

## Proposta de Projeto PIBIC

### “Modulação redox de descarboxilases produtoras de químicos renováveis”

**Orientadora:** Leticia Zanphorlin (LNBR/CNPEM)

#### 1. INTRODUÇÃO E ESTADO-DA-ARTE

A produção biológica de hidrocarbonetos a partir de matérias primas biorrenováveis apresenta uma estratégia relevante para contribuir com a transição da matriz energética brasileira (1–3). Em particular, os alcenos (ou olefinas) são building blocks para a produção de uma gama de bioprodutos e tem um papel importante para o desenvolvimento sustentável, podendo impactar diferentes setores da sociedade (4, 5). Dentre os produtos mais promissores, destaca-se o bioplástico e os biocombustíveis drop-in. O nosso grupo tem focado na descoberta e estudo dos mecanismos de ferro-enzimas que catalizam reações químicas não canônicas, desempenhando papel de descarboxilases de ácidos graxos e gerando alcenos como produtos (6). Metaloenzimas têm recebido muita atenção por sua capacidade de realizar reações químicas complexas, utilizando do poder de catalisadores inorgânicos e da seletividade conferida por sua estrutura quiral (7, 8). Na natureza, as metaloenzimas desenvolveram um papel na funcionalização das ligações C – H com alta quimio e regioespecificidade, o que é um desafio de longa data na química orgânica sintética (9). Em particular, algumas das ativações C – H mais potentes da natureza são realizadas por enzimas dependentes de ferro. As metaloenzimas facilitam essas oxidações complexas, combinando-as com a redução de O<sub>2</sub> por meio de um processo denominado ativação de oxigênio (7, 10). Embora a redução de O<sub>2</sub> seja termodinamicamente favorável, as barreiras cinéticas exigem que o processo seja dividido em múltiplas etapas de transferência de elétrons(8). Nesse sentido, as metaloenzimas empregam diferentes cofatores com estratégias distintas para realizar a catálise por meio de diversas espécies intermediárias oxigenadas ao longo do ciclo. As enzimas diferro são uma grande família de metaloenzimas que utilizam dioxigênio para realizar reações de oxidação (11). Por sua alta capacidade de funcionalizar seletivamente ligações C – H, enzimas diferro têm atraído muita atenção como potentes biocatalisadores (12). Essas enzimas possuem um cluster de dois ferros no sítio ativo, coordenados por uma histidina e um carboxilato (12, 13). A maioria das enzimas diferro caracterizadas estruturalmente são compostas por uma estrutura de quatro  $\alpha$ -hélices pacote contendo dois motivos E(D/H)xxH que servem como ligantes para o cluster diferro. Essas enzimas ativam o O<sub>2</sub> do estado ferroso para gerar espécies super-oxo diférrica, que sofre a cisão da ligação O – O para gerar intermediários de diferro (4+) ou diferro (3+/4+) de alta valência que, por sua vez, oxidam os substratos (14). Um dos mais recentes exemplos de enzima diférrica é a desaturase UndA, descoberta em 2014, com atividade de descarboxilação de ácidos graxos, capaz de produzir 1-undeceno (daí o nome Und) e CO<sub>2</sub> como produtos (15). Essa enzima é altamente conservada no gênero *Pseudomonas*, mas apenas duas foram parcialmente caracterizadas, enquanto apenas uma dessas tem estrutura depositada no PDB. A estrutura revela um motivo de três  $\alpha$ -hélices como o de heme-proteína, mas diferentemente, não possui ligação ao grupamento heme. No que diz

respeito ao ciclo catalítico, pouco se sabe e a proposta é que a clivagem C – H ocorra a partir da transferência de hidrogênio do C $\beta$  usando um intermediário com espécie ferro(4+)-oxo. Existem diversos questionamentos que precisam ser endereçados para o entendimento do mecanismo de ação dessas enzimas. Uma das principais perguntas em aberto é sobre a modulação da atividade catalítica por parceiros redox: seria atividade catalítica melhorada na presença de um parceiro redox? Particularmente, mecanismos de descarboxilação realizados por heme-proteínas, conta com o peróxido de hidrogênio, atuando diretamente como redutor na obtenção do núcleo ativo. No caso das desaturases UndA, a hipótese é que provavelmente será necessário a atuação conjunta de parceiros redox, já que a atividade na presença de peróxido de hidrogênio não foi detectada.

## 2. OBJETIVO GERAL

A proposta desse projeto de iniciação científica é produzir em bactéria e purificar potenciais proteínas parceiras que poderiam funcionar como enzimas redox no ciclo das desaturases de ácidos graxos, tornando a atividade de produção de hidrocarbonetos mais rápida e eficiente. Os parceiros redox serão selecionados baseados na literatura de heme-proteínas e também no contexto genômico das bactérias que possuem as desaturases.

- 2.1 Produção das enzimas em plataforma bacteriana;
- 2.2 Purificação por cromatografia líquida para obtenção de enzimas com alta pureza;
- 2.3 Caracterização biofísica clássica das enzimas;
- 2.4 Ensaios de sinergia para produção de 1-undeceno na presença do parceiro redox e descarboxilase.

## 3 PLANO DE TRABALHO

Atividades	Objetivo Específico	Trimestre			
		Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
Produção enzimática em diferentes cepas de bactéria, temperatura, tempo e concentração de indutor	2.1				
Ensaios cromatográficos para a purificação de enzimas em diferentes colunas de afinidade, troca iônica e exclusão molecular	2.2				
Caracterização espectroscópica	2.3				
Ensaios enzimáticos	2.4				

## 4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para a execução desse projeto de pesquisa, serão realizados experimentos que envolvem ferramentas de biologia molecular, bioquímica, biofísica molecular e enzimologia já extensivamente utilizados em nosso grupo de pesquisa (6, 16–18).

## 5 REFERÊNCIAS

1. K. Liu, S. Li, Biosynthesis of fatty acid-derived hydrocarbons: perspectives on enzymology and enzyme engineering. *Curr Opin Biotechnol* **62**, 7–14 (2020).
2. N. A. Herman, W. Zhang, Enzymes for fatty acid-based hydrocarbon biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **35**, 22–28 (2016).
3. Y. J. Zhou, E. J. Kerkhoven, J. Nielsen, Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons. *Nature Energy* 2018 3:11 **3**, 925–935 (2018).
4. M. Rude, Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel P450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* species. *Appl. Environ. Microb.* **77**, 1718–1727 (2011).
5. Y. Jiang, *et al.*, Establishing an enzyme cascade for one-pot production of  $\alpha$ -olefins from low-cost triglycerides and oils without exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition. *Biotechnol Biofuels* **13**, 1–11 (2020).
6. L. L. Rade, *et al.*, Dimer-assisted mechanism of (un)saturated fatty acid decarboxylation for alkene production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120** (2023).
7. C. E. Valdez, Q. A. Smith, M. R. Nechay, A. N. Alexandrova, Mysteries of metals in metalloenzymes. *Acc Chem Res* **47**, 3110–3117 (2014).
8. D. Schilter, Metalloenzymes: Fast delivery delivers mechanism. *Nature Reviews Chemistry* 2017 1:10 **1**, 1–1 (2017).
9. A. Barwinska-Sendra, *et al.*, An evolutionary path to altered cofactor specificity in a metalloenzyme. *Nat. Commun.* **11** (2020).
10. J. L. Lee, D. L. Ross, S. K. Barman, J. W. Ziller, A. S. Borovik, C-H Bond Cleavage by Bioinspired Nonheme Metal Complexes. *Inorg Chem* **60**, 13759–13783 (2021).
11. A. J. Jasniewski, L. Que, Dioxygen Activation by Nonheme Diiron Enzymes: Diverse Dioxygen Adducts, High-Valent Intermediates, and Related Model Complexes. *Chem Rev* **118**, 2554–2592 (2018).
12. O. M. Manley, R. Fan, Y. Guo, T. M. Makris, Oxidative Decarboxylase UndA Utilizes a Dinuclear Iron Cofactor. *J Am Chem Soc* **141**, 8684–8688 (2019).
13. B. Zhang, *et al.*, Substrate-Triggered Formation of a Peroxo-Fe<sub>2</sub>(III/III) Intermediate during Fatty Acid Decarboxylation by UndA. *J Am Chem Soc* **141**, 14510–14514 (2019).
14. B. Zhang, *et al.*, Substrate-Triggered Formation of a Peroxo-Fe<sub>2</sub>(III/III) Intermediate during Fatty Acid Decarboxylation by UndA. *J Am Chem Soc* **141**, 14510–14514 (2019).
15. Z. Rui, *et al.*, Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 18237–18242 (2014).
16. R. Y. Miyamoto, *et al.*, Paradigm shift in xylose isomerase usage: a novel scenario with distinct applications. *Crit Rev Biotechnol* **42**, 693–712 (2022).
17. R. Y. Miyamoto, *et al.*, Crystal structure of a novel xylose isomerase from *Streptomyces* sp. F-1 revealed the presence of unique features that differ from conventional classes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1864**, 129549 (2020).
18. L. L. Rade, *et al.*, A Novel Fungal Lipase With Methanol Tolerance and Preference for Macaw Palm Oil. *Front Bioeng Biotechnol* **8** (2020).