

6º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Biodegradação de fenantreno: Modelagem Computacional 3-D da proteína de uptake TbuX de *Ralstonia eutropha* JMP134

AUTORES:

*Bruno G. de Sousa, #Ciáxares M. Carvalho, ¹Paulo S. M. Lucio, ²Umberto L. Fulco, ¹Carlos 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 6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 09 a 13 de outubro de 2011, em Florianópolis-SC. 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 6ºPDPETRO.

Biodegradação de fenantreno: Modelagem Computacional 3-D da proteína de *uptake* TbuX de *Ralstonia eutropha* JMP134

Abstract

The phenanthrene is a Hydrocarbon Polycyclic Aromatic (HPA) known for its toxicity and environmental recalcitrance. There are gaps in the knowledge of degradation process of HPA's by prokaryotes with regard to *uptake* of the substrate. In this work, the *uptake* process of phenanthrene is evaluated through in silico studies of computational modeling and simulation. Was used the TbuXm 3-D model, generated with TbuX toluene carrier protein of *Ralstonia eutropha* JMP134. These data suggest that the TbuX protein displays biochemical characteristics predicted compatible for the transport of phenanthrene in *R. eutropha* JMP134. Based on these data it is possible to perform computer simulations to determine the efficiency of this transporter and the amino acids critical for the uptake aimed at designing improved biocatalysts for SMS applications in the oil industry.

Introdução

A degradação dos HAP's no ambiente pode ocorrer através de processos químicos e físicos que são lentos e/ou incompletos, sendo a biodegradação aeróbica e/ou anaeróbica fundamentais (Prince e Drake 1999). A grande diversidade e complexidade molecular dos HAP's é um desafio biotecnológico e bioinformático no atual contexto das ciências "ómicas" (Pérez-Pantoja *et al.* 2008). É relevante destacar a problemática ambiental do fenantreno decorrente da atividade petrolífera, o que permitiu conhecer que o naftaleno e o fenantreno têm rotas metabólicas em comum durante a sua degradação (Ouyang *et al.* 2004). No entanto, no processo de degradação de HAP's por microrganismos existem lacunas no que se refere ao *uptake* do substrato.

Simulações computacionais com modelagem molecular e estrutural estão provando serem cruciais na obtenção de dados experimentais, proporcionando análises a uma resolução atômica em reações enzimáticas, identificar prováveis mecanismos químicos, analisar os efeitos das mutações e variações genéticas, identificar as causas de especificidade, e derivar relações estrutura-atividade (Lonsdale *et al.* 2010). Com o intuito de obter dados estruturais e de catálises, foram realizados estudos com a proteína TbuX de *R. eutropha* JMP134 gerando subsídios para sustentar o seu envolvimento no *uptake* de fenantreno.

Metodologia

Através do servidor online Swiss-Model, foi gerado modelo 3-D por homologia da proteína TbuX com o molde PDB:3bryB e subsequentemente *docking* com substrato.

- Análise das estruturas primárias e secundárias

As sequências foram analisadas em alinhamento múltiplo pelo programa Clustal-W (Higgins e Sharp 1988) e visualizados pelo BioEdit (Hall 1999) e T-Coffee EMBL-EBI. O programa PREDATOR (Argos *et al.* 1996) foi utilizado para a predição das estruturas secundárias.

- Domínios conservados e assinaturas proteicas

Todas as informações de domínios e assinaturas proteicas foram obtidas através da ferramenta Sequence Feature Scan presente no servidor online Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) que está associado aos seguintes bancos de dados: InterPro, Pfam, TIGRFAMs, PROSITE, SUPERFAMILY, ProDom, PRINTS, SMART, PSIPRED, DISOPRED.

- Molde cristalográfico

Transportador de HAP's – Cristal utilizado: PDB:3bryB (Transportador de tolueno) de *R. pickettii*, resolução de 3,2 Angstroms obtido por difração de Raio-X, R-fator: 0,268% (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/3bry/summary.html>) com 70,67% de identidade em relação à sequência primária da proteína TbuX *R. euthropha*. O cristal identificado (fragmento 26-458) é uma proteína de membrana organizado em duas cadeias A e B idênticas. Ligante associado: C8H(Hidroxietiloxi)tri(etiloxi)octano).

- Construção dos modelos 3-D

Foi construído o modelo proteico TbuXm de *R. euthropha* JMP134. As sequências foram modeladas pelo servidor Swiss-Model e analisadas pelos programas DeepView v3.7 (SP5), PyMOL v0.99 e Molegro Virtual Docker 2010.

- Validação

O modelo gerado foi validado 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

Foram realizados *docking* no modelo proteico: TbuXm de *R. euthropha* JMP134 e no *template* PDB:3bryB de *R. pickettii*, com tolueno e fenantreno, através do programa Molegro Virtual Docker, 2010. Os parâmetros de configuração permaneceram no padrão do software, mudando-se apenas a resolução para 0,35 Angstroms. Inicialmente foi realizado *docking* incluindo toda a área (*grid*) proteica. Posteriormente, com base nos resultados, foram realizados *dockings* com o grid centralizado à cavidade de maior volume calculado pelo software. Foram obtidas cem simulações: cinquenta com a molécula tolueno e cinquenta com a molécula fenantreno.

Resultados e Discussão

Utilizando as sequências primária da proteína TbuX de *R. euthropha* JMP134, foi obtido o modelo tridimensional TbuXm através da modelagem por homologia com o molde cristalográfico proteico PDB:3bryB de *R. pickettii* (Figura 1).

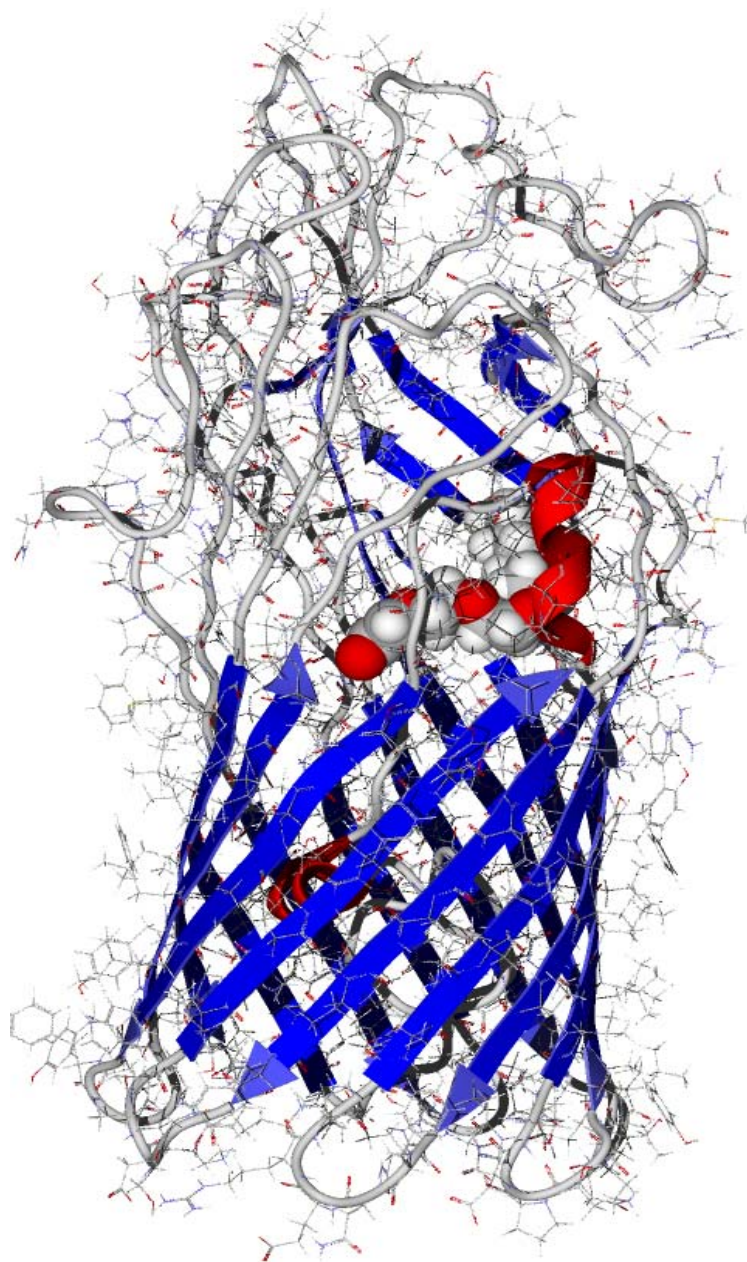


Figura 1. Modelo construído da proteína TbuXm de *R. eutropha* JMP134 por homologia aos moldes cristalográficos PDB:3bryB de *R. pickettii*. Estrutura proteica com cadeia lateral, em vermelho estruturas secundárias alfa-hélices, e em azul folhas-betas. Ligante C8H inserido através do posicionamento inferido com o cristal e *docking* (imagens geradas pelo software *Molegro Virtual Docker* 2010).

A validação do modelo proteico TbuXm de *R. eutropha* JMP134 proposta neste trabalho foi considerada aceitável. Os dados obtidos pelo programa PROCHECK, gráfico Ramachandran, mostram uma alta qualidade estrutural do modelo 3-D proteico construído (Figura 2).

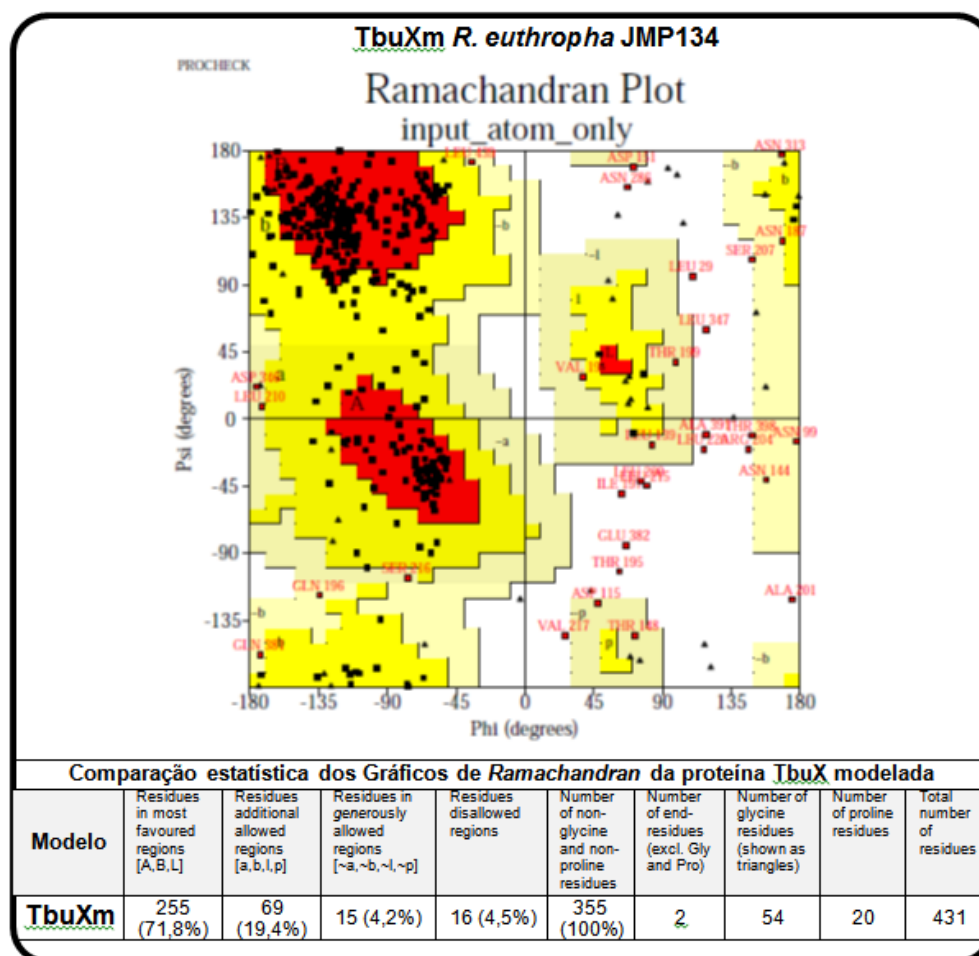


Figura 2. Gráficos de Ramachandran obtidos pelo programa PROCHECK referente ao modelo proteico gerado. Considerando-se a análise de 118 estruturas com uma resolução de pelo menos 2.0 Angstroms e R-factor não maior que 20%, é esperado um modelo de boa qualidade (acima de 90%).

O gráfico de Ramachandran, indica a boa qualidade do modelo proposto, uma vez que 91,20 % dos resíduos de aminoácidos modelados apresentam ângulos espacialmente possíveis, em regiões favorecidas do gráfico. A qualidade estereomérica está também diretamente relacionada com a identidade da sequência primária TbuX com o molde cristalográfico PDB:3bryB.

Hearn *et al.*, (2008) relataram que os cristais estruturais de duas proteínas da membrana externa de *Pseudomonas putida* (TodX) e *Ralstonia pickettii* (TbuX), implicados no transporte do BTEX, fazem parte da subfamília FadL, família de proteínas transportadoras de ácido graxos. Segundo este autor, as macromoléculas TodX e o TbuX possuem um canal hidrofóbico com uma molécula detergente C8E4 ligado a resíduos que se estendem desde a superfície extracelular. Essas proteínas possuem um mecanismo de transporte para substratos hidrofóbicos que são veiculados do ambiente extracelular para o meio periplasmático através de um canal, pelo domínio proteico conhecido como escotilha.

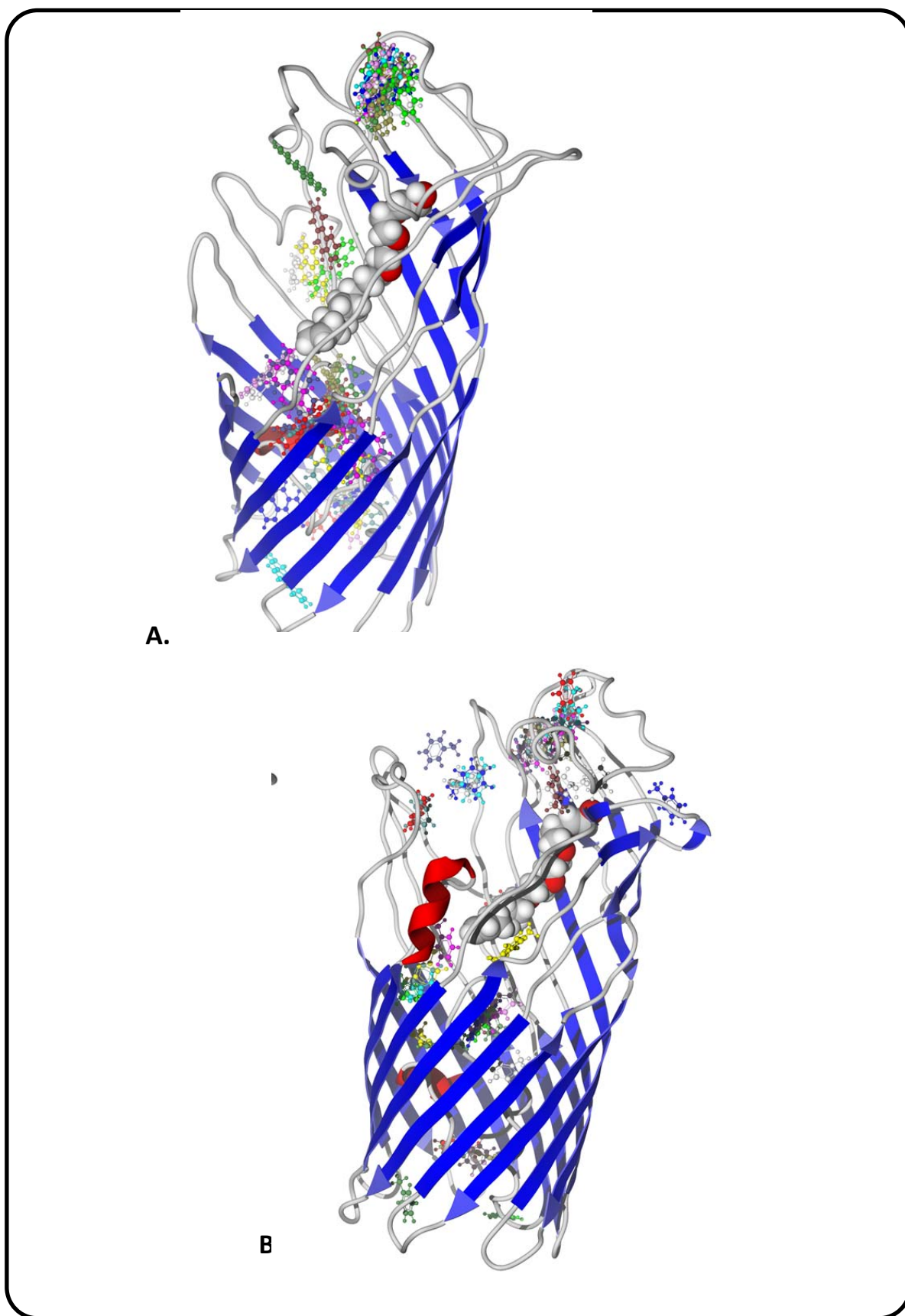


Figura 3. Docking avaliativo com o substrato tolueno e fenantreno. **A.** Docking no template cristalográfico PDB:3bryB de *R. pickettii* com o substrato tolueno e fenantreno **B.** Modelo construído da proteína TbuXm de *R. euthropha* JMP134 por homologia aos moldes cristalográficos 3bryB de *R. pickettii*. Estrutura proteica com cadeia lateral, em vermelho estruturas secundárias alfa-hélices, e em azul folhas-betas. Ligante C8H inserido através do posicionamento inferido com o cristal e dockina (imagens geradas pelo software Molearo

A proteína transportadora de tolueno, TbuXm de *R. eutropha* JMP134, foi modelada computacionalmente por homologia a sequências primárias de aminoácidos pertencentes a um *template* cristalográfico. Foi validada e testada através de *docking*. A sua estereo espacialidade é compatível para estudos com *docking* com seu respectivo substrato tolueno (Figura 3). Segundo Prince e Drake (1999), os microrganismos, dentre eles os procariotos, são considerados a principal via de degradação de HAP's. Somando com os estudos das rotas metabólicas de degradação construídas e estudadas por (Pérez-Pantoja *et al.* 2008) e com os recursos computacionais conhecidos, atualmente retratados por (Ouyang *et al.* 2004), o uso dessas estratégias de predição de estruturas 3-D de proteínas de interesse biotecnológico como a obtida neste trabalho poderão auxiliar na engenharia de enzimas visando potencializar as vias de degradação, possibilitando direta ou indiretamente o aumento da velocidade e/ou espectro degradativo de HAP's em microrganismos modificados geneticamente (Lonsdale *et al.* 2010).

Conclusões

A estrutura 3-D da proteína TbuX de *R. eutropha* JMP134, foi modelada computacionalmente por homologia e validada. Os dados decorrentes de simulação computacional com o modelo 3-D deste importante bactéria degradadora de HPAs, é possível especular que outros petroderivados também sejam transportados pela mesma proteína que transporta tolueno, outro importante poluente ambiental. Baseado nestes dados obtidos é possível realizar simulação computacional para determinar a eficiência deste transportador e os aminoácidos críticos para o uptake visando o desenho de biocatalizadores aprimorados para aplicações em SMS na indústria petrolífera.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPgCB/UFRN).

Referências Bibliográficas

- Frishman, D. Argos, P. (1996). PREDATOR Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng* Feb; 9 (2):133-142
- 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.
- Hearn, E.M. *et al.*, (2008). Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 24;105 (25):8601-6
- Higgins, D.G. Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. Dec 15;73 (1):237-44.
- Lonsdale, R., Ranaghan, K. E., Mulholland, A. J. (2010). Computational Enzymology. *Royal Society of Chemistry*. V.46, n.14, April, P.2333-2512.
- Ouyang, J. (2004). Phenanthrene Pathway Map. 2004. Disponível em: <http://umbdd.msi.umn.edu/pha/pha_map.html>. Acesso em: 08 nov. 2010.
- Perez-Pantoja, D., R. De La Iglesia, *et al.* (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev*, v.32, n.5, Aug, p.736-94.
- Prince, R.C. and Drake, E.N. (1999). Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D.C. *et al.* (Ed.) *Bioremediation of contaminated soils*. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.89-110.