

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20 4988

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Tese de Doutorado

Jean Marcel Rodrigues Pinho

Mapeamento dos subsítios de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* envolvidos na interação com o substrato

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva

São Paulo, 20 de Dezembro de 2004

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010456

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pinho, Jean Marcel Rodrigues
P654m Mapeamento dos subsítios de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* envolvidos na interação com substrato / Jean Marcel Rodrigues Pinho. - São Paulo, 2004.

107p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Silva, Ana Cláudia Rasera da

1. Enzimologia 2. Biologia molecular 3. Engenharia gênética I. T. II. Silva, Ana Cláudia Rasera da, orientador.

574.1925 CDD

“Mapeamento dos subsítios de α -amilase de
Xanthomonas axonopodis pv citri
envolvidos na interação com o substrato”

JEAN MARCEL RODRIGUES PINHO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA RASERA DA SILVA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
IQ - USP

Prof. Dr. MANUEL TROYANO PUEYO
IQ - USP

Prof. Dr. JOSÉ ABRAHÃO NETO
FCF - USP

Prof. Dr. JULIO CEZAR FRANCO DE OLIVEIRA
FCAV - UNESP - Jaboticabal

SÃO PAULO
20 DE DEZEMBRO 2004

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Cláudia Rasesa da Silva pela oportunidade cedida e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Richard Garrat pela colaboração na modelagem da α -amilase.

Ao Prof. Dr. Sandro Marana por ajudar nas correções.

À Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica, por intermédio da Profa. Dra. Aline Maria da Silva, por conceder a prorrogação da data do depósito da tese.

Aos meus amigos do laboratório: Leandro Moreira, Stefano Pashalidis, Ilda, Cássia Docena, Robson, Júlio Cezar, Izaura, Cláudia, Luci, Elaine, pelo apoio e companheirismo.

A todos os membros do laboratório e do Instituto de Química que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação científica.

Aos meus pais pela amizade, pelo apoio e carinho.

À FAPESP pela concessão da bolsa e apoio técnico.

Sumário

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
II - Revisão de Literatura	1
1-Carboidratos	1
2-Enzimas amilolíticas	7
2.1-Endo e exoamilases	7
2.2-Enzimas desramificadoras	8
2.3-Transferases	8
3-A enzima α -amilase	10
4-Estrutura e organização dos domínios	11
4.1- Íons cálcio e cloreto	14
4.2-Sítio catalítico	14
5-Sequências conservadas	16
6-Mecanismo catalítico	19
7-Engenharia das amilases e perspectivas	21
II- Objetivos	23
III-Materiais e Métodos	24
1-Vetores	24
2-Gene de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	24
3-Microrganismos	25
4-Meios de cultivo	25
5-Preparo de DNA plasmidial	26
6-Eletroforese em gel de agarose	26
7-Subclonagem do gene <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> no vetor de expressão de <i>E. coli</i>	27
7.1-Mutação mediada por oligonucleotídeos	27
7.2 - Montagem do sistema de expressão do gene de α -amilase	29
7.3 - Sequenciamento do DNA	29
8 - Expressão do gene de α -amilase recombinante por <i>E.coli</i>	31
9 - Purificação de α -amilase recombinante obtida de <i>E.coli</i>	31
10- Subclonagem do gene de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> no vetor de expressão de <i>Pichia pastoris</i>	32
10.1-Amplificação do gene de α -amilase	32
10.2-Subclonagem do inserto amplificado no vetor pPIC9Kf1	33
11- Transformação de células competentes de <i>E.coli</i> DH10B por eletroporação	35
11.1-Preparo das células competentes	35
11.2 - Eletroporação	35

12-Transformação de <i>Pichia pastoris</i>	35
12.1- <i>Pichia pastoris</i> linhagem GS115	35
12.2- Linearização do DNA plasmidial para a reação de transformação	36
12.3 - Preparo de células competentes de <i>P. pastoris</i> GS115	37
12.4 - Eletroporação	37
13- Expressão do gene de α -amilase recombinante em <i>Pichia pastoris</i>	38
13.1 - Indução de α -amilase recombinante em pequena escala	38
13.2 - Otimização da produção de α -amilase recombinante	38
13.3 - Indução de α -amilase recombinante em larga escala	39
14- Modelagem de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	39
15- Mapeamento dos resíduos candidatos a subsítio de interação com o substrato	40
16- Mutação sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeos	40
17- Sequenciamento de DNA	41
18 - Análises das leveduras transformantes	42
19 - Análises dos transformantes por Southern	42
19.1 - Preparo de DNA genômico	43
19.2 - Sonda de hibridização	43
20 - Obtenção de α -amilase a partir de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	43
21- Purificações da α -amilase selvagem obtida de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> e α -amilase recombinante obtida de <i>Pichia pastoris</i>	44
22- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	44
23- Quantificação da concentração de proteína	44
24- Ensaio enzimático para amilase	45
24.1 - Método do reagente ácido dinitrossalicílico (DNS)	45
24.2 - Método Somogyi -Nelson	45
25- Determinação de K_m e k_{cat}	46
26- Padrão de clivagem de p-Nitrofenil malto-oligossacarídeos pela α -amilase	47
 IV-Resultados	 49
1- Subclonagem do gene de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> no vetor de expressão de <i>E. coli</i>	49
2-Expressão do gene de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>citri</i> em <i>E. coli</i>	50
3-Purificação de α -amilase recombinante obtida de <i>E.coli</i>	52
4-Subclonagem do gene de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>citri</i> no vetor de expressão de <i>Pichia pastoris</i>	54
5-Expressão do gene de α -amilase recombinante em <i>Pichia pastoris</i>	54
5.1- Indução de α -amilase recombinante em pequena escala	54
5.2- Otimização da produção de α -amilase recombinante	55
6- Modelagem de α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	57
6.1- Busca de seqüências similares no banco de dados de proteínas	57
6.2-Construção do modelo para a α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	58
6.3- Características do modelo da amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	

<i>pv. citri</i>	60
7- Mapeamento dos resíduos de AXA candidatos a subsítios de ligação com o substrato.	61
8- Obtenções dos mutantes de α -amilase	65
9- Análises dos transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	66
10- Purificações das α -amilases selvagem e recombinantes	67
11- Caracterização das α -amilases nativa e recombinante	69
12- Análise do padrão de clivagem das amilases recombinates	70
V- Discussão	77
1- Sequência primária e modelo estrutural da α -amilase de <i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv. citri</i>	77
2- Clonagem, expressão e purificação de α -amilase	79
3- Caracterização de α -amilase recombinante selvagem	81
4- Efeito das mutações na atividade enzimática, parâmetros cinéticos e padrão de clivagem de AXA	84
5 - Atividade de transglicosilação	91
VI- Conclusões	94
VII- Referências bibliográficas	96

RESUMO

Mapeamento dos subsítios de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* envolvidos na interação com o substrato

A família das enzimas α -amilases é um modelo experimental interessante para o estudo das interações entre os aminoácidos e seus ligantes, já que estas enzimas apresentam especificidade variável, são frequentemente alvos de estudos por mutagênese e há estruturas cristalinas disponíveis para alguns membros da família. A proposta deste trabalho foi o mapear subsítios da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA) envolvidos na interação com substratos, através de comparações estruturais, mutagêneses sítio-dirigidas, análises de parâmetros cinéticos sobre amido e do padrão de clivagem sobre p-nitrofenil malto-oligossacarídeos (PNPG7, PNPG5, PNPG4). Foi criado um modelo estrutural para AXA a partir da estrutura tridimensional da α -amilase de *Alteromonas haloplanctis* (Aghajari et al., 1998). O modelo de AXA foi sobreposto na estrutura da α -amilase pancreática de porco (Qian et al., 1994) e 11 resíduos foram selecionados e mutados para alanina. As α -amilases recombinantes mutantes e selvagem foram secretadas pela levedura *Pichia pastoris* GS115, apresentando uma massa molecular aparente de 45 kDa. Todos os mutantes analisados reduziram em maior ou menor grau a atividade catalítica da enzima sobre amido e p-nitrofenil malto-oligossacarídeos. Mutações dos resíduos H88, F136, D196, E223, D295 e N299, deletaram a atividade enzimática, indicando que suas cadeias laterais são essenciais para o desempenho catalítico da enzima. As análises cinéticas e estruturais sugerem fortemente que D196, E223 e D295 são os resíduos catalíticos. Substituições das cadeias laterais de C157, H200, G227, T230 e H294 reduziram a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da α -amilase sobre o substrato amido para, respectivamente, 28%, 41%, 84%, 81% e 51%. As mutações em G227 e T230 foram menos importantes para a atividade da enzima e afinidade pelo amido, entretanto, estes resíduos mostraram-se importantes para a estabilização de complexos com substratos curtos (PNPG4). Os resultados indicam que o sítio ativo de AXA é formado por, no mínimo, seis subsítios. As interações dos anéis de glicose com os subsítios +2 e -2 são favorecidas em relação às interações nos subsítios -3

e +3, respectivamente, e a interação do anel de glicose no subsítio -3 é favorecida em relação à interação no subsítio +3. A enzima selvagem cliva preferencialmente a terceira ligação glicosídica de p-nitrofenil maltooligossacarídeos. Como produtos de hidrólise a enzima libera maltopentaose, maltotetraose, maltotriose, maltose e glicose.

Abstract

Subsite mapping of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* α -amylase involved in substrate binding

The α -amylase family is an interesting group for structure/function relationship investigation, as this family exhibits a variable cleavage pattern, several crystal structures are available, and its members were studied by mutagenesis. The aim of this study was the mapping of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* α -amylase (AXA) subsites involved in substrate binding, using structural comparison, site-directed mutagenesis and kinetics analyses. A structural model for AXA was created from the three-dimensional structure of the α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* (Aghajari et al., 1998). This model was superimposed on the structure of the pig pancreatic α -amylase, PPA (Qian et. al., 1994), and 11 residues were selected and changed to alanine. Wild type and mutant AXA were secreted by *Pichia pastoris* strain GS115 cells and showed apparent molecular mass of 45 kDa. All mutants have reduced α -amylase activity on starch and 4-nitrophenyl malto-oligosaccharides (PNPG7, PNPG5 and PNPG4) at different levels. Mutation of residues H88, F136, D196, E223, D295 and N299 indicate their essential role by complete loss of activity. Kinetic and structural analyses strongly suggested that D196, E223 and D295 are the catalytic residues. The substitution of the side chain of C157, H200, G227, T230 and H294 reduced the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of α -amylase on starch to respectively 28%, 41%, 84%, 81% and 51%. Although G227 and T230 were not much important for activity and binding on starch, these residues were important for stabilization of complexes with short substrates (PNPG4). The results indicate that AXA's active site is composed of at least six sugar binding subsites. The binding of the glucoses at subsites +2 and -2 are favored against binding at subsites -3 and +3, respectively. The binding of glucose at subsite -3 is favored against binding at subsite +3. The wild type enzyme primarily hydrolyzes the third glucosidic bond in PNPG7, PNPG5 and PNPG4 and the products of hydrolysis were maltopentaose, maltotetraose, maltotriose, maltose and glucose.

I- REVISÃO DE LITERATURA

1 – CARBOIDRATOS

Carboidratos (glicídeos ou sacarídeos), fórmula empírica $(C.H_2O)_n$, onde $n \geq 3$, são componentes essenciais para os organismos vivos. A unidade básica dos carboidratos é conhecida como monossacarídeos ou açúcares simples. Os monossacarídeos são classificados de acordo com a natureza química do grupo carbonílico e o número de átomos de carbono. Se o grupo carbonílico é um aldeído, como, por exemplo, a glicose, o açúcar é uma aldose. Se o grupo carbonílico é uma cetose, como a ribulose, o açúcar é uma cetose. Os menores monossacarídeos, aqueles com três átomos de carbono são as trioses. Aqueles com quatro, cinco, seis átomos de carbonos são respectivamente tetroses, pentoses e hexoses (figura 1).

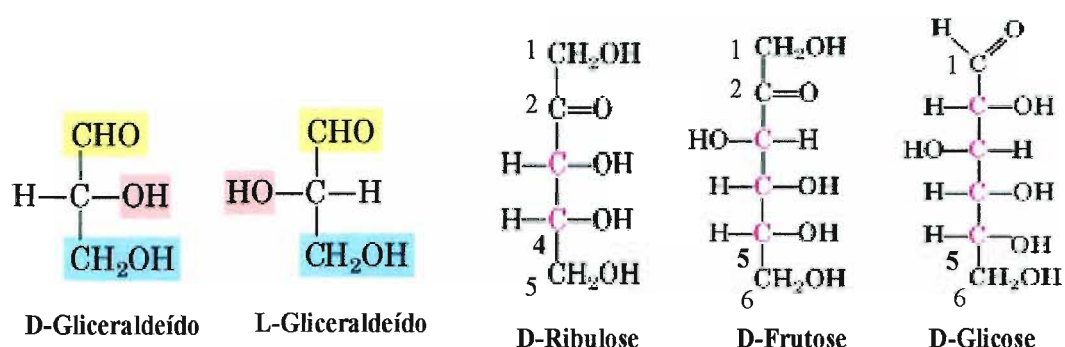


Figura 1 - Classificação dos monossacarídeos. Representação de Fischer para as moléculas do D-Gliceraldeído e L-Gliceraldeído (aldotrioses), D-Ribulose (cetopentose), D-Frutose (ceto-hexose) e D-Glicose (aldohexose). Segundo a convenção de Fischer, D açúcares apresentam a configuração do D-gliceraldeído no seu centro assimétrico mais distante (C4 nas pentoses e C5 nas hexoses). (Nelson e Cox, 2000).

O grupo hidroxil de pentoses e hexoses, através de uma reação intramolecular com as funções aldeído ou cetona, pode formar hemiacetais ou hemicetais cíclicos, respectivamente. Quando um monossacarídeo se cicliza, o carbono carbonílico, denominado carbono anomérico (carbono hemicetal ou hemiacetal na forma cíclica), torna-se um centro quiral com duas configurações possíveis. O par de estereoisômeros que se difere em configuração no carbono anomérico é denominado anômero. No anômero α , o grupo OH substituinte do carbono anomérico está do lado oposto do

anel do açúcar a partir do grupo CH_2OH no centro quiral que designa a configuração D ou L (C5 nas hexoses). O outro anômero é conhecido como a forma β (figura 2).

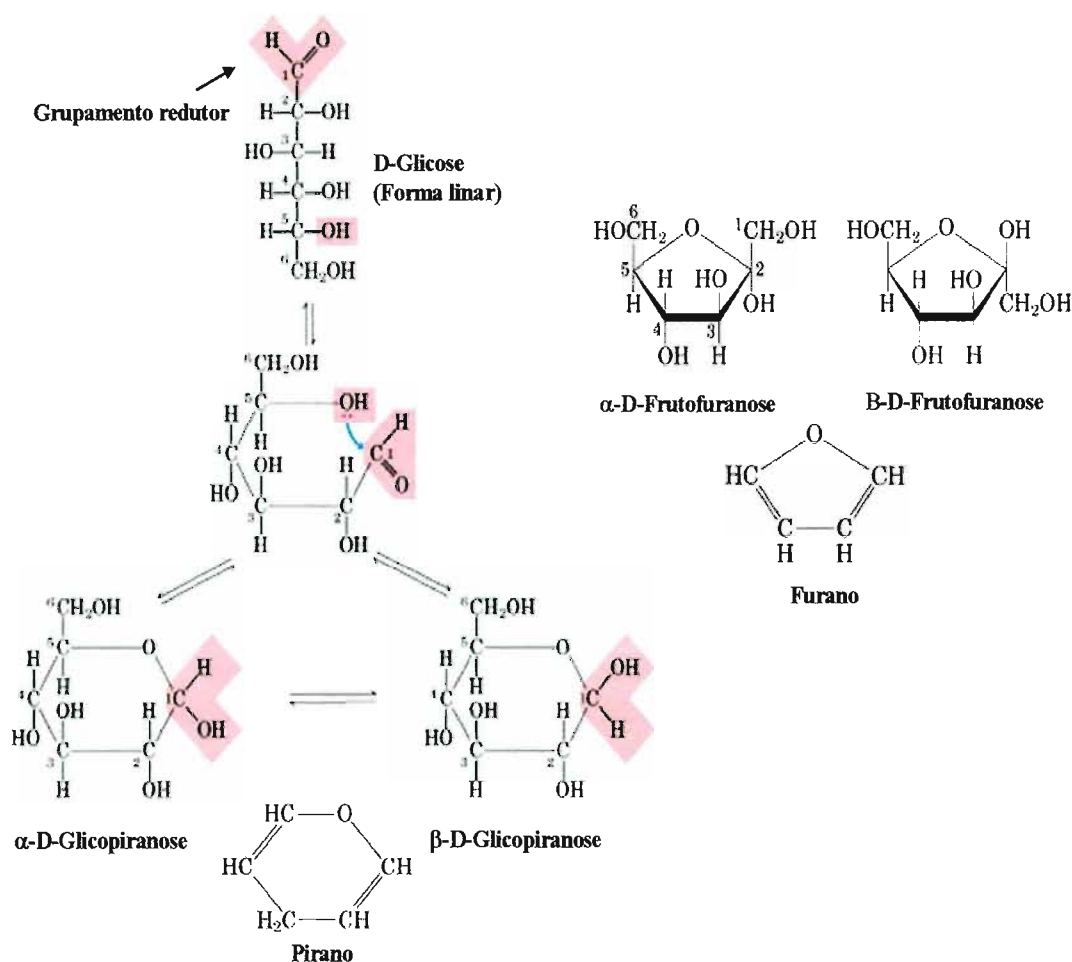
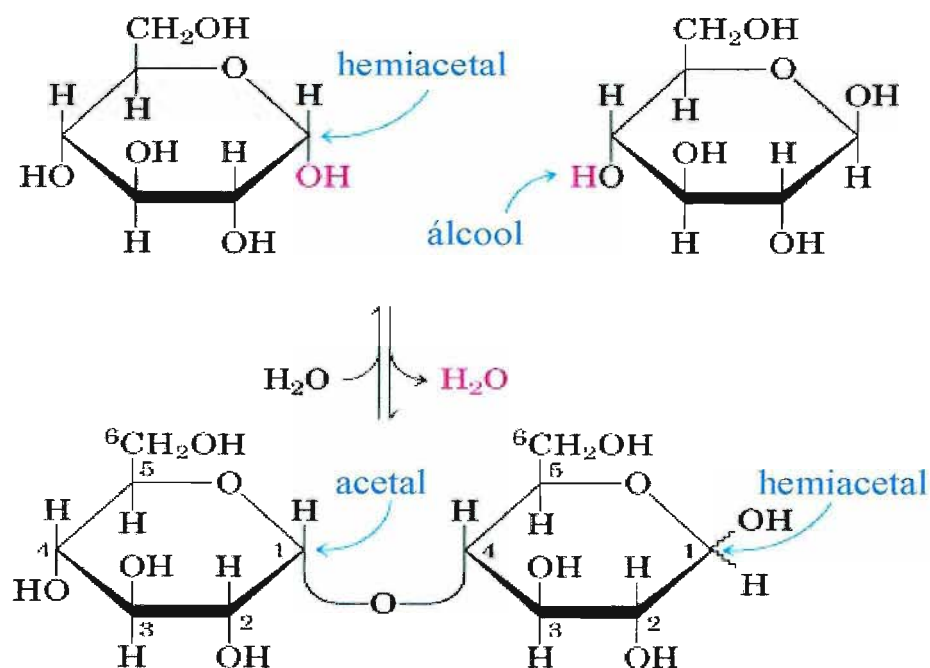


Figura 2 – Ciclização de hexoses. O aldeído em C-1 na forma em cadeia aberta da glicose reage com o grupamento hidroxila em C-5, formando um hemiacetal intramolecular. O anel resultante com seis membros é chamado de piranose devido a sua semelhança com o pirano. O grupamento cetônico em C-2 na forma em cadeia aberta da frutose pode reagir com a hidroxila em C-5, formando um hemiacetal. O anel formado é chamado de furanose devido a sua semelhança com o furano. Os açúcares contendo grupamentos aldeídico ou cetônico livre reduzem indicadores, como, por exemplo, complexos de íon cúprico (Cu^{2+}) à forma cuprosa (Cu^+). (Nelson e Cox, 2000).

Em uma catálise ácida, o grupo hidroxila do carbono anomérico de um açúcar condensa com álcoois para formar α e β glicosídeos. A ligação que conecta o carbono anomérico ao oxigênio acetal é chamada de ligação glicosídica, ligação esta que une as unidades monossacarídeos para formar açúcares poliméricos ou polissacarídeos. Os polissacarídeos mais simples são os dissacarídeos, como a maltose (figura 3).



Maltose

α -D-glicopiranosil-(1→4)-D-glicopiranoose

Figura 3 – Formação de uma ligação glicosídica. Duas moléculas de glicose condensam - se formando o dissacarídeo maltose. (Nelson e Cox, 2000).

A glicose, a principal fonte de energia para a maioria dos organismos, é encontrada na natureza preferencialmente na forma de polímeros maiores e mais complexos, como a celulose, amido e glicogênio. A celulose e o amido são produzidos exclusivamente pelas plantas e o glicogênio caracteriza-se como a principal forma de estoque deste açúcar nos animais, sendo também encontrado em grande número de microrganismos (Preiss, 1984).

O amido é utilizado como reserva energética nos vegetais e apresenta dois tipos de polímeros de glicose: α -amilose e amilopectina. A α -amilose é um polímero linear formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha,1-4$. O número de resíduos de glicose varia com de acordo com a origem, podendo ter de 1000 a 6000 unidades para a amilose do amido da batata ou entre 200 e 1200 para amilose do trigo, sendo que a média do conteúdo de amilose no amido está entre 20 e 25%.

A amilopectina é formada por curtas cadeias lineares de 10 a 60 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha, 1-4$ e ramificações formadas por ligações glicosídicas $\alpha,1-6$, com número médio de 15 a 45 moléculas de glicose ligadas $\alpha, 1-4$. As ramificações ocorrem aproximadamente a cada 30 unidades e uma molécula completa da amilopectina contém em torno de 2.000.000 de unidades de glicose, sendo uma das maiores moléculas presentes na natureza (figura 4). O modelo para a estrutura da amilopectina apresenta cadeias laterais ordenadas como aglomerados sobre um longo “esqueleto” polissacarídeo (Myers et al., 2000).

Nos vegetais, a síntese do amido envolve uma variedade de diferentes enzimas. A sacarose é o ponto de partida na síntese. Este dissacarídeo é convertido no açúcar nucleotídeo ADP-glicose, o substrato da amido sintetase, a enzima que efetivamente catalisa a incorporação da glicose ao polímero. Junto com a amido sintetase, a ação de enzimas ramificadoras auxilia na síntese da molécula de amilopectina. O amido é depositado no citoplasma das células das plantas como grânulos insolúveis em água, os quais variam na forma e diâmetro, como por exemplo, entre 2 e 30 μm no amido de milho e entre 5 e 100 μm para o amido de batata (Smith, 1999).

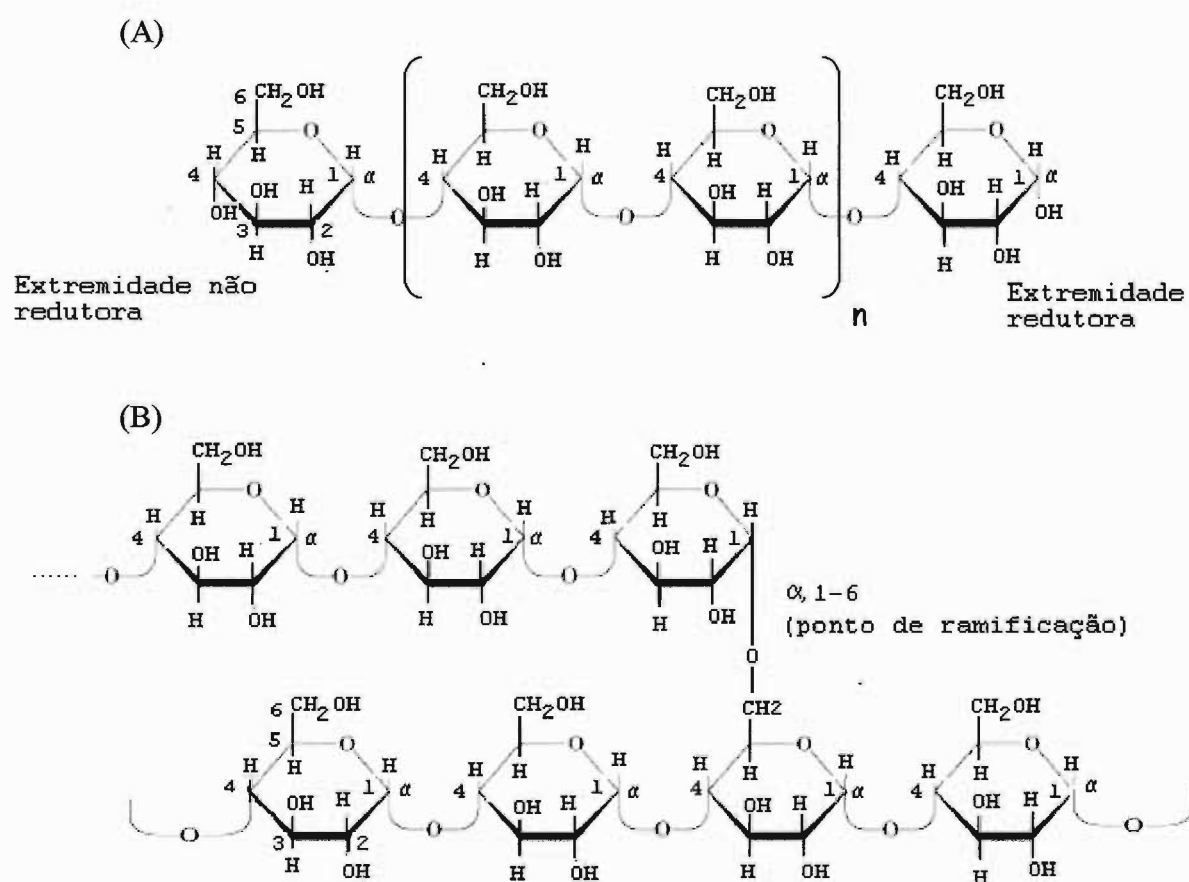


Figura 4- Polímeros do amido. (A) Estrutura linear da α -amilose mostrando as ligações $\alpha, 1-4$. (B) Parte da estrutura da amilopectina contendo uma ramificação, resultante da ocorrência de uma ligação $\alpha, 1-6$.

As plantas também sintetizam polissacarídeos com funções estruturais como a celulose, o principal componente estrutural da parede celular. A celulose é um polímero linear formado por até 15.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β ,1-4. A celulose se dispõe como fibras formadas por cadeias paralelas, arranjadas em forma estendida, as quais são mantidas por ligações de hidrogênio intracadeia que por sua vez empilham-se verticalmente. A molécula inteira é estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares entre unidades de glicoses das cadeias vizinhas. Esta estrutura altamente rígida confere às fibras de celulose um caráter insolúvel em água, apesar da natureza hidrofílica (Voet e Voet, 1995).

Nos animais, o polissacarídeo de reserva é o glicogênio, o qual apresenta estrutura primária semelhante à da amilopectina, sendo que a principal diferença está nos pontos de ramificação. No glicogênio as cadeias laterais são mais curtas, porém aproximadamente duas vezes maiores em número, ocorrendo a cada 8 a 12 resíduos de glicose. O glicogênio está presente em todas as células, mas é mais prevalente nas células do músculo esquelético e do fígado, onde ocorrem como grânulos citoplasmáticos. Nas células o glicogênio é degradado pela enzima glicogênio fosforilase, que cliva as ligações α ,1-4 a partir das extremidades não redutoras, gerando glicose 6-fosfato, que por sua vez caracteriza-se como substrato da via glicolítica. Os pontos de ramificação α ,1-6 são clivados por enzimas desramificadoras (Voet e Voet, 1995).

Portanto, os organismos que podem hidrolisar eficientemente estes polímeros citados têm disponíveis enormes quantidades de glicose. Humanos não produzem enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β ,1-4, e, conseqüentemente, as fibras (celulose) não são digeríveis pelos humanos. Por outro lado, os alimentos ricos em amido são bem digeridos pelos humanos devido à presença de enzimas na saliva e no trato gastrointestinal. Desta forma, as enzimas que atuam sobre estes polissacarídeos são importantes no metabolismo dos carboidratos, não somente para os animais superiores como para outros organismos, como insetos, microrganismos procariotos e eucariotos.

2- ENZIMAS AMIOLÍTICAS

Para converter o amido ou o glicogênio em fonte de energia, as células requerem uma combinação de enzimas. Basicamente, as enzimas processadoras do amido podem ser divididas em quatro grupos: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases.

2.1 - Endo e exoamilases

As endoamilases são capazes de clivar ligações glicosídicas do tipo $\alpha,1-4$ presentes na parte interna das cadeias da α -amilose e amilopectina. A enzima α -amilase (EC 3.2.1.1) é um exemplo bem conhecido, sendo encontrada tanto em procariotos quanto eucariotos (Pandey et. al., 2000). Os produtos finais da ação da α -amilase são oligossacarídeos de diferentes comprimentos, que apresentam retenção da configuração α do carbono anomérico, e α -dextrinas (figura 5), as quais constituem oligossacarídeos ramificados (Bertoldo e Antranikian, 2002).

Enzimas pertencentes ao segundo grupo, as exoamilases, ou hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas $\beta,1-4$, tais como as β -amilases (EC 3.2.1.2), ou clivam ambas ligações $\alpha,1-4$ e $\alpha,1-6$, como as glicoamilases (EC 3.2.1.3) e α -glicosidases (EC 3.2.1.20). Exoamilases atacam o substrato a partir da extremidade não redutora produzindo glicose (no caso da glicoamilase e α -glicosidase) ou maltose e β -dextrina pela ação da β -amilase (figura 5).

As glicoamilases, da mesma forma que as β -amilases, sempre liberam produtos com a configuração do carbono anomérico alterada de α para β (β -anômeros), ao passo que as α -glicosidases liberam glicose com α -configuração. Glicoamilase e α -glicosidase diferem-se também na preferência pelo substrato; enquanto a α -glicosidase atua melhor em malto-oligossacarídeos curtos, as glicoamilases hidrolisam com mais eficiência longas cadeias polissacarídicas (van der Maarel et al., 2002).

2.2 - ENZIMAS DESRAMIFICADORAS

Neste grupo incluem enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas $\alpha,1-6$: as isoamilases (EC 3.2.1.68) e as pululanases. A principal diferença entre pululanases e isoamilases está na habilidade para hidrolisar a pululana, um polissacarídeo formado por maltotrioses que são ligadas $\alpha,1-6$. Isoamilases somente hidrolisam ligações $\alpha,1-6$ na amilopectina, liberando longos oligossacarídeos lineares (van der Maarel et al., 2002).

As pululanases por sua vez, têm sido classificadas em dois grupos, baseando na especificidade pelo substrato e pelo tipo de produto liberado: pululanase tipo I e pululanase tipo II (Bertoldo e Antranikian, 2002). Pululanase tipo I (EC. 3.2.1.41) hidrolisa especificamente ligações $\alpha,1-6$ tanto em pululana quanto em oligossacarídeos ramificados, produzindo respectivamente maltotrioses e oligossacarídeos lineares. Pululanase tipo II ou amilopululanase ataca ligações glicosídicas $\alpha,1-6$ em pululana e polissacarídeos ramificados. Entretanto, diferentemente das pululanases tipo I, esta enzima também ataca ligações glicosídicas $\alpha,1-4$ em polissacarídeos lineares e ramificados. A ação da pululanase tipo II sobre a amilopectina leva a formação de glicose, maltose e maltotriose (Figura 5).

2.3- TRANSFERASES

As transferases clivam ligações glicosídicas $\alpha,1-4$ de uma molécula doadora e transferem parte do doador para um receptor glicosídico, formando uma nova ligação glicosídica. Enzimas como ciclodextrinas glicosiltransferases (CGTase EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação $\alpha,1-4$, enquanto a enzima ramificadora (EC 2.4.1.18) forma uma ligação $\alpha,1-6$, sendo uma enzima chave na biossíntese do amido e glicogênio.

A ciclodextrina glicosiltransferase possui baixa atividade hidrolítica e produz uma série de dextrinas cíclicas não redutoras (α -, β -, e γ -ciclodextrinas), formadas via reação de transglicosilação intramolecular, na qual a enzima cliva a ligação $\alpha,1-4$ de polissacarídeos, ligando concomitantemente a extremidade redutora à extremidade

não redutora (Van Der Veen et al., 2000). As ciclodextrinas α -, β -, e γ - contêm respectivamente seis, sete e oito unidades de glicose ligadas α , 1-4 (figura 5).

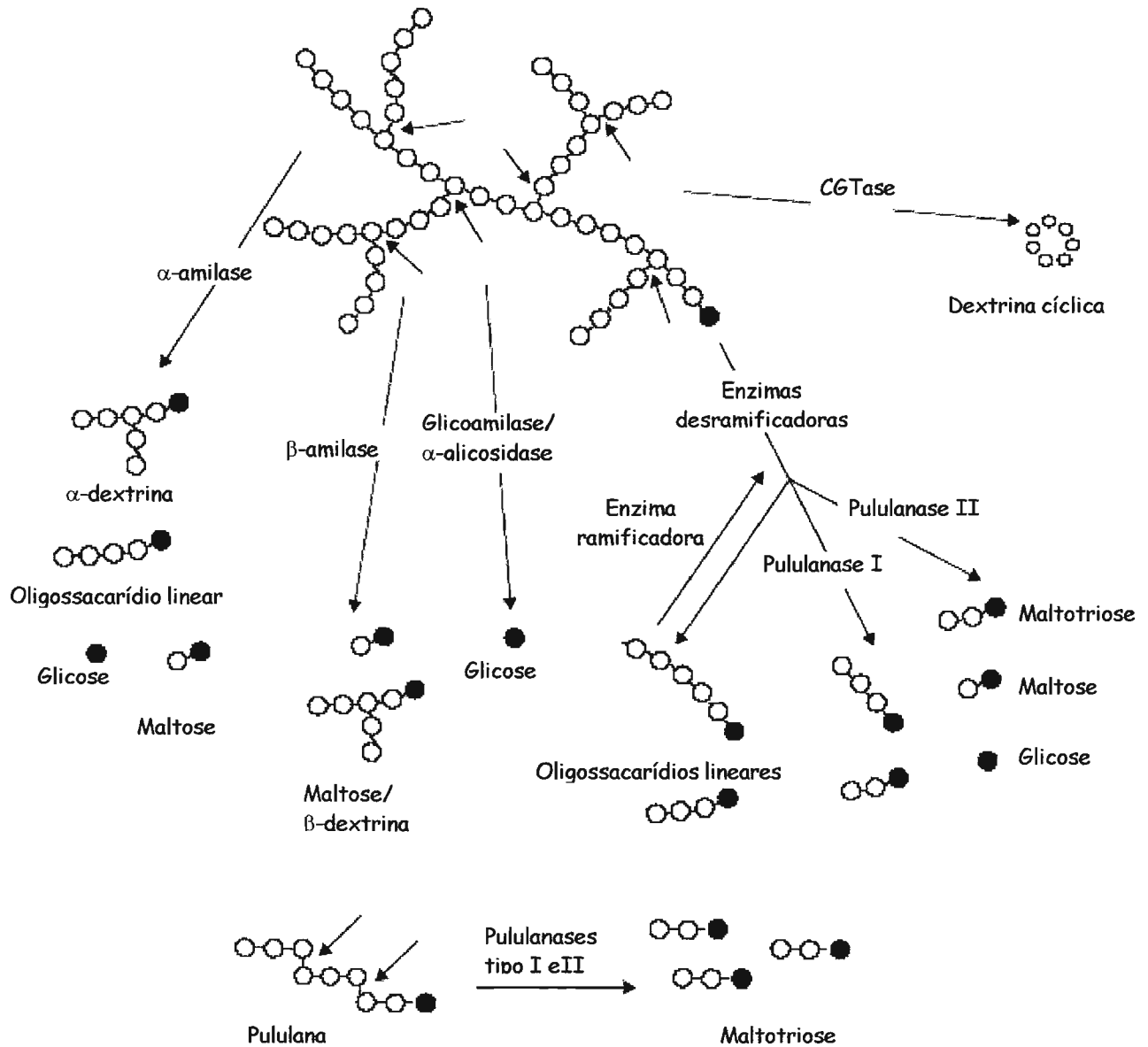


Figura 5 - Representação esquemática da ação de enzimas processadoras do amido. Pululanase tipo I e tipo II atacam ligações glicosídicas α ,1-6 em pululana, oligossacarídeos e polissacarídeos. Pululanase tipo II também ataca ligações α , 1-4 em vários oligossacarídeos e polissacarídeos. Círculos em preto indicam açúcares redutores (Bertoldo e Antranikian, 2002).

3 - A ENZIMA α -AMILASE

As α -amilases, como também a maioria das enzimas que processam o amido, pertencem a uma família de enzimas agrupadas de acordo com a similaridade de seqüências: a família α -amilase ou família 13 das glicosídeo hidrolases (Henrissat, 1991).

Este grupo compreende enzimas que apresentam as seguintes características: hidrolisam ligações glicosídicas α , produzindo sempre α -anômeros; formam ligações glicosídicas $\alpha,1-4$ ou $\alpha,1-6$ por transglicosilação, ou ainda apresentam uma combinação de ambas atividades de hidrólise e transglicosilação; possuem a estrutura $(\beta/\alpha)_8$ ou “TIM barril” (figura 6). Estas enzimas possuem quatro regiões altamente conservadas na seqüência primária, nas quais encontram-se aminoácidos que formam o sítio catalítico, bem como aqueles que são essenciais para a estabilidade topológica da estrutura (Svensson, 1994).

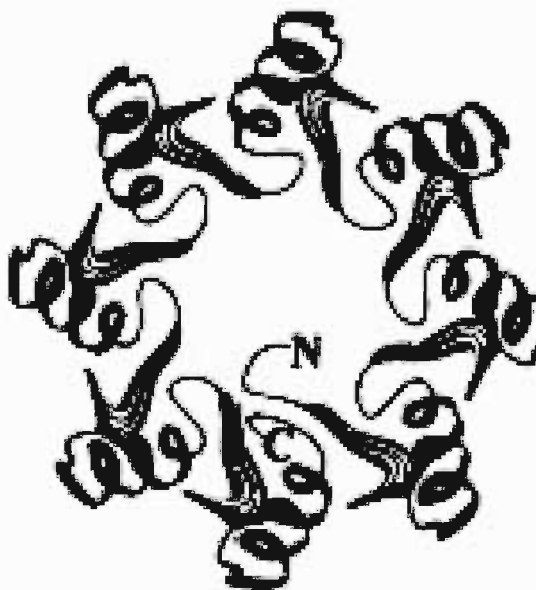


Figura 6 - Representação esquemática da estrutura $(\beta/\alpha)_8$. Nesta estrutura, oito fitas betas são arranjadas em forma de barril e circundadas por oito α - hélices. (van der Maarel et al., 2002)

4- ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS

Uma característica das enzimas da família 13 é que todas catalisam a hidrólise de ligações α -glicosídicas com retenção da configuração anomérica do carbono 1, embora variam em suas especificidades pelo substrato e pelo tipo de produto liberado. Essas variações podem ser atribuídas a organização de diferentes domínios junto ao centro catalítico ou a subsítios extras de ligação a açúcares (tabela 1).

No caso das α -amilases, estudos por difração de raio-X em enzimas de diferentes origens (Brayer et al., 1995; Kadziola et al., 1998; Larson et al., 1994; Machius et al., 1995; Ramasubbu, 1996; Strobl et al., 1998; Swift et al., 1991) têm demonstrado que todas são formadas por três domínios: A, B e C (tabela 1, figura 7).

O domínio A, o mais conservado de todos os domínios entre as enzimas da família 13, é o domínio catalítico formado pela estrutura $(\beta/\alpha)_8$. Esta estrutura foi inicialmente observada na enzima triose fosfato isomerase (Banner et al., 1975) e por isso é também conhecida por “TIM barril”, sendo encontrada não somente nos membros da família 13, mas também em diversas enzimas (Svensson e Sogaard, 1992). Nas enzimas α -amilases o domínio A ocorre na extremidade N-terminal.

As enzimas da família 13, cujas estruturas tridimensionais foram determinadas por cristalografia, apresentam uma grande alça entre as terceiras fita beta e α -hélice, a qual é conhecida como domínio B. Este apresenta uma estrutura irregular que varia significativamente em tamanho (44 a 133 resíduos) (Janecek et al., 1997). O domínio B forma grande parte da fenda de ligação ao substrato e presume-se ser importante na variabilidade de especificidade observada nos membros deste grupo (MacGregor, 1988).

O domínio C, a porção C-terminal das α -amilases, é composto por fitas beta formando um motivo “Greek Key”, que protege do solvente os resíduos hidrofóbicos do domínio A (MacGregor et al., 2001). Há relatos que sugerem também sua participação como sítio adicional de ligação ao substrato (Dauter et al., 1999).

Tabela 1 - Organização dos domínios de enzimas pertencentes à família 13 e seus principais substratos.

ENZIMA	EC	DOMÍNIOS	PRINCIPAL SUBSTRATO
Glucan ramificadora	2.4.1.18	A, B, F	Amido, glicogênio
Ciclodextrina glicosiltransferase	2.4.1.19	A, B, C, D, E	Amido
Amilomaltase	2.4.1.25	A, B1, B2	Amido, glicogênio
Maltopentaose-amilase	3.2.1 -	A, B, I	Amido
α-Amilase	3.2.1.1	A, B, C	Amido
Oligo-1,6-glicosidase	3.2.1.10	A,B	Amilopectina
Amilopululanase	3.2.1.41 ou 3.2.1.1	A, B, H, G, I	Pululana
ciclomaltodextrinase	3.2.1.54	A, B	Ciclodextrinas
Isoamilase	3.2.1.68	A, B, F, 7	Amilopectina
Maltotetraose-amilase	3.2.1.60	A, B, C, E	Amido
Amilase maltogênica	3.2.1.133	A, B, C, D, E	Amido
Neopululanase	3.2.1.135	A, B, G	Pululana

Referência: Van der Maarel et al., 2002

Domínios extras são identificados em outras enzimas da família 13 (tabela1). Uma segunda saliência do domínio A (domínio B2 ou 7) está presente em enzimas que hidrolisam ligações $\alpha,1-6$ internas. Na α -amilase maltogênica e na ciclodextrina glicosiltransferase, o domínio C é seguido pelo domínio D cuja função é desconhecida. Há enzimas que possuem o domínio E, o qual se caracteriza como sítio de interação com amido (Knegtel et al., 1995). Outros domínios característicos são os N-terminais F, H ou G, encontrados em enzimas que têm ação endo ou que hidrolisam ligações $\alpha,1-6$ de substratos ramificados (van der Maarel et al., 2002).

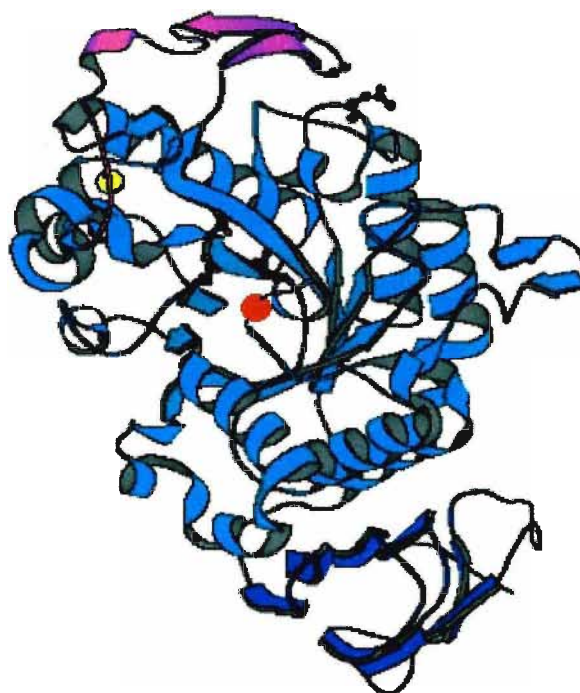


Figura 7 - Estrutura da α -amilase de *Alteromonas haloplanctis* (PDB-1B0I). Domínio A (azul). Domínio B (rosa). Domínio C (violeta). Íon cálcio (esfera amarela). Íon cloreto (esfera vermelha). (Aghajari et al., 1998b).

4.1 - ÍONS CÁLCIO E CLORETO

Todas as α -amilases contêm um sítio conservado para a ligação do íon cálcio localizado na interface entre os domínios A e B (figura 7). O íon cálcio é importante na manutenção da estabilidade da enzima e sugere-se que sua função é principalmente estrutural, uma vez que ele está distante do sítio ativo para participar diretamente na catálise. Um ou mais íons cálcio adicionais têm sido encontrados em algumas estruturas (Boel et al., 1990; Machius et al., 1998).

Várias α -amilases possuem um íon cloreto no sítio ativo (figura 7), que aumenta a eficiência catalítica da enzima e contribui para uma maior afinidade pelo íon cálcio (Levitsky e Steer, 1974). Os íons cloreto foram encontrados em α -amilases de diferentes origens (Aghajari et al., 1998a; Brayer et al., 1995; Larson et al., 1994; Strobl et al., 1998)

4.2 - SÍTIO CATALÍTICO

O sítio catalítico das α -amilases está localizado na interface entre os domínios A e B, na extremidade C-terminal das fitas beta na estrutura “TIM barril”. Estruturas tridimensionais de α -amilases complexadas com o inibidor pseudo-tetrassacarídeo acarbose, mostram que o sítio de ligação pode acomodar, dependendo da espécie, de 4 a 10 unidades de glicose. Cada unidade de glicose é ligada a aminoácidos que constituem os subsítos de ligação.

De acordo com a nomenclatura estabelecida por Davies e colaboradores (Davies et al., 1997), os subsítos de números negativos localizam-se no lado não redutor da ligação a ser clivada, já os subsítos de números positivos estão no lado redutor. A clivagem ocorre entre os subsítos -1 e +1, caracterizando um modo produtivo de ligação. Nas α -amilases, há de dois a quatro subsítos presentes na extremidade redutora ao passo que o número de subsítos na extremidade não redutora varia entre dois e sete (Bak-Jensen et al., 2004; Brzozowski et al., 2000; MacGregor, 1988).

O inibidor acarbose complexado com α -amilases ocupa os subsítos -1 a +3 (figura 8). Foi observado que algumas amilases processam a acarbose transformando-a

em derivados maiores (Aghajari et al., 2002; Brzozowski e Davies, 1997; Brzozowski et al., 2000; Dauter et al., 1999), por meio de transglicosilação, sugerindo que esta atividade converte a acarbose num inibidor mais potente. A acarbose é formada pelo pseudo-dissacarídeo acarviosina ligado à maltose. O efeito inibidor é atribuído a ligação N-glicosídica do substrato.

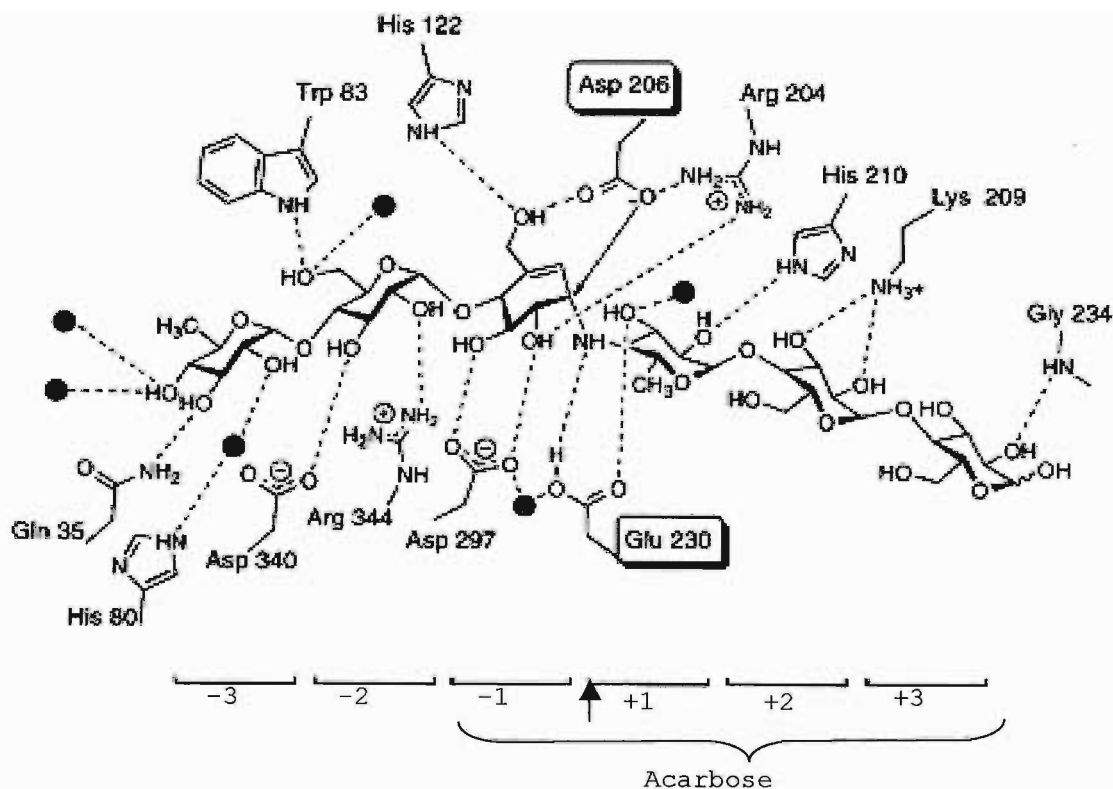


Figura 8 - Diagrama esquemático das interações da acarbose com TKA-amilase (Brzozowski e Davies, 1997). Ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). Moléculas de água (esferas). Substâncias identificadas de acordo com Davies et al., (1997). A seta indica o ponto de clivagem.

5- SEQÜÊNCIAS CONSERVADAS

As seqüências das enzimas pertencentes à família 13 apresentam quatro regiões conservadas (tabela 2). Estas regiões localizam-se nas fitas beta 3, 4, 5 e na alça que conecta a fita beta 7 à α -hélice 7 da estrutura “TIM barril” (figura 9).

Os resíduos que formam a região I encontram-se na extremidade C-terminal da terceira fita beta (β_3). Essa região contém os aminoácidos altamente conservados Asp100, Asn104 e His210 (os aminoácidos citados neste item referem-se à amilase de *Bacillus licheniformis*) (tabela 2). Além disso, há uma preferência por valina na posição 102. O resíduo Asp100 é importante para a integridade do sítio ativo; Asn104, por outro lado, não participa diretamente na estabilização da estrutura do sítio catalítico, mas coordena o conservado íon cálcio entre os domínios A e B (Boel et al., 1990; Machius et al., 1998).

A região II está localizada na fita β_4 e contém o nucleófilo catalítico Asp231, além do resíduo Arg229. Estes dois aminoácidos são invariáveis e indispensáveis para a atividade catalítica das enzimas da família 13 (Svensson, 1994). Lys234 e His235 também são encontrados nesta região e participam da ligação ao substrato no subsítio +2 (Svensson, 1994; Svensson e Sogaard, 1992).

A região III localiza-se na porção C-terminal da fita β_5 e inclui o resíduo catalítico Glu261, o qual é o único totalmente conservado.

Os aminoácidos que formam a região IV estão situados na alça que conecta a fita β_7 à α -hélice7. Esta alça protege o sítio ativo do solvente (Nielsen e Borchert, 2000). Nesta região, His327 e Asp328 são os únicos totalmente conservados e ambos envolvidos na ligação com o substrato (Svensson,1994). Sugere-se que Asp328 participe indiretamente da catálise (Klein et al., 1992; Knegtel et al., 1995; Strokopytov et al., 1995).

Janecek (1992) propôs que há uma quinta região conservada adicional nas seqüências das enzimas da família 13. Esta região contém um aspartato que atua como ligante ao íon cálcio.

Tabela 2 - Comparação das quatro regiões mais conservadas de enzimas da família 13 das glicosídeo hidrolases

ENZIMA	ESPÉCIES	REGIÃO I	REGIÃO II	REGIÃO III	REGIÃO IV
		B	C	BB	BC
			BBB		
α -Amilase	<i>Bacillus licheniformis</i>	100 DVVINH	227 GFR LD AVKH	257 FTVAE Y WQ	320 AVTFV D NHD
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	95 DVVF D H	231 GFR LD AVKH	260 FTVGE Y WS	323 AVTFV D NHD
	<i>Escherichia coli</i>	400 DVVM N H	457 GFR VD TAKH	499 WMTGE A WG	558 VLSYL S SHD
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	83 DIV F NH	192 GFR VD AAKH	219 YVFGE V IT	287 AVTFA V THD
	<i>Xanthomonas campestris</i>	83 DVVF N H	192 GFR VD AAKH	219 YVFGE V IT	287 AVTFA V THD
	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	84 DT L INH	170 GFR FD ASKH	196 VVFQE V ID	256 AVVFE V DNHD
	<i>Asp. oryzae</i> (Taka-amilase A)	117 DV V ANH	202 GLR ID TVKH	226 YCIGE V LD	289 LGTFV E NHD
	Cevada (2)	87 DIV V NH	176 GWR FD FAKG	200 FVAE I WT	281 AVTFV D NHD
	Trigo (3)	111 DIV V NH	200 AWR LD FAKG	225 FVVG E LYD	287 TVT FID NHD
	Porco (pâncreas)	96 DA V INH	193 GFR LD ASKH	229 FIFQE V ID	292 ALVFE V DNHD
Humana (pâncreas)	96 DA V INH	193 GFR LD ASKH	229 FYFQE V ID	292 ALVFE V DNHD	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	112 DV V PNH	200 GFR FD FVRG	215 FCVGE L WK	251 AVTFV D NHD	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106 DL V INH	172 GFR ID TAGL	272 MRVGE V AH	341 ATTYI E NHD	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	281 DV V YNH	349 GFR FD LMGI	377 LVFGE G WD	461 TINYV E SHD	
<i>Pseudomonas amy loderosa</i>	291 DV V YNH	171 GFR FD LASV	412 RILRE F TV	499 SINF ID VHD	
<i>Bacillus cereus</i>	98 DL V VNH	196 GFR MD VINF	251 MTVGE M PG	321 NSLYW NN NHD	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	131 DF AP NH	221 GIR MD AVKH	254 FTFGE W F L	316 QVTF ID NHD	
Batata	355 DV V HSH	426 GFR FD GITS	453 VTMAE E EST	545 CIAYAE S HD	
Humana	298 DV V YNH	506 GVR LD NCHS	534 YVVAE EL F T	600 ALFMD I THD	

Referência: (Svensson, 1994); exceto seqüências de *X. axonopodis* (este trabalho), *X. Campestris* (Hu et al., 1992) e *A. haloplanctis* (Aghajari et al., 1998). **B**= ligante ao substrato. **C**= resíduo catalítico. Resíduos altamente conservados estão em negrito.

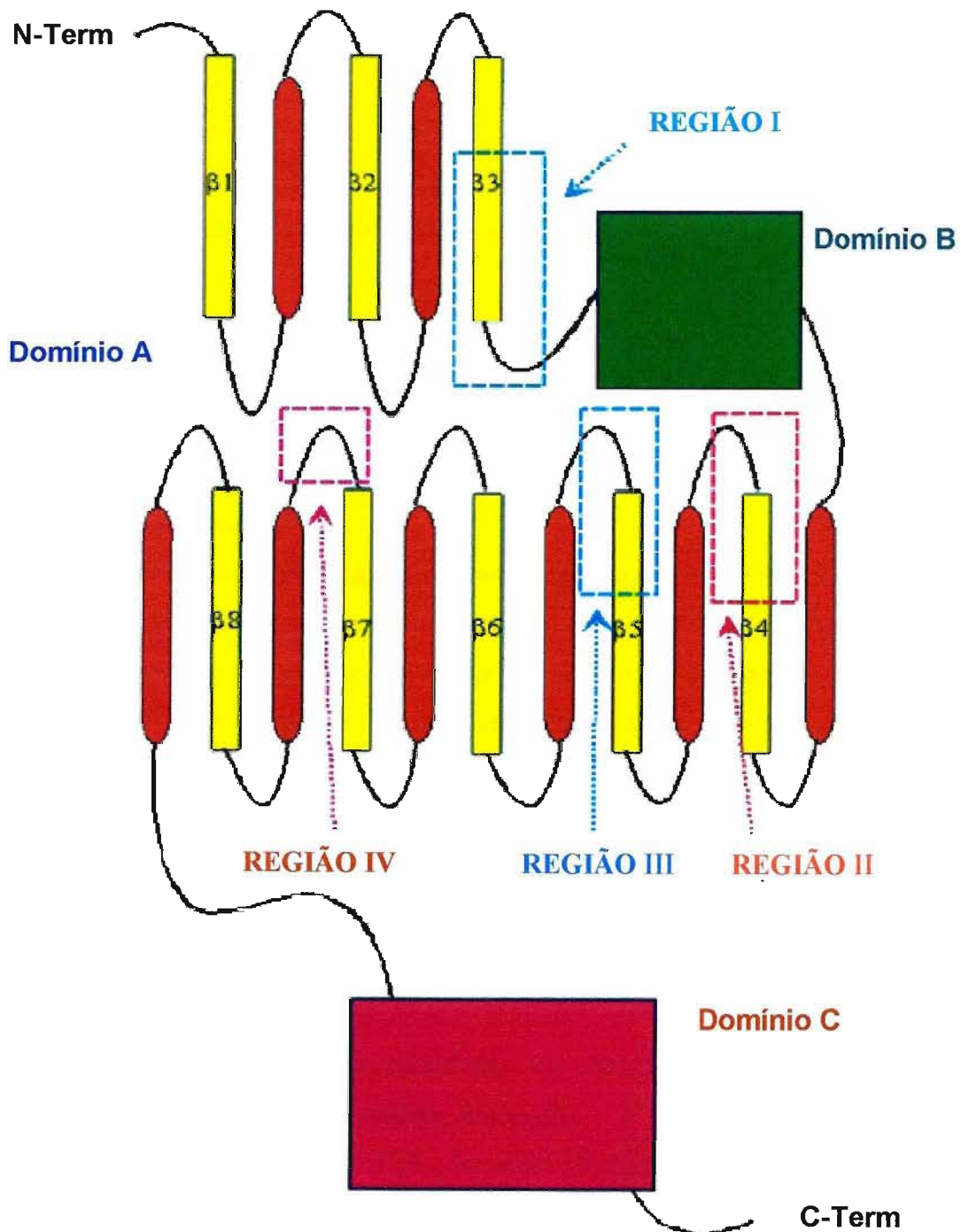


Figura 9- Diagrama topológico das α -amilases. As posições das quatro seqüências conservadas (tabela 2) são indicadas pelas setas. (Nielsen e Borchert, 2000).

6- MECANISMO CATALÍTICO

As α -amilases clivam ligações glicosídicas α ,1-4 com retenção da configuração do carbono anomérico do açúcar, ou seja, a extremidade redutora formada após a clivagem do substrato é liberada na configuração α . Esse comportamento é característico das enzimas da família 13, para as quais, o mecanismo de catálise proposto (Davies e Henrissat, 1995; McCarter e Winthers, 1994; Sinnott, 1990) envolve um deslocamento duplo e a participação de três resíduos catalíticos no sítio ativo: um ácido glutâmico como catalisador ácido/base e dois aspartatos, sendo que um deles atua como nucleófilo (figura 10).

No primeiro deslocamento, após o substrato se ligar ao sítio ativo, o ácido glutâmico doa um próton para o oxigênio da ligação glicosídica entre os subsítios -1 e $+1$, e o aspartato nucleófilo ataca o C1 da glicose no subsítio -1 , formando um transiente íon oxocarbânio como estado de transição, seguido da formação de um intermediário covalente β -glicosil-enzima.

No segundo estágio da reação, enquanto a porção protonada do substrato deixa o subsítio $+1$, uma molécula de água ou de açúcar move-se para o sítio ativo e ataca a ligação covalente entre o resíduo do açúcar no subsítio -1 e o aspartato. Novamente nesta etapa ocorre formação de um íon oxocarbânio como estado de transição. Na hidrólise, a base catalisadora glutamato (na forma carboxilato) aceita um hidrogênio da molécula de água e o oxigênio da água ataca o centro anomérico no subsítio -1 , liberando o produto na configuração α -anomérica e restaurando o grupo ácido original. A reação de transglicosilação pode ocorrer se o ataque nucleofílico na segunda etapa for feito pelo grupo hidroxila livre de um resíduo de açúcar, resultando na formação de uma cadeia de açúcar estendida.

O terceiro resíduo catalítico conservado, um segundo aspartato, não desempenha função direta no mecanismo de catálise, entretanto, sua importância é conhecida. Foi sugerido que este aspartato eleva o pK_a do ácido glutâmico que atua como doador de prótons, mantendo-o no estado de protonação correto para a atividade (Klein et al., 1992; Knegtel et al., 1995; Strokopytov et al., 1995) e, que através de ligação de hidrogênio com os grupos OH2 e OH3 do resíduo de açúcar no subsítio -1 , auxilia na correta

distorção deste para uma catálise eficiente (Strokopytov et al., 1995; Uitdehaag et al., 1999).

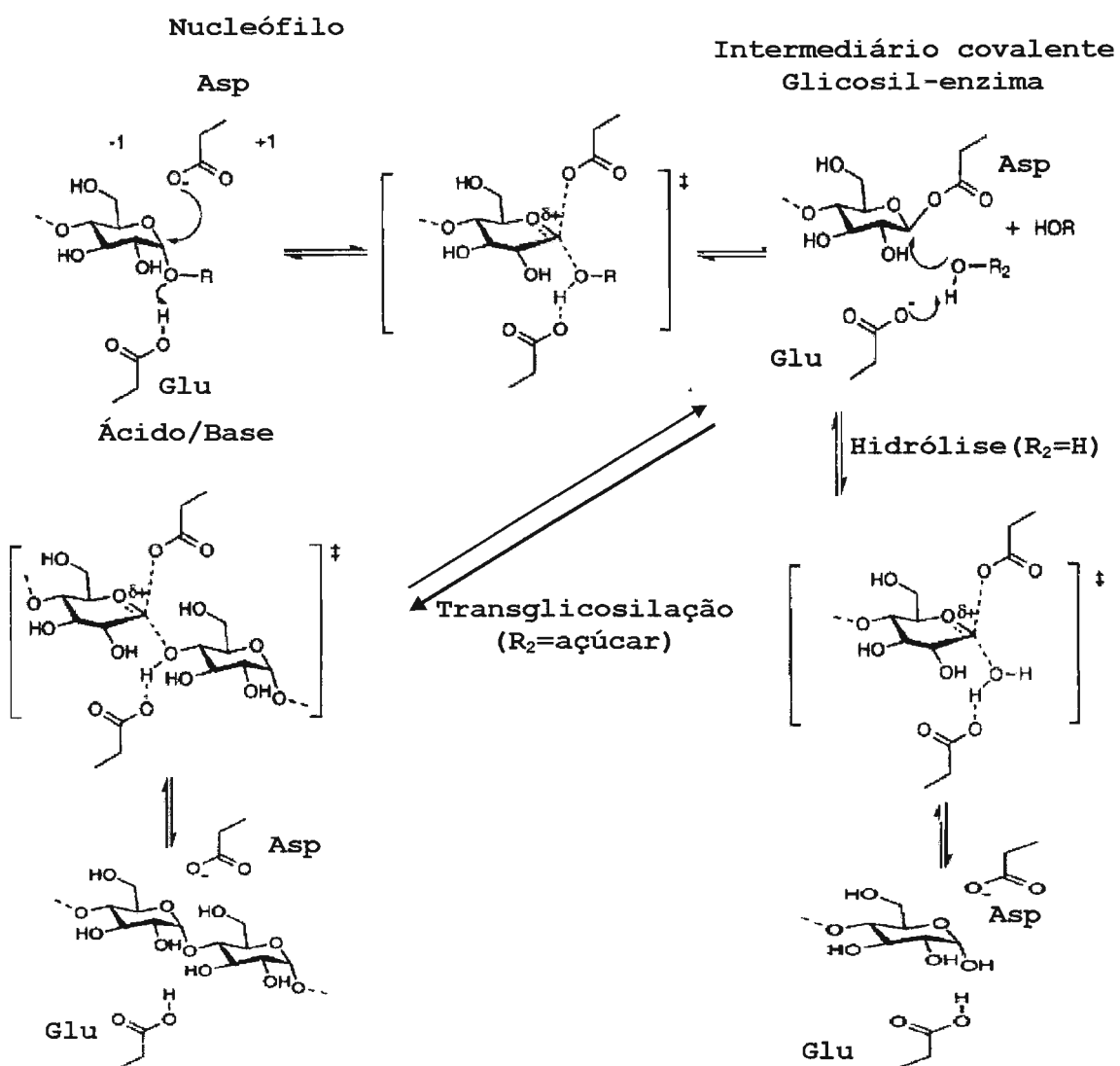


Figura 10 - Esquema do mecanismo catalítico das α -amilases. As reações de hidrólise e transglicosilação são mostradas. (Brzowski e Davies, 1997).

7 - ENGENHARIA DAS AMILASES E PERSPECTIVAS

As enzimas que hidrolisam o amido são utilizadas em inúmeros processos industriais (Guzman-Maldonado e Paredes-Lopez, 1995). As α -amilases, por exemplo, são usadas nas etapas de liquefação e sacarificação do amido, na indústria de panificação para gerar compostos fermentáveis, na indústria de papel e como aditivos nos detergentes. Estes processos requerem condições físicas e químicas que são na maioria das vezes adversas e extremas para uma atuação ótima das enzimas, especialmente em relação à temperatura e pH. Somente algumas enzimas disponíveis comercialmente atendem à demanda industrial; por exemplo, as α -amilases de *Bacillus licheniformes*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus stearothermophilus* são bem difundidas em processos industriais em função da termoestabilidade inerente. Desta forma, é crescente o interesse na engenharia de enzimas que atendam a necessidades específicas.

Fatores como o aumento do número de seqüências e de estruturas tridimensionais disponíveis, contribuem para este propósito. Nas últimas décadas foram clonados genes de inúmeras amilases (Abarca et al., 1991; Declerck et al., 1990; Feller et al., 1998; Juge et al., 1993; Rydberg et al., 1999), e em função da importância econômica destas enzimas, é crescente o número de mutantes produzidos principalmente com o objetivo de gerar enzimas mais estáveis. Considerando a grande diversidade de especificidade encontrada entre as enzimas deste grupo, as técnicas de bioengenharia também estão sendo aplicadas com o intuito de produzir enzimas com padrões de especificidade modificados. Alguns exemplos de mutações realizadas para estes propósitos são citados abaixo:

- Neopululanase de *B. stearothermophilus*: Aumento da atividade de transglicosilação, aumentando a hidrofobicidade na região do sítio catalítico (Kuriki et al., 1996).
- α -amilase de *Bacillus* KSM-1378: Aumento da termoestabilidade da enzima pela deleção de Arg181-Gly182 (Igarashi et al., 1998).
- α -amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 (TVA I): Mutações nos resíduos Ala357, Gln359 e Tyr360, localizados na região II, e a deleção de 11 resíduos localizados após C-terminal desta região, modificaram

significativamente o padrão de clivagem em pululana, favorecendo a atividade α , 1,6 (Ibuka et al., 1998).

- α -amilase quimérica de *Bacillus*: Alteração do perfil pH-atividade da enzima inserindo resíduos carregados próximo ao sítio catalítico (Nielsen et al., 2001).

- α -amilase quimérica de *Bacillus sp.* TS-23: Aumento da resistência da enzima à inativação por peróxido de hidrogênio, a partir da substituição de metionina por leucina (Lin et al., 2003).

II – OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi mapear subsítios de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* envolvidos na interação com o substrato. Para esse fim, a partir de um modelo estrutural da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram selecionados resíduos na interface com o substrato, os quais foram mutados para alanina. Comparando as propriedades das amilases recombinantes selvagem e mutante sobre amido e p-nitrofenil malto-oligossacarídeos, foi possível determinar os resíduos importantes na ligação com o substrato e para a atividade catalítica, bem como no padrão de clivagem da enzima.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1- Vetores

Para a expressão de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em *E.coli*, foi utilizado inicialmente o sistema de expressão pET-3a (Novagen) que utiliza a indução da expressão da RNA polimerase de T7 para a produção da proteína exógena em *E. coli*.

O vetor pPIC9Kf1 foi utilizado para construir o sistema para a expressão do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em *Pichia pastoris*. Este vetor é uma modificação do vetor pPIC9 (Invitrogen), no qual foram introduzidos o gene Kan^r, que possibilita a seleção de clones com múltiplas cópias integradas utilizando geneticina (G418), e a origem de replicação do bacteriófago f1, que permite a obtenção de ssDNA. A expressão do gene de interesse está sob o controle do promotor induzível *AOX1* (gene que codifica a enzima álcool oxidase) sob a adição de metanol no meio de cultura (Cereghino e Cregg, 2000; Veenhuis et al., 1983). Em adição a essas características o vetor apresenta uma origem de replicação de plasmídeo de bactéria (*ColE1*), como também, marcadores para seleção dos plasmídeos transformantes em *E.coli* (ampicilina, Amp^r) e *P. pastoris* (histidina, *HIS4*) e uma sequência derivada do pré-pro fator α de *Saccharomyces cerevisiae*, para facilitar a secreção da proteína de interesse para o meio. As regiões 5'*AOX1* e 3'*AOX1* neste vetor de expressão permitem que ocorra recombinação homóloga no genoma de *P. pastoris*.

2- Gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

O gene que codifica α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XAC0798), clonado no vetor PUC18 (figura 11), foi obtido durante o sequenciamento completo do genoma da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (da Silva et al., 2002), (<http://genoma4.iq.usp.br/xanthomonas/>).

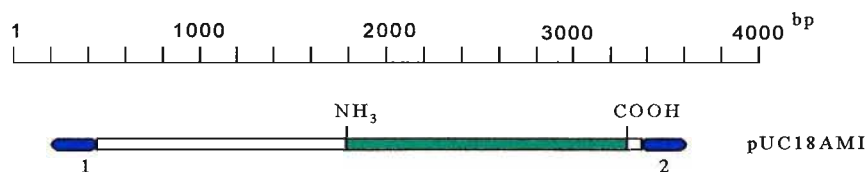


Figura 11 - Mapa de restrição do clone pUC. Sítios de restrição: EcoRI (1), HindIII (2). Região codificadora de α -amilase de *Xanthomonas citri*. NH₃ representa a seqüência que codifica a porção N^o-terminal. COOH representa a seqüência que codifica a porção C^o-terminal. Polylinker pUC.

3- Microrganismos

Células de *E.coli* DH10B foram usadas como hospedeiras na propagação dos plasmídeos pET-3a e pPIC9Kf1, os quais carregam marcador de resistência para Ampicilina (Amp^r) para seleção de transformantes de *E.coli*.

Células de *E.coli* linhagem BL21DE03 foram usadas na expressão do gene de α -amilase clonado no vetor pET-3a.

A levedura *P. pastoris* linhagem GS115 (Invitogen) foi utilizada para a expressão do gene de α -amilase inserido no vetor pPIC9Kf1.

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi utilizada para isolar α -amilase selvagem.

4- Meios de cultivo

- TYE (1,0% triptona, 0,5% extrato de levedo, 0,8% NaCl, pH 7,5): Utilizado na manutenção de *E.coli* BL21DE03;

- 2TY (1,6% triptona, 1% extrato de levedo, 0,5% NaCl, pH 7,4): Utilizado para cultivar células de *E.coli* DH10B e BL21DE03 selvagem e recombinante;

- GTY (10% glicerol, 0,125% extrato de levedo, 0,25% triptona): Utilizado na manutenção de células competentes de *E. coli* DH10B;

- SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedo, 20 mM glicose, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ e 10 mM MgCl₂): Utilizado na transfomação de *E. coli* DH10B;

- MD (1,34% “Yeast Nitrogen Base” sem aminoácidos e com sulfato de amônio, 4×10^{-5} % biotina, 2% ágar): Empregado na seleção e manutenção de clones transformantes de *P. pastoris* GS115;

- YPD (1% extrato de levedo, 2% peptona, 2% glicose, 2% ágar): Utilizado na manutenção de culturas de *P. pastoris* GS115 selvagem e recombinante;

- KLB (1% triptona, 0,3% extrato de carne, 1,5% Agar): Manutenção de culturas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*;

-XOL [0,07% K_2HPO_4 , 0,02% KH_2PO_4 , 0,1% $(NH_4)_2SO_4$, 0,001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0001% $MnCl_2$, pH 7,2]: Empregado nos experimentos de indução da produção de α -amilase a partir de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*;

- BMGY (1% extrato de levedo, 2% peptona, 100 mM tampão fosfato, pH 6,0, 1,34% “Yeast Nitrogen Base” sem aminoácidos e com sulfato de amônio, 4×10^{-5} % biotina, 1% glicerol) e BMMY (1% extrato de levedo, 2% peptona, 100 mM tampão fosfato, pH 6,0, 1,34% “Yeast Nitrogen Base” sem aminoácidos e com sulfato de amônio, 4×10^{-5} % biotina, 1% metanol): Utilizados nos experimentos de expressão do gene de α -amilase recombinante em *P. pastoris*.

5- Preparo de DNA plasmidial

Preparações de DNA em pequena escala (1,5 mL de cultura) foram feitas de acordo Sambrook et al. (1989). DNA em larga escala foi preparado a partir de 500 mL de cultura seguindo o protocolo do kit da Qiagen (Qiagen Midi and Max Protocols). Em ambos procedimentos as células de *E.coli* DH10B foram cultivadas em meio 2TY, suplementado com carbenicilina (200 μ g/mL), durante 14 horas a 37°C.

6- Eletroforese em gel de agarose

Géis de agarose foram elaborados a 1% e 0,8% (agarose “low melting”) e corados com brometo de etídeo (Sambrook et al., 1989). A eletroforese foi conduzida sob 100 V e 80 V (géis “low melting”) e o perfil eletroforético das amostras analisado ao lado de padrão marcador 1 Kb (Gibco).

7- Subclonagem do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* no vetor de expressão de *E. coli*.

O gene da amilase foi subclonado no vetor pET-3a entre os sítios de *NdeI* e *HindIII*. Para isso foram criados sítios para a enzima *NdeI* na extremidade N-terminal do gene, aproveitando a sequência de *HindIII* localizada no polilinker do vetor pUC18 (figura 11). Foram realizadas duas construções; uma na qual o gene da amilase está com o peptídeo sinal (construção excretora), e outra com o gene sem o peptídeo sinal (construção interna).

7.1 - Mutação mediada por oligonucleotídeos

Os ensaios de mutação para criar o sítio da enzima de restrição *NdeI* no gene de α -amilase foram realizados a partir do clone pUC18AMI conforme protocolo do Kit Quik changeTM site-directed mutagenesis (Stratagene). Neste procedimento, os oligonucleotídeos mutagênicos (Gibco), cada um complementar à fita oposta do vetor, foram estendidos durante ciclos de temperatura (95^oC, 30 seg., 55^oC, 1min., 68^oC, 12 min., por 12 ciclos). Na PCR foram utilizados 125 ng de cada oligonucleotídeo, dNTPmix (concentração final de cada dNTP 0,5 mM), 25 ng de DNA (plasmídeo inteiro), 5 μ L de tampão da enzima 10 vezes concentrado [100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM Mg₂SO₄, BSA 1mg/mL] e 2,5 U de *pfu* Turbo DNA polimerase para um volume final de 50 μ L. Após os ciclos o produto foi tratado com 10 U de endonuclease DpnI (sequência alvo 5' -G^mATC- 3'), que digere o DNA "template" metilado, selecionando o DNA sintetizado (plasmídeo inteiro) contendo a mutação desejada, o qual foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B por eletroporação (figura 12). Os oligonucleotídeos mutagênicos utilizados nas reações de mutação são mostrados abaixo.

NdeI (Construção interna)

5' GACCACCGCCCATATGCAGGCCGATG 3'
5' CATCGGCCTGCATATGGGCGGTTTTTC 3'

NdeI (Construção excretora)

5' GGAGATCGATCATATGCGCAACAC 3'
5' GTGTTGCGCATATGATCGATCTCC 3'

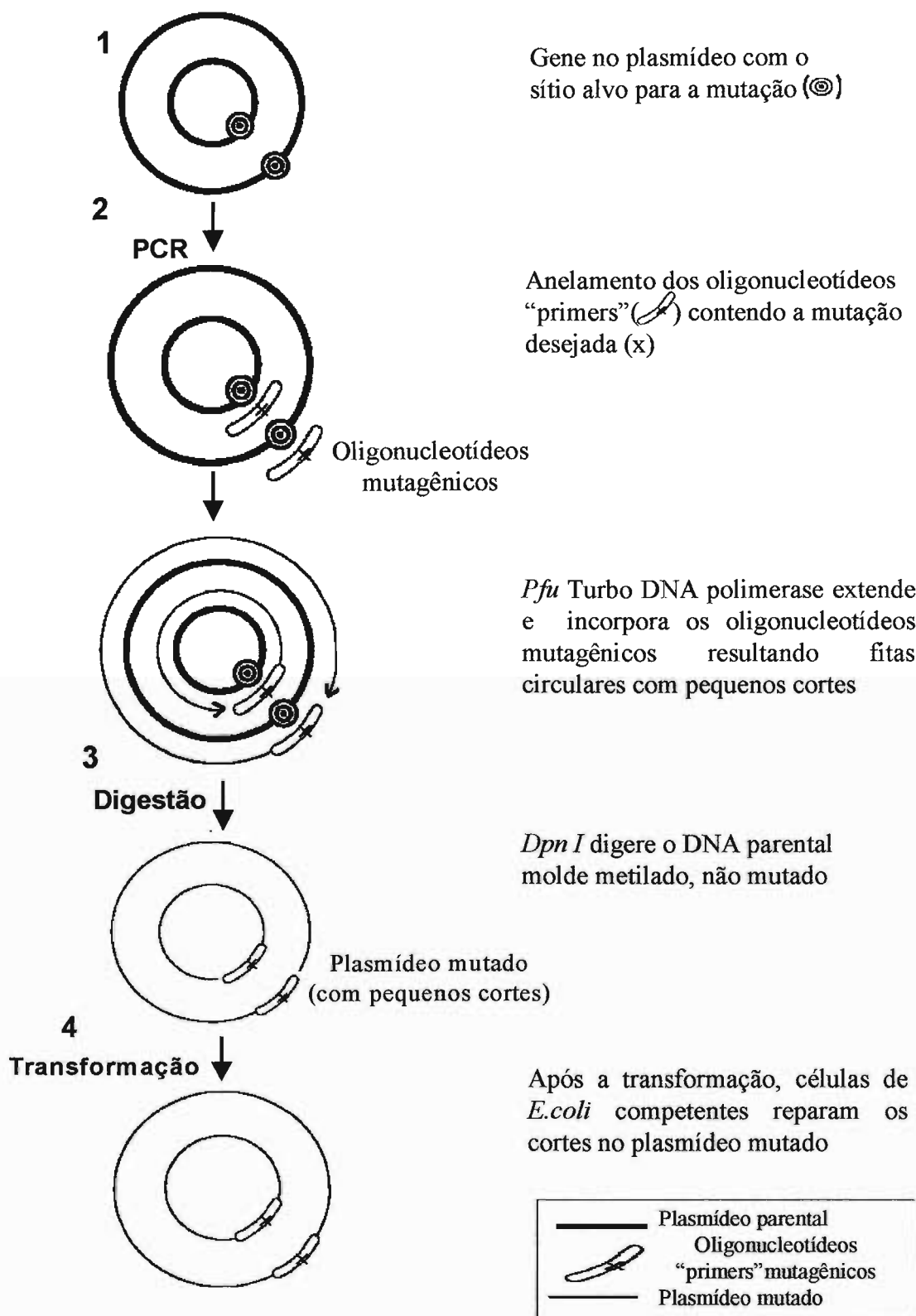


Figura 12 - Esquema da metodologia do Kit "QuikChange site-directed mutagenesis", pela qual foi criado o sítio para enzima *Nde I* na extremidade N-terminal do gene da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis citri*, inicialmente clonado no plasmídeo pUC18.

7.2 - Montagem do sistema de expressão do gene de α -amilase

Na construção do vetor de expressão pET3aAMI, sem peptídeo sinal, a sequência da região N-terminal que codifica o último aminoácido do peptídeo sinal de α -amilase foi mutada para a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *NdeI*. O clone mutado (pUC18AMI/*NdeI/HindIII*) foi tratado com as enzimas *NdeI-HindIII* (New England BioLabs) nas seguintes condições: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9, 37°C por 6 horas. O inserto proveniente da dupla digestão foi extraído de gel de agarose “Low Melting”, utilizando fenol saturado e clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Em seguida misturou-se o inserto ao vetor pET3a, igualmente digerido com *NdeI-HindIII* e extraído de gel de agarose “Low Melting”, na proporção 1:3 (vetor:inserto). A reação de ligação realizou-se em tampão apropriado (66 mM Tris-Cl, 5 mM DTT, 3 mM rATP, pH 7,5), na presença de T4 DNA ligase (England BioLabs) e incubada a 16°C por 16 horas. Em seguida o DNA da reação foi precipitado e utilizado para transformar *E.coli* DH10B por eletroporação. Após a eletroporação, colônias resistentes a carbenicilina foram selecionadas em meio TYE, para preparação de DNA em pequena escala. A presença do gene clonado foi verificada por reação de digestão com *NdeI-HindIII* (New England BioLabs) em condições apropriadas (50 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9, 37°C por 2 horas) (Figura 13). Para montar o sistema pET3aAMI com o peptídeo sinal foram utilizadas as mesmas condições descritas para o sistema sem o peptídeo sinal, só que neste caso o sítio de *NdeI* foi criado próximo ao ATG inicial, anterior à sequência líder.

As duas construções, após terem sido checadas por sequenciamento, foram utilizadas para transformar células de *E.coli* BL21DE03 pelo método de CaCl₂ (Mandel e Higa, 1970).

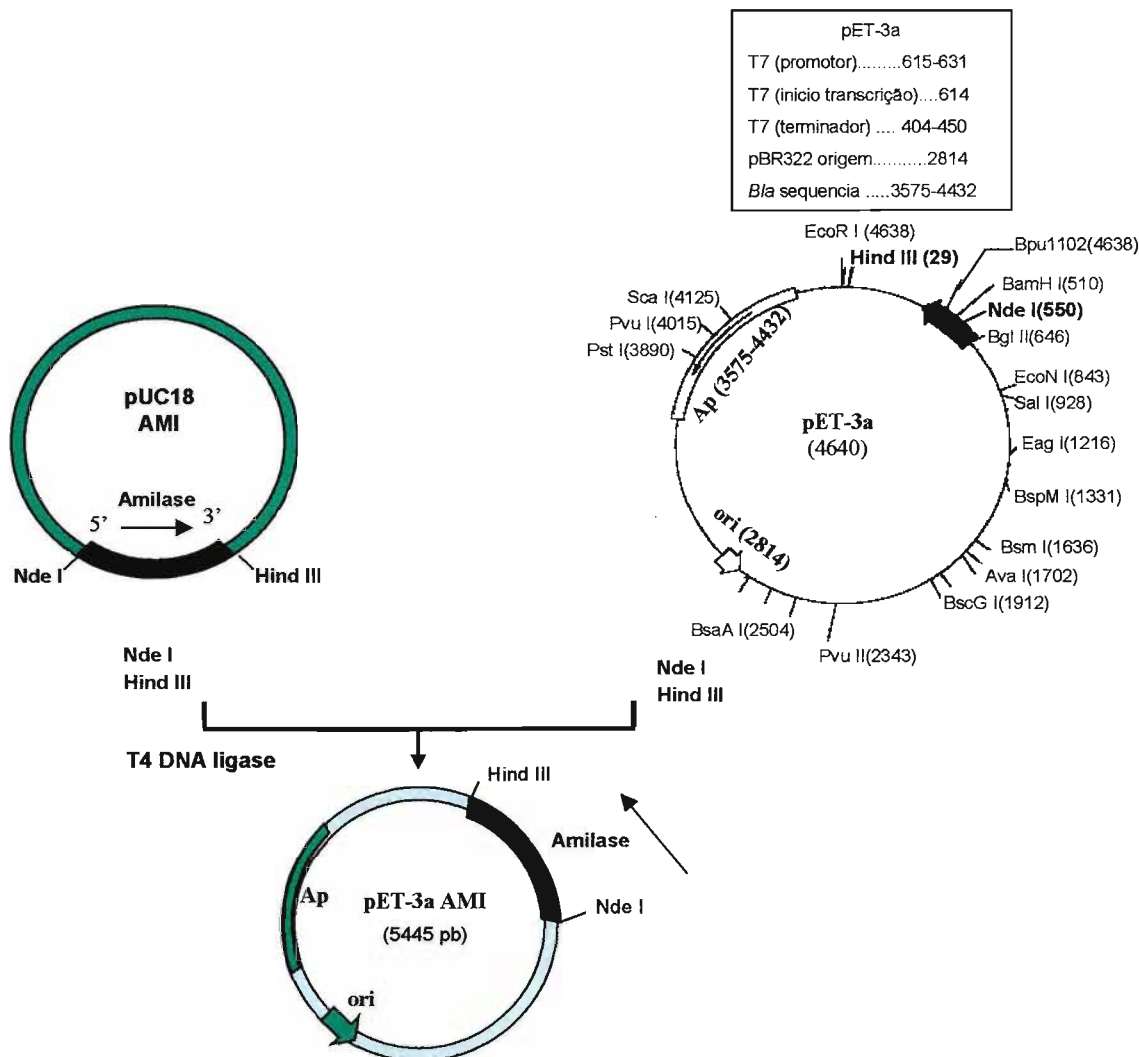


Figura 13 - Esquema da construção do vetor de expressão pET-3aAMI, no qual o gene da amilase está sem a sequência sinal. Para construir o sistema com a sequência sinal do gene da amilase [pET-3aAMI (5564 pb)], o sítio de *Nde I* foi criado próximo ao ATG inicial, anterior à sequência sinal. A metodologia para criar o sítio de restrição de *Nde I* no gene da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis citri* foi detalhada no item 7.1.

7.3 - Sequenciamento do DNA

Para confirmar a clonagem no vetor pET-3a, e a não ocorrência de outra alteração indesejada no gene de α -amilase, o DNA dos clones foi sequenciado de acordo com o protocolo do Kit BigDye™, utilizando o sequenciador ABI 377 (Perkin Elmer). Os oligonucleotídeos utilizados para checar toda a sequência do gene foram:

5' GCA CGC CGT GCG CGC GCT TTC CGG 3', 5' CAG GCG CTG GCC AGC AAC GGC GTG 3', 5' CCA GGC CTG CCG GAT TTG CTG GGC 3', 5' GCC ATT GGC GCC AGC ATG CAG CAG 3', 5' CAG GTC TTG TCG TCC AGC TCC TGC 3'.

A clonagem do gene da amilase no vetor pET3a foi comprovada utilizando o primer do promotor de T7 (5' TTA ATA CGA CTC ACT ATA 3').

8 - Expressão do gene de α -amilase recombinante por *E.coli*

O gene de α -amilase recombinante no vetor pET-3a foi expresso utilizando células de *E.coli* linhagem BL21DE03 como hospedeiras. As construções com e sem a sequência sinal foram testadas na presença e ausência do indutor IPTG, a 37^oC e 25^oC.

As células de *E.coli* foram cultivadas em meio 2TY, suplementado com carbenicilina (200 mg/mL), partindo de uma cultura saturada que foi inoculada ao meio na proporção 1:100 (inóculo:meio de cultura). Os testes foram realizados em pequena (3 mL de cultura) ou larga escalas (1L de cultura). Nos sistemas induzidos por IPTG (concentração final 1 mM), o indutor foi adicionado na cultura a uma absorvância (Abs_{600nm}) entre 0,4 e 0,6, e as células foram crescidas por mais 3 horas. Nos sistemas não induzidos as células foram cultivadas por 8 horas. Após o cultivo as células de *E.coli* foram recuperadas por centrifugação (4000 rpm, 15 min.) e ressuspensas em 50 mM Tris-Cl pH 7,0; 2 mM CaCl₂ (extrato bruto).

A expressão foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989), no extrato bruto e no extrato fracionado (pelet/sobrenadante), após lise em French Press (16000 psi, 3x), e pela quantificação da atividade da enzima.

9 - Purificação de α -amilase recombinante obtida de *E.coli*

A enzima α -amilase foi purificada a partir do precipitado de células proveniente de 1L de cultura, pelo seguinte procedimento:

- Precipitado bacteriano ressuspendido em 50 mM Tris-Cl pH 7,0, 2 mM CaCl₂
- Células lisadas em French Press (16000 psi, 3x);

- O lisado recuperado por centrifugação (20000 rpm, 30 min.) e dissolvidas em 8 M Uréia, 50 mM Tris-Cl, pH 7,0; 2 mM CaCl₂;
- Centrifugação (20000 rpm, 10 min.);
- Sobrenadante eluído em coluna DEAE-FF previamente equilibrada com o mesmo tampão;
- Lavagem da coluna com tampão 8M Uréia, 50 mM Tris-Cl pH 7,0; 2 mM CaCl₂ (2x volume da coluna);
- Proteína eluída por gradiente 0 - 400 mM NaCl;
- Frações correspondentes à α -amilase reunidas e dialisadas partindo de 6 M uréia em tampão 50 mM Tris-Cl pH 7,0; 2 mM CaCl₂, 100 mM NaCl.

10- Subclonagem do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* no vetor de expressão de *Pichia pastoris*.

O esquema da construção do vetor para expressão do gene da amilase está mostrado na figura 14.

10.1-Amplificação do gene de α -amilase

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

O gene que codifica α -amilase, sem a sequência sinal, inicialmente subclonado no vetor de expressão pET-3A nos sítos de restrição *NdeI* e *HindIII* (N e C-terminal respectivamente) foi amplificado através da PCR a partir dos seguintes oligonucleotídeos “primers”:

5' AGAAGGAGATTACGTA**ATG**CAGGCCG 3'
SnaBI

5' ATATTGTGGTGAATTC**TTA**GCGGCCA 3'
EcoRI

Através da reação de amplificação foram inseridos os sítos das enzimas de restrição *SnaBI* e *EcoRI* nas extremidades 5' e 3' respectivamente, para possibilitar a subclonagem no vetor pPIC9Kf1. Estão destacados em negrito os códons de iniciação (ATG) e término (TTA). Na PCR foram utilizados 25 η g de DNA, “primers”

(concentração final de cada 0,2 μM), dNTPmix (concentração final de cada dNTP 0,2 mM), MgCl_2 (concentração final 2 mM), tampão da enzima (60 mM Tris- SO_4 , pH 8,9; 18 mM Sulfato de Amônio, concentração final) e 1,5 U de Taq HF polimerase (Invitrogen) para um volume final de 50 μL . Os ciclos de temperatura foram: 94°C, 2 min., 1 ciclo; 94°C, 20 seg., 55°C, 30 seg., 68°C, 5 min.; 30 ciclos; 72°C, 10 min., 1 ciclo.

O produto de amplificação (*Ami/SnaBI/EcoRI*) foi purificado utilizando o Kit “the Concert™ Rapid PCR Purification System” (GIBCO) e digerido pelas correspondentes enzimas (New England Biolabs) durante 3 horas a 37°C. Na reação de dupla digestão foram adicionados 20 U de cada enzima, 6 μL de tampão 10 vezes concentrado (500 mM Acetato de potásio, 200 mM Tris-acetato, 100 mM Acetato de Magnésio, 10 mM DTT, pH 7,9) e 0,6 μL de solução de BSA (10 mg/mL) em um volume final de 60 μL . Após a reação o DNA foi precipitado com 1 volume de acetato de sódio 3M, pH 6,8 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco e dissolvido em 10 μL de água Milli-Q.

10.2- Subclonagem do inserto amplificado no vetor pPIC9Kf1

O vetor pPIC9Kf1 (10 μg) foi submetido à dupla digestão com as enzimas *SnaBI/EcoRI* nas mesmas condições adotadas para o inserto amplificado. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (“low melting”) e a banda de alto peso molecular correspondente ao vetor foi extraída do gel utilizando fenol saturado e clorofórmio (Sambrook et al., 1989). O DNA foi precipitado da mesma forma descrita para o inserto.

O vetor digerido e o inserto *Ami/SnaBI/EcoRI* foram misturados na proporção 1:3 (vetor:inserto) e submetidos à reação de ligação que foi incubada a 16°C por 12 horas. Na reação foram utilizados 2 U de T4 DNA ligase (England Biolabs) e 1 μL de tampão da enzima 10 vezes concentrado (660 mM Tris-HCl, 50 mM DTT, 30 mM rATP, pH 7,5) para um volume final de 10 μL . Em seguida o DNA foi precipitado nas mesmas condições descritas anteriormente e utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH10B. Essa construção (pPiC*Ami/SnaBI/EcoRI*) permite a

secreção de α -amilase para o meio extracelular, pois mantém o peptídeo sinal (fator α) do vetor.

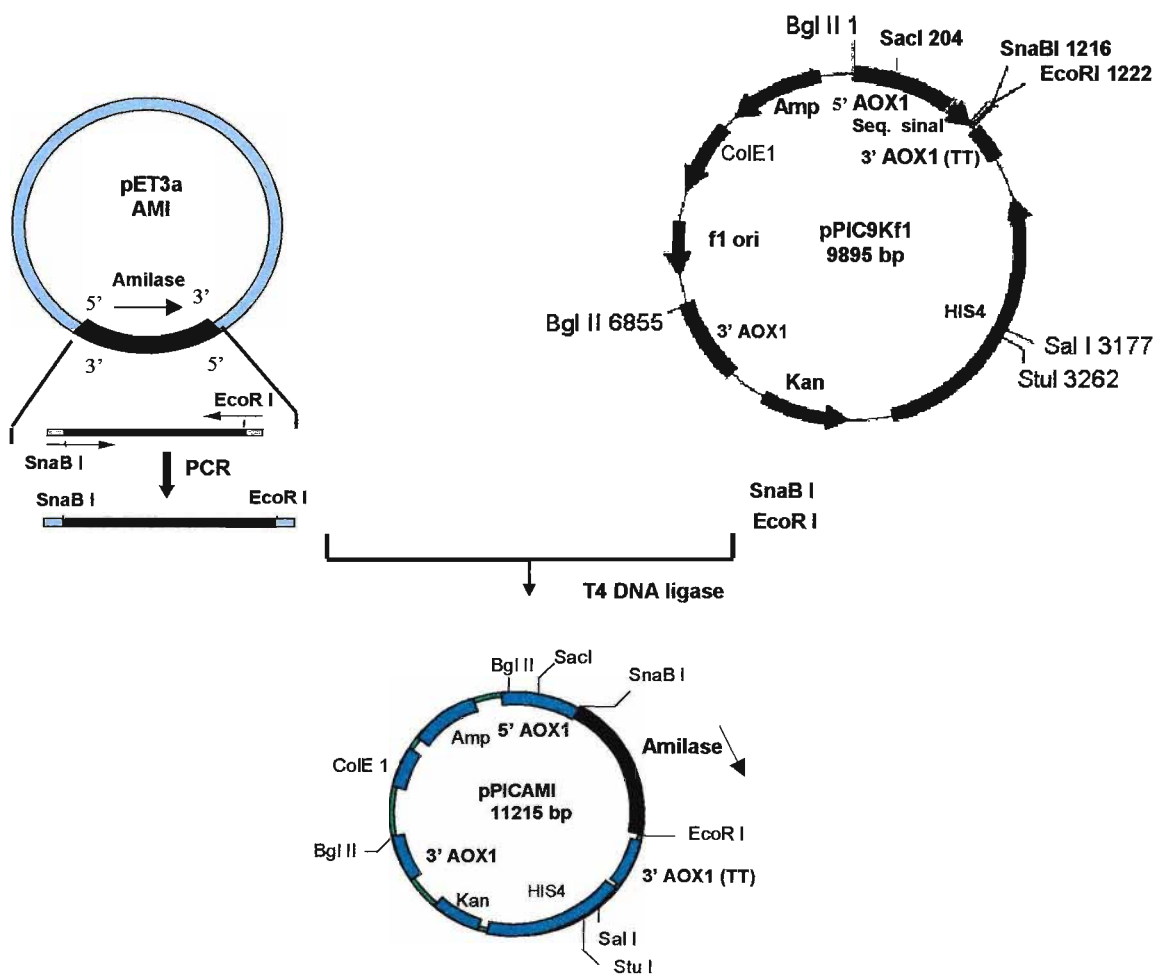


Figura 14 – Esquema da Subclonagem do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* no vetor de expressão de *Pichia pastoris*. Maiores detalhes no texto (ítens 10.1 e 10.2).

11- Transformação de células competentes de *E.coli* DH10B por eletroporação

11.1 - Preparo das células competentes

Células foram inicialmente inoculadas em 5 mL de meio 2TY acrescido de 0,2% de glicose e cultivadas durante 12 horas a 37°C sob agitação. Após este período, 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL do mesmo meio e o inóculo incubado nas mesmas condições até atingir Abs_{600nm} de aproximadamente 0,6. Em seguida a cultura foi colocada em gelo por 30 minutos e as células foram posteriormente coletadas por centrifugação (4000g, 15 minutos, 4°C). As células foram lavadas 3 vezes com 40 mL de solução gelada de glicerol 10%, centrifugadas novamente e ressuspensas em 200 µL do meio GTY gelado. Aliquotas da suspensão foram estocadas a -70°C.

11.2 - Eletroporação

Um volume de 1 a 2 µL da solução aquosa de DNA (item 7.1 e 10.2) foi adicionado a 40 µL de células competentes e a mistura transferida para cubetas de eletroporação (0,2 cm). A mistura foi colocada em gelo por 5 minutos e transferida em seguida para o eletroporador (Bio-Rad GenePulser). Após o pulso elétrico (100 Ω, 50 µF e 2,5 KV), foi adicionado 1 mL de meio SOC gelado e o conteúdo incubado por 40 minutos a 37°C sob agitação. Em seguida uma alíquota da cultura (20 µL) foi plaqueada em meio 2TY acrescido de 2% de ágar e carbenicilina (200 µg/mL). As placas foram incubadas por 12 horas a 37°C. As colônias resultantes do plaqueamento foram inoculadas em 5 mL do mesmo meio de cultura sem ágar e crescidas sob agitação durante 12 horas a 37°C, para posterior extração em pequena escala de DNA plasmidial.

12-Transformação de *Pichia pastoris*

A levedura foi transformada seguindo o procedimento descrito no Manual de Métodos para Expressão de Proteínas Heterólogas em *P. pastoris* (Invitrogen). As

construções confirmadas pelos sequenciamentos foram utilizadas na transformação de *P. pastoris* linhagem GS115 através de eletroporação.

A transformação de *P. pastoris* ocorre pela integração do DNA transformante no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga (Clare et al., 1991; Waterham et al., 1997). O sítio de integração pode ser pré-determinado pela digestão do DNA do vetor de modo que suas extremidades sejam homólogas aos correspondentes sítios de integração cromossomal. Sítios de integração cromossomal incluem os genes *HIS4* e *AOX1* (Waterham et al. 1997). A digestão do plasmídeo que resulta em homologia das regiões 5'e 3', no locus *AOX1* cromossomal, levam ao evento de troca do *AOX1* genômico com o gene incompleto derivado do plasmídeo. Este evento resulta em um fenótipo do tipo Mut^s (baixo crescimento em metanol), devido à ruptura do gene *AOX1* no cromossomo.

Recombinações que originam do evento de uma única recombinação dentro de *AOX1* ou *HIS4*, são obtidas digerindo o plasmídeo com enzima de restrição de tal forma que um único corte é introduzido dentro destes genes, resultando em transformantes com fenótipo do tipo MUT⁺ (grande habilidade de crescer em metanol).

12.1- *Pichia pastoris* linhagem GS115

A linhagem GS115 possui uma mutação no gene da histidinol desidrogenase (*his4*) que impede a síntese de histidina pela levedura. Os plasmídeos de expressão para *P. pastoris* carregam o gene *His4* que complementa o gene *his4* mutado do genoma da levedura. Os transformantes foram selecionados através da capacidade de crescimento em meio sem histidina. Outra característica da linhagem GS115 é o fenótipo Mut⁺ em função da presença do gene *AOX1* intacto.

12.2- Linearização do DNA plasmidial para a reação de transformação

Preparações em larga escala do DNA das construções mutante e selvagem (aproximadamente 10 µg de cada) foram previamente linearizadas com a enzima de restrição *Sac I* (Promega), o que permite a inserção do vetor no gene *AOX1* do genoma da levedura como resultado de um único evento de recombinação. Em cada reação de digestão foram adicionados 2 µg de DNA, 2 µL de tampão da enzima 10 vezes

concentrado (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM KCl, 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT) e 10 U de *Sac I* em um volume final de 20 µL. As digestões foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e os produtos da digestão foram purificados através de extração fenólica e precipitação alcoólica (Sambrook et al., 1989). O DNA precipitado de cada construção foi lavado 2 vezes com etanol 70%, seco e dissolvido em 10 µL de água milliQ.

12.3 - Preparo de células competentes de *P. pastoris* GS115

As células foram inoculadas em 5mL de meio YPD por 12 horas a 30°C sob agitação. Um volume de 0,1 a 0,5 mL do pré-inoculo foi transferido para 50 mL do mesmo meio e cultivado nas mesmas condições até uma Abs_{600nm} entre 1,3 e 1,5. As células coletadas por centrifugação foram lavadas com 50 mL de água milliQ gelada, novamente lavadas com 25 mL de água milliQ e por último com 2 mL de sorbitol 1M gelado. As células coletadas por centrifugação foram ressuspensas em 0,5 mL de sorbitol 1M gelado e utilizadas em seguida para transformação por eletroporação.

12.4 - Eletroporação

Uma massa de 5-10 µg do DNA plasmidial linearizado e purificado foi adicionado a 40 µL das células competentes em cubeta de 0,2 cm. A mistura foi colocada em gelo por 5 minutos e submetida ao pulso elétrico nas condições 200Ω, 20µF e 1500V. Em seguida foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado e o conteúdo transferido para tubo eppendorf. Aliquotas de 200 µL foram plaqueadas em meio MD e as placas incubadas a 30°C até aparecerem colônias (3-4 dias). Cerca de 50 colônias de cada transformação foram transferidas para novas placas contendo meio MD, incubadas por 3 a 4 dias e armazenadas a 4°C para análises posteriores.

13- Expressão do gene de α -amilase recombinante em *Pichia pastoris*

Transformantes das construções selvagem e mutante que apresentavam o gene da amilase integrado no genoma da levedura foram submetidos à indução da enzima recombinante.

13.1 - Indução de α -amilase recombinante em pequena escala

Uma colônia transformante foi inoculada em 10 mL de meio BMGY e incubado por 12 horas a 30°C sob agitação. Uma alíquota do pré-inóculo foi diluída em 10 mL do mesmo meio até uma Abs_{600nm} de 0,25 (diluição 1:100) e a cultura incubada a 30°C sob agitação por 10 horas. As células recuperadas por centrifugação foram ressuspensas no mesmo volume do meio BMMY e incubadas a 30°C sob agitação (300 rpm) durante 4 a 5 dias. A cada 24 horas foram adicionados 0,5% (concentração final) do indutor metanol nas culturas e alíquotas foram retiradas para análise das expressões através da quantificação da atividade da enzima (método do ácido dinitrossalicílico) e/ou por SDS-PAGE.

13.2 - Otimização da produção de α -amilase recombinante

A otimização da produção de amilase foi estudada sob dois parâmetros: concentração inicial do indutor metanol e temperatura de indução.

A expressão foi conduzida conforme descrito no item anterior, partindo do transformante selvagem que secretou amilase com maior atividade no sobrenadante, partindo de concentrações do indutor metanol variando de 1, 2, 3, 4 e 5% no meio BMMY (concentração final). Em outro experimento a expressão foi analisada nas temperaturas de 25 e 30°C a partir da indução com metanol. Como controles foram utilizados sistemas de expressão não induzidos e construções com o vetor integrado no genoma da levedura sem o gene da amilase subclonado.

13.3 - Indução de α -amilase recombinante em larga escala

Experimentos de indução em larga escala tanto para amilase recombinante selvagem quanto para os mutantes foram realizados nas condições ótimas. Nas expressões em larga escala, as alíquotas dos pré-inóculos foram transferidas para dois erlenmeyers de 2L contendo cada um 200 mL de meio BMGY. Após 10 horas de cultivo, as células recuperadas por centrifugação foram ressuspensas no mesmo volume do meio BMMY, acrescido da concentração inicial ótima de metanol, e a cultura incubada na temperatura ótima de indução por 4 dias sob agitação (300 rpm). A cada 24 horas foram adicionados 0,5% de metanol (concentração final) nas culturas e alíquotas foram retiradas para análise das expressões através da quantificação da atividade da enzima (método do ácido dinitrossalicílico) e/ou SDS-PAGE.

14- Modelagem de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

A modelagem da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA) foi conduzida com a colaboração do Prof. Dr. Richard Charles Garrat, no Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, do Instituto de Física de São Carlos (USP). O modelo tridimensional de AXA foi construído por homologia, utilizando o programa Moduler 6a, na estação "Silicon graphics".

Os procedimentos adotados foram:

- Pesquisa, no banco de dados de proteínas, de seqüências primárias similares à seqüência de AXA, e que por sua vez, apresentassem coordenadas 3D disponíveis. Utilizou-se nesta busca o programa de alinhamento de seqüências PSI-BLAST (Altschul et al., 1997);

- Seleção da(s) seqüência(s) primária(s) com maior grau de identidade e similaridade com a seqüência de AXA e posterior alinhamento destas seqüências. O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994);

- Construção do modelo tridimensional para AXA, a partir do alinhamento, utilizando o programa "Moduler 6A", que copia as coordenadas da cadeia principal e das cadeias laterais correspondentes (regiões conservadas), atribuindo coordenadas às regiões de baixa similaridade ou que não apresentavam correspondentes (regiões variáveis). Pelo programa, as cargas das cadeias laterais foram ajustadas para pH 7,0;

- Refinamento do(s) modelo(s) gerado(s). Os parâmetros de minimização foram: 1- algoritmo: steepest, force field CVFF, cutoff distance 12Å, dielectric constant 80, deriv 100 Kcal/Å; 2- algoritmo: conjugated, force field CVFF, cutoff distance 10Å, dielectric constant 80, deriv 0,1 Kcal/Å. Esta etapa foi realizada no programa Discover, na estação “Silicon graphics”;

- Avaliação da qualidade estereoquímica do(s) modelo(s) analisando o gráfico de Ramachandram, através do programa Procheck (Laskowski et al., 1993).

15- Mapeamento dos resíduos candidatos a subsítio de interação com o substrato

Os resíduos candidatos a interagir com o substrato foram mapeados por sobreposição do modelo criado para AXA com a estrutura da amilase pancreática de porco complexada com acarbose (PDB-1PPI), resolvida a 2,2 Å (QIAN et. al., 1994). Para isso utilizou-se o programa Homology na estação gráfica “Silicon graphics”.

Estudos cristalográficos com α -amilase pancreática de porco (PPA) complexada com substratos análogos (Machius et al., 1996; Qian et al., 1994) mostraram os subsítios de ligação na fenda catalítica de PPA. Ao sobrepor a estrutura do modelo de AXA com a estrutura de PPA, os resíduos de AXA correspondentes topológicos aos subsítios de ligação de PPA foram considerados candidatos à ligação com o substrato na fenda catalítica.

16- Mutação sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeos

Os resíduos candidatos a interagir com o substrato foram mutados para alanina a partir da construção pPICAMI/*SnaBI/EcoRI*, conforme protocolo do Kit “Quik changeTM site-directed mutagenesis” (stratagene). Os oligonucleotídeos mutagênicos (GIBCO), cada um complementar à fita oposta do gene da amilase, foram estendidos pela PCR nos seguintes ciclos de temperatura: 95^oC, 30 seg., 1 ciclo; 95^oC, 30 seg., 55^oC, 1 min., 68^oC, 22 min., 16 ciclos). As demais condições da PCR foram as mesmas descritas no item 7.1. O DNA contendo a mutação desejada foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B por eletroporação (item 11) Os oligonucleotídeos mutagênicos utilizados nas reações de mutação são mostrados a seguir:

H88A

5' CGTGTTC AACGCCATGGCCAACG 3' (f)
 5' CGTTGGCCATGGCGTTGAACACG 3' (r)

F136A

5' CGCCAGCGATGCCGGCCCGGCGC 3' (f)
 5' GCGCCGGGCCGGCATCGCTGGCG 3' (r)

C157A

5' TTACCGTATCGCCGGCGGCGGCA 3' (f)
 5' TGCCGCCGCCGGCGATACGGTAA 3' (r)

D196A

5' CTTCCGGGTGGCTGCGGCCAAGC 3' (f)
 5' GCTTGGCCGCAGCCACCCGGAAG 3' (r)

H200A

5' TGCGGCCAAGGCCATGACGTTCG 3' (f)
 5' CGAACGTCATGGCCTTGGCCGCA 3' (r)

E223A

5' TGTCTTCGGCGCAGTGATCACCG 3' (f)
 5' CGGTGATCACTGCGCCGAAGACA 3' (r)

G227A

5' AGTGATCACCGCCGGCGGTACGG 3' (f)
 5' CCGTACCGCCGGCGGTGATCACT 3' (r)

T230A

5' CGGCGGCGGTGCGGGCAATGGCG 3' (f)
 5' CGCCATTGCCCGCACCGCCGCCG 3' (r)

H294A

5' TGCAGTGACCGCCGACATTCCCA 3' (f)
 5' TGGGAATGTCCGGCGGTCACTGCA 3' (r)

D295A

5' AGTGACCCACGCCATTCCCAACA 3' (f)
 5' TGTTGGGAATGGCGTGGGTCACT 3' (r)

N299A

5' CATTCCCAACGCCGCCGGATTCC 3' (f)
 5' GGAATCCGGCGGCGTTGGGAATG 3' (r)

17- Sequenciamento de DNA

Para comprovar as mutações, a subclonagem do gene da amilase nos sítios de *SnaBI* e *EcoRI* do vetor pPIC9Kf1, bem como toda a seqüência do gene, os transformantes de *E.coli* DH10B resistentes a carbenicilina foram submetidos ao sequenciamento de DNA, utilizando o equipamento “ABI 377 Perkin-Elmer Applied Biosystems” e o Kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (PE Biosystems). Para cada reação foram adicionados 2 µL de “Terminator ready reaction mix”, 6 µL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl₂), oligonucleotídeos (3,2 pmol) e 250 ng de DNA em um volume final de 20 µL. Os ciclos de temperatura foram: 96°C, 10 seg., 50°C, 5 seg., 60°C, 4 min., 40 ciclos. Os oligonucleotídeos “primes” utilizados são apresentados a seguir.

5' AATAACGGGTTATTGTTTATAAAT 3' (*SnabI*)
 5' GGTCTTCTCGTAAGTGCCC 3' (*EcoRI*)
 5' GCACGCCGTGCGCGCCTTTCCGG 3'
 5' CAGGCGCTGGCCAGCAACGGCGTG 3'
 5' CCAGGCCTGCCGATTTGCTGGGC 3'
 5' GCCATTGGCGCCAGCATGCAGCAG 3'
 5' CAGGTCTTGTCGTCCAGCTCCTGC 3'

18 - Análises das leveduras transformantes

A seleção dos transformantes de GS115 foi realizada através da PCR segundo Linder et. al., 1998 e o procedimento descrito no Manual de Métodos para Expressão de Proteínas Heterólogas em *P. pastoris* (Invitrogen). Por este procedimento é possível determinar se o gene de interesse está integrado no genoma de *Pichia pastoris*.

Uma amostra de cada colônia transformante foi ressuspensa em 10 µL de água Milli-Q. Em seguida foram adicionados 5 µL de uma solução de liticase (Sigma) 5U/µL em cada uma das suspensões que foram imediatamente incubadas a 30°C por 10 minutos e a -80°C por 15 minutos respectivamente. Na PCR (volume final 50 µL) foram utilizados 5 µL de lisado celular, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco), 5 µL de tampão 10 vezes concentrado (600 mM Tris-SO₄ pH 8,9, 180 mM sulfato de Amônio), dNTPs (0,5 mM cada, concentração final) e os "primers" *AOXF* e *AOXR* (50 pmoles cada), os quais hibridizam, respectivamente, nas regiões do promotor e de término da transcrição do gene *AOXI*. A PCR ocorreu nas seguintes condições: 94°C, 2 min., 1 ciclo; 94°C, 1 min., 55°C, 1 min., 72°C, 1 min., 25 ciclos; 72°C, 7 min., 1 ciclo.

19 - Análises dos transformantes por Southern

Transformantes mutantes selecionados através da PCR foram submetidos à Southern Blotting (Sambrook et. al., 1989) para confirmar a integração do gene da amilase no genoma da levedura.

19.1 - Preparo de DNA genômico

Inicialmente o DNA genômico foi extraído partindo de aproximadamente 5 mL de cultura cultivada em meio YPD por 12 horas a 30°C. Após o cultivo as células recuperados por centrifugação foram ressuspensas em 350 µL do tampão SCED (1 M sorbitol, 10 mM citrato de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM DDT) e adicionadas de 5 µL de solução liticase (Sigma) 5 U/µL, sendo em seguida incubadas a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, o lisado foi recuperado por centrifugação e ressuspensado em 1 mL de DNAZOL (GIBCO) até completa homogeneização. Em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto ao sobrenadante livre de restos celulares, para precipitar o DNA, o qual foi lavado com etanol 75% e solubilizado em 8 mM NaOH. O DNA genômico isolado foi submetido à digestão pela enzima *Bgl II* (New England BioLabs) por 12 horas a 37°C. Na reação foram adicionados cerca de 60 µg DNA, 5 µL de tampão 10 vezes concentrado (1 M NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT) e 30 U de *Bgl II* em um volume de 50 µL.

19.2 - Sonda de hibridização

Como sonda de hibridização utilizou-se fragmento do gene de amilase com cerca de 640 pb o qual foi amplificado pela PCR a partir da construção pPicAMI/*SnaBI/EcoRI* (25 ng) e de oligonucleotídeos (125 ng) anteriormente utilizados na criação dos mutantes (5' CGTGTTC AACGCCATGGCCAACG 3'; 5' T GTTGGGAATGGCGTGGGTC ACT 3'). A PCR foi conduzida por 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Gibco) nas seguintes condições: 94°C, 1 min., 55°C, 1 min., 72°C, 1 min., 30 ciclos; 72°C, 7 min., 1 ciclo.

20 - Obtenção de α-amilase a partir de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

A indução da produção de α-amilase por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi realizada cultivando a bactéria no meio XOL (Hu et. al.,1992).

Uma alçada de uma cultura da bactéria, mantida em meio KLB, foi transferida para 20 mL de meio XOL e cultivada por 15 horas a 30°C. Aliquotas deste pré-inóculo

foram transferidas para dois erlenmeyers de 2L contendo cada um 200 mL do meio até uma Abs_{600nm} entre 0,2 a 0,25, e a cultura cultivada por 15 horas a 30°C sob agitação.

21- Purificações da α -amilase selvagem obtida de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e α -amilase recombinante obtida de *Pichia pastoris*

Após o cultivo (ítems 13.3 e 20), o sobrenadante livre de células (extrato enzimático bruto) foi concentrado por ultrafiltração utilizando membranas de 10 KDa (Amicon) e dialisado por 12 horas contra 50 mM Tris-Cl pH 7,0. O concentrado (25 – 30 mL) foi aplicado em coluna (XK26, Pharmacia Biotech) DEAE Sepharose “Fast Flow” (Amersham Biosciences) e eluído a um fluxo de 200 mL/hora, inicialmente em 50 mM Tris-Cl pH 7,0 e depois com gradiente de NaCl de 0 a 400 mM no mesmo tampão. Estas etapas ocorreram a 4°C. As frações correspondentes a α -amilase foram reunidas e dialisadas durante 12 horas contra 50 mM de tampão Mes pH 6,8, acrescido de 2mM $CaCl_2$. Por último, as amostras dialisadas foram concentradas por ultrafiltração (membranas amicon 10 KDa) e estocadas a - 20°C para posterior quantificação da atividade da enzima e dosagem de proteína total. A concentração ocorreu na temperatura entre 8 e 10°C.

22- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Géis de poliacrilamida desnaturantes foram preparados na concentração de 12% e corados com “Coomassie blue”R-250 (Sambrook et al., 1989). A eletroforese foi conduzida sob 200 V e o perfil eletroforético das amostras foi analisado ao lado de padrão marcador de alto peso molecular (Sigma).

23- Quantificação da concentração de proteína

A dosagem de proteína foi realizada através do Kit “Bio-Rad Protein Assay” (BioRad). Um volume de 5 mL do reagente foi adicionado em tubos contendo 100 μ L de amostra. A mistura foi agitada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. A

concentração de proteína foi determinada convertendo a absorbância a 500 nm em mg/mL utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (Sigma).

A concentração de α -amilase nas frações purificadas após concentração por ultrafiltração foi estimada com base neste método, considerando a concentração de proteína dosada (g/L) e a massa molecular teórica da enzima (48.315 g/mol).

24- Ensaio enzimático para amilase

A atividade da amilase foi quantificada pelos métodos de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944) e pelo reagente ácido dinitrossalicílico (Noelting e Bernfeld, 1948). Ambos baseiam-se na determinação de grupos redutores no meio de reação.

24.1 - Método do reagente ácido dinitrossalicílico (DNS)

A enzima foi adicionada em 1mL de solução de amido solúvel 0,5% em tampão (50 mM Tris-Cl, pH 6,8, 2 mM CaCl₂) e a reação incubada a 37°C por 25 minutos. Após esse tempo foram retiradas da reação alíquotas de 200 μ L e adicionadas a 400 μ L de DNS. Após ser bem agitada, a mistura foi levada ao banho-maria em ebulição por 5 minutos, paralisando a reação, que depois de esfriada foi diluída com 400 μ l de água bidestilada. O produto da reação foi quantificado convertendo a absorbância a 550 nm em μ mol através de curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μ mol de grupos redutores por minuto nas condições descritas.

Preparo do reagente DNS

A 1 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico, adicionar 20 mL de NaOH 2 M e 50 mL de água milliQ. Levar ao agitador magnético até dissolver completamente o DNS. Adicionar 30 g de tartarato de sódio e potássio. Após dissolver completamente, completar o volume para 100 mL com água. Se a solução resultante não estiver límpida, filtrar em lã de vidro. Observação: proteger da luz e CO₂.

24.2 - Método Somogyi Nelson

A enzima (0,5 – 35 nM) foi adicionada em 1mL de solução 0,5% de amido solúvel em tampão (50 mM Mes, pH 6,8, 2 mM CaCl₂) e a reação incubada a 37^oC por 30 minutos. Aliquotas de 100 µL foram retiradas a cada 10 minutos, diluídas em 400 µL de solução contendo 150 µL de tampão (50 mM Mes, pH 6,8, 2 mM CaCl₂) e 250 µL de solução C (4V solução A + 1V solução B) preparada logo antes do uso. A reação foi paralisada a 100^oC por 10 minutos. Após os tubos serem esfriados, adicionou-se um volume de 250 µL de solução D (diluída 1:2 em 0,75 M H₂SO₄). Essa mistura foi diluída em água (1:1) e sua absorbância determinada a 660 nm. O produto da reação foi quantificado convertendo a absorbância em nmol através de curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 nmol de grupos redutores por minuto nas condições descritas.

Solução A: 15 g de KNaC₄H₄O₆.4H₂O e 30 g de Na₂CO₃ foram dissolvidos em água, adicionados em seguida de 30 g de NaHCO₃ e a solução reservada. Em outro recipiente foram dissolvidos 180 g de Na₂SO₄ em 500 mL de água fervente. Após esfriar, as duas soluções foram misturadas e o volume completado para 1 litro.

Solução B: 5 g de CuSO₄.5H₂O e 45 g de Na₂SO₄ foram dissolvidos em 250 mL de água.

Solução D: 25 g de molibdato de amônio foram dissolvidos em 450 mL de água e adicionados em seguida de 21 mL de H₂SO₄. Em outro recipiente, 3 g Na₂HAsO₄.7H₂O foram dissolvidos em 25 mL de água e as duas soluções misturadas e incubadas por 24 horas a 37^oC antes de serem usadas.

25- Determinação de K_m e k_{cat} .

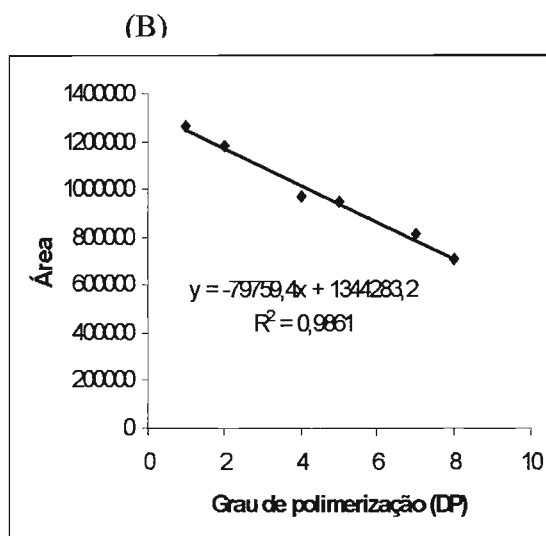
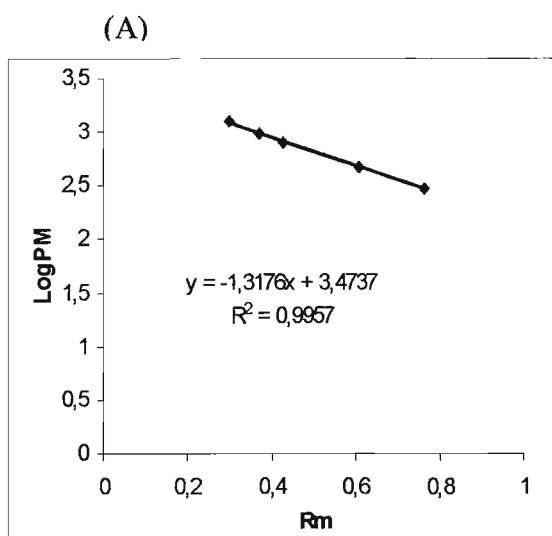
Para obter os parâmetros K_m e k_{cat} foi utilizado o ensaio descrito para o método Somogyi-Nelson (item 24.2), variando a concentração do substrato amido (0,024%, 0,048%, 0,096%, 0,18%, 0,3%, 0,36%, 0,48%, 0,6%, 0,78%, 0,96%) e utilizando enzima na concentração estimada entre 5 a 10 nM. Uma vez obtidos os valores de atividade específica (nmol produto.min⁻¹.ng⁻¹) em função das concentrações de

substrato, os parâmetro K_m e k_{cat} foram obtidos, ajustando os pontos experimentais na curva de Michaelis-Menten através do programa Enzifitter.

26- Padrão de clivagem de p-Nitrofenil malto-oligossacarídeos pela α -amilase

O padrão de clivagem de 4-nitrofenil α -D-malto-oligossacarídeos (PNPG4, PNPG5 e PNPG7, ambos Calbiochem) pela amilase recombinante selvagem e mutante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC; Shimadzu).

Inicialmente, a enzima (2 - 600 nM) foi adicionada a 400 μ L de solução 1 mM de substrato em tampão (50 mM Mes, pH 6,8, 2 mM CaCl_2) e a reação incubada a 37^oC. Alíquotas foram retiradas em tempos apropriados, os quais correspondiam a taxas de hidrólises inferiores a 10% e as reações paralisadas pela fervura durante 2 minutos. Em seguida, alíquotas de 20 μ L (previamente filtradas em filtro de 0,45 μ m) foram aplicadas no cromatógrafo e eluídas com água milliQ estéril (previamente filtrada em filtro de 0,45 μ m) com um fluxo de 0,6 mL/minuto a 35^oC. Para cada teste (em duplicatas) foi utilizado um padrão tratado nas mesmas condições, porém sem a enzima. Os substratos e produtos foram separados em coluna “TSK gel oligo PW” (Tosohaas), monitorados a 313 nm (em função do grupamento p-nitrofenil) e identificados pelo tempo de retenção comparado com o tempo de retenção de oligossacarídeos padrões (PNPG1, PNPG2, PNPG4, PNPG5, PNPG7 e PNPG8), separados nas mesmas condições descritas. Os produtos PNPG3 e PNPG6 foram identificados comparando-se os tempos de retenção com uma curva do “Log do peso molecular dos p-nitrofenil malto-oligossacarídeos x R_m (tempo de retenção dos padrões conhecidos/tempo de corrida)” ($R^2 = 0,9957$, gráfico A). Produtos e substratos foram quantificados convertendo a área do pico observado no cromatograma em concentração molar, utilizando-se curva padrão, a qual foi traçada correlacionando-se a razão área do pico/concentração molar com o grau de polimerização dos p-nitrofenil malto-oligossacarídeos ($R^2= 0,9861$, gráficoB). A razão área do pico/concentração foi obtida analisando-se massas conhecidas de um mesmo p-nitrofenil malto-oligossacarídeo na cromatografia acima referida. A distribuição dos produtos (frequência de clivagem) foi calculada como porcentagem relativa à concentração de substrato consumido.



IV – RESULTADOS

1 - Subclonagem do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* no vetor de expressão de *E. coli*.

O vetor de expressão pET-3a foi escolhido inicialmente devido a sua alta eficiência de expressão em células de *E. coli*.

Foram montadas duas construções com a intenção de verificar em qual delas o nível de expressão de amilase, na forma solúvel, seria maior. A princípio, na construção em que o gene da amilase fosse clonado sem sua seqüência líder, a enzima seria secretada no citosol de *E. coli*; já o vetor contendo o gene com a seqüência sinal possibilitaria a secreção da enzima para o meio. Em ambos os casos o gene foi clonado em fase com a seqüência do promotor de T7.

O primeiro passo para construir o vetor pET3aAMI, foi realizar mutação para criar sítio de reconhecimento da enzima *NdeI* na extremidade N-terminal do gene de α -amilase. No ensaio para gerar sítio de *NdeI* antes do ATG inicial, dos 24 clones submetidos à digestão com *NdeI* e *HindIII*, em 21 verificou-se a presença da mutação em gel de agarose. Um desses clones foi seqüenciado e a mutação foi confirmada bem como toda a seqüência do gene. No segundo experimento de mutação, em cinco clones de doze selecionados, confirmou-se o sítio de *NdeI* após a última seqüência que codifica o peptídeo sinal de amilase.

A etapa seguinte foi subclonar o gene de amilase no vetor pET-3a. Dois experimentos de clonagem foram realizados, sendo que, no primeiro, houve uma alta taxa de vetor religado e não foi verificada a clonagem quando os clones selecionados foram submetidos à digestão por *NdeI-HindIII*. No segundo experimento, inserto e vetor, provenientes de clivagem em larga escala com *NdeI* e *HindIII*, foram extraídos de gel de agarose “low melting” e, nos 18 clones escolhidos, 8 da construção excretora e 10 da construção interna, verificou-se a clonagem quando analisados em gel de agarose após digestão por *NdeI-HindIII*. A presença do gene de amilase inserido no vetor de expressão também foi confirmada em 1 clone de cada construção através de sequenciamento.

2 - Expressão do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em *E. coli*

O gene de α -amilase foi expresso por meio do vetor da série pET-3a, o qual utiliza a indução do promotor de T7 para produção da proteína exógena em *E. coli*. Inicialmente testou-se a eficiência do sistema de expressão a 37°C, na ausência e presença do indutor IPTG. A expressão atingiu bons níveis nesta temperatura (figura 15).

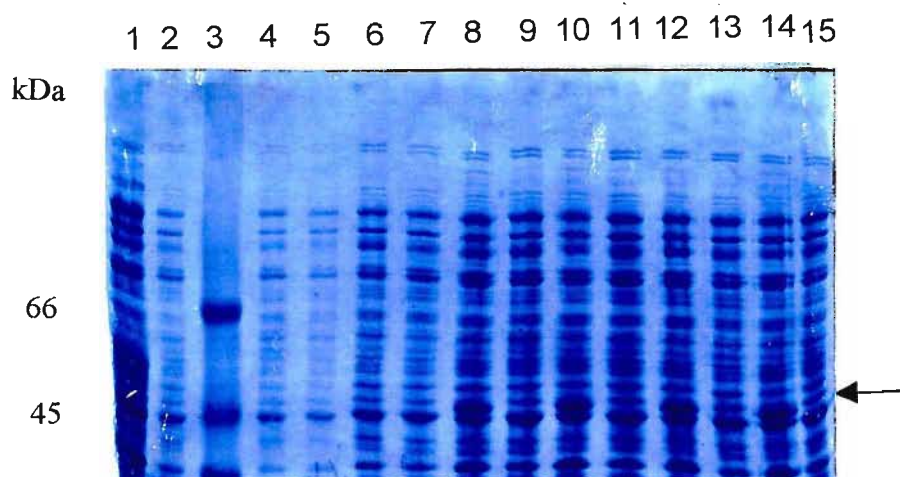


Figura 15 - SDS-PAGE 12% corado com Coomassie-blue R-250, mostrando a expressão (induzida e não induzida por IPTG) a 37°C no extrato bacteriano bruto.

- 1 - BL21DE03 induzido
- 2 - BL21DE03 não induzido
- 3 - Padrão de peso molecular (66, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa)
- 4 - pET3a induzido
- 5 - pET3a não induzido
- 6 - pET3a induzido
- 7 - pET3a não induzido
- 8,10 - pET3aAMI induzido
- 9,11 - pET3aAMI não induzido
- 12,14 - pET3aAMI* induzido
- 13,15 - pET3aAMI* não induzido
- Amilase
- AMI* - amilase sem peptídeo sinal

O próximo passo foi determinar a localização e solubilidade da amilase, fracionando o extrato bruto (sobrenadante/precipitado) após a lise das células em French Press. Nas condições testadas (37^oC, 25^oC, com e sem IPTG), foi observado que, em todas as construções, a enzima localizou-se no precipitado, na forma insolúvel (Figura 16).

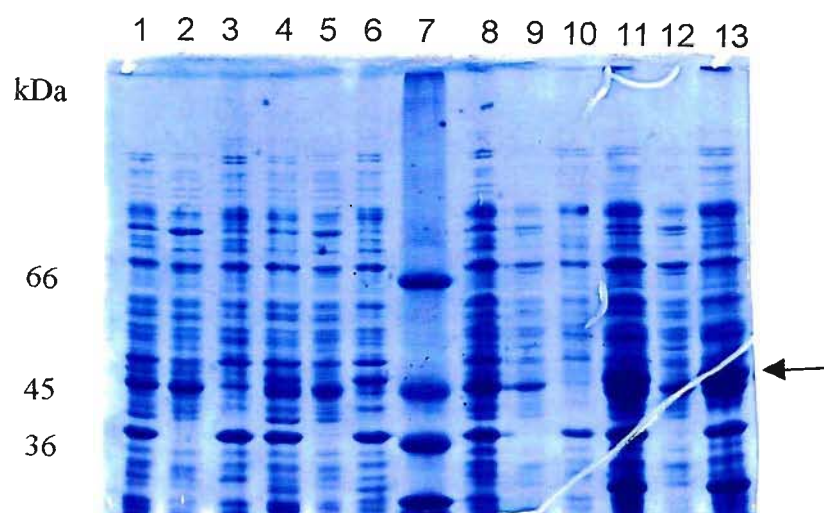


Figura 16 - SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie-blue R-250, mostrando a expressão de α -amilase (pET3aAMI com peptídeo sinal), não induzida por IPTG, a 25 e 37^oC.

1-6 - Expressão a 25^oC

8-13 - Expressão a 37^oC

1 - pET3a extrato bruto

2 - pET3a sobrenadante após lise

3 - pET3a precipitado após lise

4 - pET3aAMI (extrato bruto)

5 - pET3aAMI sobrenadante após lise

6 - pET3aAMI precipitado após lise

7- Padrão de peso molecular (66, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa)

8 - pET3a extrato bruto

9 - pET3a sobrenadante após lise

10 - pET3a precipitado após lise

11 - pET3aAMI (extrato bruto)

12 - pET3aAMI sobrenadante após lise

13 - pET3aAMI precipitado após lise

→ amilase

Mesmo nas condições em que o nível de expressão foi menor (25°C, sem IPTG) a enzima não foi encontrada ativa na forma solúvel, o que também pôde ser atestado pela ausência de atividade referente à amilase no sobrenadante (tabela 3).

Tabela3- Atividade de α -amilase (em absorvância) no sobrenadante a 25°C e 37°C.

Vetores	25°C Abs660nm	37°C Abs660nm
pET3a	0,0076	0,0231
pET3aAMI*	0,0065	0,0226
pET3aAMI	0,0089	0,0334

AMI*- amilase sem peptídeo sinal

3 - Purificação de α -amilase recombinante obtida de *E.coli*.

Em função dos resultados da expressão do gene de α -amilase em *E. coli*, tentou-se solubilizar e recuperar a enzima na forma ativa, adotando condições denaturantes (8 M Uréia) durante a purificação. A concentração de uréia no tampão de diálise foi gradativamente diminuída partindo de 6 M até próximo de zero, com o objetivo de minimizar a perda da proteína por precipitação. Na primeira tentativa de purificação, β -mercaptoetanol (concentração final 2 mM) foi adicionado ao tampão, mas neste procedimento toda amilase precipitou durante a diálise (dados não mostrados). Talvez o agente redutor estivesse dificultando o correto enovelamento da enzima, considerando que na estrutura da amilase há 5 cinco resíduos de cisteína. No segundo experimento de purificação, retirando β -mercaptoetanol do tampão de diálise, foi possível recuperar uma pequena porção da enzima na forma solúvel (figura 17), que, no entanto, apresentou reduzida atividade (Abs660nm: 0,099). A partir dos resultados obtidos optou-se para a construção de outro sistema de expressão para α -amilase.

A escolha por expressar o gene de α -amilase em *Pichia pastoris*, foi baseada em relatos nos quais altos níveis de α -amilases de diferentes origens foram secretados para o meio por este sistema (Juge et al., 1996; Paifer et al., 1994; Rydberg et al., 1999).

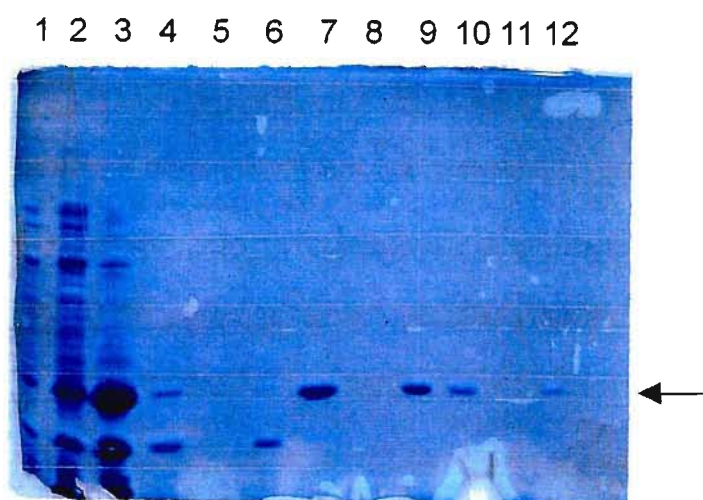


Figura 17 - SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie blue R-250, mostrando as etapas de purificação de α -amilase.

- 1 - Extrato bacteriano bruto não induzido IPTG
- 2 - Extrato bacteriano bruto induzido por IPTG
- 3 - Precipitado do lisado bacteriano
- 4; 7; 10 - frações da coluna
- 5; 8; 11 - sobrenadante após diálise
- 6; 9; 12 - precipitado após diálise
- amilase

4- Subclonagem do gene de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* no vetor de expressão de *Pichia pastoris*.

Na montagem do sistema de expressão de amilase, utilizando o vetor pPIC9Kf1, foi obtida a construção pPICAMI/SnaBI/EcoRI. A estratégia utilizada foi amplificar o gene de amilase (sem a sua seqüência sinal), subclonado no vetor pET-3A, utilizando oligonucleotídeos mutagênicos para os sítios de *SnaBI* (porção N-terminal) e *EcoRI* (região C-terminal), cujas extremidades 3' direcionam para dentro do inserto.

Dos 24 clones analisados, na terceira tentativa de clonagem, em 1 clone foi verificada a presença do gene após digestão com *SnaBI/EcoRI*. A presença do gene clonado neste vetor foi confirmada através de sequenciamento

5 – Expressão do gene de α -amilase recombinante em *Pichia pastoris*

5.1 – Indução de α -amilase recombinante em pequena escala

Transformantes das construções selvagem e mutante que apresentavam o gene da amilase integrado no genoma da levedura foram submetidos à indução da enzima recombinante. Inicialmente foram feitos experimentos em pequena escala para verificar se α -amilase recombinante estava sendo secretada para o meio em sua forma ativa. A figura 18 apresenta os testes de indução em pequena escala para transformantes da enzima selvagem.

Os resultados mostraram que todos os transformantes que apresentaram o gene da amilase integrado, quando comparados com o sistema controle, secretaram a enzima ativa, sendo que para o clone de número 13 foi detectada uma maior atividade da enzima no sobrenadante. Testes semelhantes foram feitos com três a quatro transformantes mutantes e aqueles que possibilitaram recuperar a enzima com maior atividade no sobrenadante foram escolhidos para a obtenção da enzima em larga escala.

Antes de iniciar os experimentos em larga escala, partiu-se para a tentativa de aperfeiçoar a secreção da enzima ativa.

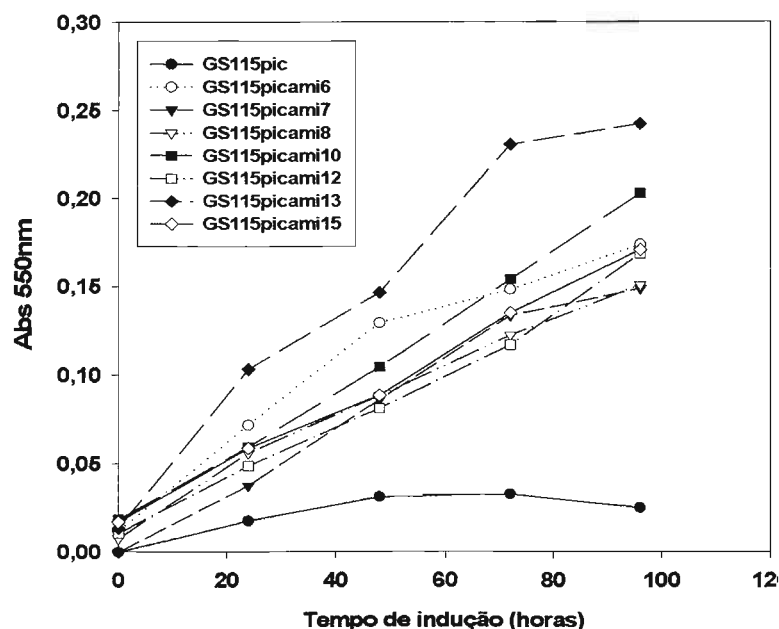


Figura 18 - Atividade de α -amilase, em unidades de absorbância (Abs 550nm), no sobrenadante, em função do tempo de indução. O gene que codifica α -amilase foi expresso na temperatura de 30°C pelo sistema GS115picami (clones 6, 7, 8, 10, 12, 13 e 15). O indutor metanol foi adicionado inicialmente na concentração de 1% (concentração final) e a cada 24 horas de cultivo adicionou-se 0,5% de metanol nas culturas. Como controle utilizou-se o sistema sem o gene de α -amilase (GS115pic).

5.2 - Otimização da produção de α -amilase recombinante

A otimização da produção de amilase foi estudada sob os parâmetros concentração do indutor metanol e temperatura de indução, partindo do transformante selvagem que secretou amilase com maior atividade no sobrenadante (clone 13). Foi realizado um experimento em que o metanol adicionado inicialmente no meio variou nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (concentração final). Os dados apresentados nas figuras 19 e 20 mostram que na concentração de 4% o metanol possibilitou recuperar maior atividade da enzima no sobrenadante. A figura 20 também mostra o efeito da temperatura de indução (30 e 25°C) na produção de amilase partindo de concentrações de metanol de 1 e 4%.

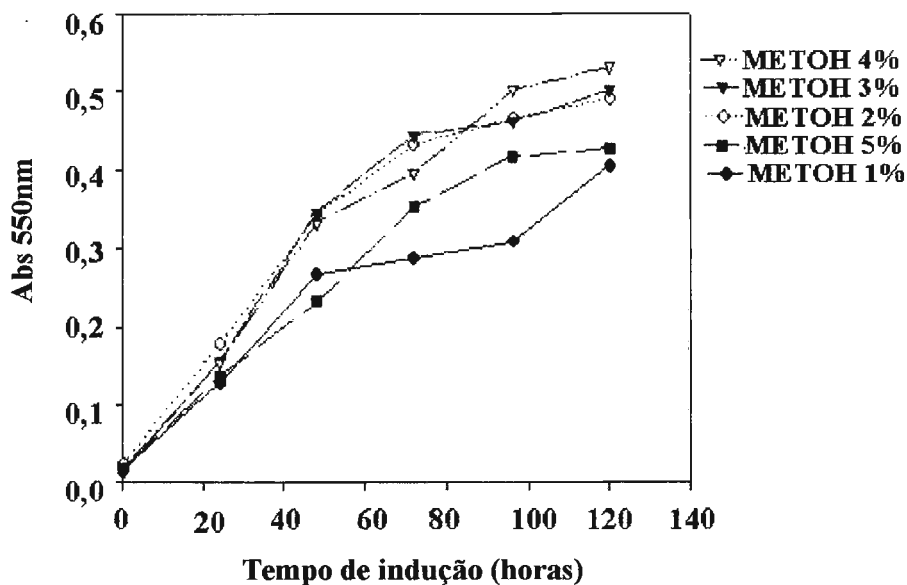


Figura 19 - Atividade de α -amilase, em unidades de absorbância (Abs 550nm), detectada no sobrenadante em função do tempo de indução. O gene que codifica α -amilase foi expresso na temperatura de 30°C pelo sistema GS115picami (clone 13), variando a concentração do indutor metanol (METOH 1, 2, 3, 4 e 5%). A cada 24 horas de cultivo adicionou-se 0,5% de metanol nas culturas.

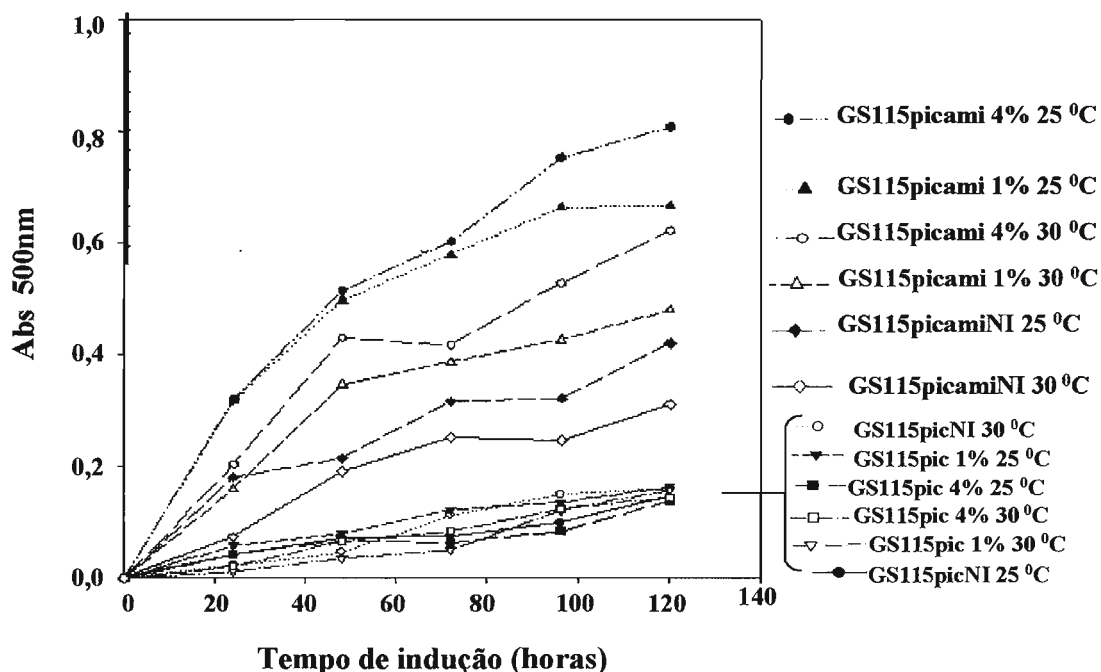


Figura 20 - Atividade de α -amilase, em unidades de absorbância (Abs 550nm), detectada no sobrenadante, em função do tempo de indução. O gene que codifica α -amilase foi expresso pelo sistema GS115picami (clone 13), não induzido (GS115picamiNI) e induzido por metanol partindo das concentrações de 1 e 4% (GS115picami1%, GS115picami4%), nas temperaturas de 25 e 30°C. A cada 24 horas de cultivo adicionou-se 0,5% de metanol nas culturas. Como controle utilizou-se o sistema sem o gene da amilase, não induzido (GS115picNI) e induzido (GS115pic1%, GS115pic4%).

A produção de α -amilase recombinante em larga escala foi realizada nas condições que possibilitaram recuperar a enzima com maior atividade no sobrenadante: concentração de metanol 4% a 25°C. O sistema de expressão secretou para o meio extracelular de 130 a 160 μg de proteínas/mL (proteína total). Apesar destes parâmetros otimizados, quando o sobrenadante livre de células foi analisado em gel SDS-PAGE, corado com Coomassie R-250, a banda referente à amilase foi detectada somente na amostra previamente concentrada (dados não mostrados).

6- Modelagem de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis*

6.1- Busca de seqüências similares no banco de dados de proteínas

A seqüência primária da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* –AXA (Q8PP90) foi submetida ao programa de alinhamento PSI-BLAST. O resultado encontrado apresentou a seqüência da α -amilase da bactéria *Alteromonas haloplanctis* –AHA (PDB 1B0I) com 23% de identidade e 34% de similaridade com a seqüência de AXA. As outras amilases de estruturas tridimensionais conhecidas, que apresentaram respectivamente graus de identidade e similaridade semelhantes à da amilase de *Alteromonas haloplanctis* foram: α -amilase pancreática de porco (PDB 1PPI; 20 e 31%), α -amilase de *Tenebrio molitor* (PDB 1JAE; 20 e 33%), α -amilase salivar humana (PDB 1SMD; 19 e 31 %) e α -amilase pancreática humana (PDB 3CPU; 19 e 31%).

Entre as enzimas que não apresentam até o momento estruturas tridimensionais resolvidas, merecem destaque as seqüências das α -amilases de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Q847N0), *Vibrio cholerae* (Q9KMS0) e de *Aeromonas hydrophila* (P22630), as quais apresentaram graus de identidade e similaridade respectivamente 88 e 92%, 50 e 65%, 51 e 66%.

A partir dos resultados obtidos, a estrutura da α -amilase de *Alteromonas haloplanctis* foi escolhida como molde para a construção do modelo de AXA, pois sua seqüência apresentou grau de identidade e similaridade, com a seqüência de AXA, ligeiramente superior em relação às outras amilases cujas estruturas tridimensionais estão disponíveis.

6.2- Construção do modelo para a α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Inicialmente as seqüências primárias das amilases de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA) e de *Alteromonas haloplanctis* (AHA), ambas sem o peptídeo sinal, foram alinhadas através do programa ClustalW. O resultado (figura 21) mostra que 113 resíduos (em vermelho) são idênticos, o que corresponde a 23,15% de identidade. Observa-se também que foi preservado o alinhamento das quatro regiões conservadas na família das amilases. Os resultados da predição de estruturas secundárias para a seqüência de AXA indicaram que os “gaps” existentes no alinhamento não interferiram com as estruturas secundárias na sua quase totalidade.

```

AHA 1 TPTTFVHLFEWNWQDVAQECEQYLGPKGAAVQVSEPPNEHITGSQWWTTRYQPVSYELQSR 60
AXA 1 QADVILHAFNWPYATVEARAKQIA-DAGYRKVLVAPAYRS-EGSAWARYQPQDIRLIDN 58
      ccc eeeee ccccc hhhhhhhhhhhh ccccc eeeee ccccc ccccc h ccccc eeeee cc

AHA 61 G-GNRAQFIDMVNRC SAAGVDIYVDTLINHMAAGSGTGTAGNSFGNKSFPISYSPQDFH-- 117
AXA 59 PLGDTAAFKKQALASNGVETYADIVFNHMANEAATRSDLNYPGGAVLSQY AANPGRYD 118
      cccc hhhhhhhhhhhh ccc hhhhhhhhhh ccccccccccccccc eeeee ccccccc

AHA 118 -----ESCTINN SDYG-----NDRYRVQNC ELVG-----LADLDTASNYVQNT 155
AXA 119 SLRLEFGLQSNFLSASDFGPAQCISNYNDAYQVRNYRICGGGSDPGLPDL-LGNDWV VQQ 177
      ccccccccccccccccccccccccccc ecccccc e c eeeee ccccccccccc ccc hhhhhh

AHA 156 IAAYINDLQAI GVKGFRFDASKHVAASDIQSLM-AKVNQSPVVEQEVIDQGGEAVG-ASE 213
AXA 178 QRAYLQALKSMGVTGFRVDAAKHMTFDHLNRVFDAGIRSGVYVEGEVITGGGTGNGDYDQ 237
      hhhhhhhhhh ccccc eee h cccc hhhhhhhhhhhh cccc e c ee cccccccc hhh

AHA 214 YLSTGL--VTEFKY STELGNTFRN-----GSLAWLSNFGEGWGFMPSSS AVVEVDNHDNQ 266
AXA 238 FLAPYLQSTPHAAYDFPLFNAV RNFAFAIGASMQLVDPAASGQALPGNR AVTFVATHDIP 297
      hhhhhh ccccccccccc hhhhhhhhhh ccc hhhhhh cccccccccccc eeeeeee cccc

AHA 267 RGHGAGNVITFEDGRLYDLANVFM LAYPYGYPKVMS SYDFHGD TDAGGPNVVHNNGNL 326
AXA 298 NNAGFRYAILDPVD---ETL AYAYLIGRNGMPMLYTDNNESGD----- 338
      ccccc eeeee cccc h hhhhhhhh ccccc eeeee ccccccc

AHA 327 ECFASNWKCEHRWSYIAGGVD FRNNTADN WAVTNWWDNTNNOISFGRGSSGHMAINKEDS 386
AXA 339 ----NRWVNAYLRDDLRRMIGFHNGV--QGTDMQVLSSSSCHILFRRGS LGIVGINKCGN 392
      hhhhhhhhhhhhhh ccccc cccc eeeee ccccc eeeee ccccc eeeee ccccc

AHA 387 TLTATVQTD MASGQYCNVLKGELSADAKSCSGEVITVNSDGTINLNIGAWDAMAIHKNKAK 446
AXA 393 PVTTTVGMNNSVLYWNADYVDALG-----SGNVVRISS-SYFTLPARGARMWRR--- 442
      eeeeeee ccccc eeeee cccc eeeee cccc eeeee cccc eeeee ccccc eeeee cc

AHA 447 LNTSSASS 454
AXA -----

```

Figura 21 – Alinhamento entre as seqüências das α -amilases de *Alteromonas haloplanctis* (AHA) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA) de acordo com o programa Clustalw. As quatro regiões conservadas na família das amilases estão sublinhadas. Estruturas secundárias de AXA, preditas pelo método MLRC (“Multivariate Linear Regression Combination; <http://pbil.univ-lyon1.fr/pbil.html>) de acordo com Guerneur et al.(1999), são apresentadas abaixo do alinhamento. h: α -Hélice; e: Fita beta; c: “Random c

O alinhamento apresentado na figura 20 foi submetido ao programa Moduler 6A para construir o modelo de AXA. Foram gerados cinco modelos minimizados energeticamente, dos quais se selecionou o modelo que apresentou menor energia e, de modo geral, melhor qualidade estereoquímica quando analisado pelo programa Procheck (Laskowski et al., 1993). O gráfico de Ramachandram (Ramachandran e Sasisekharan, 1968) mostra para o modelo selecionado que 84,9% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 12,2% em regiões permitidas, 9 resíduos (2,4%) em regiões generosamente permitidas e 2 resíduos em regiões não permitidas (figura 22), como definido pelo programa Procheck.

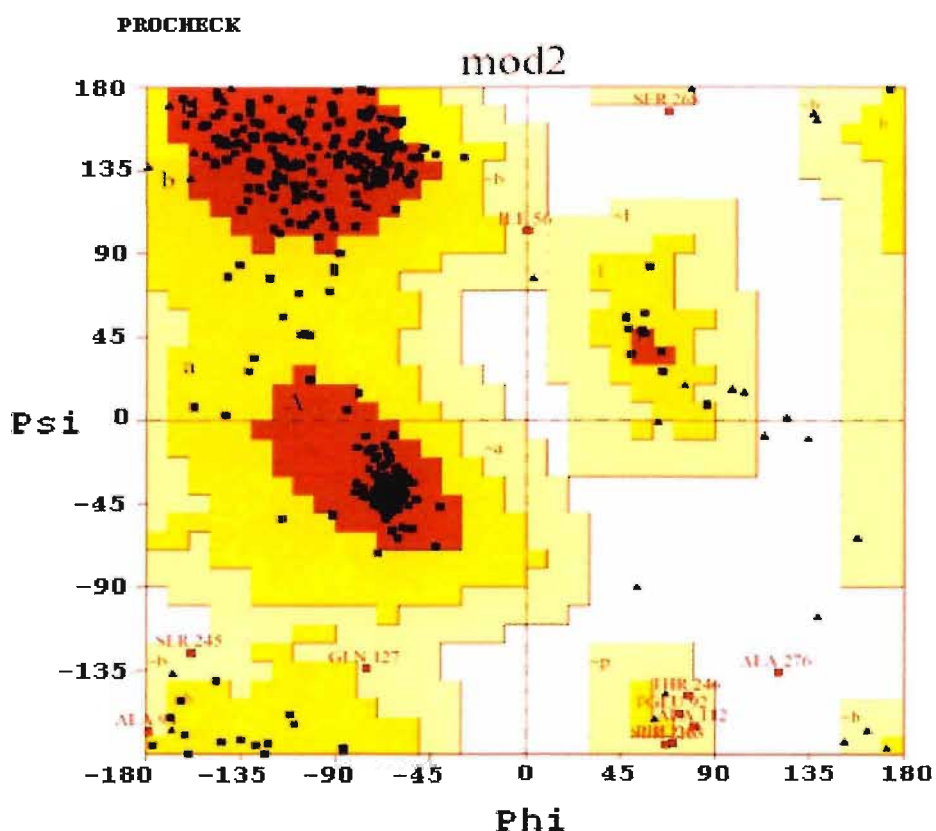


Figura 22 - Gráfico de Ramachandran para o modelo de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA). Resíduos em regiões mais favorecidas (A, B, L): 321 (84,9%). Resíduos em regiões permitidas (a, b, l, p): 46 (12,2%). Resíduos em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p): ILE 56, GLU 92, ALA 94, ALA 112, GLN 127, SER 216, SER 245, THR 246, PHE 263 (12,4%). Resíduos em regiões não permitidas: SER 268, ALA 276 (0,5%).

6.3 – Características do modelo da amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

O modelo proposto para AXA (figura 23) apresenta topologia característica das enzimas da família das amilases: a estrutura $(\beta/\alpha)_8$ no domínio central (Domínio A), a alça entre a terceira alfa-hélice e a terceira fita beta, a qual caracteriza o domínio B, e o motivo “Greek Key” na extremidade N-terminal (Domínio C).

No modelo de AXA o domínio A é formado pelos resíduos 1 a 85 e 169 a 362, o domínio B compreende os resíduos 86 a 168 e o domínio C estende-se da Thr 363 a Arg 442. A localização das estruturas secundárias encontradas no modelo de AXA está apresentada na tabela 4.

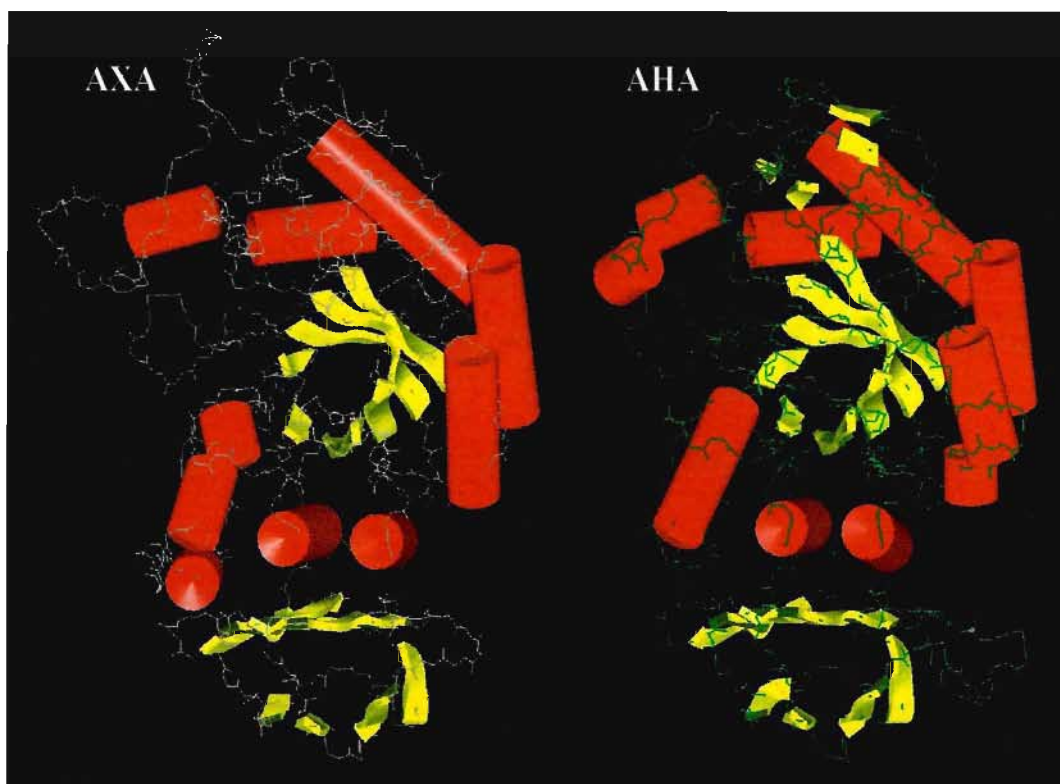


Figura 23 - Representação esquemática mostrando a estrutura de α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA), modelada a partir da α -amilase de *Alteromonas haloplanctis* (AHA). As estruturas secundárias foram geradas no programa Homology, na estação gráfica “Silicon graphics”, de acordo com o método de Kabsch (Kabsch e Sander, 1985). Em amarelo estão representadas as fitas betas; em vermelho, α -hélices.

Tabela 4 – Localização das estruturas secundárias em AXA

ESTRUTURA	REGIÃO	ESTRUTURA	REGIÃO
DOMÍNIO A			
A β 1	Ile5-Ala8	A α 1	Tyr13-Gly27
A β 2	Lys30-Ala34	<i>A$3_{10}2\alpha$</i>	<i>Trp44-Try48</i>
		A α 2b	Asp62-Gly77
A β 3	Glu79-Ile84	A α 3	Asp172-Ser87
A β 4	Gly192-Asp196	A α 4	Phe203-Phe210
A β 5	Tyr219-Glu223	A $3_{10}5$	Tyr235-Phe239
A β 6	Leu243-Ser245	A α 6a	Ala249-Asp252
		A α 6b	Pro254-Arg60
		<i>Aα 6c</i>	<i>Ser268-Gln271</i>
A β 7	Val288-Thr290	A α 7	Pro309-Gly321
A β 8	Met326-Thr331	A α 8	Asp348-His357
DOMÍNIO B			
B β 1	Asp147-Asn153		
DOMÍNIO C			
C β 1	Met365-Ser369		
C β 2	His374-Arg379		
C β 3	Gly383-Asn388		
C β 4	Thr397-Val399		
C β 5	Tyr406-Asn409		
C β 6	Val420-Ile423		
C β 7	Tyr428-Ile430		
C β 8	Gly436-Arg441		

*Estruturas secundárias em itálico não estão envolvidas na formação do (β/α)₈ “barril”

7- Mapeamento dos resíduos de AXA candidatos a subsítios de ligação com o substrato

Os resíduos candidatos a interagir com o substrato foram mapeados por sobreposição do modelo criado para AXA com a estrutura da amilase pancreática de porco (PPA). No modelo de AXA foram selecionados 18 correspondentes topológicos a PPA na fenda catalítica (figura 24 e tabela 5); treze destes são idênticos e 5 não são conservados (F136, C157, G227, T230 e N299).

Considerando a boa sobreposição das cadeias laterais em torno da região catalítica entre o modelo proposto para AXA com a estrutura de PPA, assumiu-se a semelhança da arquitetura dos subsítios entre as duas enzimas (figura 25). Segundo Qian (Qian et al.,1994), a estrutura de PPA complexada com o pseudotetrassacarídeo

acarbose mostrou uma densidade eletrônica correspondente a cinco subsítios totalmente ocupados. Estudos posteriores mostraram que a estrutura de PPA é capaz de acomodar mais que cinco anéis no sítio catalítico (Machius et al., 1996).

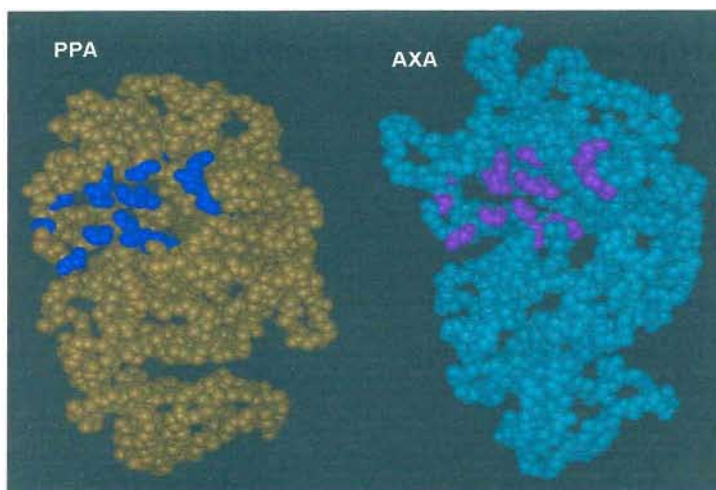


Figura 24-Representação esquemática do modelo de AXA e da estrutura de PPA. Resíduos em PPA envolvidos na ligação com substrato estão em azul. Os correspondentes topológicos em AXA são mostrados em violeta.

Tabela 5- Resíduos de PPA envolvidos na ligação com substrato e seus correspondentes topológicos em AXA mapeados por sobreposição das estruturas.

	PPA	AXA
SUBSÍTIO		
-1	Trp58	Trp44
-2	Trp59	Trp45
-2	Tyr62	Tyr48
-3,-2	Gln63	Gln49
-1	His101	His88
+2	Tyr151	<i>Phe136</i>
-3	Val163	<i>Cys157</i>
-1	Asp197	Asp196
+1	Ala198	Ala197
+2	Lys200	Lys199
+1	His201	His200
-1,+1	Glu233	Glu223
+2	Ile235	Ile225
+3	Leu237	<i>Gly227</i>
+2,+3	Glu240	<i>Thr230</i>
-1	His299	His294
-1,+1	Asp300	Asp295
-2	His305	<i>Asn299</i>
+3	Gly306	

Em itálico estão os resíduos não conservados.

Em PPA, o resíduo H305 faz parte de uma seqüência rica em glicinas (Gly304-His305-Gly306-Ala307-Gly308-Gly309-Ser310) formando uma alça (Qian et al., 1994). Esta região não existe em AXA quando as estruturas são alinhadas (figura 26). Apesar da cadeia lateral N299 em AXA não sobrepor efetivamente com H305 em PPA, este resíduo foi selecionado como candidato a subsítio de ligação, por estar direcionado para o sítio catalítico.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

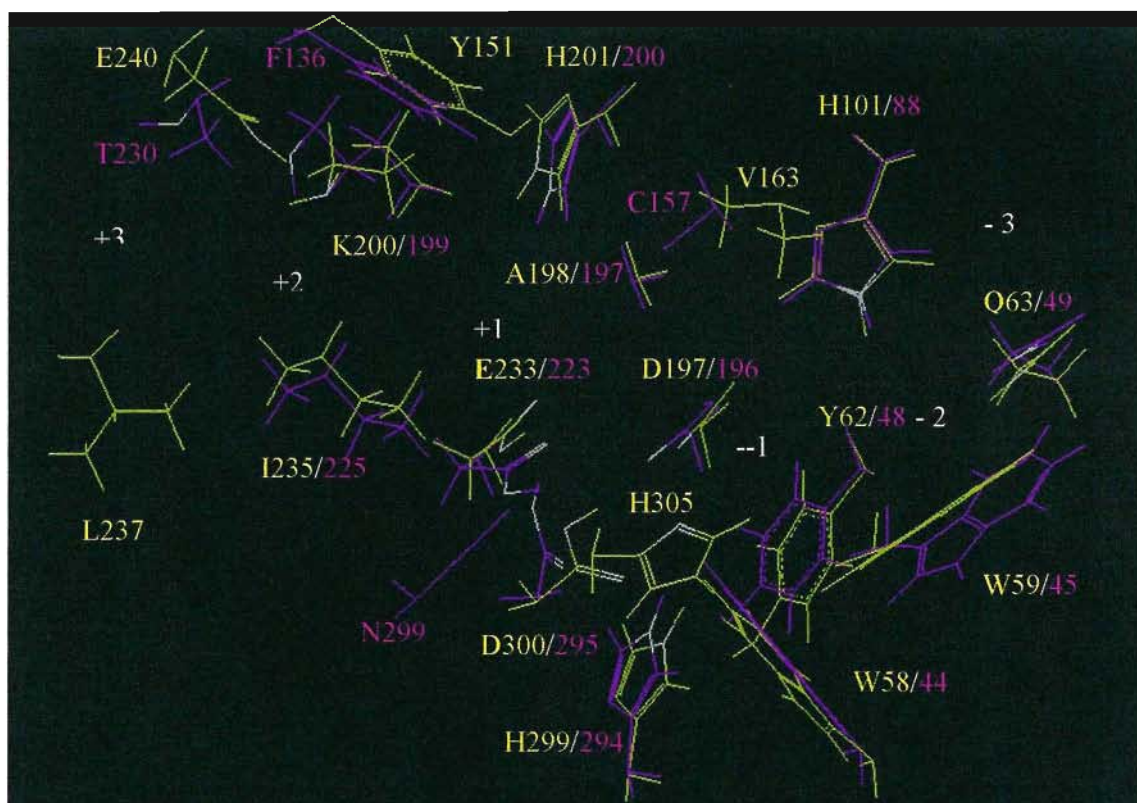


Figura 25 – Representação esquemática mostrando a sobreposição das cadeias laterais dos resíduos envolvidos na ligação com o substrato em PPA (amarelo) e seus correspondentes topológicos em AXA (violeta) em torno da fenda catalítica. Os átomos das cadeias laterais de PPA que fazem ligações de hidrogênio e seus correspondentes candidatos em AXA estão em branco, bem como a localização dos subsítios.

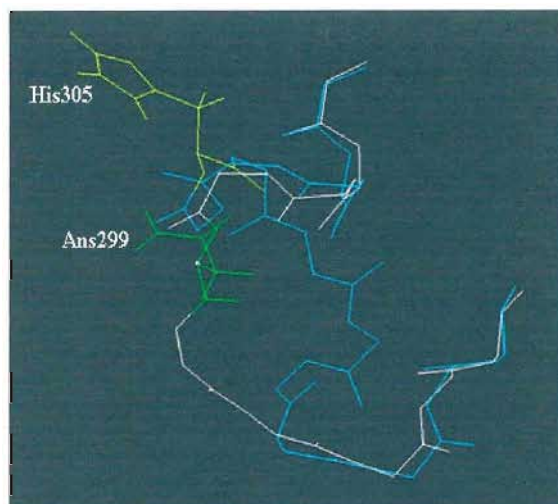


Figura 26 – Esquema mostrando a alça em PPA (azul) a qual está ausente em AXA (branco). Resíduos em verde e amarelo são respectivamente Asn299 em AXA e His305 em PPA.

Os dezoito candidatos a subsítios de ligação localizam-se nas alças que conectam as fitas betas com as hélices correspondentes da estrutura $(\beta/\alpha)_8$ (figura 27).

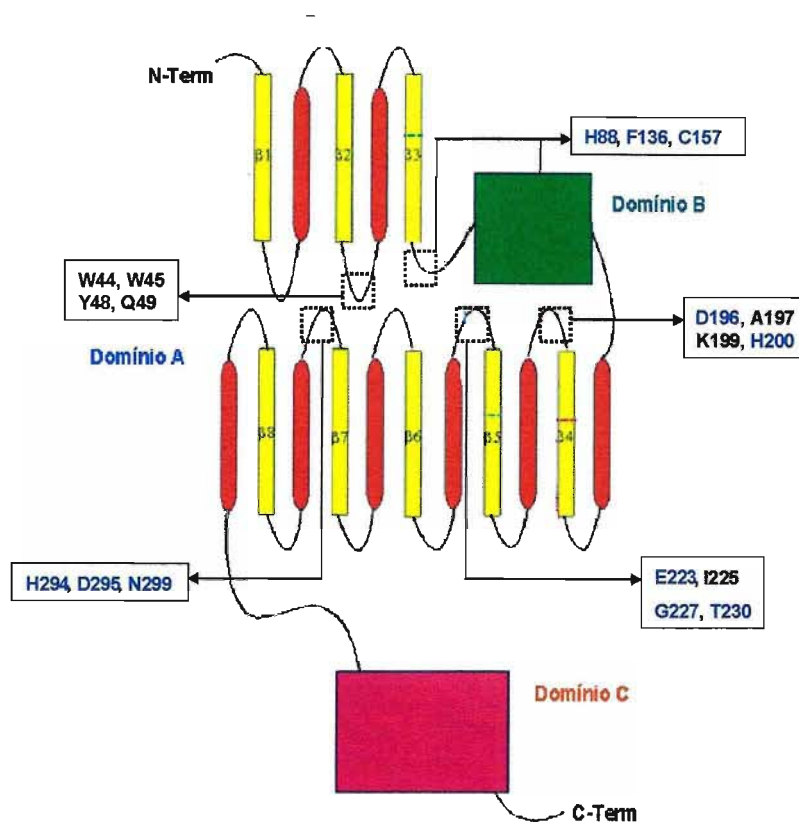


Figura 27 – Diagrama topológico de AXA, mostrando a localização dos candidatos a subsítios de ligação. Em azul estão os resíduos que foram mutados para alanina.

Onze resíduos foram escolhidos para serem mutados para alanina (His88, Phe136, Cys157, Asp196, His200, Glu223, Gly 227, Thr230, His294, Asp295 e Asn299). A escolha destes resíduos foi considerada suficiente, pois além de representativa para os subsítios, seis destes resíduos são conservados (His88, Asp196, His200, Glu 223, His294 e Asp 295) e já estudados em outras amilases (Svensson, 1994). Outros cinco não são conservados (Phe136, Cys157, Gly227, Thr230 e N299), o que possibilitará validar ou não o modelo proposto para AXA e investigar a influência dos resíduos não conservados nas propriedades catalíticas e no padrão de clivagem da enzima.

8 – Obtenções dos mutantes de α -amilase

Na obtenção dos mutantes foram realizados de dois a quatro experimentos de mutagêneses sítio-dirigidas. O resumo dos resultados é apresentado na tabela 6.

Tabela 6 – Obtenção dos mutantes de α -amilase

MUTANTE	TRANSFORMANTES OBTIDOS	TRANSFORMANTES POSITIVOS PARA A MUTAÇÃO*
H88A	10	2 (20)
F136A	6	5 (83)
C157A	1	1 (100)
D196A	5	5 (100)
H200A	16	3 (18,7)
G227A	7	7 (100)
T230A	2	2 (100)
E223A	2	2 (100)
H294A	16	2 (12,5)
D295A	16	9 (56)
N299A	1	1 (100)

* Os valores entre parênteses indicam a eficiência da mutagênese, em porcentagem, em relação ao número de transformantes obtidos.

Tanto as mutações foram confirmadas como também todo o gene foi checado por sequenciamento.

9 – Análises dos transformantes de *Pichia pastoris*.

A técnica da PCR permite analisar transformantes em *Pichia* para determinar se o gene de interesse está integrado no genoma da levedura e diferenciar fenótipo Mut⁺ de Mut^s. Dos 94 transformantes analisados para todos os mutantes, 52% apresentaram o gene da amilase integrado no genoma de *Pichia*.

Para interpretar os resultados deve-se considerar que o gene da amilase foi amplificado utilizando os primers *AOXF* e *AOXR*. O primer *AOXF* hibridiza na região promotora do gene *AOXI* na posição – 100, e o primer *AOXR* hibridiza na região de término da transcrição, 70 bases após o códon de término. O vetor pPIC9Kf1 possui 270 bp relativos à sequência sinal. O gene da amilase sem a sequência sinal apresenta 1326 pb e para integrantes do tipo Mut⁺ (“methanol utilization plus”, devido ao gene *AOXI* intacto) espera-se duas bandas como produtos de PCR: 2200 e 1766 pb (figura 28 A-D). O valor sublinhado corresponde à soma dos valores 100, 70, 270 e 1326. O valor de 2200 é referente ao gene *AOXI*.

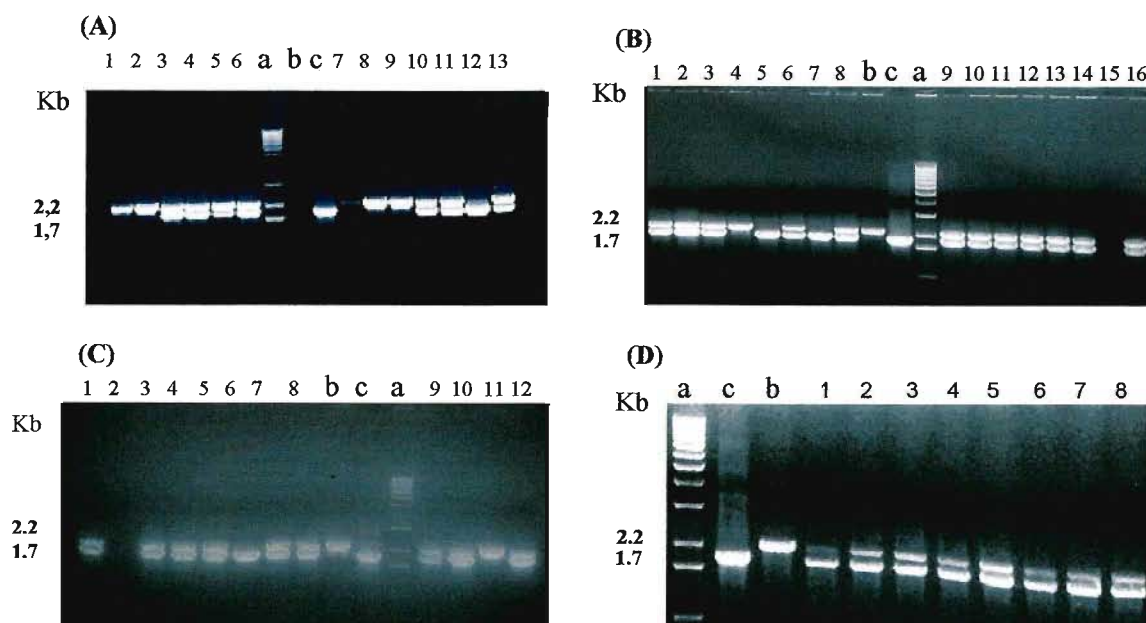


Figura 28 – Análise de transformantes de *Pichia pastoris* GS115 por PCR em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. (A) 1-6: GS115H88A, transformantes 1-6; 7-13: GS115D196A, transformantes 1- 7. (B) 1 – 8: GS115H200A, transformantes 1 – 8; 9 – 16: GS115E223A, transformantes 1 – 8. (C) 1 – 8: GS115H294A, transformantes 1 – 8; 9 -12: GS115D295A, transformantes 1- 4. (D) 1 – 4: GS115F136A, transformantes 1- 4; 5 – 8: GS115C157A, transformantes 1- 4. a, b e c são respectivamente: padrão 1Kb, GS115 e pPICAMI.

Considerando a possibilidade de ocorrerem resultados falsos positivos (“bandas fantasmas”), transformantes considerados positivos pela PCR também foram submetidos à análise por Southern para confirmar a presença do gene da amilase integrado no genoma da levedura (figura 29). Desta análise observou-se a hibridização com a sonda através da banda na altura esperada em torno de 8,1 Kb (fragmento da construção pPICAMI/SnaBI/EcoRI digerida por *BglIII*, no qual está a sonda de 640 pb).

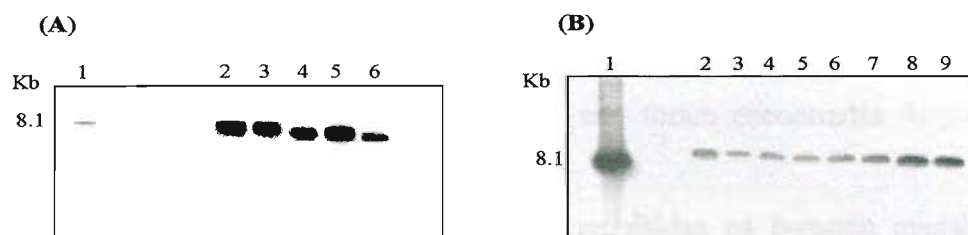


Figura 29 – Southern dos transformantes considerados positivos pela análise por PCR. (A) 1 – GS115AMI; 2 - GS115H294A, clone 3; 3 - GS115E223A, clone 1; 4 - GS115H200A, clone 6; 5 - GS115D196A, clone 4; 6 - GS115H88A; clone 4. (B) 1 – GS115AMI, 2 - GS115F136A, transformante 2; 3 e 4 - GS115C157A, transformantes 1 e 4; 5 - GS115D295A, transformante 1; 6 e 7 - GS115T230A, transformantes 4 e 8; 8 - GS115G227A, transformante 5; 9 - GS115N299A, transformante 3.

10 – Purificações das α -amilases *X. axonopodis* nativa e recombinante

As etapas de purificação da amilase recombinante selvagem (rWT) estão apresentadas na tabela 7. Ao final desta marcha, duas frações apresentando atividade de amilase foram recolhidas após cromatografia de troca iônica: uma fração (tubos:15-23) eluída na lavagem inicial com tampão Tris-Cl pH 7,0 e outra (tubos:31-45) que foi coletada durante o gradiente de NaCl.

Tabela 7 – Purificação de α -amilase recombinante selvagem (rWT)

ETAPAS	PROTEÍNA		VOLUME (mL)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/ μ g)	RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE (%)	PURIFICAÇÃO
	TOTAL (μ g)	ATIVIDADE TOTAL (U)				
Extrato Bruto	62060	5765	400	0,09	100	1
Ultrafiltração	19915	4224	35	0,2	73	2,3
DEAE/Ultrafiltração						
Fr: 15-23	1902	1369	5	0,7	24	7,7
Fr: 31-45	3973	637	4,5	0,16	11	1,8

U - μ mol de grupo redutor formado por minuto a 37⁰C.

Os parâmetros de recuperação e enriquecimento mostram que a fração inicial (tubos 15 a 23) deve conter a amilase com menor grau de contaminantes. De fato, isso é verificado pelo perfil eletroforético, no qual a amilase apresentou uma massa molecular aparente de 45 kDa. A purificação das amilases mutantes apresentou perfil semelhante (figura 30).

As etapas de purificação da amilase nativa extraída de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram as mesmas e, de forma semelhante à amilase recombinante, a enzima foi recuperada na eluição inicial (“flow-through”) e apresentou massa molecular aparente de 45 kDa (figura 31). No entanto, neste caso não foram encontradas frações com atividade de amilase no gradiente com NaCl.

Com base nestes resultados, as frações recolhidas na lavagem inicial foram reunidas, separadas em alíquotas e estocadas a -20°C para posterior caracterização.

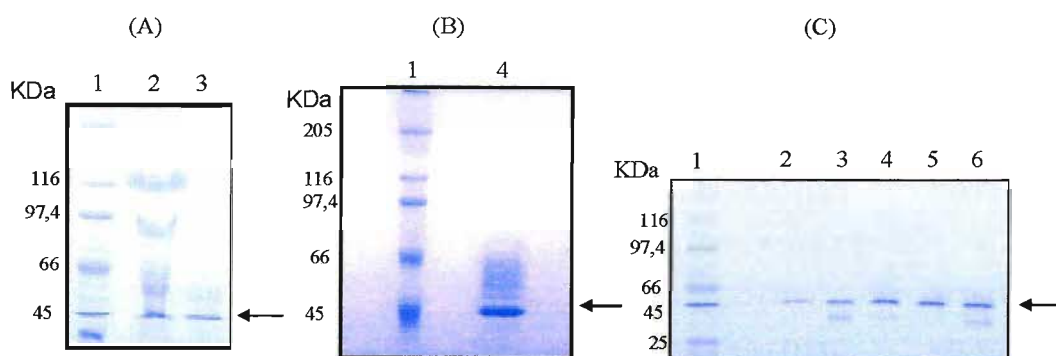


Figura 30 – SDS PAGE, corado com Coomassie blue R-250, mostrando α -amilase recombinante selvagem (rWT) e mutantes, após cromatografia (DEAE Sepharose) seguida de concentração por ultrafiltração. (A) 1 – Padrão peso molecular; 2 – rWT (Fr: 31-45); 3 – rWT (Fr: 15-23). (B) 1 – Padrão peso molecular; 4 – rWT (Fr: 16-22, de outro lote de purificação). (C) 1 – Padrão peso molecular; 2 – T230A; 3 – H88A; 4 – D196A; 5 – H200A; 6 – E223A. As setas indicam as bandas referentes às amilases.

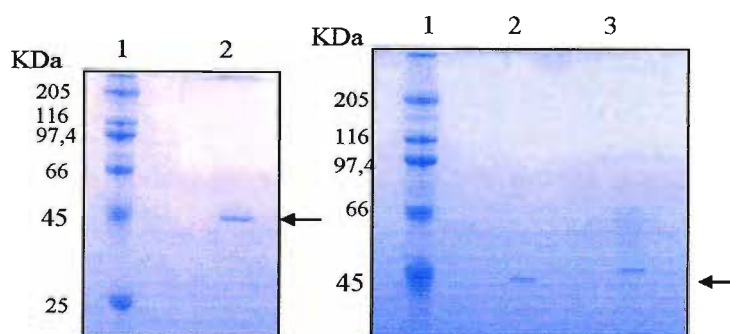


Figura 31 – SDS PAGE, corado com Coomassie blue R-250, mostrando α -amilase selvagem (WT) e recombinante selvagem (rWT) após cromatografia (DEAE Sepharose) seguida de concentração por ultrafiltração. 1 – Padrão peso molecular; 2 - WT(fração 15 -21); 3 - rWT. As setas indicam as bandas referentes às amilases.

11 – Caracterização das α -amilases nativa e recombinante

Os parâmetros k_{cat} e K_m para a hidrólise do amido encontrados para a α -amilase isolada de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, (WT), e para a enzima recombinante selvagem secretada por *P. pastoris* (rWT) foram comparáveis, apesar dos valores de k_{cat} para WT serem ligeiramente inferiores (tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros para a hidrólise de amido (solução 0,5%).

Enzima	Atividade Específica (U/ η g)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mg/mL)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mL \cdot mg^{-1}$)
WT	0,39 \pm 0,01	387 \pm 15	1,3 \pm 0,1	297,6
rWT	0,47 \pm 0,07 (100)	458 \pm 9 (100)	1,1 \pm 0,1 (100)	412,6 (100)
H88A	N.D	x	x	x
F136A	N.D	x	x	x
C157A	0,22 \pm 0,02 (47)	232 \pm 6 (51)	2,0 \pm 0,2 (180)	116,0 (28)
D196A	N.D	x	x	x
H200A	0,21 \pm 0,008 (45)	228 \pm 12 (50)	1,32 \pm 0,03 (120)	170,5 (41)
E223A	N.D	x	x	x
G227A	0,37 \pm 0,04 (79)	434 \pm 7 (95)	1,25 (113)	347,6 (84)
T230A	0,41 \pm 0,02 (87)	457 \pm 7 (100)	1,3 \pm 0,1 (123)	333,5 (81)
H294A	0,30 \pm 0,004 (64)	297 \pm 14 (65)	1,41 \pm 0,03 (127)	210,6 (51)
D295A	N.D	x	x	x
N299A	0,04 \pm 0,003 (8,5)	x	x	x

U: nmol de grupo redutor formado por minuto a 37^oC (método Somogyi-Nelson). ND: atividade não detectada. x: Não determinado em função da ausência de atividade. Valores entre parênteses correspondem à porcentagem relativa aos valores apresentados pela enzima recombinante selvagem (100%). Para as enzimas em negrito os resultados são médias de experimentos com dois lotes de enzimas; para as demais, os valores correspondem à média de três ensaios de um mesmo lote de enzima. [WT], [rWT], [C157A], [H200A], [G227A], [T230A], [H294A] = 0,5 nM. [H88A], [F136A], [D196A], [E223A], [D295A], [N299A] = 35 nM.

Os onze mutantes podem ser separados em três grupos quando suas atividades específicas são comparadas com a atividade da enzima recombinante selvagem (tabela 8): um grupo cujas mutações deletaram a atividade enzimática (H88A, F136A, D196A, E223A, D295A e N299A), sugerindo que estes resíduos são fundamentais para o desempenho catalítico da enzima; um segundo grupo que apresentou atividade próxima

(G227A, T230A); e um terceiro grupo que mostrou atividade intermediária (C157A, H200A e H294A).

O mutante C157A apresentou um k_{cat} de 50% em relação ao valor da enzima recombinante selvagem (rWT) e seu K_m praticamente dobrou, o que lhe conferiu a menor eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) entre os mutantes. Já os mutantes H200A e H294A apresentaram, respectivamente, valores de k_{cat} reduzidos para 50 e 65% e valores de K_m aumentados em 20 e 27% em relação aos valores correspondentes em rWT. Os resultados apresentados para este grupo sugerem que os resíduos C157, H200 e H294 são importantes para a catálise em AXA (mutantes com k_{cat} reduzido), porém têm menos importância na ligação do substrato com exceção da C157.

As mutações nos resíduos G227 e T230 não alteraram o k_{cat} da enzima em relação à rWT e aumentaram em apenas 13 e 23%, respectivamente, o valor do K_m . Por isso a eficiência catalítica destes mutantes foi próxima aquela da enzima recombinante selvagem. Logo, estes resíduos parecem ter menor importância para a atividade catalítica da enzima e afinidade pelo substrato.

Os resultados apresentados neste trabalho para os resíduos conservados na família das amilases (H88, D196, H200, E223, H294 e D295 em AXA) estão em acordo com estudos de mutagênese com os correspondentes em outras amilases (Svensson, 1994). Destes resíduos, D196, E223 e D295 são os prováveis candidatos envolvidos diretamente na catálise.

12- Análise do padrão de clivagem das amilases recombinantes.

O padrão de clivagem de 4-nitrofenil α -D-malto-oligossacarídeos (PNPG7, PNPG5 e PNPG4) pelas amilases recombinantes selvagem (rWT) e mutantes (H88A, F136A, C157A, H200A, G227A, T230A, H294A e N299A) foi analisado a fim de verificar se as mutações alteravam os modos produtivos de ligação da enzima, ou seja, quando a ligação a ser clivada se localiza entre os subsítios -1 e +1 (tabelas 9 -11).

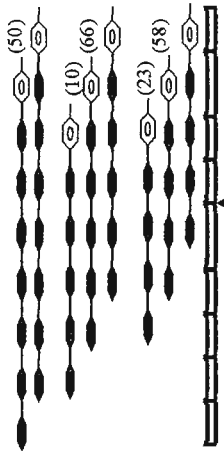
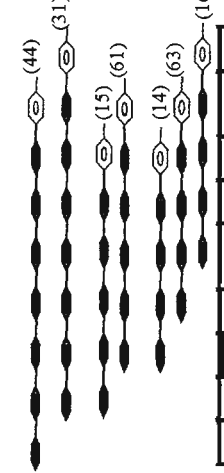
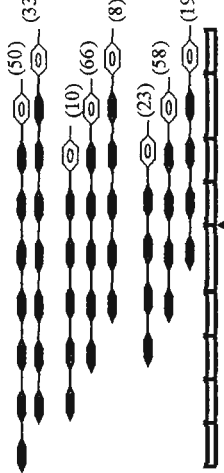
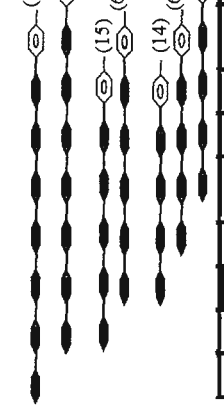
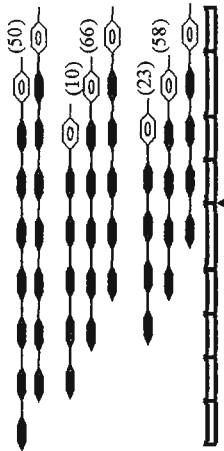
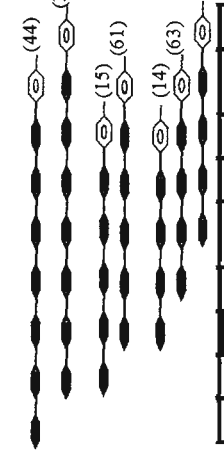
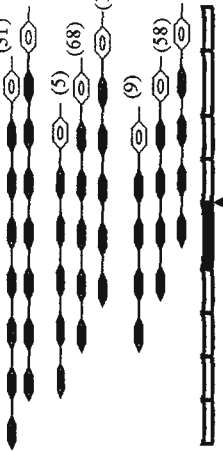
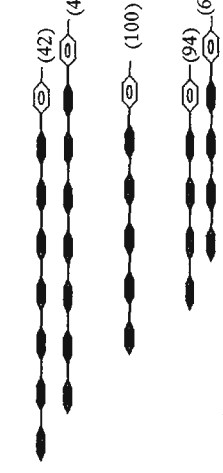
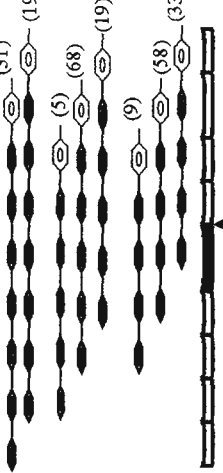
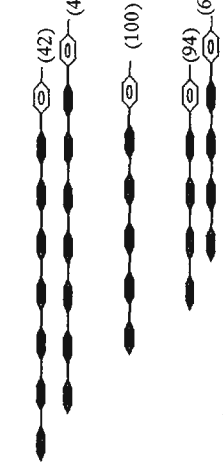
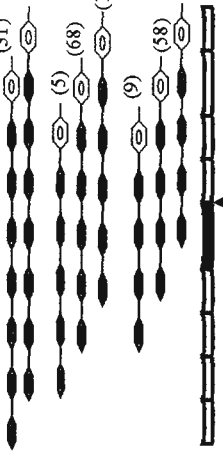
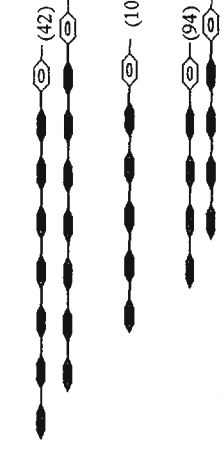
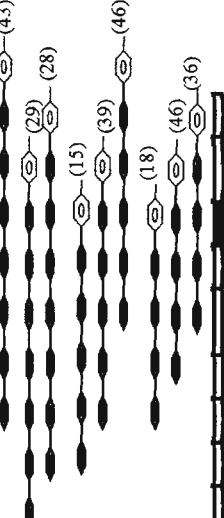
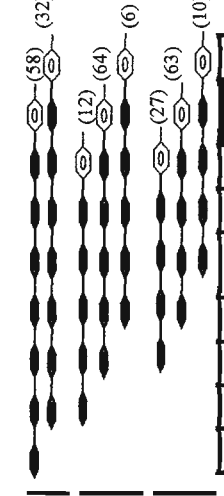
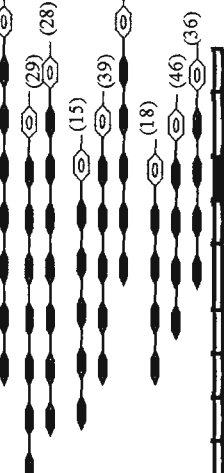
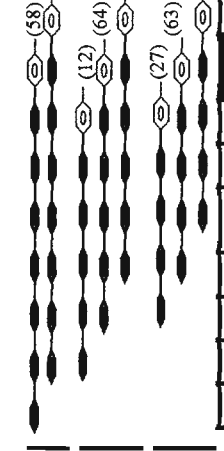
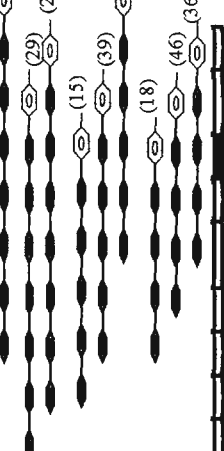
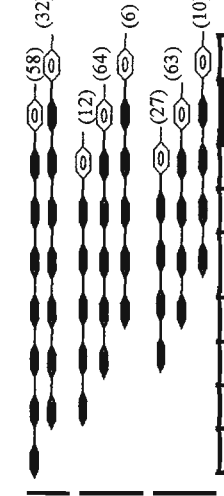
Utilizando o substrato PNPG7, observou-se que a amilase rWT apresentou dois modos produtivos de ligação. A enzima hidrolisou preferencialmente a terceira ligação glicosídica a partir da extremidade redutora, liberando 50% de PNPG2 e maltopentaose, e no outro modo de ligação hidrolisou a quarta ligação glicosídica, produzindo 33% de PNPG3 e maltotetraose.

Tabela 9 - Padrão de clivagem de p-Nitrofenil α -D-malto-oligosacarídeos (PNPG4-G5 e PNPG7) pelas amilases recombinantes selvagem (rWT) e mutante

Enzima	Substrato	Frequência de clivagem (%)			Frequência de transglicosilação (%)	Consumo do substrato (%)	Tempo da reação (min)	Concentração da enzima (nM)	Atividade de hidrólise relativa ^a	Atividade de Transglicosilação relativa ^b
		G - G - G - G - G - G - G - G - G - G - PNP								
rWT	PNPG7	33	50	17	5,6	3	2	100,00 (0,13)	100,00 (0,028)	[4,6]
H88A		19	31	50	8,7	10	52	1,10	5,80	[0,9]
F136A		43	28	0	2,0	60	360	0,01	0,00	
C157A		31	44	25	3,2	2	51	3,50	5,20	[3,3]
H200A		48	42	10	6,4	10	52	1,70	0,90	[8,7]
G227A		32	58	10	7,8	5	2	98,00	53,60	[8,5]
T230A		35	51	14	4,5	5	1,5	76,00	57,00	[6,1]
H294A		19	39	42	7,2	5	5	25,00	85,70	[1,3]
N299A		21	36	43	5,8	5	42	2,00	7,20	[1,3]
		G - G - G - G - G - G - G - G - G - G - PNP								
rWT	PNPG5	8	66	16	7,0	5	2	100,00 (0,12)	100,00 (0,023)	[5,2]
H88A		19	68	8	4,6	10	52	2,40	0,62	[20]
F136A		46	39	0	1,8	60	360	0,08	0,00	
C157A		61	15	24	1,7	2	51	2,00	2,00	[5,2]
H200A		100		0	0,6	30	196	2,00	0,00	
G227A		6	64	18	6,9	5	2	95,00	113,00	[4,3]
T230A		7	70	13	8,8	5	3	76,00	12,00	[33]
H294A		16	71	7	7,6	20	10	5,90	2,40	[13]
N299A		10	62	28	3,5	5	42	1,70	3,60	[2,5]
		G - G - G - G - G - G - G - G - G - G - PNP								
rWT	PNPG4	19	58	0	2,3	5	2	100,00 (0,048)	-	(0,0)
H88A		33	58	0	4,1	80	52	0,39	-	(0,0)
F136A		36	46	0	6,7	90	600	0,04	-	(0,0)
C157A		16	63	7	5,9	45	51	0,92	-	(0,000035)
H200A		6	94	0	1,0	90	380	0,04	-	(0,0)
G227A		10	63	0	1,5	5	2	36,70	-	(0,0)
T230A		14	61	0	1,8	10	2	36,40	-	(0,0)
H294A		18	69	0	3,5	40	10	3,20	-	(0,0)
N299A		25	61	0	3,4	30	42	1,00	-	(0,0)

a- O valor entre parênteses corresponde à atividade de hidrólise da enzima selvagem, calculada como nmol de produto de hidrólise/[enzima]/ minuto. A atividade de hidrólise relativa foi calculada como (atividade de hidrólise do mutante / atividade de hidrólise da enzima selvagem) x 100. b- O valor entre parênteses corresponde à atividade de transglicosilação da enzima selvagem, calculada como nmol de produto de transglicosilação / [enzima] / minuto. A atividade de transglicosilação relativa foi calculada como (atividade de transglicosilação do mutante / atividade de transglicosilação da enzima selvagem) x 100. Os valores entre colchetes correspondem à razão atividade de hidrólise / atividade de transglicosilação. [PNPGs] = 1mM.

Tabela 10 – Esquema do padrão de ligação das amilases recombinantes selvagem (rWT) e mutantes (H88A, F136A, C157A, H200A e G227A) em p-Nitrofenil α -D-malto-oligosacarídeos (PNPG7, PNPG5 e PNPG4).

Enzima	Substrato	Padrão de ligação	Enzima	Substrato	Padrão de ligação
rWT	PNPG7		C157A	PNPG7	
	PNPG5			PNPG5	
	PNPG4			PNPG4	
H88A	PNPG7		H200A	PNPG7	
	PNPG5			PNPG5	
	PNPG4			PNPG4	
F136A	PNPG7		G227A	PNPG7	
	PNPG5			PNPG5	
	PNPG4			PNPG4	

Os subsítos estão numerados de acordo com Davies et. al. (1997). Subsítos preenchidos de preto indicam o local da mutação. A seta indica o local da clivagem O esquema foi elaborado a partir dos dados referentes à frequência de ligação na tabela 9. Valores entre parênteses correspondem às frequências de clivagem (%).

Tabela 11 – Esquema do padrão de ligação das amilases mutantes (T230A, H294A e N299A) em p-Nitrofenil α -D-malto-oligosacarídeos (PNPG7, PNPG5 e PNPG4).

Enzima	Substrato	Padrão de ligação	Enzima	Substrato	Padrão de ligação
T230A	PNPG7		N299A	PNPG7	
	PNPG5			PNPG5	
	PNPG4			PNPG4	
H294A	PNPG7				
	PNPG5				
	PNPG4				

Os subsítos estão numerados de acordo com Davies et. al. (1997). Subsítos preenchidos indicam o local da mutação. A seta indica o local da clivagem. O esquema foi elaborado a partir dos dados referentes à frequência de clivagem na tabela 9. Valores entre parênteses correspondem às frequências de clivagem (%).

Dos oito mutantes analisados, seis (H88A, C157A, G227A, T230A H294A e N299A) também apresentaram dois modos de ligações produtivos, liberando mais PNPG2 em relação à PNPG3, da mesma forma que a enzima selvagem.

O mutante H200A mostrou modos de ligação semelhantes à rWT, entretanto, diferentemente da enzima selvagem, liberou um pouco mais de PNPG3 (48%) em relação à PNPG2 (42%).

A mutação da fenilalanina 136 no subsítio +2 alterou de forma mais significativa o padrão de clivagem da enzima. Neste caso, um modo de ligação adicional, além do apresentado pela enzima selvagem foi observado, no qual o mutante libera preferencialmente PNPG4 e maltotriose, correspondendo a 43 % dos produtos de hidrólise. Além disso, a distribuição de PNPG2 e PNPG3 foi praticamente 1:1 (29% e 28% respectivamente).

Apesar do padrão de clivagem de PNPG7 pela enzima selvagem e maioria dos mutantes serem semelhantes, as mutações provocaram alterações na taxa de liberação dos produtos de hidrólise (atividade hidrolítica relativa). O mutante F136A apresentou a menor atividade hidrolítica relativa (0,01%). Os outros mutantes que apresentaram percentuais relativos bem reduzidos foram H88A (1,1%), H200A (1,7%), N299A (2%) e C157A (3,5%). Comparando estes dados com aqueles apresentados na tabela 8, para a hidrólise do amido, a relação é semelhante principalmente para os mutantes F136A, H88A e N299A, cujas atividades sobre este polissacarídeo foram abolidas, reforçando a importância destes resíduos para a eficiência da enzima.

As mutações no subsítio +3 (mutantes G227A e T230A), comparando com os outros mutantes, foram as que menos alteraram a atividade de hidrólise sobre PNPG7. Estes mutantes, no amido, também apresentaram atividades relativas mais próximas da selvagem.

No substrato PNPG5, a enzima selvagem apresentou três modos produtivos de ligação. Preferencialmente a enzima cliva a terceira ligação glicosídica, liberando 66% de PNPG2 e maltotriose (subsítios ocupados -3 a +3). No segundo modo de ligação, a enzima cliva a segunda ligação glicosídica e libera 10% de PNPG1 e maltotetraose. No terceiro modo a enzima libera 8% de PNPG3 e maltose.

Dos oito mutantes analisados, dois (G227A e T230A) foram semelhantes à enzima selvagem, tanto no modo de ligação quanto na frequência de clivagem, ou seja, liberam preferencialmente PNPG2 e produzem mais PNPG1 em relação à PNPG3.

Outros dois mutantes (H88A e H294A, ambos no subsítio -1) apresentaram três modos de ligação, mas diferenciaram-se da enzima selvagem na frequência de clivagem, pois, apesar de liberarem preferencialmente PNPG2, como também fez rWT, a distribuição de PNPG1 e PNPG3 foi invertida. Neste caso a mutação favoreceu mais a liberação de PNPG3, em outras palavras, favoreceu interações com subsítios da extremidade redutora.

Para os mutantes C157A (subsítio-3) e N299A (subsítio -1,+1) não foram detectados PNPG3 e PNPG1 respectivamente, já para o mutante H200A, apenas observou-se a formação de PNPG2 e maltotriose. Para o mutante F136A não foi detectado PNPG3 e, novamente este mutante clivou preferencialmente a quinta ligação glicosídica, liberando glicose a partir de PNPG5.

A atividade hidrolítica da enzima selvagem em PNPG5 não alterou em relação à PNPG7 (0,12 nmol/min/[enzima] e 0,13 nmol/min./[enzima] respectivamente) . Da mesma forma, enquanto o mutante F136A apresentou a atividade relativa mais baixa (0,08%), as mutações na glicina 227 e na treonina 230 foram as menos deletérias para a atividade, com percentuais semelhantes comparando com PNPG7 (95% e 76% respectivamente). Os outros mutantes apresentaram atividades relativas bem reduzidas, sendo que, no caso do mutante H294A, foi mais evidente o efeito da redução do grau de polimerização do substrato na redução da atividade de hidrólise relativa, pois houve uma queda de 75% sobre PNPG7 e 94% sobre PNPG5.

No substrato PNPG4 a enzima selvagem teve o mesmo comportamento apresentado sobre PNPG5, ou seja; três modos de ligação produtivos, clivando preferencialmente a terceira ligação glicosídica (produção de PNPG2) e liberando mais PNPG1 em relação à PNPG3. Novamente, os mutantes G227A e T230A apresentaram padrões de clivagem semelhantes ao da enzima selvagem. Em todas as outras mutações, diferentemente da enzima selvagem, em maior ou menor grau, mais PNPG3 foi produzido em relação à PNPG1, sendo que no mutante H200A este produto não foi detectado.

Em PNPG4 ficou claro o efeito da redução do grau de polimerização na redução da atividade hidrolítica da enzima. A atividade da enzima selvagem foi reduzida em 60%, e até mesmo para os mutantes G227A e T227A a redução da atividade relativa à enzima selvagem foi mais significativa (64% sobre PNPG4 contra 5% e 24% respectivamente sobre PNPG5).

A atividade de transglicosilação foi observada basicamente nos substratos PNPG7 e PNPG5. No substrato PNPG4, somente no mutante C157A foram encontrados traços de produtos maiores ($3,5 \times 10^{-5}$ nmol/min./[enzima]). Sobre ambos os substratos PNPG7 e PNPG5 somente no mutante F136A não foi detectada atividade de transglicosilação.

Os resultados mostram que a enzima selvagem libera mais produtos de hidrólise em relação aos produtos de transglicosilação, tanto em PNPG7 quanto em PNPG5, resultados observados pela razão atividade de hidrólise/atividade de transglicosilação (4,6 em PNPG7 e 5,2 em PNPG5). Essa tendência foi seguida, em maior ou menor grau, pela maioria dos mutantes, exceto para os mutantes H88A, H294A e N299A, agindo no substrato PNPG7, cujas razões atividade hidrolítica/atividade de transglicosilação foram praticamente de 1:1 (0,9, 1,3 e 1,3 respectivamente).

V - DISCUSSÃO

1 – Sequência primária e modelo estrutural da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

A enzima α -amilase da bactéria gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (AXA) é composta por 475 aminoácidos e sua sequência tem 90% de identidade com a sequência da amilase de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Hu et al., 1992). A partir do alinhamento das sequências primárias destas enzimas, o peptídeo sinal de AXA foi deduzido, sendo composto por 33 aminoácidos (MRNTPAHAPPSLIQCGVRLLLTALVLLVTTANA) contendo em sua extremidade C-terminal o sítio de processamento consenso (Ala-X-Ala) em procariotos (von Heijne, 1985). Pelo alinhamento com outras seqüências de amilases foram observadas as quatro regiões conservadas propostas para as amilases (Nakajima, 1986). Em adição a estas regiões, a seqüência de AXA revelou duas outras regiões conservadas. Uma quinta região (Janecek, 1992), na qual localiza um aspartato envolvido na ligação com íon cálcio (165 LPDLL 169 em AXA) em várias amilases cujas estruturas foram resolvidas (MacGregor, 1988), e uma sexta região (44 WWARYQP 50 em AXA) muito similar à região presente nas amilases de origem animal (Boer e Hickey, 1986; MacDonald et al., 1980; Nishide et al., 1986; Pasero et al., 1986), localizada na terceira alça da estrutura $(\beta/\alpha)_8$ (resultados, figuras 21 e 27) e que contém resíduos envolvidos na ligação com substratos (Qian et al., 1994).

No modelo estrutural proposto para AXA, a partir do alinhamento com a sequência da amilase da bactéria psicrófila *Alteromonas haloplanctis*, que por sua vez mostrou uma significativa identidade de sequência (50 a 60%) com amilases pancreática e salivar de vertebrados (Feller et al., 1992), foram encontrados os três domínios (A, B e C) característicos das enzimas pertencentes à família das amilases (Janecek, 1997). As maiores variações na estrutura entre amilases de diferentes espécies são encontradas no domínio C (Jespersen et al., 1993; MacGregor, 1988) e no domínio B (Janecek et al., 1997). O domínio C no modelo estrutural de AXA apresentou 8 fitas betas em “sanduíche” formando motivo “Greek Key” (Richardson et al., 1992), já para outras

amilases, como por exemplo de cevada (Kadziola et al., 1994) e de pâncreas de porco (Larson et al., 1994), são encontradas 5 e 10 fitas betas, respectivamente, na extremidade N-terminal. No domínio B de AXA foi encontrada apenas uma α -hélice. Na amilase do inseto *Tenebrio molitor* (Strobl et al., 1998), o domínio B é formado por uma hélice e quatro fitas betas curtas formando uma estrutura em folha. Na α -hélice do domínio B de AXA está o resíduo Arg152, o qual, topologicamente em outras amilases, está envolvido na ligação com cálcio (Svensson, 1994). Os outros resíduos de AXA propostos a interagir com o íon cálcio são listados na tabela 12, com seus respectivos correspondentes topológicos em outras amilases. Sítio de ligação ao íon cloreto é encontrado nas amilases salivar e pancreática de vertebrados, em insetos e bactéria (Aghajari et al., 1998a; Aghajari et al., 1998b).

Tabela 12- Resíduos conservados nas amilases envolvidos na ligação com íon cálcio e os correspondentes topológicos em AXA.

AXA	AHA	TMA	PPA	ANA	CGT
N87	N88	N98	N100	N121	N139
R152	Q135	R146	R158	E162	I190
D167	D144	D155	D167	D175	D199
H200	H178	H189	H201	E210	H233

Resíduos não conservados estão em negrito. AXA, α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (este trabalho); AHA, α -amilase de *Alteromonas haloplanctis* (Aghajari et al., 1998a,b); TMA, α -amilase de *Tenebrio molitor* (Strobl et al., 1998); PPA, α -amilase pancreática de porco (Larson et al., 1994); ANA, α -amilase de *Aspergillus niger* (Boel et al., 1990); CGT, ciclodextrina glicosil transferase (Klein et al., 1992).

Na sequência primária de AXA existem cinco cisteínas, sendo que uma delas faz parte da sequência sinal. As outras cisteínas estão nos domínios B (C141 e C157) e C (C373 e C390), sendo que as duas últimas podem ser candidatas à formação de uma ligação dissulfeto, baseando-se na distância entre seus átomos de enxofre (3,19 Å). As amilases de mamíferos apresentam 5 ligações dissulfídicas (Brayer et al., 1995; Larson et al., 1994) e em procariotos, por exemplo, há variações entre uma, no caso de β -amilase de *Bacillus polymyxa* (Uozumi et al., 1991) a quatro, para a α -amilase de *Alteromonas haloplanctis* (Aghajari et al., 1998a,b).

No domínio A de AXA, observa-se uma quebra na sexta α -hélice da estrutura $(\beta/\alpha)_8$ (ver resultados, figura 23) que é explicada pela presença da prolina 254 (resultados, tabela 4). Sabe-se que nas estruturas secundárias em α -hélice o oxigênio carbonílico de cada resíduo faz uma ligação de hidrogênio (2,86 Å) com o NH do quarto resíduo da cadeia polipeptídica. Essas ligações são praticamente paralelas ao eixo da hélice e apontam para a mesma direção, conferindo à estrutura um momento dipolo. As cadeias laterais nestas estruturas apontam para fora da hélice, entretanto, somente os resíduos de prolina são incompatíveis com esta conformação, pois sua cadeia lateral está ligada ao átomo de nitrogênio da cadeia polipeptídica, prevenindo sua participação na ligação de hidrogênio e interferindo na correta conformação da estrutura (Creighton, 1984).

Nos domínios do tipo $(\beta/\alpha)_8$, o sítio ativo está situado na porção inferior da fenda, em formato de funil, criada pelas oito alças que conectam a extremidade carboxi de cada fita beta com o amino terminal das α -hélices. Resíduos que participam na ligação e catálise localizam-se nestas regiões de alças (Branden e Tooze, 1999), o que está de acordo com resultado encontrado para os 18 candidatos a subsítios de interação selecionados no modelo de AXA (resultados, figura 27). Isso de certa forma contribui para a validação do modelo proposto para AXA. Portanto, as características da sequência primária e do modelo estrutural de AXA estão consistentes com o padrão apresentado pelas enzimas da família das amilases.

2 – Clonagem, expressão e purificação de α -amilase.

A solubilidade de uma proteína recombinante é determinada por vários fatores como, por exemplo, o vetor, a célula hospedeira, e as condições de cultivo. Um bom exemplo é a expressão, utilizando células de *E.coli*, dos genes que codificam AXA e a amilase de *Xanthomonas campestris* (Hu et al, 1992). Como já dito, estas amilases apresentam 90% de identidade entre as sequências, no entanto, enquanto a amilase desta última foi encontrada no espaço periplasmático, AXA por outro lado, localizou-se no precipitado, provavelmente na forma de agregados insolúveis (corpos de inclusão). Nestes dois casos foram utilizados vetores e linhagens de *E.coli* diferentes (vetor pET-3a

e *E.coli* BL21DE03 para AXA, e vetor pB16 e *E.coli* JM101 para amilase de *Xanthomonas campestris*). Geralmente, níveis altos de expressão levam à produção de corpos de inclusão em procariotos (Tsumoto et al., 2003), ainda assim, a maioria dos relatos de expressão de amilases recombinantes de origem bacteriana utiliza *E.coli* como célula hospedeira (Declerck et al., 1990; Feller et al., 1998; Lin et al., 2003; Mikkelsen et al., 2001; Sogaard et al., 1993; Takata et al., 1994). Entretanto, há expressões bem sucedidas utilizando outros microrganismos hospedeiros, como é o caso de *Bacillus subtilis* (Igarashi et al., 1998; Ikawa et al., 1998), *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius et al., 1988) e *Pichia pastoris* (Paifer et al., 1994). AXA foi secretada ativa e solúvel pela levedura *Pichia pastoris*, sendo que as condições que possibilitaram recuperar maior atividade da enzima no meio foram concentração de 4% (V/V) do indutor metanol e temperatura de indução 25°C. Provavelmente, na temperatura mais baixa, o crescimento mais lento da cultura resultou em uma menor taxa de produção da enzima, favorecendo o seu enovelamento.

A α -amilase de *Xanthomonas campestris* (Hu et al., 1992) foi purificada por cromatografia de troca catiônica (DEAE-celulose) e recuperada na eluição inicial (“flow-through”), apresentando massa molecular aparente de 45 kDa, da mesma forma que AXA nativa e recombinante. Este resultado faz sentido, pois, o PI teórico de AXA é 6,8 e o pH do tampão utilizado na cromatografia foi 7,0, logo, a enzima nestas condições está praticamente sem carga efetiva. Houve perda, durante a purificação, de cerca de 50% na atividade da enzima recombinante selvagem, provavelmente em razão da ação de proteases. Para amilase nativa isolada de *Xanthomonas axonopodis* o percentual foi semelhante. Cabe ressaltar que, como houve traços de contaminantes nas amostras após a purificação, a concentração de enzima estimada nos ensaios enzimáticos pode ser um pouco menor.

Sabe-se do potencial de *Pichia pastoris* para realizar modificações pós-traducional, tipicamente associados a eucariotos superiores, tais como processamento de seqüência sinal, O- e N-glicosilação (Bretthauer e Castellino, 1999; Cereghino e Cregg, 2000). Há relatos de O-glicosilação por *Pichia* em amilases de cevada (Juge et al., 1996), de saliva de camundongo (Kato et al., 2001) e glicoamilases de *Aspergillus awamori* (Heimo et al., 1997). Na amilase salivar de camundongo, por exemplo, a razão enzima

glicosilada/não glicosilada foi 20/80, e as massas moleculares foram respectivamente 58600 e 56300 Da.

A banda referente à AXA recombinante, no gel de poliacrilamida, ficou ligeiramente acima quando comparada com a banda da enzima nativa obtida de *Xanthomonas axonopodis*. Como na sequência de AXA há sítios potenciais de N-glicosilação (334 NESG e 401 NSSV), há uma possibilidade de que a enzima recombinante tenha sido glicosilada. Entretanto, o perfil eletroforético de AXA recombinante e a presença da sequência consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (Marshall, 1972) não são suficientes para concluir que a asparagina será glicosilada, principalmente levando em consideração que o enovelamento de uma proteína influencia na regulação de N-glicosilações (Pless and Lennarz, 1977). Neste caso, um tratamento com endoglicosidases, ou mais precisamente, a determinação das massas moleculares de AXA selvagem e recombinante, por espectrometria de massa, poderia confirmar essa hipótese.

3 – Caracterização de α -amilase recombinante selvagem.

A ligação glicosídica caracteriza-se por ser muito estável, tendo uma constante catalítica de aproximadamente $2 \times 10^{-15} \text{s}^{-1}$ à temperatura ambiente (Wolfenden, 1998). As enzimas da família das amilases aumentam significativamente esta taxa, sendo consideradas uma das mais eficientes enzimas conhecidas. Ciclodextrinas glicosiltransferases, por exemplo, tem uma constante catalítica de 3s^{-1} (van der Veen et al., 2002).

O parâmetro k_{cat} de AXA nativa, extraída de *Xanthomonas axonopodis* (WT), e AXA selvagem recombinante (rWT), no substrato amido, foram respectivamente 387s^{-1} e 458s^{-1} (resultados, tabela 8). Valores semelhantes foram encontrados para α -amilase da bactéria psicrófila *Alteromonas haloplanctis*, a 4°C (490s^{-1}) e para α -amilase pancreática de porco, a 25°C (326s^{-1}) (Feller et al., 1994). No mesmo trabalho de Feller e colaboradores, os valores do K_m sobre amido foram de $1,09 \text{mg.mL}^{-1}$, para α -amilase de *Alteromonas haloplanctis*, e $1,12 \text{mg.mL}^{-1}$ para α -amilase pancreática de porco, os quais também coincidem com os valores de K_m encontrados para AXA recombinante selvagem. O K_m da α -amilase de *Bacillus licheniformis*, a 80°C , foi também semelhante ($1,15$

mg/mL) (Rivera et al., 2003). Como os valores estão bem próximos do padrão encontrado indica que a AXA está na sua conformação apropriada.

Quando a enzima recombinante atuou em substratos menores (p-nitrofenil malto-oligosacarídeos), sua atividade hidrolítica reduziu com a redução do grau de polimerização do substrato. Isso ficou bem evidente na mudança dos substratos PNPG7 e PNPG5 (atividades de 0,13 nmol/min./[enzima] e 0,12 nmol/min./[enzima], respectivamente) para PNPG4 (atividade de 0,048 nmol/min./[enzima]). Esse comportamento foi observado em outros trabalhos utilizando substratos de tamanhos diferentes e amilases de diferentes origens, como por exemplo, α -amilase de cevada (Bak-Jensen et al., 2004; Mori et al., 2002), α -amilase humana pancreática (Rydberg et al., 2002) e salivar (Ramasubbu et al., 2004) e α -amilase de *Bacillus subtilis* (Suganuma et al., 1996). Estes resultados não são surpreendentes, considerando que, maior o substrato, maior o número de subsítios ocupados, e em função da maior energia liberada dessas interações, a energia de ativação do complexo enzima-substrato diminuiria, aumentando assim a eficiência catalítica da enzima (Suganuma et al., 1996).

Vale ressaltar que as energias liberadas das interações de cada anel de glicose com seu respectivo subsítio pode variar entre os subsítios que compõem o sítio de ligação (Kandra et al., 2002; Kandra et al., 2003), e desta forma contribuir mais ou menos para o aumento da atividade da enzima. Essa observação pode ser analisada pela taxa de liberação de produtos de hidrólise da enzima recombinante selvagem nos três substratos (PNPG7, PNPG5 e PNPG4). Por exemplo, quando o produto de hidrólise é PNPG1 a partir de PNPG5 e PNPG4 (taxas de 0,015 nmol/min./[enzima] e 0,011 nmol/min./[enzima] respectivamente), o aumento na taxa de hidrólise para o substrato PNPG5 (cerca de 26% a mais em relação à PNPG4) sugere uma interação com um subsítio adicional (-4).

Seguindo o mesmo raciocínio, a liberação de PNPG3 a partir de PNPG5 (anéis de glicose ocupando subsítios -2 a +3) e PNPG4 (anéis de glicose ocupando subsítios -1 a +3) ocorre nas respectivas taxas de 0,012 nmol/min./[enzima] e 0,009 nmol/min./[enzima]. Neste caso, a interação do último anel de glicose de PNPG5 com o subsítio -2 favorece em 25% a liberação de PNPG3, a partir de PNPG5, em relação à PNPG4. Por outro lado, quando PNPG2 é liberado de PNPG5 (anéis de glicose ocupando

os subsítios -3 a +2) e de PNPG4 (anéis de glicose ocupando os subsítios -2 a +2), a diferença na taxa de hidrólise para este produto é mais drástica (0,098 nmol/min./[enzima], em PNPG5 e 0,028 nmol/min./[enzima], em PNPG4). Isso evidencia como a interação do último anel de glicose de PNPG5 com o subsítio -3 favorece a liberação de PNPG2, a partir de PNPG5, comparando com PNPG4.

Os modos de ligações e as frequências de clivagem apresentados pela enzima selvagem em PNPG5 sugerem que a interação do anel de glicose no subsítio -3 é mais favorável em relação à interação no subsítio +3, em função da maior produção de PNPG2 em relação à PNPG3 (66% contra 8% respectivamente). Neste caso, para a liberação de PNPG2, os anéis de glicose ocupam os subsítios -3 a +2, e, para a produção de PNPG3, os subsítios ocupados pelos anéis de glicose são -2 a +3.

Considerando agora o substrato PNPG4, as interações de glicoses com os subsítios +2 e -2 são favorecidas em relação aos subsítios -3 e +3, respectivamente, devido a maior produção de PNPG2 em relação à PNPG1 e PNPG3, respectivamente (58% contra 23% e 19%, respectivamente). Na liberação de PNPG2, os subsítios ocupados pelas glicoses são -2 a +2, e, para produção de PNPG1 e PNPG3, os subsítios ocupados são, respectivamente, -3 a +1, e -1 a +3.

As diferenças nos padrões de clivagem de endo-enzimas são atribuídas às diferenças na estrutura de seus subsítios, incluindo, o número de subsítios, a localização do sítio catalítico e as afinidades de cada subsítio (Suganuma et al., 1996). O sítio ativo da α -amilase salivar humana (HSA), por exemplo, está dividido em sete subsítios (-4, -3, -2, -1, +1, +2, +3) (Ramasubbu et al., 2003). Está enzima atuando em oligossacarídeos marcados (CNP-G4 e CNP-G5) produz CNP-G1, CNP-G2 e CNP-G3, sendo que, CNP-G2 é o produto preferencial, a partir de ambos os substratos, e a liberação de CNP-G1 a partir de CNP-G4 é favorecida em relação à CNP-G3, da mesma forma que AXA selvagem atuando em PNPG4 e PNPG5. A energia de ligação aparente para os subsítios de HSA foi calculada (Kandra et al., 2003). Os subsítios +2 e +3 apresentaram o maior e o menor decréscimo na energia (-12 KJ/mol e -1,5 KJ/mol respectivamente), já o subsítio -2 apresentou uma energia de ligação de -8,8 KJ/mol. Os dados mostrados para HSA, tanto das frequências de distribuição dos produtos quanto o cálculo das energias de ligação, reforçam a análise feita aqui neste trabalho de que as interações de glicoses com

os subsítios +2 e -2 são respectivamente favorecidas em relação aos subsítios -3 e +3 de AXA

4 – Efeito das mutações na atividade enzimática, parâmetros cinéticos e padrão de clivagem de AXA.

Os aminoácidos candidatos a formarem subsítios de interação com substratos foram mutados para alanina. A escolha por alanina baseou-se principalmente pelas seguintes razões: a cadeia lateral alifática da alanina (o grupo metil –CH₃) não contém grupo polar ou grupo químico funcional, o que a torna pouco reativa, permitindo verificar o efeito de interações inerentes a determinados grupos funcionais, como por exemplo, ligações de hidrogênio por grupos hidroxilas, aminas ou sulfidrilas. Pelo fato de ser um substituinte pouco volumoso, não causa interferências estéricas significativas, e, comparando com a glicina, cuja ausência da cadeia lateral lhe confere uma grande flexibilidade conformacional (Voet e Voet, 1995), minimiza o efeito de possíveis alterações estruturais que poderiam acontecer se o substituinte utilizado fosse a glicina.

As mutações dos ácidos D196, E223 e D295 aboliram completamente a atividade da enzima sobre amido, indicando que são essenciais para a atividade enzimática. Mutações que levaram à substituição dos resíduos correspondentes confirmaram a importância desses grupos pela completa perda da atividade catalítica das amilases de *Bacillus subtilis* (Takase, 1992; Takase et al., 1992), *Bacillus stearothermophilus* (Holm et al., 1990; Takata et al., 1994; Vihinen et al., 1990), *Pseudomonas stutzeri* (Hasegawa et al., 1999), *Aspergillus oryzae* (Nagashima et al., 1992), cevada (Sogaard et al., 1993), pâncreas humano (Rydberg et al., 2002) como também de neopululanase (Kuriki et al., 1991), ciclodextrinase (Podkovyrov et al., 1993) e CGTase (Klein et al., 1992; Nakamura et al., 1992).

Os resíduos D196, E223 e D295 estão localizados no modelo estrutural de AXA, respectivamente, na quarta, quinta e sétima alças da estrutura (β/α)₈. Estes correspondem à tríade D197, E233 e D300 em PPA e na amilase pancreática humana. Estudos estruturais e cinéticos com amilase pancreática humana (Brayer et al., 2000; Rydberg et al., 2002) sugerem fortemente que D197 é o nucleófilo, E233 funciona como ácido/base e

que D300 desempenha uma importante função na interação da enzima com a molécula nucleofílica da água durante a hidrólise da ligação glicosídica, além de garantir a apropriada ligação de substratos e inibidores ao sítio catalítico. Foi sugerido também que este aspartato eleva o pK_a do ácido glutâmico, mantendo-o protonado para exercer a função de doador de prótons em pH próximo à neutralidade (Knegtel et al., 1995; Strokopytov et al., 1995). Portanto, os dados estruturais associados aos dados cinéticos apresentados neste trabalho são fortes evidências de que D196, E223 e D295 correspondem à tríade catalítica de AXA.

As histidinas 88, 200 e 294 no modelo estrutural de AXA localizam-se, respectivamente, na terceira, quarta e sétima alças que conectam os C-terminais das fitas betas aos respectivos N-terminais das hélices (ver resultados, figura 27).

As atividades dos mutantes tanto sobre amido quanto sobre p-nitrofenil malto-oligossacarídeos reforçam a importância do anel imidazólico na catálise e na ligação. A mutação da histidina 200 no subsítio +1 provavelmente reduziu a afinidade deste subsítio, afetando drasticamente o modo de ligação no qual o primeiro anel de glicose ocupa o subsítio +1 (liberação de PNPG1 a partir de PNPG5 e PNPG4). As mutações nos subsítios -1 (H88A e H294A) não foram tão drásticas a ponto da formação de PNPG1 não ser detectada a partir de PNPG5 e PNPG4, entretanto, as interações neste subsítio foram enfraquecidas a ponto de inverter o padrão de clivagem da enzima selvagem, favorecendo a produção de PNPG3 em relação à PNPG1. Então, pode-se dizer que as mutações nos subsítios +1 e -1 favoreceram mais as interações com os subsítios +2 e +3 da extremidade redutora.

A função destes resíduos na amilase pancreática humana (HPA) foi investigada (Ishikawa et al., 1992). Os resíduos H101, H201 e H299 foram mutados para asparagina e os pesquisadores concluíram que as três histidinas são importantes para a atividade catalítica, sendo que o resíduo H101 está mais diretamente envolvido na catálise (atividade reduzida em 99%, 74% e 97%, respectivamente). Interessante que o correspondente topológico de H101 em AXA é H88, cuja mutação, entre as três histidinas, acarretou em efeito mais drástico para atividade da enzima. Isso é um indício de que H101 (HPA) e H88 (AXA) podem estar envolvidas na mesma função.

As histidinas na CGTase de *Bacillus sp* 1011 (His140, His233 e His327) foram também mutadas para provar suas funções na catálise (Nakamura et al., 1993). Os valores do K_m sobre amido não foram muito alterados em relação aos valores da enzima selvagem (redução de 25%, 2,5% e 5%, respectivamente), sugerindo que a participação das histidinas na ligação inicial com o substrato seria pouca, mas os valores de k_{cat} reduziram-se para 9,8%, 11% e 21%, respectivamente. Da mesma forma, os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m calculados para H200A e H294A mostram que a redução na eficiência catalítica k_{cat}/K_m da enzima mutante está mais relacionada com o processo de catálise do que com a afinidade pelo substrato, contribuindo para a hipótese de que estes resíduos conservados desempenhem funções semelhantes.

Nakamura e colaboradores, no mesmo trabalho com a CGTase em 1993, também calcularam a diferença na energia livre de ativação [$\Delta(\Delta G)$] dos mutantes, a qual reflete mudanças na força de ligação da enzima no estado de transição, e verificaram um aumento nos valores de $\Delta(\Delta G)$. Além disso, foi observada nos mutantes uma baixa afinidade pela acarbose, cujo anel do ciclitol é similar ao estado de transição (íon oxocarbânion) na catálise das glicosidades. Destas observações os autores concluíram que as histidinas na CGTase desempenham função na estabilização do estado de transição. Estudos cinéticos e estruturais com a amilase de cevada também indicaram fortemente que as histidinas 93 e 290 (AXA 88 e AXA 294, respectivamente) participam na estabilização do estado de transição, mas não diretamente na catálise (Sogaard et al., 1993; Kadziola et al., 1998).

Os estudos estruturais em PPA (que é muito similar a HPA), complexada com o inibidor acarbose (Qian et al., 1994), mostraram as possíveis explicações para os resultados obtidos por Ishikawa e colaboradores (Ishikawa et al., 1992). A histidina 101 em PPA (HPA101, AXA H88) faz ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do C-6 do anel ciclitol, no subsítio -1, através do seu átomo de nitrogênio NE2, e esta ligação pode ser particularmente importante na estabilização do estado intermediário do anel de glicose no subsítio catalítico. O outro nitrogênio desta histidina, ND1, faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral da asparagina 100 (AXA N87), que por sua vez está ligada ao íon cálcio. A histidina 201 (AXA H200, HPA201) está envolvida na interação com o inibidor no subsítio +1, onde faz ligação de hidrogênio por meio do seu

átomo de nitrogênio NE2 com o grupo hidroxila do C-2 do amino açúcar. A histidina 299 (AXA294 HPA 299), no complexo com acarbose, interage no subsítio -1 com os grupos hidroxilas dos carbonos C-2 e C-3 do anel ciclitol, e por estar muito próxima ao resíduo catalítico Asp300, quando o inibidor está ligado, pode estar envolvida indiretamente na função do grupo catalítico carboxila.

Os átomos das histidinas de PPA envolvidos nas ligações de hidrogênio se sobrepõem perfeitamente com os respectivos correspondentes em AXA (resultados, figura 25), sugerindo que os átomos das histidinas em AXA possam interagir com o substrato análogo também por meio de ligações de hidrogênio.

Dos resultados obtidos neste presente trabalho sugere-se que, ou as histidinas 200 e 294 em AXA participem indiretamente na ligação com o substrato, baseando nos valores de K_m próximos ao selvagem (Mikkelsen et al., 2001), ou, mais provável, considerando os dados cinéticos, as comparações estruturais com o modelo de PPA e os estudos estruturais e de mutagêneses com outras amilases (Kadziola et al., 1998; Nakamura et al., 1993; Sogaard et al., 1993), que as histidinas em AXA também estejam envolvidas na estabilização do estado de transição.

Em AXA, a fenilalanina 136 encontra-se na terceira alça que conecta a terceira fita beta com a terceira hélice (resultados, figura 27). Seu correspondente topológico em PPA é a tirosina 151 no subsítio +2, que no complexo com acarbose, seu anel aromático paralelo à superfície do inibidor, claramente exerce interações hidrofóbicas com a superfície do inibidor, abaixo da ligação glicosídica α - (1,4), a qual é conhecida por exibir propriedades hidrofóbicas (Johnson et al., 1988; citado por Qian et al., 1994). Além da tirosina 151 os anéis aromáticos de W58, W59 e Y62 (W44, W45 e Y48 em AXA) também interagem do mesmo modo com o inibidor.

Pelo fato da fenilalanina 136 apresentar cadeia lateral com características hidrofóbicas, e pela orientação do anel aromático, paralelo à fenda catalítica, é muito provável que este resíduo exerça interações semelhantes. A importância de interações hidrofóbicas (“stacking”) na ligação do substrato foi evidenciada pela redução da energia aparente de ligação de -12 kJ/mol para -2 kJ/mol, apresentada pelo mutante Y151M no subsítio +2 (AXA F136) da amilase salivar humana (Kandra et al., 2003).

A mutação F136A foi a que mais afetou o modo de ligação preferencial da enzima (liberação de PNPG2), indicando a importância deste resíduo e do subsítio +2 na formação deste produto. Além disso, o mutante F136A foi o único que possibilitou a enzima clivar ligações mais externas nos substratos PNPG5 e PNPG7, sugerindo que subsítios adicionais na extremidade redutora podem estar ocupados em modos produtivos de ligação. No entanto, este padrão modificado foi à custa de drástica redução na atividade hidrolítica nestes substratos (respectivamente, 0,01 e 0,08% em relação à enzima selvagem). O mesmo foi observado sobre o substrato amido. Resultado semelhante também foi encontrado para o mutante F286A da amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 (Ohtaki et al., 2001). Esta fenilalanina interage com anéis de glicose nos subsítios -1 e +1. Análises cinéticas do mutante mostraram uma redução no valor k_{cat}/K_m , no substrato amido, de 97% em relação à enzima selvagem. Estudos estruturais indicaram que F238 da CGTase de *Bacillus* sp parcialmente regula a conformação do sítio catalítico (Kanai et al., 2004), o que justificaria a redução da atividade do mutante em 40% (Nakamura et al., 1994).

Baseado nestes relatos, sugere-se que a mutação da fenilalanina 136 afetou drasticamente a atividade da enzima, devido à ausência de interações hidrofóbicas estabilizadoras, como também uma possível alteração conformacional no sítio de ligação, impossibilitando uma ligação efetiva do substrato.

A cisteína 157 de AXA localiza-se no domínio B e seu correspondente topológico em PPA é a valina no subsítio -3. A mutação da cisteína para alanina reduziu em 72% o valor de k_{cat}/K_m sobre amido e praticamente aboliu a atividade de hidrólise sobre PNPG7, PNPG5 e PNPG4. Estes dados indicam a importância deste resíduo para a catálise, provavelmente em função da ausência de uma ligação de hidrogênio entre o grupo tiol da cisteína e o substrato. É bom lembrar, que pelo modelo estrutural de AXA, não há possibilidade de este resíduo formar ligações dissulfídicas. Sugere-se que a ausência desta ligação possa ter alterado a estrutura do sítio ativo, levando a uma menor afinidade da enzima pelo substrato (o K_m em amido aumentou de 2 vezes comparando com a enzima selvagem) e reduzindo a atividade da enzima. Hipótese semelhante foi sugerida para o mutante C323S da β -amilase de *Bacillus polymyxa*, cujo valor k_{cat}/K_m reduziu de 80% em relação à enzima selvagem (Uozumi et al., 1991).

A hipótese de alteração conformacional do sítio de ligação, afetando a catálise, é reforçada pelo comportamento do mutante C157A na liberação de PNPG1 e PNPG2 a partir do substrato PNPG4. No modo de ligação para liberar estes produtos, o subsítio -3 não está ocupado pelo substrato, entretanto, a mutação reduz drasticamente as taxas de liberação destes produtos (0,011 nmol/[E]/min. e 0,028 nmol/[E]/min., respectivamente, para a enzima selvagem e $6,5 \times 10^{-5}$ nmol/[E]/min e 3×10^{-4} nmol/[E]/min, respectivamente, para o mutante), sugerindo, portanto, uma alteração conformacional que afetou as interações dos anéis de glicose do substrato com os outros subsítios.

Os resíduos localizados no subsítio +3, G227 e T230, ambos encontram-se na quinta alça que conecta a quinta fita beta à hélice correspondente, na estrutura $(\beta/\alpha)_8$ do modelo de AXA.

O correspondente topológico da glicina 227 na estrutura de PPA é a leucina 237. A interação da leucina com o substrato foi observada no complexo de PPA com o inibidor V-1532, um pseudo-octasacarídeo, que ao contrário da acarbose (que é processada por PPA a um pseudo-pentassacarídeo), não é processado para exercer sua atividade inibitória. A cadeia lateral da leucina 237 exerce interações hidrofóbicas com o anel glicosídico de V-1532 no subsítio +3 (Machius et al., 1996).

A glicina é o mais simples dos aminoácidos, mas já foram observadas interações entre este resíduo e substratos análogos. A glicina 234 da amilase de *A. oryzae* interage com o átomo O-2 do anel de glicose, no subsítio +3, via ligação de hidrogênio com o NH da cadeia peptídica (Brzozowski and Davies, 1997). Interessante, que G234 correspondente topologicamente à G227, quando a estrutura da amilase de *A. oryzae* (PDB 6TAA) é sobreposta com o modelo de AXA. Já foi verificada também interação hidrofóbica entre a glicina 306 e a acarbose no complexo com a amilase salivar humana (Ramasubbu et al., 2003).

O mutante G227A, atuando sobre o amido, apresentou valor de k_{cat}/K_m comparável ao da enzima selvagem, apesar de um pouco inferior. Entretanto, o efeito da mutação na atividade hidrolítica foi observado com mais evidência no substrato PNPG4, indicando que este resíduo é importante para a hidrólise de substratos menores. Observa-se neste substrato que a mutação reduziu a frequência de clivagem para liberar PNPG1

(19% para a enzima selvagem e 10% para G227A) e favoreceu interações nas quais os anéis de glicose não ocupam o subsítio mutado (liberação de PNPG2 e PNPG3).

A treonina 230 corresponde ao ácido glutâmico 240 em PPA, o qual interage com acarbose por uma ligação de hidrogênio entre o átomo OE1 e o átomo de oxigênio do carbono 2 do anel de glicose, no subsítio +2 (Qian et al., 1994). Foi observado que este mesmo átomo interage através de ligação de hidrogênio no subsítio +3 com o anel de glicose do inibidor V-1532 (Machius et al., 1996). O grupo hidroxila da treonina confere a este aminoácido certo caráter polar, podendo participar nas ligações de hidrogênio tanto como receptor quanto doador de hidrogênio (Creighton, 1984). Pelo modelo de AXA, o oxigênio da hidroxila da treonina está aparentemente mais direcionado para o subsítio +3.

O comportamento deste mutante frente ao substrato amido foi semelhante ao do mutante G227A, no entanto, a interação com a treonina 230 parece ser mais importante na estabilização de complexos com substratos menores, como por exemplo, PNPG7 e PNPG5, uma vez que neste último substrato, o mutante T230A reduziu a atividade em 24% e o mutante G227A em 5%, em relação à atividade da enzima selvagem. Em outras palavras pode-se sugerir que a energia liberada da interação com a treonina será provavelmente maior nestes substratos.

O último candidato a subsítio de interação analisado foi a asparagina 299, localizada na sétima alça da estrutura $(\beta/\alpha)_8$. A região em PPA que corresponde a este resíduo é uma alça inexistente em AXA, na qual faz parte o resíduo de histidina 305. No complexo PPA-acarbose, esta alça se movimenta direcionando o resíduo de histidina para uma ligação de hidrogênio entre o átomo ND1 e o oxigênio 2 da glicose no subsítio -2. Pelo modelo de AXA observa-se que N299 está mais localizada entre os subsítios -1 e +1, próximo ao resíduo catalítico D295 (o átomo do hidrogênio2 do grupo amida de N299 está a 3,63 Å do oxigênio da carboxila de D295).

A cadeia lateral da asparagina é relativamente polar, sendo capaz de doar e aceitar átomos de hidrogênio em ligações de hidrogênio. A redução da atividade do mutante N299A em mais de 90%, tanto sobre amido quanto sobre p-nitrofenil-malto-oligossacarídeos, evidencia que a cadeia lateral da asparagina é fundamental para a catálise. Resíduos de asparagina próximos ao sítio catalítico são observados em outras amilases. Na estrutura de PPA complexada com a acarbose, N298 liga-se ao íon cloreto e

à molécula de água 555, que por sua vez faz ligação de hidrogênio com os resíduos catalíticos E233 e D300. Na amilase de cevada complexada com a acarbose (Kadziola et al., 1998), a asparagina 287 (PPA N298) faz ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico D289 (PPA D300), e na estrutura da amilase de *Bacillus subtilis* complexada com uma maltopentaose, a asparagina 273 (PPA H305, AXA N299), faz ligação diretamente com o anel de glicose do substrato no subsítio -2 (Fujimoto et al., 1998). Baseando-se nestes relatos, sugere-se que o efeito da mutação N299A, sobre a atividade da enzima, possa ser atribuído ou por uma mudança conformacional do sítio ativo, causada pela ausência de uma ligação de hidrogênio entre o substrato e o grupo amida de N299, ou pela mutação afetar resíduos catalíticos próximos, como por exemplo, D295.

Os mutantes analisados neste trabalho afetaram em maior ou menor grau a atividade enzimática e o padrão de clivagem da enzima. Isto indica que o sítio ativo de AXA é formado por no mínimo seis subsítios (-3, -2, -1, +1, +2, +3). Essa mesma arquitetura foi encontrada, por exemplo, nas amilases de *Aspergillus oryzae* (Brzozowski and Davies, 1997) e de *Bacillus stearothermophilus* (Dauter et al., 1999), já para a amilase de *Alteromonas haloplanctis* complexada com acarbose (Aghajari et al., 2002) foram verificados sete subsítios (-4 à +3).

Diferenças na arquitetura dos subsítios geralmente refletem em variações do padrão de clivagem. A α -amilase de cevada apresenta 10 subsítios (-6 a +4), o que é consistente com sua capacidade em liberar produtos com graus de polimerização entre 6 e 8 a partir de amido (MacGregor et al., 1994). A partir de PNPG7, por exemplo, esta enzima libera preferencialmente G6 (96%) seguido de G7 (Bak-Jensen et al., 2004; Mori et al., 2002). AXA, por sua vez, libera preferencialmente G5 de PNPG7, o mesmo padrão observado para PPA, a partir de G7 marcado radioativamente (Robyt e French, 1970).

5 – Atividade de transglicosilação

É conhecida a capacidade das α -amilases transglicosilarem (Aghajari et al., 2002; Brzozowski e Davies, 1997; Robyt e French, 1970).

A atividade de transglicosilação de AXA recombinante selvagem e mutante, no complexo com PNPG7, formou somente PNPG8 (dados não mostrados). Baseando-se no

mecanismo de ação proposto para as α -amilases (Davies e Henrissat, 1995; McCarter e Withers, 1994; Sinnott, 1990) e no modo de ligação apresentado pela enzima selvagem, sugere-se que PNPG8 seja formado da ligação da extremidade não redutora de PNPG3, liberada do intermediário covalente enzima-G4, com a extremidade redutora do intermediário covalente enzima-G5, após a liberação do produto de hidrólise PNPG2.

Para o substrato PNPG5 foram observados como produtos de transglicosilação PNPG6 e PNPG7. PNPG6 pode ser formado por duas vias; uma via seria a ligação da extremidade não redutora de PNPG2, liberado do intermediário covalente enzima-G3, com a extremidade redutora do intermediário covalente enzima-G4, após a liberação de PNPG1. A segunda via seria a ligação da extremidade não redutora de PNPG3, liberado do intermediário enzima-G2, com a extremidade redutora do intermediário enzima-G3, após a liberação de PNPG2. PNPG7 seria formado da ligação da extremidade não redutora do substrato intacto, com a extremidade redutora do intermediário enzima-G2.

Verifica-se através da razão atividade de hidrólise/atividade de transglicosilação que, se a atividade de transglicosilação não foi predominante em relação à atividade de hidrólise, essa razão foi menor para alguns mutantes comparando com a enzima selvagem, entretanto, esta tendência não foi observada para todos os substratos, o que torna os dados pouco conclusivos. Como a atividade de transglicosilação é caracterizada como uma reação secundária (Kandra et al., 2003), as condições adotadas nos experimentos de análise do padrão de clivagem, como, por exemplo, baixa concentração de substrato e consumo de substrato inferior a 10%, contribuíram para baixas taxas de transglicosilação, tornando mais difícil a investigação do efeito das mutações sobre esta atividade. Talvez o mutante N299A mereça atenção para estudos posteriores, pois tanto em PNPG5 como em PNPG7, a razão atividade de hidrólise/atividade de transglicosilação foi menor comparando com a enzima selvagem.

Pouco se sabe dos fatores estruturais que são responsáveis pela atividade de transglicosilação apresentada pelas amilases. Kuriki e colaboradores (Kuriki et al., 1996) aumentaram a atividade de transglicosilação de uma neopululanase aumentando a hidrofobicidade na região do sítio ativo, baseando na hipótese de que isso excluiria moléculas de água e conseqüentemente aumentaria a atividade de transglicosilação. Hipótese semelhante foi mencionada para mutantes da α -amilase de *Bacillus*

stearothermophilus (Cha et al., 1998). Além da hidrofobicidade, efeitos eletrostáticos podem estar envolvidos na determinação da razão transglicosilação/hidrólise, modificando a geometria das cadeias laterais no sítio ativo (Saab-Rincon et al., 1999). Baseando-se nestas hipóteses, o aumento relativo na capacidade de transglicosilação apresentado pelo mutante N229A, poderia ser explicado pelo decréscimo da polaridade nesta região, favorecendo a entrada de grupos glicosil em relação à água. Para se fazer uma análise em termos eletrostáticos, a verificação de uma possível alteração do perfil pH-atividade da enzima mutante seria mais indicado.

VI - CONCLUSÕES

A proposta deste trabalho foi o mapeamento dos subsítios da α -amilase de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (AXA) envolvidos na interação com substratos, através de comparações estruturais, mutagêneses sítio-dirigidas, análises de parâmetros cinéticos sobre amido e do padrão de clivagem sobre p-nitrofenil malto-oligossacarídeos (PNPG4, PNPG5 e PNPG7). A partir do modelo estrutural de AXA e comparando as propriedades das amilases mutantes e selvagem foi possível determinar resíduos importantes na ligação com o substrato e para a atividade catalítica.

Foi verificado que AXA cliva preferencialmente a terceira ligação glicosídica de PNPG7, PNPG5 e PNPG4. Como produtos de hidrólise a enzima libera maltopentaose, maltotetraose, maltotriose, maltose e glicose.

Todos os mutantes analisados afetaram em maior ou menor grau a atividade catalítica da enzima sobre amido e p-nitrofenil malto-oligossacarídeos, indicando que o sítio ativo de α -amilase de AXA é formado por no mínimo seis subsítios de interação com o substrato, três na extremidade não redutora e três na extremidade redutora.

As interações dos anéis de glicose com os subsítios +2 e -2 são favorecidas em relação aos subsítios -3 e +3, respectivamente. A interação do anel de glicose no subsítio -3 é favorecida em relação à interação no subsítio +3. A mutação no subsítio +2 foi a que mais afetou o modo de ligação preferencial da enzima. Mutações nos subsítios +1 e -1 alteraram frequências de clivagem em modos de ligação secundários (liberação de PNPG1 e PNPG3).

Os resultados cinéticos e comparações estruturais do modelo de AXA com outras estruturas de amilases complexadas com inibidores são fortes evidências que os aminoácidos D196, E223 e D295 correspondem à tríade conservada na família das amilases, envolvidas diretamente na catálise.

As três histidinas de AXA (H88, H200 e H294) são importantes para a atividade da enzima, sendo que H88 parece estar mais diretamente envolvida na catálise. Provavelmente H200 e H294 estejam envolvidas na estabilização do estado de transição, em função que estes resíduos foram mais importantes para a catálise do que na ligação inicial do substrato.

Dos cinco aminoácidos não conservados (AXA F136, C157, G227, T230 e N299), T230 e G227 foram menos importantes para a atividade catalítica da enzima e na afinidade pelo substrato amido, entretanto, estes resíduos contribuíram para a estabilização de complexos com substratos menores, uma vez que pelos dados referentes ao substrato PNPG4 (tabela 9) a atividade de hidrólise reduziu para 36% em relação ao valor selvagem.

As propriedades hidrofóbicas do anel aromático de F136 foram fundamentais para a atividade catalítica da enzima. Provavelmente a ausência de interações hidrofóbicas (“stacking”) dificultou uma eficiente ligação do substrato no sítio ativo do mutante F136A.

A mutação de C157 reduziu a afinidade da enzima pelo substrato amido. A possibilidade de alteração conformacional do sítio de ligação, afetando a catálise, foi reforçada pela redução das taxas de hidrólise para liberar PNPG2 e PNPG3 a partir do substrato PNPG4, que não ocupa o subsítio mutado nestes modos de ligação.

A mutação de N299 também reduz drasticamente a atividade da enzima. Duas hipóteses são atribuídas. A ausência de uma ligação de hidrogênio com o substrato, a qual alteraria a conformação do sítio de catálise ou a ausência de interação (direta ou indireta) de N299 com o resíduo catalítico D295, afetando indiretamente a catálise.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

- Abarca D, Fernandez-Lobato M, del Pozo L, Jimenez A. 1991. Isolation of a new gene (SW A2) encoding an alpha-amylase from *Schwanniomyces occidentalis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 279(1):41-44.
- Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. 1998a. Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci* 7(3):564-572.
- Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. 1998b. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* 6(12):1503-1516.
- Aghajari N, Roth M, Haser R. 2002. Crystallographic evidence of a transglycosylation reaction: ternary complexes of a psychrophilic alpha-amylase. *Biochemistry* 41(13):4273-4280.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-3402.
- Bak-Jensen KS, Andre G, Gottschalk TE, Paes G, Tran V, Svensson B. 2004. Tyrosine 105 and threonine 212 at outermost substrate binding subsites -6 and +4 control substrate specificity, oligosaccharide cleavage patterns, and multiple binding modes of barley alpha-amylase 1. *J Biol Chem* 279(11):10093-10102.
- Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255(5510):609-614.
- Bertoldo C, Antranikian G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 6(2):151-160.
- Boel E, Brady L, Brzozowski AM, Derewenda Z, Dodson GG, Jensen VJ, Petersen SB, Swift H, Thim L, Woldike HF. 1990. Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* 29(26):6244-6249.
- Boer PH, Hickey DA. 1986. The alpha-amylase gene in *Drosophila melanogaster*: nucleotide sequence, gene structure and expression motifs. *Nucleic Acids Res* 14(21):8399-8411.

- Branden C, Tooze J. 1999. Introduction to Protein Structure. . editor. Second ed. New York: Garland Publishing, Inc. 410 p.
- Brayer GD, Luo Y, Withers SG. 1995. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci* 4(9):1730-1742.
- Brayer GD, Sidhu G, Maurus R, Rydberg EH, Braun C, Wang Y, Nguyen NT, Overall CM, Withers SG. 2000. Subsite mapping of the human pancreatic alpha-amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry* 39(16):4778-4791.
- Bretthauer RK, Castellino FJ. 1999. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 3):193-200.
- Brzozowski AM, Davies GJ. 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36(36):10837-10845.
- Brzozowski AM, Lawson DM, Turkenburg JP, Bisgaard-Frantzen H, Svendsen A, Borchert TV, Dauter Z, Wilson KS, Davies GJ. 2000. Structural analysis of a chimeric bacterial alpha-amylase. High-resolution analysis of native and ligand complexes. *Biochemistry* 39(31):9099-9107.
- Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24(1):45-66.
- Cha HJ, Yoon HG, Kim YW, Lee HS, Kim JW, Kweon KS, Oh BH, Park KH. 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose. *Eur J Biochem* 253(1):251-262.
- Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N Y)* 9(5):455-460.
- Creighton TE. 1984. *Proteins: Structures and Molecular Principles*. New York: W.H. Freeman. 515 p.
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira

- MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417(6887):459-463.
- Dauter Z, Dauter M, Brzozowski AM, Christensen S, Borchert TV, Beier L, Wilson KS, Davies GJ. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochemistry* 38(26):8385-8392.
- Davies G, Henrissat B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9):853-859.
- Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J* 321 (Pt 2):557-559.
- Declerck N, Joyet P, Gaillardin C, Masson JM. 1990. Use of amber suppressors to investigate the thermostability of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. Amino acid replacements at 6 histidine residues reveal a critical position at His-133. *J Biol Chem* 265(26):15481-15488.
- Feller G, Le Bussy O, Gerday C. 1998. Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts: assessment of the folding state of a recombinant alpha-amylase. *Appl Environ Microbiol* 64(3):1163-1165.
- Feller G, Lonhienne T, Deroanne C, Libioulle C, Van Beeumen J, Gerday C. 1992. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile alpha-amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. *J Biol Chem* 267(8):5217-5221.
- Feller G, Payan F, Theys F, Qian M, Haser R, Gerday C. 1994. Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur J Biochem* 222(2):441-447.
- Fujimoto Z, Takase K, Doui N, Momma M, Matsumoto T, Mizuno H. 1998. Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J Mol Biol* 277(2):393-407.
- Guermeur Y, Geourjon C, Gallinari P, Deleage G. 1999. Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics* 15(5):413-421.
- Guzman-Maldonado H, Paredes-Lopez O. 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35(5):373-403.

- Hasegawa K, Kubota M, Matsuura Y. 1999. Roles of catalytic residues in alpha-amylases as evidenced by the structures of the product-complexed mutants of a maltotetraose-forming amylase. *Protein Eng* 12(10):819-824.
- Heimo H, Palmu K, Suominen I. 1997. Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. *Protein Expr Purif* 10(1):70-79.
- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2):309-316.
- Holm L, Koivula AK, Lehtovaara PM, Hemminki A, Knowles JK. 1990. Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Eng* 3(3):181-191.
- Hu NT, Hung MN, Huang AM, Tsai HF, Yang BY, Chow TY, Tseng YH. 1992. Molecular cloning, characterization and nucleotide sequence of the gene for secreted alpha-amylase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Gen Microbiol* 138 (Pt 8):1647-1655.
- Ibuka A, Tonozuka T, Matsuzawa H, Sakai H. 1998. Conversion of neopullulanase-alpha-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 into an amylopullulanase-type enzyme. *J Biochem (Tokyo)* 123(2):275-282.
- Igarashi K, Hatada Y, Ikawa K, Araki H, Ozawa T, Kobayashi T, Ozaki K, Ito S. 1998. Improved thermostability of a *Bacillus* alpha-amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem Biophys Res Commun* 248(2):372-377.
- Ikawa K, Araki H, Tsujino Y, Hayashi Y, Igarashi K, Hatada Y, Hagihara H, Ozawa T, Ozaki K, Kobayashi T, Ito S. 1998. Hyperexpression of the gene for a *Bacillus* alpha-amylase in *Bacillus subtilis* cells: enzymatic properties and crystallization of the recombinant enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(9):1720-1725.
- Ishikawa K, Matsui I, Honda K, Nakatani H. 1992. Multi-functional roles of a histidine residue in human pancreatic alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 183(1):286-291.
- Janecek S. 1992. New conserved amino acid region of alpha-amylases in the third loop of their (beta/alpha)₈-barrel domains. *Biochem J* 288 (Pt 3):1069-1070.
- Janecek S, Svensson B, Henrissat B. 1997. Domain evolution in the alpha-amylase family. *J Mol Evol* 45(3):322-331.
- Jespersen HM, MacGregor EA, Henrissat B, Sierks MR, Svensson B. 1993. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of

- the catalytic (beta/alpha)₈-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J Protein Chem* 12(6):791-805.
- Juge N, Andersen JS, Tull D, Roepstorff P, Svensson B. 1996. Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley alpha-amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 8(2):204-214.
- Juge N, Sogaard M, Chaix JC, Martin-Eauclaire MF, Svensson B, Marchis-Mouren G, Guo XJ. 1993. Comparison of barley malt alpha-amylase isozymes 1 and 2: construction of cDNA hybrids by in vivo recombination and their expression in yeast. *Gene* 130(2):159-166.
- Kabsch W, Sander C. 1985. Identical pentapeptides with different backbones. *Nature* 317(6034):207.
- Kadziola A, Abe J, Svensson B, Haser R. 1994. Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. *J Mol Biol* 239(1):104-121.
- Kadziola A, Sogaard M, Svensson B, Haser R. 1998. Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J Mol Biol* 278(1):205-217.
- Kanai R, Haga K, Akiba T, Yamane K, Harata K. 2004. Role of Phe283 in enzymatic reaction of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus* sp.1011: Substrate binding and arrangement of the catalytic site. *Protein Sci* 13(2):457-465.
- Kandra L, Gyemant G, Remenyik J, Hovanszki G, Liptak A. 2002. Action pattern and subsite mapping of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates. *FEBS Lett* 518(1-3):79-82.
- Kandra L, Gyemant G, Remenyik J, Ragunath C, Ramasubbu N. 2003. Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M. *FEBS Lett* 544(1-3):194-198.
- Kato S, Ishibashi M, Tatsuda D, Tokunaga H, Tokunaga M. 2001. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary alpha-amylase secreted from methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* 18(7):643-655.
- Klein C, Hollender J, Bender H, Schulz GE. 1992. Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31(37):8740-8746.
- Knegtel RM, Strokopytov B, Penninga D, Faber OG, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 1995. Crystallographic studies of the interaction of

- cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J Biol Chem* 270(49):29256-29264.
- Kuriki T, Kaneko H, Yanase M, Takata H, Shimada J, Handa S, Takada T, Umeyama H, Okada S. 1996. Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J Biol Chem* 271(29):17321-17329.
- Kuriki T, Takata H, Okada S, Imanaka T. 1991. Analysis of the active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J Bacteriol* 173(19):6147-6152.
- Larson SB, Greenwood A, Cascio D, Day J, McPherson A. 1994. Refined molecular structure of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 235(5):1560-1584.
- Laskowski RA, Moss DS, Thornton JM. 1993. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol* 231(4):1049-1067.
- Levitzki A, Steer ML. 1974. The allosteric activation of mammalian alpha-amylase by chloride. *Eur J Biochem* 41(1):171-180.
- Linder S, Schliwa M, Kube-Grandenath E. 1996. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques* 20(6):980-982.
- Lin LL, Lo HF, Chiang WY, Hu HY, Hsu WH, Chang CT. 2003. Replacement of methionine 208 in a truncated *Bacillus* sp. TS-23 alpha-amylase with oxidation-resistant leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide. *Curr Microbiol* 46(3):211-216.
- McCarter JD, Withers SG. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4(6):885-892.
- MacDonald RJ, Crerar MM, Swain WF, Pictet RL, Thomas G, Rutter WJ. 1980. Structure of a family of rat amylase genes. *Nature* 287(5778):117-122.
- MacGregor EA. 1988. Alpha-amylase structure and activity. *J Protein Chem* 7(4):399-415.
- MacGregor EA, MacGregor AW, Macri LJ, Morgan JE. 1994. Models for the action of barley alpha-amylase isozymes on linear substrates. *Carbohydr Res* 257(2):249-268.
- Machius M, Declerck N, Huber R, Wiegand G. 1998. Activation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through a disorder-->order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure* 6(3):281-292.

- Machius M, Vertesy L, Huber R, Wiegand G. 1996. Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J Mol Biol* 260(3):409-421.
- Machius M, Wiegand G, Huber R. 1995. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* 246(4):545-559.
- Mandel M, Higa A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53(1):159-162.
- Marshall RD. 1972. Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 41:673-702.
- Mikkelsen R, Binderup K, Preiss J. 2001. Tyrosine residue 300 is important for activity and stability of branching enzyme from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 385(2):372-377.
- Mori H, Bak-Jensen KS, Svensson B. 2002. Barley alpha-amylase Met53 situated at the high-affinity subsite -2 belongs to a substrate binding motif in the beta-->alpha loop 2 of the catalytic (beta/alpha)₈-barrel and is critical for activity and substrate specificity. *Eur J Biochem* 269(22):5377-5390.
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG. 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122(4):989-997.
- Nagashima T, Tada S, Kitamoto K, Gomi K, Kumagai C, Toda H. 1992. Site-directed mutagenesis of catalytic active-site residues of Taka-amylase A. *Biosci Biotechnol Biochem* 56(2):207-210.
- Nakajima R, Imanaka T, Aiba S. 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Applied and Microbiological Biotechnology* 23:355-360.
- Nakamura A, Haga K, Ogawa S, Kuwano K, Kimura K, Yamane K. 1992. Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and alpha-amylases. Site-directed mutagenesis of the conserved two Asp and one Glu residues. *FEBS Lett* 296(1):37-40.
- Nakamura A, Haga K, Yamane K. 1993. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry* 32(26):6624-6631.
- Nakamura A, Haga K, Yamane K. 1994. Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of

- replacements on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry* 33(33):9929-9936.
- Nelson DL, Cox MM. 2000. *Principles of Biochemistry*. Third ed. New York: Worth Publishers. 1152 p.
- Nelson N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153:375-380.
- Nielsen JE, Borchert TV. 2000. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta* 1543(2):253-274.
- Nielsen JE, Borchert TV, Vriend G. 2001. The determinants of alpha-amylase pH-activity profiles. *Protein Eng* 14(7):505-512.
- Nishide T, Nakamura Y, Emi M, Yamamoto T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. 1986. Primary structure of human salivary alpha-amylase gene. *Gene* 41(2-3):299-304.
- Noelting G, Bernfeld P. 1948. Sur les enzymes amylolytiques. III - La beta-amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d'alpha-amylase. *HelvChimActa* 31:286-290.
- Ohtaki A, Kondo S, Shimura Y, Tonozuka T, Sakano Y, Kamitori S. 2001. Role of Phe286 in the recognition mechanism of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) by *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 2 (TVaII). X-ray structures of the mutant TVaIIs, F286A and F286Y, and kinetic analyses of the Phe286-replaced mutant TVaIIs. *Carbohydr Res* 334(4):309-313.
- Pandey A, Nigam P, Socol CR, Socol VT, Singh D, Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 31 (Pt 2):135-152.
- Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM. 1994. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast* 10(11):1415-1419.
- Pasero L, Mazzei-Pierron Y, Abadie B, Chicheportiche Y, Marchis-Mouren G. 1986. Complete amino acid sequence and location of the five disulfide bridges in porcine pancreatic alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta* 869(2):147-157.
- Pless DD, Lennarz WJ. 1977. Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(1):134-138.
- Podkovyrov SM, Burdette D, Zeikus JG. 1993. Analysis of the catalytic center of cyclomaltodextrinase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *FEBS Lett* 317(3):259-262.

- Preiss J. 1984. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu Rev Microbiol* 38:419-458.
- Pretorius IS, Laing E, Pretorius GH, Marmur J. 1988. Expression of a *Bacillus* alpha-amylase gene in yeast. *Curr Genet* 14(1):1-8.
- Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E, Payan F. 1994. The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33(20):6284-6294.
- Ramachandran GN, Sasisekharan V. 1968. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* 23:283-438.
- Ramasubbu N. 1996. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 a resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52(Pt 3):435-446.
- Ramasubbu N, Raguath C, Mishra PJ. 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J Mol Biol* 325(5):1061-1076.
- Ramasubbu N, Raguath C, Mishra PJ, Thomas LM, Gyemant G, Kandra L. 2004. Human salivary alpha-amylase Trp58 situated at subsite -2 is critical for enzyme activity. *Eur J Biochem* 271(12):2517-2529.
- Richardson JS, Richardson DC, Tweedy NB, Gernert KM, Quinn TP, Hecht MH, Erickson BW, Yan Y, McClain RD, Donlan ME, et al. 1992. Looking at proteins: representations, folding, packing, and design. *Biophysical Society National Lecture*, 1992. *Biophys J* 63(5):1185-1209.
- Rivera MH, Lopez-Munguia A, Soberon X, Saab-Rincon G. 2003. Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Eng* 16(7):505-514.
- Robyt JF, French D. 1970. The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *J Biol Chem* 245(15):3917-3927.
- Rydberg EH, Li C, Maurus R, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. 2002. Mechanistic analyses of catalysis in human pancreatic alpha-amylase: detailed kinetic and structural studies of mutants of three conserved carboxylic acids. *Biochemistry* 41(13):4492-4502.
- Rydberg EH, Sidhu G, Vo HC, Hewitt J, Cote HC, Wang Y, Numao S, MacGillivray RT, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. 1999. Cloning, mutagenesis, and structural

- analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Sci* 8(3):635-643.
- Saab-Rincon G, del-Rio G, Santamaria RI, Lopez-Munguia A, Soberon X. 1999. Introducing transglycosylation activity in a liquefying alpha-amylase. *FEBS Lett* 453(1-2):100-106.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. second ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Sinnott ML. 1990. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev* 90:1171-1202.
- Sogaard M, Kadziola A, Haser R, Svensson B. 1993. Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley alpha-amylase 1. *J Biol Chem* 268(30):22480-22484.
- Smith AM. 1999. Making starch. *Curr Opin Plant Biol* 2(3):223-229.
- Strobl S, Maskos K, Betz M, Wiegand G, Huber R, Gomis-Ruth FX, Glockshuber R. 1998. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *J Mol Biol* 278(3):617-628.
- Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 1995. X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry* 34(7):2234-2240.
- Svensson B. 1994. Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol Biol* 25(2):141-157.
- Svensson B, Sogaard M. 1992. Protein engineering of amylases. *Biochem Soc Trans* 20(1):34-42.
- Suganuma T, Ohnishi M, Hiromi K, Nagahama T. 1996. Elucidation of the subsite structure of bacterial saccharifying alpha-amylase and its mode of degradation of maltose. *Carbohydr Res* 282(1):171-180.
- Swift HJ, Brady L, Derewenda ZS, Dodson EJ, Dodson GG, Turkenburg JP, Wilkinson AJ. 1991. Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) alpha-amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Crystallogr B* 47 (Pt 4):535-544.
- Takase K. 1992. Interaction of catalytic-site mutants of *Bacillus subtilis* alpha-amylase with substrates and acarbose. *Biochim Biophys Acta* 1122(3):278-282.

- Takase K, Matsumoto T, Mizuno H, Yamane K. 1992. Site-directed mutagenesis of active site residues in *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta* 1120(3):281-288.
- Takata H, Takaha T, Kuriki T, Okada S, Takagi M, Imanaka T. 1994. Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 60(9):3096-3104.
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28(1):1-8.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680.
- Uitdehaag JC, Mosi R, Kalk KH, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Withers SG, Dijkstra BW. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. *Nat Struct Biol* 6(5):432-436.
- Uozumi N, Matsuda T, Tsukagoshi N, Udaka S. 1991. Structural and functional roles of cysteine residues of *Bacillus polymyxa* beta-amylase. *Biochemistry* 30(18):4594-4599.
- van der Maarel MJ, van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol* 94(2):137-155.
- Veenhuis M, Van Dijken JP, Harder W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv Microb Physiol* 24:1-82.
- Vihinen M, Ollikka P, Niskanen J, Meyer P, Suominen I, Karp M, Holm L, Knowles J, Mantsala P. 1990. Site-directed mutagenesis of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J Biochem (Tokyo)* 107(2):267-272.
- Voet D, Voet JG. 1995. *Biochemistry*. second ed. New York: Jhn Wiley Sons, Inc. 1361p
- von Heijne G. 1985. Signal sequences: the limits of variantion. *Journal of Molecular Biology* 184:99-105.
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186(1):37-44.

Wolfenden R, Lu, X., Young, G.,. 1998. Spontaneous hydrolysis of glycosides. *J Am Chem Soc* 120:6814-6815.