

EXPLORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RODOPSINAS MICROBIANAS BRASILEIRAS PARA APLICAÇÕES EM BIOENERGIA

Pesquisador Responsável: Dr. Célio Cabral Oliveira

Grupo/Unidade: Hidrocarbonetos/LNBR

E-mail: celio.oliveira@lnbr.cnpe.br

I. INTRODUÇÃO

O cenário energético global está passando por uma transformação profunda, impulsionada por fontes renováveis e soluções baseadas em biomassa. O Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) foca, além dos biocombustíveis tradicionais, em uma diversidade de biorrenováveis e novas soluções sustentáveis para a indústria. Nesse contexto de inovação em bioenergia, destacam-se as rodopsinas microbianas, proteínas com 7 domínios transmembrana (7TM) que são capazes de absorver e utilizar luz solar por meio de interações específicas com o retinal, molécula derivada do betacaroteno e responsável pela coloração observada nas soluções em que estão presentes¹.

Através da interação com seu cromóforo, essas proteínas podem atuar como bombas de íons, sensores e canais, sendo, na sua maioria, transportadoras de prótons do citoplasma para o espaço periplasmático¹. Assim, os organismos que as possuem têm a capacidade de transformar energia luminosa em energia química, convertendo essencialmente luz em uma força motriz de prótons (PMF) através de suas membranas². Essa PMF é vital para a síntese de ATP, impulsionando processos anabólicos que permitem o crescimento acelerado desses microrganismos com baixo consumo de nutrientes, e podem ser explorados para a síntese de compostos de interesse, como o hidrogênio^{2,3}. Um vasto grupo dessas proteínas é capaz de interagir com carotenoides diversos, alterando suas propriedades físico-químicas e expandindo seu espectro de absorção, sendo denominadas antenas^{4,5}.

II. ESTADO DA ARTE

A rodopsina microbiana Tara76, identificada em metagenomas de bactérias não cultivadas, é o padrão atual em estabilidade entre rodopsinas transportadoras de prótons⁶. Estudos demonstram que Tara76 mantém funcionalidade em condições extremas, incluindo temperaturas acima de 85°C, pH de 0,02 a 13, e resistência a detergentes como Triton X-100 e dodecilsulfato de sódio (SDS), superando a rodopsina termofílica TR (*Thermus thermophilus* rhodopsin) em aproximadamente 20 vezes a 80°C^{6,7}. Sua interação com canthaxantina forma cromóforos secundários que amplificam a estabilidade térmica e eficiência fotofísica, acelerando a ligação com retinal⁸. Avanços recentes identificaram CryoRhodopsins (CryoRs), uma nova classe adaptada a ambientes frios, com atividade fotossensorial e um ciclo fotocíclico lento estabilizado por um resíduo conservado de arginina⁹. Apesar disso, nenhuma variante supera a robustez de Tara76 em condições extremas, consolidando-a como referência para prospecção de rodopsinas mais estáveis e eficientes em plataformas fototrópicas voltadas à produção de compostos de alto valor.

III. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral descobrir e caracterizar novas rodopsinas microbianas com maior estabilidade e eficiência em comparação com a proteína Tara76, referência atual do estado da arte,

para estabelecer as bases de uma futura plataforma fototrópica voltada à produção de compostos de alto valor. Enquanto os objetivos específicos são:

- a. Prospectar e sintetizar genes de rodopsinas, otimizando códons, com base em análises de similaridade estrutural, sequencial e condições ambientais.
- b. Produzir as sequências selecionadas em sistemas bacterianos.
- c. Avaliar *in vivo* a função de bombeamento de prótons das proteínas expressas.
- d. Isolar e estabilizar as proteínas em nanodiscos sintéticos para purificação.
- e. Determinar as propriedades das proteínas purificadas, incluindo estado de oligomerização, resistência térmica e perfil de absorção óptica.
- f. Explorar a capacidade de ligação das rodopsinas com diferentes cromóforos.

IV. METODOLOGIA

A triagem inicial utilizará a sequência da proteína Tara76 como referência para prospectar bancos de sequências da biodiversidade brasileira do LNBR. Sequências com similaridade serão filtradas para remover redundâncias e fragmentos curtos, seguidas por uma segunda triagem para identificar motivos DTx ou similares (como DSx), característicos de bombeadores de prótons. As sequências selecionadas serão modeladas com retinal utilizando AlphaFold3¹⁰ para validar a conformação de sete hélices transmembrana (7TM). Essas sequências serão agrupadas por similaridade sequencial e estrutural, e representantes de cada cluster serão selecionados. Os genes correspondentes terão códons otimizados para expressão bacteriana, sendo sintetizados e clonados em vetores por métodos Gibson e/ou GoldenGate, com uma tag C-terminal de 10 histidinas. A clonagem será confirmada por coloração visual na presença de cromóforo, PCR e sequenciamento Sanger, com subclonagem em *Escherichia coli* C43(DE3) sob controle do promotor T7.

As condições de expressão serão otimizadas por análise de coloração visual, e a atividade de bombeamento de prótons será avaliada utilizando um painel de LED RGB (emissão nas cores azul, verde e vermelho), com mensuração do decaimento de pH no meio externo. Para purificação, frações de membrana serão enriquecidas por ultracentrifugação, e a solubilização será testada com detergentes como dodecilmaltosídeo (DDM) e octilglicosídeo (BOG), além de nanodiscos formados por copolímeros sintéticos, como Amphipol 17, Amphipol 18 e SMALP 300. A condição ótima de solubilização será selecionada com base na estabilidade e rendimento. As proteínas solubilizadas serão purificadas por cromatografia de afinidade com resina Ni-NTA, seguida de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) para determinar o estado oligomérico. A pureza será avaliada por eletroforese em gel, SEC-MALS e dispersão dinâmica de luz (DLS).

As proteínas purificadas serão caracterizadas por espectroscopia no espectro visível para determinar o comprimento de onda de absorção máxima. A estabilidade será avaliada monitorando a absorção em diferentes condições, incluindo a presença ou ausência de cromóforos secundários, como canthaxantina, enquanto a estabilidade térmica será investigada por dicroísmo circular. Os alvos com maior potencial bioquímico e funcional serão otimizados para estudos de resolução estrutural, ajustando condições de purificação, estabilização e, se necessário, cristalização, visando análises estruturais detalhadas.

V. CRONOGRAMA

O cronograma planejado para a execução das atividades do projeto ao longo dos 12 meses de bolsa está apresentado na tabela abaixo. Ele foi elaborado com base na lógica experimental e na sequência metodológica descrita, garantindo o tempo adequado para cada etapa.

Mês	Atividades Principais	Objetivos Relacionados
1	Prospecção de sequências e triagem baseada em motivos conservados e modelos estruturais	a
1	Seleção de variantes, otimização de códons, síntese gênica	a
2-3	Clonagem e expressão em E. coli; validação por PCR, coloração visual e sequenciamento	b
4-5	Testes de atividade <i>in vivo</i>	c
6-8	Extração de membrana, solubilização com detergentes/nanodiscos e início da purificação	d
9-11	Purificação, análise de pureza e oligomerização	d, e
9-11	Caracterização óptica e térmica das proteínas purificadas	e
11	Avaliação de interação com cromóforos secundários	f
12	Seleção de candidatos promissores e preparação para estudos estruturais	e, f

VI. REFERÊNCIAS

1. Rozenberg, Andrey, et al. "Microbial rhodopsins: the last two decades." Annual review of microbiology 75.1 (2021): 427-447.
2. Lee, Keon Ah, and Kwang-Hwan Jung. "ATP regeneration system using E. coli ATP synthase and Gloeobacter rhodopsin and its stability." Journal of Nanoscience and Nanotechnology 11.5 (2011): 4261-4264.
3. Kim, Jaon YH, et al. "Improved production of biohydrogen in light-powered Escherichia coli by co-expression of proteorhodopsin and heterologous hydrogenase." Microbial cell factories 11 (2012): 1-7.
4. Imasheva, Eleonora S., et al. "Reconstitution of Gloeobacter violaceus rhodopsin with a light-harvesting carotenoid antenna." Biochemistry 48.46 (2009): 10948-10955.
5. Chazan, Ariel, et al. "Phototrophy by antenna-containing rhodopsin pumps in aquatic environments." Nature 615.7952 (2023): 535-540.
6. Shim, Jin-gon, et al. "Discovery of a microbial rhodopsin that is the most stable in extreme environments." Iscience 24.6 (2021).
7. Tsukamoto, Takashi, et al. "X-ray crystallographic structure of thermophilic rhodopsin: implications for high thermal stability and optogenetic function." Journal of Biological Chemistry 291.23 (2016): 12223-12232.
8. Shim, Jin-gon, et al. "The binding of secondary chromophore for thermally stable rhodopsin makes more stable with temperature." Protein Science 31.9 (2022): e4386.
9. Lamm, Gerrit HU, et al. "CryoRhodopsins: a comprehensive characterization of a group of microbial rhodopsins from cold environments." bioRxiv (2024): 2024-01.
10. Abramson, Josh, et al. "Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3." Nature 630.8016 (2024): 493-500.