresentou uma larga expressão na fração insolúvel, porém pode se observar que houve alguma expressão na fração solúvel. Com relação à enzima Orf8* e StaK, apesar de apresentar uma banda corresponde ao seu peso molecular (Orf8* 54KD e StaK 46 KD), não houve uma expressão significativa, e facilmente pôde ser confundida com outras proteínas, mostrando resultados inconclusivos.

4.2 Expressão e Purificação das proteínas ComH, StaI e StaK e visualização em *Western Blotting*.

Com intuito de obter uma concentração satisfatória das halogenases ComH, StaI e StaK, foram realizadas expressões em grande escala (8L de meio LB) e tentativas de purificação por afinidade (FPLC) utilizando a coluna His-Trap IMAC 5ml carregada com níquel e posterior exclusão molecular.

Através dos cromatogramas foi possível observar os picos, referentes às proteínas que foram eluídas a uma baixa concentração de imidazol (25 mM--155 mM). Para a enzima ComH a eluição começou com 5% de tampão B, ou seja 25 mM de imidazol (Figura 16). As frações solúveis, insolúveis e os respectivos picos foram analisados em gel de SDS-PAGE 15% onde foi possível observar a pureza e expressão da enzima ComH com sucesso (Figura 17).

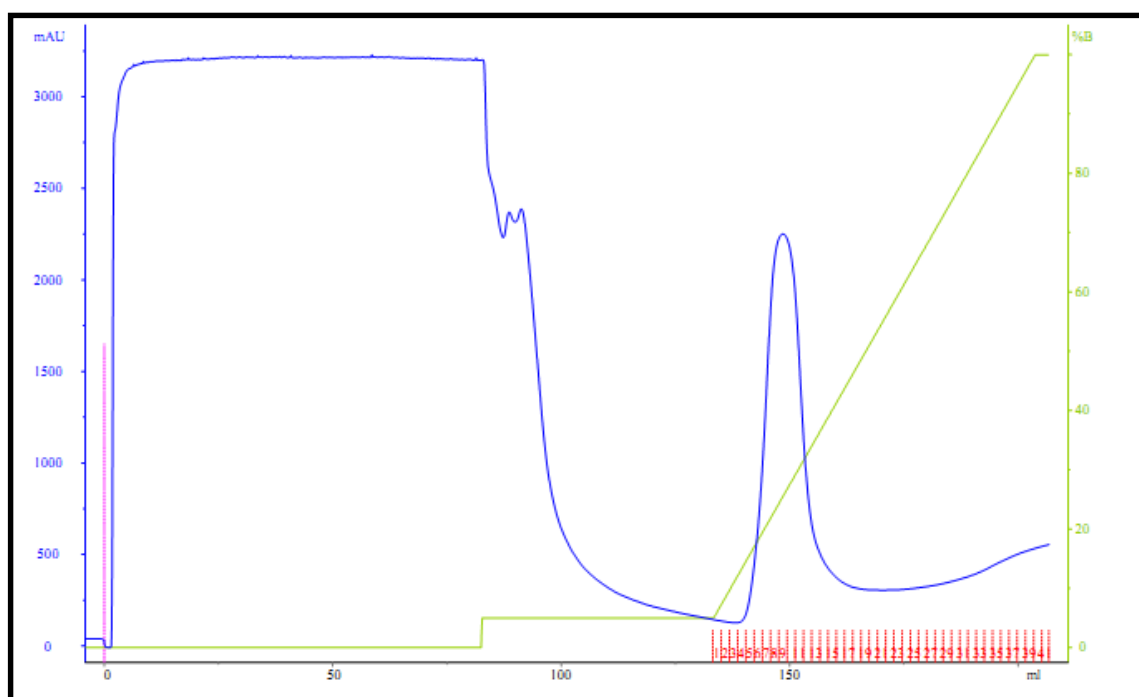


Figura 16. Cromatograma obtido para a enzima ComH. Em vermelho as frações coletadas. Foram utilizadas como amostras para a análise em SDS-Page 15% as frações 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15; em verde a concentração do tampão B; em azul a absorbância a 280 nm.

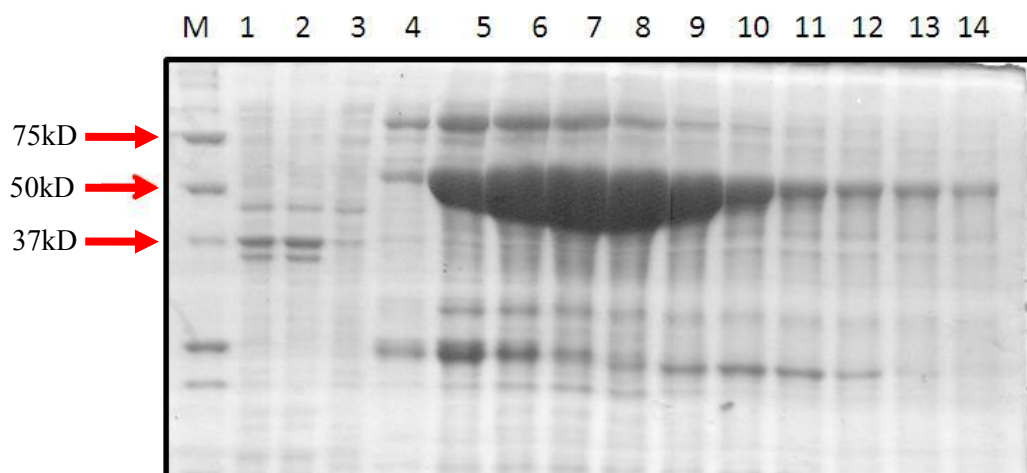


Figura 17. Gel SDS-Page 15% contendo amostras da ComH(1-7) M- marcador de 250 kD (10 -250kD) (Bio-Rad), 1- Sobrenadante, 2- pellet, 3- *flow through*, 4 a 14- amostras da ComH referente às frações 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 respectivamente; Seta indica expressão da halogenase com tamanho aproximado de 50Kd.

Pela análise do gel SDS-PAGE da purificação por afinidade é possível observar uma banda por volta de 50kD que é referente a enzima ComH (Figura 17). Entretanto, no cromatograma obtido da exclusão molecular (Figura 18) foram observados quatro picos de absorbância, sendo que o terceiro pico apresenta a absorbância mais alta (por volta de 1200 mAU). A análise em SDS-PAGE 15% (Figura 19) indica que a ComH estava predominantemente no pico 1 e 3. Além disso, pôde-se observar uma alta pureza da amostra de proteína obtida após o passo de purificação por exclusão molecular. Entretanto, o primeiro pico indica que uma parcela da enzima pode estar agregada. Isso pode ter ocorrido devido à alta concentração de enzima que foi injetada no sistema de purificação, a degradação da molécula de FAD que é co-purificada com a enzima ou uma própria tendência natural da enzima. Assim, foi realizada uma série de experimentos na tentativa de melhorar a qualidade da enzima e em purificações futuras, alguns agentes, como detergentes, glicerol ou agentes redutores foram utilizados a fim de se contornar tal comportamento. Todavia, como grande parte da enzima ainda não estava agregada, isso permitiu a continuação da próxima etapa do estudo, que seria a tentativa de cristalização da mesma.

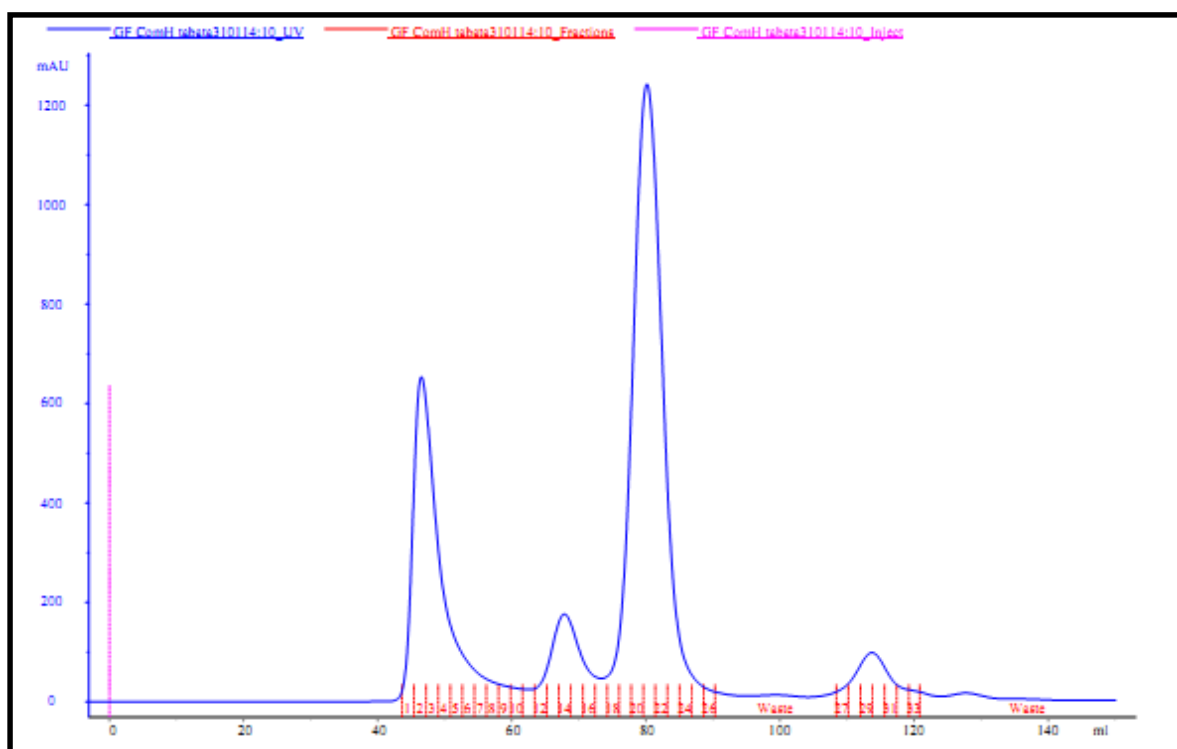


Figura 18. Cromatograma obtido da purificação por exclusão molecular da enzima ComH.

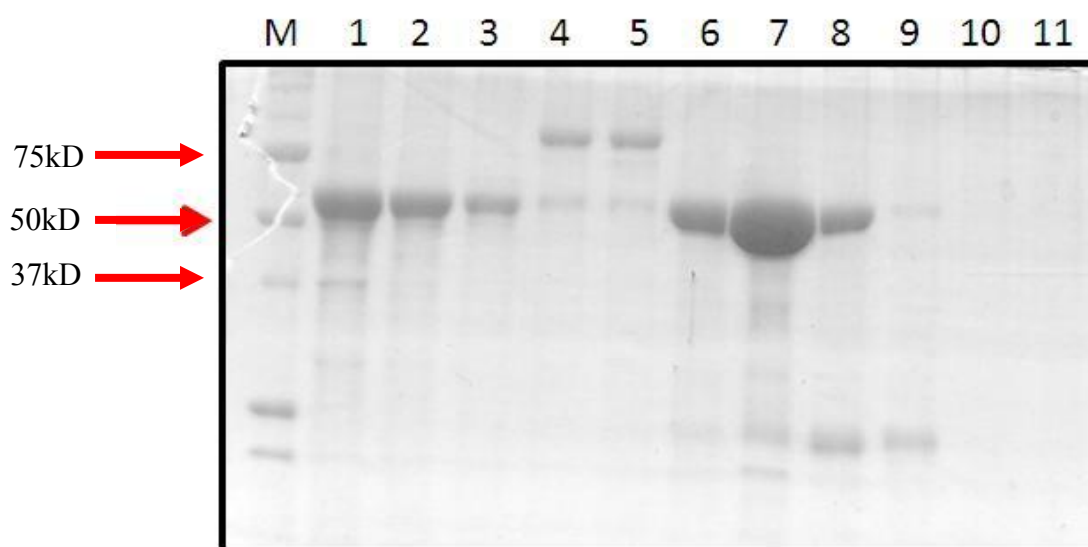


Figura 19. Gel SDS-Page 15% contendo amostras das frações da purificação por exclusão molecular da enzima ComH referente às frações dos picos na figura 7. M-marcador de peso molecular 250kD (10-250kD) (Bio-Rad), 1 a 11 frações 2, 4, 6, 13, 15, 19, 21, 23, 25, 28, 30, 32.

Durante a purificação da enzima Stal (56 KD), foi possível observar que o perfil cromatográfico da purificação por gradiente de imidazol apresenta um pico que elui por

volta de 60mM de imidazol (Figura 20), que pôde posteriormente ser confirmado ser a StaI por SDS-PAGE 15% como mostrado na Figura 21.

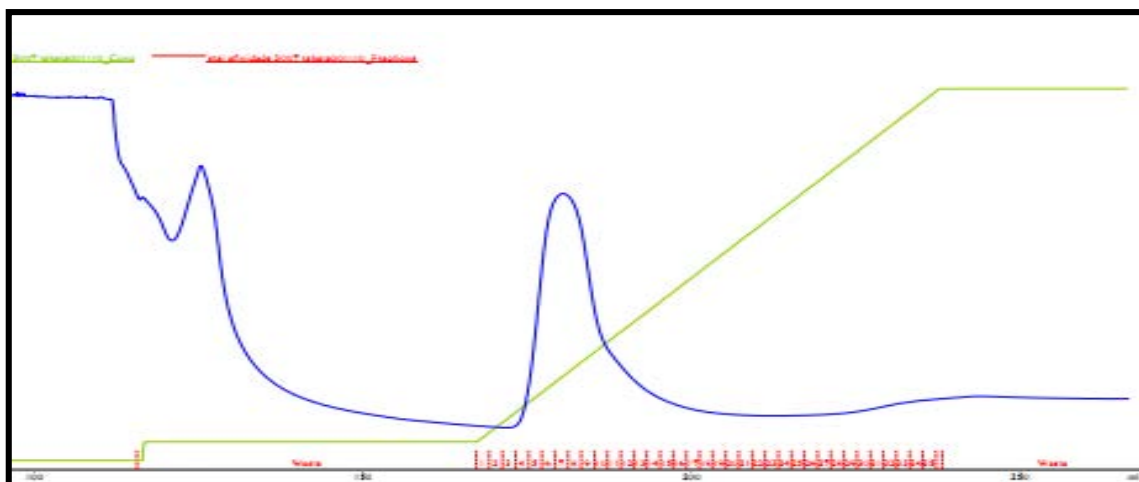


Figura 20. Cromatograma da proteína StaI. Em azul a absorvância a 280nm; em vermelho as frações coletadas pelo sistema de purificação de proteínas; em verde concentração de tampão B (com imidazol).

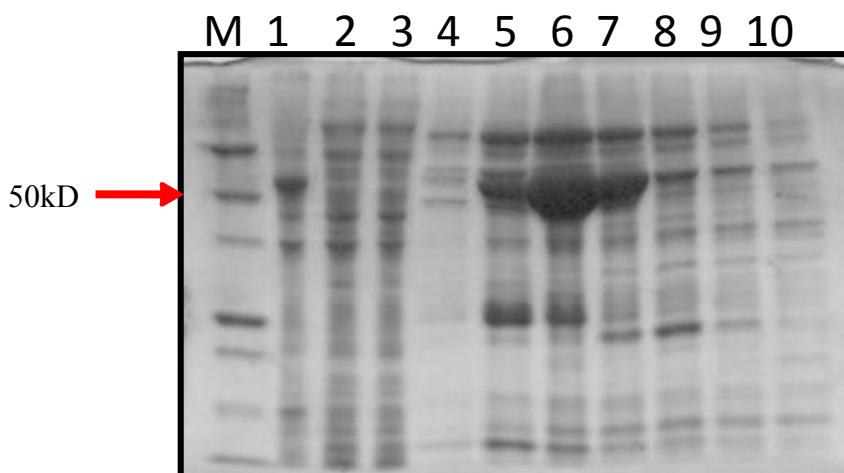


Figura 21. Gel SDS-Page 15% contendo amostras da StaI (4-10) M- marcador de 1 kD (Bio-Rad), 1- lisado e 8- pellet, 2 –pellet , 3- *flow through*, 4 e 10- amostras da StaI referente às frações 3, 5, 7, 9, 11, 13.

As frações referentes ao pico observado no cromatograma da Figura 20 foram concentradas e aplicadas em uma coluna de filtração em gel (16/200). Pela análise do cromatograma (Figura 22) foram observados três picos principais. Para confirmar a pureza da amostra e verificar se os três picos são referentes a StaI, um gel SDS-PAGE 15% com as frações referentes a estes picos foi preparado (Figura 23). Pela análise deste

gel, pôde-se confirmar que o primeiro e o terceiro picos são referentes à Stal e o segundo deve ser alguma proteína que se liga inespecificamente a coluna. A análise do cromatograma também indica que uma parcela da enzima pode estar agregada, o que pode ter ocorrido devido à alta concentração da enzima injetada durante o processo de purificação ou ainda a natureza intrínseca da proteína, uma vez que o primeiro pico eluiu no tempo de retenção da coluna e, portanto deve ser referente a uma partícula muito grande.

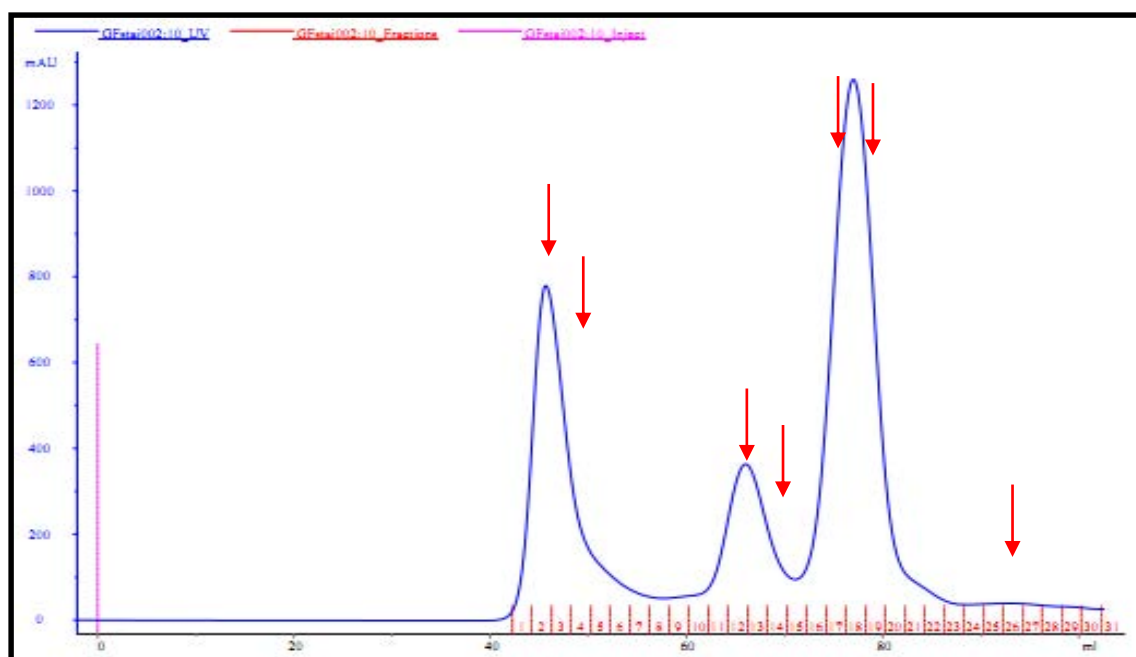


Figura 22. Cromatograma obtido da purificação por exclusão molecular da Stal. As setas indicam quais frações foram utilizadas como amostras no gel SDS-Page 15% (Figura 23)

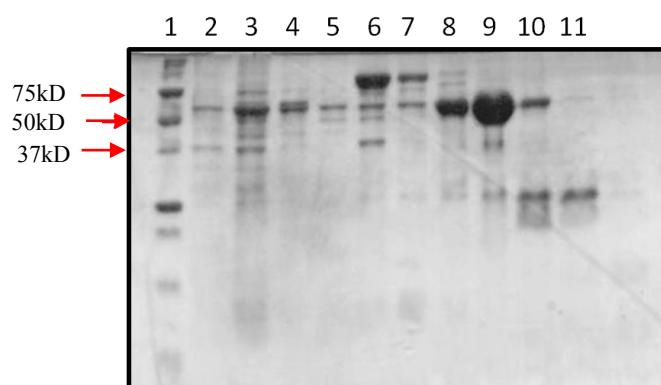


Figura 23. Visualização do gel SDS-PAGE 15% representando resultados da cromatografia por exclusão molecular da Stal, 1 marcador molecular 250kD (10-250kD) (Bio-Rad), 2, 3, e 4 o lisado, pellet e *flow through* respectivamente, 5-11 as frações 2, 4, 12, 14, 17, 19, 25 obtidas pelo cromatograma da exclusão molecular.

Entretanto, além da ComH e StaI, uma tentativa de expressão em larga escala foi realizada para a StaK, uma vez que o teste de expressão mostrou resultados inconclusivos sobre a possibilidade de proteína na fração solúvel. Dessa forma após a tentativa de expressão, realizamos os processos de purificação por afinidade em uma coluna IMAC carregada com níquel, na qual foram observados 2 picos durante o gradiente de imizadol (Figura 24), demonstrando que poderia haver uma pequena fração de proteína na fração solúvel. Para confirmarmos essa hipótese, um gel SDS-PAGE foi preparado, e a Figura 25 mostra as bandas referentes às frações, sendo que nenhuma delas está próximo a 50 Kda, que é o próximo ao peso molecular da StaK, assim pela análise do gel, a enzima não pode ser identifica.

Dessa forma, ainda para averiguar se houve uma pequena expressão não detectável na fração solúvel, foi realizado um *Western Blotting* utilizando anticorpos anti-His (Figura 26). A análise do *Western Blotting* mostra que a enzima predominantemente encontra-se no *pellet*, porém a uma pequena quantidade na fração solúvel, mas em quantidades insuficientes para os experimentos posteriores. Assim, na tentativa de obter uma maior expressão da enzima, principalmente na fração solúvel, foram realizados testes de expressão utilizando outras cepas de *E. coli*

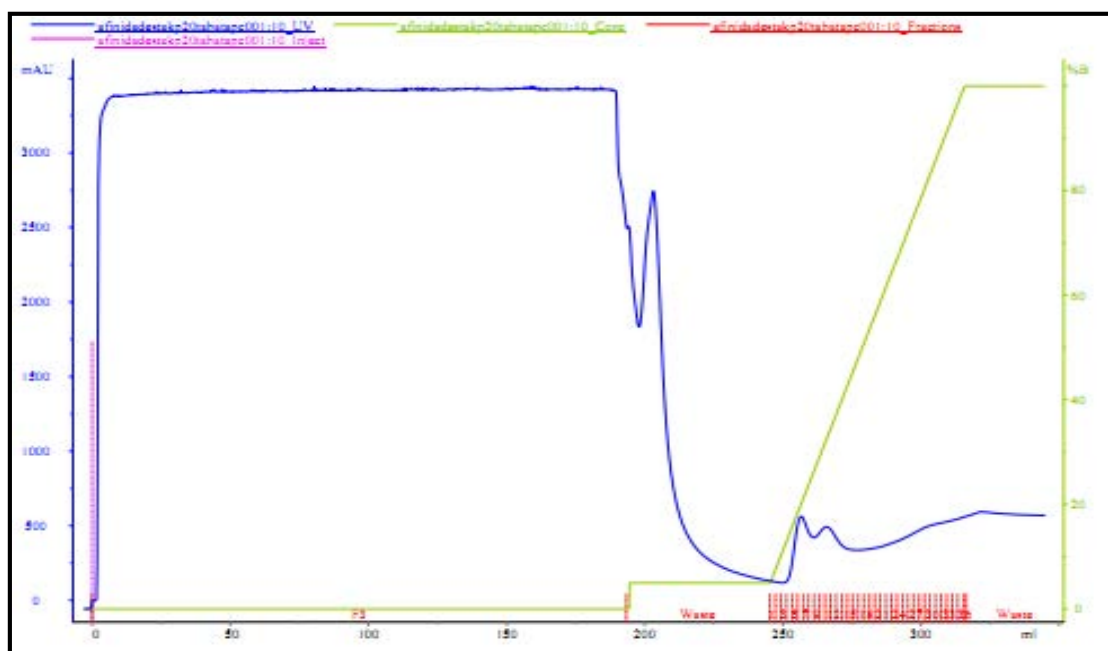


Figura 24. Cromatograma obtido da enzima StaK. Em vermelho as frações coletadas; em verde a concentração do tampão B; em azul a absorbância, a 280 nm.

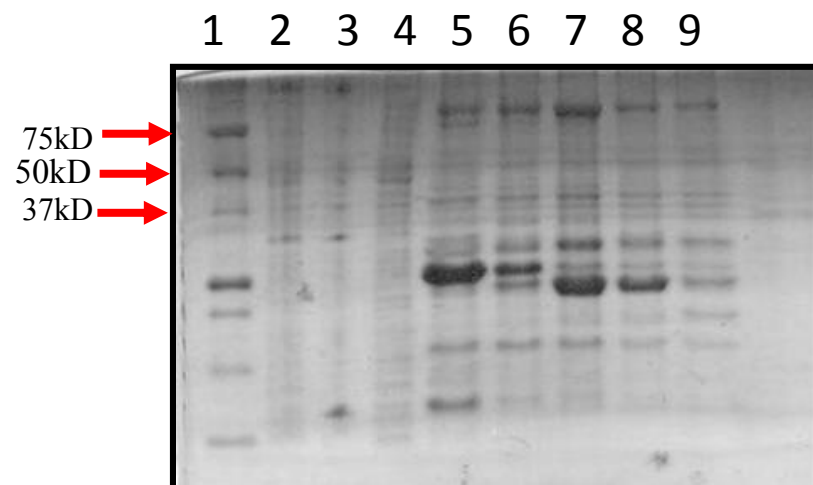


Figura 25. Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade da proteína StaK, 1, marcador molecular 1kD (Bio-rad), 2, 3, e 4 o lisado, pellet e *flow through* respectivamente, 5-9 as frações 8, 10, 18, 24, 30 obtidas na purificação.

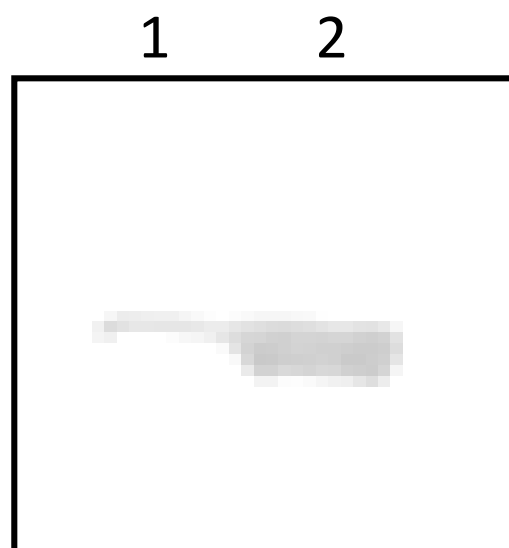


Figura 26. Visualização da membrana de *Western Blot* utilizando anticorpos anti-His realizado para a confirmação da enzima StaK, 1,o lisado e 2, o pellet.

4.3 Teste de expressão das halogenases Orf8* e StaK em diferentes cepas de *E. coli*.

Devido aos resultados negativos sobre a expressão das enzimas Orf8* e StaK, foram realizadas uma série de testes de expressão variando-se o sistema de expressão e também a temperatura e tempo de indução por IPTG.

Desta forma, utilizaram-se cepas ou sistema Origami (apresenta mutações nos genes para tioredoxina redutase e glutathione reductase que aumentam a expressão de proteínas ativas), Artic Express (Expressão aumentada para as chaperonas GroEL/GroES) e Rosetta (presença de códons raros para *E. coli*).

Para observar se houve expressão das enzimas Orf8* e StaK nos diferentes tipos de células e métodos de indução, foram realizados géis SDS-PAGE 15% (Figura 27, Figura 28 e Figura 29). Entretanto para facilitar as análises foram feitos controles com células na presença dos plasmídeos, porém não induzidos, passo que não foi realizado anteriormente.

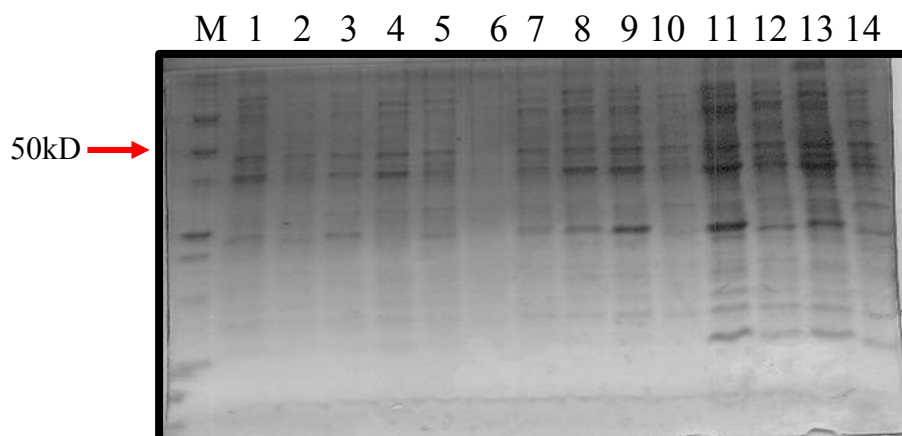


Figura 27. Gel SDS-Page 15% contendo amostras do lisado das proteínas Orf8* e StaK. M- marcador de 250 kD (Bio-Rad), 1- Orf8 Rosetta não induzido, 2- Orf8* Origami não induzido, 3- Orf8* Artic Express não induzido, 4-StaK Rosetta não induzido, 5- StaK Origami não induzido, 6- StaK Artic Express não induzido, 7- Orf8 Rosetta 37°-4h, 8- Orf8* Origami 37° - 4h, 9- StaK Rosetta 37°-4h, 10- StaK Origami 37°-4h, 11- Orf8* Rosetta 18° over night, 12- Orf8* Origami 18° over night, 13- StaK Rosetta 18° over night, 14- StaK Origami 18° over night.

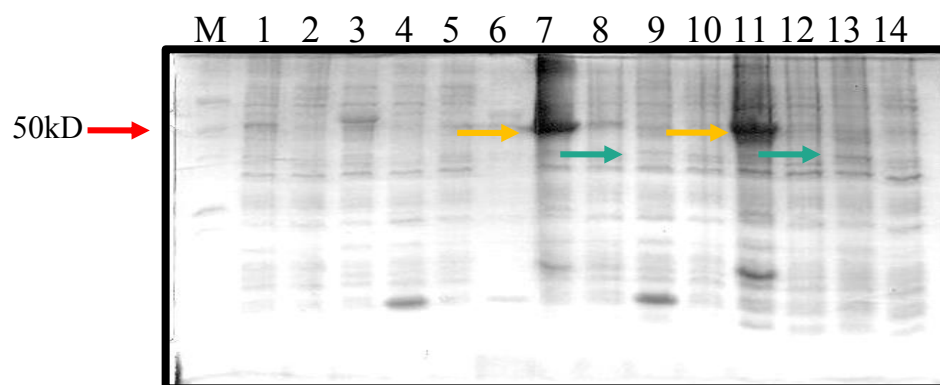


Figura 28. Gel SDS-Page 15% contendo amostras do pellet das proteínas Orf8* e StaK. M- marcador de 250 kD (Bio-Rad), 1- Orf8* Rosetta não induzido, 2- Orf8* Origami não induzido, 3- Orf8* Artic Express não induzido, 4- StaK Rosetta não induzido, 5- StaK Origami não induzido, 6- StaK Artic Express não induzido, 7- Orf8* Rosetta 37°-4h, 8- Orf8* Origami 37° - 4h, 9- StaK Rosetta 37°-4h, 10- StaK Origami 37°-4h, 11- Orf8* Rosetta 18° over night, 12- Orf8* Origami 18° over night, 13- StaK Rosetta 18° over night, 14- StaK Origami 18° over night.

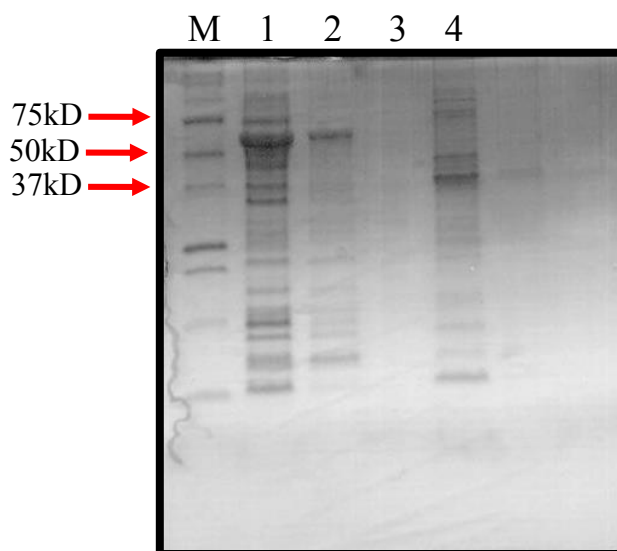


Figura 29. Gel SDS-Page 15% contendo amostras do lisado e pellet das proteínas Orf8* e StaK. M- marcador de 250 kD (Bio-Rad), 1- Orf8* Artic Express 18° over night Lisado, 2- StaK Artic Express 18° over night Lisado, 3- Orf8* Artic Express 18° over night Pellet, 4- StaK Artic Express 18° over night Pellet.

A Figura 27 mostra o gel que foram aplicadas as amostras contendo o lisado. Entretanto, pela análise do gel pode se observar que não há claramente nenhuma banda diferencial entre as células induzidas e não induzidas próximo ao peso molecular de 50 Kda. Assim, mesmo alterando o tempo de indução e cepas de *E. coli* não foi possível obter estas enzimas na fração solúvel.

Na fração insolúvel (Figura 28), pode se observar bandas características de super expressão no poço 7 referente a Orf8* em Rosetta e induzida a 37° por 4h e também no poço 11 referente a Orf8* em Rosetta e induzida a 18° *overnight*. Por outro lado, apesar da Figura 26 mostrar um *Western Blot* com alguma expressão da StaK (na fração insolúvel) não é possível identificar nenhuma banda diferencial para esta proteína na fração insolúvel, novamente evidenciando uma baixa expressão da mesma.

Embora o gel contendo amostra Orf8* *artic express* induzida a 18°C *overnight* (Figura 29) apresente uma banda com características de super expressão, não se pode considerar tal fato uma vez que, o peso molecular não corresponde ao da proteína e deve ser referente à chaperonas (60kD).

4.4 Expressão e purificação da proteína StaK

Após várias tentativas de obter concentrações consideráveis da proteína StaK solúvel, optou-se por adquirir o gene sintético junto a empresa GenScript (USA), o qual é otimizado para expressão em *E. coli*. Expressão em larga escala (6 litros) foi realizada e o produto foi submetido a uma purificação por afinidade (coluna His-trap IMAC 5 mL) e foi possível observar, através do cromatograma (Figura 30), um pico que eluiu por volta de uma baixa concentração de imidazol (25 mM--155 mM), referente a proteína.

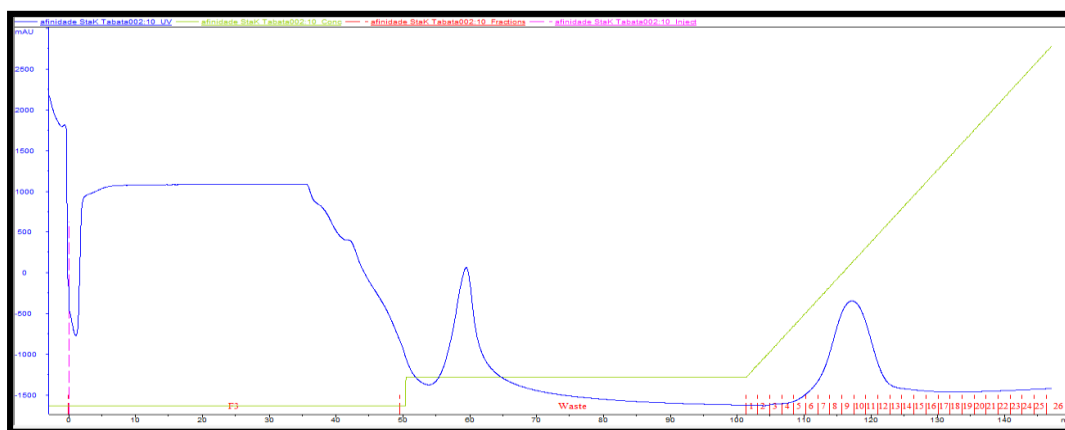


Figura 30. Cromatograma obtido para proteína StaK. Em azul a absorbância a 280nm. Em vermelho as frações coletadas, as que se referem ao pico foram analisadas em SDS-Page 15%. Em verde a concentração do tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl e 500 mM de imidazol.

As etapas do processo de expressão e purificação da proteína StaK podem ser verificadas através do gel de eletroforese (Figura 32). Frações insolúveis e solúveis apresentam-se no gel SDS-Page 15% e demonstram que as frações solúveis, referente ao pico obtido na cromatografia (Figura 30), correspondem à proteína em questão com um considerável grau de pureza.

Com intuito de obter uma melhor pureza da amostra, as frações referentes ao pico foram concentradas e submetidas a uma purificação por exclusão molecular (Superdex 200-16/200). O perfil da cromatografia de exclusão molecular por ser observado na Figura 31.

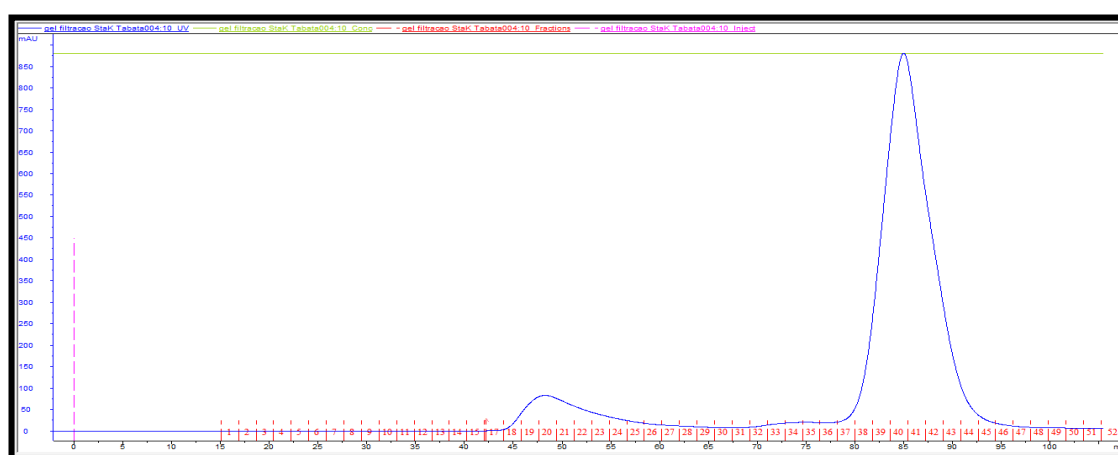


Figura 31. Perfil cromatográfico da proteína StaK na etapa de purificação por exclusão molecular (coluna HiLoad Superdex 16/200 equilibrada em solução tampão 50mM Tris-HCl pH 7,8; 100mM de NaCl).

Pela análise do cromatograma (Figura 31) foi possível observar picos, sendo que o maior atinge por volta de 870 mAU. No entanto, para confirmação de que tal pico em destaque é referente a StaK, foi verificado através de gel SDS-PAGE 15% (Figura 32) bandas correspondente ao peso molecular da proteína. Desta maneira, obtivemos quantidade significativas da proteína StaK dando possibilidade de prosseguir com ensaios de cristalização.

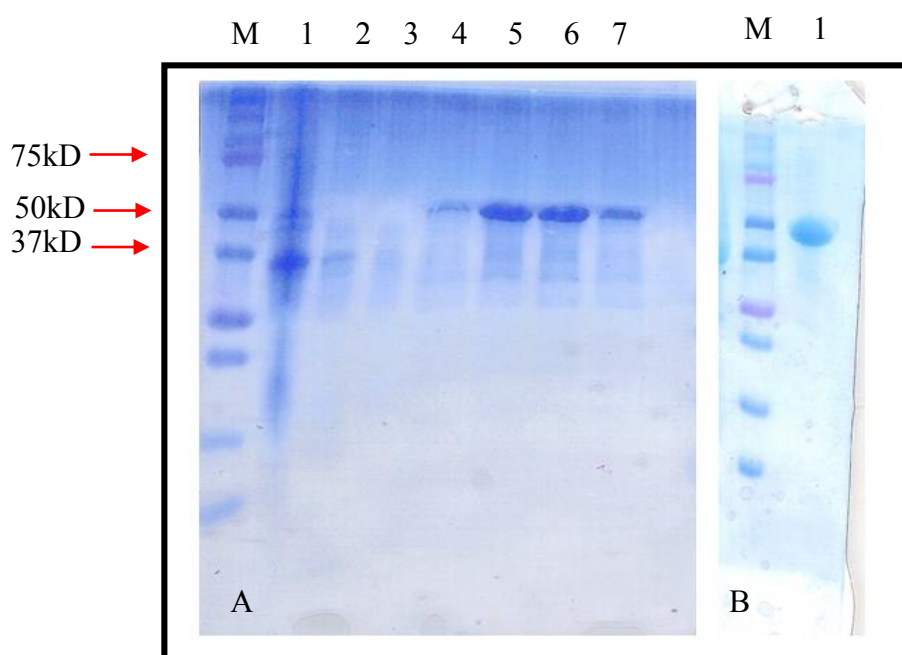


Figura 32. Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade e exclusão molecular da proteína StaK. **A.** Amostras referentes a purificação por afinidade ao níquel. M, marcador molecular 250kD (10-250kD) (Bio-rad), 2, 3, e 4 o *pellet*, lisado e *flow through* respectivamente, 5-9 as frações 8,10,18, 24, 30 obtidas na purificação. **B.** Amostra referente ao pico obtido na purificação exclusão de peso molecular. M marcador de peso molecular 1kD (Bio-rad) (Gel editado para melhor visualização).

4.5 Testes de cristalização da ComH, StaI e StaK

Devido ao sucesso na clonagem, expressão e purificação das enzimas StaI, StaK e ComH, testes de cristalização foram efetuados para estas enzimas.

A cristalização de macromoléculas biológicas é um procedimento empírico, uma vez que tal processo depende de inúmeros parâmetros, variáveis físicas como: tempo, pressão, temperatura, etc, e químicas: homogeneidade e pureza das amostras, ponto isoelétrico, agente precipitante, pH, força iônica, etc. Devido à complexidade de uma

proteína e aos inúmeros parâmetros envolvidos, a determinação teórica das condições de cristalização é até hoje imprevisível.

Para a triagem destas condições foram utilizadas as facilidades existentes no Laboratório Nacional de Biociências (RobLab) (StaI e ComH) e LBEA –Universidade de São Paulo (StaK) e as placas foram mantidas a 20° por aproximadamente 2 meses em sistema de visualização automático (Hotel de placas) para StaI e ComH e visualização manual para a StaK. Os ensaios iniciais de cristalização foram feitos por meio do robô de cristalização Honeybee 963 (Genomic Solutions) para StaI e ComH, utilizando 6 diferentes kits descritos nos Materiais e Métodos e um robô Orix4 para a StaK também utilizando aproximadamente 600 condições.

Entretanto, em uma primeira tentativa, não foram obtidos quaisquer cristais para ComH ou qualquer tipo de *hits* nas condições de cristalização testadas (aproximadamente 400 condições de diferentes kits de cristalização da empresa *Hamptom Research*). Com relação à StaI, um pequeno cristal foi obtido após 5-6 dias. Porém este cristal não se apresentou reproduzível. Esse cristal foi obtido em uma condição composta por 0,1M de CHES pH 9,0 e 30% PEG400 com a proteína em uma concentração de 10 mg/mL em tampão contendo 50 mM de Tris-pH 7,8, 100 mM de NaCl (Figura 33A). Quando fotografado sobre luz Ultra Violeta, o mesmo mostrou-se brilhante relevando ser realmente cristal de proteína (Figura 33B).

Devido à condição que este cristal foi obtido, nós optamos em utilizar o tampão 50 mM de CHES, pH 9,0, 100 mM de NaCl nas seguintes purificações, pois este tampão poderia estar contribuindo para estabilização da enzima ou diminuindo a sua agregação. Assim novos testes de cristalização foram efetuados utilizando este tampão. Entretanto, apenas após nove meses depois da realização dos testes de cristalização foi observado um novo cristal (Figura 34 A). Este cristal apareceu em uma condição contendo 0,2M de Sulfato de Lítio, 0,1M de Acetato de Sódio pH 4.5 e 50% Peg400. Inicialmente, acreditou-se que a presença do PEG400 poderia ser o agente precipitante responsável pela formação do cristal. Entretanto, fotografias do cristal sob luz Ultra Violeta revelou que o mesmo era cristal de sal devido à ausência de brilho, descartando a possibilidade da necessidade de PEG400 para formação de cristal (Figura 34B).

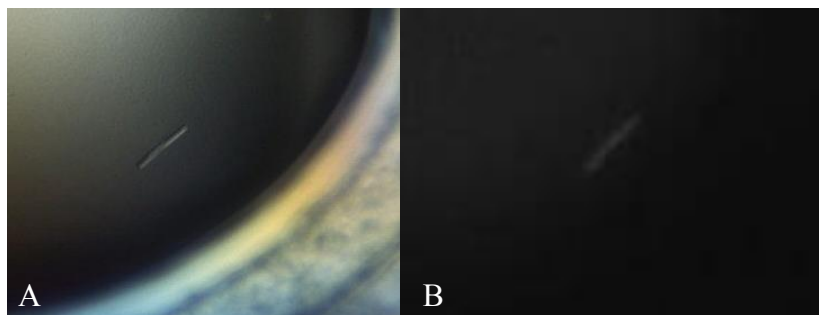


Figura 33. Fotografia do cristal obtido em condição composta de 0,1 M de CHES pH 9.0 e 30% Peg400. (A) exposto à visualização natural e (B) exposto a visualização por luz Ultra Violeta.

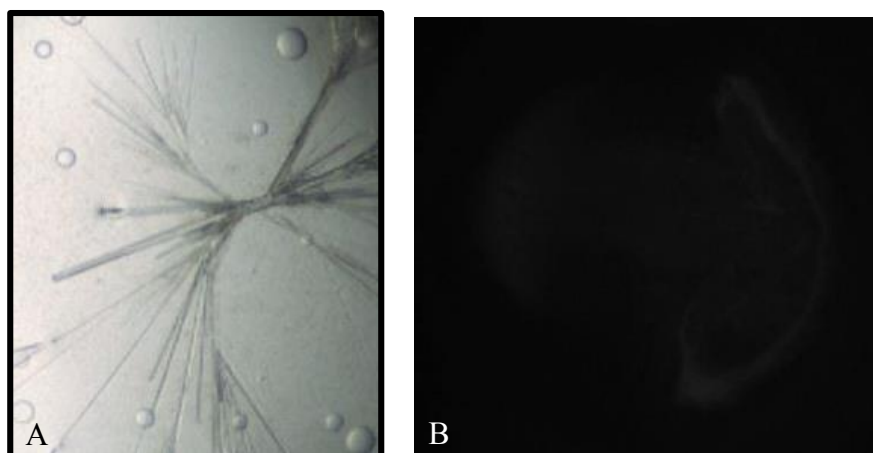


Figura 34. Fotografia do cristal obtido na condição composta por 0,1M de Acetato de Sódio pH 4,5, 0,2 M de sulfato de lítio, 50% PEG 400, (A) exposto a visualização natural e (B) exposto a visualização por luz Ultra Violeta.

4.6 Ensaios Espectrométricos

4.6.1 Dicroísmo Circular – CD

Com objetivo de averiguar se as proteínas estavam enoveladas e para calcular as porcentagens de elementos de estrutura secundários, foram realizados experimentos de dicroísmo circular, como pode ser observado pelas Figura 35 e Figura 36.

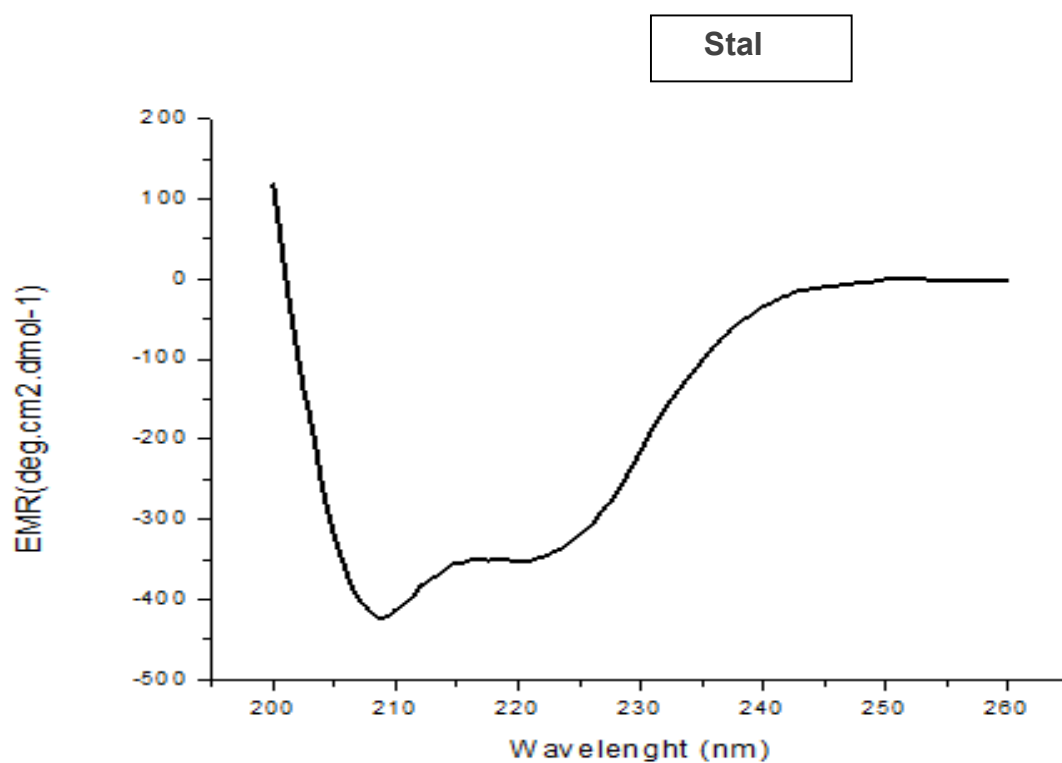


Figura 35. Dicroísmo Circular da proteína Stal. Curva de CD experimental com a proteína 5 μ mol/L em tampão 50mM CHES e 100 mM NaCl, pH 9,0.

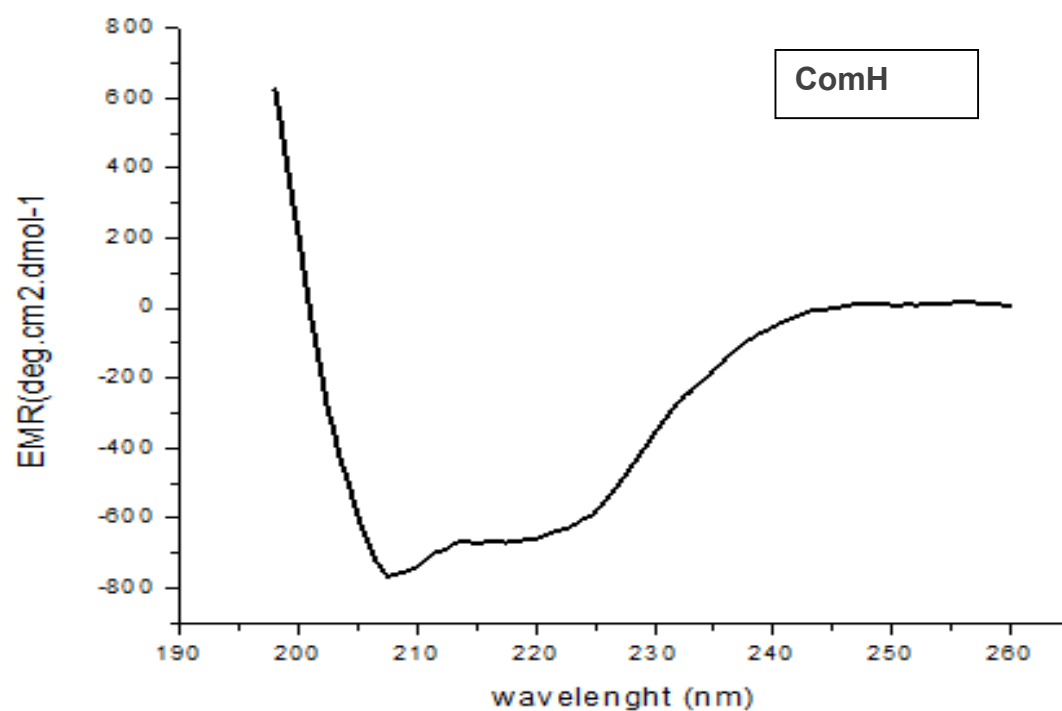


Figura 36. Dicroísmo Circular da ComH. Curva de CD experimental com a proteína 5 μ mol/L em tampão 50mM Tris-HCl e 100 mM NaCl, pH 7,8

Ambas as enzimas apresentaram espectros dicroísmo circular semelhante (Figura 35e Figura 36), sendo possível observar que elas têm espectros típicos de proteínas ricas em α -hélices. Assim, ComH apresenta um conteúdo de estruturas secundárias composto por 30% de α -hélices e 16% de folhas- β e a StaI apresenta 24% de α -hélices e folhas- β (Tabela 1).

Tabela 1. Dados do Dicroísmo Circular para proteínas ComH e StaI.

Proteína	Método Utilizado	α-hélice	Folha-β	Randômica
ComH	K2d	30%	16%	54%
StaI	K2d	24%	24%	52%

4.6.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Com intuito de verificar a homogeneidade da amostras, ou a presença de diferentes estados de oligomerização ou ainda a formação de agregados proteicos, foi realizado DLS das enzimas ComH e StaI (Tabela 2). Além disso, para aumentar o sucesso na cristalização foram verificados alguns aditivos e diferentes tampões com o objetivo de encontrar condições que a amostra apresenta-se polidispersividade próxima a 20%, que é o ideal para cristalização de macromoléculas.

Tabela 2. Dados obtidos através de DLS das halogenases ComH e StaI a 1mg/mL em tampão seus tampões originais.

Proteína	Tampão	R (nm)	Pd (%)	PM (kDa)	Massa (%)
ComH	50mM Tris-HCl e 100 mM NaCl, pH 7,8	6,22111	64,4522	242,477	99,9441
StaI	50mM CHES e 100 mM NaCl, pH 9,0	5,02366	33,3342	147,037	97,2579

R raio hidrodinâmico, **Pd** polidispersividade, **PM** peso molecular

Pela análise de DLS da Tabela 2, podemos verificar que as amostras encontram-se com um raio hidrodinâmico e porcentagem de polidispersividade muito alta, e somente as frações consideradas monomodais (1 população) e monodispersas (até 20% de polidispersividade), são indicadas para melhor utilização na cristalização, pois há relatos na literatura (FERRE-D'AMARE; BURLEY, 1994) mostrando que amostras monodispersas têm maior chance de cristalização. Desta forma foram testadas algumas condições que apresentavam detergentes, alta concentração de sais e agentes redutores com objetivo de obter valores de raio e de polidispersividade próximos a 20% (Tabela 3e Tabela 4).

Tabela 3. Dados obtidos através de DLS da halogenase ComH a 1mg/mL em diferentes soluções tampões.

Tampões-Proteína ComH	R (nm)	Pd (%)	PM (kDa)	Massa (%)
50mM Tris + 10%Glicerol pH 7.8	2,36334	11,7841	25,1857	91,3964
50mM Tris + 5mM DTT pH 7.8	4,91541	16,8147	139,73	97,5793
50mM Tris + 0.1% Thesit pH 7.8	4,05034	11,1333	88,8356	87,2773
50mM Tris + 0.1% Triton pH 7.8	3,52038	6,21145	63,9867	95,231
50mM Tris + 500mM NaCl pH 7.8	3,89188	11,0231	80,9159	65,0149
50mM CHES + 10%Glicerol pH 9.0	1,69675	0	11,5995	58,8855
50mM CHES + 5mM DTT pH 9.0	4,65582	10,487	123,071	96,4978
50mM CHES + 0.1% Thesit pH 9.0	4,68594	10,8313	124,942	95,0618
50mM CHES + 0.1% Triton pH 9.0	3,71245	16,4246	72,4555	95,6645
50mM CHES + 500mM NaCl	3,53175	10,7419	64,4711	82,0853

pH 9.0				
50mM Fosfato de Potássio + 10%Glicerol pH 7.0	2,2353	9,03853	22,1084	86,8707
50mM Fosfato de Potássio + 5mM DTT pH 7.0	4,69069	10,8803	125,239	96,7739
50mM Fosfato de Potássio + 0.1% Thesit pH 7.0	3,53466	6,88369	64,5955	92,3507
50mM Fosfato de potássio + 0.1% Triton pH 7.0	3,68571	10,7374	71,2401	96,0979
50mM Fosfato de Potássio + 500mM NaCl pH 7.0	1,62501	0	10,4843	75,3165

R raio hidrodinâmico, **Pd** polidispersividade, **PM** peso molecular

Tabela 4. Dados obtidos através de DLS da halogenase Stal a 1mg/mL em diferentes soluções tampões.

Tampões-Proteína Stal	R (nm)	Pd (%)	PM (kDa)	Massa (%)
50mM Tris + 10%Glicerol pH 7.8	2,67842	6,28738	33,7544	93,1962
50mM Tris + 5mM DTT pH 7.8	5,15367	11,0301	156,095	92,3012
50mM Tris + 0.1% Thesit pH 7.8	3,46592	0	61,6943	86,1005
50mM Tris + 0.1% Triton pH 7.8	4,17717	14,3706	95,4813	97,6311
50mM Tris + 500mM NaCl pH 7.8	3,32085	0	55,821	86,3164

50mM CHES + 10%Glicerol pH 9.0	2,79492	7,33557	37,2901	94,5305
50mM CHES + 5mM DTT pH 9.0	4,44785	35,009	110,591	99,3245
50mM CHES + 0.1% Thesit pH 9.0	4,16806	9,64606	94,9947	95,9537
50mM CHES + 0.1% Triton pH 9.0	3,92283	11,8814	82,4295	95,389
50mM CHES + 500mM NaCl pH 9.0	3,79372	11,7536	76,2211	93,6172
50mM Fosfato de Potássio + 10%Glicerol pH 7.0	2,91574	10,9073	41,1716	98,8644
50mM Fosfato de Postássio + 5mM DTT pH 7.0	4,76176	11,463	129,724	90,6522
50mM Fosfato de Potássio + 0.1% Thesit pH 7.0	4,70084	10,9806	125,874	85,7112
50mM Fosfato de potássio + 0.1% Triton pH 7.0	3,82906	11,8737	77,8931	94,0797
50mM Fosfato de Potássio + 500mM NaCl pH 7.0	3,32085	1,66E-14	55,821	82,7804

R raio hidrodinâmico, **Pd** polidispersividade, **PM** peso molecular

Assim, os testes preliminares empregando o tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,8 para enzimas ComH e tampão 50mM CHES e 100 mM NaCl, pH 9,0(Tabela 1) para proteína StaI resultaram em amostras com alta polidispersidade. Porém, quando há uma variação de tampão na amostra, melhores resultados de polidispersidade foram obtidos (Tabela 3 e Tabela 4), visto que algumas mudanças de soluções tampões geraram dados de menor raio e menor polidispersividade. Embora tenha-se obtido menor raio e menor polidispersão, houve uma diferença entre o raio hidrodinâmico da mesma amostra em relação aos tampões utilizados.

4.7 Purificação e Ensaio Espectrométrico da proteína StaI em novas condições padronizadas pelos resultados de DLS.

4.7.1 Expressão e Purificação

Posteriormente aos resultados referente à halogenase StaI obtidos por DLS, novas purificações foram realizadas com intuito de obter uma fração onde não houvesse agregado proteico ou que este estivesse reduzido. Para isso, a StaI foi novamente purificada por afinidade (FPLC) utilizando a coluna His-Trap IMAC 5 ml carregada com níquel e posterior exclusão molecular, utilizando como tampão base 50 mM de Fosfato de Potássio e 10% de Glicerol em pH 7.0 .

Através do cromatograma (Figura 37) foi possível observar um pico, referente à proteína que foi eluída a uma baixa concentração de imidazol (25 mM--155 mM). As frações solúveis, insolúveis e os respectivos picos foram analisados em gel de SDS-PAGE 15% onde foi possível observar a pureza e expressão da enzima StaI com sucesso (Figura 39).

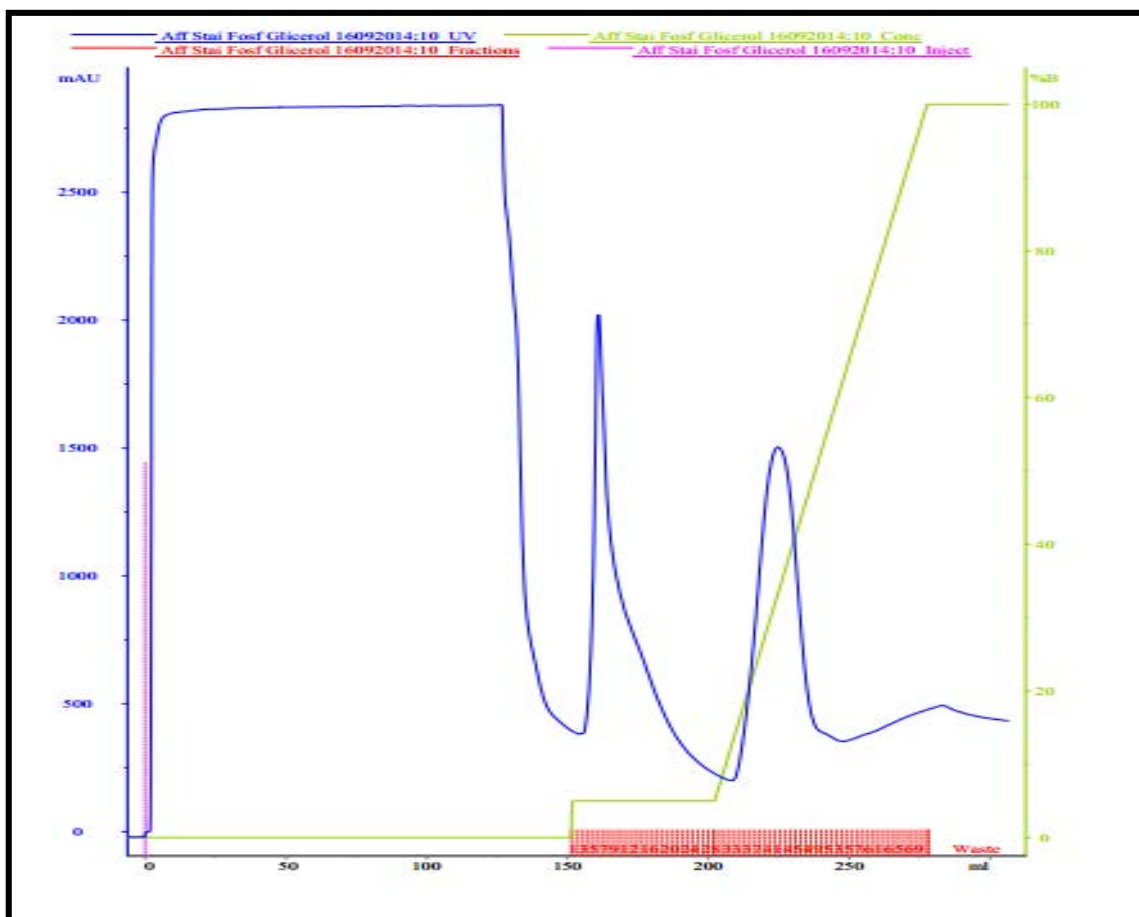


Figura 37. Cromatograma obtido para a enzima Stal. Em vermelho as frações coletadas. Foram utilizadas como amostras para a análise em SDS-Page 15% as frações referente aos picos; em verde a concentração do tampão B; em azul a absorbância a 280nm

As frações referentes ao pico observado no cromatograma da Figura 37 foram concentradas e aplicadas em uma coluna de filtração em gel (16/200). Pela análise do cromatograma (Figura 38) podem-se observar picos, sendo que o maior atinge por volta de 1800 mAU. A fim de confirmar a pureza da amostra e verificar se quais picos são referentes a Stal, um gel SDS-PAGE 15% com as respectivas frações foi preparado (Figura 39). Pela análise deste gel, pôde-se confirmar que o pico que se destaca é referentes à Stal e os outros devem ser alguma proteína que se liga inespecificamente a coluna. A análise do cromatograma também indica que uma parcela da enzima pode ainda está agregada, mesmo com a variação de tampões.

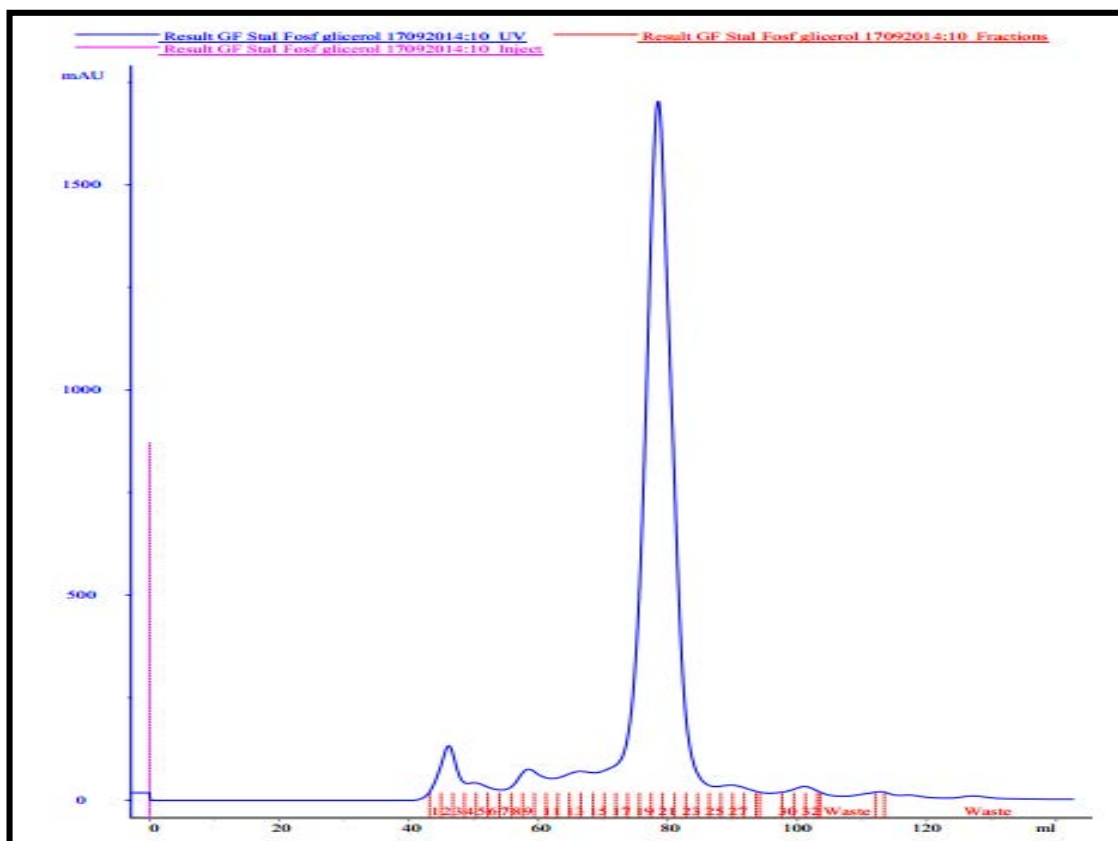


Figura 38. Cromatograma obtido da purificação por exclusão molecular da StaI. Frações referentes aos picos foram utilizadas como amostras no gel SDS-Page 15% (Figura 39).

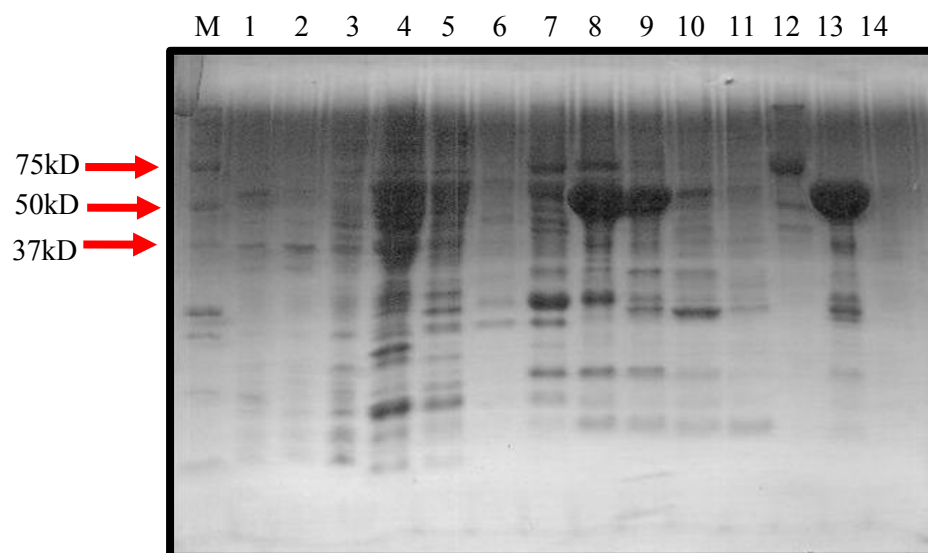


Figura 39. Gel SDS-Page 15% contendo amostras da StaI. M- marcador de 250 kD (10-250kD) (Bio-Rad), 1- pellet, 2- Sobrenadante, 3- *flow through*, 4 a 10- amostras da StaI referente às frações 7, 12, 16 28, 41, 46, 65, respectivamente, do cromatograma de afinidade. 11 a 14 – amostras da StaI referente as frações 2, 9, 21, 32, obtidas após cromatográfica exclusão de peso molecular. Seta indica expressão da halogenase com tamanho aproximado de 50 Kd.

4.7.2 Ensaios Espectrométricos da proteína StaI

A integridade estrutural da proteína StaI foi avaliada por dicroísmo circular.

A Figura 40 mostra o espectro de CD da StaI em 50mM de Fosfato de Potássio e 10% de Glicerol, condição cuja estabilidade da proteína foi preservada.

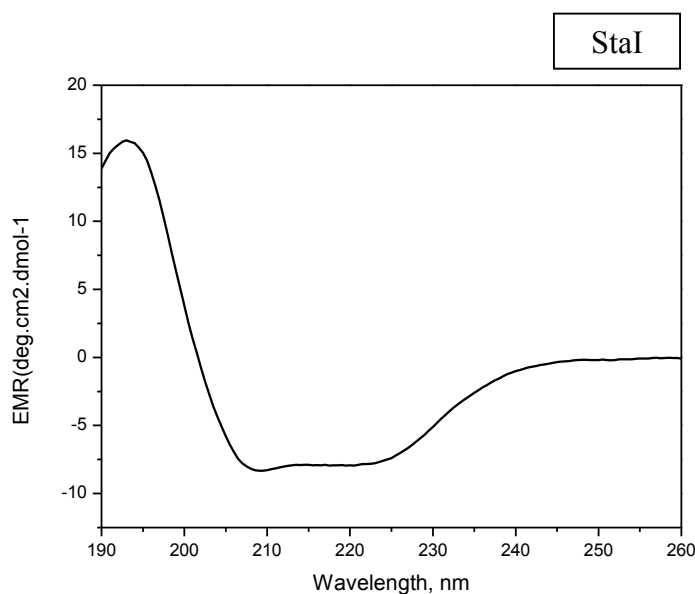


Figura 40. Dicroísmo Circular da proteína StaI. Curva de CD experimental com a proteína 5 μ mol/L em tampão 50mM de Fosfato de Potássio e 10% de Glicerol.

A StaI apresentou um espectro de CD caracterizado por dois mínimos pronunciados em 222 e 208 nm, configurando uma estrutura em α -hélice. Para realizar a deconvolução dos dados foi utilizado o servidor online Dichroweb (WHITMORE; WALLACE, 2004) utilizando o algoritmo K2d (Tabela 5).

Tabela 5. Dados do Dicroísmo Circular para proteínas StaI.

Proteína	Método Utilizado	α -hélice	Folha- β	Randômica
StaI	K2d	31%	15%	54%

Com intuito de verificar a homogeneidade da amostra, ou a presença de diferentes estados de oligomerização ou ainda a formação de agregados proteicos, foi realizado DLS da enzima StaI (Tabela 6).

Tabela 6. Dados obtidos através de DLS das halogenase StaI a 1mg/mL em tampão seu original.

Proteína	Tampão	R (nm)	Pd (%)	PM (kDa)	Massa (%)
StaI	50mM Fosfato de Potássio e 10% de Glicerol	3,96397	11,6847	84,4665	99,8024

R raio hidrodinâmico, **Pd** polidispersividade, **PM** peso molecular

Pela análise de DLS da Tabela 6 podemos verificar que as amostras encontram-se com um raio hidrodinâmico e porcentagem de polidispersividade relativamente dentro dos parâmetros, uma vez que somente as frações consideradas monomodais (1 população) e monodispersas (até 20% de polidispersividade), são indicadas para melhor utilização na cristalização, pois há relatos na literatura (FERRÉ-D'AMARÉ e BURLEY,1994) mostrando que amostras monodispersas têm maior chance de cristalização.

Desta forma a enzima foi novamente enviada para cristalização, mas novamente não tivemos sucesso na obtenção de hits ou cristais para continuar com os experimentos de resolução de estrutura.

4.8 Proteólise Limitada com Tripsina para proteína StaI

Devido ao insucesso na cristalização da StaI, obtamos então em verificar se a mesma poderia ter regiões muito flexíveis que poderiam interferir na cristalização. Assim, para remover regiões protéicas mais flexíveis, a proteína StaI foi submetida à proteólise limitada com tripsina. Normalmente, as regiões mais flexíveis em uma proteína dificultam o empacotamento ordenado necessário para a formação de cristais que podem difratar a alta resolução. A proteólise limitada permite que essas regiões flexíveis sejam clivadas por uma protease específica como tripsina, porém devido à baixa concentração de protease utilizada no experimento, a proteína alvo geralmente mantém a integridade das regiões enoveladas.

Assim, unidades peptídicas enterradas no core protéico e elementos de estrutura secundária regulares são menos acessíveis à ação de proteases e, portanto, não são clivados tão rapidamente. Desta maneira, é esperado que as clivagens observadas nesse tipo de experimento ocorreram em regiões de superfície que estão mais expostas ao solvente circundante, como as alças e/ou loops. No caso de estruturas de proteínas globulares, espera-se que a proteólise ocorra primariamente nas regiões flexíveis de superfície e no caso de proteínas multi-domínios, nas regiões ligadoras móveis entre esses domínios. Dentro deste contexto, a proteólise limitada pode ser usada para monitorar regiões de superfície protéica, mudanças conformacionais induzidas por ligantes, domínios de ligação e dobramento proteico.

Desta maneira, a StaI, foi submetida a um experimento de proteólise limitada. No SDS-PAGE 15% da Figura 41, a proteína apresenta uma banda de aproximadamente 50 kDa que se manteve constante em todos os tempos de reação. Foi possível observar a presença de uma banda menor em todos os tempos de empregados no experimento de proteólise. Acreditamos assim, que alguma porção do N ou do C terminal possa ter sido clivada.

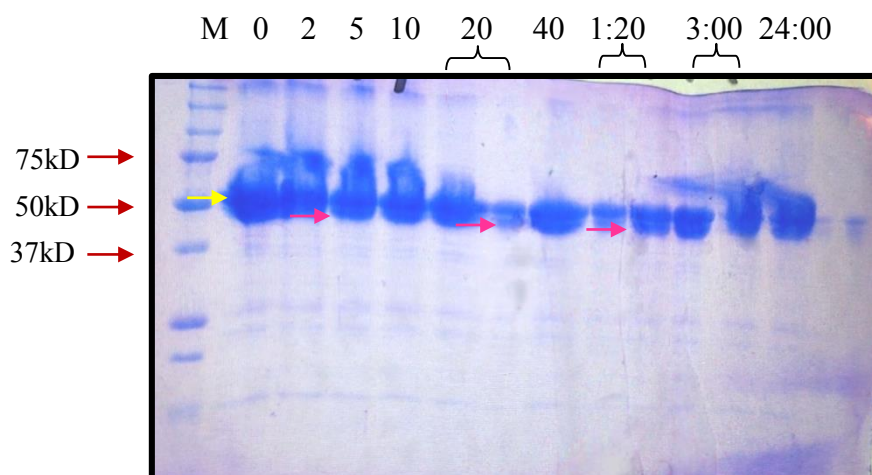


Figura 41. SDS-PAGE 15% contendo o resultado da ação da tripsina sobre a halogenase StaI. Nota-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 50 kDa após a proteólise e de outra banda menor. M - marcadores de peso molecular; Tempos de proteólise: 0, 2, 5, 10, 20 e 40 minutos e 1:20, 3, e 24 horas após a ação da enzima. Seta na cor amarela evidência banda que se manteve constante. Seta na cor rosa indicando banda menor proveniente da digestão

4.9 Modelagem Molecular por Homologia

Foi optado em realizar a modelagem molecular, a fim de obter mais informações a respeito da estrutura, para as enzimas StaI e StaK devido a particularidades interessantes, tais como, a necessidade de duas enzimas preditas para serem halogenases em clusters gênicos da rota biossintética do composto A47934, a não especificidade destas enzimas em relação a posição de halogenação. Por uma análise utilizando programa BlastP, a proteína com estrutura resolvida que apresenta maior homologia tanto para StaI quanto para StaK foi a CndH da biossíntese de condrocloreto (3E1T) (BUEDENBENDER et al., 2009). A StaI e StaK apresentam uma homologia de 56% e 53%, respectivamente com a CndH. Essa homologia é completamente compatível com a construção de bons modelos teóricos levando em consideração que a similaridade sequencial está implicada com a similaridade estrutural (SALI; BLUNDELL, 1993).

Inicialmente, analisando o alinhamento das sequências entre proteína StaI e StaK foi possível observar importantes alterações em resíduos de aminoácidos aromáticos da halogenase StaK. É possível observar que os resíduos na sequência da proteína StaK são substituídos por resíduos aromáticos na sequências da StaI (Figura 42A e Tabela 7). Interessantemente, quando realizamos o alinhamento múltiplo de todas as halogenases

relacionadas com a biossíntese de glicopeptídeos podemos observar que o padrão de alteração nas tirosinas somente não é conservado na StaK (Figura 42B) o que sugestiona que esses resíduos de aminoácidos podem estar relacionados ao reconhecimento e em um padrão diferente de halogenação que é somente visto no composto A47934.

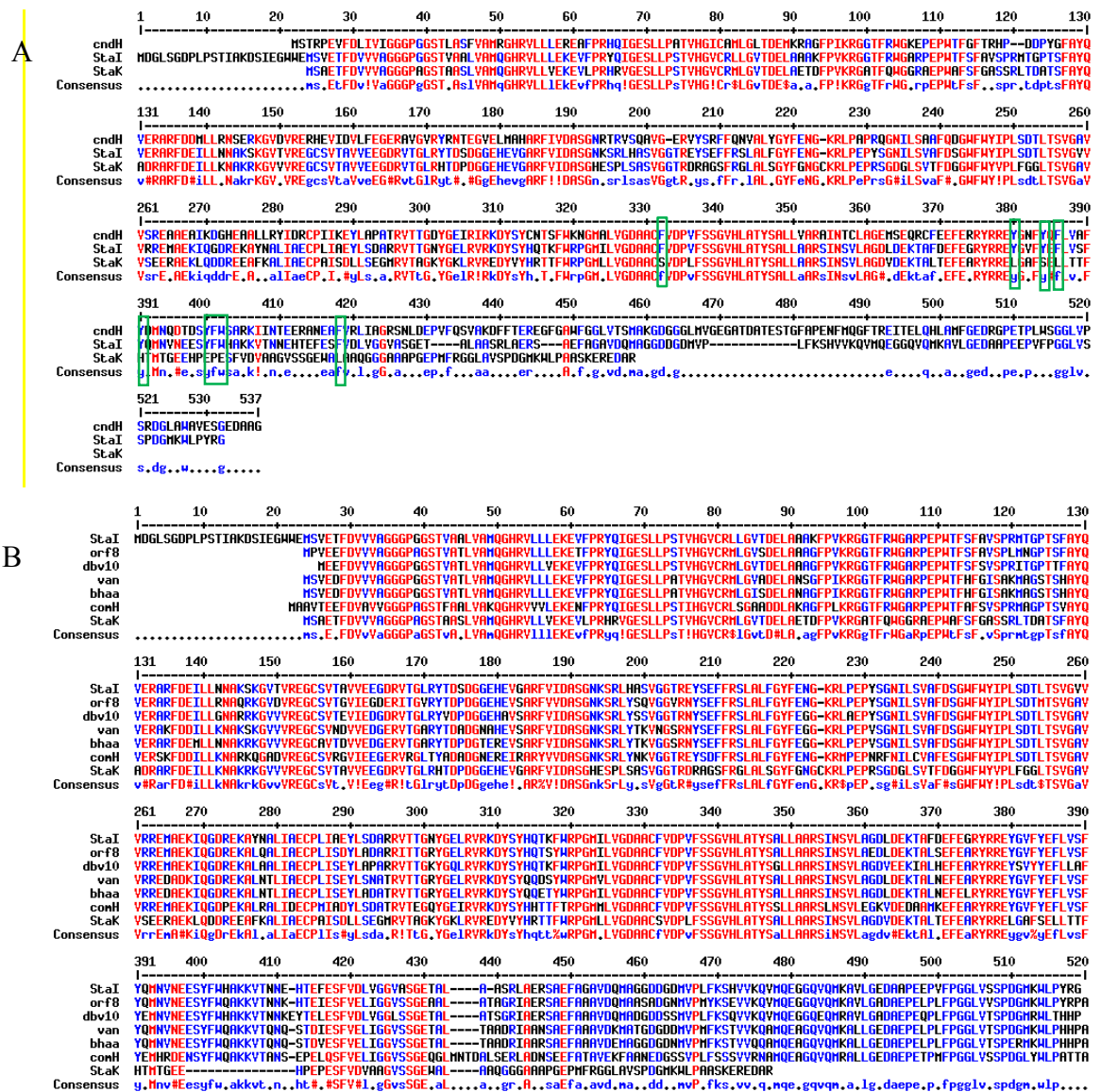


Figura 42. Alinhamento das sequências da halogenase. A) Alinhamento da halogenase de *Chondromyces crocatus* (CndH) que foi utilizado como molde para a construção dos modelos da StaI e da StaK. No alinhamento é possível observar uma alta identidade sequencial entre as três proteínas, com exceção da região C terminal que é pouco conservado para a StaK. Entretanto na estrutura da CndH, o seu C terminal é desordenado e não foi possível ser observado na estrutura cristalográfica. Caixas em verde são referentes aos resíduos de tirosinas não conservados na StaK. B) Alinhamento das halogenases conhecidas para a biossíntese de antibióticos glicopeptídicos. É possível observar que uma série de resíduos somente não são conservados na StaK e que esses resíduos podem estar relacionados com o reconhecimento do substrato e sua ordenação que pode levar a um padrão de halogenação diferente.

Tabela 7. Resíduos de aminoácidos divergentes nas sequências das halogenases StaI e StaK.

Resíduo (StaI)	332	380	384	386	391	400	401	402	418
StaI	F	Y	Y	F	Y	Y	F	W	F
StaK	S	L	S	L	H	E	P	S	L

Desta forma, com a intenção de observar o efeito dessas substituições nas estruturas da StaI e StaK foram gerados os modelos teóricos. Esses modelos apresentaram estereoquímica satisfatória com base na análise do gráfico de Ramachandran (Tabela 8), sendo que somente poucos resíduos estão em regiões não favoráveis.

Tabela 8. Valores obtidos segundo gráfico de Ramachandran para escolha dos modelos gerados para StaI e StaK.

	Regiões Favoráveis	Adicionalmente Favorável	Generosamente Favorável	Regiões Desfavoráveis
StaI	91,7%	7,8%	0,6%	0,0%
StaK	90,4%	9,3%	0,3%	0,0%

Como esperado, tanto StaI quanto StaK apresentam uma estrutura terciária (Figura 43) semelhante a estrutura da CndH. Esta estrutura pertence à superfamília das glutatona redutases e apresenta um enovelamento comum para as proteínas ligadoras a FAD. Segundo Dong et al (2005), o enovelamento das halogenases FADH₂-dependentes em geral, pode ser descrito como um único domínio com dois módulos ou subdomínios. Um dos módulos é chamado de caixa e o outro de pirâmide que é adjacente a caixa. A caixa é nomeada como módulo de ligação do FAD e é caracterizada por duas folhas betas em duas extremidades formando como se fosse “teto e o piso”. Entre essas duas folhas há quatro hélices principais como se fosse as “laterais”(arestas) da caixa. O FAD está ligado em uma cavidade central exposta ao solvente neste módulo. Esse domínio é conservado em praticamente todas as halogenases dependente de flavina (DONG et al, 2005). Além disso, na estrutura da PrnA a pirâmide que é considerada o módulo de ligação de reconhecimento de substrato é formado por três alfa-hélices principais que formam os vértices da pirâmide triangular.

O substrato desta enzima se liga na interface entre os dois módulos. Entretanto na estrutura da CndH, o módulo pirâmide ou de reconhecimento do substrato está desenovelado. Devido a maior similaridade das sequências da StaI e StaK com a sequência da CndH, nós especulamos que essa região também possa estar desenovelada. Outra evidência de que essa região possa estar desenovelada são os dados obtidos pela purificação destas enzimas que mostram uma tendência a agregação das mesmas ou mesmo ainda os resultados de proteólise limitada que sugerem uma região muito flexível e acessível a tripsina. Contudo, o módulo de reconhecimento de substrato da StaK apresenta-se relativamente menor em relação as outras halogenases.

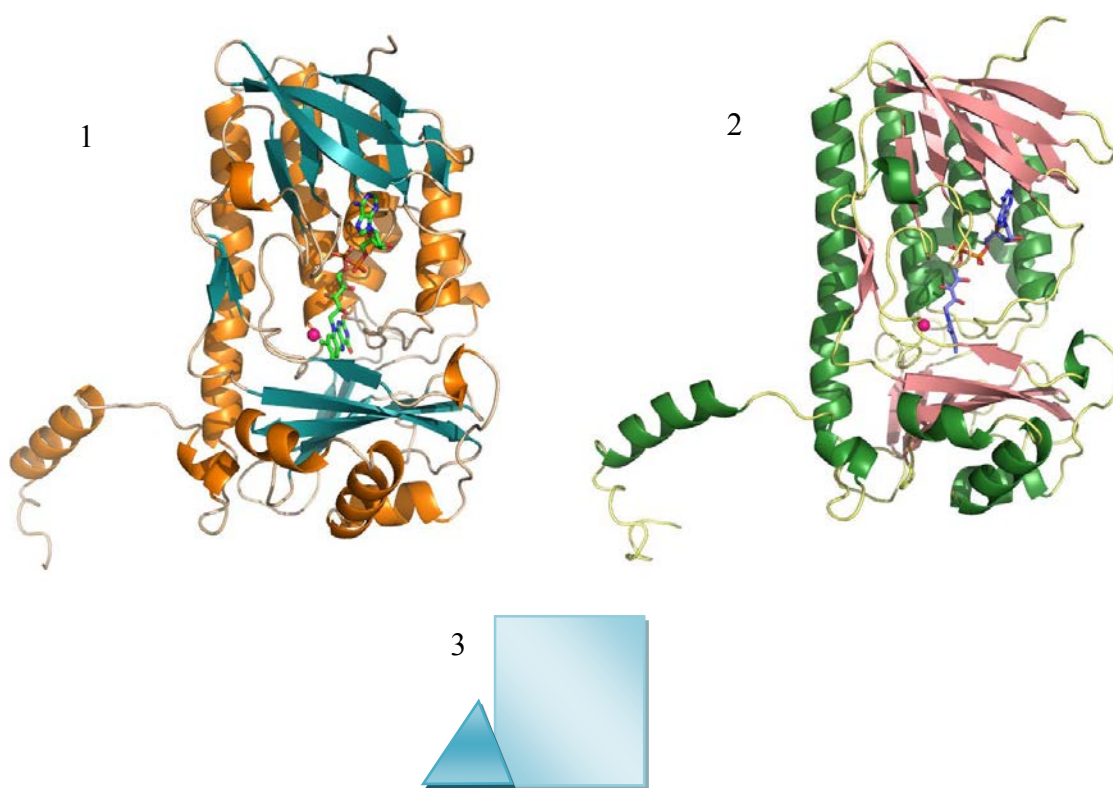


Figura 43. Modelos de estrutura terciária das halogenases StaI (1) e StaK (2) geradas com base na proteína molde CndH. Esquema representando o enovelamento das halogenas FAD-dependentes, com módulo (3) denominado ‘caixa’ (módulo de ligação ao FAD) e o módulo ‘pirâmide’ (módulo de reconhecimento do substrato).

Pela análise da superfície eletrostática da StaI e StaK é possível observar uma região hipotética de ligação do heptapeptídeo (Figura 44 A, C). Essa região apresenta-se como um sulco na região oposta ao sítio de ligação de FAD, próximo ao módulo de reconhecimento de substrato. Entretanto, com base nos modelos, não é possível observar variações drásticas nestas regiões, porém a proteína StaI apresenta-se relativamente mais carregada positivamente do que a StaK. Além disso, realizando um

corte na superfície eletrostática destas enzimas foi possível observar claramente um túnel que deve transferir o cloro ativado pela molécula de FAD para ser ligado ao heptapeptídeo dos antibióticos glicopeptídeos em formação. Através de uma análise desses túneis é possível observar, interessante, variações no seu diâmetro (Figura 44 B, D). Dessa forma nós especulamos que essas alterações possam estar relacionadas com uma possível diferença da atividade destas enzimas.

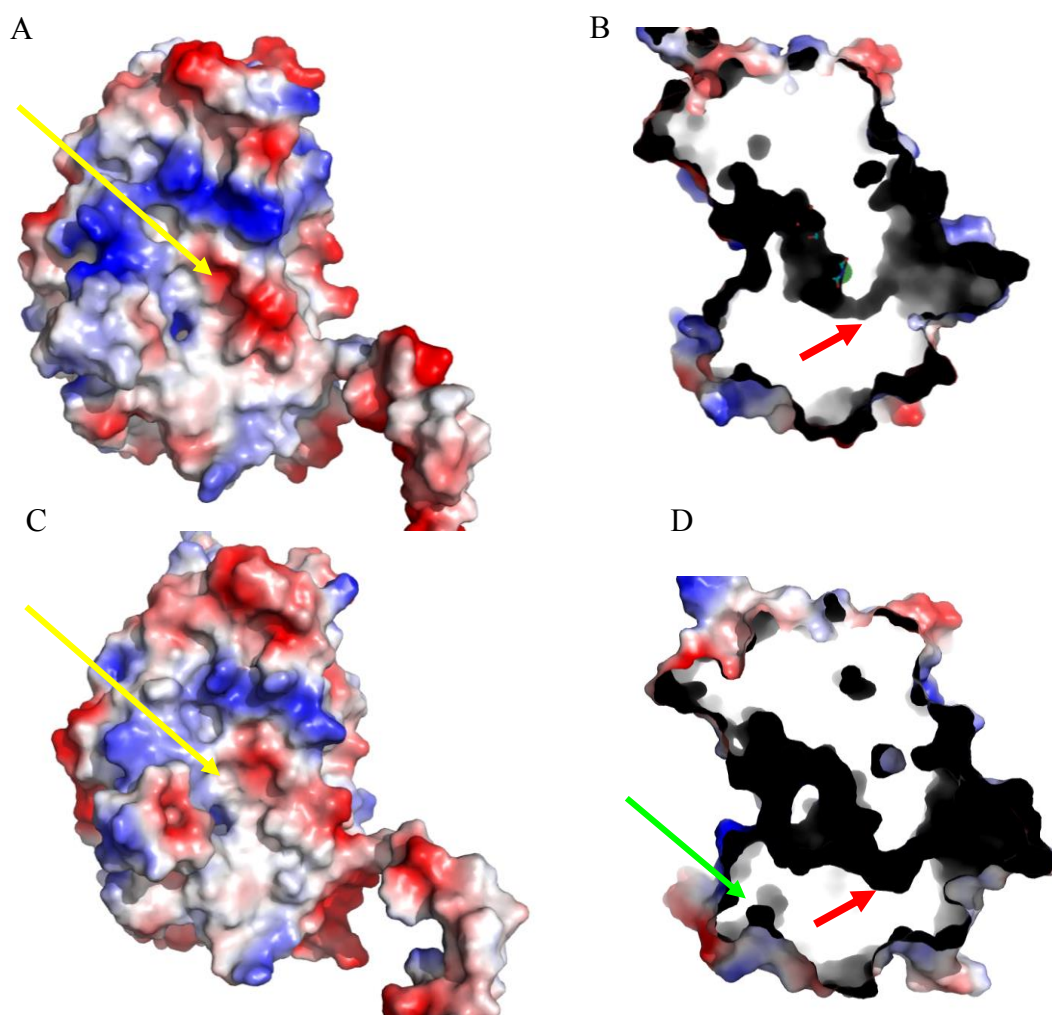


Figura 44. Superfície eletrostática. **A** refere-se a proteína StaI e **C** refere-se a StaK, setas indicam a região de sulco. Superfície eletrostática cortada para visualização do túnel de transferência do cloro. **B** referente a StaI e **D** para StaK, setas (em vermelho) indicam o túnel de cada enzima. Seta na cor verde indica região onde não estão conservados os resíduos de aminoácidos, conforme alinhamento.

Devido aos resíduos de tirosina, fenilalaninas e triptofanos não conservados na sequência e estrutura da StaK conforme observados no alinhamento da figura 42A, nós realizamos uma análise para verificar a posição das mesmas com intuito de observar se esses resíduos poderiam estar envolvidos no processo de reconhecimento do substrato

(Figura 45). Com base nesta análise, foi possível ver que tais resíduos estão, em sua maioria, presentes na mesma região da molécula no módulo de caixa. Todavia, esta região está próximo a região que possivelmente faz interação com o módulo de reconhecimento do substrato (Figura 44). Entretanto, esses resíduos não estão próximos do sulco onde possivelmente ocorre a ligação do heptapeptídeo, o que torna difícil inferir que esses possam estar relacionados de alguma forma com a diferença no padrão de halogenação que ocorre na síntese do composto A47934. De qualquer modo, é possível observar ainda na análise da superfície eletrostática da StaK a formação de uma nova cavidade que ainda possa ter alguma relação com a ligação do substrato, mas uma confirmação desta evidência só pode ser obtida através da obtenção da estrutura cristalográfica dessas proteínas que poderá ter os movimentos intrínsecos da sua estrutura que não são observados em modelos teóricos.

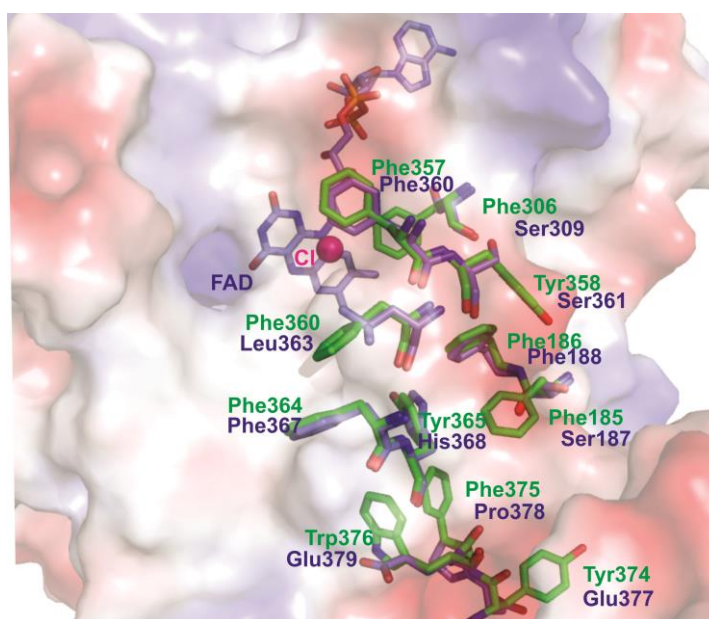


Figura 45. Superposicao dos resíduos de aminoácidos que se apresentam diferentes entre as sequências da StaK e StaI. Em verde, encontram-se os resíduos da StaI. Em azul, os resíduos da StaK são mostrados. O íon cloro está representado em cor rosa e o FAD na cor azul e são referentes ao modelo da StaK.

O objetivo inicial deste trabalho era obter principalmente dados estruturais de halogenases relacionadas com a biossíntese de antibióticos glicopeptídicos. Nós sabemos que somente com a obtenção de dados estruturais seria possível prever ou entender como pode ocorrer o processo de halogenação para esses antibióticos.

Contudo, não foi possível a obtenção de cristais para as proteínas testadas (Orf8*, StaK, StaI, ComH) até o momento. Desta forma, optamos por tentar obter informações através de modelos teóricos os quais puderam nós dar algumas idéias sobre o mecanismo de halogenação. Além disso, a construção dos modelos da StaK e StaI nos permitiu levantar suposições sobre os possíveis mecanismos para uma plausível diferença nos padrões de halogenação.

4.10 Resultados obtidos dos ensaios de complementação genes *staI* e *staK* de *Streptomyces toyocaensis*.

Os genes *staI* e *staK* foram previamente clonados em plasmídeo pIJ10257 pelo grupo da pesquisadora Hee-Jeon Hong (Universidade de Cambridge) e foram gentilmente cedidos para o nosso trabalho. O vetor pIJ10257 transporta o gene de resistência a higromicina como marcador de seleção e possui sítio ϕ BT1 para integração. O gene *staK* estava clonado nos sítios *NdeI* / *PacI* e *staI* clonadas com *NdeI* / *HindIII* (Figura 46).

As cepas produtoras dos antibióticos teicoplanina, vancomicina e a ristocetina foram cultivadas em placas contendo higromicina e duas delas (*Amycolatopsis orientalis* e a *Amycolatopsis* sp. MJM258) provaram ser resistente a higromicina. Deste modo, foi indispensável a troca do gene de resistência do plasmídeo pIJ10257, substituindo higromicina por apramicina. Para tal, utilizamos a estratégia denominada *PCR targeting*.

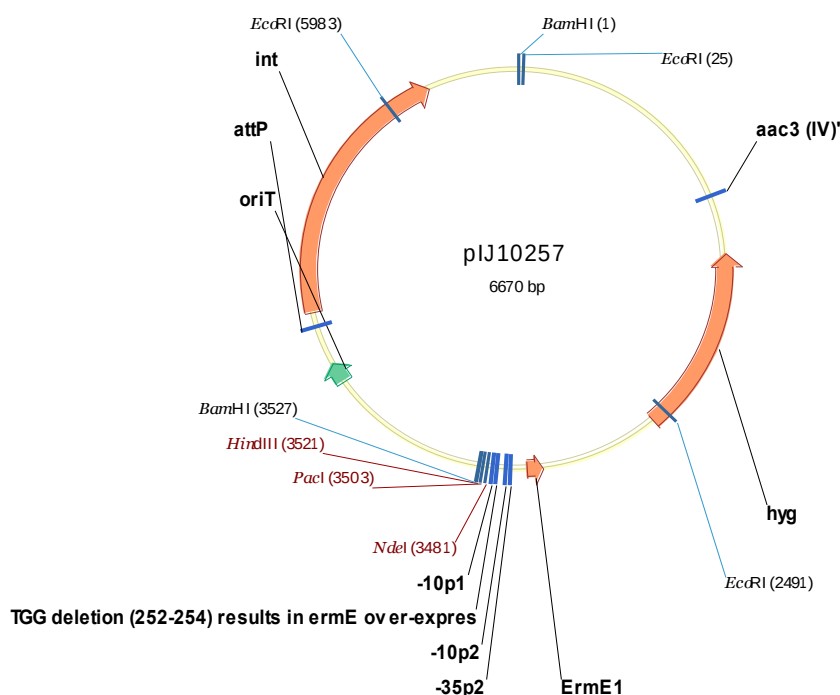


Figura 46. Plasmídeo pIJ 10257. *staK* previamente clonado com *NdeI/PacI* e *staI* com *NdeI/HindIII*. Este plasmídeo possui o gene de resistência a higromicina como marcador de seleção.

4.10.1 PCR Targeting

Nesta curta versão de *PCR targeting* (GUST et al., 2003), nós substituímos o marcador de resistência original do plasmídeo pIJ10257, higromicina, com um cassette obtido de um plasmídeo diferente, neste caso o pIJ773, o qual foi digerido (10µg) com *EcoRI* e *HindIII* para obtenção do fragmento contendo o gene de seleção apramicina. O produto da digestão foi observado em gel de agarose e uma bandade ~1.4 kb foi isolada (Figura 47). Esta banda foi purificada e eluída em um baixo volume, com intuito de se obter uma alta concentração de DNA. Este fragmento foi posteriormente amplificado por PCR utilizando primers específicos (Figura 48).

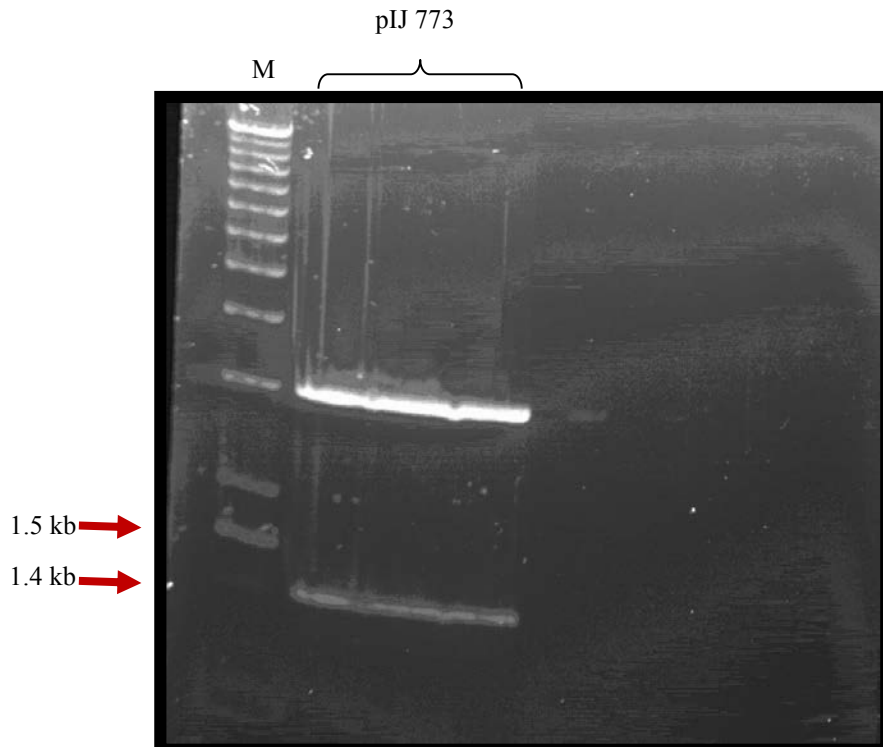


Figura 47. TAE gel de agarose 0.8%. Digestão do plasmídeo pIJ773 com *EcoRI* e *HindIII* (Roche) para obtenção do marcador de seleção apramicina. M- 1kb Marcador molecular (NEB). Seta indica o fragmento correspondente ao marcador de seleção apramicina.

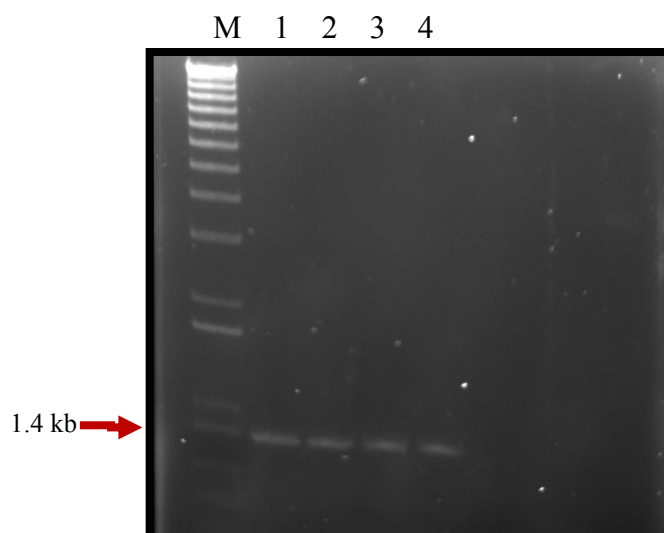


Figura 48. 0.8% TAE gel de agarose representando quatro bandas relacionadas com a amplificação por PCR do cassette apramicina. Foi usada enzima DNA polimerase Herculanase II Fusion (Agilent Technologies) com 4 diferentes temperaturas de melting: 1) 62°C, 2) 60.6°C, 3) 57.7°C e 4) 55°C. M- 1 kb Marcador de peso molecular (NEB).

O plasmídeo original (pIJ10257) foi introduzido em *E. coli* BW25113 por eletroporação. Estas células carregam o plasmídeo pIJ790, o qual possui um gene que marca a recombinação λ red (GUST et al., 2003). Estas células competentes foram transformadas com ~100 ng do cassette purificado e plaqueadas em meio LB contendo apramicina. Das colônias obtidas, foram extraídos plasmídeos os quais foram digeridos para confirmação da presença do gene de resistência a apramicina (Figura 49).

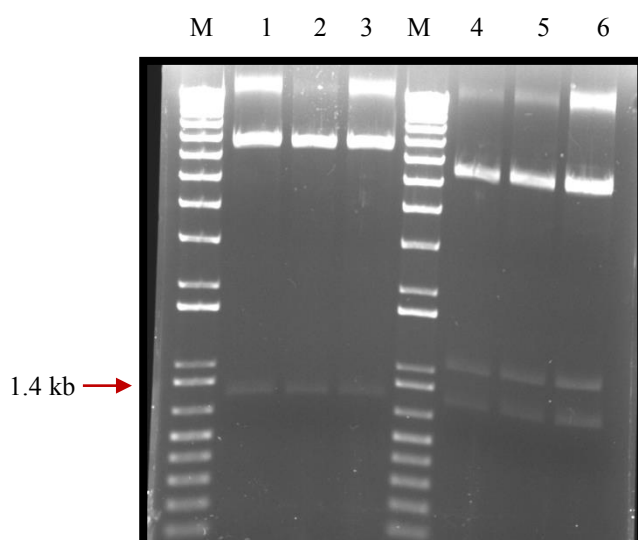


Figura 49. Gel de agarose mostrando a digestão do plasmídeo pIJ10257 com enzima SacI (Roche). Seta indica os fragmentos (~1.4 kb) que correspondem ao marcador de seleção apramicina, confirmando assim que o plasmídeo contendo os *staK* e *staI* são

apramicina resistente. Coluna M- Marcador molecular 1 kb (NEB), colunas 1 a 3 referem-se ao plasmídeo pIJ10257+ *staI* gene e colunas 4 a 6 ao plasmídeo pIJ10257+ *staK* gene.

4.10.2 Conjugação e produção

Os genes das halogenases foram introduzidos em *Amycolatopsis orientalis*, *Actinoplanes teichomyceticus* e *Amycolatopsis* sp. MJM2582 por conjugação do plasmídeo pIJ10257 com *E. coli* ET12567/pUZ8002. A integração do plasmídeo não replicativo foi selecionada usando antibiótico apramicina para *orientalis Amycolatopsis*, *Amycolatopsis* sp. MJM2582 e *Actinoplanes teichomyceticus*, e higromicina apenas para cepa *Actinoplanes teichomyceticus*, uma vez que esta se mostrou sensível a este antibiótico. Todas as cepas mostraram crescimento característico, conforme observado para a cepa selvagem. Exconjugantes apramicina resistente foram cultivados sem seleção de antibiótico por duas rodadas em meio SFM. Foi realizado um *streaking* das colônias para a ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga (Figura 50).

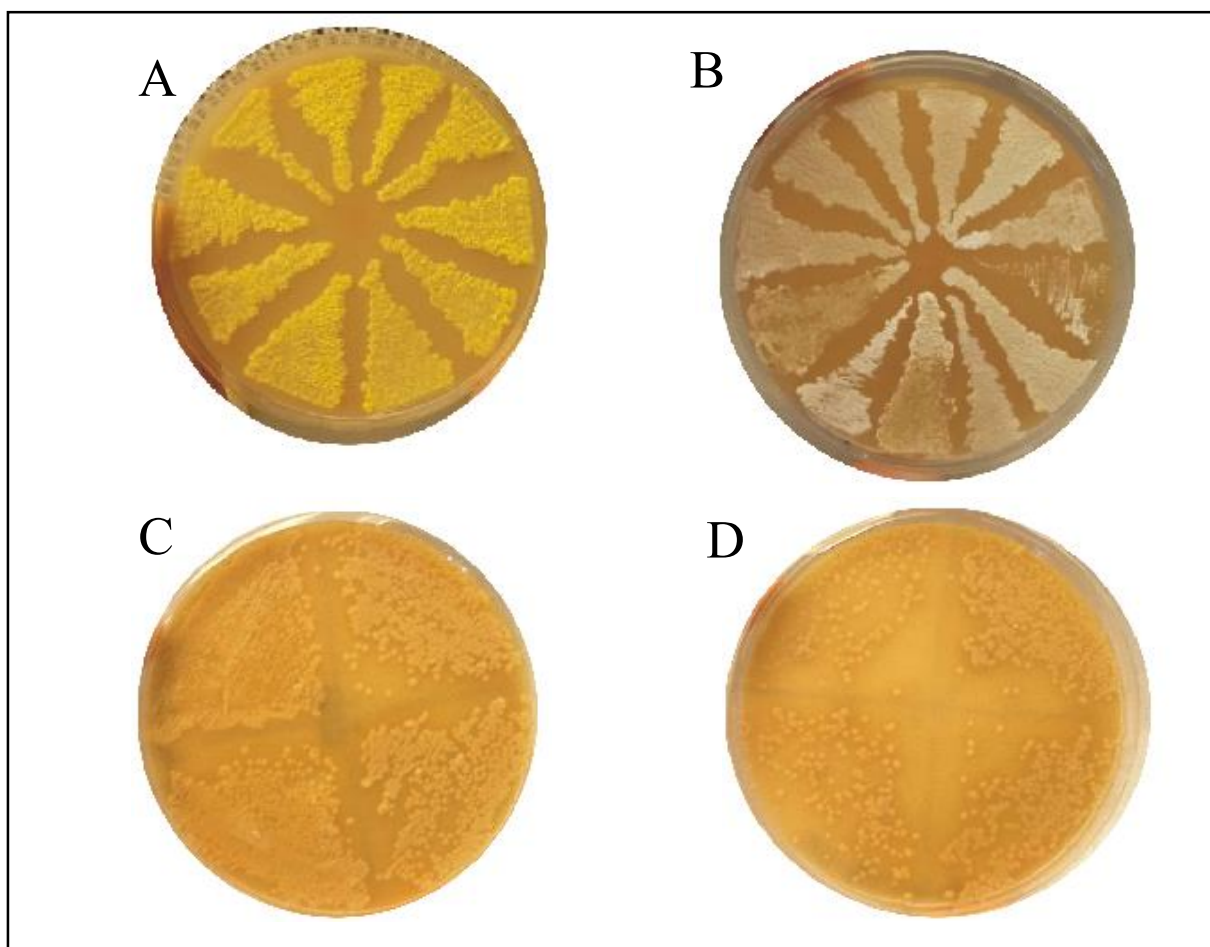


Figura 50. *Streaking* de colônias em placas contendo antibiótico de resistência A. *Amycolatopsis orientalis*, produtora de vancomicina; B. cepa *Amycolatopsis* sp. MJM2582, produtora de ristocetina; C. cepa *Actinoplanes teichomyceticus*, produtora de

teicoplanina; D. cepa *Actinoplanes teichomyceticus*, produtora de teicoplanina usando higromicina como marcador de seleção.

Estes mutantes foram usados para a produção de antibióticos. Primeiramente foram crescidos em meio de cultivo designado para cada cepa (conforme consta nos materiais e métodos ítem 3.9) e após dois dias foram inoculados em meio de produção e permaneceram por 7 dias, incubados a 30°C sob agitação constante (250 rpm).

4.10.3 Análises de Massa

Após a fermentação, as células bacterias produtoras de glicopeptídeos foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado em sistema Thermo Fisher Scientific Surveyor HPLC acoplado a um espectrómetro de massa Thermo Scientific™ LCQFleet™ ion trap equipado com uma fonte de ionização ESI modo positivo. Foi possível observar no espectro que há produção de vancomicina, com eluição de um pico característico no tempo de 4.37 min (Figura 51A) e também de teicoplanina no tempo de 5.65 min. (Figura 51C), para a cepa selvagem, os quais correspondem a m/z 1449 e m/z 1880 para a vancomicina e teicoplanina, respectivamente. Por outro lado, uma pequena produção de ristocetina pela cepa selvagem *Amycolatopsis* sp. MJM2582 (Figura 51B) foi identificado com um pequeno pico correspondente m/z 1034 que eluiu no tempo de 0.52 min.

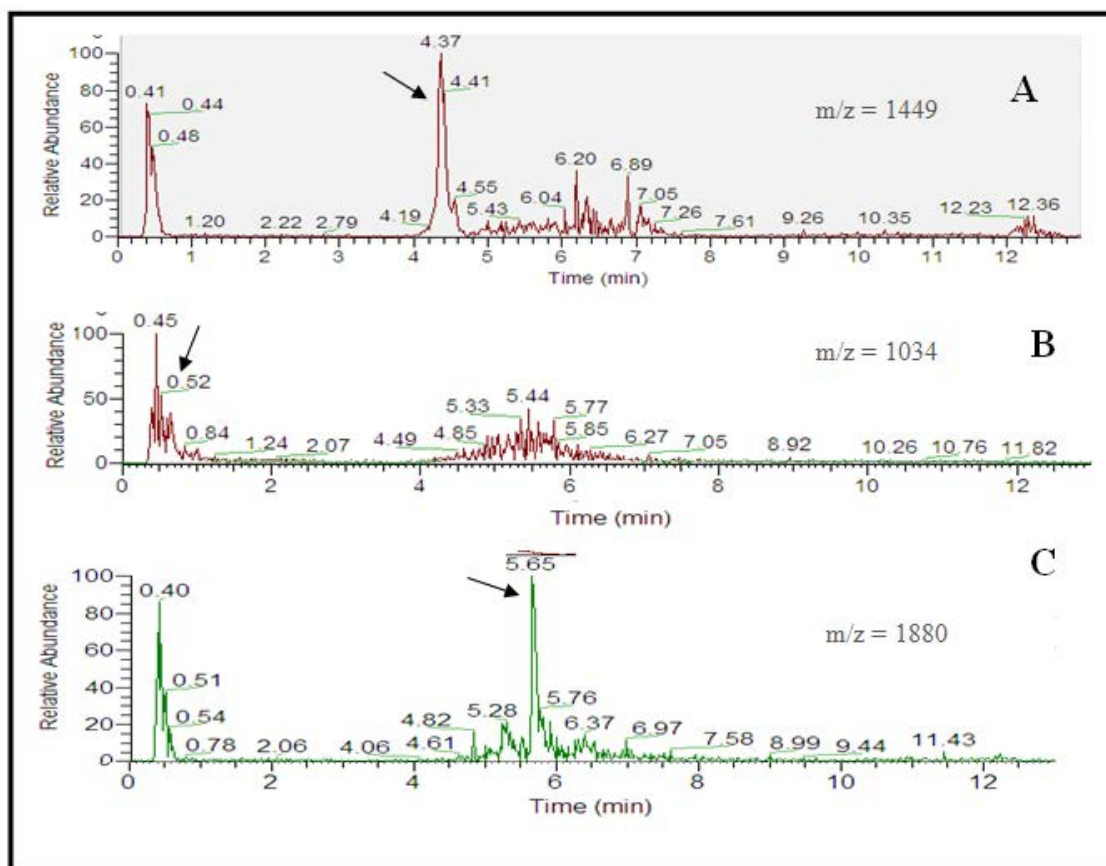


Figura 51. Análises LC-MS da produção pela cepa selvagem de glicopeptídeos: **A.** *Amycolatopsis orientalis*, produtor da vancomicina, tempo de eluição de 4.37 min ; **B.** *Amycolatopsis* sp. MJM2582, produtor de ristocetina, tempo de eluição de 0.52 min; **C.** *Actinoplanes teichomyceticus*, produtor de teicoplanina, tempo de eluição de 5.65 min. Setas indicam os picos referentes ao tempo de eluição. Cada espectro mostra a monitorização iónica seletiva para cada glicopeptídeo.

Três mutantes de cada cepa contendo o gene *staI* e outros três mutantes de cada cepa contendo gene *staK* foram selecionados. Análises de LC-MS / MS de alta resolução dos sobrenadantes da cultura de *Amycolatopsis orientalis* confirmou a produção de vancomicina com massa (m/z) correspondente a $M + H = 1449,254$ Da. No entanto, a adição de um halogénio não pôde ser confirmada: nada foi observado quando se tentou identificar o pico de massa adicionada de um grupo cloro ($[M + H]^+ = 1481-1483$) (Figura 52).

Do mesmo modo, observou-se a produção de teicoplanina por *Actinoplanes teichomyceticus*. Os picos no espectro indicaram a produção de teicoplanina (Figura 54) corresponde à massa obtida pela cepa selvagem ($[M + H]^+ = 1878-1882$, dependendo da presença de ^{37}Cl ou ^{35}Cl). Nestas análises, também não se conseguiu identificar qualquer pico referente à massa de teicoplanina com a massa de um cloro a mais ($[M +$

$H]^+ = 1913-1917$). Teicoplanina pode ter diferentes cadeias laterais de acil, por isso um segundo conjunto de picos de m/z também foi procurado. Os picos fracos observados na Figura 54, para m/z 1913 e 1927 correspondem à isótopos naturais de teicoplanina, em vez de novos compostos. Em relação à produção de ristocetina por *Amycolatopsis* sp. MJM2582 houve problemas com a identificação deste antibiótico em todos os experimentos testados, embora tenhamos utilizado a mesma metodologia descrita e estabelecida por Truman et al (2014) (Figura 53). Sendo assim, não foi possível observar e confirmar a produção de ristocetina ($[M + 2H]^{2+} = 1,034$) por LC-MS / MS, e consequentemente, a incorporação, ou não, de um átomo de halogênio também foi prejudicada. Assim mais experimentos seriam necessários para melhorar a produção deste glicopeptídeo e seus possíveis produtos halogenados.

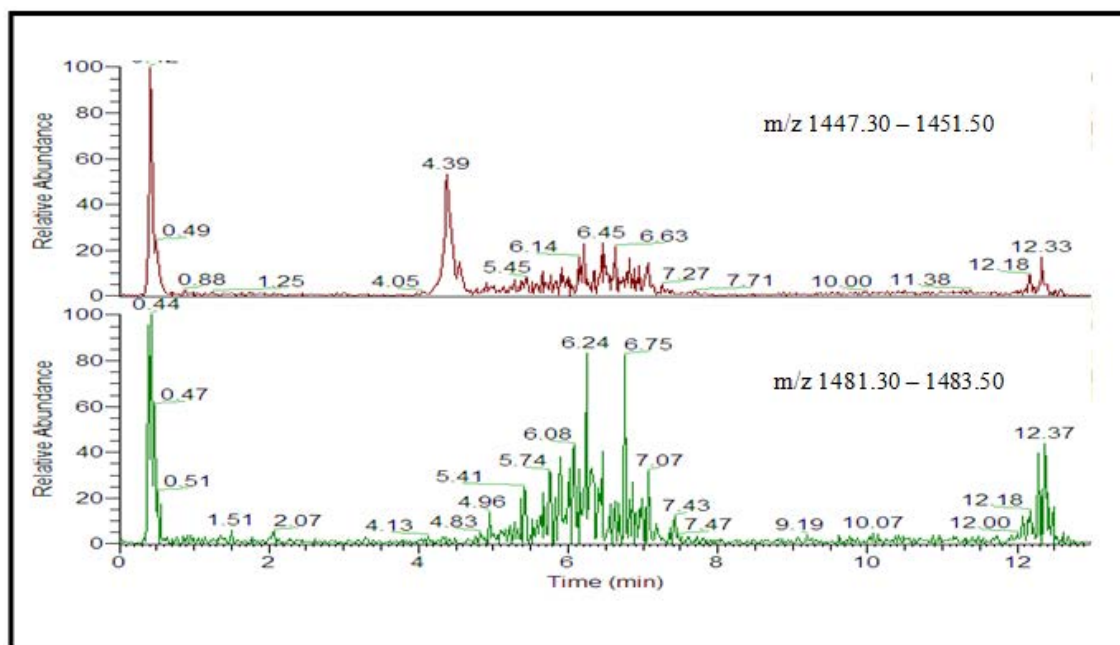


Figura 52. Cromatograma LC-MS da produção de glicopeptídeo por *Amycolatopsis orientalis* (cepa produtora de vancomicina) do mutante contendo gene *staK*. m/z 1481.30 – 1483.50 refere-se a vancomicina adicionada de um halogênio. Nós selecionamos três colônias para cada mutante construídos com *staK* e outras três colônias para mutantes contendo *staI*. Entretanto, análises de massa mostram que todos os mutantes mantêm o mesmo padrão da cepa selvagem.

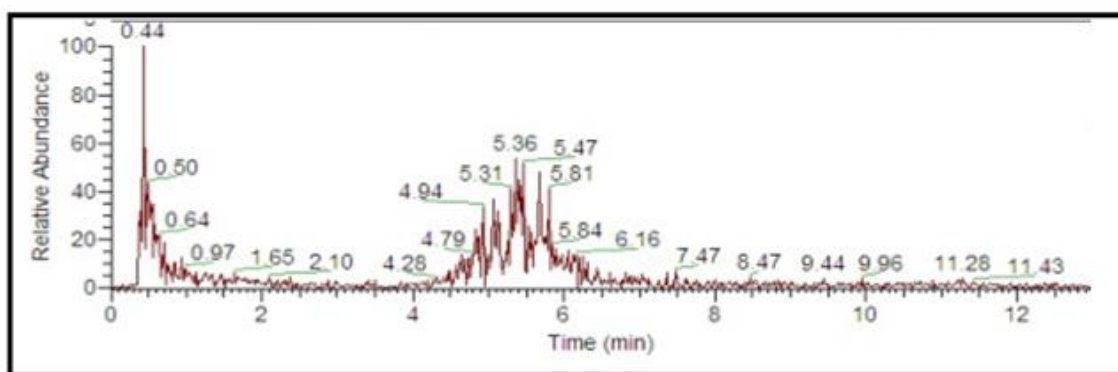


Figura 53. Cromatograma de massa buscando ristocetina produzida por *Amycolatopsis* sp. MJM2582 contendo gene *staI*. O pico correspondente a produção de ristocetina e também a produção de ristocetina acrescida de cloro (m/z 1069.83 – 1071.34) não se faz presente. O mesmo padrão se manteve para todos os mutantes selecionados.

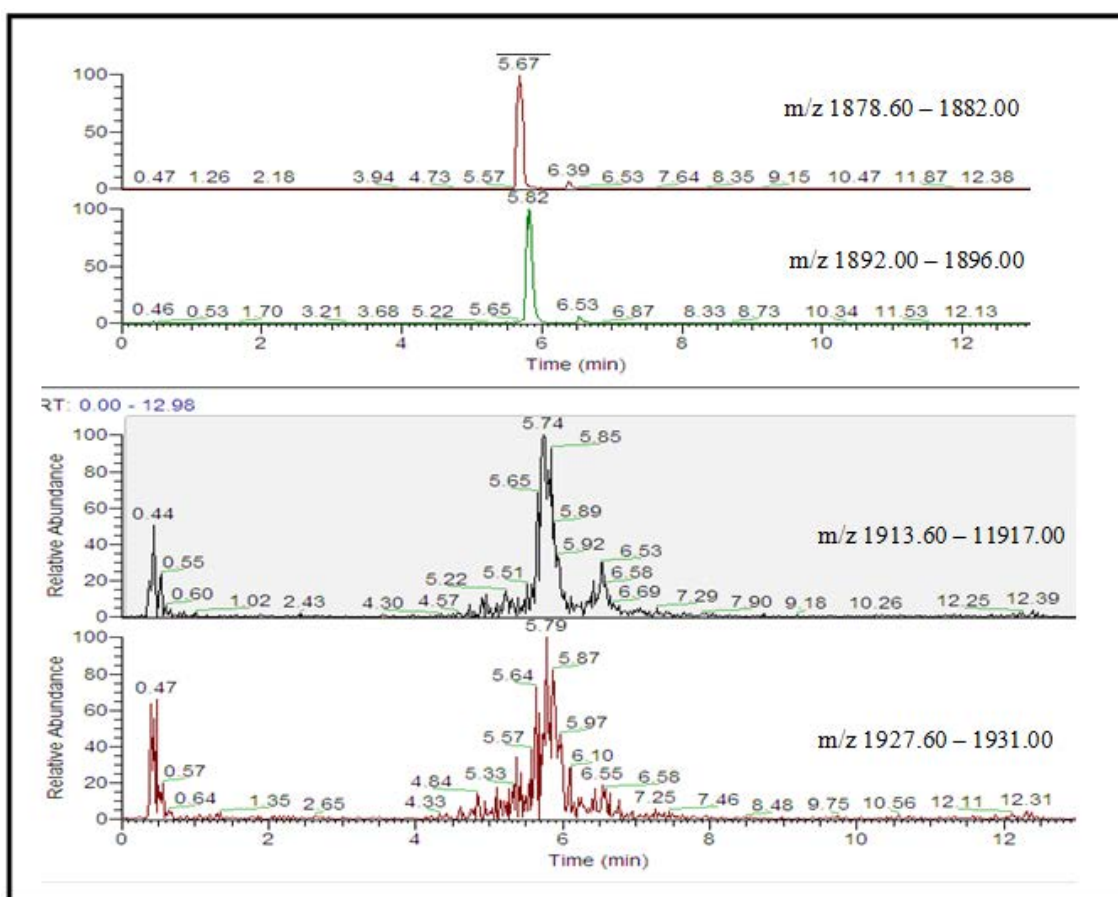


Figura 54. Cromatograma (análises LC-MS) da produção de teicoplamina ($[M+H]^+$ 1878.60 – 1882.00 $[M+Na]^+$ 1892.00 – 1896.00). Três mutantes para cada construção com *staK* e outros três referentes as construções com *staI* foram selecionados. Um mutante contendo gene *staI*, é representado nesta figura indicando não haver pic

correspondentes para produção de teicoplanina adicionada de cloro (m/z 1913.60 – 11917.00 e m/z 1927.60 – 1931.00)

Estudos revelam que a produção de teicoplanina depende tanto da geração quanto da manutenção da cepa produtora. A fim de aperfeiçoar a produção de teicoplanina, nós também realizamos outras produções modificando os meios de cultivo. Foram utilizados o meio E25 (BELTRAMETTI et al., 2004) para cultivo da cepa e meio TM1 (TAURINO et al., 2011) para produção do antibiótico. Horbal (2014) demonstrou que teicoplanina teve um aumento de produtividade de cerca de 1 g/L quando utilizou-se o meio TM1 para produção. Quando dois genes, *tei15** e *tei16**, foram integrados ao cluster gênico sobre controle do gene de resistência *aac(3)IV* no sítio de integração *attB ϕ C31* do cromossomo de *A. teichomyceticus*. Entretanto, as modificações realizadas nos meios de cultura não alteraram o padrão de produção e, consequentemente, picos no cromatograma referentes a um novo derivado clorado de teicoplanina, cuja massa corresponde a m/z 1913,60 1927,6 não foram encontrados (Figura 55). Três mutantes para cada gene foram selecionados e o mesmo padrão foi apresentado em todos.

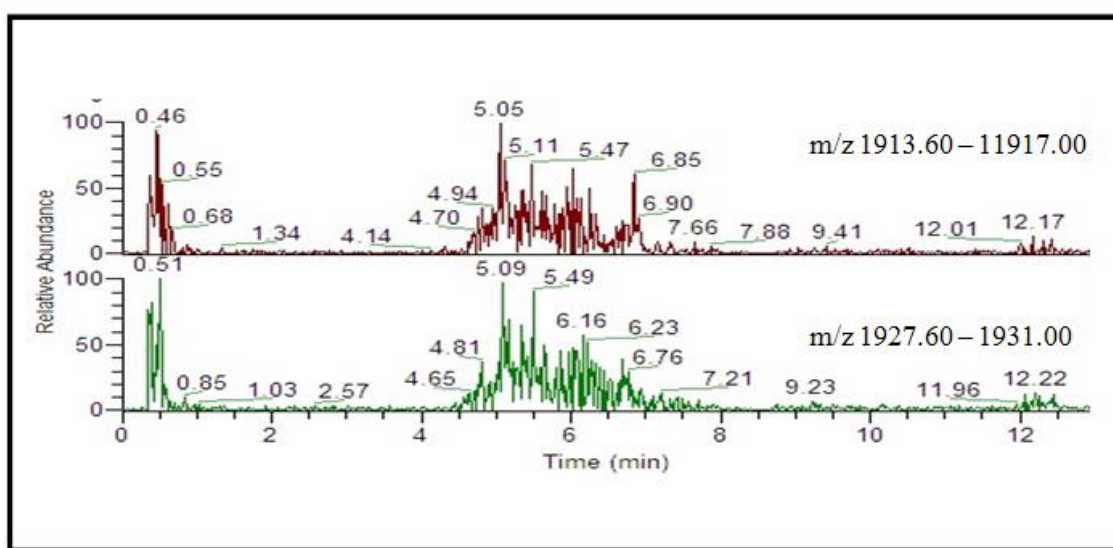


Figura 55. Base de picos da análise cromatográfica para a produção de teicoplanina utilizando meio E25 para cultivo e meio TM1 para produção. Não há pico que se refere a m/z 1913.60 – 1917.00 ou m/z 1927.60 – 1931.00, o qual correspondem para teicoplanina acrescida de cloro.

Uma explicação possível para a ausência de produção de novos derivados de glicopéptidos halogenado pelas cepas mutantes pode ser devido à utilização do plasmídeo integrativo não-replicativo (pIJ10257). Alguns autores descrevem que a

produção pelas cepas que transportam os vetores replicativos poderia ser diferente daquelas contendo vetores integrativos. Isto pode ser causado pela diferença no número de cópias do gene por cromossomo (HORBAL et al., 2014). Proteínas que regulam a expressão, por regiões promotoras de ligação, de outros genes do cluster poderia ser outra hipótese para a não-incorporação de halogênios. Neste caso, *Southern blotting* poderia confirmar se os genes heterólogos são expressos.

Com a intenção de melhorar a expressão de genes heterólogos, foram iniciadas a clonagem dos genes *staI* e *staK* no vetor pKCPAmtcp29, o qual é baseado em pKCPAm (derivado de pKC1139) (HORBAL et al., 2014). Este é um vetor de alto número de cópias e possui promotor heterólogo *aac(3)IVp*. O gene *tcp29* foi clonado no sítio *EcoRV*. No entanto, nós não fomos capazes de ligar os fragmentos gênicos *staI* e *staK* para os respectivos locais de restrição. Mais tempo experimental seria necessário para terminar estas construções e realizar os passos adjacentes, incluindo a análise da produção. Ainda de acordo com a literatura (HORBAL et al., 2014) a substituição dos promotores nativos por promotores heterólogo *aac(3)IVp* influencia nos níveis de produtividade de teicoplanina. Portanto, nós também começamos a trocar o *PermE** promotor de pIJ10257 por *aac(3)IVP* para verificar a importância do promotor, mas estas etapas dos experimentos não foram concluídas devido ao tempo obtido de bolsa BEPE no exterior.

5 Conclusão

Neste trabalho, a realização da clonagem de 4 halogenases foram realizadas com sucesso. No entanto, uma delas apresentou-se insolúvel (*Orf8**), uma com baixa expressão (*StaK*) e duas são solúveis (*ComH* e *StaI*) e assim, foi dada continuidade nos experimentos de purificação. Entretanto, ainda a fim de realizar os estudos com as halogenase *StaK*, foi obtido gene sintético com o objetivo de se obter esta enzima na fração solúvel. Expressão e purificação revelaram que *StaK* foi apresentada na fração solúvel e com esta também pode-se dar continuidade com os experimentos de cristalização. Entretanto, análises espectroscópicas ainda não foram realizadas.

Uma vez que testes de cristalização para as enzimas *ComH*, *StaI* e *StaK* não apresentaram sucesso, teste biofísicos preliminares foram realizados a fim de verificar a qualidade das amostras. Dicroísmo circular foi realizado e mostrou que estas enzimas

estão enoveladas e foi ainda possível obter uma estimativa de porcentagem dos elementos de estrutura secundária das mesmas. A técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) revelou que, com a variação de tampão houve uma mudança significativa na polidispersividade das amostras. Desta forma, foram realizadas alterações nas condições de purificação e novas tentativas de cristalização e também novos experimentos espectroscópicos foram realizados com a halogenase StaI e afim de confirmar esses valores. Com uma alteração de tampão no processo de purificação foi possível observar nas análises espectrométricas de DLS que a enzima StaI encontra-se com valores dentro dos parâmetros considerados como satisfatórios para cristalização de enzimas (apensar que novamente não tivemos sucesso). Dados de dicroísmo circular foram novamente obtidos e confirmam que esta enzima esta enovelada.

Estudo de complementação para proteínas StaI e StaK foram realizados no laboratório do Dr. Andrew Truman no John Innes Centre – UK, embora não houve produção de um novo derivado halogenado como esperado. Entretanto, este estágio forneceu uma base sólida para o aprendizado em técnicas moleculares relacionada a biossíntese combinatorial e genética de *Streptomyces*.

A análise de alinhamento de sequências de halogenases relacionadas com a biossíntese de glicopeptídeos permitiu inferir importantes questões que podem estar relacionadas com a um diferente padrão de halogenação entre as enzimas StaI e StaK da biossíntese do antibiótico A43749. Por fim, a obtenção de modelos para estas duas enzimas foi realizada com sucesso e nos pudemos obter *insights* sobre o processo de halogenação tanto em antibióticos glicopeptídicos em geral como nas bases estruturais que determinam a especificidade e diferente padrões de halogenação pela StaI e StaK.

6 Referências Bibliográficas

AHLERT, J. et al. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. **Science**, v. 297, n. 5584, p. 1173-6, Aug 16 2002.

ALMEIDA, M. et al. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 633-42, Jul 2001.

BADEN, D. G.; CORBETT, M. D. Bromoperoxidases from *Penicillium capitatus*, *Penicillium lamourouxii* and *Rhizopus corymbifer*. **Biochem J**, v. 187, n. 1, p. 205-11, Apr 1 1980.

- BALTZ, R. H. et al. Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in *Streptomyces roseosporus*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 2, p. 66-74, Feb 2006.
- BARNETT, P. et al. Isolation, characterization, and primary structure of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Embellisia didymospora*. **J Biol Chem**, v. 273, n. 36, p. 23381-7, Sep 4 1998.
- BELTRAMETTI, F. et al. Valine influences production and complex composition of glycopeptide antibiotic A40926 in fermentations of *Nonomuraea* sp. ATCC 39727. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 57, n. 1, p. 37-44, Jan 2004.
- BERGER, R. S. 2,6-dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. **Science**, v. 177, n. 4050, p. 704-5, Aug 25 1972.
- BITTO, E. et al. The structure of flavin-dependent tryptophan 7-halogenase RebH. **Proteins**, v. 70, n. 1, p. 289-93, Jan 1 2008.
- BLASIAK, L. C.; DRENNAN, C. L. Structural perspective on enzymatic halogenation. **Acc Chem Res**, v. 42, n. 1, p. 147-55, Jan 20 2009.
- BLASIAK, L. C. et al. Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis. **Nature**, v. 440, n. 7082, p. 368-71, Mar 16 2006.
- BUEDENBENDER, S. et al. Structure and action of the myxobacterial chondrochloren halogenase CndH: a new variant of FAD-dependent halogenases. **J Mol Biol**, v. 385, n. 2, p. 520-30, Jan 16 2009.
- CHANG, H. C.; BUMPUS, J. A. Iodide oxidation and iodine reduction mediated by horseradish peroxidase in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): the superoxide effect. **Proc Natl Sci Counc Repub China B**, v. 25, n. 2, p. 82-9, Apr 2001.
- CHENG, V. C. et al. Strategic measures for the control of surging antimicrobial resistance in Hong Kong and mainland of China. **Emerg Microbes Infect**, v. 4, n. 2, p. e8, Feb 2015.
- CHIU, H. T. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 15, p. 8548-53, Jul 17 2001.
- COATES, A. R.; HU, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 8, p. 1147-54, Dec 2007.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, Nov 25 1988.
- COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clin Infect Dis**, v. 42 Suppl 1, p. S25-34, Jan 1 2006.

DAIRI, T. et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 6, p. 1099-106, Jun 1995.

DENG, H. et al. Fluorinase mediated C-(18)F bond formation, an enzymatic tool for PET labelling. **Chem Commun (Camb)**, n. 6, p. 652-4, Feb 14 2006.

DONG, C. et al. Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. **Science**, v. 309, n. 5744, p. 2216-9, Sep 30 2005.

DONG, C. et al. Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme. **Nature**, v. 427, n. 6974, p. 561-5, Feb 5 2004.

EDWARDS, D. J. et al. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Chem Biol**, v. 11, n. 6, p. 817-33, Jun 2004.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004.

ENFIELD, K. B. et al. Control of simultaneous outbreaks of carbapenemase-producing enterobacteriaceae and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an intensive care unit using interventions promoted in the Centers for Disease Control and Prevention 2012 carbapenemase-resistant Enterobacteriaceae Toolkit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 35, n. 7, p. 810-7, Jul 2014.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 12, p. 666-73, Dec 2006.

FERRE-D'AMARE, A. R.; BURLEY, S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Structure**, v. 2, n. 5, p. 357-9, May 15 1994.

FLASHMAN, E.; SCHOFIELD, C. J. The most versatile of all reactive intermediates? **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 2, p. 86-7, Feb 2007.

FUJIMORI, D. G. et al. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 42, p. 16498-503, Oct 16 2007.

GALONIC, D. P.; VAILLANCOURT, F. H.; WALSH, C. T. Halogenation of unactivated carbon centers in natural product biosynthesis: trichlorination of leucine during barbamide biosynthesis. **J Am Chem Soc**, v. 128, n. 12, p. 3900-1, Mar 29 2006.

GEIB, N. et al. New insights into the first oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 18, n. 10, p. 3081-4, May 15 2008.

GRGURINA, I. et al. Relevance of chlorine-substituent for the antifungal activity of syringomycin and syringotoxin, metabolites of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Experientia**, v. 50, n. 2, p. 130-3, Feb 15 1994.

GRIBBLE, G. W. The diversity of naturally produced organohalogens. **Chemosphere**, v. 52, n. 2, p. 289-97, Jul 2003.

GROLL, M.; HUBER, R.; POTTS, B. C. Crystal structures of Salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of beta-lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. **J Am Chem Soc**, v. 128, n. 15, p. 5136-41, Apr 19 2006.

GUST, B. et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1541-6, Feb 18 2003.

HAHN, M.; STACHELHAUS, T. Harnessing the potential of communication-mediating domains for the biocombinatorial synthesis of nonribosomal peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 2, p. 275-80, Jan 10 2006.

HAMMER, P. E. et al. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. **FEMS Microbiol Lett**, v. 180, n. 1, p. 39-44, Nov 1 1999.

HEIDE, L. et al. Use of a halogenase of hormaomycin biosynthesis for formation of new chlorobiocin analogues with 5-chloropyrrole moieties. **Chembiochem**, v. 9, n. 12, p. 1992-9, Aug 11 2008.

HOFRICHTER, M.; ULLRICH, R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 71, n. 3, p. 276-88, Jul 2006.

HOPWOOD, D. A. et al. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 642-4, Apr 18-24 1985.

HORBAL, L. et al. The pathway-specific regulatory genes, *tei15** and *tei16**, are the master switches of teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 22, p. 9295-309, Nov 2014.

HUBBARD, B. K.; THOMAS, M. G.; WALSH, C. T. Biosynthesis of L-p-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics. **Chem Biol**, v. 7, n. 12, p. 931-42, Dec 2000.

ISUPOV, M. N. et al. Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. **J Mol Biol**, v. 299, n. 4, p. 1035-49, Jun 16 2000.

ITOH, N.; MORINAGA, N.; NOMURA, A. A variety of catalases and bromoperoxidases in genus *Pseudomonas* and their characterization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1122, n. 2, p. 189-95, Jul 31 1992.

KELLER, S. et al. Purification and Partial Characterization of Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 39, n. 13, p. 2300-2302, Jul 3 2000.

KIRNER, S. et al. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 7, p. 1939-43, Apr 1998.

KIRNER, S. et al. The non-haem chloroperoxidase from *Pseudomonas fluorescens* and its relationship to pyrrolnitrin biosynthesis. **Microbiology**, v. 142 (Pt 8), p. 2129-35, Aug 1996.

KIRST, H. A.; THOMPSON, D. G.; NICAS, T. I. Historical yearly usage of vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 5, p. 1303-4, May 1998.

KULIK, H. J. et al. First-principles study of non-heme Fe(II) halogenase SyrB2 reactivity. **J Am Chem Soc**, v. 131, n. 40, p. 14426-33, Oct 14 2009.

KUO, R. Y. et al. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 421-5, Jun 2001.

LASKOWSKI, R. A.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **J Mol Biol**, v. 231, n. 4, p. 1049-67, Jun 20 1993.

LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clin Infect Dis**, v. 42 Suppl 1, p. S5-12, Jan 1 2006.

LITTLECHILD, J. et al. Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes. **J Mol Recognit**, v. 15, n. 5, p. 291-6, Sep-Oct 2002.

MACEDO-RIBEIRO, S. et al. X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. **J Biol Inorg Chem**, v. 4, n. 2, p. 209-19, Apr 1999.

MANTHEY, J. A.; HAGER, L. P. Purification and properties of bromoperoxidase from *Penicillium capitatus*. **J Biol Chem**, v. 256, n. 21, p. 11232-8, Nov 10 1981.

MARAHIEL, M. A.; ESSEN, L. O. Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. **Methods Enzymol**, v. 458, p. 337-51, 2009.

MARSHALL, G. C.; WRIGHT, G. D. Purification and characterization of two haloperoxidases from the glycopeptide antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 219, n. 2, p. 580-3, Feb 15 1996.

MAY, M. Drug development: Time for teamwork. **Nature**, v. 509, n. 7498, p. S4-5, May 1 2014.

MESSERSCHMIDT, A.; PRADE, L.; WEVER, R. Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus

Curvularia inaequalis by X-ray structures of the native and peroxide form. **Biol Chem**, v. 378, n. 3-4, p. 309-15, Mar-Apr 1997.

MESSERSCHMIDT, A.; WEVER, R. X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus Curvularia inaequalis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 1, p. 392-6, Jan 9 1996.

MULLER, K.; FAEH, C.; DIEDERICH, F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1881-6, Sep 28 2007.

MULYANI, S. et al. The thioesterase Bhp is involved in the formation of beta-hydroxytyrosine during balhimycin biosynthesis in Amycolatopsis balhimycina. **Chembiochem**, v. 11, n. 2, p. 266-71, Jan 25 2010.

MURPHY, C. D.; SCHAFFRATH, C.; O'HAGAN, D. Fluorinated natural products: the biosynthesis of fluoroacetate and 4-fluorothreonine in Streptomyces cattleya. **Chemosphere**, v. 52, n. 2, p. 455-61, Jul 2003.

NAGARAJAN, R. Structure-activity relationships of vancomycin-type glycopeptide antibiotics. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 46, n. 8, p. 1181-95, Aug 1993.

NEIDLEMAN, S. L.; GEIGERT, J. Biological halogenation: roles in nature, potential in industry. **Endeavour**, v. 11, n. 1, p. 5-15, 1987.

NEUMANN, C. S.; FUJIMORI, D. G.; WALSH, C. T. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. **Chem Biol**, v. 15, n. 2, p. 99-109, Feb 2008.

NICOLAOU, K. C. et al. Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 38, n. 15, p. 2096-2152, Aug 1999.

NICOLAOU, K. C.; SMITH, A. L.; YUE, E. W. Chemistry and biology of natural and designed enediynes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 13, p. 5881-8, Jul 1 1993.

O'HAGAN, D. et al. Biochemistry: biosynthesis of an organofluorine molecule. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 279, Mar 21 2002.

OHSHIRO, T. et al. Expression of the vanadium-dependent bromoperoxidase gene from a marine macro-alga Corallina pilulifera in Saccharomyces cerevisiae and characterization of the recombinant enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 595-601, Jul 2002.

PATRICELLI, M. P. et al. An endogenous sleep-inducing compound is a novel competitive inhibitor of fatty acid amide hydrolase. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 8, n. 6, p. 613-8, Mar 17 1998.

PEREIRA, E. R. et al. Structure-activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties. **J Med Chem**, v. 39, n. 22, p. 4471-7, Oct 25 1996.

PFEIFER, V. et al. A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis: the biosynthesis of the non-proteinogenic amino acid (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine. **J Biol Chem**, v. 276, n. 42, p. 38370-7, Oct 19 2001.

POOTOOLAL, J. et al. Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 13, p. 8962-7, Jun 25 2002.

PUK, O. et al. Biosynthesis of chloro-beta-hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide antibiotics. **J Bacteriol**, v. 186, n. 18, p. 6093-100, Sep 2004.

RAJESH, E. et al. Naturally occurring products in cancer therapy. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 7, n. Suppl 1, p. S181-3, Apr 2015.

RENIRIE, R. et al. Cofactor and substrate binding to vanadium chloroperoxidase determined by UV-VIS spectroscopy and evidence for high affinity for pervanadate. **Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1133-41, Feb 8 2000.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**, v. 234, n. 3, p. 779-815, Dec 5 1993.

SANCHEZ, C. et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 2, p. 461-6, Jan 11 2005.

STEGMANN, E.; FRASCH, H. J.; WOHLLEBEN, W. Glycopeptide biosynthesis in the context of basic cellular functions. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 595-602, Oct 2010.

STEGMANN, E. et al. Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes. **J Biotechnol**, v. 124, n. 4, p. 640-53, Aug 5 2006.

SUN, H. et al. Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 823-33, 2015.

TAURINO, C. et al. *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. **Microb Cell Fact**, v. 10, p. 82, 2011.

THAKER, M. N.; WRIGHT, G. D. Opportunities for synthetic biology in antibiotics: expanding glycopeptide chemical diversity. **ACS Synth Biol**, v. 4, n. 3, p. 195-206, Mar 20 2015.

TRUMAN, A. W. et al. Chimeric glycosyltransferases for the generation of hybrid glycopeptides. **Chem Biol**, v. 16, n. 6, p. 676-85, Jun 26 2009.

VAILLANCOURT, F. H. et al. Nature's inventory of halogenation catalysts: oxidative strategies predominate. **Chem Rev**, v. 106, n. 8, p. 3364-78, Aug 2006.

VAN PEE, K. H. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 375-99, 1996.

- VAN PEE, K. H. Microbial biosynthesis of halometabolites. **Arch Microbiol**, v. 175, n. 4, p. 250-8, Apr 2001.
- VAN PEE, K. H.; LINGENS, F. Detection of a bromoperoxidase in *Streptomyces phaeochromogenes*. **FEBS Lett**, v. 173, n. 1, p. 5-8, Jul 23 1984.
- VAN PEE, K. H.; PATALLO, E. P. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 70, n. 6, p. 631-41, May 2006.
- VAN PEE, K. H.; UNVERSUCHT, S. Biological dehalogenation and halogenation reactions. **Chemosphere**, v. 52, n. 2, p. 299-312, Jul 2003.
- WAGENKNECHT, H. A.; WOGGON, W. D. Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. **Chem Biol**, v. 4, n. 5, p. 367-72, May 1997.
- WALKER, B. et al. Environment. Looming global-scale failures and missing institutions. **Science**, v. 325, n. 5946, p. 1345-6, Sep 11 2009.
- WEYAND, M. et al. X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. **J Mol Biol**, v. 293, n. 3, p. 595-611, Oct 29 1999.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Web Server issue, p. W668-73, Jul 1 2004.
- WIESNER, W.; VAN PEE, K. H.; LINGENS, F. Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia*. **J Biol Chem**, v. 263, n. 27, p. 13725-32, Sep 25 1988.
- WILLIAMS, A. H.; GRUNEBERG, R. N. Teicoplanin. **J Antimicrob Chemother**, v. 14, n. 5, p. 441-5, Nov 1984.
- WILLIAMS, P. G. et al. Novel iodinated diterpenes from a marine cyanobacterium and red alga assemblage. **Org Lett**, v. 5, n. 22, p. 4167-70, Oct 30 2003.
- WOHLLEBEN, W.; STEGMANN, E.; SUSSMUTH, R. D. Chapter 18. Molecular genetic approaches to analyze glycopeptide biosynthesis. **Methods Enzymol**, v. 458, p. 459-86, 2009.
- WRIGHT, G. D.; SUTHERLAND, A. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 6, p. 260-7, Jun 2007.
- WUOSMAA, A. M.; HAGER, L. P. Methyl chloride transferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites. **Science**, v. 249, n. 4965, p. 160-2, Jul 13 1990.
- YEH, E.; GARNEAU, S.; WALSH, C. T. Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during

rebeccamycin biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 11, p. 3960-5, Mar 15 2005.

YIM, G. et al. Glycopeptide antibiotic biosynthesis. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 67, n. 1, p. 31-41, Jan 2014.

ZAMPELLA, G. et al. Reactivity of peroxo forms of the vanadium haloperoxidase cofactor. A DFT investigation. **J Am Chem Soc**, v. 127, n. 3, p. 953-60, Jan 26 2005.

ZERBE, K. et al. An oxidative phenol coupling reaction catalyzed by oxyB, a cytochrome P450 from the vancomycin-producing microorganism. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 43, n. 48, p. 6709-13, Dec 10 2004.