

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização de uma arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.**

Dissertação de Mestrado

DOUGLAS SOUZA VIEIRA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marilene Henning Vainstein

Orientadora

Prof Dr. Charley Christian Staats

Coorientador

Porto Alegre, agosto de 2020

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora e coorientador, Prof Marilene Henning Vainstein e Prof Charley C. Staats, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pelas conversas e discussões científicas, pelo apoio, ensinamentos, paciência a mim depositada.

Aos meus colegas de bancada Henrique Brito, Amanda Napp, Evandro Pereira, Julia Reuwsaat, Vanessa Barcellos, Fernanda Lopes, Gabriela Zottis e todos os outros amigos que tive a oportunidade de fazer no Centro de Biotecnologia.

Aos professores Augusto Schrank e Livia Kmetzch pela atenção e acompanhamento das atividades realizadas nos laboratórios, sempre dispostos a ensinar e solucionar os problemas e dúvidas no decorrer do trabalho.

Ao pessoal da secretaria do PPGBCM, em especial à Silvia Centeno, pela disponibilidade e palavras condescendentes, bem como palavras de apoio no decorrer deste trabalho.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o meu amadurecimento profissional junto à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	3
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	8
<b>LISTA DE TABELAS</b>	10
<b>RESUMO</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<i>Roseomonas gilardii</i>	18
Promiscuidade catalítica	19
Aplicações de enzimas na agricultura	20
Aplicações na indústria petrolífera	21
<b>OBJETIVOS</b>	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	25
Análise e classificação de sequências preditas de proteínas	25
Modelagem Molecular por Homologia Estrutural	25
Estimativa de qualidade do modelo.	25
Análise de <i>Docking</i> Molecular	26
Clonagem em vetor de expressão pET23d+	26
Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	27
Ensaio de atividade enzimática.	29
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	30
Análise da sequência primária de RgARS1	30
Predição da estrutura molecular de RgARS1	31
Predição de atracamento molecular de RgARS1 a seu substrato	33
Predição da promiscuidade enzimática <i>in silico</i>	36
Análise de conservação estrutural	38
Sítio catalítico de arilsulfatase de <i>Roseomonas gilardii</i> .	40
Expressão heteróloga de RgARS1	42
Avaliação da atividade enzimática de RgARS1	46
<b>CONCLUSÕES</b>	48
<b>PERSPECTIVAS</b>	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>S</b>	enxofre
<b>O</b>	oxigênio
<b>C</b>	carbono
<b>fG</b>	formil-glicina
<b>m/m</b>	Massa molar do soluto
<b>%</b>	Percentual
<b>H</b>	hidrogênio
<b>N</b>	nitrogênio
<b>SO<sub>2</sub></b>	dióxido de enxofre
<b>ECHA</b>	Agência Europeia das Substâncias Químicas
<b>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	sulfito
<b>CID</b>	Classificação de propriedades físico-químicas
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>MG-RAST</b>	<i>Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo.
<b>IMO</b>	Organização Marítima Internacional
<b><i>Psi</i></b>	lbf/in <sup>2</sup> ou libra-força por polegada quadrada
<b>GMQE</b>	<i>Global Model Quality Estimated</i>
<b>QSQE</b>	<i>Quaternary Structure Quality Estimated</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>DUF</b>	<i>Domain Unknown Function.</i>

<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase.
<b>μ</b>	Micro (unidade de medida).
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio.
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto.
<b>nm</b>	nanômetro
<b>M</b>	molar.
<b>g</b>	grama
<b>RgARS1</b>	Aril Sulfatase de <i>Roseomonas gilardii</i>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espécies químicas encontrados no petróleo com a presença do átomo de enxofre. Fonte: Imagem adaptada de Rocha *et al.* 2019.....Página 12.
- Figura 2. Molécula de endosulfan. Imagem editada pelo autor. As coordenadas estruturais das imagens foram obtidas do banco de dados *PubChem* do *National Center for Biotechnology Information* (CID=3224).....Página 14.
- Figura 3. Imagem de microscopia eletrônica de *Roseomonas gilardii*. Fonte: Han *et al.*, 2003.....Página 15.
- Figura 4. Estimativa de mercado de enzimas fosfatase e sulfatases. Fonte: *Grand View Research Inc.* 2017.....Página 18.
- Figura 5. Estruturas tridimensionais da arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* construídas por homologia estrutural.....Página 29.
- Figura 6. Diagrama esquemático de uma cadeia de aminoácidos, mostrando diferentes ângulos  $\phi$  e  $\psi$ . Fonte Mahmood *et al.* 2015.....Página 30.
- Figura 7. Representação tridimensional da região de menor energia de ancoragem do substrato sulfato 4-nitrofenil de potássio.....Página 33.
- Figura 8. Representação tridimensional da região de menor energia de ancoragem do agente químico Paraoxon.....Página 34.
- Figura 9. Topologia da fenda catalítica de arilsulfatase imagem em corte lateral da enzima com os agentes químicos analisados.....Página 35.
- Figura 10. Topologia da fenda catalítica compartilhada, imagem em vista superior da fenda catalítica.....Página 37.
- Figura 11. Representação tridimensional de estruturas homólogas.....Página 37.
- Figura 12. Composição de aminoácidos presentes no sítio catalítico da estrutura predita para arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.....Página 39.
- Figura 13. Resultado da amplificação por PCR do gene *RgARS1* proveniente do vetor *puc57*.....Página 41.
- Figura 14. Resultado do ensaio enzimático de clivagem.....Página 42.
- Figura 15. Detecção do gene *RgARS1* no vetor *pET23d(+)*.....Página 43.
- Figura 15. Resultado da expressão da proteína *RgARS1* em *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS.....Página 44.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Percentual estimado de átomos presentes no petróleo bruto.....Página 13.
- Tabela 2. O teor de enxofre em combustíveis no Brasil. ANP N° 807, de 23 de janeiro de 2020.....Página 23.
- Tabela 3. Resultados de diferentes estimativas de qualidade estrutural.....Página 36.
- Tabela 4. Resultado da análise no *software online ProtParam*.....Página 44.
- Tabela 5. Arilsulfatase microbiana com expressão heteróloga.....Página 45.
- Tabela 6. Atividade sulfatase (Sem adição de íons metálicos).....Página 46.
- Tabela 7. Atividade sulfatase (Com adição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ).....Página 47.

## RESUMO

Majoritariamente, ésteres de sulfato são hidrolisados por enzimas da classe arilsulfatase (EC 3.1.6.1). Aplicação biotecnológica dessa classe de enzimas pode impulsionar o mercado agrícola de biocatalisadores. Pois no contexto ambiental, essas classe desempenham um papel primordial no ciclo biogeoquímico do enxofre, mas também estão associadas à atividade promíscua, atuando de forma paralela na ciclagem de outros elementos químicos. Nas últimas décadas, arilsulfatase têm sido relacionada à degradação de compostos xenobióticos. Até o momento, diferentes membros da classe arilsulfatase, foram caracterizados, tanto em procariotos, quanto em eucariotos. No entanto, o estudo de arilsulfatase microbiana, derivadas de estudos de metagenômica, ainda é incipiente. Neste trabalho descrevemos uma arilsulfatase derivada de um metagenoma contendo sequências de microrganismos com capacidade de metabolizar compostos derivados do petróleo. O gene codificante da arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* foi identificado e clonado no vetor pET23d(+) e expresso na linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. A atividade enzimática foi determinada com o substrato sulfato-4-nitrofenil de potássio. A descrição tridimensional da enzima foi determinada por homologia estrutural e inferências de atividade enzimática promíscua foram determinadas *in silico*, por análise de *Docking Molecular*. Os resultados aqui apresentados contribuem para uma melhor compreensão das propriedades moleculares da enzima arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.

## ABSTRACT

Mostly, sulfate esters are hydrolyzed by enzymes of the arylsulfatase class (EC 3.1.6.1). Biotechnological application of this class of enzymes can boost the agricultural market for biocatalysts. For in the environmental context, this class plays a major role in the sulfur biogeochemical cycle, but they are also associated with promiscuous activity, acting in parallel in the cycling of other chemical elements. In the last decades, arylsulfatase has been related to the degradation of xenobiotic compounds. To date, different members of the arylsulfatase class have been characterized, both in prokaryotes and in eukaryotes. However, the study of microbial arylsulfatase, derived from metagenomics studies, is still incipient. In this work, we describe an arylsulfatase derived from a metagenome containing sequences of microorganisms capable of metabolizing petroleum-derived compounds. The *Roseomonas gilardii* aryl sulfatase gene was identified and cloned into the vector pET23d (+) and expressed in the strain *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. The enzymatic activity was provided with the substrate potassium sulfate-4-nitrophenyl. A three-dimensional description of the enzyme provided by structural homology and inferences of promiscuous enzymatic activity were determined in silico, by Molecular Docking analysis. The results here contribute to a better understanding of the molecular properties of the arylsulfatase enzyme of *Roseomonas gilardii*.

## 1. INTRODUÇÃO

A microbiota ambiental coordena uma importante etapa no ciclo biogeoquímico do enxofre (S) em diferentes ecossistemas marinhos e terrestres. O enxofre também está presente em estruturas químicas que constituem o petróleo bruto, produtos químicos sintéticos com alto grau de toxicidade. Quando o enxofre apresenta quatro ligações covalentes ao átomo de oxigênio (O), constitui o grupo químico Sulfato, podendo este grupo químico ser convertido em Sulfeto e/ou Sulfito, durante a degradação da matéria orgânica mediada por microrganismos fermentadores. Essa reação é essencial para a produção de energia em bactérias “litotróficas”, que utilizam enxofre ou outros elementos inorgânicos como aceptor final de elétrons. Estima-se que, há cerca de 3,5 bilhões de anos, o primeiro tipo de metabolismo energético, utilizando via anaeróbica na terra, tenha sido mediado por microrganismos fermentadores e redutores de Sulfato (Anantharaman *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2019; Rocha *et al.*, 2019).

As enzimas da classe sulfatases (EC 3.1.6) derivadas de microrganismos desempenham um papel fundamental no ciclo biogeoquímico do enxofre, bem como, na degradação de glicosaminoglicanos sulfatados, no espaço extracelular. Majoritariamente, estruturas químicas de ésteres de sulfato são hidrolisadas por enzimas da classe arilsulfatase (EC 3.1.6.1), sendo essa classe amplamente distribuída em procariotos e eucariotos (Stressler *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2019). Em procariotos, a classe arilsulfatase tem sido identificada e relacionada a diferentes processos como atividade promíscua, biorremediação de compostos antropogênicos e, mais recentemente, com áreas contaminadas com petróleo (Gianfreda *et al.*, 2005; Nobeli *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012; Chaudhary *et al.*, 2017; Charlotte *et al.*, 2018).

O sítio catalítico da enzima arilsulfatase em procariotos é caracterizado por uma sequência motivo conservada no domínio das sulfatases. O aminoácido modificado, a formilglicina (fG), é obtido por um processo pós-traducional e atua como o principal doador de prótons rompendo a ligação química do átomo de carbono (C) junto ao oxigênio (O) ligado ao grupo Sulfato. Esta reação é mediada por um íon metálico, que atua como cofator enzimático, e a topologia do sítio ativo também é compartilhada por diferentes gêneros microbianos. A reação da enzima arilsulfatase microbiana representa um processo molecular primordial no complexo ciclo biogeoquímico do enxofre no meio ambiente (Stressler *et al.*, 2016; Anantharaman *et al.*, 2018).

As frações de enxofre encontradas no petróleo podem variar desde 0,05% (m/m), em um óleo com baixa densidade, até 6,0% em um óleo com alta densidade (Speight *et al.*, 2014). A definição moderna do petróleo o descreve como um material de composição química complexa, de ocorrência natural, formado de matéria orgânica sedimentar, tendo, predominantemente, compostos químicos contendo carbono (C) e hidrogênio (H). Estes compostos também podem ocorrer associados a elementos metálicos e não metálicos como: enxofre (S), nitrogênio (N) e oxigênio (O) (Rocha *et al.* 2019). A tabela 1 exemplifica os percentuais estimados para uma amostra generalista de petróleo bruto.

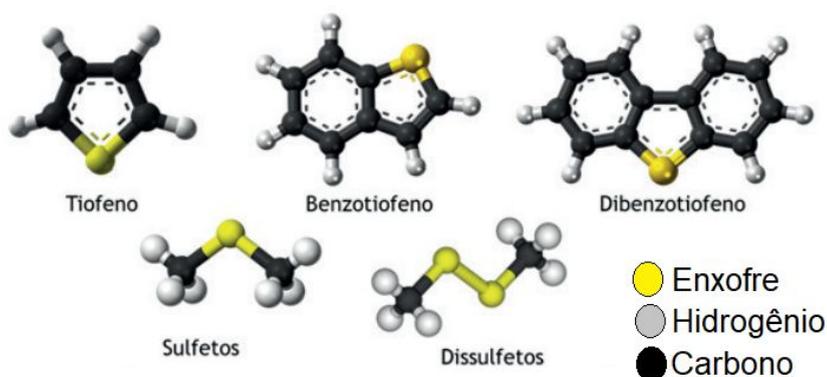
**Tabela 1:** Percentual estimado de átomos presentes no petróleo bruto.

<b>Átomos</b>	<b>% (m/m)</b>
Carbono	83,0-87,0
Hidrogênio	10,0-14,0
Enxofre	0,05-6,0
Nitrogênio	0,01-2,0
Oxigênio	0,05-1,5

Fonte: James G. Speight. A química e tecnologia do petróleo (2014).

O percentual de enxofre presente no petróleo bruto é considerado um problema econômico e ambiental, uma vez que, durante o processo de refinamento, na produção de combustíveis, existe uma etapa de refino do óleo bruto específica para a remoção de frações de enxofre. Caso esta etapa não seja realizada, são liberadas grandes quantidades de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) na atmosfera durante a queima de combustíveis, como gasolina e diesel. Assim, SO<sub>2</sub> representa um dos principais poluentes atmosféricos e, também, está diretamente relacionado ao fenômeno de chuvas ácidas, responsável por causar corrosão em estruturas metálicas (Denome *et al.*, 1993; Rocha *et al.*, 2019).

De forma semelhante, são encontradas outras espécies químicas contendo Enxofre na sua composição com percentual elevado de toxicidade como sulfetos, dissulfetos, benzotiofeno, dibenzotiofeno e tiofenos (Figura 1). Compostos orgânicos polares carregados como o enxofre podem corresponder até 15% do petróleo bruto, variando de acordo com a origem do óleo, evolução térmica e alterações secundárias da sua formação (Rocha *et al.* 2019).



**Figura 1.** Espécies químicas encontrados no petróleo com a presença do átomo de enxofre. Fonte: Imagem adaptada de Rocha *et al.* 2019.

Considerando as características ambientais ligadas ao ciclo do enxofre e a atividade nativa da enzima arilsulfatase microbiana é possível supor diferentes aplicações biotecnológicas na indústria petrolífera. De acordo com Pabis *et al.* (2016), muitas enzimas nativas das reações de hidrólise de Sulfato também podem atuar na hidrólise de outros substratos com graus variados de eficiência. Essa sugestão condiz com a matriz complexa e generalista do petróleo.

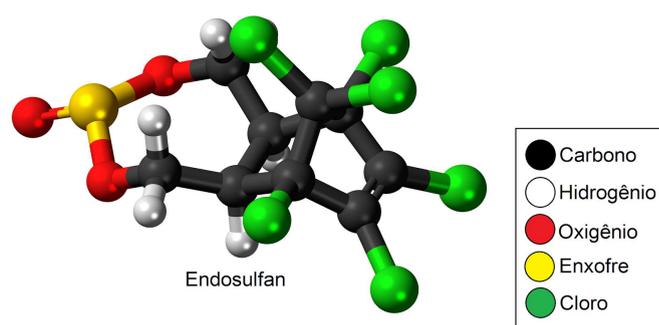
Um exemplo foi demonstrado por Luo *et al.* (2012) ao analisar a arilsulfatase de *Pseudomonas aeruginosa*. A reação nativa esperada é a hidrólise de organossulfurados,

liberando sulfato. Porém, também já foi descrita a capacidade desta enzima de hidrolisar monoésteres de fosfato, liberando fosfato, em decorrência da natureza inespecífica destas enzimas. De forma semelhante, Jonas *et al.* (2008) identificaram uma nova enzima pertencente à família das Fosfatase Alcalinas em *Rhizobium leguminosarum*. Foi demonstrado homologia estrutural conservada a uma típica arilsulfatase, assim como atividade enzimática promíscua (hidrolase / esterase). Outros autores, como Zalatan *et al.* (2006) e Lassila *et al.* (2008), demonstraram atividade generalista de uma enzima pertencente à família das fosfatase alcalinas de *Xanthomonas axonopodis* (atividade fosfatases e/ou sulfatases). De fato, a família das fosfatase alcalinas apresenta um mecanismo de atividade enzimática, não específico de substrato, mesmo em espécies filogeneticamente não relacionadas, demonstrando, aparentemente, ser um mecanismo enzimático primordial (Jonas *et al.*, 2009; Pabis *et al.*, 2016).

De uma perspectiva da remediação ambiental, essa versatilidade de substrato também pode estar ligada à capacidade de certas linhagens em metabolizar compostos antropogênicos. A persistência de compostos antropogênicos, como pesticidas, herbicidas, medicamentos e outros produtos sintéticos, se deve, entre outros fatores, à recente introdução no meio ambiente (Hashmi *et al.*, 2017). Neste contexto, na última década, diferentes autores têm relatado que a atividade da enzima arilsulfatase é induzida pela presença de xenobióticos altamente recalcitrantes (Gianfreda *et al.*, 2005; Kalyani *et al.*, 2009; Narkhede *et al.*, 2015).

Lipińska *et al.* (2014) demonstraram que a microbiota presente em uma amostra de solo apresentou maiores níveis de atividade de arilsulfatase após contaminação deste solo com hidrocarbonetos. Fenantreno derivado do petróleo foi o composto que mais induziu a atividade enzimática de arilsulfatase. Fenantreno é um composto tóxico, carcinogênico, que, em sedimentos variados, pode apresentar uma meia-vida de 420 a 1250 dias (ECHA. 2018).

De forma semelhante, Narkhede *et al.*, (2015) observaram uma maior atividade enzimática de arilsulfatase durante o ensaio de biodegradação em solo contaminados com endosulfan (Figura 2), um pesticida químico com baixa solubilidade em água, que apresenta meia-vida de 183 dias no solo. Utilizando isômeros de  $\alpha$ -endossulfan e  $\beta$ -endossulfan, Kalyani *et al.* (2009) notaram uma evidente correlação, na qual o aumento da atividade enzimática da arilsulfatase era proporcional à biodegradação do endosulfan.



**Figura 2.** Molécula de endosulfan. Imagem editada pelo autor. As coordenadas estruturais das imagens foram obtidas do banco de dados *PubChem* do *National Center for Biotechnology Information* (CID=3224).

Complementar a esses achados, estudos recentes de metagenômica comparativa têm indicado um elevado número de cópias do gene correspondente à enzima arilsulfatase em microbiotas em associação simbiótica com algas e poríferos. Trata-se de organismos conhecidos por realizar a filtragem e reciclagem de nutrientes no ambiente marinho. A microbiota com a presença acentuada de genes de arilsulfatase pode estar atuando indiretamente na ciclagem de nutrientes no ambiente marinho, biodisponibilizando grupos fosfatos e/ou sulfatos a algas e poríferos (Slaby *et al.*, 2017; Fraser *et al.*, 2018). De forma similar, foi observado um elevado número de cópias dos genes correspondentes a enzima arilsulfatase durante um ensaio de degradação de petróleo (Napp *et al.* 2018).

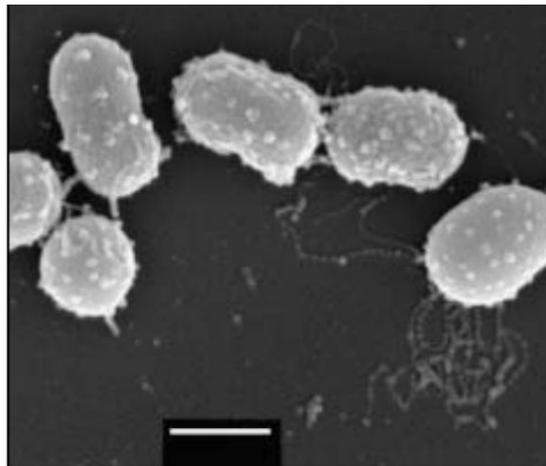
A identificação e caracterização de novas enzimas arilsulfatase apresentando atividade promíscua continua sendo um grande desafio. Apesar de ser um mecanismo

descrito a décadas, ainda existem poucos estudos com descrições de atividade promíscua (Jensen *et al.*, 1976; Charlotte *et al.*, 2018).

Até o presente momento não foi encontrada na literatura uma descrição da atividade promíscua em arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*. Sendo este um trabalho pioneiro, neste sentido.

### 1.1. *Roseomonas gilardii*

*Roseomonas gilardii* é uma bactéria gram-negativa com o formato de cocos e apresenta uma pigmentação rosa, descrita como um oxo-carotenoide. A temperatura ótima de desenvolvimento foi descrita como sendo 30°C, não sendo conhecidos isolados que sobrevivem acima de 42°C. A espécie apresenta locomoção por um único flagelo polar. Os primeiros isolados clínicos e ambientais remontam à década de 80 e foram provenientes de cateteres de pacientes imunodeprimidos e de amostras de uma estação de tratamento de água. Também já foi demonstrada que a espécie é quimiotaxonômica positiva para as reações de urease, amilase, indofenol oxidase e catalase (Gilardii e Faur 1984). Na década seguinte, Rihs *et al.* (1993) realizaram estudos genômicos e estimaram o percentual de conteúdo GC de 67,6% para *R. gilardii*.



**Figura 3.** Imagem de microscopia eletrônica de *Roseomonas gilardii* ( $\times 15,000$ ), Barra indica 1  $\mu\text{m}$ . Obtida de Han *et al.*, 2003.

Isolados do gênero *Roseomonas* têm sido identificados em áreas contaminadas com petróleo. Chaudhary e Kim (2017) isolaram uma linhagem de *Roseomonas* sp. de

uma amostra de solo contaminado com óleo proveniente de Nepal. A análise quimiotaxonômica demonstrou que a linhagem apresentava atividades de fosfatase e sulfatase. Subhash e Lee (2018), em um trabalho de *screening* para microrganismos degradadores de petróleo, isolaram e identificaram uma linhagem de *Roseomonas* sp. a partir de uma amostra de solo contaminado com petróleo bruto, próximo de uma refinaria de petróleo no Kuwait. De forma similar, Napp *et al.* (2018) caracterizaram um consórcio microbiano com habilidade em metabolizar compostos de petróleo, sendo que o estudo de metagenômica evidenciou que espécies do gênero *Roseomonas* estavam entre os dez organismos mais prevalentes.

Esses achados, de fato, são indícios relevantes da presença de espécies do gênero *Roseomonas* em áreas contaminadas com petróleo, supostamente em decorrência desse gênero apresentar resistência a compostos derivados do petróleo e, possivelmente, a habilidade de metabolizar os mesmos.

## 1.2. Promiscuidade catalítica

O conceito de catálise enzimática remonta ao modelo de chave e fechadura idealizado por Emil Fischer (1894), popularmente conhecido como modelo “chave-fechadura”. Segundo a percepção de Fischer, cada enzima corresponde a um substrato de forma especializada e única, sendo essa afirmação correta para determinadas classes de enzimas. Somente após 82 anos depois da apresentação do modelo chave-fechadura, Jensen *et al.* (1976) relacionaram o surgimento de novas funções metabólicas a um mecanismo de promiscuidade enzimática. A promiscuidade catalítica, por conceito, é a capacidade do sítio ativo da enzima interagir com diferentes substratos, ou seja, o tipo de ligação formada ou rompida durante uma reação enzimática, podendo envolver diferentes grupos funcionais (Bornscheuer e Kazlauskas, 2004).

Esse conceito atribui implicações, já bastante conhecidas, de como uma proteína pode adotar múltiplas estruturas e funções. Mesmo em um repertório limitado de sequências, a diversidade conformacional pode aumentar a diversidade funcional (Brian *et al.* 1999). Essa diversidade certamente contribuiu com o surgimento evolutivo de novas enzimas, a partir das funções catalíticas de enzimas preexistentes. Nos últimos anos, essa percepção é sustentada por um número crescente de estudos, tanto em *in*

*vitro* como em *in silico* (Jonas *et al.*, 2008; Nobeli *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2012; Charlotte *et al.*, 2018).

O termo “promiscuidade enzimática”, assim, pode ser interpretado como generalista, a partir de uma perspectiva química dos diferentes processos atribuídos ao termo. Neste sentido, na última década, diferentes trabalhos de revisão têm sugerido sistemas de classificação para promiscuidade enzimática.

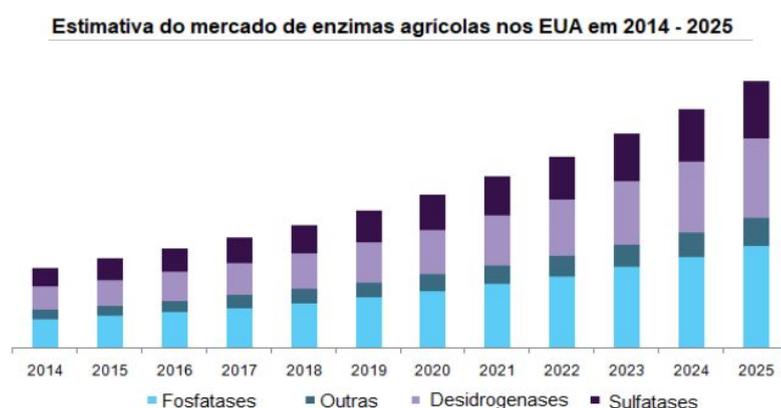
Inicialmente, Bornscheuer e Kazlauskas (2004) propuseram uma classificação simplificada, na qual a promiscuidade catalítica era diretamente relacionada aos grupos químicos envolvidos na reação. Hult e Berglund (2007) adicionaram camadas de complexidade ao conceito e propuseram uma classificação em três tipos distintos: promiscuidade em diferentes condições, promiscuidade de substrato e promiscuidade catalítica (ligação e/ou clivagem de substratos).

De uma outra perspectiva, Nobeli *et al.* (2009) sugeriram uma classificação que reconhece que a promiscuidade se manifesta em diferentes níveis de informação biológica, os níveis informação sugeridos são de gene (modificação e/ou expressão em determinada condição), durante o processo de transcrição (uma sequência de RNA transcrita exclusivamente em determinada condição), uma única proteína (sequência única de aminoácidos), bem como homólogos próximos (com identidade de sequência alta em membros da mesma família de proteínas) ou homólogos remotos (identidade de sequência baixa em membros da mesma superfamília de proteínas) na mesma espécie ou em organismos diferentes.

De fato, a classificação de atividades promíscuas não é trivial e, provavelmente, nos próximos anos, com a descoberta e descrição de novas enzimas promíscuas, seja desenvolvido um sistema de classificação unificado capaz de integrar os mecanismos bioquímicos desencadeados por diferentes condições, que empregue diferentes mecanismo e resulte em diferentes efeitos.

### 1.3. Aplicações de enzimas na agricultura

Segundo Silva (2019), o mercado global de enzimas agrícolas foi estimado em US\$ 246,9 milhões em 2017. Estima-se um crescimento do mercado de enzimas agrícolas (Figura 3) e essa perspectiva é atribuída a uma demanda global por novas tecnologias sustentáveis, em substituições de catalisadores químicos usados na agricultura. Neste sentido, as fosfatases e sulfatases são as principais classes de enzimas com atribuições comerciais. As principais empresas empenhadas no desenvolvimento de biocatalisadores, para fins agrícolas incluem: Novozymes, Creative Enzyme, Enzyme India Pvt. Ltd. e Afrizymes.



**Figura 4.** Estimativa de mercado de enzimas fosfatase e sulfatases. Fonte: *Grand View Research Inc.* 2017.

Os recursos minerais na sua forma solúvel são essenciais para o crescimento e a produtividade agrícola. A deficiência de fósforo e enxofre em plantas é considerada um fator limitante para a produção de alimentos, em solos com extensiva atividade agrícola. Neste sentido, biocatalisadores de origem microbiana, que convertem as formas insolúveis (P) e (S) presentes no solo, em formas acessíveis (fósforo e enxofre), são fundamentais para o crescimento e sobrevivência das plantas. Enzimas com habilidade de converter matéria orgânica e inorgânica em compostos orgânicos acessíveis para absorção da microbiota e/ou de plantas, sem poluir o solo e rios, têm se destacado como uma vantagem econômica e ecológica, diferente da utilização de fertilizantes sintéticos

que têm contribuído com a poluição de mananciais hídricos e desequilíbrio ecológico (Mendes *et al.*, 2014; Behere *et al.*, 2014).

Neste sentido, bancos de dados públicos de análise funcional de metagenomas, como MG-RAST (*Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology*), detêm um arsenal de sequências de enzimas disponíveis a serem exploradas (Meyer *et al.* 2008). Assim, a identificação de novas enzimas microbianas com características singulares depositadas nos mais variados bancos de dados permite a base fundamental de informação biológica para propor novos biocatalisadores, visando aplicação agrícola. Enzimas com atividade generalista de substrato destacam-se de forma promissora, uma vez que o solo também apresenta uma matriz complexa de substratos.

#### 1.4. Aplicações na Indústria Petrolífera

O conceito primordial da biotecnologia é a utilização de um organismo, ou partes destes, no desenvolvimento de produtos e/ou processos, visando sanar os problemas da sociedade contemporânea. Nessa perspectiva, microrganismos que possuem enzimas com atividade promíscua podem apresentar uma melhor adaptação a mudanças ambientais disruptivas. A promiscuidade enzimática já foi relacionada a uma ampla gama de adaptações metabólicas. Dessa forma, metagenomas microbianos derivados de resíduos da indústria petrolífera apresentam um patrimônio genético a ser explorado, com a finalidade de melhorar produtos e processos, na própria indústria petrolífera ou outros segmentos industriais. A utilização de enzimas provenientes de metagenomas representa um fator de inovação, uma vez que podem ser identificados genes e genomas com características singulares de microrganismos não cultiváveis, aplicáveis em bioprocessos de interesse biotecnológico (Risso *et al.*, 2018; Nobeli *et al.*, 2019)

A indústria petrolífera mundial tem sido advertida quanto ao compromisso com a preservação do meio ambiente e a adoção de medidas sustentáveis. De forma paralela, os governos de diferentes países têm sancionadas leis específicas em relação à emissão de gases tóxicos derivados da queima de combustíveis fósseis. Em especial, a emissão de compostos sulfurosos presentes nos combustíveis derivados do petróleo, como o diesel e a gasolina. A legislação brasileira, nos últimos anos, também tem legislado em favor de limites de enxofre cada vez menores (Tabela 2) na produção de combustíveis.

Tabela 2: O teor de enxofre tolerado em combustíveis no Brasil

<b>Percentual máximo</b>	<b>Ano</b>
500 mg/kg	2009
200 mg/kg	2013
50 mg/kg	2014
50 mg/kg	2020

Fonte: Agência Nacional de Petróleo, gás natural e biocombustíveis (ANP). Resolução ANP N° 807, de 23 de janeiro de 2020.

O teor médio de enxofre permitido nos combustíveis fósseis foi reduzido nos últimos anos, em função da necessidade de adequação à legislação nacional e internacional. Atualmente, a Organização Marítima Internacional (IMO) limitou o teor de enxofre nos combustíveis (0,5% de massa) utilizados em navios e embarcações sem sistema de filtro de gases. Essa norma entrou em vigor em 1º de janeiro de 2020. O Brasil, como país signatário dessa organização, aderiu a esse limite mínimo (Resolução ANP n° 789/2019). A partir desse e de outros propósitos institucionais, a indústria petrolífera demanda novas tecnologias, focadas na remoção do enxofre presente no petróleo.

Diferentes processos físico-químicos são utilizados na remoção do enxofre, dentre eles a hidrodessulfurização. Este processo consiste na adição de gás hidrogênio sob condições extremas de temperaturas (200 a 425 °C) e altas pressões (150 a 250 psi). A partir desse processo, compostos orgânicos carregados negativamente com enxofre ligam-se a uma matriz de um material sólido (adsorvente) durante uma etapa de refino do petróleo bruto. Os dois principais fatores limitantes do processo de hidrodessulfurização estão ligados à necessidade de alta quantidade de energia necessária para dissociação de grupos químicos orgânicos contendo enxofre na sua composição, bem como a saturação da matriz adsorvente (Alves *et al.*,1999; Rocha *et al.*,2019).

Considerando as características nativas e ambientais ligadas ao ciclo do enxofre no meio ambiente, a atividade enzimática da classe arilsulfatase microbiana apresenta

um potencial biotecnológico aplicado ao processo de dessulfurização (processo químico de remoção de átomos de enxofre ligados a compostos orgânicos). Quando o processo de remoção de átomos de enxofre presente no petróleo bruto é mediado por microrganismos, ou partes destes, denomina-se Biodessulfurização. Esta consiste em cultivar microrganismos adaptados à ciclagem de enxofre em um sistema de biorreatores adaptados. O principal contraponto entre a dessulfurização e a biodessulfurização está no fato do processo Físico-Químico (dessulfurização) utilizar altas temperaturas (200 a 425 °C) e catalisadores químicos para dissociar o enxofre da matriz bruta do petróleo, enquanto o processo biológico (biodessulfurização) requer apenas atividade microbiana, com composição genética habilitada. Por outro lado, o principal fator limitante da biodessulfurização é a identificação de linhagens cultiváveis com habilidade de remover o enxofre de espécies químicas orgânicas (Alves *et al.* 1999). Neste sentido, a classe de enzimas arilsulfatase expõe um mercado de cifras milionárias.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Caracterizar funcionalmente uma enzima da classe Arissulfatase oriunda de um estudo metagenômico, denominada RgARS1.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Inferir a estrutura tridimensional da enzima RgARS1 por homologia;
- Clonar a região codificante da enzima RgARS1 em vetor de expressão com promotor induzível e promover a sua expressão recombinante;
- Determinar a atividade enzimática da arissulfatase recombinante.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Análise e classificação de sequências preditas de proteínas

A partir de dados depositadas no servidor *Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology* (MG-RAST) (id153f2b977f6d676d343634333437362e33) de metagenômica, provenientes de um consórcio microbiano de resíduos de perfuração de poço de petróleo, definiu-se a abundância relativa dos genes presentes no ensaio de degradação de petróleo. Considerando o total de sequências correspondentes às vias metabólicas de xenobiótico e esfingolípídeos. A sequência utilizada neste trabalho encontra-se no apêndice 1. A ferramenta *InterProSCAN Beta* (Jones *et al.*, 2014) foi utilizada para determinar domínios estruturais conservados na proteína em estudo e, de forma complementar, a ferramenta BLAST (Camacho *et al.*, 2009) foi utilizada para definir inferências taxonômicas.

#### 3.2. Modelagem Molecular por Homologia Estrutural

A construção por homologia estrutural foi realizada em três etapas. A partir da sequência da proteína em estudo (Fasta), foram pesquisados modelos 3D em sequências evolutivamente relacionadas presentes em toda a biblioteca de modelos SWISS-MODEL, *Template Library* (SMTL). Para tanto, foram utilizados dois métodos de pesquisa em banco de dados de proteínas BLAST (Camacho *et al.*, 2009) e HHblits (Remmert *et al.*, 2012). Os modelos foram, então, selecionados, de acordo com a qualidade do *Global Model Quality Estimated* (GMQE) (Biasini *et al.*, 2014) e com o *Quaternary Structure Quality Estimated* (QSQE) (Bertoni *et al.*, 2017). Por fim, o modelo tridimensional da proteína em estudo foi obtido pela ferramenta ProMod3 (Biasini *et al.*, 2013), utilizando as coordenadas dos átomos da proteína modelo com melhor resolução de cristalografia.

#### 3.3. Estimativa de qualidade do modelo.

A estimativa de erros de modelagem foi determinada pela métrica de pontuação do QMEAN (Bertoni *et al.*, 2017). O QMEAN utiliza modelos estatísticos para

determinar a média das forças entre interações moleculares, obtendo estimativas de qualidade global e por resíduo. Após a construção da estrutura da proteína por homologia, a ferramenta MolProbity (Chen *et al.*, 2010) foi utilizada para determinar o percentual de resíduos favoráveis e não favoráveis, sendo o resultado apresentado em gráfico de Ramachandran.

### 3.4. Análise de *Docking* Molecular

O modelo obtido a partir da construção por homologia foi utilizado para determinar as características de ancoragem dos substratos sulfato de 4-nitrofenil de potássio e Paraoxon. As coordenadas dos átomos dos substratos foram obtidas no banco de dados *PubChem* do *National Center for Biotechnology Information*. A análise de acoplamento foi realizada utilizando o *software Chimera*, seguindo a descrição de Pettersen *et al.* (2004), bem como as inferências de imagens foram realizadas no mesmo *software*. A ferramenta *AutoDock Vina* foi utilizada para determinar as regiões de menor energia. O servidor do *National Biomedical Computation Resource* (NBCR) foi utilizado, seguindo os parâmetros descritos por Trott *et al.* (2010). As coordenadas para o sítio ativo da proteína foram determinadas no *software Chimera* com base no alinhamento do servidor *Clustal Omega*.

### 3.5. Clonagem em vetor de expressão *pET23d+*

O DNA molde utilizado foi o plasmídeo *pUC57-ARYL*, contendo a sequência codificante referente ao gene *RgARS1* (apêndice) previamente sintetizada pela empresa *GeneScript*. A amplificação foi realizada pela reação em cadeia da polimerase, *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). Os iniciadores: *Aryl\_pET-F*; *GGA TCC AAA TGG CGT CTC AGC GTA AC* e *Aryl\_pET-R*; *GAA TTC TGC TCG AGT CGG CTT CTC TCC T*, foram utilizados para gerar o amplicon maior de 1500 pb. A reação teve adição de 1,25 µL de DMSO (10 %), a temperatura de anelamento utilizada foi de 58°C e as demais condições da reação foram seguidas conforme o fabricante da enzima *Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen).

O vetor de expressão *pET23d+* (Invitrogen) foi selecionado para expressão heteróloga da proteína recombinante. As enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*

(Promega) foram utilizadas para gerar extremidades coesivas. A reação de clivagem foi realizada a 37°C durante 3 horas, sendo a clivagem confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,7%. Os produtos da clivados (vetor e fragmento ) foram precipitados e suspensos em 25 µL água Milli-Q e quantificados no aparelho *NanoDrop lite* (Thermo scientific).

A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 ligase (Promega), durante 24 horas a 16°C, respeitando a proporção da razão molar de 3:1 (PCR:plasmídeo) em um volume final 10 µL. Destes, foi utilizado 1 µL para transformação por choque térmico de células quimiocompetentes de *E.coli* TG2, previamente preparadas. As colônias presentes em meio de cultura ágar Luria Bertani 20 g/L (ágar-LB) contendo ampicilina (50 mg/ml) foram inoculadas em 3 ml de meio de cultura Luria Bertani contendo ampicilina (50 µg/ml) e incubadas por 16 horas a 37°C. Após este período foi realizado um ensaio de extração de plasmídeo (*Mini-prep*), como descrito por Sambrook e Russell, 2001. A extração de plasmídeo foi confirmada por eletroforese em gel de Agarose 0,7%.

A inserção do gene no sítio de policlonagem foi confirmada por reação de PCR utilizando o *primer* do Promotor *T7\_pET-F*: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG como direto e o *primer* do Terminador *T7\_pET-R*: GCT AGT TAT TGC TCA GCG G como reverso. Estes flanqueiam o sítio de policlonagem do vetor de expressão. A temperatura de 56°C foi utilizada no anelamento dos *primers* e as demais condições foram seguidas conforme o fabricante da enzima *Taq DNA polymerase* (Invitrogen).

### 3.6. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS

A transformação do plasmídeo recombinante *pET23d+* RgARS1 foi realizada por meio do ensaio de choque térmico em células quimiocompetentes da linhagem de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Sambrook *et al.*, 2001). As colônias transformantes foram selecionadas em meio de cultura ágar-LB acrescido de ampicilina (50 mg/ml).

Para o ensaio de indução foi realizado um pré-inóculo, onde uma única colônia de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo recombinante foi selecionada e inoculada em 1 ml de meio de cultura LB (20 g/L) acrescido de 1 % de glicose por 16 horas a 37°C. Um volume de 100 µL desta cultura foi adicionado a um frasco Erlenmeyer de 500 ml,

contendo 100 ml de meio LB, acrescido de ampicilina (50 µg/ml). A incubação foi procedida em plataforma de agitação a 180 rpm na temperatura de 37°C, até a cultura atingir a densidade ótica de 0,4 em 600 nm. Foram, então, adicionados 100 mM de isopropil-β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e a cultura foi mantida em plataforma de agitação por 3 horas adicionais. A cultura foi centrifugada a 9000 rpm durante 10 minutos na temperatura de 10°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em solução contendo inibidor de protease *Sigmafast* (Sigma-Aldrich).

A expressão foi confirmada em gel desnaturante de poliacrilamida a 12 % como descrito por Sambrook e Russell, 2001. Para visualizar as proteínas após a eletroforese vertical o gel foi submerso em solução de azul de Coomassie G (50 % Metanol, 10 % Ácido Acético e 0,05 % *Coomassie Brilliant Blue R-250*). Foi utilizado o marcador de massa molecular *Protein mixture* (GE Healthcare) como referência.

Com base na sequência de aminoácidos da enzima arilsulfatase, a massa molecular foi estimada usando servidor *ProtParam*, segundo descrito por Gasteiger *et al*, 2005.

### **3.7. Ensaio de *Western blot*.**

A linhagem recombinante *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-pET23d+GgARS1 foi induzida como descrito no item 3.6. Neste ensaio, foi utilizado um controle negativo não induzido da mesma linhagem. O procedimento usado para a transferência foi o sistema semi-seco (*Sistema Mini Protean BioRad*) em membrana de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) de 0,45 µM e o tampão de transferência usado foi Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%. O gel de poliacrilamida em condições nativas foi mantido em contato com a membrana de PVDF durante 1 hora em 15 v. Ao final do período foi adicionada a solução bloqueadora (2,5 g de leite em pó desnatado, 0,01 % Tween 20, 50 ml PBS 1X). A membrana foi mantida em agitação por 24 horas na temperatura de 4°C. Após esse período foi adicionado o anticorpo primário *Anti-poly-Histidine mouse* (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:3000. A membrana foi mantida em agitação durante 4 horas na temperatura de 4°C. Após o período de incubação a membrana foi lavada 3 vezes com tampão fosfato salino. A membrana foi transferida para uma placa de vidro e foi adicionado o anticorpo secundário *Anti-poly-Histidine-Peroxidase* de camundongo (Sigma-Aldrich) e mantida sob agitação em temperatura de 23°C durante 1 hora ao abrigo da luz. Após o período

incubação com o anticorpo secundário a membrana foi submersa em tampão de revelação (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> em pH 9).

### 3.8. Ensaio de atividade enzimática.

A atividade de sulfatase foi determinada medindo a quantidade de *p*-nitrofenol obtida a partir do substrato sulfato de 4-nitrofenil de potássio (Sigma-Aldrich). Como descrito por Tabatabei e Bremner, 1970. O ensaio contém 375 µL solução tampão A (20 mM de Tris-HCl, pH 7), 25 µL sulfato de 4-nitrofenil de potássio (25 mM) e 100 µL de lisados de células previamente induzidas, como descrito no item 3.6.

O ensaio foi realizado por 24 horas de incubação a 37°C. A reação foi interrompida adicionando 1 ml de solução de NaOH (0,5 M) e o *p*-nitrofenol produzido foi quantificado espectrofotometricamente a 410 nm. Atividade de sulfatase (U) foi definida como a absorvância equivalente a 1 U/ml de *p*-nitrofenol produzido por hora sob as condições experimentais utilizadas. Como controle negativo foi utilizado homogeneizado de células *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise da sequência primária de RgARS1

A predição realizada na ferramenta *InterProScan* revelou que a proteína em estudo, denominada RgARS1, é pertencente a grande família das fosfatases alcalinas. A região C-terminal desta proteína apresenta domínio de função desconhecido entre os aminoácidos 385-487 com o número de identificação DUF4976 (*Domain Unknown Function*). RgARS1 também apresenta um domínio pertencente às sulfatases (entre os aminoácidos 8-381) na porção N-terminal.

Na região N-terminal da RgARS1 foi identificado um domínio conservado na classe de enzimas arilsulfatase, estando localizado na posição 57-CGPARASLLTG-68. A organização e estrutura da sequência é compartilhada com arilsulfatase de *Pseudomonas aeruginosa* (C / SXPXRXXXX -TG). Além disso, também tem similaridade com o motivo encontrado em uma nova fosfatase de *Rhizobium leguminosarum*, representado pela sequência de aminoácidos (C/SXPXR). Cabe ressaltar que nos casos citados de *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. as proteínas tiveram suas estruturas determinadas por cristalografia e são descritas como enzimas com atividade promíscua (Jonas *et al.*, 2008; Lou *et al.*, 2012; Stressler *et al.*, 2016).

A função molecular atribuída ao motivo pertencente às sulfatases corresponde a reação de hidrólise de ésteres sulfúricos. Enzimas com a habilidade de realizar a hidrólise de ésteres sulfúricos são relacionadas ao metabolismo de esfingolipídeos pela base de dados metabólicos KEGG (*kyoto encyclopedia of genes and genomes*). Majoritariamente, a classe de enzimas 3.1.6.1 das arilsulfatases realiza a reação hidrolítica em éster de sulfato (Kanehisa e Goto 2000).

A análise em BLAST utilizando a sequência de nucleotídeos da região codificante da proteína RgARS1 (Stephen *et al.*, 1997) revelou uma identidade de 99% com a arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*, sob identificação: WP\_075799357.1 depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A sequência proteica em estudo, oriunda de *R. gilardii*, não apresenta um peptídeo sinal, sendo classificada pelo servidor *SignalP 3.0*, como proteína não secretada.

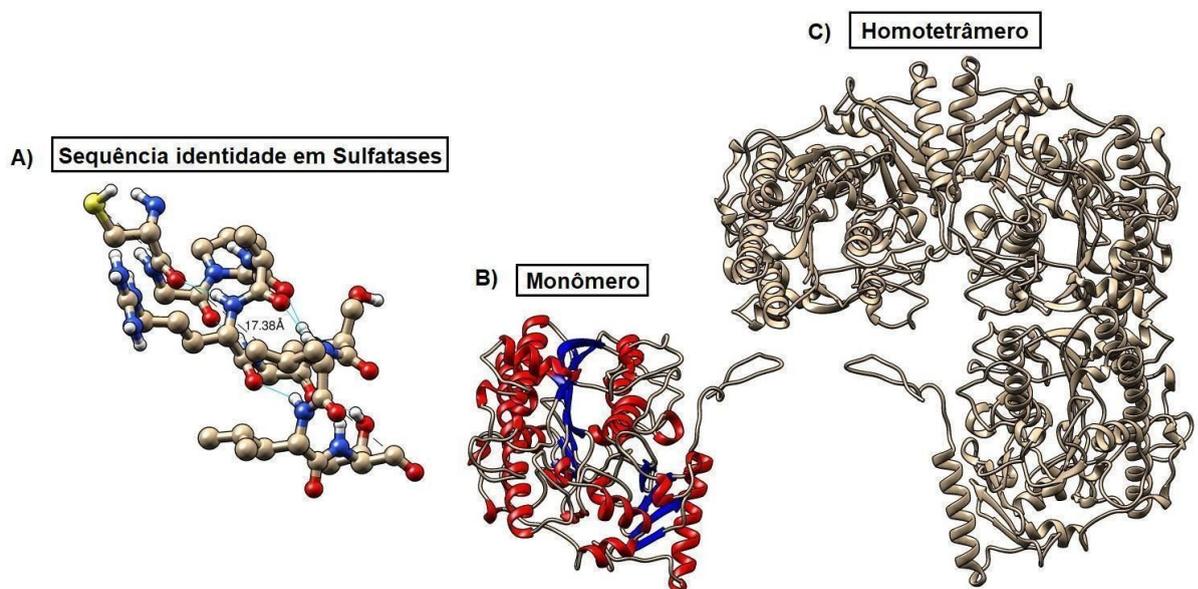
O gênero *Roseomonas* tem sido relacionado a estudos de contaminação ambiental, apesar da sua classificação e identificação quimiotaxonômica remeter à década de 80. A percepção do gênero em ambientes contaminados com petróleo passou a ter relevância,

nos últimos anos, a partir de estudo de metagenômica comparativa (Gilardii e Faur, 1984; Chaudhary e Kim, 2017; Subhash e Lee, 2018; Napp *et al.*, 2018).

#### 4.2. Predição da estrutura molecular de RgARS1

Foram encontrados 28 moldes na análise em BLASTP seguindo o procedimento descrito por Camacho *et al.* (2009), e 213 moldes pela análise de HHblits, seguindo o procedimento descrito por Remmert *et al.* (2012).

O molde com maior identidade, melhor resolução de Raio-X e evolutivamente mais próximo de *R. gilardii* foi utilizado para determinar a estrutura da proteína RgARS1. A estrutura obtida neste trabalho é descrita como um homotetrâmero. As coordenadas dos átomos da estrutura de Raio-X da fosfatase alcalina de *R. leguminosarum* (Jonas *et al.* 2008), foram usadas como molde para determinar a estrutura tridimensional da proteína arilsulfatase de *R. gilardii* (Figura 4).



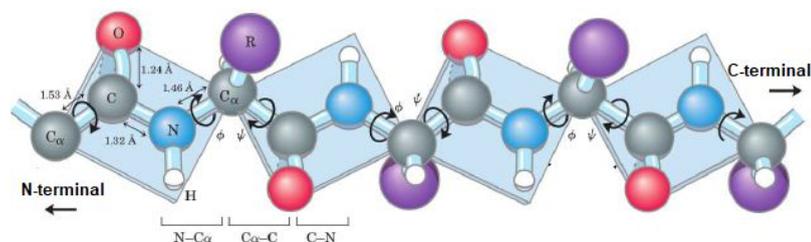
**Figura 5.** Estruturas tridimensionais da arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* construídas por homologia estrutural. Em A: Sequência peptídica conservada no domínio das sulfatases CGPARASLLTG. Em B: Estruturas secundárias de um monômero do homotetrâmero, as estruturas de folhas  $\beta$  estão em cor vermelha, estruturas  $\alpha$ -hélice paralelas em cor azul e em cinza são mostrados os *loops*. Em C: Está demonstrado a conectividade dos monômeros formando um homotetrâmero.

Cada monômero do homotetrâmero de arilsulfatase de *R. gilardii* é constituído por 12 estruturas secundárias de folhas  $\beta$ . As folhas  $\beta$  consistem em vários filamentos  $\beta$ , segmentos esticados da cadeia polipeptídica, mantidos juntos por uma rede de ligações de hidrogênio, destacado em cor vermelha, na imagem B da Figura 4. Estão presentes

em cada monômero 14 estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélice paralelas, destacado em azul, na imagem 1-B. Em cor cinza na imagem B são mostrados os loops. O motivo conservado, um pentapeptídeo, sublinhados (C/S-X-P-X-R-XXXX-T-G), compreende todo domínio das sulfatases; os aminoácidos Cisteína (Cis) ou Serina (Ser) da sequência motivo, são representados como uma esfera em cor amarela na Figura 4-A. O aminoácido inicial do pentapeptídeo passa por um processamento pós-traducional, que, aparentemente, tem a finalidade de maturar a enzima no seu estado funcional (Stressler *et al.*, 2016).

A conformação de uma proteína pode ser descrita em termos quantitativos e considerando que as proteínas são polipeptídeos interconectados, suas formas tridimensionais podem ser definidas pela conectividade entre seus peptídeos (Figura 5).

As ligações entre átomos da cadeia principal de uma proteína apresentam ângulos internos de rotação ( $\phi$  e  $\psi$ ), com distâncias interatômicas favoráveis ou improváveis (Chen *et al.*, 2010). Dessa forma, são definidos ângulos favoráveis para a definição de estruturas. Essa percepção de estruturas moleculares foi proposta, inicialmente, em 1963 por Gopalasamudram Narayan Ramachandran.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de uma cadeia de aminoácidos, mostrando diferentes ângulos  $\phi$  e  $\psi$ . Fonte Mahmood *et al.* 2015.

Combinações dos vinte aminoácidos primários constituem a maior proteínas conhecidas. No entanto, na predição de proteínas por homologia o grande desafio é correlacionar os dados da tríade: sequência de aminoácidos, estrutura tridimensional e função biológica, de forma lógica e compatível com sistemas biológicos conhecidos. É sabido que a estrutura nativa de uma proteína possui energia mínima possível, a partir da qual se pode propor inferências de validação de estruturas. Também é possível encontrar padrões de estruturas conservadas em proteínas da mesma classe, a fim de validar dados biológicos, a partir de modelos computacionais (Mahmood *et al.*, 2015).

O percentual de combinações favorecidas para a estrutura geométrica da proteína construída para arilsulfatase de *R. gilardii* está de acordo com dados sugeridos pela literatura, segundo Chen *et al.* 2010. A análise realizada pelo servidor *MolProbity* estimou que a maior parte dos peptídeos está localizada na região favorável, com alta qualidade das ligações peptídicas (percentual de Ramachandran na Tabela 3), desta forma, se aproximando da estimativa ideal. A alta identidade da proteína usando como molde favorece esse resultado. De forma semelhante, as pontuações de GMQE e QMEAN apresentaram valores dentro dos limites de confiabilidade sugeridos pela literatura, mais bem descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de diferentes estimativas de qualidade estrutural

Valores sugeridos pela literatura	Identidade <sup>1</sup> (> 30 %)	Ramachandra n <sup>2</sup> (Caso ideal < 98%)	GMQE <sup>2</sup> (Caso ideal 1.0)	QMEAN <sup>2</sup> (<-4.0)
Valores obtidos	72%	95.83%	0.89	-0.69

#### 4.3. Predição de atracamento molecular de RgARS1 a seu substrato

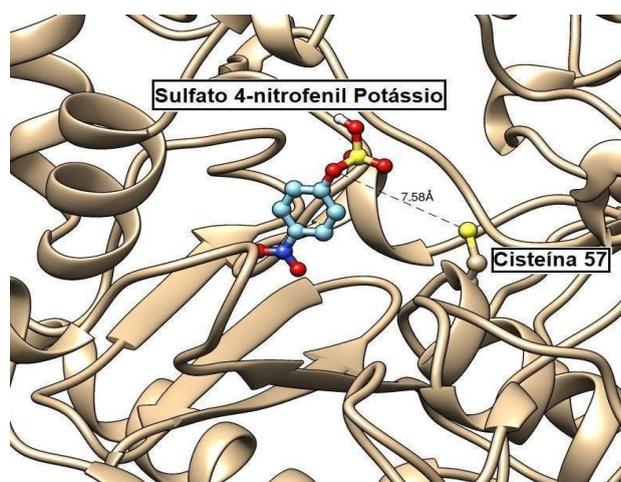
O modelo tridimensional construído por modelagem molecular da enzima arilsulfatase de *R. gilardii* apresentou resultados confiáveis em relação a sua estrutura geométrica. Visando a descrição do sítio ativo da proteína em estudo, foi realizada a análise de *docking* molecular com o substrato (ligante) sulfato de 4-nitrofenil de potássio. Este substrato é utilizado por diferentes autores para descrever atividade de sulfatase (Stressler *et al.*, 2016; Fraser *et al.*, 2018). Os valores representativos na análise de *docking* molecular são favoráveis apenas quando representados negativamente, ou seja, quanto menor for o valor, maior a significância que o resultado representa (Bell *et al.*, 2019). RMSD é a sigla de '*root mean square deviation*', que identifica o limite superior e inferior das conformações realizadas e é expresso em

<sup>1</sup> Verli *et al.*, 2014

<sup>2</sup> Chen *et al.*, 2010

ângström (Å). O valor de tolerância é no máximo 2 Å. Valores acima do valor máximo de tolerância representam um modelo pouco confiável (Lee *et al.*, 2010).

A análise de predição apresentou afinidade de ligação de - 6,7 kcal/mol e RMSD de 0 Å ao sulfato 4-nitrofenil de potássio, demonstrando, *in silico*, que a enzima arilsulfatase de *R. gilardii* apresenta um sítio de ancoragem compatível com este substrato (Figura 7). De uma perspectiva biológica, a região de ancoragem é compatível com o sítio ativo de outros membros do domínio das sulfatases.

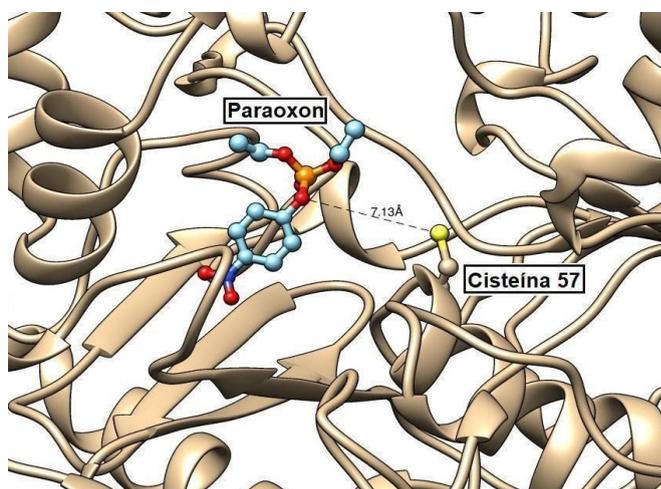


**Figura 7.** Representação tridimensional da região de menor energia de ancoragem do substrato sulfato 4-nitrofenil de potássio em arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.

A arilsulfatase de *R. gilardii* apresenta um resíduo de cisteína na posição 57 (Figura 7). Geometricamente, esse resíduo de cisteína fica localizado próximo da região de menor energia de ligação do substrato. Carregado negativamente com enxofre, essa posição na estrutura favorece a dissociação das ligações éster de sulfato, liberando o grupo sulfato, ficando o resíduo de cisteína 57 a aproximadamente 7,1 Å de distância do átomo de oxigênio, que sofre o ataque nucleofílico (tem sua ligação rompida com o grupo fenol). Nos membros da classe arilsulfatase, esse tipo de dissociação geralmente é intermediado por um íon metálico, como  $Mg^{+2}$  ou  $Ca^{+2}$ , que atua como uma base de Lewis (Charlotte *et al.* 2018). Esse indicativo de localização geométrica, demonstrada em *in silico*, sugere uma possível atividade de sulfatase. Já foi demonstrado que sulfatases com atividade promíscua apresentam predisposição por substratos carregados negativamente com átomos de fósforo ou enxofre (Charlotte *et al.*, 2018).

Foram realizadas, também, análises de *docking* molecular, usando o agente químico Paraoxon (Figura 8). Este agente químico apresenta na sua estrutura molecular

um átomo de fósforo ligado ao anel aromático, diferente do substrato sulfato 4-nitrofenil de potássio, que apresenta um enxofre ligado ao anel aromático. A predição de ancoragem revelou a afinidade de ligação de - 7,0 kcal/mol e RMSD de 0 Å, demonstrando, *in silico*, que a enzima arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* apresenta um sítio de ancoragem compatível com um substrato carregado negativamente com átomo de fósforo.



**Figura 8.** Representação tridimensional da região de menor energia de ancoragem do agente químico Paraoxon em arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.

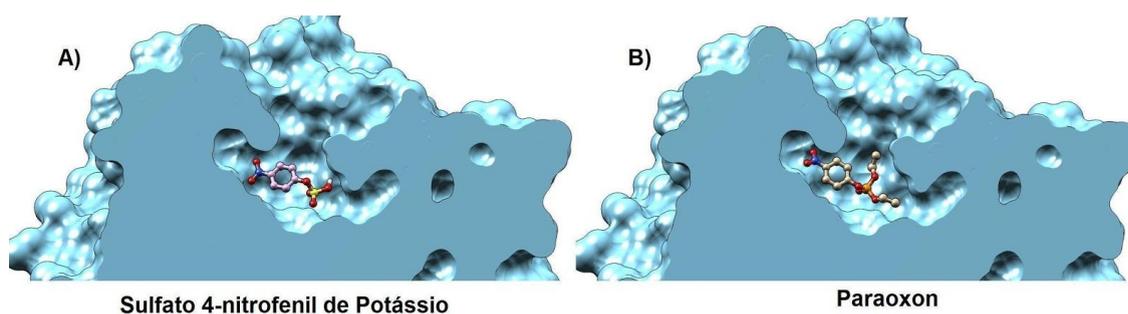
O agente químico Paraoxon é um organofosfato amplamente utilizado na agricultura e indústria como pesticida, mas também já foi utilizado como arma química. Em seres humanos, o principal mecanismo de intoxicação causado por Paraoxon é a inibição da enzima acetilcolinesterase. O envenenamento por organofosfatos vem ocupando um dos primeiros lugares no número total de intoxicações por agentes químicos, decorrente do uso intensivo na agricultura (Belinskaia *et al.*, 2019).

O fósforo presente na molécula de Paraoxon carrega negativamente a molécula, de forma semelhante ao papel molecular exercido pelo enxofre na molécula de sulfato 4-nitrofenil de potássio. Da mesma maneira, o resultado de *docking* para Paraoxon indica uma localização geométrica semelhante à encontrada na análise de *docking* para sulfato 4-nitrofenil de potássio. Esse indício de localização geométrica corresponde, topologicamente, a um possível sítio ativo promiscuo, para atividade sulfatase e fosfatase (Figura 9). É possível supor que ocorra um ataque nucleofílico da enzima arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* ao agente químico Paraoxon, pois a distância de 7.1 Å, intermediada por um íon metálico, favorece essa reação. Essa reação é

compatível com um fenômeno biológico, biodisponibilização dos grupos fosfatos e, conseqüentemente, a fragmentação de composto xenobiótico. Neste sentido, novos estudos devem ser realizados, com a finalidade de propor um papel da enzima arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* na degradação de Paraoxon.

#### 4.4. Predição da promiscuidade enzimática *in silico*

Supondo o comportamento enzimático generalista (atividade de sulfatase e/ou fosfatase) da arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*, foi demonstrado *in silico* que o modelo predito por homologia estrutural para enzima arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* apresenta uma região de fenda topologicamente favorável a dois substratos diferentes. Os substratos analisados apresentam menor energia de ligação na mesma zona, após análise de *docking* molecular, como fica claro na Figura 9.



**Figura 9.** Topologia da fenda catalítica de arilsulfatase de *Roseomonas sp.* Em A: Corte lateral da enzima com o substrato com enxofre. Em B: Corte lateral da enzima com o agente químico carregado negativamente com fósforo.

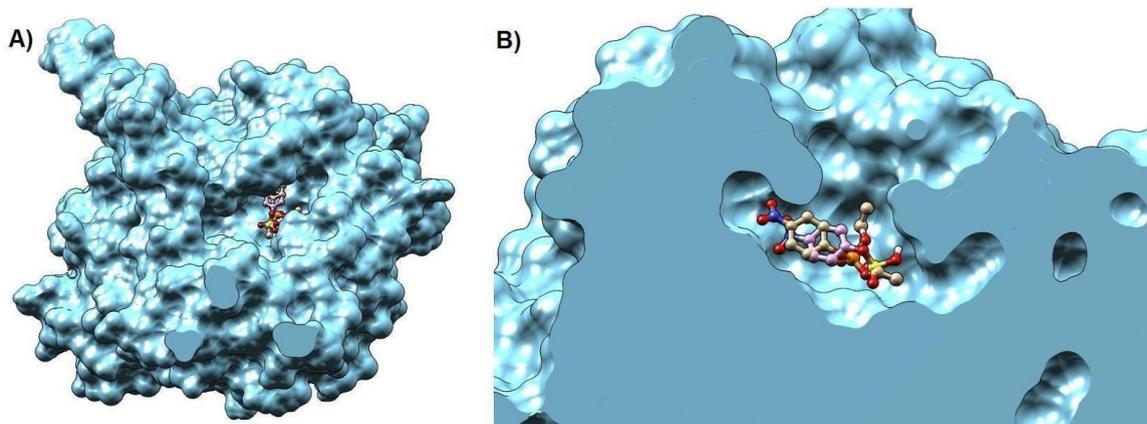
Topologicamente, a fenda catalítica demonstra ser acessível a um grupo variado de moléculas. Geometricamente, moléculas orgânicas com um ou mais grupos fenol ligados a átomos como enxofre e fósforo podem ser alojadas de forma a sofrer dissociação decorrente da atividade enzimática. Charlotte *et al.* (2018) procederam um estudo comparativo das hidrólises de monoésteres de fosfato e nitrofenil de sulfato em solução aquosa. Evidenciaram que, apesar da semelhança da estrutura química dos substratos, as reações de dissociação prosseguem por diferentes estados de transição, com efeitos de solvatação muito diferentes, indicando que os requisitos para a catálise eficiente dos dois substratos por uma enzima, também devem ser muito diferentes. No entanto, Lou *et al.* (2012) demonstraram que a arilsulfatase de *P. aeruginosa*, mesmo

com grau variado de eficiência de clivagem, é capaz de catalisar dois substratos diferentes no mesmo sítio ativo.

Na arilsulfatase de *R. gilardii*, o resíduo de cisteína 57 está geometricamente próximo aos substratos preditos pelas análises de *docking* molecular. Similarmente, a arilsulfatase de *P. aeruginosa* com atividade promíscua apresenta um resíduo de cisteína na posição 51, que exerce um papel fundamental no sítio catalítico. A ausência desse resíduo de cisteína 51 na arilsulfatase de *P. aeruginosa* resulta em uma proteína sem atividade enzimática (Lou *et al.*, 2012). De forma similar, uma enzima pertencente à família das fosfatases alcalinas descrita com atividade promíscua em *Rhizobium leguminosarum* apresenta um resíduo de cisteína na posição 57, a mesma posição que em *R. gilardii*, e tem um papel fundamental na atividade enzimática (Jonas *et al.*, 2008). Topologicamente, as enzimas citadas compartilham um resíduo de cisteína ao final da sequência de identidade das sulfatases e no sítio ativo (Figura 10).

São candidatos topologicamente favoráveis a região de fenda da arilsulfatase de *R. gilardii* os compostos carregados com enxofre, derivados do petróleo como sulfetos, dissulfetos, benzotiofeno, dibenzotiofeno e tiofenos, pois apresentam tamanho e estrutura compatível com o sítio ativo (ou fenda catalítica). Como mencionado anteriormente, a sequência da proteína analisada neste trabalho é proveniente de um metagenoma de um resíduo de perfuração de poço de petróleo. É natural imaginar uma pressão de seleção evolutiva direcionada à presença destes compostos em enzimas generalistas com atividade de sulfatase.

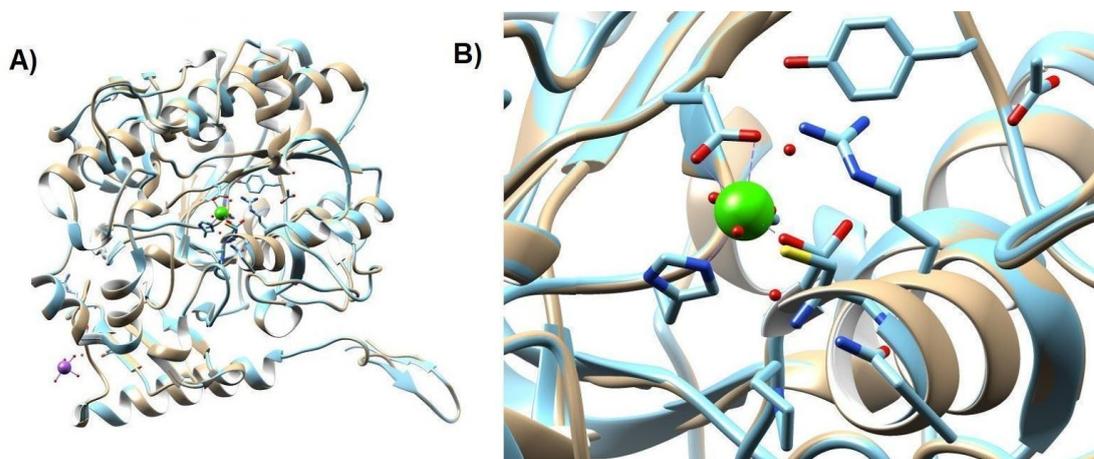
Já é bastante conhecido que enzimas de origem microbiana, que atuam em compostos sintéticos, surjam de atividades promíscuas de enzimas previamente existentes, ou metabolicamente são propensas à promiscuidade. Por exemplo, as enzimas envolvidas na desintoxicação são altamente promíscuas e podem degradar uma grande variedade de agentes tóxicos, por meio de diferentes rotas bioquímicas. Novas funções enzimáticas surgem a todo momento na natureza, à medida que os organismos são expostos a diferentes pressões de seleção. As enzimas promíscuas podem evoluir para se tornarem catalisadores mais eficientes no uso de uma fonte alternativa de carbono. Esse tipo de promiscuidade é frequentemente considerado um vestígio da natureza generalista, atribuído às enzimas primordiais (Charlotte *et al.*, 2018; Risso *et al.*, 2018; Washingtona *et al.*, 2019).



**Figura 10.** Topologia da fenda catalítica compartilhada. Em A: Representação do monômero de arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*, vista superior da fenda catalítica. Em B: Vista em corte lateral da fenda catalítica, compartilhada por dois substratos diferentes.

#### 4.5. Análise de conservação estrutural

A finalidade desta observação consiste na identificação de regiões similares e/ou distintas do modelo construído, frente ao modelo conhecido. Neste caso, utilizando o *software* Chimera, foi realizada uma sobreposição de estruturas. A estrutura de arilsulfatase de *R. gilardii*, determinada anteriormente por homologia estrutural, foi comparada com a predição cristalográfica, realizada por Jonas *et al* (2008), de uma enzima da família das fosfatase alcalinas de *R. leguminosarum* (Figura 11).



**Figura 11.** Representação tridimensional de estruturas homólogas. Em A: Representação de uma unidade do homotetrâmero de *R. leguminosarum* em cor azul (Jonas *et al.* 2008), em cor cinza arilsulfatase de *Roseomonas gilardii* em sobreposição. Em B: Representação esquemática do sítio catalítico de *R. leguminosarum*, esfera em cor verde, representa átomo de Cálcio, bastonetes em vermelho e azul representam os principais aminoácidos do sítio catalítico. Bastonete em cor amarela ao final da

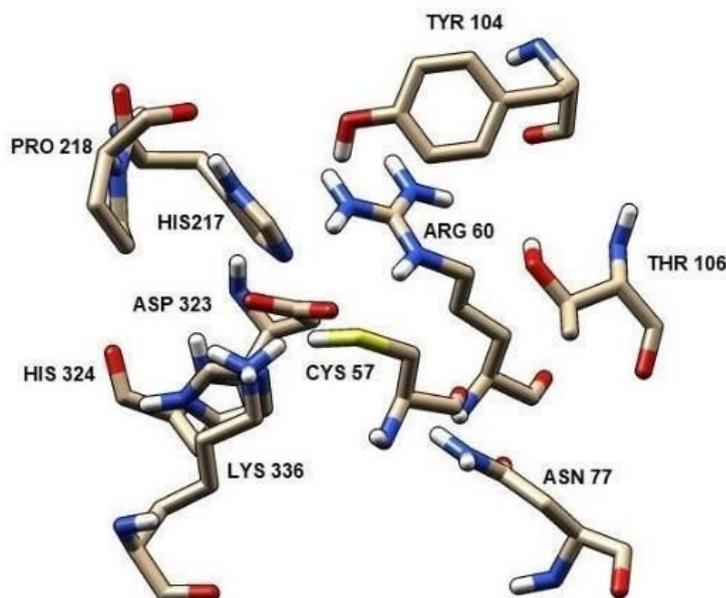
estrutura de folhas  $\beta$  representa o resíduo de cisteína 57 de arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.

Utilizando a abordagem de alinhamento estrutural, podemos observar estruturas consenso, mesmo que as proteínas (de forma generalista) possam apresentar baixa similaridade de sequências. Geralmente, o sítio catalítico é conservado quanto a sua forma estrutural e é esperado que o modelo gerado por homologia estrutural apresente características de localizações específicas, compatíveis com fenômenos biológicos conhecidos (Verli *et al.*, 2014).

Neste contexto, o sítio catalítico da fosfatase alcalina de *R. leguminosarum*, compartilha estruturas moleculares de folhas- $\alpha$  e  $\beta$  com a arilsulfatase de *R. gilardii*, bem como alguns aminoácidos que interagem com o íon metálico também são conservados nas duas estruturas. Jonas e Hollfelder (2009) propuseram que todos os membros da família das fosfatases alcalinas operam um ciclo catalítico semelhante. A representação tridimensional da fosfatase alcalina de *R. leguminosarum* foi determinada com uma resolução de cristalográfica de 1,42 Å (Jonas *et al.*, 2008). Essa resolução permite uma alta confiabilidade do modelo gerado por homologia estrutural para arilsulfatase de *R. gilardii*, uma vez que a acurácia do modelo obtido, dentre outros parâmetros, está diretamente relacionada com o grau de similaridade entre as estruturas tridimensional da proteína predita em relação à da proteína molde (Figura 10).

#### **4.6. Sítio catalítico de arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.**

Diferentes membros da família das fosfatases alcalinas que apresentam atividade promíscua compartilham aminoácidos com geometria espacial similar, bem como polaridade similar no sítio catalítico. Os principais aminoácidos determinados por comparação de estruturas são : Asp 12, Gln 13, Serina / Cisteína (fG 57-51), Arg 61, Asn78, Tir105, Trp107, His218, Asp 317, Asp 324, His 325 e Lis 337. Esses aminoácidos e suas respectivas posições já foram descritos há cerca de duas décadas por Stec *et al.* 2000 e Boltes *et al.* 2001. Em estudos mais recentes, foram observados diferentes cofatores enzimáticos e variações pontuais de aminoácidos relacionados à estabilidade do sítio catalítico e sensibilidade a diferentes íons metálicos que atuam como cofatores enzimáticos (Stressler *et al.* 2016).



**Figura 12.** Composição de aminoácidos presentes no sítio catalítico da estrutura predita para arilsulfatase de *Roseomonas gilardii*.

A fG (formil-glicina) é um aminoácido modificado por um processo pós traducional, dependente da ação de enzimas geradoras de formil-glicina. Essa modificação ocorre no retículo endoplasmático, após a importação do polipeptídeo do citoplasma. Dentre os aminoácidos determinados por comparação de sequência, a fG no sítio ativo atua como doador de prótons, na reação de dissociação do átomo de enxofre ligado a moléculas orgânicas.

A reação nativa de uma típica arilsulfatase microbiana é a dissociação em ésteres de sulfatos e os membros da classe arilsulfatase compartilham a presença fG no sítio ativo. As linhagens descritas com atividade promíscua também mantêm essa estrutura conservada no núcleo (Stressler *et al.*, 2016). Jonas *et al* (2008) identificaram em uma linhagem de *Rhizobium* sp. uma arilsulfatase que apresenta a fG no sítio catalítico, mas não apresenta atividade de sulfatase. Porém, ela apresenta atividade promíscua de monoésteres / diésteres de fosfato.

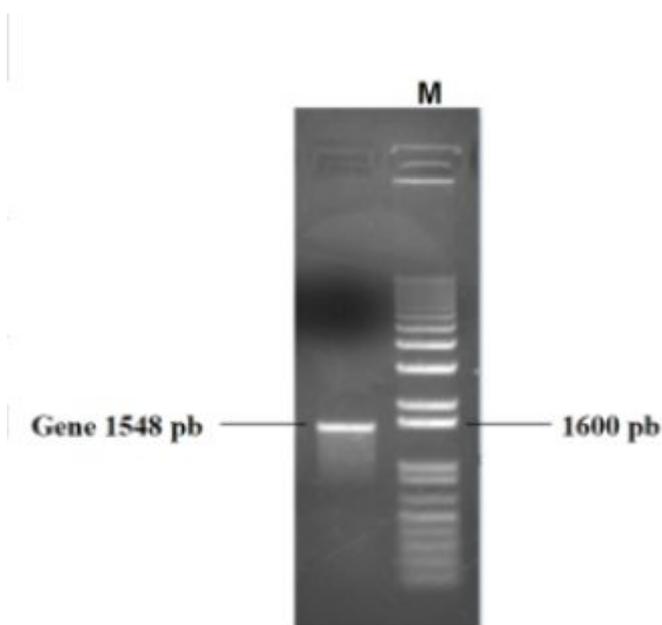
No caso de arilsulfatase de *P. aeruginosa* existe um resíduo de cisteína na posição 51, no sítio catalítico, que sofre ação de enzimas geradoras de fG originando fG51. Esse fG51 faz com que a enzima tenha a estrutura molecular propícia para ser um doador de prótons no ataque nucleofílico ao substrato, reagindo quimicamente como uma sulfatase (Lou *et al.*, 2012).

O alinhamento de estruturas revelou que a enzima arilsulfatase de *R. gilardii* compartilha uma estrutura semelhante com o sítio catalítico de fosfatase de *R. leguminosarum*, identificada no banco de dados de proteínas (PDB) pelo código de acesso 2vqr. No entanto, os aminoácidos Asp 12 e Gln 13 da fosfatase de *R. leguminosarum* estão ausentes no contexto do sítio catalítico proposto para arilsulfatase de *R. gilardii*. Na fosfatase de *Rhizobium leguminosarum*, os aminoácidos Asp 12 e Gln 13 estão relacionados à estabilidade do íon metálico ( $Mg^{2+}$ ) que atua como cofator enzimático (Jonas *et al.* 2008) Ao descrever a arilsulfatase de *P. aeruginosa* identificada no banco de dados de proteínas (PDB) pelo código de acesso 1hdh, Lou *et al.* (2012) demonstraram que Asp 13, Asp 14 e Asp 317 no sítio catalítico têm relação direta com a estabilidade do íon metálico ( $Ca^{2+}$ ), que atua como cofator enzimático. Os aminoácidos Lis 336 e Asn 77 da estrutura proposta para arilsulfatase de *R. gilardii*, apresentam um posicionamento geométrico que favorece as interações com um cofator enzimático, devido a sua proximidade com Cis 57 e angulação em relação a His 324 e His 217 (Figura 11).

Já é conhecido que na arilsulfatase de *P. aeruginosa* os aminoácidos His 115 e His 211 favorecem a interação com o grupo sulfato. No caso da arilsulfatase de *R. gilardii* foi observado que as duas enzimas têm o mesmo ângulo de torção em relação ao encaixe do grupo sulfato no sítio ativo. Entretanto, não está claro qual íon metálico atua como cofator enzimático. Estudos preliminares sugerem que a presença do íon de cálcio favorece a atividade enzimática em arilsulfatase de *R. gilardii* (item 4.7).

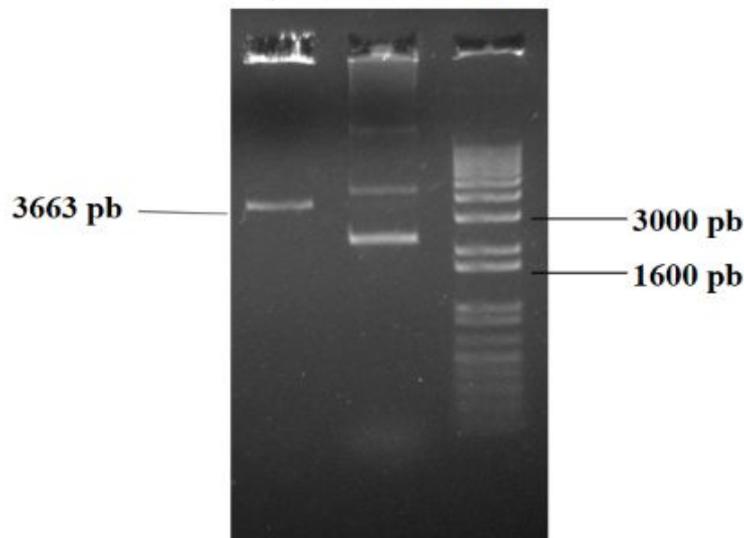
#### 4.7. Expressão heteróloga de RgARS1

Para produção da proteína recombinante RgARS1 foi realizada a amplificação do gene correspondente ao gene codificante da enzima arilsulfatase (Figura 12), usando como DNA molde um plasmídeo comercialmente adquirido. A reação de amplificação foi realizada, com a adição de dimetilsulfóxido DMSO (10 %), visto que os *primers* estavam apresentando baixa especificidade (dados não mostrados). A reação foi otimizada seguindo a descrição de Cherter *et al.* (1993).



**Figura 13.** Resultado da amplificação por PCR do gene *RgARS1* proveniente do vetor *puc57*. Eletroforese em gel de agarose 0,7 %, com anelamento a 58°C, com adição de 1,25 µl de DMSO (10 %) no volume final da reação. M: marcador de massa molecular de 1 kb.

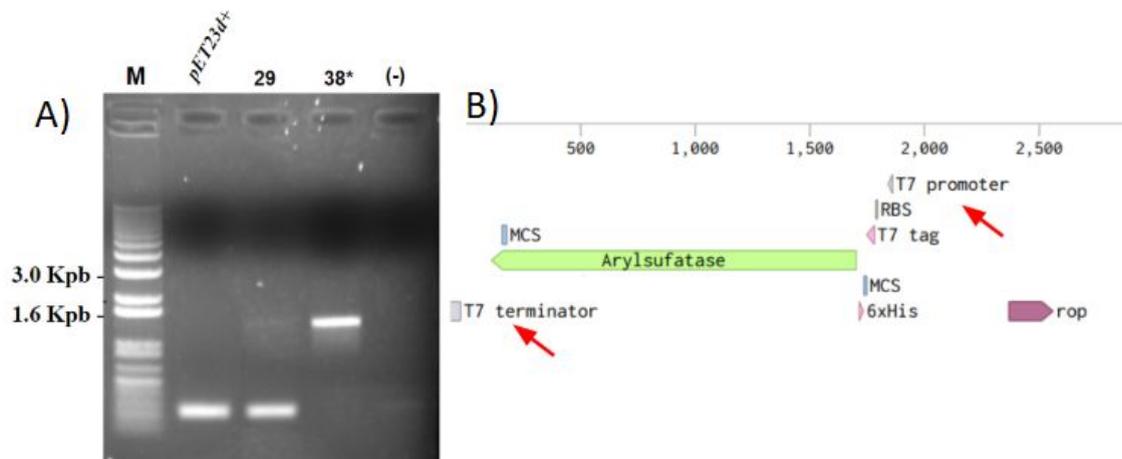
Posteriormente, foi realizada a reação de dupla clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* do amplicon contendo a região codificante do gene *RgARSI* e do vetor de expressão *pET23d+*. A reação de clivagem do plasmídeo foi confirmada em eletroforese de gel de agarose 0,7 % e o padrão de bandas obtido no gel foi compatível com o padrão de bandas obtido na análise *in silic*, usando a ferramenta *Benchling*.



**Figura 14.** Análise da clivagem pET23d + com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, na primeira coluna da esquerda para direita. Na coluna do centro pET23d íntegro e na coluna da direita o marcador de peso molecular. Eletroforese em gel de agarose a 0,7 %. M: marcador de tamanho molecular de 1 kb.

A clonagem do fragmento de interesse no vetor de expressão foi realizada com a enzima de ligação T4 ligase. O produto da reação de ligação foi utilizado na transformação por choque térmico da linhagem de *E.coli* TG2. Foi, então, realizado um *screening*, empregando PCR, para detectar qual colônia apresentava o clone recombinante.

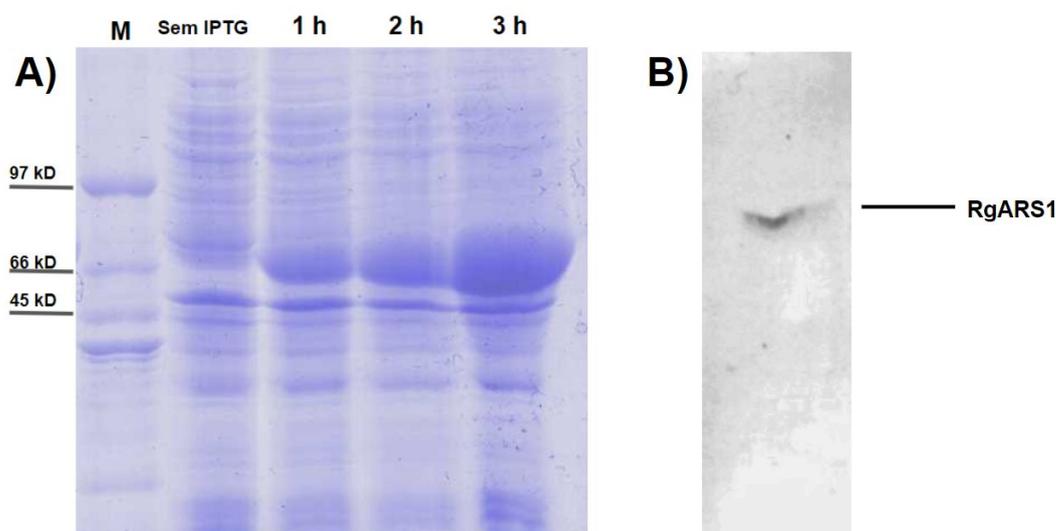
Utilizando *primers* T7, que hibridizam nas regiões flanqueadoras ao sítio de clonagem do plasmídeo, foi possível identificar um clone recombinante em cerca de 40 avaliados (Figura 15).



**Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose 0,7 % mostrando a detecção do gene *RgARS1* inserido no vetor *pET23d* (+). Em A) Amplificação por PCR utilizando os iniciadores T7 do vetor de expressão. Anelamento dos primers a 56°C. (-): Controle negativo. M: marcador de tamanho molecular de 1 kb. 38\*: Colônia positiva; 29: colônia negativa. Em B) Modelo esquemático dos locais de hibridização dos *primers* T7. As setas em vermelho destacam as posições dos primer no sítio múltiplo de clonagem do vetor de expressão.

O plasmídeo recombinante foi, então, utilizado na transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Após cultivo e indução da expressão com adição de IPTG, a expressão heteróloga da proteína recombinante arilsulfatase de *R. gilardii* foi identificada em eletroforese vertical de gel poliacrilamida desnaturante com base em extratos brutos de células induzidas. A linhagem *E. coli* BL21(DE3) pLysS-pET23d+RgARS1 gerada apresenta expressão seletiva apenas na presença do agente indutor IPTG (Figura 16-A).

A proteína recombinante apresenta uma sequência de 6 histidinas adicionadas a RgARS1, visando futuros ensaios de purificação, por coluna de afinidade. O ensaio de *Western Blot*, utilizando antígeno anti-poli histidina, confirmou a presença dessa estrutura na proteína RgARS1 (Figura 16-B).



**Figura 16.** Expressão e identificação de RgARS1 em lisado bruto de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Em **A**: *SDS-PAGE* 12% de extratos proteicos após a indução por 1, 2 e 3 horas com IPTG 0,1 mM, em comparação com um extrato não induzido (sem IPTG). **M**: Marcador de massa molecular. Em **B**: Resultado do *Western Blot* em membrana de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) com *Anti-poly-Histidine-Peroxidase* de camundongo.

Com base na sequência de aminoácidos preditos a partir do clone recombinante, foi utilizada a ferramenta *ProtParam* na análise de diferentes parâmetros quanto às propriedades físico-químicas da proteína RgARS1. Foi estimada uma massa molecular de 58 kDa para a RgARS1 recombinante, compatível com a banda observada na Figura 16-A e dentro dos limites de massas moleculares encontradas em arilsulfatases recombinantes conhecidas como descrito na tabela 4.

Tabela 4. Resultado da análise no *software online ProtParam*

Número de aminoácidos	521
Peso molecular	58 kDa
Ponto isoelétrico teórico	5.07
Estimativa de meia vida	>20 horas (leveduras, <i>in vivo</i> ). >10 horas ( <i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i> ).

A expressão heteróloga de arilsulfatase microbiana tem sido objeto de estudo de diferentes autores (Tabela 5), com os mais variados objetivos. Também é consenso entre os autores que obtenção de uma enzima funcional depende de um processo pós-traducional mediado por enzimas geradoras de fG endógenas do metabolismo da célula hospedeira. No trabalho histórico de Dierks *et al* (1998) arilsulfatases de *P. aeruginosa*, que apresentavam alterações no códon da Cis 51, expressavam uma proteína sem atividade enzimática perceptível. Esse aminoácido foi considerado o aminoácido fundamental no sítio catalítico para atividade arilsulfatase da enzima. A massa molecular da enzima arilsulfatase em diferentes microrganismos pode variar de 33-66 kDa (Tabela 5), demonstrando uma versatilidade topológica e estrutural. No entanto, mantém-se o sítio ativo conservado.

Tabela 5: Arilsulfatases microbianas com expressão heteróloga.

Espécie de origem	Linhagem recombinante	Massa molecular	Autor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).	66 kDa	Dierks <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	33 kDa	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Escherichia coli</i> W3110	65 kDa	Lee <i>et al.</i> , 2013
<i>Marinomonas sp.</i> FW-1	<i>Escherichia coli</i>	33 kDa	Wang <i>et al.</i> , 2015
<i>Flammeovirga pacifica</i>	<i>Escherichia coli</i>	56 kDa	Gao <i>et al.</i> , 2015
<i>Alteromonas carrageenovora</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	35 kDa	Stressler <i>et al.</i> , 2016
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	65 kDa	Stressler <i>et al.</i> , 2018

#### 4.8. Avaliação da atividade enzimática de RgARS1

A enzima RgARS1 produzida de forma recombinante pela linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-pET23d+RgARS1 teve atividade enzimática mensurada por ensaios preliminares, utilizando a porção do lisado celular bruto, sem processos de purificação.

Inicialmente, a linhagem recombinante teve atividade mensurada na presença de solução tampão, sem adição de íons metálicos no tampão. No entanto, diferentes íons fazem parte do meio de cultura utilizado na indução. Como foi utilizado o lisado bruto, mesmo em pequenas frações, estes íons podem ter atuado no ensaio enzimático, como cofatores da atividade enzimática mensurada na Tabela 6, que mostra a comparação dos resultados obtidos de duas linhagem de *E.coli* BL21 (DE3) *pLysS*, uma contendo o plasmídeo (pET23d+RgARS1) e induzida com IPTG e outra sem a presença do plasmídeo. Neste caso, observamos um aumento da atividade enzimática, quando comparada as duas linhagem. Mesmo com uma concentração menor de proteínas, a linhagem contendo o plasmídeo recombinante e induzida apresenta maior atividade de sulfatase. No entanto, os ensaios enzimáticos são preliminares e nos permitem um pequeno elemento norteador quanto à real capacidade da enzima em estudo.

Tabela 6. Atividade de sulfatase (sem adição de íons metálicos na solução tampão)

Linhagem	Concentração de Proteínas (mg/ml)	Atividade (U/ml)	Atividade específica (U/mg)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>pLysS</i> .	8.3	0.0030	0.0003
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS-pET23d+RgARS1	7.6	0.0111	0.0014

Atividade de sulfatase foi determinada pela produção de *p*-nitrofenol, decorrente da clivagem de sulfato 4-nitrofenil de potássio (25 mM) em solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 a 37°C. A tabela demonstra um comparativo entre a linhagem recombinante e a linhagem não recombinante.

Pelo fato das arilsulfatases de *P. aeruginosa* (Lou *et al.*, 2012) e de *R. gilardii* compartilharem domínios proteicos e ângulos de torção nas suas estruturas preditas, é provável que estas duas enzimas também compartilhem o mesmo cofator enzimático.

Com a finalidade de avaliar esta hipótese, a atividade enzimática da arilsulfatase presente na linhagem recombinante expressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-pET23d+RgARS1 foi avaliada na presença de íons de Ca<sup>2+</sup> na solução tampão.

De fato, foi observado um aumento substancial (Tabela 7) na atividade enzimática com acréscimo do íon Ca<sup>2+</sup>. No entanto, novos ensaios devem ser realizados a fim de validar essa hipótese.

Tabela 7. Atividade de sulfatase (Com adição de íons Ca<sup>2+</sup> na solução tampão )

Linhagem	Concentração de Proteínas (mg/ml)	Atividade (U/ml)	Atividade específica (U/mg)
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS.	6.1	0.0035	0.0005
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS-pET23d+RgARS			
1	4.8	0.0290	0.0060

Atividade de sulfatase foi determinada pela produção de *p*-nitrofenol, decorrente a clivagem de sulfato de 4-nitrofenil de potássio (25 mM) em solução de Tris-HCl 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 7.0 a 37°C. A tabela demonstra um comparativo entre a linhagem recombinante e a linhagem não recombinante.

## 5. CONCLUSÕES

Em resumo, este estudo demonstrou a estrutura geométrica da enzima RgARS1 predita por homologia estrutural, bem como, características funcionais, relacionada à classe Arilsulfatase. Atividade de sulfatase da enzima RgARS1 foi predita *in silico* e confirmada *in vitro*. Além disso, foram encontradas evidências *in silico* de possível atividade promíscua em RgARS1.

Também foi construído com sucesso um vetor de expressão contendo a região codificante da enzima RgARS1. De igual forma, foram obtidas linhagens com expressão recombinante de RgARS1. Ensaios preliminares sugerem que atividade de sulfatase da enzima RgARS1 é estimulada na presença do íon  $\text{Ca}^{2+}$ .

Adicionalmente, os resultados das análises de *docking* molecular sugerem que a enzima RgARS1 apresenta atividade de fosfatase, já que, virtualmente, o sítio catalítico predito para enzima RgARS1 é propenso à proficiência enzimática de uma ampla gama de compostos químicos carregados negativamente com o átomo de enxofre e/ou fósforo.

## 6. PERSPECTIVAS

Este trabalho resultou nas seguintes perspectivas:

- Avaliar atividade fosfatase (*in vitro*) da enzima RgARS1 recombinante.
- Analisar a habilidade de catalisador biológico da enzima RgARS1 recombinante, em processos de degradação de compostos derivados de petróleo.
- Avaliar a capacidade da enzima RgARS1 recombinante, como promotor de crescimento e desenvolvimento de cultivares de interesse econômico, como soja.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

ANANTHARAMAN, Karthik; HAUSMANN, Bela; JUNGBLUTH, Sean P.; *et al.* Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. **The ISME Journal**, v. 12, n. 7, p. 1715–1728, 2018.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, S.K.; MISHRA, R.R.; *et al.* Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97–110, 2014.

BELINSKAIA, Daria A.; AVDONIN, Pavel V.; AVDONIN, Piotr P.; *et al.* Rational in silico design of aptamers for organophosphates based on the example of paraoxon. **Computational Biology and Chemistry**, v. 80, p. 452–462, 2019.

BELL, Eric W.; ZHANG, Yang. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 40, 2019.

BENKERT, Pascal; BIASINI, Marco; SCHWEDE, Torsten. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011.

BERTONI, Martino; KIEFER, Florian; BIASINI, Marco; *et al.* Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10480, 2017.

BIASINI, M.; SCHMIDT, T.; BIENERT, S.; *et al.* *OpenStructure*: an integrated software framework for computational structural biology. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 69, n. 5, p. 701–709, 2013.

BORNSCHEUER, Uwe T.; KAZLAUSKAS, Romas J. Catalytic Promiscuity in Biocatalysis: Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 45, p. 6032–6040, 2004.

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009.

CHAUDHARY, Dhiraj Kumar; KIM, Jaisoo. *Roseomonas nepalensis* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 981–987, 2017.

CHEN, Vincent B.; ARENDALL, W. Bryan; HEADD, Jeffrey J.; *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.

CHESTER, N.; MARSHAK, D.R. Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer T<sub>m</sub> Reduction: A Method for Analyzing the Role of Renaturation Temperature in the Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 284–290, 1993.

COPLEY, Shelley D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 8, p. 559–566, 2009.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues. Agricultural Enzymes, Phosphatases, Peptidases, and Sulfatases and the Expectations for Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 16, p. 4395–4396, 2019.

ECHA (Agência Europeia das Substâncias Químicas) Disponível em: <<https://echa.europa.eu/documents/10162>> Acesso em: 03/03/220.

ERRINGTON, Ingrid; KING, Catherine K.; WILKINS, Daniel; *et al.* Ecosystem effects and the management of petroleum-contaminated soils on subantarctic islands. **Chemosphere**, v. 194, p. 200–210, 2018.

FANG, Wenwen; GU, Manfei; LIANG, Dongqing; *et al.* Generation of zero valent sulfur from dissimilatory sulfate reduction under methanogenic conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 383, p. 121197, 2020.

FISCHER, Emil. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894.

FRASER, Matthew W.; GLEESON, Deirdre B.; GRIERSON, Pauline F.; *et al.* **Metagenomic Evidence of Microbial Community Responsiveness to Phosphorus and Salinity Gradients in Seagrass Sediments**. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1703, 2018.

GIANFREDA, Liliana; ANTONIETTA RAO, Maria; PIOTROWSKA, Anna; *et al.* **Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution**. *The Science of the Total Environment*, v. 341, n. 1–3, p. 265–279, 2005.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph; SAMBROOK, Joseph. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GUEX, Nicolas; PEITSCH, Manuel C.; SCHWEDE, Torsten. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. S1, p. S162–S173, 2009.

HULT, Karl; BERGLUND, Per. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 231–238, 2007.

HAN, Xiang Y.; PHAM, Audrey S.; TARRAND, Jeffrey J.; *et al.* **Bacteriologic Characterization of 36 Strains of Roseomonas Species and Proposal of Roseomonas mucosa sp nov and Roseomonas gilardii subsp rosea subsp nov**. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 120, n. 2, p. 256–264, 2003

JAMES, Leo C.; TAWFIK, Dan S. Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 7, p. 361–368, 2003.

JONAS, Stefanie; HOLLFELDER, Florian. Mapping catalytic promiscuity in the alkaline phosphatase superfamily. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 731–742, 2009.

JONAS, Stefanie; VAN LOO, Bert; HYVÖNEN, Marko; *et al.* A New Member of the Alkaline Phosphatase Superfamily with a Formylglycine Nucleophile: Structural and Kinetic Characterisation of a Phosphonate Monoester Hydrolase/Phosphodiesterase from *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 1, p. 120–136, 2008.

JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H.-Y.; *et al.* InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.

KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

LEE, Dong-Geun; SHIN, Jae Gyun; JEON, Myong Je; *et al.* Heterologous expression and characterization of a recombinant thermophilic arylsulfatase from *Thermotoga maritima*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 5, p. 897–902, 2013.

LEE, Wook; VOJCIC, Ljubica; DESPOTOVIC, Dragana; *et al.* Rationalizing perhydrolase activity of aryl-esterase and subtilisin Carlsberg mutants by molecular dynamics simulations of the second tetrahedral intermediate state. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 125, n. 3–6, p. 375–386, 2010.

LIMA FILHO, Oscar Fontão de; AMBROSANO, Edmilson José; ROSSI, Fabrício; *et al.* (Orgs.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. 1a edição. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

LIPÍŃSKA, Aneta; KUCHARSKI, Jan; WYSZKOWSKA, Jadwiga. **Activity of Arylsulphatase in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.** *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 9, p. 2097, 2014.

LUO, Jinghui; VAN LOO, Bert; KAMERLIN, S. C. L. Examining the promiscuous phosphatase activity of *Pseudomonas aeruginosa* arylsulfatase: A comparison to analogous phosphatases. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 4, p. 1211–1226, 2012.

LUO, Jinghui; VAN LOO, Bert; KAMERLIN, Shina C.L. Catalytic promiscuity in *Pseudomonas aeruginosa* arylsulfatase as an example of chemistry-driven protein evolution. **FEBS Letters**, v. 586, n. 11, p. 1622–1630, 2012.

MEYER, F; PAARMANN, D; D'SOUZA, M; *et al.* The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.

MITON, Charlotte M.; JONAS, Stefanie; FISCHER, Gerhard; *et al.* Evolutionary repurposing of a sulfatase: A new Michaelis complex leads to efficient transition state charge offset. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 31, p. E7293–E7302, 2018.

NAPP, Amanda P.; PEREIRA, José Evandro S.; OLIVEIRA, Jorge S.; *et al.* Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. **Chemosphere**, v. 209, p. 7–16, 2018.

O'BRIEN, P. J.; HERSCHLAG, D. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. **Chemistry & Biology**, v. 6, n. 4, p. R91–R105, 1999.

PABIS, Anna; DUARTE, Fernanda; KAMERLIN, Shina C. L. Promiscuity in the Enzymatic Catalysis of Phosphate and Sulfate Transfer. **Biochemistry**, v. 55, n. 22, p. 3061–3081, 2016.

PASEK, Matthew. A role for phosphorus redox in emerging and modern biochemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, p. 53–58, 2019.

PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; *et al.* UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

RASHID, Mahmood A.; KHATIB, Firas; SATTAR, Abdul. Protein preliminaries and structure prediction fundamentals for computer scientists. **arXiv:1510.02775 [cs, q-bio]**, 2015. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1510.02775>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

REMMERT, Michael; BIEGERT, Andreas; HAUSER, Andreas; *et al.* HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. **Nature Methods**, v. 9, n. 2, p. 173–175, 2012.

RISSO, Valeria A; SANCHEZ-RUIZ, Jose M; OZKAN, S Banu. Biotechnological and protein-engineering implications of ancestral protein resurrection. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 51, p. 106–115, 2018.

ROCHA, Y. S.; PEREIRA, R. C. L.; MENDONÇA, J. G. Petroleomics: Fundamentals and Application on the Geochemical Assessment of Crude oil and Source Rock Samples. **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**, v. 42, n. 1, p. 196–208, 2019.

SLABY, Beate M; HACKL, Thomas; HORN, Hannes; *et al.* Metagenomic binning of a marine sponge microbiome reveals unity in defense but metabolic specialization. **The ISME Journal**, v. 11, n. 11, p. 2465–2478, 2017.

SPEIGHT, James G. **The chemistry and technology of petroleum**. Fifth edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & francis Group, 2014. (Chemical industries, a series of reference books and textbooks, 137).

STRESSLER, Timo; REICHENBERGER, Katrin; GLÜCK, Claudia; *et al.* A natural variant of arylsulfatase from *Kluyveromyces lactis* shows no formylglycine

modification and has no enzyme activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2709–2721, 2018.

SUBHASH, Y.; LEE, Sang-Seob. *Roseomonas deserti* sp. nov., isolated from crude oil contaminated desert sand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 675–680, 2018.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

VAN LOO, Bert; BERRY, Ryan; BOONYUEN, Usa; *et al.* Transition-State Interactions in a Promiscuous Enzyme: Sulfate and Phosphate Monoester Hydrolysis by *Pseudomonas aeruginosa* Arylsulfatase. **Biochemistry**, v. 58, n. 10, p. 1363–1378, 2019.

WANG, Xueyan; DUAN, Delin; XU, Jiachao; *et al.* Characterization of a novel alkaline arylsulfatase from *Marinomonas* sp. FW-1 and its application in the desulfation of red seaweed agar. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 10, p. 1353–1362, 2015.

WASHINGTON, John W.; ROSAL, Charlita G.; ULRICH, Elin M.; *et al.* Use of carbon isotopic ratios in nontargeted analysis to screen for anthropogenic compounds in complex environmental matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1583, p. 73–79, 2019.

ZHENG, Yingying; XUE, Yanfen; ZHANG, Yueling; *et al.* Cloning, expression, and characterization of a thermostable glucoamylase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 225–233, 2010.

**Xenobiotics in the soil environment**. 1st edition. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017.



# Douglas Souza Vieira

Curriculum Vitae

Porto Alegre, agosto de 2020

# Curriculum Vitae

**VIEIRA, D. S.**

## **Dados pessoais**

Nome : Douglas Souza Vieira

Data e local de nascimento : 08 de outubro de 1989, Porto Alegre-RS, Brasil

e-mail : [douglasouzavieira@gmail.com](mailto:douglasouzavieira@gmail.com).

Endereço comercial: PoaHub na Av. da Azenha, 295 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90160-000.

## **Formação acadêmica**

Mestrado em Biologia Celular e Molecular (2018-2020)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, São Gabriel, Brasil

Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

## **Cursos de formação complementar:**

Redação de Patentes. (Carga horária: 12h).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. 2019 - 2019.

Extensão universitária em Processos Industriais. (Carga horária: 40h).

Universidade de Brasília, UnB, Brasil. 2018 - 2018.

Extensão universitária em Gestão da Qualidade. (Carga horária: 40h).

Universidade de Brasília, UnB, Brasil. 2018 - 2018.

Fabricação de Cerveja Artesanal. (Carga horária: 60h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil. 2015 - 2015.

Implantação de Incubadora Tecnológica. (Carga horária: 4h).

Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Brasil. 2014 - 2014.

Genética e Biologia Molecular Humana. (Carga horária: 44h).

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil. 2012 - 2012.

### **Atuação Profissional:**

Empresa *P&D20* - Inova Simples (IS) , Brasil.

Vínculo: Proprietário, Enquadramento Funcional: CEO, Regime: Dedicção parcial. 2020-atual.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Pós-graduação (CAPES), Regime: Dedicção exclusiva. 2018-2019.

FKbiotecnologia - LTDA, Brasil.

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Desenvolvimento Tecnológico Industrial DTI-C, Regime: Dedicção exclusiva. 2015 - 2016.

Universidade Federal do Pampa, Brasil.

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica (PROBIC/FAPERGS), Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva. 2012-2013.

### **Patentes e registros:**

Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR20202001057, título: "Dispositivo de energia ultravioleta de alta intensidade para descontaminação do ar.", Depósito: 26/05/2020, Brasil.

## ANEXOS

### **Anexo 1:**

Sequência de aminoácidos correspondente à RgARS1, utilizada neste trabalho:

SRSMASQRNVLLIVVDQWRADFMVPLGADFLRTPNLDRLCREGVTFRNHVTT  
AVPCGPASLLTGLYLMNHRAVQNTVPLDARHMNLGKALRGVGYDPALIGY  
TTTTDPDRGTSRNDPRFSLGDLMEGFRSVGAFEPSMDGYFGWLAQKGYDLPP  
NREDIWLPEGMDDVPGATDRPSRIPTLSDTAYFTERALTYIKGRGEKPWFLHL  
GYWRPHPPFIAPEPYNRMYTAAQMPAPVRMPHWREAAQHPLLDYLRGVQR  
GSFFHGAGGAANEMAEAEIRQMRATYAGLISEVDAALGEVFAHLDATDQWKD  
TLIFTSDHGEQLGDHYLLGKIGFHDESFRIPLVVVDPDAPEQAGRIESAFTESVD  
VLPSIIDWLGGEVPRACDGRSLLPLLGRRRPADWREHLFYEYDFRDVYYSHPEA  
PLGLGMDDCSLCVVQDEQWKYVHFAALPPLLFNLEEDPNQFVNLADDDPAHAG  
IVADYAQRALSHMRHAERTLTHYRSTPQGLEERSRLEHHHHHHH\*

Formulário de patente (UFRGS)

Patente de Biotecnologia referente a construção genética.

**Reivindicação de uso aplicado a :**

Refinaria de petróleo

Agricultura (promotor de crescimento)

Bioprocessos e afins.

**Classificação de patentes:** C12N 15/00.

**Descrição:** Mutação ou engenharia genética; DNA ou RNA referente à engenharia genética, vetores, por exemplo, plasmídeos, ou seu isolamento, preparação ou purificação; Utilização dos hospedeiros para os mesmos (mutantes ou micro-organismos geneticamente modificados C12N 1/00 , C12N 5/00 , C12N 7/00).

**Anexo 2:** Parâmetros de afinidade de substrato.

Tabela A1 : Parâmetros de afinidade do agente químico Paraoxon em diferentes sítios de ligação dentro do modelo predito para arilsulfatase *Roseomona Gilardii*.

<b>kcal/mol</b>	<b>RMSD l.b</b>	<b>RMSD u.b</b>
-7.0 <sup>3</sup>	0.0 <sup>3</sup>	0.0 <sup>3</sup>
-6.9	53.294	54.681
-6.7	46.576	49.547
-6.6	46.509	49.518
-6.4	54.597	56.202
-6.3	46.899	49.995
-6.2	11.367	13.196
-5.8	23.185	25.06
-5.8	54.844	56.559

Tabela A2: Parâmetros de afinidade do substrato Sulfato de 4-nitrofenil de Potássio em diferentes sítios de ligação dentro do modelo predito para arilsulfatase *R. Gilardii*.

<b>kcal/mol</b>	<b>RMSD l.b</b>	<b>RMSD u.b</b>
-6,7 <sup>3</sup>	0,0 <sup>3</sup>	0,0 <sup>3</sup>
-6,7	2,853	5,675
-6,6	46,386	47,175
-6,5	26,941	27,797
-5,9	46,237	47,678
-5,9	27,416	28,999
-5,8	28,251	29,146
-5,8	28,99	30,064
-5,8	29,018	29,727

<sup>3</sup> Valor com maior significância.