

5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Aplicação da bioinformática nos estudos de biocatalisadores para a indústria de petróleo: alcanomonoxigenases

AUTORES:

*Bruno G. de Sousa, #Ciáxares M. Carvalho, ¹Paulo S. M. Lucio, ²Umberto L. Fulco, ²Carlos A. G. Blaha

INSTITUIÇÃO:

1LBMP-DBG/UFRN, 2DBF-CB/UFRN, *PPg-CB/UFRN, #PPg-CEP/UFRN
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Brasil

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 5º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 5º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 15 a 22 de outubro de 2009, em Fortaleza-CE. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 5ºPDPETRO.

Aplicação da bioinformática nos estudos de biocatalisadores para a indústria de petróleo: alcano-monoxigenases

Abstract

Many bacterial species are involved in the oil compound degradation. Someone possesses in their metabolic constitution the Alk proteins specialized in n-alkane conversion for carbon and energy sources as found in Bacteria domain. The alkanes are 20-50% of oil components, varying in agreement with their origin. These hydrocarbon compounds are chemically inert and their activation depends on their metabolism. It is detachable the relevance of oxygen, that result in the oxidation of methyl-terminal groups, generating primary alcohol. After that, the product is oxidized by dehydrogenase until fatty acids, metabolized by β -oxidation. The aim of this study is to understand the probable mechanisms utilized by AlkB in the n-alkane substrate selection and conversion in primary alcohol for carbon and energy resources. There were realized computational simulations using atomic structure of cytochrome P450-Terp (PDB 1ctp:A *Pseudomonas* sp.). From this information, through 3-D computational modeling by homology, was obtained an enzymatic tridimensional model of the AlkB of *P. putida* GPo1. The n-alkanes substrate positions were appraised in the 3-D model. The results suggest that the hydrocarbon access the catalytic site through channels that are interconnected. The possible substrate routes for access and exit in the protein were verified through docking simulations. Based on these results and on protein surface hydrophobicity profile analysis, it is proposed a model for the topologic positioning of AlkB in the membrane. This work contributes for the understanding of the molecular mechanisms of biocatalyst-substrate interaction aiming the uptake and degradation of n-alkanes. The application of Bioinformatics in oil industry looks at the development of biocatalysts for biorefin, bioremediation strategies and others cleaned technologies.

Key words: AlkB, 3-D modeling, biodegradation, Alkane, Alkane hydroxylase, Alkane monooxygenase, oxidoreductase, bioinformatics.

Introdução

Muitas espécies de bactérias estão envolvidas no processo de degradação do petróleo. Estes microrganismos podem possuir em sua constituição metabólica biocatalisadores envolvidos na biodegradação de n-alcanos. Os alcanos constituem de 20 a 50% do petróleo, sendo estas variações dependentes da sua origem. Estes compostos hidrocarbonados são quimicamente inertes, devendo ser ativados antes de serem metabolizados, ressaltando a importância da presença de oxigênio, o que resulta na oxidação dos grupamentos metil terminais, gerando álcool primário. O produto gerado é oxidado por desidrogenases até ácidos graxos, os quais são metabolizados através de β -oxidação (Van Hamme et al., 2003).

Estudos revelam que a proteína AlkB inicia o processo catalítico, porém não é conhecida a razão dessa proteína catalisar n-alcanos de tamanhos variados para cada espécie bacteriana (McKenna e Coon, 1970; Van Beilen et al., 1994). Por exemplo, enquanto a mesma proteína em *Pseudomonas putida* GPo1 degrada n-alcanos de C_5 a C_{12} em *P. aeruginosa* PAO1 degrada de C_{12} a C_{16} .

As monooxigenases que contêm dois átomos de Fe^{++} e Cu são encontradas em bactérias metanotróficas, como *Methylococcus capsulatus* (Murrell, 1994). As Bactérias das classes α , β , e γ -proteobacteria (*Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*), e bactérias Gram-positivas com alto conteúdo GC (*Nocardia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Rhodococcus*) possuem uma proteína de

membrana que contém dois átomos de Fe⁺⁺ (Smits et al., 1999; Van Beilen et al., 2001, Van Beilen et al., 2003). Leveduras e fungos filamentosos possuem citocromo P450 (CYP) de membrana (Ayala e Torres, 2004; Craft et al., 2003; van Beilen e Funhoff, 2005), que estão envolvidos em degradação de alcanos.

As alcano hidroxilases de *P. putida* GPo1 e de outras eubactérias podem ser utilizadas como biocatalisadores em indústrias, potencializando a produção de derivados do petróleo (Witholt et al., 1990; Van Beilen e Funhoff, 2007) e em aplicações ambientais (Whyte et al., 2002). Por isso é considerada o protótipo das proteínas non-heme Ferro oxigenases, que incluem as desaturases (proteínas que removem dois átomos de hidrogênio de um composto orgânico, criando uma dupla ligação entre dois átomos de carbono) e xileno monooxigenases (Shanklin e Cahoon, 1998).

O objetivo deste trabalho é a realização de estudos *in silico* para investigar a possível relação entre as estruturas primária e terciária da proteína alcano hidroxilase AlkB de *Pseudomonas putida* GPo1 com a capacidade de discriminar n-alcanos.

Metodologia

A figura 1 resume as etapas do trabalho que inclui as diferentes análises *in silico*.

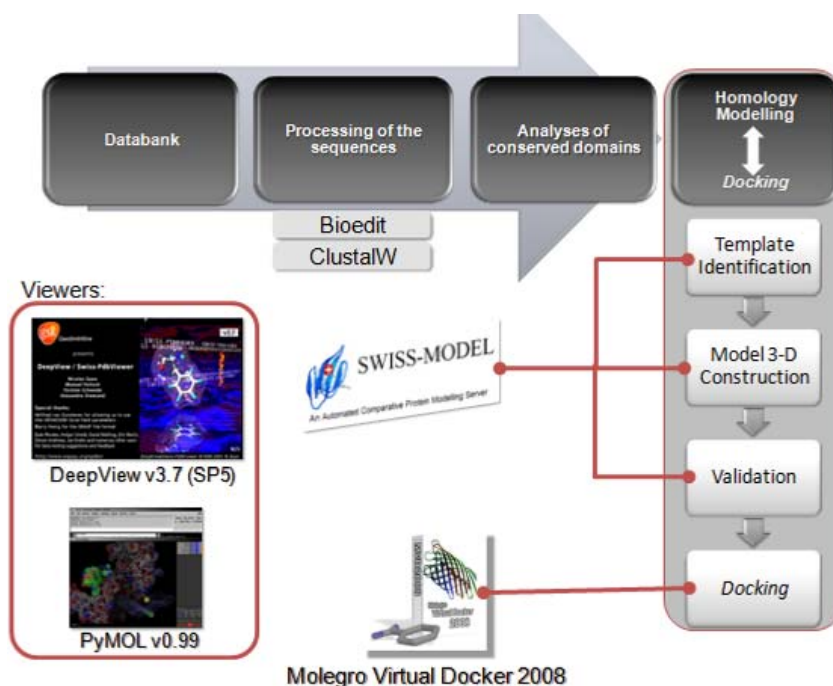


Figura 1. Resumo da metodologia

Base de dados:

Seqüências da proteína AlkB pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. foram selecionadas do Genbank contido no NCBI por similaridade com auxílio do pacote BLASTp, utilizando inicialmente como seqüência alvo (*query*) a proteína alcano hidroxilase de *Pseudomonas putida* GPo1. Para análise comparativa, utilizou-se a seqüência protéica CYP153A6 - *Mycobacterium* sp. HXN-1500, que também foi obtido pelo mesmo banco de dados e posteriormente utilizado como seqüência *query*. As seqüências foram selecionadas conforme os seguintes critérios: proteína completa (AlkB), não hipotética e substrato conhecido (n-alcanos).

Molde cristalográfico

Cristal utilizado: 1cpt:A (Citocromo P450-Terp) de *Pseudomonas sp.*, resolução de 2,3 Angstroms obtido por difração de Raio-X, R-fator: 18,9% (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/atlas/sequence/1cpt.html>) com 29% de identidade em relação a sequência primária da proteína CYP153A6.

Obtenção dos modelos 3-D por homologia

A partir da estrutura primária da proteína AlkB de *Pseudomonas putida* GPo1 foi gerado o modelo 3-D **AlkB-Pseu_m**. Como controle positivo e para estudos comparativos foi também obtido o modelo 3-D **CYP153A6m** da proteína CYP153A6 de *Mycobacterium sp.* HXN-1500. Os modelos 3-D foram obtidos através de modelagem por homologia utilizando como molde cristalográfico 1cpt:A no servidor *on-line* Swiss-Model. Os dados 3-D gerados foram analisados utilizando os programas DeepView v3.7 (SP5), PyMOL v0.99 e Molegro Virtual Docker (2008).

Validação

Os modelos gerados **AlkB-Pseu_m** e **CYP153A6m** foram validados com auxílio da ferramenta Structure Assessment do servidor Swiss-Model que avalia com base nos seguintes bancos de dados: ProQRes, Anolea, Gromos, QMEAN, DFire, Whatcheck, Procheck, DSSP e Promotif.

Docking

Foi realizado *docking* no modelo **AlkB-Pseu_m** de *P. putida* GPo1 com alcoóis (produto) e n-alcanos de C₅, C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ e C₁₂ com o programa Molegro Virtual Docker (2008). Os parâmetros de configuração permaneceram no padrão do software mudando-se apenas a resolução para 0,35 Angstroms na precisão da distância atômica. Foram realizados *dockings* com o *grid* ajustado à cavidade de maior volume detectada no modelo protéico 3-D. Para cada *dockings* com substrato e *dockings* com produto foram obtidas dez simulações.

Resultados e Discussão

Utilizando as sequências de aminoácidos da proteína AlkB de bactérias *P. putida* GPo1 e de *Mycobacterium* HXN-1500, foram obtidos modelos tridimensionais através de modelagem por homologia com molde cristalográfico protéico 1cpt:A de *Pseudomonas sp.*. Com base em dados de Funhoff et al., (2006), Van Beilen and Funhoff (2007) e nossos dados estruturais 3-D das proteínas **AlkB-Pseu_m** e **CYP153A6m** observa-se que similaridade estrutural com elevada conservação de *folding* (Figura 2). O modelo obtido da proteína **AlkB-Pseu_m** foi validado através de três abordagens: i) modelagem da estrutura 3-D da proteína CYP153A6 (*Mycobacterium sp.* HXN-1500) proposto por Funhoff et al., (2006); ii) Comparação do **CYP153A6m** e o modelo **AlkB-Pseu_m**, conforme as predições *in silico* e iii) análises comparativas dos gráficos de Ramachandran (Figura 3).

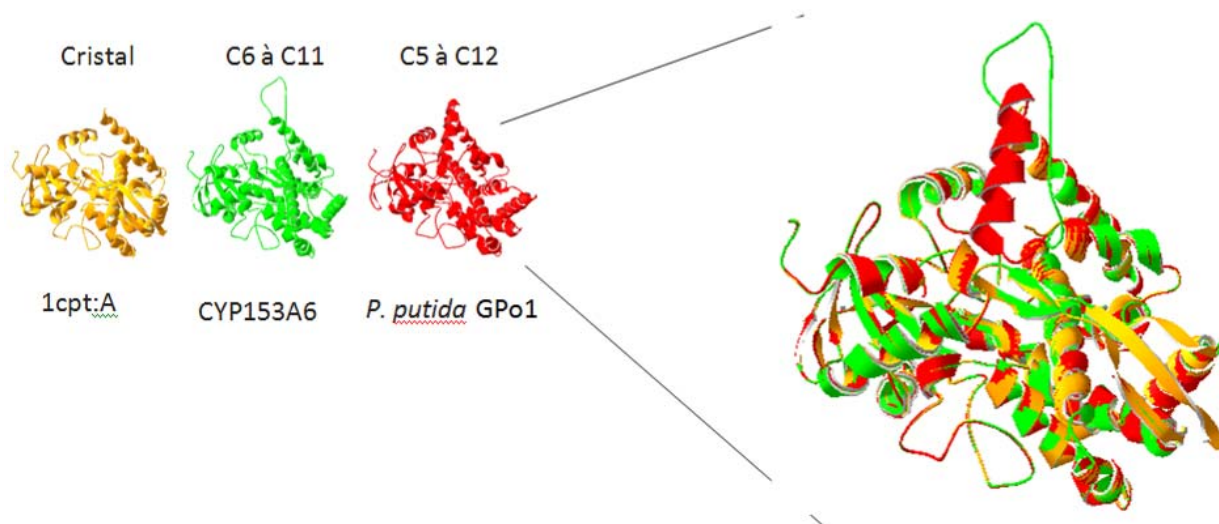


Figura 2. Modelos gerados pelo servidor Swiss-Model com as suas respectivas variações de utilização de substratos. A direita os 03 modelos 3-D sobrepostos evidenciam as regiões similares das regiões estruturalmente diferentes (imagens geradas pelo software DeepView – versão 3.7 SP5).

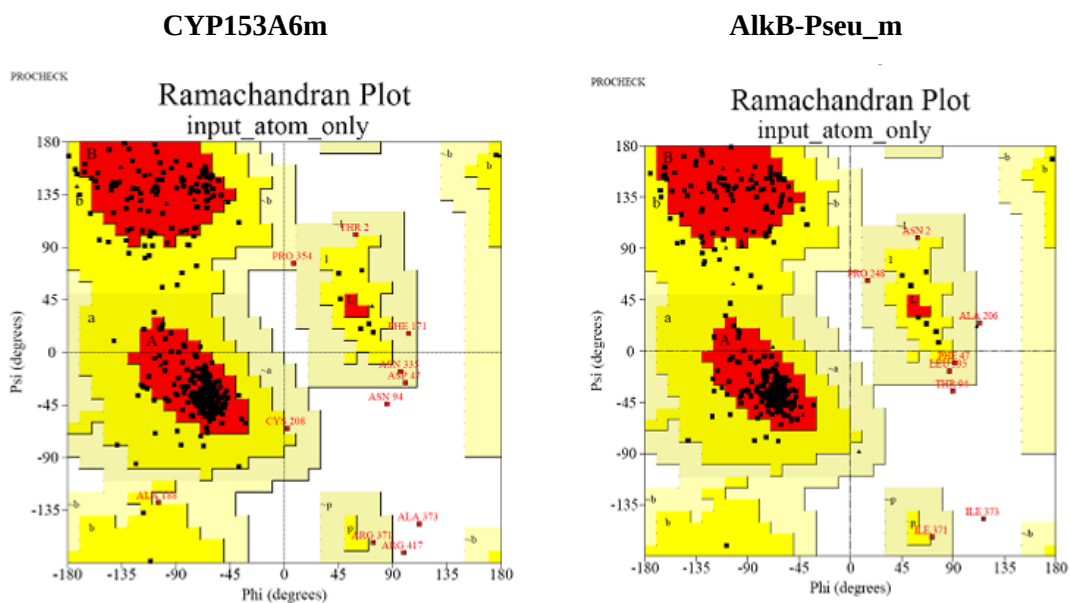


Figura 3. Gráficos de Ramachandran obtidos pelo programa PROCHECK referente a cada modelo de proteína AlkB gerado. Considerando-se a análise de 118 estruturas com uma resolução de pelo menos 2.0 Angstroms e R-factor não maior que 20%, é esperado um modelo de boa qualidade (acima de 90%).

A validação do modelo da proteína **AlkB-Pseu_m** proposto neste trabalho foi considerada aceitável de acordo com ProQRes, Anolea, Gromos, QMEAN, DFire, Whatcheck, Procheck, DSSP e Promotif (dados não apresentados). Este resultado é esperado devido a ocorrência do altamente conservado domínio histidina (HIS) presente nestas enzimas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise estatística comparativa dos Gráficos de Ramachandran gerados para validação dos modelos protéicos obtidos.

Comparação estatística dos Gráficos de Ramachandran das proteínas AlkB modeladas									
Modelo	Residues in most favoured regions [A,B,L]	Residues additional allowed regions [a,b,l,p]	Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	Residues disallowed regions	Number of non-glycine and non-proline residues	Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	Number of glycine residues (shown as triangles)	Number of proline residues	Total number of residues
CYP153A6m	313 (84,4%)	48 (12,9%)	7 (1,9%)	3 (0,8%)	371 (100%)	2	21	26	420
AlkB-Pseu_m	302 (86,3%)	41 (11,7%)	4 (1,1%)	3 (0,9%)	350 (100%)	2	29	21	402

Para investigar os possíveis modos de captação, interação e catálise dos hidrocarbonetos (n-alcanos) com a alceno hidroxilase de *Pseudomonas putida* GPo1 foram realizadas simulações de *docking* com a proteína modelada **AlkB-Pseu_m**. O *grid* ajustado à cavidade de maior volume (1951.88 Å³), proposto como um possível canal, viabilizou análises pontuais comparativas entre os aminoácidos críticos do modelo reconstruído CYP153A6m com os resíduos dessa região. Dez simulações com substrato pentano (C₅) a dodecano (C₁₂), energeticamente ordenados e selecionados (menor energia), permitiram inferir locais de entrada e saída do substrato. Posições de acomodação dos n-alcanos à proteína propiciaram levantar hipóteses sobre possíveis trajetórias na alceno hidroxilase. Na Figura 4 são visualizados três canais relativamente hidrofóbicos (setas pretas) são sugeridos como regiões preferenciais de entrada para os hidrocarbonetos. Esta hipótese é fundamentada com base nas dez simulações de *docking* com pentano (C₅) a dodecano (C₁₂) com mínima energia (visualizados em cor rosa na figura). Também foi sugerido um possível canal de saída para o substrato, porção relativamente hidrofílica (seta em azul).

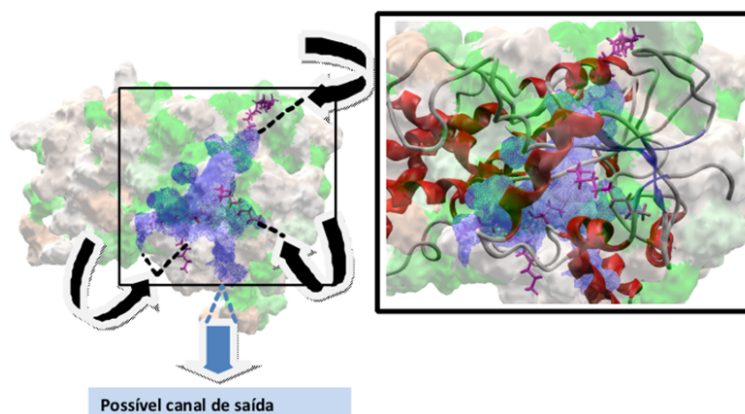


Figura 4. Regiões preferenciais para entrada e trânsito de substrato alceno na **AlkB-Pseu_m**. O docking de substrato n-alceno e a geração de imagens foi realizada com o software Molegro Virtual Docker 2008.

O ancoramento de proteínas na membrana pode ser avaliado *in silico* por diversas estratégias, segundo Lindahl et al. (2008). De acordo com Beilen et al. (2001) a proteína alceno hidroxilase de *Pseudomonas putida* GPo1 está ancorada à membrana interna e exposta no citoplasma bacteriano exibindo canais hidrofóbicos. A partir das análises *in silico* com a proteína modelada **AlkB-Pseu_m**, e dos resultados obtidos de *docking* com substrato e somados ao perfil de hidrofobicidade da superfície protéica sustentam este modelo topológico

Conclusões

Utilizando as seqüências de proteínas alceno hidroxilase existentes em microrganismos degradadores nos bancos de dados e através de uma abordagem *in silico* de modelagem 3-D por homologia, obtivemos o modelo **AlkB-Pseu_m** da alceno hidroxilase de *P. putida* GPo1.

Neste trabalho, foi possível a inferência dos possíveis sítios de entrada e saída do hidrocarboneto na enzima contribuindo para a compreensão dos possíveis mecanismos de *uptake* e degradação de n-alcenos. A aplicação de Bioinformática na indústria de Petróleo e Gás é promissora para o desenvolvimento de biocatalisadores para biorefino, bioremediação e outras tecnologias limpas.

Referências Bibliográficas

- Eisenhaber F., Frömmel, C., Argos, P. (1996). Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. II. The paradox with secondary structural class. *Proteins*. 25,169-179.
- Eggink, G., Lageveen, R. G., Altenburg, B. and Witholt, B. (1987). Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 17712-17718.
- Funhoff, E. G., Bauer, U., Garcia-Rubio, I., Witholt, B. and van Beilen, J. B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J. Bacteriol.* 2006, 188:5220-5227.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1988). Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. 73, 237-244.
- Katopodis, A. G., Smith, H. A. and May, S. W. (1988). New oxyfunctionalization capabilities for ω -hydroxylases: asymmetric aliphatic sulfoxidation and branched ether demethylation. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 897-899.
- Katopodis, A. G., Wimalasena, K., Lee, J. and May, S. W. (1984). Mechanistic studies on non-heme iron monooxygenase catalysis: epoxidation, aldehyde formation, and demethylation by the ω -hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7928-7935.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 503-549.
- Murrell, J. C. (1994). Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation* 5, 145-159.
- Smits, T. H., Röthlisberger, M., Witholt, B. and van Beilen, J. B. (1999). Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* 1, 307-318.
- Van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Fanchini, A. G., Rothlisberger, M. and Witholt, B. (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology*. 147, 1621-1630.

Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. and Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil. Gas. Sci. Technol.* 58, 427-440.

Witholt, B., Smet, M. J., Kingma, J., van Beilen, J. B., Kok, M., Lageveen, R. G. and Eggink, G. (1990). Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends. Biotechnol.* 8, 46-52.

Van Beilen, J. B. and Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 13-21.

Whyte, L.G., Smits, T.H., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C.W. and van Beilen, J.B. (2002). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl Environ Microbiol.* 68, 5933-5942.

Shanklin, J. and Cahoon, E. B. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49, 611-641.

May, S. W. and Abbott, B. J. (1972). Enzymatic epoxidation. I. Alkane epoxidation by the ω -hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1230-1234.

May, S. W. and Katopodis, A. G. (1986). Oxygenation of alcohol and sulphide substrates by a prototypical non-haem iron monooxygenase: catalysis and biotechnological potential. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 17-21.

McKenna, E. J. and Coon, M. J. (1970). Enzymatic ω -oxidation IV Purification and properties of the ω -hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* 245, 3882-3889.

Pereira, M. S. Estudos *in silico* da proteína AlkB e prospecção de bactérias alcanotróficas em solos da bacia petrolífera potiguar. 70p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

Van Beilen, J. B., Kingma, J. and Witholt, B. (1994). Substrate specificity of the alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans* GPo1. *Enzyme Microb Technol.* 16, 904-911.

Van Beilen, J. B., Funhoff, E. G. (2005). Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 308-314.

Swiss-Model, An Automated Comparative Protein Modelling Server. <http://swissmodel.expasy.org/>

Software's: (Storn, R.; Price, K. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A. Gehlhaar, D. K.; Verkhivker, G.; Rejto, P. A.; Fogel, D. B.; Fogel, L. J.; Freer, S. T. Molegro Virtual Docker v2.4.0, 2008); (Nicolas Guex, Manuel Peitsch, Torsten Schwede, Alexandre Diemand. DeepView v3.7 (SP5)); (Warren L. Delano, Joni W. Lam. PyMOL v0.99).