UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAIRA ARTISCHEFF FRUTUOSO

**Estudo das bases moleculares de reações
de transglicosilação em b-glicosidases GH1
de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor***

São Paulo

Data de depósito na SPG:

09/11/2010

MAIRA ARTISCHEFF FRUTUOSO

**Estudo das bases moleculares de reações
de transglicosilação em b-glicosidases GH1
de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor***

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências –
Área: Bioquímica*

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

São Paulo

2010

MAIRA ARTISCHEFF FRUTUOSO

**Estudo das bases moleculares de reações de transglicosilação em
b-glicosidases GH1 de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências - Área: Bioquímica

Aprovado em ____/____/ 2011

Banca Examinadora

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Dedico...

...aos professores que sempre me
incentivaram a fazer ciência

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Marana, pela pronta orientação, conselhos, a atenção e apoio durante a realização deste trabalho. E que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Luci Deise Navarro pela contribuição na técnica de sequenciamento de DNA.

Ao técnico. José, pelo auxílio prestado na realização desse trabalho.

À Luiza Nakabayashi, M. Ivanilde Marcelino e Christiane Cardoso pelo apoio técnico no laboratório anexo do prof. Walter Terra.

Aos colegas de laboratório: Fabiane Chaves Cançado, Lúcio M. Ferreira de Mendonça, Fernanda Matias, Marcelo Padilha, Cecília M. Ikegami, Valquíria P. Souza, Roberto Rozemberg, Daniela Beton, pelas discussões, amizade e ajuda com dicas e protocolos na realização desse trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química pela manutenção da infraestrutura para a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Enzimologia, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório

Ao Instituto de Química, pela oportunidade de realização do curso de pós graduação (mestrado).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Resumo

Frutuoso, M. A. **Estudo das bases moleculares de reações de transglicosilação em β -glicosidases GH1 de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor*. 2010.** 108p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Glicosídeos essenciais a vida podem ser sintetizados por métodos enzimáticos com altíssima especificidade. O mecanismo de reação de β -glicosidases GH1 por dupla-substituição envolve a formação de intermediário covalente (glicosil-enzima) que pode seguir duas rotas. Uma envolve sua hidrólise na ligação β -glicosídica entre glicone e aglicone do substrato, liberando o monossacarídeo da extremidade não-redutora; enquanto na outra rota, transglicosilação ou síntese por controle cinético, o intermediário é atacado por um acceptor glicosídico (2^a molécula de substrato), gerando um novo glicosídeo. BglB possui resíduos (W e H) que formam um “canal” por onde a água ataca o intermediário covalente no sítio ativo, sendo alvos de potenciais mutações que alteram o balanço entre as rotas e ampliando a eficiência de transglicosilação. Para caracterizar as bases moleculares da razão entre essas duas rotas catalíticas, β -glicosidases da família GH1 *Spodoptera frugiperda* (Sf β glu; AF052729) e *Tenebrio molitor* (Tm β glu; AF312017) foram produzidas como enzimas recombinantes em leveduras *Pichia pastoris* GS115, concentradas com 90% (p/v) de sulfato de amônio e diálise reversa com PEG 10000, e dialisadas em tampão CP 100 mM pH 6. A pureza foi confirmada por banda única com tamanho semelhante a 50 kDa (Sf β gly) e 56 kDa (Tm β gly) em SDS-PAGE. A atividade recuperada após purificação é 152% (Sf β gly) e 171% (Tm β gly) e a concentração protéica de 0,134 μ g/ μ L (Sf β gly) e 0,217 μ g/ μ L (Tm β gly). A razão entre as reações de hidrólise e transglicosilação (v_H/v_T) foi analisada utilizando os substratos *p*NP β -gluco (0,1 mM a 8 mM) e MU β -gluco (0,1 mM a 40 mM), a partir da velocidade de formação dos produtos *p*NP ou MU e glicose, respectivamente. Tm β gly catalisa reações de transglicosilação com ambos, mas v_H/v_T depende da [S] variando de $+\infty$ ($v_H \gg v_T$) a 1,5 para

*p*NPβ-gluco e $\rightarrow\infty$ a 1 para MUβ-gluco. Sβgly, ao contrário, não transglicosila com substrato MUβ-gluco. Além disso, v_H/v_T para *p*NPβ-gluco é 2 e independe da [S]. Já Sβgly K201F conjuga propriedades de ambas, pois não transglicosila com MUβ-gluco, mas para *p*NPβ-gluco há ocorrência de transglicosilação dependente da [S], variando de $\rightarrow\infty$ ($v_H \gg v_T$) a 1,25. Os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) foram ajustados no Enzifitter e por simulação numérica na equação do modelo cinético ping-pong para dois substratos, e mostram maior (K_{m2}) em Tmβgly e Sβgly K201F do que em Sβgly. Também foi avaliado o efeito da adição de aceptores alternativos que substituem a água em ensaios com *p*NPβ-gluco 4mM na presença de alcoóis. Para as três enzimas a adição de metanol torna a v_{glc} menor do que de v_{pNP} , indicando ocorrência de transglicosilação. Com adição de *n*-propanol v_H/v_T diminui cerca de 7 vezes em Sβgly e 2 vezes em Tmβgly. Os efeitos destes alcoóis sobre Sβgly são maiores do que para Tmβgly e Sβgly K201F, sugerindo acesso mais fácil destes ao intermediário covalente em Sβgly, indicando diferenças entre as enzimas na configuração desta região. Portanto, notamos que v_H/v_T não está ligada à afinidade pela segunda molécula de substrato, podendo ser modulada por mutação do resíduo K201 de Sβgly, posição relacionada ao acesso da água ou acceptor alternativo ao sítio ativo.

Palavras chave: transglicosilação, beta-glicosidase e enzimas

Abstract

Frutuoso, M. A. Study of the molecular basis of transglycosylation reactions in β -glucosidase GH1 from *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. **2010**. 108p. Master dissertation – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Glycosides are essential to life and can be synthesized by enzymatic methods with high specificity. The reaction mechanism of GH1 β -glucosidases by double-substitution involves the formation of covalent intermediate (glycosyl-enzyme) which may follow two routes. One of them involves hydrolysis in β -glycosidic bond between aglycone glucone and the substrate, releasing a monosaccharide from the non-reducing end, whereas in the other route, transglycosylation or synthesis by kinetic control, the intermediate is attacked by a glucosyl acceptor (second substrate molecule), generating a new glucoside. BglB has two residues (W and H) that form a "channel" through which water attacks the covalent intermediate on the active site. Thus, the residues are potential targets for mutations that alter the balance between routes, increasing the efficiency of transglycosylation. To characterize the molecular basis of the ratio between these two catalytic routes, two β -glucosidases from GH1 family, *Spodoptera frugiperda* (Sf β gly; AF052729) and *Tenebrio molitor* (Tm β gly; AF312017) were produced as recombinant enzymes in *Pichia pastoris* GS115, concentrated using 90% (w/v) ammonium sulfate and reverse dialysis with PEG 10000, and dialyzed in 100 mM CP buffer pH 6. SDS-PAGE confirmed that Sf β gly (~50 kDa) and Tm β gly (~56 kDa) were pure after that procedure. The activity recovered after purification were 152% (Sf β gly) and 171% (Tm β gly) and protein concentration were 0.134 mg/mL (Sf β gly) and 0.217 mg/mL (Tm β gly). The ratio between the hydrolysis and transglycosylation (v_H/v_T) was analyzed using *p*NP β -gluco substrates (0.1 mM to 8 mM) and MU β -gluco (0.1 mM to 40 mM), the rate of formation of *p*NP or MU and glucose. Tm β gly catalyzes transglycosylation reactions with both substrates,

but v_H/v_T depends on $[S]$ ranging from $+\infty$ ($v_H \gg v_T$) to 1.5 for pNP β -gluco and $+\infty$ to 1 for MU β -gluco. In contrast, S β gly did not catalyses transglycosilation with MU β -gluco. Moreover, v_H/v_T for pNP β -gluco-is 2 and is independent of $[S]$. S β gly K201F combines properties of both, because it does not catalyse transglycosylation with MU β -gluco, but for pNP β -gluco the occurrence of transglycosylation is dependent on $[S]$, ranging from $+\infty$ ($v_H \gg v_T$) to 1.25. The kinetic parameters (V_{max} e K_m) were adjusted in Enzfitter and numerical simulation showing that K_{m2} is higher for Tm β gly and S β gly K201F than S β gly. We also evaluated the effect of adding alternative acceptors that replace the water in pNP β gluco-4 mM. For the three enzymes the addition of methanol makes v_{glc} less than pNP, indicating the occurrence of transglycosylation. Addition of n-propanol decreases v_H/v_T about 7 times in S β gly and 2 times Tm β gly. The effects on S β gly are higher than on Tm β gly and S β gly K201F, suggesting easier access to the covalent intermediate in S β gly. We observe that v_H/v_T is not related to affinity for the second substrate molecule and may be modulated by mutation of residue K201 S β gly, position related to the access of water or alternative acceptor to the active site.

Keywords: transglycosylation, beta-glycosidase and enzymes

Lista de abreviaturas e siglas

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	sulfato de amônio
[S]	concentração de substrato
μM	micromolar
3C	região que codifica o C-terminal
5N	região que codifica o N-terminal
$A_{260\text{nm}}$	absorbância em comprimento de onda de 260nm
Abs	absorbância
BglB	β -glicosidase de <i>Paenebacillus polymyxa</i>
BLAST	“basic local alignment search”
BMM	meio mínimo de cultura contendo metanol 1%
BSA	albumina de soro bovino
CaCl_2	cloreto de cálcio
CB	tampão carbonato bicarbonato
cm	centrímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co.	compania
CP	tampão citrato fosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirridonucleotídeo 5’ trifosfato
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
Ek	enteroquinase
ES-MS	espectrometria de massa por eletrospray
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GATC	sequencia dos nucleotídeos guanina, adenina, tirosina e citosina
GC	guanina-citosina
GH1	família 1 das glicosídeo hidrolases
glc	glicose
h	hora
H_2O	água destilada

H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
I/VTENG	sequência Ile-(Val)-Thr-Glu-Asn-Gly conservada em GH1
IDT	“Integrated DNA Technologies”
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
K201F	resíduo de aminoácido lisina 201 mutado para fenilalanina
Kb	quilobases
KD	quilodalton
K _i	constante de inibidor
K _m	constante de Michaelis
L	litro
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LIC	clonagem independente de ligação
M	molar
m/v	massa sobre volume
mA	miliampére
MD	meio de cultura Mourad-gha e Dexheimer
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Milli-Q	água filtrada por osmose reversa
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
Mr	massa molecular relativa
mRNA	RNA mensageiro
MU	metilumbeliferona
MUβ-gluc	metilumbeliferil-β-D-glucopiranosídeo
NaCl	cloreto de sódio
NaOAc	acetato de sódio
ng	nanogramas
NH ₄ OH	hidróxido de amônio
nm	cumprimento de onda em nanômetros
°C	graus centígrados
p/v	peso sobre volume
PA	persulfato de amônio

pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDB	“ <i>Protein Data Bank</i> ”
PEG	polietilenoglicol
pET46	vetor de expressão de polipeptídeos
pH	potencial hidrogeniônico
PIC9 BG	vetor comercial de expressão extracelular em levedura <i>Pichia pastoris</i>
PM	peso molecular
pmol	picomol
pNP	<i>p</i> -nitrofenolato
pNP β -gluco	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
pT7-7 β 50	vetor pT7 que codifica β -glicosidase selvagem de <i>Spodoptera frugiperda</i>
pT7-7	vetor de expressão controlado pelo promotor T7
q. s. p.	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	enzima ribonuclease
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SbDhr1	β -glicosidase de <i>Sorghum bicolor</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Sf β gly K201F	β -glicosidase mutante de <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf β gly	β -glicosidase selvagem de <i>Spodoptera frugiperda</i>
TAE	tampão tris acetato EDTA
TFNEP	sequência Thr-Phe-Asn-Glu-Pro conservada em GH1
TGO	reagente de tris-glicose-oxidase
TLC	“thin layer chromatography” cromatografia em camada delgada
Tm β gly	β -glicosidase selvagem de <i>Tenebrio molitor</i>
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
Tris-HCl	tampão tris com ácido clorídrico
U	unidade de atividade enzimática
UDP-glicose	glicose ativada com ribonucleotídeo de uracila difosfatado
UV	luz ultravioleta
V	volt

v/v	volume sobre volume
V _{final}	volume final
v _H	velocidade de produção de glicose
V _{max}	velocidade máxima
v _T	velocidade de transglicosilação
WT-BG	vetor pET46 que codifica a β-glicosidase de <i>Spodoptera frugiperda</i>
xg	força em gravidade
YNB	meio de cultura básico com nutrientes de levedura
YPD	meio de cultura complexo para cultivo de levedura
ZmGlu1	β-glicosidase de <i>Zea mays</i>
μF	microfaraday
μg	micrograma
μL	microlitro

Lista de símbolos

$+\infty$	mais infinito
TM	marca registrada comercial
Ω	ohms
F %H	probabilidade de enzimas seguirem a rota de hidrólise em função da concentração de substrato
F %T	probabilidade de enzimas seguirem a rota de transglicosilação em função da concentração de substrato
®	marca registrada

Índice

1 - Introdução	16
2 - Objetivos	26
3- Procedimentos experimentais	27
3.1 - Produção das b-glicosidases de <i>Spodoptera frugiperda</i> mutante	
3.1.1 – Manutenção e cultivo de bactérias	27
3.1.2 - Preparo de bactérias competentes para transformação por CaCl ₂	28
3.1.3 - Transformação das células <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 competentes por choque térmico	28
3.1.4 – Indução para produção da proteína expressa em bactérias BL21 DE3 transformadas	29
3.1.5 - Estoque de bactéria em glicerol a -80°C	30
3.1.6 - Lise das bactérias BL21-DE3 induzidas	30
3.1.7 - Extração e purificação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias	31
3.2 - Produção das b-glicosidases de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Tenebrio molitor</i> selvagens	
3.2.1 - Manutenção e cultivo de leveduras	32
3.2.2 – Preparo de leveduras competentes para transformação por eletroporação	32
3.2.3 - Transformação de leveduras por eletroporação	33
3.2.4 - Indução da expressão das β -glicosidases de <i>S. frugiperda</i> e <i>T. molitor</i> em <i>Pichia pastoris</i>	34
3.2.5 - Estoque de leveduras em glicerol a -80°C	35
3.3 - Purificação das b-glicosidases de <i>Spodoptera frugiperda</i> e de <i>Tenebrio molitor</i>	
3.3.1 – Cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose	35
3.3.2 - Detecção da Sf β gly mutante após a cromatografia de afinidade	36
3.3.3 - Precipitação com sulfato de amônio	37
3.3.4 – Concentração de proteína com PEG 10000 – diálise reversa	37
3.4 - Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida na presença de SDS 1%	38
3.5 - Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford	38
3.6 – Ensaio de atividade enzimática	
3.6.1 - Ensaio metilumbeliferil- β -D-glucopiranosídeo (MU β -gluco)	39
3.6.2 - Ensaio <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (<i>p</i> NP β -gluco)	40
3.6.3 - Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenolato (<i>p</i> NP) e de metilumbeliferona (MU)	41
3.6.4 - Curva padrão de glicose utilizando o reagente TGO (tris -glicose oxidase) e TGO ácido	41
3.6.5 - Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenolato e de TGO na presença de metanol	42
3.6.6 - Ensaio <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na presença de metanol	44
3.6.7 - Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenolato e de TGO na presença de isopropanol	45

3.6.8 - Ensaio <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na presença de isopropanol.....	47
3.6.9 – Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenolato e de TGO ácido na presença de <i>n</i> -propanol.....	48
3.6.10 - Ensaio <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na presença de <i>n</i> -propanol.....	50
3.7 - Cromatografia de camada delgada em placas de sílica-gel – TLC	51
3.8 – Determinação dos parâmetros cinéticos	52
3.9 - Procedimentos para manipulação e análise de DNA	
3.9.1 - PCR em termociclador	53
3.9.2 - Eletroforese em gel de agarose	54
3.9.3 - Quantificação de DNA por espectrofotometria	55
3.9.4 – Sequenciamento automatizados de DNA	55
3.9.5 – Reações de mutagênese sítio-dirigida na sequência de Sfbgly	57
3.9.6 – Clonagem no vetor de expressão pPIC9	59
3.9.7 – Clonagem no vetor de expressão pET46.....	64
4 - Resultados e discussão	
4.1 – Mutação sítio dirigida na sequencia da Sfbgly	67
4.2 – Clonagem do mutante Sfbgly K201F no vetor de expressão pPIC9	68
4.3 – Clonagem do mutante Sfbgly K201F no vetor de expressão pET 46.....	71
4.4 – Produção em bactérias BL21 DE3 e purificação de Sfbgly K201F	75
4.5 – Produção em levedura <i>Pichia pastoris</i> e purificação de Sfbgly selvagem.....	78
4.6 – Produção e purificação de Tmbgly selvagem.....	80
4.7 – Detecção de reações de transglicosilação	82
4.8 – Determinação de parâmetros cinéticos das reações	93
4.9 – Efeito da adição de aceptores alternativos nas reações	97
5 – Conclusões prévias	106
6 - Referências bibliográficas.....	107

1 – Introdução

1.1 - Síntese enzimática de glicosídeos

Polissacarídeos e oligossacarídeos são moléculas essenciais aos seres vivos, desempenhando funções na composição de estruturas (parede celular), no armazenamento de energia, reconhecimento celular, sinalização e resposta imune (Whitelock *et al.*, 2005; Descroix *et al.*, 2006; Stern *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006, Faijes e Planas, 2007). O uso de oligossacarídeos de aplicação médica tem crescido, sendo aplicados em imunização contra câncer e no bloqueio da adesão de vírus, bactérias e fungos patogênicos (Krivan *et al.*, 1988; Brassart *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1997; Gilewski *et al.*, 2001; Kudryashov *et al.*, 2001; Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Le Pendu, 2004).

Polissacarídeos e oligossacarídeos podem ser sintetizados por métodos químicos e enzimáticos. Apesar dos excelentes resultados obtidos por métodos exclusivamente químicos, a síntese enzimática tem a vantagem de apresentar altíssima especificidade (estero e regioespecificidade) e de ocorrer em condições brandas (Murata e Usui, 2006). As enzimas utilizadas para síntese de glicosídeos são as glicosiltransferases e as glicosídeo hidrolases.

As glicosiltransferases catalisam a transferência de monossacarídeos de um doador (por exemplo UDP-glicose) para um aceptor. Estas enzimas podem atuar processivamente na síntese de glicosídeos ou em combinação com outras glicosiltransferases na produção de heterossacarídeos (Faije e Planas, 2007).

As glicosídeo hidrolases atuam em grande variedade de processos biológicos fundamentais e foram bem caracterizadas nos últimos anos (Esen *et al.*, 2003; Henrissat *et al.*, 2005). Estas enzimas catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas, contudo esta reação pode ser revertida em condições apropriadas. Assim, as glicosídeo hidrolases podem ser usadas para síntese de oligo e polissacarídeos.

Estas enzimas são estáveis, amplamente encontradas na natureza, apresentam grande número de formas recombinantes e utilizam doadores de monossacarídeos que são baratos e de fácil obtenção (Faije e Planas, 2007; Murata e Usui, 2006). Glicosídeo hidrolases podem catalisar a hidrólise do substrato através de mecanismos que resultam na retenção ou inversão da configuração espacial (α ou β) do carbono anomérico. A diferença entre estas enzimas está na maior distância entre o nucleófilo e o carbono anomérico, o que permite que o resíduo que age como nucleófilo ative uma molécula de água que ataca o carbono anomérico gerando um produto com estereoquímica oposta à do substrato nas enzimas inversoras quando comparadas às enzimas retentoras. Em geral, as glicosidases mais utilizadas na síntese são as retentoras, embora recentemente tenham surgido relatos do uso de enzimas inversoras (Davies e Henrissat, 1995; Honda e Kitaoka, 2006; Honda *et al.*, 2008).

As glicosídeo hidrolases retentoras utilizam um mecanismo de catálise com dupla-substituição que pode ser dividido em duas etapas. Na primeira, chamada glicosilação, forma-se um intermediário covalente (glicosil enzima), o qual é hidrolisado na segunda etapa (deglicosilação) regenerando a enzima livre (Figura 1). Neste mecanismo há participação de dois grupos carboxila do sítio ativo da enzima, dois ácidos glutâmicos catalíticos presentes em regiões conservadas da enzima: a sequência TFNEP onde se encontra o resíduo E187 que age como ácido/base catalítico e a sequência I/VTENG contendo o resíduo E399 que age como nucleófilo catalítico (Kempton e Withers, 1992; Burmeister *et al.*, 1997).

Em condições apropriadas este mecanismo pode ser revertido levando à síntese de glicosídeos. Isto pode ser obtido deslocando o equilíbrio a favor da síntese (controle termodinâmico) ou através do uso de doadores de monossacarídeos “ativados” (controle cinético), desviando a rota da reação de hidrólise.

Figura 1: Esquema da reação de hidrólise de uma ligação glicosídica catalisada por uma glicosídeo hidrolase retentora (β -glicosidase). Baseado em Kempton e Withers (1992).

No caso do “controle termodinâmico” para condensação de dois monossacarídeos os rendimentos estão em torno de 15%, e são usadas altas temperaturas, adição de solventes orgânicos ou alta concentração de produtos. Já no caso do “controle cinético” a produção do oligossacarídeo depende do ataque do intermediário covalente por um aceptor glicosídico ao invés da água (Figura 2). Neste caso, a reação também chamada de transglicosilação pode usar como aceptores: oligossacarídeos, aril glicosídeos e glicosídeos fluorados, atingindo rendimentos na faixa de 20 a 40% (Malet e Planas, 1998).

A modificação de glicosídeo hidrolases através de mutagênese sítio-dirigida ou de evolução *in vitro* tem sido usada na tentativa de aumentar estes rendimentos ou desenvolver estratégias alternativas.

Figura 2: Esquema representando a ocorrência de reações de transglicosilação catalisadas por glicosídeo hidrolases retentoras. Doadores ativados ($X = F$, p -nitrofenil, etc.) ou doadores glicosídicos ($X =$ glicosil) podem participar da reação de transglicosilação. Baseado em Faijes e Planas (2007).

1.1.1 - β -glicosidases na síntese de glicosídeos

As β -glicosidases, classificadas na maior família das glicosídeo hidrolases (GH1), compartilham semelhança na estrutura espacial e no mecanismo da reação catalítica (Coutinho e Henrissat, 1999). Tem sido o principal foco de muitas pesquisas recentes devido as suas funções nos sistemas biológicos, e também devido a interesses na aplicação dessas enzimas em processos biotecnológicos (Henrissat *et al.*, 2005, Cairns e Esen, 2010).

β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas entre o glicone (grupo glicosil, galactosil, mannosil, fucosil, 6-fosfoglicosil, 6-fosfogalactosil ou um resíduo glucoronídeo) e o aglicone do substrato, o qual pode ser um outro monossacarídeo ou não, resultando na liberação do monossacarídeo da extremidade não-redutora do substrato.

Em geral, as funções fisiológicas de glicosídeos naturais são determinadas pela natureza química do aglicone (Henrissat, 1991; Henrissat e Davis, 1997), assim a determinação da função fisiológica de uma β -glicosidase depende de sua especificidade pelo aglicone. Sendo glicosídeo hidrolases retentoras, estas enzimas atuam segundo o mecanismo descrito na Figura 1. As β -glicosidases apresentam uma estrutura do tipo $(\alpha/\beta)_8$ barril, sendo

que o sítio ativo encontra-se entre as alças que conectam as fitas β às α -hélices localizado na porção C-terminal do barril (Figura 3).

Figura 3: Modelo estrutural de uma β -glicosidase (E.C. 3.2.2.21). A seta indica a cavidade do sítio ativo. Adaptado de PDB code: 1bgg.

Este sítio é dividido em uma série de subsítios, onde o monossacarídeo que forma a extremidade não-redutora do substrato (glicone) liga-se ao subsítio -1 e a porção remanescente do substrato, a extremidade redutora, que interage com uma série de subsítios (+1, +2, +3, etc...) formadores da região de ligação do aglicone (Figura 4). Em cada subsítio a cadeia lateral de um aminoácido hidrofóbico forma uma plataforma (plataforma basal) sobre a qual posiciona-se o anel do glicone (monossacarídeo do substrato), enquanto que as cadeias laterais de aminoácidos polares formam ligações de hidrogênio com as hidroxilas do glicone do substrato, atribuindo à enzima especificidade quanto ao substrato (Davies *et al.* 1997; Burmiester *et al.*, 1997, Marana, 2006).

Figura 4: Esquema representando os subsítios do sítio ativo de uma β -glicosidase. A seta indica o ponto de clivagem da ligação glicosídica.

A partir das β -glicosidases GH1 foram desenvolvidas enzimas chamadas de glicosintases (Mackensie *et al.*, 1998; Prade *et al.*, 1998; Perugino *et al.*, 2004). Estas enzimas são β -glicosidases onde o nucleófilo catalítico foi substituído através de mutagênese sítio-dirigida por alanina, serina ou glicina. Assim, na presença de doadores glicosídicos (β -glicosídeos fluorados) estas enzimas sintetizam ligações β -glicosídicas, mas não as hidrolisam. Esta mesma estratégia foi usada para desenvolver glicosintases a partir de endoglucanases (Malet e Planas, 1998).

Enfim, desde o estabelecimento da estratégia para construção de glicosintases, diversas β -glicosidases têm sido usadas como plataforma para produção de novas enzimas (Hancock *et al.*, 2006).

As β -glicosidases também têm sido modificadas a fim de aumentar sua eficiência e especificidade em reações de transglicosilação (Feng *et al.*, 2005; Hancock *et al.*, 2006). No caso da β -glicosidase de *Sulfolobus solfataricus*, as mutações foram concentradas em resíduos localizados no subsítio -1, enquanto que na β -glicosidase de *Thermus thermophilus* as mutações alteraram o subsítio de ligação do acceptor no subsítio +1. Neste caso, a ligação do acceptor glicosídico foi favorecida e a enzima perdeu sua atividade hidrolítica, mantendo apenas a função transglicosiladora (Feng *et al.*, 2005).

É interessante notar que os dados estruturais da β -glicosidase BglB de *Paenibacillus polymyxa* (Figura 5) revelaram dois resíduos (W412 e H181) que formam um “canal” através do qual a molécula de água que atua na hidrólise do intermediário covalente poderia entrar no sítio ativo (Isorna *et al.*, 2007).

Figura 5: Modelos estruturais e esquemáticos do sítio ativo de BglB em complexo. **A)** Complexo com Tiocellobiosídeo. **B)** Complexo com glicose. W representa molécula de água. Ligações não-covalentes são representadas por linhas tracejadas.

Portanto, estes resíduos podem ter influência direta na eficiência de reações de transglicosilação. De fato, eles poderiam afetar o balanço entre as velocidades de reação de hidrólise e transglicosilação. Assim, em adição aos dados já levantados, a manipulação dos resíduos que formam esse “canal” seria outra estratégia para o desenvolvimento de β -glicosidases transglicosiladoras. Contudo, o efetivo papel destes resíduos nas reações de transglicosilação ainda não foi estudado.

1.2 – As β -glicosidases de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor*

As β -glicosidases da larva da lagarta *S. frugiperda* (AF052729; Sf β gly) e da larva do besouro *T. molitor* (AF312017; Tm β gly) pertencem à família GH1 e foram associadas à digestão de oligocelodextrinas nestes insetos (Marana *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2001).

Sf β gly possui 489 aminoácidos em sua forma madura, enquanto que Tm β gly possui 485 aminoácidos. Ambas enzimas possuem um único sítio ativo que apresenta uma ampla

especificidade, sendo registrada atividade sobre dissacarídeos, oligocelodextrinas, aril β -glicosídeos sintéticos, alquil β -glicosídeos sintéticos e glicosídeos vegetais. É interessante notar que a ampla especificidade manifesta-se tanto na diversidade de glicones como de aglicones (Marana *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2001).

A ampla especificidade de S β gly suscitou uma série de estudos buscando entender como a atividade relativa entre os diversos substratos é modulada. Os resíduos que formam o subsítio -1 de S β gly foram identificados e seu papel na especificidade pelo substrato avaliado. O resíduo E451 é o principal ponto de interação com a hidroxila 4 do glicone e também de diferenciação entre glicones que apresentam esta hidroxila na orientação equatorial (glicose) ou axial (galactose e fucose). O resíduo Q39 também interage com a hidroxila 4, porém não atua na diferenciação entre glicones. Os resíduos N186 e H142 interagem com a hidroxila 2 do glicone. Este conjunto de resíduos (N186, H142, Q39 e E451), juntamente com o resíduo formador da plataforma basal apolar (W444) é conservado na família GH1 (Marana *et al.*, 2001, Marana *et al.*, 2002; Marana, 2006).

Sabe-se ainda que em S β gly a região de ligação do aglicone possui 3 subsítios e a afinidade entre ela e alquil β -glicosídeos é diretamente proporcional ao número de carbonos do aglicone, sugerindo haver interações deste com uma superfície hidrofóbica, provavelmente com a plataforma basal apolar de cada subsítio (Marana *et al.*, 2001).

Além disso, no subsítio +1 a afinidade por resíduos de glicose é maior do que a afinidade por grupos alquila, enquanto que o inverso ocorre nos subsítios +2 e +3. Com base em comparações estruturais e caracterização cinética foi evidenciado que E190, E194 e K201 atuam na ligação do aglicone no subsítio +1, e M453 participa no subsítio +2. Interessantemente, a comparação de energias de associação calculadas a partir de K_i para celodextrinas e alquil β -glicosídeos mostrou que E194 favorece a ligação de aglicones do tipo

alquil, enquanto E190 e K201 favorecem a ligação de aglicones formados por glicose (Mendonça e Marana, 2008).

O sítio ativo de Tm β gly também apresenta 4 subsítios, sendo que os resíduos formadores do subsítio -1 são idênticos à Sf β gly sugerindo que ambas enzimas possuam a mesma especificidade pelo glicone. É interessante notar que em Tm β gly os resíduos equivalentes a E190, E194 e K201 são uma Q, A e F, respectivamente e coerentemente o subsítio +1 desta β -glicosidase tem maior preferência por aglicones apolares (Ferreira *et al.*, 2001).

A diversidade de glicosídeos vegetais utilizados como substrato na caracterização de Tm β gly foi maior do que no estudo de Sf β gly e inclusive foi demonstrado que Tm β gly catalisa reações de transglicosilação a partir do substrato amigdalina. O produto de transglicosilação foi caracterizado por ES-MS revelando tratar-se da adição de uma molécula de glicose em uma amidaglina que atuou, portanto, como aceptor glicosídico ao invés da água (Ferreira *et al.*, 2001). Porém, a ocorrência deste tipo de reação usando outros substratos nunca foi investigada, além disso, reações de transglicosilação também não foram estudadas para Sf β gly.

Um alinhamento de sequências indica que K201 em Sf β gly e F183 em Tm β gly correspondem a H181 em BglB. Além disso, W412 em BglB corresponde a E454 em Sf β gly e A451 em Tm β gly. Assim, estes resíduos de Sf β gly e Tm β gly poderiam estar envolvidos na entrada de água no sítio ativo destas β -glicosidases.

De fato, a caracterização prévia de Sf β gly indica que estes resíduos estão no subsítio +1 (K201) ou muito próximo dele (E454) e portanto realmente encontram-se na vizinhança da ligação glicosídica hidrolisada no intermediário covalente (Figura 6).

Todavia, a existência deste canal, a participação de K201 e E454 e F183 e A451 na sua constituição, a influência destes resíduos no balanço entre as reações de hidrólise e

2 – Objetivos

O objetivo geral desta dissertação foi caracterizar as bases moleculares do balanço entre reações de hidrólise e transglicosilação catalisadas por β -glicosidases da família GH1.

Para alcançar esta meta, foram estabelecidos alguns objetivos estratégicos:

- expressão das β -glicosidases Sf β gly e Tm β gly como proteínas recombinantes e sua purificação para serem usadas como enzimas modelo;
- verificação da ocorrência de reações de transglicosilação catalisadas em meio aquoso pelas β -glicosidases Sf β gly e Tm β gly;
- determinação do balanço entre as velocidades das reações de hidrólise e transglicosilação catalisadas em meio aquoso pelas β -glicosidases Sf β gly e Tm β gly;
- determinação dos parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_m) para as reações de transglicosilação catalisadas em meio aquoso pelas β -glicosidases Sf β gly e Tm β gly;
- análise do efeito de aceptores alternativos (álcoois) sobre a razão entre as velocidades da reação de hidrólise e de transglicosilação catalisadas pelas β -glicosidases Sf β gly e Tm β gly;
- construção de um mutante da β -glicosidase Sf β gly com substituição do resíduo K201 pelo resíduo F;
- verificação do efeito da mutação K201F sobre a ocorrência de reações de transglicosilação catalisadas pela β -glicosidase Sf β gly.

3 – Procedimentos experimentais

Todos os reagentes, exceto quando mencionado, são procedentes do Sigma Chemical Co. ou Merck. Os valores de pH foram determinados a temperatura ambiente com pHmetro Mettler Toledo MP220.

3.1 - Produção das b-glicosidases de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgly) mutantes

3.1.1 - Manutenção e cultivo de bactérias

Para a preparação das construções plasmidiais foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* cepa XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F'* [*proAB⁺ lac^q lacZ^ΔM15 Tn10(tet^r)*]).

Para a preparação das construções plasmidiais das mutações sítio dirigidas foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* cepa XL10-gold (Tetr^r (*mcrA*)183 ^Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacIqZ ΔM15 Tn10* (Tetr) Amy Cam^r]).

Para a indução da expressão da proteína recombinante foram utilizadas colônias de *Escherichia coli* cepa BL21-gold DE3 [F⁻ *ompT hsdS(rB- mB-)* *dcm⁺ Tetr gal⁺ Δ(DE3) endA Hte*]. O genótipo de cada um destes organismos, as condições de crescimento, seleção e aplicações podem ser encontrados nos manuais fornecidos pela StratageneTM Agilent Technologies.

As culturas das bactérias *E. coli* foram mantidas em meio LB (Luria-Bertani) [triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v) pH 7,5] previamente autoclavado contendo glicerol 20% (v/v) a -80°C. Aliquotas deste estoque bacteriano foram semeadas em placas de meio LB-ágar [triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v) e ágar 1,5% (m/v) pH 7,5] sem antibiótico e então incubadas a 37°C, por 16 h.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 4 mL de meio LB líquido com antibiótico. Esta suspensão de células foi incubada a 37°C, por 16 h a 160 rpm. Uma fração desta cultura foi utilizada para obtenção de bactérias competentes.

Todos materiais e equipamentos que entraram em contato com bactérias foram esterilizados anteriormente e posteriormente ao uso.

3.1.2 - Preparo de bactérias competentes para transformação por CaCl_2

Cerca de 2 mL do pré-inóculo com tetraciclina (15 $\mu\text{g/mL}$), como descrito no item anterior, foram transferidos para 400 mL de meio LB líquido previamente autoclavado, acrescido de tetraciclina (15 $\mu\text{g/mL}$). As células retornaram ao “shaker” e ficaram crescendo por 2 a 3 horas, a 160 rpm até atingir uma $\text{DO}_{590\text{nm}}$ de 0,5.

As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação a 4.000 rpm, por 10 min a 4°C (GSA SORVALL). O sedimento proveniente da centrifugação foi ressuspensão em 40 mL de CaCl_2 0,1 M estéril gelado e incubado em gelo por 1 h. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. As bactérias foram então ressuspensas em 1 mL de CaCl_2 0,1 M previamente resfriado para uso imediato. Para serem congeladas foi adicionado glicerol para concentração final de 15% (v/v), alíquotas de 100 μL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

3.1.3 - Transformação das células *Escherichia coli* XL1-Blue competentes por choque térmico

Aproximadamente 0,1 μg de DNA plasmidial em 1 μL da solução previamente produzida foi separadamente adicionada a 200 μL de bactérias *E. coli* XL1-Blue competentes

e a mistura foi mantida em gelo por 30 min. As células foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 s e imediatamente incubadas em gelo por 3 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio LB previamente autoclavado ao microtubo contendo as células e a suspensão bacteriana foi incubada a 37°C, por 1 h sob agitação constante de 160 rpm para recuperação das bactérias. Este material foi então semeado, 100 µL por placa, em placas de LB-ágar contendo antibiótico ampicilina 50 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por um período de 18 h, obtendo dessa forma colônias isoladas com expressão das proteínas envolvidas na resistência ao antibiótico de seleção.

Colônias transformantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas em “shaker” a 160 rpm, 37°C, por 16 h. Essa suspensão de células foi utilizada para indução com IPTG, como descrito adiante.

3.1.4 - Indução para produção da proteína expressa em bactérias BL21 DE3 transformadas

A indução da expressão da Sfbgly mutante K201F foi feita em células *E. coli* BL21-DE3. Esta indução iniciou-se com a preparação do pré-inóculo adicionando 2 mL de meio LB autoclavado com carbenicilina 50 µg/mL em tubo de polipropileno autoclavado com uma colônia previamente transformada contendo o plasmídio com o inserto de interesse. Este pré-inóculo foi, então, incubado a 37°C por 18 h a 150 rpm. Após este período o pré-inóculo foi transferido totalmente a 500 mL de LB com 50 µg/mL de carbenicilina, em erlenmeyer de 2 L autoclavado, voltando a ser incubado nas mesmas condições até atingir DO_{590nm} entre 0,6 e 1,0 contra água destilada. Ao atingir valores neste intervalo, foi retirada uma alíquota de 50 µL representante do material não induzido em microtubo de 1,5 mL, posteriormente armazenada a -20°C. Adicionou-se ao meio indutor IPTG a 1 mM, a partir de solução estoque de 200 mM esterilizado por filtração em filtros Millex 0,22 µm. As células foram incubadas a

25°C por 3 h a 150 rpm. Terminado este período de indução da expressão da proteína recombinante retirou-se uma segunda alíquota de 50 µL representante do material induzido, também armazenada a -20°C. O material foi equitativamente dividido em 2 garrafas de polipropileno e centrifugado a 4°C por 20 min a 7.000xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi armazenado a -20°C em tubo de polipropileno.

Essas amostras foram utilizadas em um teste eletroforético SDS-PAGE (item 3.4) para a certificação da transformação e indução, a fim de verificar se houve produção da proteína recombinante.

3.1.5 - Estoque de bactéria em glicerol a -80°C

Adicionou-se 200 µL de glicerol-LB 30% autoclavado a 200 µL de cultura de bactérias em LB líquido, em microtubo de 1,5 mL estéril identificado, obtendo o volume final de 0,4 mL. Depois de homogeneizadas as alíquotas foram congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas no freezer -80°C.

3.1.6 - Lise das bactérias BL21-DE3 induzidas

As bactérias induzidas contendo as proteínas recombinantes, presentes no “pellet” da indução foram ressuspensas em 30 mL de tampão de lise [fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 0,5 M e imidazol 30 mM], acrescidos à solução de lisozima de galinha a uma concentração de 200 µg/mL e Triton X-100 a 0,1% (v/v). A mistura foi incubada a temperatura ambiente sob leve agitação em agitador mecânico por 30 min.

Após esse período as células sofreram cinco ciclos de sonicação, sendo cada ciclo composto por um pulso de 30 s em um sonicador Branson com microtip (nas condições: Constant cycle, time: hold e output: 4), seguido de banho de gelo por 3 min. A amostra sonicada foi distribuída equitativamente em tubos Corex e centrifugada a 7000 xg, 4°C por 20

min, sendo o sedimento descartado e o sobrenadante coletado em tubo de polipropileno. O sobrenadante foi armazenado a 5°C para posterior purificação da proteína recombinante, tomando o cuidado de não congelar o material de interesse, para não inativar a enzima.

3.1.7 - Extração e purificação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias

Uma vez obtidas colônias no processo de transformação utilizando células XL1-Blue competentes (item 3.1.3), uma delas foi inoculada, em 5 mL de meio LB com antibiótico ampicilina a 50 µg/mL em tubo polipropileno autoclavado e incubadas a 160 rpm, a 37°C, por 12-16 h, conforme descrito no item 3.1.1. Esta suspensão de células foi então utilizada para a extração do DNA plasmidial (“*minipreps*”) realizada seguindo o protocolo de purificação do *kit Wizard® Plus SV Minipreps - DNA purification system* (Promega Corporation), sugerido pelo fabricante.

Basicamente as bactérias eram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, contendo EDTA 10mM e RNase A 100 µg/mL. Em seguida realizava-se uma lise alcalina utilizando solução de NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v) e neutralizando com acetato de potássio 1,32 M pH 4,8. O sobrenadante da mistura centrifugada era aplicado em mini-coluna, lavada com tampão acetato de potássio 80 mM, EDTA 40 µM e etanol 55% (v/v) para retirada do material não ligado. Finalmente a coluna era eluída com água MilliQ, para recuperação dos plasmídeos.

As suspensões de plasmídeos linearizados com enzimas de restrição foram utilizadas para a extração do DNA plasmidial realizada seguindo o protocolo de purificação do *kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system* (Promega Corporation), sugerido pelo fabricante.

O rendimento e pureza dos plasmídeos purificados foram avaliados através de determinação da quantidade de DNA, feita pela medida de absorbância a 260 nm, descrito no item 3.9.3.

3.2 - Produção das β -glicosidases de *Spodoptera frugiperda* (Sf β gly) e de *Tenebrio molitor* (Tm β gly) selvagens

3.2.1 - Manutenção e cultivo de leveduras

Para a superexpressão das proteínas recombinantes foi utilizada a levedura *Pichia pastoris* GS115, cuja cultura foi mantida em meio YPD [extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e glicose 2% (m/v)] contendo glicerol 20% (v/v) a -80°C. O genótipo de cada um destes organismos, as condições de crescimento, seleção e aplicações podem ser encontrados nos manuais fornecidos pela InvitrogenTM Life Technologies.

Alíquotas deste estoque foram semeadas em placas de meio YPD-ágar [extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v), glicose 2% (m/v) e ágar 2% (m/v)] e incubadas a 28°C, por cerca de 24 h.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio YPD líquido autoclavado, e incubada a 28°C por uma noite a 160 rpm. Esta cultura pôde ser utilizada como pré-inóculo para obtenção de culturas em maior volume, para preparação de células competentes e obtenção de proteínas recombinantes.

3.2.2 - Preparo de leveduras competentes para transformação por eletroporação

Cerca de 5 mL de pré-inóculo, obtido como descrito no item anterior, foram transferidos para 500 mL de meio líquido YPD previamente autoclavado em erlenmayer de 2 L. A suspensão de *P. pastoris* foi incubada a 28°C, por cerca de 20 h a 150 rpm, até atingir uma DO_{600nm} entre 1,3 e 1,5, contra água destilada.

As células foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação a 1.500 $\times$ g, por 5 min a 4°C (GSA SORVALL). O sedimento foi ressuspensão em 250 mL de água Milli-Q estéril gelada e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A

etapa de lavagem e centrifugação foi repetida por mais uma vez. As células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1 M estéril gelado e submetidas à centrifugação nas mesmas condições anteriores. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M estéril gelado e forma feitas alíquotas de 80 μ L.

3.2.3 - Transformação de leveduras por eletroporação

Aproximadamente 30 μ g das construções pPIC9 contendo o fragmento de DNA de interesse, foram utilizados no processo de transformação por eletroporação em *P. pastoris*.

Tais construções foram previamente linearizadas quando incubados por uma noite a 37°C com a enzima de restrição *SacI* (1 U/ μ g de DNA) em tampão próprio e na presença de BSA. O DNA extraído a partir dos plasmídeos digeridos (item 3.1.7) foi adicionado a 80 μ L de *P. pastoris* competente (item 3.2.2). A mistura foi homogeneizada e então transferida para uma cubeta estéril (gene pulser cuvette 0,2 cm, BIO-RAD) resfriada por 5 min no gelo. Em seguida, as células juntamente ao DNA linear foram submetidas à eletroporação nas seguintes condições: 1500 V, 25 μ F e 200 Ω (BIO-RAD GenePulser XCell). Imediatamente após o choque elétrico, foi adicionado à cubeta 500 μ L de sorbitol 1 M estéril gelado e alíquotas de aproximadamente 150 μ L foram semeadas em placas MD-água [YNB 1,34% (v/v), biotina 4 X 10⁻⁵% (v/v), glicose 2% (m/v) e água 1,5% (m/v)]. As placas foram incubadas a 28°C, por cerca de 60 h. As colônias isoladas foram transferidas para placas de YPD-água quadriculada e incubadas a 28°C por uma noite.

Como controle da transformação, o vetor pPIC9 linearizado sem inserto foi submetido à eletroporação em uma alíquota de 80 μ L de *P. pastoris* competente seguindo as condições previamente descritas.

Posteriormente, seguiu-se a indução da expressão de enzimas recombinantes com metanol 1% a partir de pré-inóculo, como descrito adiante.

3.2.4 – Indução da expressão das β -glicosidases S β gly e Tm β gly em *Pichia pastoris*

Foram utilizadas colônias de leveduras *P. pastoris* previamente transformadas com vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para S β gly e transformadas por eletroporação com o vetor PIC9BG contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para Tm β gly.

As células transformadas cultivadas em 2 mL de meio YPD líquido como descrito no item 3.2.1, foram transferidas a 500 mL de meio YPD líquido autoclavado em erlenmeyer de 2 L e incubadas, sob agitação contínua de 160 rpm a 28°C, durante 18 h. Em seguida, a suspensão de células foi submetida a uma centrifugação a 3.000 $\times g$, a 4°C, por 5 min e o sedimento obtido lavado 3 vezes com água Milli-Q previamente autoclavada. A cada lavagem, o “pellet” contendo as células era ressuspensão em água e a suspensão então submetida ao mesmo processo de centrifugação. Posteriormente, o sedimento isento de YPD foi transferido para um novo meio denominado BMM [YNB 1,34% (v/v), biotina $4 \cdot 10^{-5}$ % (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6] contendo metanol 1% (v/v) como indutor. A suspensão foi novamente incubada a 28°C, sob agitação de 160 rpm por aproximadamente 24 h. Foi retirada então uma alíquota de 1 mL, volume este suficiente para a realização de um ensaio enzimático usando *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 4 mM como substrato. O restante do material foi novamente incubado, após nova adição de metanol (1 mL/100 mL de meio). Esse procedimento foi repetido após cerca de 48 h e 72 h, quando a indução foi finalmente encerrada. As condições de crescimento e indução foram baseadas nas instruções do manual “*Pichia expression kit*” publicado pela InvitrogenTM Life Technologies.

Como neste sistema de superexpressão as proteínas recombinantes são secretadas para o meio de cultura, cada suspensão de células induzidas foi centrifugada a 3.000 $\times g$, a 4°C, por 5 min e os sobrenadantes dos meios de cultura contendo as proteínas recombinantes foram recolhidos e armazenados a -20°C até serem submetidos ao processo de purificação.

3.2.5 - Estoque de leveduras em glicerol a -80°C

Adicionou-se 500 µL de glicerol-YPD 60% autoclavado a 500 µL de cultura de leveduras em YPD líquido, em microtubo de 1,5 mL estéril identificado, obtendo o volume final de 1 mL. Depois de homogeneizadas as alíquotas foram congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas no freezer -80°C.

3.3 - Purificação das β -glicosidases recombinantes de *S. frugiperda* (Sf β gly) e *T. molitor* (Tm β gly)

A β -glicosidase Sf β gly mutante K201F superexpressa em *E. coli* BL21 DE3 foi purificada a partir de uma cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sepharose (item 3.3.1), sendo submetida posteriormente à diálise em tampão imidazol 20 mM pH 8 e citrato-fosfato (CP) 100 mM pH 6.

As β -glicosidases selvagens Sf β gly e Tm β gly superexpressa em *P. pastoris* foram purificadas por precipitação com sulfato de amônio (item 3.3.3) ou diálise reversa em PEG 10.000, seguida de diálise em tampão CP 100 mM pH 6.

3.3.1 - Cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sepharose

Para *S. frugiperda* foi usada cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sepharose, pois o vetor pET46 codifica Sf β gly como uma proteína de fusão com uma “cauda de histidinas” (His₆-tagged) em seu N-terminal.

Todos os tampões utilizados foram preparados com água MilliQ, filtrados a vácuo em filtros Millex 0,45 µm (Millipore) e desaerados com auxílio de uma bomba de vácuo.

O lisado das bactérias BL21-DE3 induzidas foi analisado em cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel-sepharose (HisTrapTM FF 1 mL, Amersham

Biosciences/ HisTrapTM FF 5 mL, GE Healthcare) e bomba peristáltica P-1 (Pharmacia Biotech).

As soluções foram injetadas na coluna cromatográfica sob fluxo de 0,5 mL a 1,0 mL/min inicialmente lavada com 5 volumes de água destilada e a seguir equilibrada com 5 a 10 volumes de tampão de lavagem [fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 0,5 M e imidazol 30 mM]. O volume da amostra injetado foi de 10 mL de uma solução formada por 6 mL de tampão de lavagem e 4 mL do lisado filtrado em filtros Millex de 22 µm (Millipore). As proteínas que não ficaram retidas pela coluna foram lavadas com mais 10 a 15 mL de tampão de lavagem. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com 5 ou 15 mL de tampão de eluição [fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 com imidazol 0,5 M].

Durante todo o processo cromatográfico foram coletadas amostras de 1 e 2 mL, utilizadas para a detecção da proteína recombinante.

3.3.2 - Detecção da Sfb gly mutante K201F após a cromatografia de afinidade

Para a detecção da enzima mutante K201F foi utilizada uma solução 4 mM de *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (*p*NPβ-glucos) em tampão CP 100 mM pH 6. Para esse ensaio utilizou-se 43 tubos de ensaio contendo 50 µL de substrato mais 50 µL de material proveniente de cada uma das 40 a 43 frações obtidas na cromatografia. Esses tubos foram incubados a 30°C até a observação da degradação do substrato, surgimento de coloração amarelada. Neste momento a reação foi interrompida utilizando 0,5 mL de tampão carbonato-bicarbonato (CB) 250 mM pH 11. Neste procedimento o *p*-nitrofenolato (*p*NP) liberado durante a hidrólise do substrato é detectado por espectrofotometria utilizando-se o comprimento de onda 420 nm (Terra, 1979).

Os tubos com maior atividade foram reunidos em um “pool” diluído 10x em tampão CP 100 mM pH 6 e submetido à diálise contra este mesmo tampão por 9h a 4°C sob agitação

constante. Neste processo foram realizadas 3 trocas, sendo que em cada troca o material era dialisado contra 100 volumes de tampão. A pureza das enzimas recombinantes pode ser verificada através de um teste eletroforético SDS-PAGE (ver item 3.4).

3.3.3. - Precipitação com sulfato de amônio

Aos meios de cultura contendo as proteínas recombinantes selvagens Sfbgly e Tmbgly, foi adicionado sulfato de amônio aos poucos para concentração final de 0,69 g/mL (90% de saturação) sendo a mistura incubada a temperatura ambiente durante 3 h. Uma alíquota de 1 mL de meio BMM foi retirada, representando o material inicial e armazenada em microtubo a -20°C. Posteriormente a solução foi centrifugada a 10.000 $\times g$, por 1 h a 4°C, a fim de coletarmos o precipitado que contém a enzima de interesse. O restante do sobrenadante foi transferido para garrafa plástica e congelado a -20°C. O sedimento foi ressuspenso em 4 mL de tampão imidazol 20 mM pH 8 e submetido à diálise contra este mesmo tampão por 9 h a 4°C sob agitação constante. Neste processo foram realizadas 3 trocas, sendo que em cada troca o material era dialisado contra 100 volumes de tampão.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas do sobrenadante e do sedimento ressuspenso da indução e armazenadas em microtubo a -20°C para realizar ensaio de atividade enzimática. A pureza da enzima recombinante pode ser verificada através de um teste eletroforético SDS-PAGE (item 3.4).

3.3.4 – Concentração com PEG (polietilenoglicol) 10.000– diálise reversa

Cerca de 100 mL do meio BMM contendo as proteínas selvagens recombinantes Sfbgly e Tmbgly foram aliquotados em membrana de diálise de 20 cm e incubados a temperatura ambiente sob 500 g de PEG 10.000 por 4 h, ou até diminuir o volume da amostra. Em seguida o material foi submetido à diálise em tampão CP 100 mM pH 6 por 9 h a 4°C sob

agitação constante. Neste processo foram realizadas 3 trocas, sendo que em cada troca o material era dialisado contra 100 volumes de tampão. A pureza da enzima recombinante pode ser verificada através de um teste eletroforético SDS-PAGE, descrito abaixo.

3.4 - Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida na presença de SDS 1% - SDS-PAGE

Amostras contendo aproximadamente 4 µg de proteína em 10 µL foram diluídas com 10 µL de tampão de amostra [tris-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 5% (m/v), β-mercaptoetanol 1,3 mM, EDTA 1 mM, glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)]. Para o padrão foi preparada solução com 3 µL de padrão SDS-PAGE Low Range (Bio Rad) em 17 µL de tampão de amostra. As amostras foram aquecidas por 5 min em banho de água fervente antes de serem aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% contendo SDS 1% (m/v), preparado segundo Laemmli, 1970. A eletroforese ocorreu com uma corrente de 0,2 mA/cm³ de gel, sob uma voltagem constante de 200 V a temperatura ambiente por 45 min, e a coloração das proteínas foi feita com comassie blue R-250 0,1% (p/v) preparado em uma solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), por 30 min e depois foi descorado em solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por 1 h a 3 h.

Os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de proteínas conhecidas, usando os marcadores: lisozima (20,011 kD); inibidor de tripsina (29,228 kD); anidrase carbônica (37,554 kD); ovalbumina (54,051 kD); albumina sérica bovina (97,320 kD) e fosforilase B (100,886 kD).

3.5 - Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), acrescentando 1 mL do reagente de Bradford [10 mg de comassie brilliant blue G-250

dissolvido em 5 mL de metanol e 10 mL de ácido fosfórico 85%] a cada 100 μ L de amostra e homogeneizando no vórtex. A absorbância foi lida a 595 nm após 5 min. A concentração protéica foi obtida por comparação do valor de absorbância da amostra com valores da curva padrão, feita a partir de solução de ovalbumina com concentração conhecida.

3.6 - Ensaios de atividade enzimática

Todos os substratos foram ensaiados em tampão CP 100mM pH 6 a 30°C sob condições onde a atividade *in vitro* é proporcional à concentração de proteína e ao tempo. Sendo o tempo de ensaio menor que a hidrólise espontânea, permitindo calcular a velocidade inicial de hidrólise. Todos os estudos cinéticos foram feitos em mudanças na abs, usando cubeta de quartzo de 1 cm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amerchan Bioscience).

3.6.1 – Ensaio de atividade β -glicosidásica sobre metilumbeliferil- β -D-glucopiranosídeo (MUB-gluco)

Amostras dialisadas em tampão CP 100 mM pH 6 de S β gly, S β gly K201F e Tm β gly purificadas foram incubadas diferentes períodos de tempo a 30°C, sendo o volume de reação total de 120 μ L formado por 60 μ L de cada amostra da enzima diluída com tampão CP100 mM pH 6 e 60 μ L de substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosídeo (MUB-gluco) diluído no mesmo tampão. O substrato foi usado nas concentrações entre 0,1 e 8 mM, a partir de solução estoque de 16 mM. A reação foi interrompida por 3 min em fervura e a mistura de reação dividida em duas alíquotas que foram usadas na quantificação de glicose e de metilumbeliferona (MU). A fluorescência da MU foi detectada em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 450 nm após acrescentar 1 mL de tampão glicina-NH₄OH 100 mM/ pH 10,5 (Baker e Woo, 1992). A glicose foi detectada por absorbância em 420 nm após ser incubada com 1 mL do reagente TGO a 37°C por 1 h (Dahlqvist, 1968).

Alternativamente foram utilizados 500 μ L do reagente de do kit “glicose PP” da Gold Analisa Diagnóstica Ltda, posteriormente incubando os tubos em banho-maria a 30°C por 10 min

Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais.

As curvas padrão de MU e glicose nos permitem correlacionar o valor de emissão de fluorescência e absorbância, respectivamente, com a quantidade de produto formado nos ensaios de atividade.

3.6.2 – Ensaio de atividade β -glicosidásica sobre *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP β -gluco)

Amostras dialisadas em tampão CP 100 mM pH 6 de S β gly, S β gly K201F e Tm β gly purificadas foram incubadas em diferentes períodos de tempo a 30°C, sendo o volume de reação total de 120 μ L formado por 60 μ L de cada amostra da enzima e 60 μ L de substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP β -gluco) diluído em tampão CP 100 mM pH 6. Foram usadas concentrações de substrato entre 0,1 e 40 mM, a partir de solução estoque de 80 mM. A reação foi interrompida por incubação (3 min) em banho de água fervente e a mistura de reação dividida em duas alíquotas iguais que foram posteriormente usadas na quantificação de glicose e de *p*NP. O *p*NP foi detectado a 420 nm após acrescentar-se 500 μ L de tampão CB 250 mM pH 11 (Terra, 1979). A glicose foi detectada por absorbância a 540 nm utilizando-se 1 mL do reagente TGO seguida por incubação a 37°C por 1 h e adição de 500 μ L de H₂SO₄ 50% (v/v), (Dahlqvist, 1968).

Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais.

As curvas padrão de *p*NP nos permitem correlacionar o valor de absorbância–com a quantidade de produto formado nos ensaios de atividade.

3.6.3 - Curva padrão de *p*-nitrofenolato (*p*NP) e de metilumbeliferona (MU)

Curvas padrão de *p*NP foram preparadas pela diluição de uma solução estoque de *p*NP 5mM em tampão CP 100 mM pH 6 numa faixa de 5 até 75 nmols, de tal forma que o volume final sempre fosse de 50 μ L e, em seguida nestas alíquotas adicionaram-se 500 μ L de tampão CB 250 mM pH 11. A absorbância foi lida a 420 nm usando o tampão como branco.

Curvas padrão de MU foram preparadas pela diluição de uma solução estoque de MU 0,2 mM em DMSO 0,1% (v/v) em tampão CP 100 mM pH 6 , numa faixa de 0,02 até 1 nmol em um volume final de 50 μ L, e em seguida nestas alíquotas adicionou-se 1 mL de tampão glicina-NH₄OH 100 mM pH 10,5. A fluorescência foi detectada a uma excitação de 360 nm e emissão de 450 nm.

Figura 7: Curvas padrão de *p*-nitrofenolato (A) e metilumbeliferona (B).

3.6.4 - Curva padrão de glicose utilizando o reagente TGO (tris-glicose oxidase) e TGO ácido

Curvas padrão para quantificação de glicose com o reagente TGO (Dahlqvist, 1968) foram obtidas a partir da diluição em água de uma solução estoque de glicose 11,1 mM numa faixa de 5,55 até 55,51 nmols, de tal forma que o volume final sempre fosse de 50 μ L e, em seguida nestas alíquotas adicionaram-se 1 mL do reagente de TGO [15 mg glicose oxidase dissolvida em 100 mL tampão Tris-HCl 0,25 M pH 7; 1 mL solução Triton X100 e etanol 20%(v/v); 0,5 mL solução peroxidase 1 mg/mL em água; 1 mL solução de o-dianisidina 10

mg/mL em água]. Posteriormente os tubos foram incubados por 1 h a 37°C em banho-maria termostatizado. A absorbância foi lida a 420 nm usando uma mistura de água (50 µL) com reagente TGO (1 mL) como branco.

A curva padrão de TGO ácido foi obtida do mesmo modo que a curva padrão de TGO, porém a absorbância foi lida a 540 nm, após a adição de 500 µL de H₂SO₄ 50% (v/v).

As curvas padrão de TGO ácido e TGO foram refeitas a cada ensaio devido à oxidação constante do reagente de TGO.

3.6.5 – Curvas padrão de *p*-nitrofenolato (*p*NP) e de glicose na presença de metanol

A curva padrão de *p*NP na presença de metanol consistiu da diluição de uma solução estoque de *p*NP 5 mM em tampão CP 100 mM pH 6 com metanol em concentrações de 3,5 M (71 µL/mL), 7 M (142 µL/mL) e 8,2 M (152,5 µL/mL). As diluições foram preparadas em uma faixa de 5 até 75 nmols, de tal forma que o volume final sempre fosse de 50 µL e, em seguida nestas alíquotas adicionaram-se 500 µL de tampão CB 250 mM pH 11. A absorbância foi lida a 420 nm, usando solução de tampão com metanol nas concentrações acima como branco (Figura 8).

Figura 8: Curvas padrão de *p*-nitrofenolato na presença de metanol. **A)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em água; **B)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em metanol 3,5 M; **C)** curva padrão de *p*-nitrofenolato feita em metanol 7 M; **D)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em metanol 8,2 M.

A curva padrão de glicose detectada por TGO ácido na presença de metanol foi obtida a partir da diluição de uma solução estoque de glicose 11,1 mM em água com metanol em concentrações de 3,5 M (71 $\mu\text{L/mL}$), 7 M (142 $\mu\text{L/mL}$) e 8,2 M (152,5 $\mu\text{L/mL}$). As diluições foram preparadas em uma faixa de 2,78 até 55,51 nmols, de tal forma que o volume final sempre fosse de 50 μL . Em seguida nestas alíquotas adicionaram-se 1 mL do reagente TGO e os tubos foram incubados por 1 h a 37°C em banho-maria termostatizado. A absorbância (Figura 9) foi lida a 540 nm, após adição de 500 μL de H_2SO_4 50% (v/v).

Figura 9: Curvas padrão de glicose detectada com TGO ácido na presença de metanol **A)** curva padrão de glicose em TGO ácido feita em água; **B)** curva padrão de glicose em TGO ácido em metanol 3,5 M; **C)** curva padrão de glicose em TGO ácido em metanol 7 M; **D)** curva padrão de glicose em TGO ácido em metanol 8,2 M.

3.6.6 - Ensaio de atividade b-glicosidásica sobre *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (*p*NPb-gluco) na presença de metanol

Amostras de Sβgly, Sβgly K201F e Tmβgly foram incubadas por 4 diferentes períodos de tempo a 30°C em tubos de polipropileno saturados com metanol. O volume total de reação foi de 120 μL formado por 60 μL de cada amostra da enzima e 60 μL de substrato *p*NPb-gluco 4 mM preparados em tampão CP 100 mM pH 6 contendo metanol 3,5 M (142 μL/mL), 7 M (284 μL/mL) ou 8,2 M (305 μL/mL). A reação foi interrompida por incubação (3 min) em banho de água fervente e a mistura de reação dividida em duas alíquotas que foram usadas na quantificação de glicose e de *p*NP.

Como controle foi realizado um ensaio nas mesmas condições com o substrato diluído em tampão CP 100 mM pH 6, ou seja, na ausência de metanol.

3.6.7 - Curva padrão de *p*-nitrofenolato (*p*NP)e de glicose detectada por TGO ácido na presença de isopropanol

A curva padrão de *p*NP na presença de isopropanol consistiu da diluição de uma solução estoque de *p*NP 5 mM em tampão CP 100 mM pH 6 com isopropanol em concentrações de 1 M (38 μ L/mL), 3,5 M (134 μ L/mL), 7 M (268 μ L/mL) e 8,2 M (314 μ L/mL). As diluições foram preparadas em uma faixa de 5 até 75 nmols, de tal forma que o volume final sempre fosse de 50 μ L e, em seguida nestas alíquotas adicionaram-se 500 μ L de tampão CB 250 mM pH 11. A absorbância foi lida a 420 nm, usando solução de tampão com isopropanol nas concentrações acima como branco (Figura 10).

A curva padrão para detecção de glicose com TGO ácido na presença de isopropanol foi obtida a partir da diluição de uma solução estoque de glicose 11,1 mM em água com isopropanol em concentrações de 1 M (38 μ L/mL), 3,5 M (134 μ L/mL), 7 M (268 μ L/mL) e 8,2 M (314 μ L/mL). A curva padrão foi preparada em uma faixa de 2,78 até 55,51 nmols, de tal forma que o volume final sempre fosse de 50 μ L. Em seguida, nestas alíquotas adicionaram-se 1 mL do reagente de TGO e os tubos foram incubados por 1 h a 37°C em banho-maria termostatizado. A absorbância foi lida a 540 nm após a adição de 500 μ L de H₂SO₄ 50% (v/v), (Figura 11).

Figura 10: Curvas padrão de *p*-nitrofenolato na presença de isopropanol. **A)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em água; **B)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em isopropanol 1 M; **C)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em isopropanol 3,5 M; **D)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em isopropanol 7 M; **E)** curva padrão de *p*-nitrofenolato em isopropanol 8,2 M.

Figura 11: Curvas padrão de glicose detectada por TGO ácido na presença de isopropanol. **A)** curva padrão de glicose com TGO ácido em água; **B)** curva padrão de glicose com TGO ácido em isopropanol 1 M; **C)** curva padrão de glicose com TGO ácido em isopropanol 3,5 M ; **D)** curva padrão de glicose com TGO ácido em isopropanol 7 M; **E)** curva padrão de glicose com TGO ácido em isopropanol 8,2 M.

3.6.8 - Ensaio de atividade b-glicosidásica sobre *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na presença de isopropanol

Amostras de S β gly, S β gly K201F e Tm β gly foram incubadas por 4 diferentes períodos de tempo a 30°C em tubos de polipropileno saturados com isopropanol. O volume de reação total foi de 120 μ L formado por 60 μ L de amostra da enzima (S β gly ou Tm β gly

diluída 26,6x) e 60 μL de substrato $p\text{NP}\beta\text{-gluco}$ 4 mM em tampão CP 100 mM pH 6 com isopropanol 1 M (76 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 3,5 M (268 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 7 M (536 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e 8,2 M (628 $\mu\text{L}/\text{mL}$). A reação foi interrompida por 3 min em fervura, e a mistura de reação dividida em duas alíquotas que foram usadas na quantificação de glicose e de $p\text{NP}$. O $p\text{NP}$ foi quantificado por absorbância a 420 nm e a glicose por absorbância a 540 nm após ser incubada com 1 mL do reagente TGO a 37°C por 1 h e a seguir receber 500 μL de H_2SO_4 50% (v/v).

3.6.9 - Curva padrão de p -nitrofenolato ($p\text{NP}$) e de glicose detectada por TGO ácido na presença de n -propanol

A curva padrão de $p\text{NP}$ na presença de n -propanol (Figura 12) foi obtida do mesmo modo que a curva padrão de $p\text{NP}$ na presença de isopropanol, porém as concentrações de n -propanol foram 1 M (37 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 3,5 M (131 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 7 M (261 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e 8,2 M (306 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Figura 12: Curvas padrão de *p*-nitrofenolato na presença de *n*-propanol. **A)** curva padrão de *p*-nitrofenolato feita em *n*-propanol 1 M; **B)** curva padrão de *p*-nitrofenolato feita em *n*-propanol 3,5 M; **C)** curva padrão de *p*-nitrofenolato feita em *n*-propanol 7 M; **D)** curva padrão de *p*-nitrofenolato feita em *n*-propanol 8,2 M.

A curva padrão de glicose detectada por TGO ácido na presença de isopropanol (Figura 13) foi obtida do mesmo modo que descrito para curva padrão na presença de isopropanol, porém as concentrações foram 1 M (37 $\mu\text{L/mL}$), 3,5 M (131 $\mu\text{L/mL}$) 7 M (261 $\mu\text{L/mL}$) e 8,2 M (306 $\mu\text{L/mL}$).

Figura 13: Curvas padrão de glicose detectada por TGO ácido na presença de *n*-propanol. **A)** curva padrão de glicose com TGO ácido feita em *n*-propanol 1 M; **B)** curva padrão de glicose com TGO ácido feita em *n*-propanol 3,5 M; **C)** curva padrão de glicose com TGO ácido feita em *n*-propanol 7 M; **D)** curva padrão de glicose com TGO ácido feita em *n*-propanol 8,2 M.

3.6.10 - Ensaio de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP β -gluco) na presença de *n*-propanol

Amostras de S β gly, S β gly K201F e Tm β gly foram incubadas por 4 diferentes períodos de tempo a 30°C em tubos de polipropileno saturados com *n*-propanol. O volume de reação total foi de 120 μ L formado por 60 μ L de cada amostra da enzima (S β gly ou Tm β gly diluída 26,6x) e 60 μ L de substrato *p*NP β -gluco 4 mM em tampão CP 100 mM pH 6 com *n*-propanol 1 M (75 μ L/mL), 3,5 M (261 μ L/mL) 7 M (522 μ L/mL) e 8,2 M (612 μ L/mL). A reação foi interrompida por 3 min em fervura, e a mistura de reação dividida em duas alíquotas que foram usadas na quantificação de glicose e de *p*NP. O *p*NP foi detectado por absorbância a 420 nm e a glicose por absorbância a 540 nm após ser incubada com 1 mL do reagente TGO a 37°C por 1 h e receber a adição de 500 μ L de H₂SO₄ 50% (v/v).

3.7 – Cromatografia de camada delgada em placas de sílica-gel - TLC

Amostras de S β gly, S β gly K201F e Tm β gly foram incubadas com *p*NP β -gluco por 18 h, 3 h e por 30 min a 30°C em tubos de polipropileno fechados e saturados com metanol. A saturação foi garantida pela colocação de papel de filtro embebido em metanol na parte interna da tampa dos tubos e mostrou-se importante para evitar a diminuição da concentração do metanol em solução devido à evaporação. A mistura de reação continha 60 μ L de cada amostra de enzima e 60 μ L de substrato *p*NP β -gluco 4 mM ou 40 mM, preparado em tampão CP 100 mM pH 6 com metanol 8,2 M (305 μ L/mL), totalizando um volume de reação de 120 μ L, sendo a reação interrompida por fervura (3 min).

Na placa de poliéster pré-revestida de sílica-gel (Polygram SILC da Aldrich Chemical Company) marcada com linha de base, cerca de 2 cm acima do início da placa; foram aplicadas as amostra com o auxílio de um tubo capilar, com distância entre si de 2 cm, repetindo a aplicação em intervalos de tempo suficientes para secar a aplicação anterior. A placa foi incubada verticalmente em cuba cromatográfica previamente saturada com a fase móvel [clorofórmio 60% e metanol 40% (v/v)] para separar metilglucosídeos e glicose ou [acetonitrila 70% e H₂O 30% (v/v)] para separar *p*-nitrofenilcelobiosídeo e glicose. As placas foram posicionadas de forma a manter contato com a fase móvel em nível abaixo do nível das amostras (linha de base). Após 1 hora e 30 min, quando a fase móvel atingiu a linha de chegada cerca de 15 cm após a linha de base, a placa foi retirada da cuba e a fase móvel evaporada em capela. O revelador [3 g de fenol diluído em 5 mL de H₂SO₄ e 95 mL de etanol] foi aspergido sobre a placa e esta foi incubada por 15 min em estufa a 110°C. Soluções de 1 μ g/mL de glicose, *p*NP, metil- α -glucosídeo, metil- β -glucosídeo e *p*-nitrofenilcelobiosídeo foram utilizadas como padrão de referência em uma massa final de 5 μ g.

3.8 - Determinação de parâmetros cinéticos

Utilizando-se o material contendo as enzimas Sfbgly, Sfbgly K201F e Tmbgly purificadas foram feitos uma série de ensaios enzimáticos nos quais foram determinadas as velocidades de hidrólise para 10 diferentes concentrações de substrato, 0,1 a 40 mM de *p*NPβ-gluco e 0,1 a 8 mM para MUβ-gluco, conforme ensaio descrito nos itens anteriores.

Dados experimentais das velocidades de reação de hidrólise em função das concentrações de substrato que seguem uma cinética michaeliana, foram ajustados na equação abaixo, através do programa Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987). Este processo gerou os parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_m) referentes às reações de hidrólise.

$$\text{velocidade de produção de glicose} = F \%H \times v_H \quad \text{onde } (v_H = V_{\max} [S]/K_m + [S])$$

Os parâmetros cinéticos para transglicosilação foram ajustados manualmente por simulação numérica em uma equação que segue o modelo de reação do tipo ping-pong.

$$\text{velocidade de transglicosilação} = F \%T \times v_T$$

$$\text{sendo } v_T = (V_{\max} [S_1][S_2]/K_{m2} [S_1] + K_{m1} [S_2] + [S_1][S_2])$$

A velocidade de produção de *p*NP ou MU (P_1) é igual à soma das velocidades de produção de glicose (v_H) e de transglicosilação (v_T), ou seja,

$$v = F \%H(V_{\max} [S]/K_m + [S]) + F \%T(V_{\max} [S_1][S_2]/K_{m2} [S_1] + K_{m1} [S_2] + [S_1][S_2])$$

$F \%H$ e $F \%T$ referem-se à probabilidade de ocorrência de hidrólise e transglicosilação em função da concentração de substrato, ou seja, refletem qual a fração de uma população de intermediários covalentes que segue cada uma destas duas rotas de reação. Estes parâmetros foram determinados experimentalmente a partir da razão de produção de *p*NP ou MU ($v_H + v_T$) por produção de glicose (v_H), assumindo-se que sendo 100% a somatória de $F \%H$ e $F \%T$, então $v_H + v_T = 1$. Assim, por exemplo se $(v_H + v_T) / v_H = 1,5$ então $v_H = 1/1,5$ e $v_T = 1 - (1/1,5)$.

3.9 - Procedimentos para manipulação e análise de DNA

Os procedimentos experimentais de técnicas de DNA recombinante foram adaptados de manuais dos fabricantes de reativos para Biologia Molecular, bem como de protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) e McPherson & Moller (2006).

3.9.1 - PCR em termociclador

Para amplificação das sequências codificadoras das enzimas recombinantes foram realizadas reações de PCR utilizando um termociclador Robocycler Gradient 96 (StratageneTM Agilent Technologies). Em um microtubo de plástico de 200 µL foi preparada a reação:

- 5 µL de tampão 10x PCR Buffer minus Mg (InvitrogenTM Life Technologies);
- 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (InvitrogenTM Life Technologies);
- 1 µL da mistura de dNTP 10 mM;
- 1,5 µL do iniciador sense 100 µM;
- 1,5 µL do iniciador antisense 100 µM;
- 1 µL de DNA (10-100 ng/µL);
- 0,5 µL da Platinum Taq DNA Polimerase (InvitrogenTM Life Technologies);
- 38 µL de H₂O (q. s. p. v_{final} 50 µL).

Tabela 1: Programa do Termociclador.

Etapas	Janela	Temperatura	Tempo (minutos)	Nº de ciclos
Desnaturação	1	94°C	3	1
Desnaturação		94 °C	1	
Anelamento dos Iniciadores	2	50 °C	1	30
Extensão		72 °C	1	
Extensão Final	3	72 °C	7	1

O resultado da reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 2%, conforme descrito abaixo.

3.9.2 - Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose (Grau Biologia Molecular, BioAgency) foi preparado em uma concentração de 1 a 2% (m/v) em tampão TAE [Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8] e montado sobre a cuba de eletroforese Horizon 58 (Whatman®). A eletroforese foi realizada neste mesmo tampão cobrindo completamente o gel, sob voltagem constante de 80 V e 180 mA a temperatura ambiente durante 45 min a 1 h em fonte para eletroforese (Amersham Pharmacia Biotec EPS301).

Para o padrão foi preparada uma mistura contendo 2 µL de tampão de amostra 6x ou com 1 µL de tampão Blue Green Loading dye I (LGC Biotecnologia), 5 µL de água deionizada e autoclavada e 5 µL de padrão de tamanho molecular “O’Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder” 0,5 µg/µL (Fermentas®). O material amplificado a ser analisado foi preparado com 2 µL de tampão de amostra 6x e 10 µL do produto de PCR, ou com 1 µL de tampão Blue Green Loading dye I (LGC Biotecnologia) e 10 µL do produto de PCR.

A corrida foi interrompida quando o corante percorreu aproximadamente 4/5 da distância entre o local de aplicação e o limite inferior do gel. Posteriormente, o DNA foi corado utilizando-se uma solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL por 10 min e visualizado a 312 nm em transluminador 2020E (Stratagene™ Agilent Technologies). No caso do uso do tampão Blue Green Loading dye I (LGC Biotecnologia) durante a corrida, os géis também foram analisados a 312 nm em transluminador 2020E (Stratagene™ Agilent Technologies) e fotografados para análise e registro dos resultados.

Os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA conhecidos.

3.9.3 - Quantificação de DNA por espectrofotometria

As amostras contendo DNA foram quantificadas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience) utilizando-se cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. As medidas foram realizadas nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A amostra foi diluída em água (DNA plasmidial 1:250) para um volume final de 0,5 mL, utilizando somente água como branco. O valor de absorbância a 260 nm foi correspondente à quantidade de DNA na amostra e a razão 260/280 indicou a sua pureza, sendo que valores próximos de 2,0 evidenciam maior pureza. A concentração da amostra foi calculada utilizando a fórmula:

$$[\text{DNA fita dupla}] \text{ (mg/mL)} = A_{260\text{nm}} \times 0,05 \times \text{diluição}$$

3.9.4 - Sequenciamento automatizado de DNA dos plasmídeos mutantes

As reações de sequenciamento de DNA plasmidial foram feitas na central de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP – São Paulo. O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante.

Em uma placa de 96 poços foi preparada a reação:

- 3 µL de tampão 5x sequencing buffer (PE Applied Biosystems);
- 3 µL do iniciador (3,2 pmol/µL);
- 1 µL de DNA molde (100-200 ng/µL);
- 2 µL da enzima Big Dye Terminator v3.1 (PE Applied Biosystems);
- 6 µL de H₂O (q. s. p. v_{final} 15 µL).

Tabela 2: Programa do Termociclador Appied Byosystems GeneAmp® 9700.

Etapas	Janela	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	1	94°C	1 a 2 min	1
Desnaturação		94 °C	45 s	
Anelamento dos Iniciadores	2	50 °C	30 s	35
Extensão		60 °C	4 min	

Uma vez encerrada a amplificação, as amostras foram precipitadas com glicogênio de acordo com a orientação do fabricante. Aos 15 µL da reação de sequenciamento adicionaram-se 25 µL do “cocktail” de precipitação [25 µL de etanol 100% gelado (P.A.); 1 µL de NaOAc 3 M, pH 5,2; 1 µL de glicogênio 1 mg/mL]. As amostras foram agitadas e mantidas em gelo por 15 min e posteriormente foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 min à temperatura ambiente. O excesso do “cocktail” foi descartado, dando a seguir dois pulsos de centrifugação a 1.000 rpm com a placa invertida. Adicionaram-se 50 µL de etanol 70% gelado por reação sem agitar, repetindo a seguir a centrifugação e a drenagem dos tubos. Os micro-tubos abertos foram secos a 95°C por 1min em termociclador e a amostra foi enviada para o Serviço de Sequenciamento de DNA selada e envolta com papel alumínio.

O inserto codificando Stßgly K201F foi sequenciado por inteiro utilizando os seguintes “primers”:

1º sequenciamento

T7.....5´ - TAATACGACTCACTATAGGG - 3´

FIM.....5´ - GAACCAGTCGCTGATGAG - 3´

AGAIN5´ - GGTCCGAGAAATCTACTTC - 3´

2X0.....5´ - CCTGTCTCCTAAGTTCAGC - 3´

SEQ331.....5´ - CCAAGGAGCTTTCAGACAAG - 3´

SEQ399.....5' - GATGATAGCTGGCTCAAGTC - 3'

SEQ187.....5' - CCTCATCAGCGACTGGTTCG - 3'

GOL.....5' - CAGCCATTCTCAAGTGATGTAG - 3'

2º sequenciamento

T7.....5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

SEQ1REV3' - CGAATGTCCAAGAGGGAGAGG - 5'

SEQ1FW.....5' - AGCCTCCTACCAGATCGAAGG - 3'

SEQ2FW.....5' - CTGATCACGCTCTACCATTTGG - 3'

SEQ3FW.....5' - GGTGGTCAGTGCGGTATTACC - 3'

SEQ4FW.....5' - CGCAAAGGTCCGTACCCTGTG - 3'

SEQ5FW.....5' - GCTTGGAGTCTAATGGACAAC - 3'

A análise das sequências geradas foi feita utilizando os programas Chromas Lite 2.01 e ChromasPro 1.4 beta (Softpedia) e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

3.9.5 - Reações de mutagênese sítio-dirigida na sequência de Sfb gly

A construção dos mutantes foi realizada através do “kit” *QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis* (StratageneTM Agilent Technologies) usando como molde um plasmídeo pT7-7 (Tabor; Richardson, 1985) com inserto de DNA que codifica para a Sfb gly selvagem madura (pT7B50).

A introdução da mutação caracteriza-se pela amplificação em termociclador de toda a extensão do vetor, utilizando dois iniciadores mutagênicos (detalhados no item abaixo) que durante a amplificação são incorporados nos produtos da reação (fitas filhas), resultando em vetores linearizados contendo a mutação desejada, seguida da destruição do DNA molde parental com uma endonuclease de restrição dependente de metilação.

Para a produção e a amplificação dos fragmentos de DNA oriundos da reação de PCR1 e PCR2 foi utilizada a enzima de alta fidelidade Platinum *Pfu*[®] turbo DNA polimerase (InvitrogenTM Life Technologies) a fim de garantir fidelidade e reduzir a probabilidade de mutações secundárias.

3.9.5.1 - Descrição dos iniciadores

Nas reações de mutagênese sítio-dirigida foram utilizados os seguintes iniciadores oligonucleotídicos complementares às sequências de DNA de interesse, mas contendo códons que dirijam a mutação planejada, para que ocorresse a introdução de 1 códon mutante na sequência da *Sfβgly* (apenas as fitas senso são listadas).

Mutante K201F

K201F1 5'- GGTTATGGATCTGCTACT**TCGCTCCGATCCTAAACGC** -3'

K201F2 5'- GCGTTTAGGATCGGAGCG**AAGGTAGCAGATCCATAACC** -3'

Todos os iniciadores contendo os códons mutantes (em negrito) possuem temperatura de anelamento maior ou igual a 66°C, cerca de 51 a 56% de GC e os códons mutantes estão localizados no meio do iniciador, sendo ladeados por cerca de 10-15 nucleotídeos idênticos à sequência molde. Estas características são importantes para que haja incorporação das mutações com sucesso.

Os iniciadores foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT) através da Prodimol Biotecnologia S/A. Os iniciadores foram fornecidos liofilizados e purificados pelo método padrão da IDT. Todos os iniciadores foram ressuspensos em água ultrapura suficiente para a concentração final de 100 µM.

Quando foram utilizados para reações de sequenciamento, procedeu-se a diluição em água ultrapura para a concentração final de 5 µM.

3.9.5.2 – Digestão com enzima de restrição *Dpn I*

Posteriormente, os 50 µL da reação de mutagênese sítio-dirigida foram digeridos com 0,1 µL da enzima de restrição *Dpn I* (Fermentas[®]), incubando a 37°C por uma noite (18 h). Esta enzima reconhece uma sequência de nucleotídeos GATC metilada na adenina. Dessa forma, apenas o plasmídio molde na forma metilada, cujo inserto não possui a mutação, é digerido pela enzima. Já os produtos de PCR obtidos *in vitro* contendo a mutação desejada não estão metilados e nada sofrem pela ação da *DpnI*, permanecendo, conseqüentemente, na mistura de reação.

Todo conteúdo do produto da digestão foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3) e as colônias selecionadas pelo antibiótico em placas de LB ágar, foram utilizadas na extração e purificação de plasmídios (ver item 3.1.7).

Estes plasmídios purificados foram então submetidos a um sequenciamento de DNA (ver item 3.9.4), para verificar a incorporação da mutação desejada no fragmento de DNA que codifica os mutantes das enzimas.

3.9.6 – Clonagem no vetor de expressão pPIC9

Os insertos clonados no plasmídio pT7-7 foram transferidos para vetores de expressão pPIC9 (Figura 14), segundo as etapas a seguir:

Os fragmentos dos insertos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 3.9.2. O restante do produto da amplificação foi usado na reação de digestão descrita a seguir.

3.9.6.3 – Digestão com enzimas de restrição

Os fragmentos de inserto mutante K201F amplificado e os plasmídios purificados foram digeridos, separadamente, inicialmente seguindo o protocolo e reagentes da New England BioLabs, com enzimas de restrição a 37°C durante 16 h.

Em cada tubo foi preparada a reação:

plasmídio pPIC9	Inserto mutante
– 13,5 µL de plasmídio pPIC9 (4 µg);	– 10 µL de inserto mutante K201F;
– 1 µL da enzima de restrição <i>XhoI</i> 2U/µL;	– 1 µL da enzima de restrição <i>XhoI</i> 2U/µL;
– 1 µL da enzima de restrição <i>NotI</i> 1 U/µL;	– 1 µL da enzima de restrição <i>NotI</i> 1 U/µL;
– 2 µL de tampão nº3;	– 2 µL de tampão nº3;
– 2 µL de BSA 10x;	– 2 µL de BSA 10x;
– 0,5 µL de H ₂ O (q.s.p. v_{final} 20 µL).	– 4 µL de H ₂ O (q.s.p. v_{final} 20 µL).

Posteriormente seguiu-se o protocolo sugerido pela Fermentas[®] e seus reagentes, como descrito abaixo:

Em cada tubo foi preparada a reação:

plasmídio pPIC9	
– 13,5 µL de plasmídio pPIC9 (4µg);	– 2 µL de tampão O;
– 4 µL da enzima de restrição <i>XhoI</i> ;	– 2 µL de BSA 10x;
– 2 µL da enzima de restrição <i>NotI</i> ;	– 1,5 µL de H ₂ O (q.s.p. v_{final} 20 µL).

Inserto mutante

- 10 μ L de inserto mutante K201F;
- 4 μ L da enzima de restrição *XhoI*;
- 2 μ L da enzima de restrição *NotI*;
- 2 μ L de tampão O;
- 2 μ L de BSA 10x;
- 5 μ L de H_2O (q.s.p. v_{final} 20 μ L)

Finalmente, os insertos com mutação K201F e o plasmídeo foram submetidos separadamente, à dupla digestão rápida com FastDigest[®] enzymes, a 37°C por 30 min, seguindo as instruções do fabricante (Fermentas[®]).

Em cada tubo foi preparada a reação:

Plasmídeo pPIC9

- 2 μ L de plasmídeo pPIC9 (>1 μ g);
- 1 μ L da enzima FastDigest *XhoI*;
- 1 μ L da enzima FastDigest *NotI*;
- 2 μ L de FastDigest buffer 10x;
- 14 μ L de H_2O (q.s.p. v_{final} 20 μ L).

Inserto mutante

- 2 μ L de inserto mutante K201F;
- 1 μ L da enzima FastDigest *XhoI*;
- 1 μ L da enzima FastDigest *NotI*;
- 2 μ L de FastDigest buffer 10x ;
- 14 μ L de H_2O (q.s.p. v_{final} 20 μ L).

3.9.6.4 - Purificação dos produtos de PCR a partir do gel de agarose

Os produtos de digestão do inserto mutante K201F amplificado por PCR e do plasmídeo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (item 3.9.2). Após eletroforese, a banda de interesse foi extraída do gel de agarose e o fragmento de DNA proveniente do PCR foi recuperado e purificado usando o protocolo do kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega Corporation), seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram estocados a -20°C.

A fim de reduzir as perdas durante a eletroforese, na dissolução da agarose e extração, os produtos da reação de digestão do inserto mutante K201F e do plasmídeo foram também purificados diretamente da reação de amplificação usando o protocolo do kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega Corporation), seguindo as instruções do fabricante.

3.9.6.5 – Ligação do inserto mutante K201F ao vetor de expressão pPIC9

Após a digestão seguiu-se imediatamente a reação de ligação do inserto mutante K201F ao vetor pPIC9. Inicialmente foi adotado o protocolo sugerido pela Fermentas[®], e assim incubando a mistura descrita abaixo a 20°C por 16 h.

- 5 µL de vetor pPIC9 linear ;
- 10 µL de inserto com mutação K201F digerido;
- 2 µL de tampão T4 DNA ligase 10x (Fermentas[®]);
- 2 µL de solução de PEG 4000 50%;
- 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Fermentas[®]);
- X µL de H₂O (q. s. p. v_{final} 20 µL).

Também foi utilizado o protocolo sugerido pela Promega Corporation, incubando assim a 22°C por 1 h em um micro-tubo, a reação contendo:

- 2 µL de vetor pPIC9 linear (20-100 ng);
- 2,1 µL de inserto com mutação K201F amplificado (1:5 molar);
- 2 µL de tampão T4 DNA ligase 10x (Promega Corporation);
- 2 µL de solução de PEG 4000 50%;
- 1 µL da enzima T4 DNA ligase (1-5 U/ Promega Corporation);
- X µL de H₂O (q. s. p. v_{final} 20 µL).

Todo conteúdo das reações de ligação foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3) e as colônias selecionadas pelo antibiótico em placas de LB ágar, foram utilizadas na extração e purificação de plasmídeos (ver item 3.1.7).

3.9.7 – Clonagem no vetor de expressão pET46

Os insertos clonados no plasmídio pT7-7 foram transferidos para vetores de expressão pET46 (Figura 15), segundo as etapas a seguir:

Figura 15: A) Visão geral do vetor de expressão pPIC9; **B)** Detalhe da região de clonagem do inserto (“cloned insert”).

3.9.7.1 – Estoque de inserto com mutação K201F

As amostras do inserto com mutação K201F foram submetidas à amplificação por PCR como descrito no item 3.9.1, utilizando os iniciadores abaixo, seguindo o protocolo sugerido pela Novagen® Merck Biosciences:

pET46BG5N 5’-GACGACGACAAGATCCAGCAGCGCCGCTTCCCCGATGAC–3’

pET46BG3C 5’- GAGGAGAAGCCCGGTTCAATGTCCCTCATCTATAGTC –3

Os fragmentos dos insertos amplificados foram submetidos à purificação a partir de eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 3.9.6.4 utilizando-se Tris-HCl 10 mM com EDTA 0,1 mM pH 8 na etapa de eluição. O material eluído foi posteriormente utilizado na reação descrita abaixo.

3.9.7.2.– Tratamento com enzima T4 DNA polimerase

Após a purificação dos insertos amplificados por PCR (item 3.9.6.4), estes sofreram tratamento com a enzima T4 polimerase, usando o protocolo do kit *pET-46 Ek/LIC Cloning* (Novagen® Merck Biosciences)

Em um micro-tubo foi preparada a reação abaixo que foi incubada a 22°C por 30 min:

- 1,5 µL de inserto com mutação K201F extraído;
- 2 µL de tampão T4 DNA 10x (Novagen® Merck Biosciences);
- 2 µL da mistura de dNTP 25 mM;
- 1 µL de solução de DTT 100 mM (Novagen® Merck Biosciences);
- 0,4 µL da enzima T4 DNA polimerase (Novagen® Merck Biosciences);
- 13,1 µL de H₂O (q. s. p. v_{final} 20 µL).

Posteriormente a enzima foi inativada incubando por mais 20 min a 75°C.

3.9.7.3.– Anelamento do vetor Ek/LIC ao inserto mutado

Após o tratamento com a enzima T4 polimerase seguiu-se imediatamente a reação de anelamento do inserto mutante K201F ao vetor Ek/LIC, inicialmente seguindo o protocolo sugerido pela Novagen® Merck Biosciences, incubando-a a 22°C por 5 min em um micro-tubo contendo:

- 1 µL de vetor Ek/LIC (Novagen® Merck Biosciences);
- 2 µL do produto do tratamento com T4 DNA polimerase ;

Posteriormente acrescentou-se 1 µL de EDTA 25 mM (Novagen® Merck Biosciences) incubando por mais 5 min a 22°C.

Todo conteúdo do produto do anelamento foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3) e as colônias selecionadas pelo antibiótico em placas de LB ágar, foram utilizadas na extração e purificação de plasmídeos (ver item 3.1.7).

Estes plasmídios purificados foram também submetidos a um sequenciamento de DNA (ver item 3.9.3), para verificar a incorporação da mutação desejada no fragmento de DNA que codifica os mutantes das enzimas.

4 – Resultados e Discussão

Buscando entender as bases moleculares do balanço entre reações de hidrólise e transglicosilação em β -glicosidases, este projeto propôs-se a estudar comparativamente as β -glicosidases de *S. frugiperda* (Sf β gly) e *T. molitor* (Tm β gly) e um mutante de Sf β gly no qual o resíduo K201, possivelmente presente no subsítio +1 desta enzima (Mendonça e Marana, 2008), foi trocado pelo resíduo fenilalanina (Sf β gly K201F), que ocupa posição equivalente em Tm β gly. A caracterização paralela destas três β -glicosidases permitirá estabelecer correlações entre as propriedades observadas para as formas selvagens e o tipo de resíduo que ocupa a posição potencialmente (201/183) envolvida no acesso da água ao intermediário covalente.

Assim, nesta dissertação será apresentada inicialmente a construção do mutante de Sf β gly K201F por meio de mutagênese sítio dirigida para então a expressão e caracterização das 3 β -glicosidases serem expostas simultaneamente.

4.1 – Mutação sítio-dirigida na sequência da β -glicosidase de *S. frugiperda* (Sf β gly)

Um plasmídeo pT7-7 contendo um inserto que codifica para Sf β gly selvagem foi usado como molde no experimento de mutação sítio-dirigida. A fim de verificar a incorporação da mutação desejada, foi efetuada uma reação de sequenciamento de DNA plasmidial (item 3.9.4) na central de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP – São Paulo (Figura 16).

Figura 16: Eletroferograma da reação de sequenciamento do plasmídeo pT7-7 codificando para a β -glicosidase de *S. frugiperda* mutada na posição K201. **A)** mutante K201F sequenciado pelo “primer” SEQ187; **B)** mutante K201F sequenciado pelo “primer” T7. O retângulo em destaque indica os nucleotídeos mutados.

4.2 – Clonagem da sequência codificadora do mutante K201F no vetor de expressão pPIC9

Inicialmente foram feitas tentativas para transferir o inserto com mutação K201F clonado no plasmídeo pT7-7 para o vetor de expressão pPIC9 conforme descrito no item 3.9.6.

Foram realizadas reações de PCR (item 3.9.1) com os “primers” 5NPBG e 3CPBG para amplificação das sequências codificadoras da enzima mutante. A reação de amplificação (PCR) foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 2%, conforme descrito no item 3.9.2, e apresentou um produto amplificado com tamanho aproximado de 1,5 Kb (resultado não mostrado).

O produto de PCR purificados e o plasmídeo pPIC9 foram digeridos, separadamente, com as enzimas de restrição *Xho*I e *Not*I utilizando inicialmente o protocolo sugerido pela New England BioLabs (item 3.9.6.3).

Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (item 3.9.2), de onde o fragmento de DNA correspondente ao inserto amplificado em PCR e ao plasmídeo foram recuperados usando o protocolo do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* descrito no item 3.9.6.4 (Figura 17).

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação de digestão do vetor pPIC9 e do produto de PCR que codifica o inserto mutante Sfßgly K201F.

Após a digestão seguiu-se imediatamente a reação de ligação do inserto mutante no vetor de expressão pPIC9 linearizado através de reação catalisada por T4 DNA ligase, inicialmente seguindo o protocolo proposto pela Fermentas[®], conforme item 3.9.6.5.

Todo conteúdo do produto da ligação foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3). As colônias selecionadas em placas de LB Ágar com ampicilina foram cultivadas em meio líquido e seu DNA plasmidial utilizado em reações de PCR com os “primers” 5AOX e 3AOX (item 3.9.1), seguido de análise em eletroforese em gel de agarose 2% (item 3.9.2), para verificar a correta ligação dos insertos mutados no vetor de expressão pPIC9. Porém, não houve amplificação, indicando que os insertos mutados não se ligaram corretamente ao vetor de expressão (resultado não mostrado).

Não sendo clara a causa do resultado negativo, a digestão foi repetida seguindo o protocolo sugerido pela Fermentas[®] com enzimas e tampão novos (item 3.9.6.3). Além disso, houve redução de uma etapa na purificação dos produtos de digestão, utilizando diretamente a mistura de reação no protocolo do kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* (item

3.9.6.4). Posteriormente seguiu-se a reação de ligação conforme o protocolo sugerido pela Promega Corporation (item 3.9.6.5). Todo conteúdo do produto da ligação foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3).

Para verificar a ligação correta dos insertos mutados ao vetor de expressão pPIC9, a partir das colônias transformadas foi realizada reação de PCR (item 3.9.1) com os “primers” 5AOX e AGAIN (específicos para Sffgly), seguido de análise em eletroforese em gel de agarose 2% (item 3.9.2). Porém, novamente não apareceram bandas com tamanho esperado (resultado não mostrado) indicando que a reação de digestão e posterior ligação foi falha.

Em uma terceira tentativa os insertos mutantes e o plasmídeo foram submetidos separadamente, à dupla digestão rápida com “FastDigest® Enzymes” (item 3.9.6.3) seguida da extração das bandas de interesse do gel de agarose 1% (itens 3.9.2 e 3.9.6.4). Seguiu-se imediatamente a reação de ligação seguindo o protocolo da Promega Corporation (item 3.9.6.5). Paralelamente foi feito um controle da atividade da T4 DNA ligase usando o DNA do fago Lambda previamente digerido, segundo instruções do fabricante da ligase. Este controle mostrou que a T4 DNA Ligase encontrava-se funcional.

Assim, as reações de ligação foram utilizadas para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3), usando como controle da transformação a reação de ligação apenas com plasmídeo linearizado (sem inserto); a reação de ligação sem plasmídeo e sem inserto e a reação de ligação apenas com inserto.

As colônias transformadas foram utilizadas em reações de PCR com os “primers” 5AOX e 3AOX (item 3.9.1), seguido de análise em eletroforese em gel de agarose 2% (item 3.9.2), para verificar a correta ligação do inserto mutado no vetor de expressão pPIC9. Como visualizado na Figura 18, apareceram apenas bandas referentes ao plasmídeo vazio.

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias transformadas contendo os produtos da ligação. **Padrão.** Marcador de peso molecular O'Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas[®]); **Raia 1.** Mistura das reações usadas como controle positivos partindo do plasmídeo pPIC9 vazio (500 pb) e do plasmídeo pPIC9 com o inserto da Sfβgli selvagem (1700 pb); **Raia 2.** amostra 1 (~500 pb); **Raia 3.** amostra 2 (~500 pb); **Raia 4.** amostra 3 (~500 pb).

Essa etapa de verificação se tornou importante, pois, tivemos colônias transformadas com plasmídeo fechado e sem inserto, indicativo de que o vetor pPIC9 não foi adequadamente linearizado.

Também foi utilizada uma estratégia baseada na mutação sítio-dirigida tendo o plasmídeo pPIC9-Sfβgly diretamente como molde e finalmente empregou-se uma estratégia de produção de um “megaprimer” que correspondia ao inserto codificando Sfβgly K201F que foi utilizado na tentativa de amplificar todo plasmídeo pPIC9-Sfβgly. Contudo, estas estratégias também foram mal sucedidas.

Frente as diversas tentativas frustradas optou-se por abandonar o sistema de expressão com o vetor pPIC9 em *Pichia pastoris*.

4.3 – Clonagem do segmento de DNA codificador de Sfbgly K201F no vetor de expressão pET 46

O inserto que codifica Sfbgly com mutação K201F clonado no plasmídeo pT7-7 foi transferido para vetores de expressão pET 46 conforme descrito no item 3.9.7.

O inserto mutante foi amplificado por PCR com os “primers” pET46BG5N e pET46BG3C, seguindo o protocolo sugerido pela Novagen[®] Merck Biosciences (item 3.9.1). O resultado da reação de PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 2% (item 3.9.2), com padrão de tamanho molecular “O’Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder” 0,5 µg/µL (Fermentas[®]), e apresenta 1,5 Kb de tamanho visualizado na Figura 19 abaixo.

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado usando o plasmídeo pT7 com o inserto que codifica a Sfbgly K201F para visualização e extração de bandas. **Padrão.** Marcador de peso molecular O’Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas[®]); **Raia 1 e 2.** inserto Sfbgly K201F (~1500 pb).

A banda de interesse foi extraída do gel e os fragmentos de DNA mutados foram recuperados usando o protocolo do kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System descrito no item 3.9.6.4. Após a purificação seguiu-se imediatamente o tratamento com a enzima T4

polimerase e o anelamento do inserto mutante ao vetor pET46, usando o protocolo do kit *pET-46 Ek/LIC Cloning*, conforme itens 3.9.7.2 e 3.9.7.3 (Novagen® Merck Biosciences).

Todo conteúdo da reação foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3) e as colônias selecionadas pelo antibiótico em placas de LB ágar foram cultivadas em meio líquido, tendo seu DNA plasmidial utilizado em reações de PCR com os “primers” pET46BG5N e pET46BG3C (item 3.9.1), seguido de análise em eletroforese em gel de agarose 2% (item 3.9.2) para verificar a correta ligação dos insertos mutados no vetor de expressão pET46 (Figura 20).

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados em reações de PCR a partir das colônias transformadas com a reação de ligação do inserto Sfbgly K201F no vetor pET46. **Padrão.** Marcador de peso molecular O'Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas®); **Raia 1, 2, 3 e 4.** inserto Sfbgly K201F (~1500 pb).

Estes plasmídios purificados foram então submetidos a um sequenciamento de DNA (ver item 3.9.4), que comprovou a correta incorporação do fragmento de DNA que codifica o mutante K201F no vetor pET46.

Figura 21: A) Eletroferograma da reação de sequenciamento do plasmídeo pET 46 codificando para a β-glicosidase de *S. frugiperda* mutada na posição K201, utilizando o “primer” T7, específico para o promotor T7 presente no plasmídeo. O retângulo em destaque indica a ‘His₆-tag’; **B)** Alinhamento entre as sequências da mutante Sfβgly K201F e Sfβgly selvagem através do programa ChromasPro Version 1.49 beta. O aminoácido mutado na posição 201 está marcado em destaque com retângulo azul. A seta azul indica a metionina inicial da proteína de fusão recombinante. As setas vermelhas indicam o códon que codifica o N-terminal de Sfβgly K201F.

4.4 - Produção em bactérias BL21 DE3 e purificação da β -glicosidase Sfbgly K201F

A β -glicosidase mutante Sfbgly K201F foi produzida como enzima recombinante em bactérias *Escherichia coli* cepa BL21 DE3.

A indução da expressão de Sfbgly mutante realizada como descrito no item 3.1.4, ocorreu de forma satisfatória, o que pode ser verificado em um teste eletroforético SDS-PAGE (item 3.4), pela presença da banda correspondente à enzima induzida (Figura 22). A comparação com os padrões de peso molecular e a análise simultânea de um experimento realizado com bactérias transformadas com um plasmídeo que codifica a enzima selvagem confirma que a banda em destaque refere-se a uma proteína que apresenta o tamanho semelhante aquele esperado para Sfbgly (~ 50 kDa – Marana *et al.*, 2001).

As bactérias induzidas contendo as proteínas mutantes recombinantes foram lisadas, como descrito no item 3.1.6, através de digestão com lisozima e sonicação.

A purificação de Sfbgly K201F presente no lisado ocorreu através de cromatografia líquida de afinidade em coluna de níquel-sepharose (Figura 23), seguida de diálise do “pool” formado pelas frações com maior atividade em tampão CP 100 mM pH 6.

Figura 23: Purificação de Sfbgly K201F recombinante através de cromatografia líquida de afinidade em coluna de níquel-sepharose. O “pool” de frações foi formado pelos tubos com maior atividade enzimática (frações 29, 30 e 31). A seta indica o início da eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 500 mM e imidazol 500 mM.

A purificação de Sfbgly K201F foi eficiente, o que pode ser verificado em teste eletroforético SDS-PAGE, descrito no item 3.4, pela presença de única banda de proteína (Figura 24). A comparação com os padrões de peso molecular e a análise simultânea de um experimento realizado com Sfbgly selvagem confirma que a banda em destaque refere-se a uma proteína que apresenta o tamanho semelhante aquele esperado para Sfbgly (~ 50 kDa – Marana *et al.*, 2001).

Outros polipeptídeos observados estão presentes em pequenas quantidades e só podem ser vistos em altas concentrações de proteína aplicada no gel.

Figura 24: Eletroforese em SDS-PAGE das amostras purificadas através cromatografia líquida de afinidade em coluna de níquel-sepharose de Sfβgly K201F expressas em células *E. coli* BL21-DE3. Foi usado um gel de poliacrilamida 10% corado com comassie blue R250 0,1%. **Padrão-** Marcador de Peso Molecular SDS-PAGE Low range; **Raia 1 e 2-** 2 μL de amostra de Sfβgly selvagem purificada e dialisada; **Raia 3-** 2 μL de amostra de Sfβgly K201F purificada e dialisada; **Raia 4-** 3 μL de amostra de Sfβgly K201F purificada e dialisada.

Após ensaio de atividade enzimática, verificou-se uma recuperação de atividade enzimática em torno de 400% após a purificação. Já a concentração protéica da Sfβgly K201F obtida pelo método de Bradford (item 3.5) revelou um valor médio de 0,25 μg/μL a partir de 0,5 L de cultura purificada em 4 cromatografias.

4.5 - Produção em levedura *Pichia pastoris* e purificação da β -glicosidase S β gly selvagem.

Foram utilizadas colônias de leveduras *Pichia pastoris* previamente transformadas com PIC9 BG contendo o inserto que codifica para β -glicosidase de *S. frugiperda*. A indução da expressão de S β gly foi feita em meio BMM, como descrito no item 3.2.4. Como neste sistema de expressão as proteínas recombinantes são secretadas para o meio de cultura, o sobrenadante contendo as proteínas recombinantes, foi submetido ao processo de purificação por precipitação com sulfato de amônio a uma concentração final de 0,69 g/mL (90% de saturação), descrito no item 3.3.3, seguido de diálise tampão imidazol 20 mM pH 8. A diálise foi realizada com o objetivo de remover principalmente o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uma vez que na etapa de precipitação foi utilizada uma concentração extremamente alta deste sal, próxima à sua concentração de saturação a 25°C, cerca de 0,767 g/mL.

Alíquotas retiradas do sobrenadante e do precipitado usadas para ensaio de atividade enzimática demonstram 152% de atividade recuperada após a precipitação. A concentração protéica da S β gly obtida pelo método de Bradford (item 3.5) revelou um valor de 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de 0,5 L de cultura.

A purificação de S β gly expressa em *Pichia pastoris* foi eficiente, o que pode ser verificado em teste eletroforético SDS-PAGE (Figura 25) pela presença de única banda de proteína que apresenta o tamanho semelhante ao-esperto para S β gly (~ 50k Da – Marana *et al.*, 2001).

Figura 25: Eletroforese SDS-PAGE das amostras da purificação através de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de Sfbgly expressa em *Pichia pastoris*. Foi usado um gel de poliacrilamida 10% corado com comassie blue R250 0,1%. **Padrão-** Marcador de Peso Molecular SDS-PAGE Low range; **Raia 1-** 1 μL de amostra de Sfbgly purificada e dialisada; **Raia 2-** 2 μL de amostra de Sfbgly purificada e dialisada; **Raia 3-** 3 μL de amostra de Sfbgly purificada e dialisada.

4.6 - Produção e purificação da β -glicosidase Tm β gly selvagem

A indução da expressão de Tm β gly foi realizada em levedura *Pichia pastoris* GS115 submetida à transformação por eletroporação com 30 μ g do vetor pPIC9 codificando Tm β gly.

Para verificar se tais construções haviam sido integradas no genoma da levedura, partimos para análise da expressão das enzimas recombinantes. A partir de 10 colônias de *P. pastoris* transformadas, foi feita mini-indução com metanol 1% em meio mínimo BMM por 72h. Para análise do perfil de indução o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante livre das células utilizado em ensaios de atividade enzimática. Foi verificado que destas 10 colônias, 7 tinham atividade, porém com variação entre as amostras analisadas (dados não mostrados). A partir da colônia com maior atividade enzimática, iniciou-se o processo de produção em larga escala da Tm β gly recombinante, conforme descrito no item 3.2.4.

A purificação de Tm β gly presente no sobrenadante foi feita através de dois procedimentos alternativos: precipitação com sulfato de amônio a 0,69 g/mL (90% de saturação), descrito no item 3.3.3 e diálise reversa com PEG 10.000, descrito no item 3.3.4. Ambos procedimentos foram seguidos de diálise contra tampão CP 100 mM pH 6. Como verificado em teste eletroforético SDS-PAGE (Figura 26), ambos procedimentos foram eficientes, sendo observada a presença de única banda de proteína que apresenta o tamanho semelhante ao esperado para Tm β gly (~ 56 kDa – Ferreira *et al.*, 2001).

Figura 26: Eletroforese SDS-PAGE das amostras da purificação de Tm β gly com precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e por diálise reversa com PEG 10.000. Foi usado um gel de poliacrilamida 10% corado com comassie blue R250 0,1%,. **Padrão-** Marcador de Peso Molecular SDS-PAGE Low range; **Raia 1-** Amostra de sedimento da precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ressuspenso em tampão CP 100 mM pH 6; **Raia 2-** Amostra do sobrenadante da precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **Raia 3-** Amostra de sedimento da precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dialisado em tampão CP 100 mM pH 6; **Raia 4-** Amostra de material após diálise reversa com PEG 10000 seguida por diálise em tampão CP 100 mM pH 6.

Após ensaio de atividade enzimática, verificou-se 171% de atividade recuperada após a diálise reversa com PEG 10000, a partir da atividade inicial. Mostrando-se mais eficaz na recuperação da atividade enzimática do que a precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ onde 145% da atividade inicial foi recuperada.

A concentração protéica da Tm β gly obtida pelo método de Bradford (item 3.5) revelou um valor de 0,21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de 0,5 L de cultura.

4.7 - Detecção de reações de transglicosilação

A caracterização de Sf β gly, Tm β gly e do mutante Sf β gly K201F iniciou-se com a determinação da velocidade de hidrólise de diversas concentrações dos substratos *p*NP β -gluco e MU β -gluco (Figura 27). A velocidade foi determinada acompanhando-se a formação dos dois produtos de reação, *p*-nitrofenolato (*p*NP) e glicose (glc) a partir de *p*NP β -gluco e metilumbeliferona (MU) e glicose (glc) a partir de MU β -gluco.

Figura 27: Esquema representando os substratos utilizados nos ensaios. **A)** *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo; **B)** metilumbeliferil- β -D-glucopiranosídeo. A seta indica o ponto de clivagem da ligação glicosídica.

Considerando apenas a ocorrência de reação de hidrólise, a velocidade de formação dos dois produtos a partir de um dos substratos deve ser igual. Contudo, se ocorrerem reações de transglicosilação, a quantidade de glicose formada é menor do que de MU e/ou *p*NP, pois parte deste monossacarídeo será incorporada ao(s) produto(s) de transglicosilação. Assim, a

partir da comparação das velocidades de formação de cada um dos produtos é possível detectar a ocorrência e quantificar a velocidade da reação de transglicosilação.

Logo, a velocidade de reação calculada a partir da quantidade de glicose formada representa exclusivamente a velocidade de hidrólise (v_H). A velocidade calculada a partir da formação de MU ou *p*NP representa uma somatória das reações de hidrólise e transglicosilação ($v_H + v_T$), pois estes produtos são comuns a ambas. Por fim, a velocidade calculada a partir da subtração $[MU \text{ ou } pNP] - [glc]$ representa exclusivamente a reação de transglicosilação (v_T), ver Figura 28.

Figura 28 – Esquema representando as reações de hidrólise e transglicosilação catalisadas por uma β-glicosidase. O substrato $MU\beta-glc$ liga-se à enzima (E) gerando o complexo enzima-substrato (não representado) a partir do qual forma-se o intermediário covalente glicosil-enzima (E-Glc). Nesta etapa é liberado o primeiro produto da reação (MU). O intermediário glicosil-enzima pode ser hidrolisado (ramo superior) ou transferir a glicose para um aceptor (Ac) gerando um produto de transglicosilação (Glc-Ac). O aceptor pode ser uma molécula de substrato, um tipo diferente de glicosídeo ou até outras moléculas adicionadas na reação.

4.7.1 - Detecção de reações de transglicosilação catalisadas por Sfbgly selvagem

Em ensaio com Sfbgly expressa em levedura *Pichia pastoris* diluída 4x incubada com *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo por 36 min, a produção de *p*NP ($v_H + v_T$) é maior do que de glicose (v_H) em toda faixa de concentração de substrato testada (Figura 29A e C) indicando ocorrência de reação de transglicosilação (v_T) na Figura 29B. A razão $(v_H + v_T)/v_H$ oscila em torno de 1,4 a 1,5, ou seja, produção de até 50% a mais de *p*NP do que glicose, indicando que 33% dos intermediários covalentes seguem a rota da reação de transglicosilação.

Figura 29: Efeito da concentração do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na atividade da Sfbgly selvagem expressa em levedura *Pichia pastoris*. **A)** velocidade de produção de glicose e *p*-nitrofenolato (pontos) e seus respectivos ajustes cinéticos (linhas); **B)** velocidade da reação de transglicosilação e seu ajuste cinético (linha) **C)** razão entre velocidade de produção de *p*-nitrofenolato e a velocidade de produção de glicose.

Com a S β gly incubada com MU β -gluco, a produção de MU ($v_H + v_T$) é claramente igual a de glicose (v_H) em toda faixa de concentração de substrato testada (Figura 30) indicando ausência de reação de transglicosilação (v_T).

Figura 30: Efeito da concentração do substrato metilumbeliferil- β -D-glucopiranosídeo na atividade da S β gly selvagem expressa em levedura *Pichia pastoris*. Plote da velocidade de produção de glicose e metilumbeliferona.

4.7.2 - Detecção de reações de transglicosilação catalisadas por Sfbgly K201F

Em ensaio com Sfbgly K201F expressa em bactérias BL21 DE3 incubada com *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo por 36min, a produção de *p*NP ($v_H + v_T$) é maior do que de glicose (v_H), indicando ocorrência de reação de transglicosilação (v_T) com velocidade crescente a partir de concentrações de substrato maiores do que 2,5 mM. A razão $(v_H + v_T)/v_H$ é 1 para concentração de substrato 2 mM e cresce para 2,25 em 38 mM, ou seja, produção de até 125% a mais de *p*NP do que glicose, indicando que até 55% dos intermediários covalentes seguem a rota da reação de transglicosilação (Figura 31).

Figura 31: Efeito da concentração do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na atividade da Sfbgly K201F expressa em bactérias BL-21DE3. **A)** velocidade de produção de glicose e *p*-nitrofenolato e seus respectivos ajustes cinéticos (linhas); **B)** velocidade da reação de transglicosilação

e seu ajuste cinéticos (linha); **C)** razão entre velocidade de produção de *p*-nitrofenolato e a velocidade de produção de glicose.

Em ensaio com Sfbgly K201F diluída 3x incubada com MUβ-gluco por 120min, a produção de MU ($v_H + v_T$) é claramente igual a de glicose (v_H) em toda faixa de concentração de substrato testada (Figura 32) indicando ausência de reação de transglicosilação (v_T).

Figura 32: Efeito da concentração do substrato metilumbeliferil-β-D-glucopiranosídeo na atividade da Sfbgly K201F expressa em bactérias BL21 DE3. Plote da velocidade de produção de glicose e metilumbeliferona.

4.7.3 - Detecção de reações de transglicosilação catalisadas por Tm β gly selvagem

Em ensaio com Tm β gly expressa em levedura *Pichia pastoris* diluída 40x incubada com *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo por 6min, a produção de *p*NP ($v_H + v_T$) é maior do que de glicose (v_H), indicando ocorrência de reação de transglicosilação (v_T) com velocidade crescente a partir de concentrações de substrato maiores do que 2,5 mM. A razão $(v_H + v_T)/v_H$ é 1 para concentração de substrato 0,5 mM e cresce para 2,5 em 40 mM, ou seja, produção de até 150% a mais de *p*NP do que glicose, indicando que até 60% dos intermediários covalentes seguem a rota da reação de transglicosilação (Figura 33).

Figura 33: Efeito da concentração do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo na atividade da Tm β gly selvagem expressa em levedura *Pichia pastoris*. **A)** velocidade de produção de glicose e *p*-nitrofenolato e seus respectivos ajustes cinéticos (linhas); **B)** velocidade da reação de transglicosilação e seu ajuste cinéticos (linha); **C)** razão entre velocidade de produção de *p*-nitrofenolato e a velocidade de produção de glicose.

Em ensaio com Tm β gly diluída 1.250x incubada com MU β -gluco por 35min, a produção de MU ($v_H + v_T$) é maior do que de glicose (v_H), indicando ocorrência de reação de transglicosilação (v_T) com velocidade crescente a partir de concentrações de substrato maiores do que 1 mM. A razão $(v_H + v_T)/(v_H)$ está em torno de 1 na concentração de substrato 0,2 mM e atinge 1,9 para concentração de substrato 8 mM, ou seja, produção de até 90% a mais de MU do que glicose, indicando que até 47% dos intermediários covalentes seguem a rota de reação de transglicosilação (Figura 34).

Figura 34: Efeito da concentração do substrato metilumbeliferil- β -D-glucopiranosídeo na atividade da Tm β gly recombinante expressa em levedura *Pichia pastoris*. **A)** velocidade de produção de glicose e metilumbeliferona e seus respectivos ajustes cinéticos (linhas); **B)** velocidade da reação de transglicosilação e seu ajuste cinéticos (linha); **C)** razão entre velocidade de produção de metilumbeliferona e a velocidade de produção de glicose.

Os resultados apresentados indicam que S β gly não catalisa reações de transglicosilação quando o substrato é MU β -gluco. Porém, quando o substrato é pNP β -gluco há ocorrência de transglicosilação, mas em uma taxa menor do que a reação de hidrólise. De fato, $v_H = 2v_T$ e não depende da concentração de substrato pNP β -gluco.

Tm β gly apresenta propriedades diferentes, catalisando reações de transglicosilação com ambos substratos, pNP β -gluco e MU β -gluco. A ocorrência de transglicosilação depende da concentração destes, partindo de um estado onde em baixas concentrações de substrato $v_H \gg v_T$, ou seja, v_T é praticamente nulo, e atingindo uma situação onde em altas concentrações de substrato $v_T = 1,5v_H$ para pNP β -gluco e $v_H = v_T$ para MU β -gluco.

S β gly K201F conjuga propriedades de S β gly e Tm β gly. Assim, como a S β gly selvagem esta enzima mutante não catalisa reações de transglicosilação quando o substrato é MU β -gluco. Porém, de modo similar a Tm β gly, quando o substrato é pNP β -gluco há ocorrência de transglicosilação dependente da concentração de substrato, partindo de um estado onde em baixas concentrações de substrato $v_H \gg v_T$, ou seja, v_T é praticamente nulo, e atingindo uma situação onde em altas concentrações de substrato $v_T = 1,25v_H$. Portanto, a mutação K201F tornou a probabilidade de S β gly seguir a rota de transglicosilação semelhante àquela para Tm β gly.

Assim, Tm β gly mostra-se mais propensa do que S β gly e S β gly K201F a catalisar reações de transglicosilação quando o substrato é MU β -gluco, enquanto que S β gly K201F e Tm β gly mostram-se mais propensas do que S β gly a catalisar reações de transglicosilação quando o substrato é pNP β -gluco.

4.7.4 - Detecção dos produtos transglicosilação por cromatografia de camada delgada

Além de detectados espectrofotometricamente, os produtos da reação catalisada por S β gly, S β gly K201F e Tm β gly foram visualizados em cromatografia de camada delgada (Figuras 35A e B).

Figura 35 A) Cromatografia de camada delgada (TLC) das reações envolvendo *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 4 mM e S β gly ou Tm β gly. **Padrão-** 5 μ g de *p*-nitrofenolato e 5 μ g de glicose (glc); **Raia 1-** ensaio com Tm β gly incubado por 18h; **Raia 2-** ensaio com Tm β gly incubado por 30min; **Raia 3-** ensaio com S β gly incubado por 30min, apresentando produto de transglicosilação (destacado pela linha pontilhada) além de glicose. **B)** Cromatografia de camada delgada das reações envolvendo *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 40 mM e S β gly ou S β gly K201F. **Padrão-** mistura de 5 μ g de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP β -gluco), 5 μ g de *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (*p*NP β -celo) e 5 μ g de glicose (glc); **Raia 1-** ensaio com S β gly incubado por 5h, apresentando produto de transglicosilação (destacado pela linha pontilhada) além de glicose e substrato; **Raia 2-** ensaio com S β gly incubado por 1h, apresentando produto de transglicosilação (destacado pela linha pontilhada) além de glicose e substrato; **Raia 3-** ensaio com S β gly K201F incubado por 5h, apresentando produto de transglicosilação (destacado pela linha pontilhada) além de glicose e substrato.

Como pode ser observado na raia 3 da Figura 35A e nas raias 1, 2 e 3 da Figura 35B, as reações envolvendo Sf β gly e a mutante K201F geraram glicose como produto, além da formação de um produto com migração nitidamente diferente da migração de glicose e que pode ser comparada à migração do *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo na Figura 35B. Assim, lembrando que *p*-nitrofenol não é visualizado nesta técnica de revelação (Figura 35A), é provável que este segundo produto seja resultante da reação de transglicosilação. Contudo, não é possível afirmar que este produto de transglicosilação seja *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo, pois as migrações não são perfeitamente iguais. Tentativas de eluição deste produto a partir das placas de TLC seguida de posterior análise por espectrometria de massas foram infrutíferas, possivelmente devido ao baixo rendimento.

Finalmente, nota-se que o produto de transglicosilação não aparece na reação catalisada por Tm β gly (nas raias 1 e 2 da Figura 35A). Supomos que por causa do tempo de incubação, a reação não mais se encontra em condição inicial (formação de no máximo 5% de produto) e deste modo tendo a concentração do substrato diminuído drasticamente, o próprio produto de transglicosilação acumulado durante o período, passou a ser hidrolisado produzindo novamente glicose.

4.8 - Determinação de parâmetros cinéticos das reações de hidrólise e transglicosilação

Conforme apresentado acima, utilizando o material contendo as enzimas S β gly, S β gly K201F e Tm β gly purificadas fez-se uma série de ensaios enzimáticos nos quais foram determinadas as velocidades de hidrólise e transglicosilação para diferentes concentrações de substrato (Figuras 29 a 34).

Para obter os parâmetros cinéticos que descrevem as velocidades destas reações, assumiu-se que o total de enzima se distribui entre a rota de reação de hidrólise e a rota de reação de transglicosilação (Figura 28). O produto *p*NP ou MU é gerado em ambas, mas a glicose apenas na rota de hidrólise. Logo, a velocidade de produção de glicose é v_H e a velocidade de produção de *p*NP ou MU é $v_H + v_T$.

Assim a probabilidade da enzima seguir a rota da reação de hidrólise (%H) ou a rota da reação de transglicosilação (%T) pode ser calculada experimentalmente a partir da razão $(v_H + v_T)/(v_H)$. Como a razão varia conforme a concentração de substrato, a probabilidade de ocorrência da reação de hidrólise e transglicosilação pode ser calculada para cada concentração de substrato (*F* %H e *F* %T). Esta probabilidade pode ser encarada como a porcentagem da população total de enzimas que se direciona para uma das rotas de reação (hidrólise ou transglicosilação).

Dados experimentais das velocidades de reação de hidrólise que seguem uma cinética michaeliana foram ajustados na equação abaixo, através do programa Enzfitter.

$$\text{velocidade de produção de glicose} = F \%H \cdot (V_{\max} [S]/K_m + [S])$$

Os parâmetros cinéticos para transglicosilação foram ajustados manualmente por simulação numérica em uma equação que segue o modelo cinético para dois substratos do tipo Ping-pong (Segel, 1993).

Onde S_1 e S_2 representam $pNP\beta$ -gluco ou $MU\beta$ -gluco, sendo que S_2 é o substrato que atua como aceptor na reação de transglicosilação. P_1 é o primeiro produto liberado e corresponde ao pNP ou MU . P_2 é o segundo produto, no caso o produto de transglicosilação. Neste modelo, a velocidade de reação pode ser descrita como:

$$\text{velocidade de transglicosilação} = F \% T \cdot (V_{\max} [S_1][S_2]/K_{m2} [S_1] + K_{m1} [S_2] + [S_1][S_2])$$

Finalmente, a velocidade de produção de pNP ou MU , produtos comuns a ambas rotas, é igual à soma das velocidades de produção de glicose (v_H) e de transglicosilação (v_T), ou seja,

$$v = F \% H(V_{\max} [S]/K_m + [S]) + F \% T(V_{\max} [S_1][S_2]/K_{m2} [S_1] + K_{m1} [S_2] + [S_1][S_2])$$

Portanto, com base nestes modelos foram gerados os parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_m) referentes às reações de hidrólise e transglicosilação catalisadas pelas β -glicosidases analisadas (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros cinéticos para as reações de hidrólise e transglicosilação catalisadas por Sf β gly, Sf β gly K201F e Tm β gly.

Enzima	Substrato	Hidrólise		Transglicosilação		
		K_m (mM)	$V_{\max}$ (nmol/min/ μ g)	K_{m1} (mM)	K_{m2} (mM)	$V_{\max}$ (nmol/min/ μ g)
Sfβgly	pNP - β gluco	1,5	2,4	1,5	1,5	2,9
	MU - β gluco	0,9	0,3	—*	—*	—*
Sfβgly K201F	pNP - β gluco	9	7,4	9	15	10
	MU - β gluco	0,6	0,4	—*	—*	—*
Tmβgly	pNP - β gluco	2,6	93,7	2,6	4	110
	MU - β gluco	0,6	600	0,6	3,25	923

K_{m1} =constante de Michaelis-Menten para o primeiro substarto

K_{m2} =constante de Michaelis-Menten para o segundo substarto

*não há reação de transglicosilação

Nota-se que o ajuste dos mesmos valores de K_m para hidrólise e K_{m1} para transglicosilação é coerente com os modelos adotados, onde a ligação do substrato para hidrólise e a ligação do primeiro substrato (S_1) na transglicosilação são o mesmo evento.

A ocorrência de $K_{m1} = K_{m2}$ para Sfbgly selvagem é compatível com a relação praticamente constante de $(v_H + v_T)/(v_H)$, observada na Figura 29C, pois em toda a faixa de concentração de substrato os sítios de ligação do primeiro e segundo substrato encontram-se igualmente preenchidos. Já a ocorrência de $K_{m2} > K_{m1}$ para Sfbgly K201F e Tmbgly é compatível com uma maior ocupação do sítio do aceptor (segundo substrato) à medida que aumenta a concentração do substrato, levando a maiores velocidades de transglicosilação e consequente aumento de $(v_H + v_T)/(v_H)$, observado nas Figuras 31C e 33C. Interessantemente, tanto em Sfbgly K201F como Tmbgly, K_{m2} é cerca de 1,6 vezes maior que K_{m1} e em ambos os casos a razão $(v_H + v_T)/(v_H)$ atinge valores similares (2,5) em altas concentrações de substrato (40 mM). Ademais, a mutação K201F tornou a probabilidade de Sfbgly seguir a rota de transglicosilação semelhante àquela para Tmbgly.

Finalmente, somente os parâmetros cinéticos não indicam o motivo de Tmbgly e Sfbgly K201F serem mais propensas do que Sfbgly selvagem a catalisar reações de transglicosilação tendo *p*NPβ-gluco como substrato. De fato, os K_{m2} de Tmbgly e Sfbgly K201F são maiores do que o K_{m2} para Sfbgly. Estes dados sugerem que a maior atividade de transglicosilação de Tmbgly e Sfbgly K201F, quando o substrato é *p*NPβ-gluco, não está correlacionada com características do sítio de ligação do aceptor (segundo substrato).

Em contrapartida a ausência de atividade transglicosiladora para Sfbgly e Sfbgly K201F tendo MUβ-gluco como substrato pode indicar que este substrato não se liga no sítio do aceptor, sendo que a modificação estrutural da mutação K201F não foi suficiente para garantir que ocorresse esta ligação no sítio do aceptor. É possível que o grande volume do aglicone

MU (Figura 27B) impeça a ligação deste substrato no sítio do acceptor nestas enzimas, sendo que neste caso Tm β gly possuiria um sítio do acceptor mais amplo.

Finalmente, a similaridade de Tm β gly e Sf β gly K201F quanto à atividade transglicosiladora e a ausência de correlação entre esta atividade e a afinidade no sítio do acceptor (S₂) sugerem que o efeito da mutação K201F possa de fato estar correlacionado ao acesso da água “catalítica” ao intermediário covalente conforme proposto pelos dados estruturais de BglB (Isorna *et al.*, 2007).

Para testar esta hipótese foi analisado o acesso de aceptores diferentes da água ao intermediário covalente conforme descrito no item a seguir.

4.9 – Efeito da adição de aceptores alternativos nas reações de transglicosilação catalisadas por Sfb gly, Sfb gly K201F e Tmb gly.

Além de avaliar o efeito do substrato sobre a ocorrência da reação de transglicosilação, também foi avaliado o efeito da adição de um acceptor alternativo em substituição à água, sendo neste caso utilizados alcóois primários e secundários.

Considerando apenas a ocorrência de reação de hidrólise, a velocidade de formação dos dois produtos (glicose e *p*NP) a partir do substrato deve ser igual. Contudo, se ocorrerem reações de transglicosilação, a quantidade de glicose formada é menor do que de *p*NP, pois parte deste monossacarídeo será incorporada ao(s) produto(s) de transglicosilação. Assim, a partir da comparação das velocidades de formação de cada um dos produtos é possível detectar a ocorrência e quantificar a velocidade da reação de transglicosilação.

Logo, a velocidade de reação calculada a partir da quantidade de glicose formada representa exclusivamente a velocidade de hidrólise (v_H). A velocidade calculada a partir da formação de *p*NP representa a somatória das reações de hidrólise e transglicosilação ($v_H + v_T$), pois estes produtos são comuns a ambas. Por fim, a velocidade calculada da subtração [*p*NP] – [glc] representa exclusivamente a reação de transglicosilação (v_T).

Caso o álcool substitua a água nestas reações, será observado um decréscimo na velocidade da reação medida pela formação de glicose (v_H).

Assim inicialmente, amostras dialisadas em tampão CP 100 mM pH 6 de Sfb gly, Sfb gly K201F e Tmb gly foram incubadas como descrito nos itens 3.6.6, 3.6.8 e 3.6.10, para ensaio com *p*NP β -gluco 4mM na ausência de aceptores alternativos. Os valores de absorbância foram convertidos a nmols através dos dados obtidos pela curva padrão de *p*NP e glicose com o reagente TGO ácido na presença do acceptor alternativo. Estes cuidados foram tomados para evitar a interferência do *p*NP nas medidas de glicose e para garantir que a

medida de glicose, que depende de uma reação enzimática (glicose oxidase) não fosse afetada pela presença dos alcoóis.

Observou-se que nas reações catalisadas por S β gly, S β gly K201F e Tm β gly em meio sem acceptor alternativo, as velocidades de reação medidas a partir da formação de *p*NP ($v_H + v_T$) e glicose (v_H) foram semelhantes, indicando que a reação de transglicosilação era minoritária nestas condições (Tabela 4).

4.9.1 – Efeito da adição de metanol nas reações de hidrólise e transglicosilação

A seguir amostras dialisadas em tampão CP 100 mM pH 6 de S β gly, S β gly K201F e T β gly foram incubadas como descrito no item 3.6.6 para ensaio com *p*NP β -gluco 4 mM na presença de metanol 3,5 M; 7 M e 8,2 M.

Observou-se que para as três enzimas a adição de metanol torna a velocidade de formação de glicose (v_H) menor do que a velocidade de formação de *p*NP ($v_H + v_T$), indicando nestes casos a ocorrência de transglicosilação (v_T) com provável formação de metilglicosídeo (Tabela 4).

Dever ser notado que as atividades de S β gly e T β gly calculadas a partir da velocidade de formação de *p*NP ($v_H + v_T$) não são reduzidas pela adição de concentrações crescentes de metanol, indicando que as enzimas não foram desnaturadas na presença deste álcool. Logo, as diferenças de velocidade de formação de glicose refletem alterações na proporção entre hidrólise (v_H) e transglicosilação (v_T). Já as atividades de S β gly K201F calculadas a partir da velocidade de formação de *p*NP foram reduzidas apenas pela adição de metanol 8,2 M, indicando que S β gly K201F foi desnaturada—apenas nesta concentração de metanol.

O efeito das concentrações crescentes de metanol sobre as velocidades nas reações catalisadas por S β gly, S β gly K201F e T β gly estão organizadas na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Efeito do metanol sobre as velocidades de hidrólise e transglicosilação catalisadas por S β gly, S β gly K201F e T β gly.

	Metanol (M)	$v_H + v_T$ (nmol/min)	v_H (nmol/min)	v_T (nmol/min)	v_H/v_T
S β gly	0	0,82	0,76	0,062	12,26
	3,5	1,45	0,95	0,50	1,90
	7	1,04	0,30	0,74	0,40
	8,2	1,37	0,28	1,09	0,26

Sfβgly K201F	0	0,29	0,25	0,043	5,80
	3,5	0,26	0,17	0,097	1,75
	7	0,18	0,059	0,12	0,50
Tmβgly	0	1,37	1,19	0,18	6,61
	3,5	1,14	0,89	0,25	3,56
	7	1,38	0,60	0,78	0,77
	8,2	2,08	0,56	1,52	0,37

v_H = velocidade de produção de glicose

v_T = velocidade de produção de *p*NP - v_H

A redução da razão v_H/v_T causada pelo metanol (entre 0 e 3,5 M) para Sfβgly (6,4 vezes) é maior do que para Tmβgly e Sfβgly K201F (1,8 e 3,3, respectivamente), sugerindo que o acesso de metanol ao intermediário covalente de Sfβgly seja mais “fácil” do que em Tmβgly e Sfβgly K201F. Supondo que o metanol ocupe o mesmo “canal” que a água, este resultado poderia indicar diferenças nesta região entre as três enzimas, relacionando a maior atividade transglicosiladora de Tmβgly e Sfβgly K201F observada anteriormente nos ensaios com diversas concentrações de substratos (Figuras 29 a 34) com o menor acesso da água ao intermediário covalente, o que resulta em uma menor probabilidade de ocorrência da reação de hidrólise. Ademais, considerando que a alteração pontual K201F foi suficiente para causar este efeito, é possível que a presença de um resíduo volumoso como fenilalanina neste “canal” esteja associada ao menor acesso doceptor (água ou metanol) ao intermediário covalente. De fato o resíduo que forma esse canal em Tmβgly é uma fenilalanina (F183), resíduo apolar e volumoso que dificultaria o acesso à água e em Sfβgly é uma lisina (K201), resíduo polar, que facilitaria a entrada da água. Nota-se que a redução da razão v_H/v_T causada pela variação da concentração de metanol entre 3,5 M e 7 M é semelhante para Sfβgly, Sfβgly K201F e Tmβgly (4,75, 3,5 e 4,6, respectivamente), sugerindo que em altas concentrações de metanol como 7 M a quantidade de enzimas com metanol no “canal” que dá acesso ao intermediário covalente torna-se semelhante, independentemente das diferenças desta região entre as três

enzimas, ou seja, todas estão “saturadas” pelo metanol. Esta tendência confirma-se para variação de metanol entre 7 M e 8,2 M, quando a redução de v_H/v_T é semelhante para S β gly e Tm β gly (1,5 e 2,0, respectivamente).

Os produtos da reação catalisada por S β gly, S β gly K201F e Tm β gly foram visualizados em cromatografia de camada delgada (Figuras 36A, 36B e 37). Como pode ser observado na raia 1, a reação em meio aquoso gerou glicose como produto (*p*NP não é visualizado nesta técnica de revelação), enquanto que a adição de metanol 8,2 M (raias 2 e 3) leva à formação de um produto de transglicosilação (destacado pela linha pontilhada) com migração semelhante a metil- α -glucosídeo e metil- β -glucosídeo. Na cromatografia não é possível distinguir entre estes produtos, contudo considerando que S β gly e Tm β gly apresentam um mecanismo do tipo retentor, o produto de transglicosilação é provavelmente metil- β -glucosídeo.

Finalmente, nota-se na Figura 37 que em virtude da alta concentração de substrato utilizada no ensaio, um excedente deste ainda pode ser visualizado ao final da reação.

Figura 36: Cromatografia de camada delgada (TLC) dos produtos da reação entre Sfβgly e *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo 40mM (**A**); e entre Tmβgly e *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo 4mM (**B**). **Padrão**- 5 μg de metil-β-glucosídeo (β), 5 μg de metil-α-glucosídeo (α) e 5 μg de glicose (glc), respectivamente; **Raia 1**- ensaio na ausência de metanol; **Raia 2**- ensaio na presença de metanol 8,2 M; **Raia 3**- ensaio na presença de metanol 8,2 M. A linha pontilhada indica o produto de transglicosilação.

Figura 37: Cromatografia de camada delgada (TLC) dos produtos da reação entre Sfbgly e Sfbgly K201F com *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo 40 mM na presença de metanol 8,2 M (item 3.7). **Padrão- 1**-mistura de 5 μg de metil-α-glucosídeo (a) e 5 μg de glicose (glc); **2** – 5 μg de metil-β-glucosídeo (β); **Raia 1**- ensaio para Sfbgly; **Raia 2**- ensaio para Sfbgly K201F. A linha pontilhada indica o produto de transglicosilação. Substrato *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (*p*NPβ-gluco).

4.9.2 - Efeitos do *n*-propanol e isopropanol sobre as velocidades de hidrólise e transglicosilação

Continuando a investigar o acesso do acceptor alternativo ao intermediário covalente no sítio ativo, amostras dialisadas em tampão CP 100 mM pH 6 de Sfbgly, Sfbgly K201F e Tmbgly foram incubadas como descrito nos itens 3.6.8 e 3.6.10, para ensaio com *p*NPβ-gluco 4 mM na presença de *n*-propanol e isopropanol.

Observou-se que concentrações maiores do que 1 M resultaram em redução da atividade enzimática, sugerindo a ocorrência de desnaturação das enzimas. Assim, a análise se restringiu a uma única concentração. (Tabela 5), onde as diferenças de velocidade de formação de glicose refletem alterações na proporção entre hidrólise (v_H) e transglicosilação (v_T).

Tabela 5: Efeito do *n*-propanol e isopropanol sobre as velocidades de hidrólise e transglicosilação catalisadas por Sfbgly, Sfbgly K201F e Tmbgly.

	álcool (M)	$v_H + v_T$ (nmol/min)	v_H (nmol/min)	v_T (nmol/min)	v_H/v_T
Sfbgly	0	0,82*	0,76*	0,062*	12,26*
	<i>n</i> -propanol 1,0 M	0,15	0,095	0,55	1,71
	isopropanol 1,0 M	0,20	0,22	nd	
Sfbgly K201F	0	0,29*	0,25*	0,043*	5,8*
	<i>n</i> -propanol 1 M	---	---	---	---
	isopropanol 1 M	0,61	0,60	nd	
Tmbgly	0	1,37*	1,19*	0,18*	6,61*
	<i>n</i> -propanol 1 M	6,1	4,7	1,4	3,3
	isopropanol 1 M	2,4	2,4	nd	

* Dados provenientes da Tabela 4

nd= não detectável

Para as reações catalisadas por S β gly e Tm β gly, a adição de *n*-propanol torna a velocidade de formação de glicose (v_H) menor do que a de *p*NP ($v_H + v_T$), indicando nestes casos a ocorrência de transglicosilação (v_T) com provável formação de *n*-propilglicosídeo.

A razão v_H/v_T diminui cerca de 7 vezes na reação catalisada por S β gly e 2 vezes na reação catalisada por Tm β gly. Assim, para S β gly este efeito tende a ser maior do que para Tm β gly, sugerindo que o acesso de *n*-propanol ao intermediário covalente em S β gly seja mais “fácil” do que em Tm β gly, o que corrobora com os dados dos ensaios com metanol.

Infelizmente o mutante S β gly K201F não apresentou atividade enzimática mesmo na menor concentração de *n*-propanol, não sendo assim possível verificar se esta tendência se aplicava à enzima mutante.

É interessante notar que diferentemente do *n*-propanol a adição do isopropanol não alterou a velocidade de hidrólise indicando que ao menos nesta concentração o isopropanol não atua como um aceptor para reação de transglicosilação catalisada por S β gly, S β gly K201F e Tm β gly.

Estes dois alcoóis possuem 3 carbonos, porém possuem formas diferentes. Isopropanol é um álcool secundário onde o grupo hidroxila liga-se no segundo carbono, ou seja, encontra-se ligada ao centro da cadeia carbônica. Já *n*-propanol é um álcool primário possuindo o grupo hidroxila ligado à extremidade da cadeia carbônica. Considerando que é o grupo hidroxila que efetua o “ataque nucleofílico” sobre o intermediário covalente, é possível que esta diferença torne incompatível o correto posicionamento e “entrada” do isopropanol no “canal” que dá acesso ao intermediário covalente nestas β -glicosidases.

5 – Conclusões

Conforme demonstrado Tm β gly e Sf β gly K201F mostram-se mais propensas do que Sf β gly a catalisar reações de transglicosilação quando o substrato é pNP β -gluco. Por outro lado, apenas Tm β gly catalisa reação de transglicosilação quando o substrato é MU β -gluco.

Os parâmetros cinéticos determinados para reação de transglicosilação tendo pNP β -gluco como substrato mostram que em Tm β gly e Sf β gly K201F a afinidade pelo acceptor da reação de transglicosilação (K_{m2}) é menor do que Sf β gly.

Os efeitos de metanol e *n*-propanol atuando como um acceptor alternativo sobre Sf β gly tendem a ser maiores do que para Tm β gly e Sf β gly K201F, sugerindo que o acesso destes alcoóis ao intermediário covalente seja mais fácil em Sf β gly do que em Tm β gly e Sf β gly K201F, indicando diferenças na configuração desta região entre Sf β gly e Tm β gly.

Portanto, notamos que a razão entre as velocidades de hidrólise e transglicosilação catalisadas por Sf β gly e Tm β gly não está ligada à afinidade pela segunda molécula de substrato, mas sim ao acesso da água ou acceptor alternativo ao sítio ativo. Coerentemente, a razão entre as velocidades de hidrólise e transglicosilação pode ser modulada por mutação do resíduo K201 de Sf β gly, posição potencialmente relacionada com o acesso da água no sítio ativo de β -glicosidases.

6 - Referências bibliográficas

BRASSART, D.; WOLTZ, A.; GOLLIARD, M.; NEESER, J.R. (1991). In vitro inhibition of adhesion of candida albicans clinical isolates to human buccal epithelial cells by fucal ? 2Gal β -bearing complex carbohydrates. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 1605-1613.

BURMEISTER W. P.; COTTAZ S.; DRIGUEZ H.; IORI R.; PALMIERI S.; HENRISSAT B. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. **Structure**, v. 5, p. 663-675.

CAIRN J. R. K; ESEN A. (2010). β -glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, doi: 10.1007/s00018-010-0399-2.

COUTINHO, P.M; HENRISSAT, B. (2007). **Carbohydrate active enzymes server**, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/Cazy>

DAVIES, G.J.; WILSON K.S.; HENRISSAT, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemistry Journal**, v. 321, p. 557–559.

DECROIX, K.; FERRIÈRES, V.; JAMOIS, F.; YVIN, J.; PLUSQUELLEC, D. (2006). Recent progress in the field of β -(1,3)-glucans and new applications. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1341-1349.

ESEN, A. (1993). **b-glucosidases: biochemistry and molecular biology**, ACS Symposium series.

ESEN, A.; BEVAN, D.R.; MORINIERE, J.; CZJZEK, M.; VERDOUCQ, L. (2003). Mutational and structural analysis of aglicone specificity in maize and sorghum β -glucosidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 25055-25062.

FAIJES, M.; PLANAS, A. (2007). In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1581–1594.

FENG, H-Y.; DRONE, J.; HOFFMANN, L.; TRAN, V.; TELLIER, C.; RABILLER, C.; DION, M. (2005). Converting a β -glycosidase into a β -transglycosidase by directed evolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37088–37097.

FERREIRA, A.H.P.; MARANA, S.R.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. (2001). Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p. 1065 – 1076.

GILEWSKI, T.; RAGUPATHI, G.; BHUTA, S.; WILLIAMS, L.J.; MUSSELLI, C.; ZHANG, X.F.; BORNMANN, W.G.; SPASSOVA, M.; BENCSATH, K.P.; PANAGEAS, K.S.; CHIN, J., HUDIS, C.A.; NORTON, L.; HOUGHTON, A.N.; LIVINGSTON, P.O.; DANISHEFSKY, S.J. (2001). Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: A phase I trial. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n. 6, p. 3270 – 3275.

HANCOCK, S.M.; VAUGHAN, M.D.; WITHERS, S.G. (2006). Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.509–519.

HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**, v. 280; p. 309-316.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J. (1997). Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 637-644.

HENRISSAT, B.; GLOSTER, T. M.; DAVIES, G. J. (2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, p. 637-645.

HONDA, Y.; FUSHINOBU, S.; HIDAKA, M.; WAKAGI, T.; SHOUN, H.; TANIGUCHI, H.; KITAOKA, M. (2008). Alternative strategy for converting an inverting glycoside hydrolase into glycosynthase. **Glycobiology**, v. 18, n. 4, p. 325-330. *doi:10.1093/glycob/cwn011*.

HONDA, Y.; KITAOKA, M. (2006). The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.3, p.1426–1431.

ISORNA, P.; POLAINA, J.; LATORRE-GARCÍA, L.; CAÑADA, F.J.; GONZÁLEZ, B.; SANZ-APARÍCIO, J. (2007). Crystal structure of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insight into the catalytic machinery of family 1 glycosidases. **Journal of Molecular Biology**, v. 371, p. 1204 – 1218.

KEMPTON, J.B.; WITHERS, S.G. (1992). Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic studies. **Biochemistry**, v. 31, p. 9961 – 9969.

KRIVAN, H.C.; ROBERTS, D.D.; GINSBURG, V. (1988). Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4Gal found in some glycolipids **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p. 6157 – 6161.

KUDRYASHOV, V.; GLUNZ, P.W.; WILLIAMS, L.J.; HINTERMANN, S.; DANISHEFSKY, S.J.; LOYD, K.O. (2001). Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: Epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewisy conjugates in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.6, p. 3264 – 3269.

LAEMMLI, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685.

LE PENDU, J. (2004). Protecting infants through human milk. **Kluwer Academic/Plenum Publishing Corporation**, NY, p. 135 – 143.

MACKENSIE, L.F.; QINGPING, W.; WARREN, R.A.J; WITHERS, S.G. (1998). Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. **Journal American Chemical Society**, v. 120, p. 5583 – 5584.

MALET, C.; PLANAS, A. (1998). From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. **FEBS Letters**, v. 440, p. 208 – 212.

MARANA S.R.; ANDRADE E.H.P.; MENDONÇA L.M.F.; FERREIRA C.; TERRA W.R. (2003). The role of amino acid residues R97 and Y331 in the modulation of the pH optimum in a β -glycosidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4866 – 4875.

MARANA, S.R. (2006). Molecular Basis of Substrate Specificity in Family 1 Glycoside Hydrolases. **IUBMB Life**, v. 58, p. 63 – 73.

MARANA, S.R.; JACOBS-LORENA, M.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. (2001) Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1545, p. 41 – 52.

MENDONÇA, L.M.F.; MARANA, S.R. (2008). The role in the substrate specificity and catalysis of residues forming the substrate aglycone binding site of a β -glycosidase. **FEBS Journal**, v. 275, p. 2536 - 2547.

MURATA, T.; USUI, T. (2006). Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1049-1059.

PERUGINO, G.; TRINCONE A.; ROSSI, M.; MORACCI, M. (2004). Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 31 – 37.

PRADE, H.; MACKENSIE, L.F.; WITHERS, S.G. (1998). Enzymatic synthesis of disaccharides using *Agrobacterium* sp. β -glucosidase. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 371-381.

RUIZ-PALACIOS, G.M.; CERVANTES, L.E.; RAMOS, P.; CHAVEZ-MUNGUIA, B.; NEWBURG, D.S. (2003). *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuca1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 14112 – 14120.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: NY – USA, 1989.

SIMON, P.M.; GOODE, P.L.; MOBASSERI, A.; ZOPF, D. (1997). Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 750–757.

STERN, R.; ASARI, A.A.; SUGAHARA, K.N. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, p. 699–715.

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 1074 – 1078.

TAYLOR, K.R.; GALLO, R.L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **The FASEB Journal**, v. 20, p. 9 – 22.

WHITELOCK, J.M.; IOZZO, R.V. (2005). Heparan Sulfate: A complex polymer charged with biological activity. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 7, p. 2745 – 2764.

Súmula Curricular

Dados pessoais

Maira Artischeff Frutuoso

Nascida em 02/02 de 1982 em São Paulo.

Educação

1997 -2000	Curso técnico/profissionalizante em Técnico em nutrição e dietética .
ETESP Carlos de Campos, ETESP, Brasil.
1997 -2000	Graduação em Ciências biológicas
Universidade Sao Judas Tadeu, USJT, Brasil.

Ocupação

03/2008 -03/2010	Bolsista de Mestrado em andamento (Pós graduação em bioquímica) do
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
Brasil. |
|------------------|--|

Publicações

Frutuoso, M. A. ; Marana, S. R. . Determination of the ratio between hydrolysis and transglycosylation reactions catalyzed by beta-glycosidases. In: 38º Reunião Anual da SBBq, 2009, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 38º Reunião Anual da SBBq, 2009. v. 38. p. 89-89.