Mendonça, L. M. F. de, BASES MOLECULARES da ESPECIFICIDADE pelo SUBSTRATO em uma β-GLICOSIDASE. 2009. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases (GH 1) são um dos mais importantes grupos de enzimas, estando envolvidas em diversos processos biológicos. Neste trabalho o objetivo principal foi o estudo das bases moleculares da especificidade pelo substrato em β-glicosidases GH 1 utilizando como modelo experimental uma β-glicosidase pertencente a larva de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Na primeira etapa procurou-se analisar através de mutagênese sítio-dirigida e cinética enzimática o papel na modulação da especificidade pelo substrato e na catálise dos resíduos E190, E194, K201 e M453 da Sfβgli50 , os quais correspondem aos encontrados no sítio de ligação do aglicone das β-glicosidases de milho e de sorgo. Os resultados mostraram que E190 favorece a ligação da porção inicial de aglicones do tipo alquil inicial e também da primeira unidade de glicose de aglicones oligossacarídicos. E194 favorece a ligação de radicais alquil, enquanto K201 é mais relevante para a ligação de unidades de glicose em detrimento de radicais alquil. O balanço entre as interações com E194 e K201 determina a preferência entre unidades de glicose *versus* radicais alquil. M453 favorece a ligação da segunda unidade de glicose de aglicones oligossacarídicos e também da porção inicial de aglicones do tipo alquil. Nenhum destes resíduos interage com a porção terminal de aglicones do tipo alquil. Demonstrou-se que todos estes resíduos contribuem de forma similar e individualmente fraca na estabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ e suas interações com o aglicone não influenciam na ligação do glicone. Na segunda etapa, procurou-se

identificar resíduos ou regiões da Sfβgli50 que participem do processo de modulação da especificidade pelo substrato e que ainda não tivessem sido descritos na literatura. Assim, selecionou-se 14 Sfβgli50 mutantes a partir de uma "biblioteca" de mutantes geradas por mutagênese aleatória *in vivo*. As análises de "contatos" e de ligações de hidrogênio envolvendo estes resíduos mutados possibilitaram a identificação de outros resíduos e, consequentemente, a construção de mais 32 Sfβgli50 mutantes. Estas 46 Sfβgli50 mutantes foram produzidas em sistema heterólogo de expressão em bactéria, purificadas e caracterizadas cineticamente. A análise dos resultados obtidos sugere que alguns resíduos mutados devem participar da modulação da especificidade pelo substrato formando "vias de conexão", de tal forma que mutações em resíduos que compõem uma "via" podem ter efeitos propagados através de suas conexões e, assim, atingirem outras porções da Sfβgli50, como o sítio ativo. Esta propagação pode se dar através de alterações no posicionamento espacial e no conjunto das interações não-covalentes entre os resíduos envolvidos. Finalmente um ponto em comum aos efeitos mutacionais analisados parece ser uma alteração na plataforma basal do glicone, W444, o que causaria modificações na preferência relativa pelos substratos fucosídeos e glucosídeos.

Apoio financeiro: FAPESP.

Palavras-chave: ENZIMAS, ESPECIFICIDADE PELO SUBSTRATO e β-GLICOSIDASE.

Mendonça, L. M. F. de, MOLECULAR BASES of the SPECIFICITY SUBSTRATE of a β-GLYCOSIDASE. 2009. PhD Thesis presented to the Instituto de Química da Universidade de São Paulo – Graduate program in Biologicals sciences (Biochemistry).

The β-glycosidases of family 1 of the glycoside hydrolases (GH 1) are one of the most important groups of enzymes. These enzymes are involved in a high diversity of physiological functions. The main objective of this study was the analysis of the molecular bases of the specificity for substrate of a β-glycosidase from the larvae of *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Initially the role of residues E190, E194, K201 and M453 of Sfβgli50 in modulation of the specificity for the substrate was investigated through site-directed mutagenesis experiments and enzyme kinetic analysis. These residues corresponds to the those found in the aglycone binding site of *Zea mays* and *Sorghum bicolor* β-glycosidases. The results showed that E190 favors the binding of the initial portion of alkyl-type aglycones (up to the sixth methylene group) and also the first glucose unit of oligosaccharidic aglycones, whereas a balance between interactions with E194 and K201 determines the preference for glucose units versus alkyl moieties. E194 favors the binding of alkyl moieties, while K201 is more relevant for the binding of glucose units, in detriment of its favorable interaction with alkyl moieties. In addition, M453 favors the binding of the second glucose unit of oligosaccharidic aglycones and also of the initial portion of alkyl-type aglycones. None of these residues interact with the terminal portion of alkyl-type aglycones. It was also demonstrated that E190, E194, K201 and M453 similarly contribute to stabilize $ES^{\ddagger}$. Their interactions with aglycone are individually weaker than those formed by

residues interacting with glycone, but their joint catalytic effects are similar. Finally, these interactions with aglycone do not influence glycone binding. In the second part of this study, new Sfβgli50 residues or portions that participated in the modulation of the substrate specificity were identified. In order to reach this objective, 14 Sfβgli50 mutants were seleted from a "library" generated by random mutagenesis *in vivo*. Based on the "contacts" or hydrogen bounds involving these 14 mutated residues 32 additional mutant Sfβgli50 were constructed. These 46 Sfβgli50 mutant were produced in bacteria, purificated and characterized. The results suggest that these residues ways be grouped in "connective pathways", a set of residues that contact each other. Mutations in residues that compose a "pathways" may be propagated through its connections reaching the Sfβgli50 active site. This propagation may be mediated by alterations in the spatial positioning and the set of non covalent interactions of these residues. Finally, several of these "connective pathways" contact a common point in the active site, the basal platform of the glycone subsite, W444.

Financial support: FAPESP.

Key words: ENZYMES, SUBSTRATE SPECIFICITIES and β-GLYCOSIDASE.

2. INTRODUÇÃO.

2.1. Histórico.

Como muitos eventos na história das ciências o momento histórico preciso da descoberta das enzimas também não é algo fácil de ser determinado. Pode-se considerar que elas são utilizadas pela humanidade, de forma indireta, a milhares de anos, através de preparações brutas de origem animal, vegetal ou microbiana (Said e Pietro, 2002). No entanto, a primeira descoberta de uma enzima é creditada a Payen e Persoz que em 1833 verificaram a hidrólise do amido a partir de uma fração precipitada de um extrato de malte e etanol. Mas, somente em 1834 - 1836 foi feita a primeira descrição que associava observações similares a esta com a noção de catálise. Em 1838, Cagniard de Latour mostrou que a fermentação ocorria em organismos vivos. Este conceito foi confirmado e ampliado por Pasteur entre 1858 - 1871 que associou a fermentação como algo intrínseco aos microorganismos vivos (Segel, 1993). Em 1878, Kühne sugeriu o nome de “enzyme” (in (dentro) + zyme (levedo); literalmente significa “dentro das leveduras”) para os “fermentos desorganizados e organizados” e o sufixo “ase” foi proposto em 1883 por Duclaux (Segel, 1993). Uma característica marcante das enzimas, desde o início que as primeiras foram purificadas, é a capacidade delas agirem de forma específica sobre determinadas moléculas. (Voet e Voet, 1995).

Desde o inicio do século XX que se reconhece a capacidade de utilização prática das enzimas, sendo de 1913 o primeiro relato de utilização planejada e direta de uma enzima. Neste ano Otto Rohn, na Alemanha,

desenvolveu uma fórmula de detergente para a lavagem de vestuário hospitalar que continha enzimas pancreáticas (Said e Pietro, 2002). Porém, logo se percebeu a necessidade em compreender o funcionamento das enzimas, pois o seu detergente não funcionou como esperado já que não se considerou na sua formulação que as enzimas utilizadas não atuariam da forma desejada em pHs muito elevados. No final do século XX as enzimas passaram a ser utilizadas de maneira criteriosa em diversas áreas como, por exemplo, na indústria de química fina, alimentícia, etc. Atualmente, embora a utilização industrial delas ainda seja tímida considera-se que elas se tornarão economicamente capazes de competir com os tradicionais processos químicos tendo como uma grande vantagem a capacidade de causarem menos impactos ambientais (Cherry e Fidantsef, 2003). Deve-se ainda ressaltar que qualquer aplicação das enzimas tem como fator limitante a necessidade de que elas tenham propriedades específicas, como estabilidade sobre determinado pH ou temperatura e especificidade sobre certo substrato. Sendo que para alguns casos isto somente será possível através da manipulação de suas propriedades catalíticas. Porém, tal manipulação exige um vasto entendimento da “maquinaria” que capacita as enzimas a terem tais propriedades.

2.1.1. Enzimas: o que são e como agem?

Em termos gerais enzimas são proteínas que agem como catalisadores altamente eficientes das reações químicas que ocorrem nos organismos vivos podendo acelerar a velocidade das reações químicas em até 10^{17} vezes (Fersht, 1999). Tanto elas como os catalisadores químicos possuem em comum a capacidade de diminuir a energia de ativação das reações que

catalisam o que resulta no aumento da velocidade. No entanto, as enzimas possuem como propriedades que as distinguem dos catalisadores químicos o fato de aumentarem as velocidades das reações em uma magnitude maior, a sua atividade pode ser regulada, podem atuar em condições amenas de pH, temperatura e pressão (em geral elas são ativas em condições fisiológicas (pH neutro, pressão atmosférica e temperaturas abaixo de 100°C)) e são muito específicas sobre os reagentes (substratos) que elas agem como também em relação aos seus produtos gerados (Segel, 1993; Voet e Voet, 1995). Deve ser ressaltado que além das enzimas há moléculas capazes de atuarem como catalisadores de determinadas reações químicas em alguns organismos vivos como as ribozimas (pequenas moléculas de RNA catalíticos) e as abzimas (anticorpos catalíticos).

As enzimas por serem proteínas possuem seqüências primárias, estruturas secundárias e terciárias para exercerem suas funções. Outra característica que as diferem dos catalisadores químicos é o fato da reação ocorrer em uma cavidade da enzima, sítio ativo, que fornece um ambiente mais favorável a ocorrência da reação.

Vários mecanismos são propostos para explicar a capacidade das enzimas de realizarem o seu papel catalítico, podendo ser citadas à catálise ácido-base, nucleofílica, eletrofílica, eletrostática e por estabilização do estado de transição da reação. Dentre estes, propõe-se que a estabilização do estado de transição da reação seja o mecanismo mais importante. Já em 1946 Linus Pauling admitia que “a fim de catalisar reações uma enzima deveria ser complementar ao estado de transição, ou seja, as interações ótimas entre o substrato e a enzima deveriam ocorrer para o estabelecimento deste estado” (Segel, 1993; Voet e Voet, 1995).

Assim, segundo essa hipótese, o sítio ativo de uma enzima dispõe de grupos orientados de tal forma que permitam a interação com o estado de transição da reação.

Logo, a formação de um complexo enzima-substrato que torne mais provável a formação do estado de transição do que na ausência do catalisador permite que a velocidade da reação seja aumentada. Uma vez que as enzimas utilizam-se de combinações de mecanismos pode-se assumir que as contribuições para a catálise estão distribuídas por todo o sítio ativo (Fersht, 1999).

2.1.2. Especificidade enzimática.

Já em 1894 Emil Fischer relatou que as enzimas glicolíticas eram capazes de distinguir entre açúcares estereoisômeros. Isto o levou a formular a hipótese de chave/fechadura, na qual sinteticamente ele afirmava que “a especificidade de uma enzima (fechadura) sobre seu substrato (chave) era oriundo de sua forma geometricamente complementar a este” (Segel, 1993; Voet e Voet, 1995).

Atualmente admite-se que o sítio de ligação do substrato sofra alterações ao ligar-se ao substrato de tal forma que haja uma maior flexibilidade na “fechadura”, ou seja, há um ajuste induzido do sítio ativo ao ligar-se no substrato. Sendo que as forças não covalentes de ligação entre substrato e enzimas são as mesmas responsáveis pela conformação das proteínas (interações de van der Waals, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas) (Ferst, 1999).

2.2. CAZymes (Carbohydrate-Active enzymes).

A variedade e complexidade de estruturas que os oligossacarídeos e polissacarídeos podem adotar torna este grupo de moléculas essenciais sendo empregadas pelos organismos vivos para uma grande quantidade e variedade de funções biológicas, como energética, estrutural, eventos de sinalização, etc (Geisler-Lee *et al*., 2006). Com base no princípio de atuação sobre tais moléculas criou-se o grupo das enzimas que são ativas sobre carboidratos ou moléculas glicosiladas, CAZymes (sigla obtida pelas iniciais de "Carbohydrate-Active enzymes"; http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY). As CAZymes são subdivididas em 4 grupos: o das carboidrato esterases (CE), polissacarideo liases (PL), glicosil transferases (GT) e as glicosídeo hidrolases (GH). Este último é o grupo mais representativo e abundante das CAZymes.

A importância das CAZymes pode ser constatada no fato de haver um número expressivo de genes relacionados a estas enzimas nos organismos de genomas já seqüenciados. Além disto, em Bacteria e Eukaria há evidências de existir uma correlação direta entre o número total de genes de glicosidases e glicosiltransferases com o número total de genes do organismo (Henrissat *et al.*, 2003).

A importância deste grupo de enzimas é mais evidente nas plantas. Elas necessitam das CAZymes para a assimilação dos produtos da fotossíntese, para a síntese e degradação dos constituintes da parede celular e vários compostos glicosilados, como glicolipídeos, glicoproteínas e metabólitos secundários (Geisler-Lee *et al*., 2006).

Como exemplo, podemos citar *Arabidopsis taliana*, uma das plantas mais estudadas, a qual possui cerca de 800 genes relacionados a glicosidases e glicosiltransferases, o que equivale a algo em torno de 3,3% de seus genes (no *Homo sapiens* este número é estimado em torno de 350 genes) (Henrissat et al., 2003).

2.3. Glicosídeo hidrolases (GH).

Como comentado as Glicosídeo hidrolases (GH) (EC 3.2.1.X) correspondem ao grupo mais representativo e numeroso das CAZymes. Além disto, são as enzimas mais bem caracterizadas nos últimos anos (Henrissat *et al*. 2005). São enzimas que agem hidrolisando ligações O ou S-glicosídicas.

Ocorrem em todos os organismos vivos (Bacteria, Archaea e Eukaria) e atuam em uma grande variedade de processos biológicos fundamentais. Por exemplo, na conversão da biomassa realizada por bactérias e fungos, no metabolismo energético de carboidratos, em insetos atuam no processo de digestão e resistência a toxinas de plantas, nas plantas agem nos mecanismos de defesa contra herbívoros, na ativação de fitormônios, na lignificação e catabolismo da parede celular e muito outros processos biológicos (Esen *et al*., 2003).

A nomenclatura das enzimas da IUB-MB para as glicosídeo hidrolases, GH, baseia-se na sua especificidade pelo substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. Assim, como esta classificação não reflete características estruturais destas enzimas (e nem tem esta intensão) criou-se uma classificação em famílias baseada na similaridade das seqüências de

aminoácidos (Coutinho e Henrissat, 2007), pois considerando a existência de uma relação direta entre esta seqüência e as similaridades de “foldings”, tal agrupamento tem como vantagens: refletir características estruturais, revelar relações evolutivas entre estas enzimas e ser uma importante ferramenta para prover informações mecanísticas (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY).

2.3.1. Família 1 das GH.

A família 1 das GH é uma das mais importantes, tanto em termos qualitativos como quantitativos. Por exemplo, Geisler-Lee *et al*., 2006, ao comparar a diversidade genética de CAZymes entre Populus e Arabidopsis, mostra-nos que a família 1 das GH é uma das três mais representativas nestas duas plantas.

As GH 1 tipicamente hidrolisam substratos do tipo G-O-X (ou G-S-X), onde G representa a extremidade não redutora, também chamada de glicone, glicona ou glicônica da molécula, e X a extremidade redutora, ou aglicone ou aglicônica. A extremidade G é constituída por um grupo glicosil, galactosil, mannosil, fucosil, 6-fosfoglicosil, 6-fosfogalactosil ou um resíduo glucoronídeo ligados por uma ligação do tipo β a extremidade X. O aglicone pode ser um outro monossacarídeo ou um grupo não carboidrato, de tal forma que esta é a porção mais variável entre os substratos dessas enzimas, como ilustrado pelos exemplos da figura 2.3.1.1. - B a G. A letra O indica que este grupo de enzimas hidrolisa ligações do tipo β de O-glicosídeos, mas há as que são capazes de hidrolisar ligações do tipo S-glicosídeos, as mirosinases. Em geral, as funções

fisiológicas de glicosídeos naturais são determinadas pela natureza química do aglicone (Henrissat, 1991; Henrissat e Davis, 1997).

As glicosídeo hidrolases da família 1 (GH 1) possuem uma estrutura do tipo $(\beta/\alpha)_8$ barril, no qual o sítio ativo está localizado na porção C terminal do barril.

Estas enzimas hidrolisam ligações do tipo β-glicosídicas através de um mecanismo que é dividido em duas etapas: glicosilação e desglicosilação, com a geração de produtos com a retenção da configuração do carbono anomérico. A reação envolve dois ácidos glutâmicos catalíticos presentes em regiões conservadas da enzima: TFNEP (este E age como ácido/base catalítico) e I/VTENG (este E age como nucleófilo). Deve ser ressaltado que nas mirosinases, glicosídeo hidrolases da família 1 que hidrolisam as ligações do tipo S-glicosídicas, o primeiro segmento conservado é perdido, sendo que o E catalítico é substituído por um Q no segmento TINQL (Burmeister *et al*., 1997).

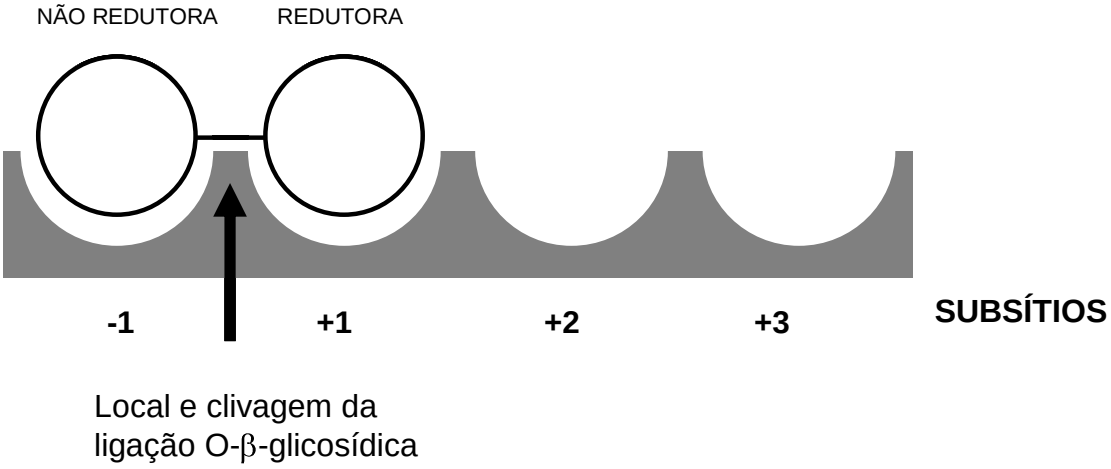
As β-glicosidases, classificadas na família 1, constituem o maior grupo de enzimas das glicosídeo hidrolases e tem sido o principal foco de pesquisas recentes devido as suas funções nos sistemas biológicos, mas também devido a interesses na aplicação dessas enzimas em processos biotecnológicos (Henrissat *et al*., 2005).

O sítio ativo das β-glicosidases apresenta um subsítio de ligação da extremidade não-redutora do substrato, conhecido como subsítio -1 ou subsítio do glicone, enquanto a extremidade redutora do substrato é acomodada nos subsítios +1, +2, +3 e outros, também chamados de subsítio do aglicone. A clivagem da ligação glicosídica ocorre entre os subsítios -1 e +1 (Henrissat e Davis, 1997) (figura 2.3.1.1. - A).

Segundo Sá-Correia *et al*., 2003, uma análise filogenética das GH 1 segue o mesmo padrão dos agrupamentos filogenéticos dos organismos envolvidos sugerindo que, diferentemente de outras famílias de GH, as enzimas pertencentes a família 1 das GH não sofreram transferência horizontal significante entre os filos ao longo da história evolutiva destes. A figura 2.3.1.2. ilustra tal análise com um pequeno número de β-glicosidases (as β-glicosidases de *Spodoptera frugiperda*, *Zea Mays*, *Sorghum vulgare*, *Brevicoryne brassicae* e *Paenobacillus polymyxa* presentes nesta árvore genealógica serão comentadas adiante em outras partes).

FIGURA 2.3.1.1.

A



G = glicone
Ag = aglicone

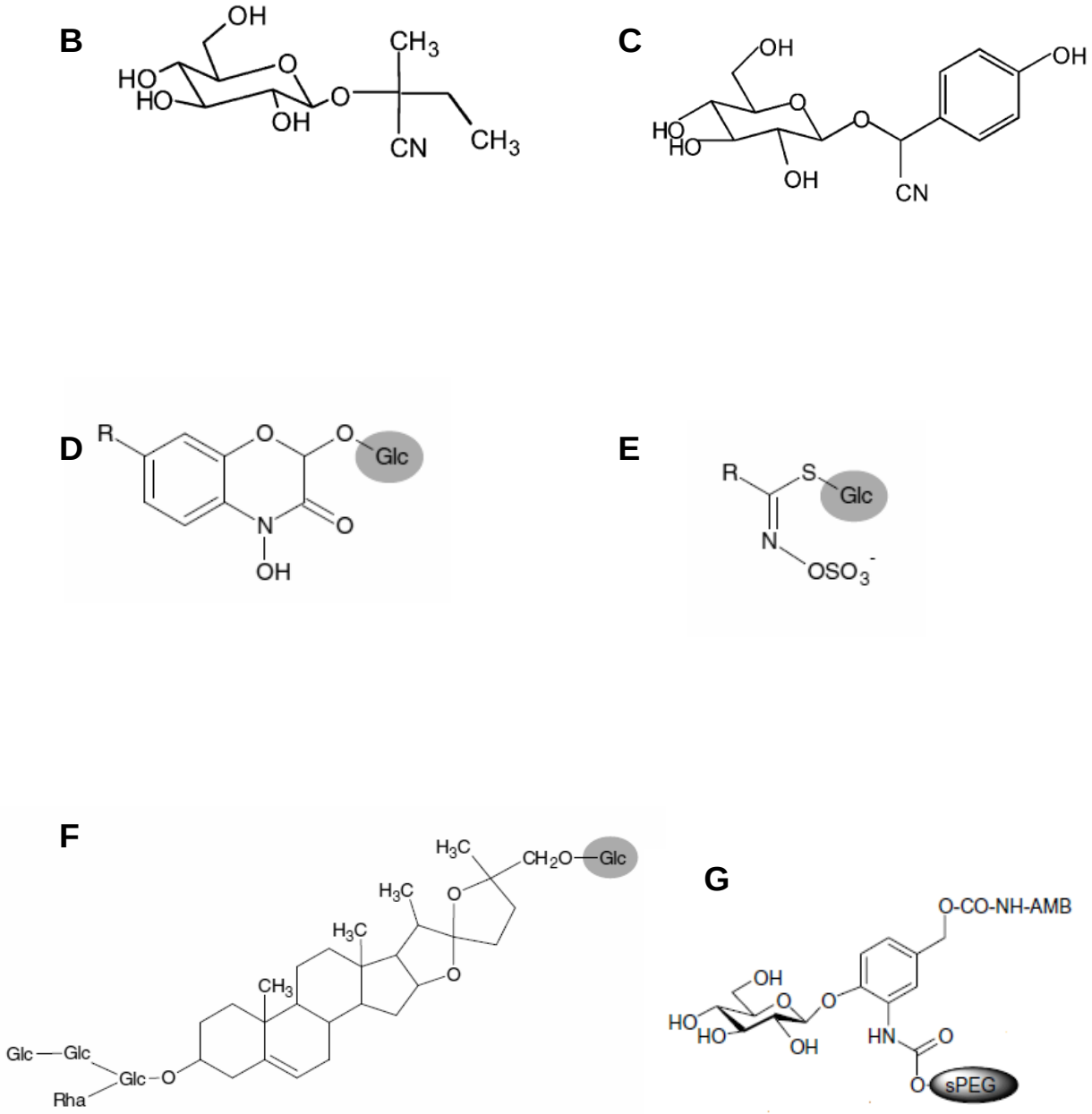


FIGURA 2.3.1.1. (A) Esquema representando os subsítios -1 de interação do glicone, e os subsítios +1,+2 e +3 de interação com o aglicone da β-glicosidase de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Os dois círculos conectados representam um substrato (por exemplo, um dissacarídeo) com sua extremidade não-redutora posicionada no subsítio -1 e a redutora no +1. A seta indica o ponto de clivagem da ligação O-glicosídica. (**B, C, D, E, F** e **G**) Exemplos de alguns aglicones de substratos hidrolisados por β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases. **(B)** linamarina, **(C)** Dhurrin, **(D)** DIMBOAGlc, **(E)** Glucosinolato, **(F)** Avenocosídeo e **(G)** AMB4-sPEG. (**B** e **C**) Zagrobelny *et al*., 2008. (**D, E** e **F**) Morant *et al*., 2008. (**G**) Sedlák *et al*., 2008.

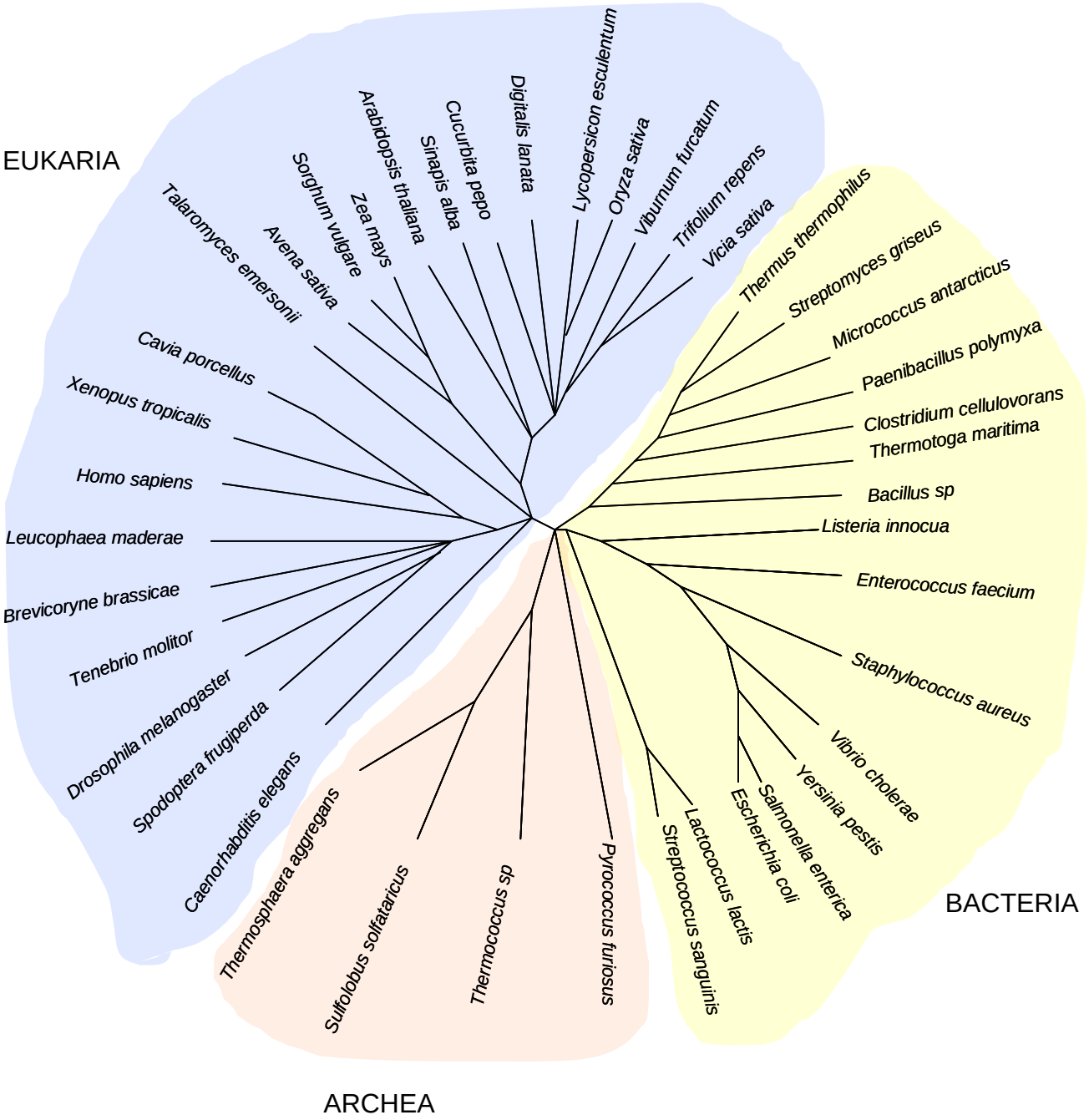


FIGURA 2.3.1.2. Árvore genealógica de β-glicosidases GH1 de ARCHEA, BACTERIA e EUKARIA construída com seqüências de aminoácidos obtidas no CAZY databank (http://afmg.cnrs-mrs.fr/CAZY) e visualizada por meio do TreeView(win32) (1.6.6) (http:// taxonomy .zoology.gla.ac.uk / rod.html). mais detalhes ver item 4.10..

2.4. β-glicosidases GH 1.

2.4.1. β-glicosidases GH 1 de microorganismos.

β-glicosidases encontradas em bactérias e fungos tem sido objeto de diversos estudos por serem utilizadas em vários processos biotecnológicos, como o desenvolvimento de novos carboidratos para alimentos, produção de álcool e derivados de celulose (Said e Pietro, 2002). Particularmente a produção de açúcar e consequentemente de etanol derivado de sua fermentação têm participação de β-glicosidases de fungos. Por exemplo, complexos de celulase isoladas de *Trichoderma reseei* compreendem no mínimo três diferentes enzimas que em conjunto hidrolisam a celulose para oligossacarídeos e glicose (Fowler, 1993). Uma dessas é uma endoglucanase e a outra uma celobiohidrolase que em conjunto hidrolisam a celulose em pequenos celooligossacarídeos, principalmente celobiose. Em seguida, estes são hidrolisados a unidades de glicose pela ação de uma β-glicosidase (em *Trichoderma reseei* esta enzima foi clonada do gene bgl1 por Barnet *et al*., 1991).

Outra aplicação de β-glicosidases de microorganismos é no melhoramento industrial de aromas, pois estas são enzimas chaves na liberação de compostos aromáticos de glicosídeos precursores presentes em frutas e produtos fermentados, como, por exemplo, monoterpenos da uva (linalol, geraniol, nerol, citronelol, etc) (Gunata *et al*., 1985). Elas também são utilizadas para melhorar as propriedades organolépticas de sucos de frutas cítricas (Roitner *et al*., 1984).

Atualmente existem 11 β-glicosidases de microorganismos com estrutura terciária resolvida (8 de Bactéria e 3 de Archea). Uma das mais relevantes é a de *Paenibacillus polymyxa*, BglB, por apresentar informações das bases moleculares da especificidade pelo substrato (Sanz-Aparicio *et al*., 2007). Detalhes mais importantes a respeito desta enzima serão tratados a seguir.

2.4.2. β-glicosidases GH 1 de mamíferos.

Em mamíferos são encontrados dois tipos de β-glicosidases: citosólica e lisossomal (glucocerobrosidases) (Beutler, 1992; Ohassi *et al*. 1992; Beutler *et al*., 2004). A β-glicosidase citosólica está presente principalmente no fígado e intestinos e, baseado no fato dessas enzimas terem uma ampla especificidade por radicais aglicônicos do tipo mono e dissacarídeos como salicina, amigdalina, prunasina, visine, linamarina e outros, encontrados em plantas consumidas por animais, acredita-se que estas enzimas tenham um papel de detoxificação desses β-glicosídeos. A β-glicosidase lisossômica não pertence a GH 1.

Há ainda a lactase-phlorizin hidrolase (LPH) que é encontrada na membrana das microvilosidases do intestino de mamíferos, sendo de vital importância para estes, pois sua atividade lactase hidrolisa lactose liberando D - galactose e D - glicose, permitindo sua absorção pelo intestino. De tal forma que a ausência ou mal funcionamento desta enzima é a causa alguns tipos de intolerância a lactose. Ela também possui atividade de phlorizin hidrolase, a qual age sobre glicosídeos com aglicones hidrofóbicos, sendo que estas duas atividades encontram-se na mesma cadeia protéica (Fernandez *et al*., 1995).

Atualmente a única β-glicosidase de mamífero com estrutura terciária determinada é a citosólica de humanos (Kakuta *et al*., 2008).

2.4.3. β-glicosidases GH 1 de plantas.

Nas plantas as β-glicosidases tem um papel muito importante de defesa contra patógenos e herbívoros por participar da liberação de ácido hidroxamico, coumarinas, tiocianatos, terpenos e cianeto de seus correspondentes glicosídeos (Fenwick *et al*., 1983; Niemeyer, 1988; Hruska, 1988; Poulton, 1990 e Oxtoby, 1991). Além disto, elas participam da ativação de fitormonios (glicosídeos de giberelinas, auxinas, ácido abscísico e citocinas) (Nowachi *et al*., 1980; Schliemann, 1984; Wiese e Grambow, 1986; Brzobohaty *et al*., 1993) e do processo de lignificação e metabolismo da parede celular (Xu *et al*., 2004).

A função das β-glicosidases de plantas mais bem entendida é a sua participação na hidrólise de glicosídeos cianogênicos de plantas importantes economicamente, como sorgo, mandioca e muitas outras (Conn, 1981; Oxtoby, 1991; Morant *et al*., 2008).

Outras β-glicosidases bem caracterizadas são as que ocorrem na família *Brassicaceae,* conhecidas como mirosinases (tioglicosídeo glucohidrolase, EC 3.2.3.1) que catalisam a hidrólise de compostos secundários conhecidos como glucosinolatos (tioglicosídeos) (Morant *et al*., 2008). Estes consistem de um resíduo de glicose ligado a um aglicone por um S ou N. Glicosinolatos são estocados em vacúolos de folhas, raízes e vasos. Quando estes tecidos que os contêm são lesados, os glicosinolatos são convertidos, por meio da ação das mirosinases, em compostos tóxicos, como isotiocianatos, tiocianatos e nitrilas (Bennett *et al.,* 1995; Morant *et al*., 2008). Há relatos na literatura que sugerem

que glicosinolatos exibem atividade antiproliferativa no câncer coloretal (Leoni *et al*., 1997) e que muitos isotiocianatos inibem o desenvolvimento do câncer em diversos outros órgãos (Shapiro *et al*., 1998; Morant *et al*., 2008).

Para ressaltar a importância, já comentada, do papel das CAZymes nas plantas, mais especificamente das β-glicosidases GH 1, pode-se citar os 48 genes de enzimas deste grupo encontradas em *Arabidopsis taliana*, sendo que segundo Xu *et al*., 2004, somente 8 talvez sejam de pseudogenes. Este é o maior número de β-glicosidases GH 1 encontradas em um único organismo.

Atualmente das 13 β-glicosidases de Eukaria com estrutura terciária resolvida, somente 3 não são de plantas. Mas as mais relevantes são a de sorgo (*Sorghum bicolor*) e a de milho (*Zea mays*) (Czjzek *et al*., 2000; Cicek *et al*., 2000; Verdoucq *et al*., 2003 e 2004). A dhurinase 1 é uma enzima de sorgo e é capaz de hidrolisar unicamente seu substrato natural, dhurrina β-glicosideo (β-D-glucopiranosil-oxi-(S)-p-hidroximandelonitrila) (figura 2.3.1.1. – B), o qual é cianogênico (Halkier *et al*.1989). Em milho há duas β-glicosidases, homólogas a de sorgo, mas que, ao contrário desta, podem hidrolisar um amplo espectro de substratos, além do seu substrato natural, DIMBOA-glucosídeo (2-O-ß-D-glucopiranosil-4-hidroxi-7-methoxi-1,4-benzoxazin-3-one) (Babcock e Esen, 1994) (figura 2.3.1.1. – C). Outros comentários a respeito destas duas enzimas serão feitos mais adiante.

2.4.4. β-glicosidases de insetos.

As β-glicosidases têm um importante papel na digestão de β-glicans que compõem a dieta de muitos insetos (Ferreira e Terra, 1994). Estas enzimas são

ativas sobre uma ampla faixa de substratos e em muitos casos elas estão envolvidas na resistência do inseto aos mecanismos de defesa encontrados em muitas plantas (alguns comentados anteriormente), como os glicosídeos que quando hidrolisados liberam componentes tóxicos, por exemplo, cianeto. Deve ser ressaltado que segundo Ferreira *et al*., 1998, glicosídeos tóxicos podem provocar quedas da atividade β-glicosidásica em alguns insetos, talvez devido a um aumento da inibição, a um aumento do "turnover" destas enzimas ou a uma diminuição da transcrição de seus genes ou da tradução de seu RNA mensageiro.

Segundo Marana, 2001, a primeira classificação das β-glicosidases digestivas de insetos se baseava na especificidade destas enzimas pelo aglicone de seus substratos. No entanto, como tal classificação não utilizava em suas premissas dados moleculares ou estruturais ela não reflete dados de função/especificidade dessas β-glicosidases.

Evidências evolucionárias entre as β-glicosidases de insetos sugerem que a "tendência evolutiva" é a existir organismos com múltiplas enzimas com diferentes especificidades pelo substrato, pois este fato permitiria a resistência a glicosídeos tóxicos (Ferreira *et al*., 1998).

Atualmente existe uma β-glicosidase GH 1 de inseto com estrutura terciária resolvida. Trata-se da enzima pertencente ao afídeo *Brevicoryne brassicae* (Bones *et al*., 2005).

2.4.5. Mecanismo catalítico das β-glicosidases GH 1.

As β-glicosidases GH 1 tem como uma de suas principais características a retenção da configuração do carbono anomérico no produto liberado. O

mecanismo catalítico dessas enzimas envolve a formação de um intermediário covalente glicosil-enzima e um estado de transição semelhante a um íon oxocarbenium. O nucleófilo e o ácido/base catalítico são resíduos de E e a clivagem ocorre entre os subsitios -1 e +1.

Em linhas gerais, segundo White e Rose, 1997, e Whites e Rye, 2000, o mecanismo de reação se processa da seguinte maneira. Primeiramente, o glicosídeo liga-se no subsítio -1. Há autores que acreditam que o glicone ao se ligar no sítio ativo adote uma conformação do tipo “barco torcido” (Zechel e Whithers, 2000). Em seguida, o carboxilato que age como ácido/base catalítico doa um próton ao O da ligação glicosídica que será clivada (ligação β-1,4). Com a clivagem desta ligação é formado um estado de transição com uma carga formal positiva no carbono anomérico. Este estado de transição tem um caráter semelhante a um íon oxocarbenium e o monossacarídeo que constitui o glicone adota uma conformação do tipo “meia-cadeira”. A aproximação desta espécie iônica com o nucleófilo catalítico leva a formação de um intermediário covalente glicosil-enzima com uma configuração invertida (tipo α) e uma conformação de “cadeira”. O aglicone é liberado e uma molécula de água difundi-se para a vizinhança da base catalítica. A espécie covalente reativa passa novamente através de um estado de transição semelhante a um íon oxocarbenium, com o glicone adotando novamente uma conformação do tipo “meia-cadeira”. Então, a base catalítica abstrai um próton da molécula de água, possibilitando que ela, neste momento, promova um ataque nucleofílico no C1 do glicone. Após este ataque o glicone é liberado com a retenção da configuração anomérica do tipo β no C1. A figura 2.4.5.1. ilustra as etapas do mecanismo de reação de uma β-glicosidase com a retenção da configuração do carbono anomérico.

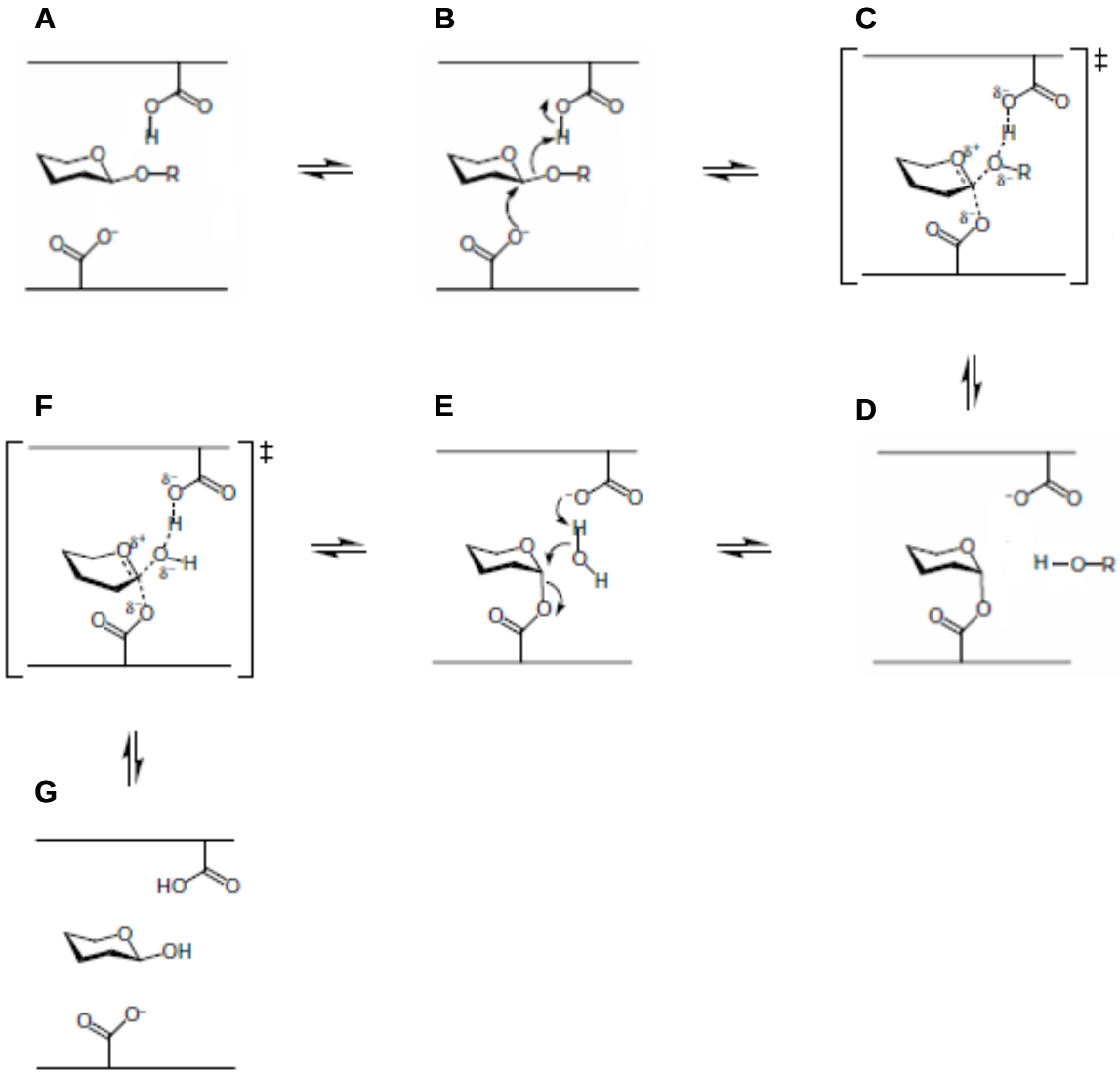


FIGURA 2.4.5.1. Mecanismo catalítico proposto para β-glicosidases. **(A)** Um substrato ocupa o sítio ativo, com o glicone no subsítio -1 e seu aglicone (-OR) no +1. **(B)** O E catalítico que age como ácido/base doa um próton ao O da ligação glicosídica. O E catalítico que age como um nucleófilo efetua um ataque sobre o carbono anomérico. **(C)** formação de um estado de transição com o glicone adotando uma conformação do tipo "meia cadeira"; a ligação glicosídica com o aglicone está sendo desfeita e uma ligação glicosil-enzima está sendo formada. **(D)** o aglicone é liberado e o intermediário covalente glicosil-enzima está formado. O glicone assume uma conformação do tipo "cadeira". **(E)** uma molécula de água difunde-se para o sítio ativo onde tem seu próton abstraído pela base catalítica, possibilitando que ela realize um ataque nucleofílico no C anomérico. **(F)** um estado de transição igual ao da etapa C é novamente formado, dessa vez uma ligação entre o carbono anomérico e a água está sendo formada e a ligação glicosil enzima está sendo desfeita. **(G)** O produto final é liberado, um monossacarídeo. (Baseado em White e Rose, 1997; Whites e Rye, 2000).

2.4.6. *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho).

Spodoptera frugiperda é um inseto, pertencente à família das Lepidópteras, conhecido na sua fase larval como lagarta-do-cartucho. É a principal praga da cultura do milho no Brasil e nos últimos anos vem aumentando em várias áreas cultivadas. Os motivos apontados para esse aumento tem sido o desequilíbrio biológico, pela eliminação de seus inimigos naturais, e também o aumento da exploração da cultura do milho. A larva também ataca e causa danos a várias outras culturas de importância econômica, como o algodão, arroz, alfafa, amendoim, abóbora, batata, couve, espinafre, feijão, repolho, sorgo, trigo e tomate atacando diversas partes dessas plantas (Cruz e Resende Monteiro, 2004).

2.4.7. β-glicosidase de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50).

A β-glicosidase digestiva da lagarta de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50, AF 052729, Mr 50.000; 509 aminoácidos), pertencente à família 1, clã A das glicosídeo hidrolases, foi previamente clonada, seqüenciada e teve suas propriedades cinéticas caracterizadas e, posteriormente, foi o alvo de experimentos de modificação química (Marana *et al*., 2000 e 2001). Em seguida, através de alinhamentos com outras β-glicosidases foram identificados resíduos de aminoácidos potencialmente envolvidos na sua especificidade pela porção do glicone e do aglicone de seu substrato e também envolvidos na modulação de seu pH ótimo. Estes resíduos foram os alvos de

estudos através de mutagênese sítio-dirigida (Marana *et al*., 2002, 2003 e 2004).

2.4.8. Especificidade pelo glicone nas β-glicosidases GH 1 e em Sfβgli50.

Existem diversos trabalhos a respeito do subsítio de ligação da extremidade não redutora, ou subsítio do glicone, que permitem verificar que, assim como em outras glicosídeo hidrolases, esta porção do sítio ativo é formada por uma plataforma basal apolar, responsável por fazer interações com o anel do glicone e, em alguns casos, seu Nε1 faz ligação de hidrogênio com a OH4 do glicone. Para a Sfβgli50 a plataforma basal apolar é formada pelo resíduo do W444 (Marana *et al*., 2001), o qual é conservado em toda a família 1. Considerando que esta plataforma apolar (W444) interage de modo similar com diferentes monossacarídeos, acredita-se que grande parte da especificidade atribuída ao subsítio -1 deve-se às ligações de hidrogênio formadas por grupos polares distribuídos dentro deste subsítio (os quais tendem a ser conservados neste grupo de enzimas) com as hidroxilas do glicone do substrato (Quiocho, 1986; Burmeister *et a*l., 1997; Barret *et al*., 1995; Wiesmann *et al*., 1997; Aguilar *et al*., 1997; Sanz-Aparicio et al., 1998; Chi *et al*., 1999; Kaper *et al*., 2000; Hakulien *et al*., 2000; Zechel *et al*., 2003; Czjzek *et al*., 2001; Verdoucq *et al*., 2003 e 2004; Gloster *et al*., 2004).

Marana, 2006, apresenta todas as interações que as OH do glicone são capazes de exercer com o subsitio -1. Assim, dois resíduos de aminoácidos, de uma N e um E, fazem ligações de hidrogênio com a OH2. Este E é o mesmo que age com o nucleófilo. Há relatos de uma terceira ligação de hidrogênio da

OH2 com um resíduo de H em *B. polymyxa* e *S. bicolor* (Sanz-Aparicio et al., 1998; Verdoucq *et al*., 2003). A OH3 forma 3 ligações de hidrogênio, com uma Q, um W (que não é o que forma a plataforma basal) e com uma H (a mesma que faz com a OH2). A OH4 também faz 3 ligações de hidrogênio, uma com um E, outra com um Q (o mesmo que faz com a OH3) e a terceira com o W que forma a plataforma basal. A OH6 faz uma ligação de hidrogênio com o mesmo E que interage com a OH4. Estas ligações de hidrogênio entre as OH do glicone e o sítio ativo das β-glicosidases formam uma rede somente detectada no intermediário covalente e no complexo ES, mas talvez elas também estejam presentes no complexo $ES^{\ddagger}$. De tal forma que a energia para ligação e estabilização do $S^{\ddagger}$ no subsítio -1 deva ser afetada pelo posicionamento de suas OH que, consequentemente, interfere nas ligações de hidrogênio que estas podem realizar. A figura 2.4.8.1. resume estas ligações de hidrogênio entre as OH do glicone e os resíduos do sitio ativo e a figura 2.4.8.2. exemplifica estas interações nas β-glicosidases de milho, sorgo e *Spodoptera frugiperda.*

Outro ponto discutido em Marana, 2006, que é relevante para este trabalho é o fato de não haver uma relação direta entre relações filogenéticas entre as β-glicosidases de determinadas organismos com a especificidade destas enzimas no subsítio -1. Assim, a especificidade de uma β-glicosidase não pode ser prevista simplesmente pela presença ou ausência de resíduos que constituem o subsítio de ligação do glicone.

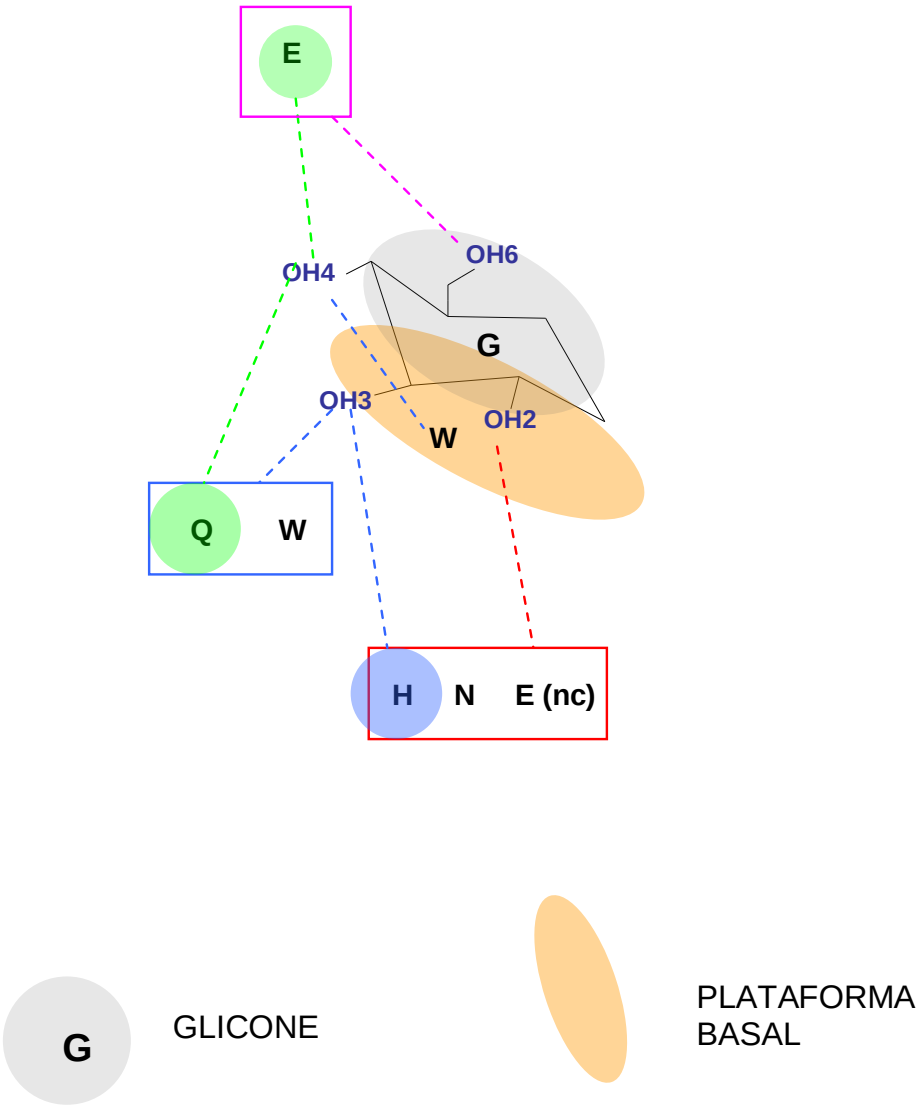
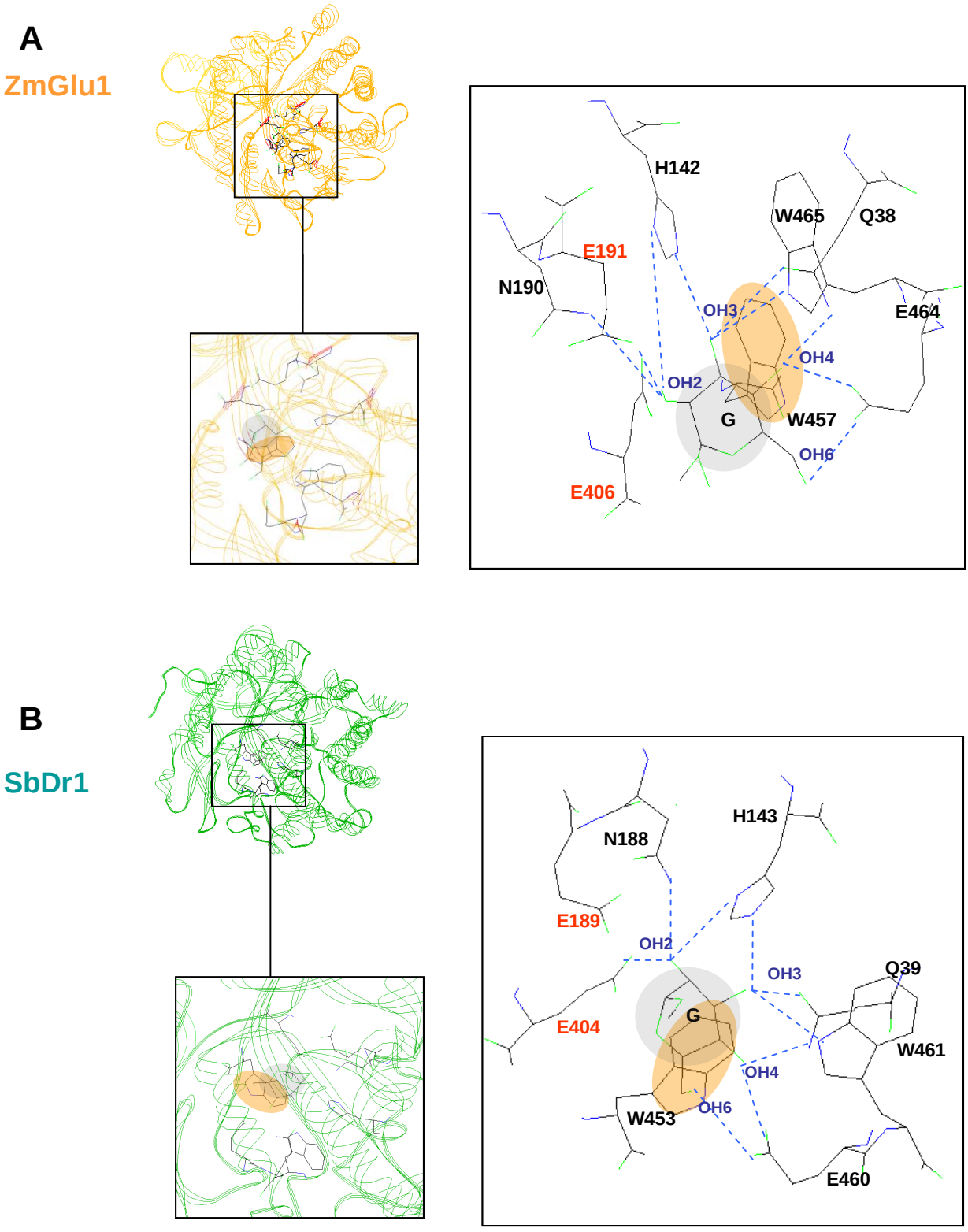


FIGURA 2.4.8.1. Representação esquemática da rede de ligações de hidrogênio dentro do subsítio -1. Os quadrados indicam os resíduos que fazem ligações de hidrogênio com uma determinada OH, enquanto os resíduos circundados representam que somente estes fazem ligações de hidrogênio com a OH da mesma cor do círculo. **(nc)** indica o E que também age como nucleófilo. (Baseado em Marana, 2006).

FIGURA 2.4.8.2.


A
ZmGlu1
H142
W465
Q38
E191
N190
OH3
E464
OH4
OH2
G
W457
OH6
E406
B
SbDr1
N188
H143
E189
OH2
OH3
Q39
E404
G
W461
OH4
OH6
W453
E460
G
GLICONE
PLATAFORMA
BASAL

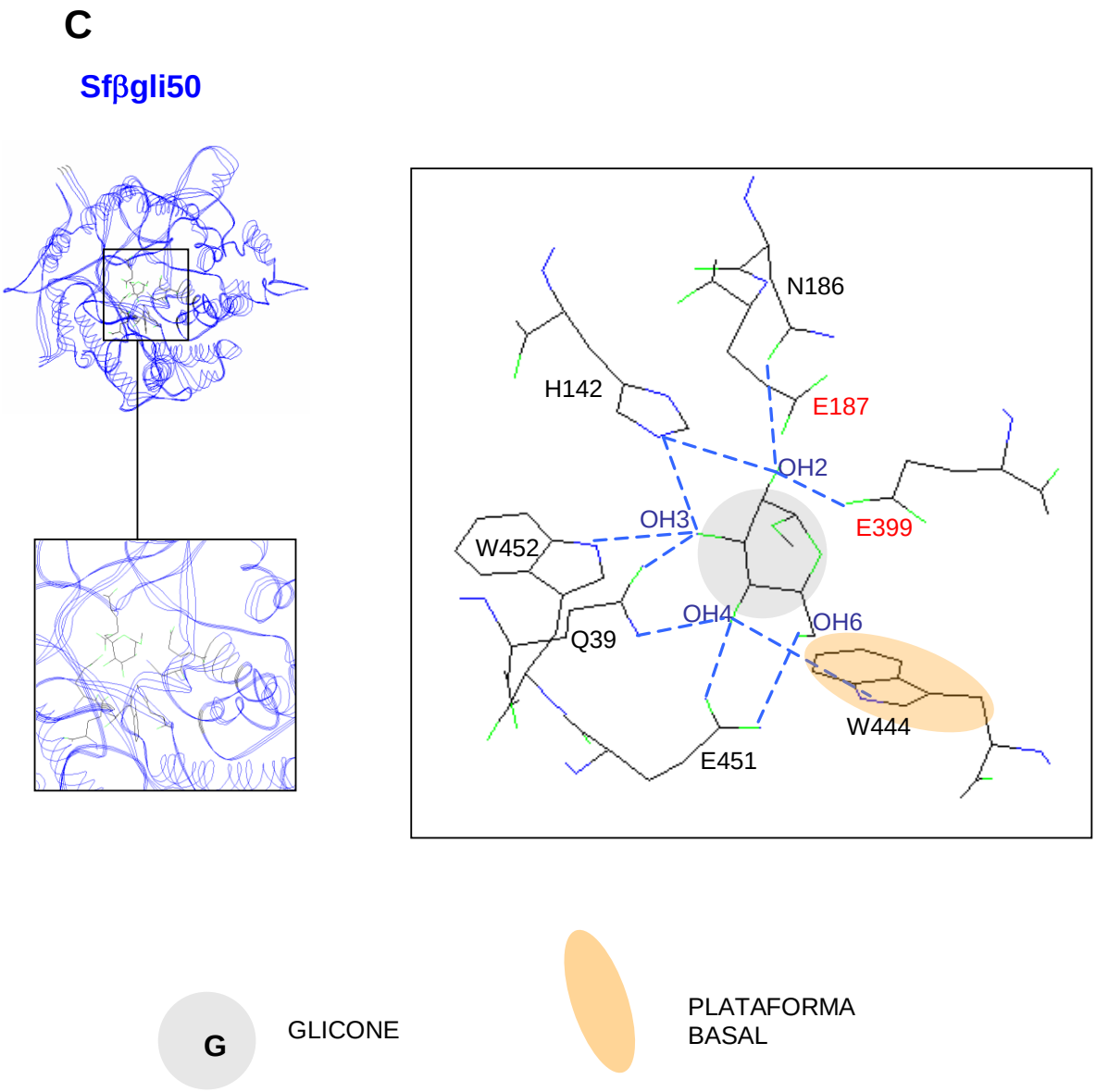


FIGURA 2.4.8.2. Representação da rede de ligações de hidrogênio entre o glicone do substrato e o subsítio -1 das β-glicosidases de **(A)** milho (Zmglu1; arquivo no pdb: 1e56), **(B)** sorgo (SbDr1; arquivo no pdb: 1v03) e **(C)** *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). As linhas tracejadas indicam ligações de hidrogênio. Cada quadrado pequeno está focalizando um detalhe da enzima com o substrato em seu interior e o quadrado maior expande este detalhe ressaltando os resíduos do sítio ativo envolvidos na ligação com o glicone. As estruturas foram visualizadas utilizando o Deep View / Swiss PDB Viewer v3.7 (Guex and Peitsh, 1997).

2.4.9. Especificidade pelo aglicone nas β-glicosidases GH 1 e em Sfβgli50.

Em relação à região de ligação do aglicone, sabe-se que há diferenças entre β-glicosidases GH 1 de diferentes organismos no número de subsítios responsáveis pela ligação dessa porção do substrato. Há casos extremos em que se encontra 4 subsítios (+1, +2, +3 e +4) (Hrmova *et al*., 1998) ou então, somente um (+1) (Fukuda *et al*., 2002). Já outras β-glicosidases possuem números intermediários de subsítios. Acredita-se que interações não-covalentes com o aglicone estejam concentradas no subsítio +1 e que este subsítio também possa ter um importante papel no posicionamento correto do substrato durante a catálise. Porém, esta hipótese ainda não foi experimentalmente testada.

Admite-se que a especificidade pelo aglicone pode ser determinada tanto por interações hidrofóbicas como por ligações de hidrogênio. As β-glucosidase de milho (ZmGlu1) e a de soja (SbDhr1) são as enzimas das quais se têm mais detalhes a respeito da região de ligação com o aglicone (Czjzek *et al*., 2000; Cicek *et al*., 2000; Verdoucq *et al*., 2003 e 2004). Os trabalhos sobre estas duas β-glicosidases revelaram que há preponderância de interações hidrofóbicas no subsítio +1 da ZmGlu1, o que deve conferir maior liberdade e diversidade de posicionamentos do aglicone. Enquanto, em SbDhr1, a presença de ligações de hidrogênio determina uma menor liberdade de posicionamentos do aglicone. Um possível reflexo dessas características, pode ser o fato de SbDhr1 somente hidrolisar seu substrato natural (dhurrina), enquanto ZmGlu1 hidrolisa um amplo espectro de substratos artificais e naturais (Czjzek *et al*., 2000).

Apesar da caracterização estrutural dos subsítios de ligação do aglicone em ZmGlu1 e SbDhr1, o papel de resíduos de aminoácidos desta porção do

sítio ativo na modulação da especificidade pelo aglicone permanece desconhecido. Isto se deve, ao fato que as interações não-covalentes entre os resíduos desses subsítios e o aglicone ainda não terem sido analisadas para nenhuma β-glicosidase.

Para a Sfβgli50 sabe-se que 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 uma 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. A partir da comparação das seqüências de Sfβgli50 com SbDhr1 e ZmGlu1 acredita-se que os resíduos E190, E194, K201 e M453 sejam constituintes do subsítio +1 de Sfβgli50 (figura 2.4.9.1.). A presença destes resíduos é coerente com a preferência deste subsítio por aglicones polares. É interessante notar que na β-glicosidase 1 do inseto *Tenebrio molitor* os resíduos equivalentes a E190, E194 e K201 são uma Q, A e F, respectivamente, e coerentemente o subsítio +1 dessa β-glicosidase tem preferência por aglicones apolares (Ferreira *et al*., 2001). A figura 2.4.9.2. ilustra o sítio ativo com os resíduos correspondentes nas β-glicosidases de milho, *Zea mays* (Zmglu1), sorgo, *S. bicolor* (SbDr1), *P. polymyxa* (BglB) e *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50).

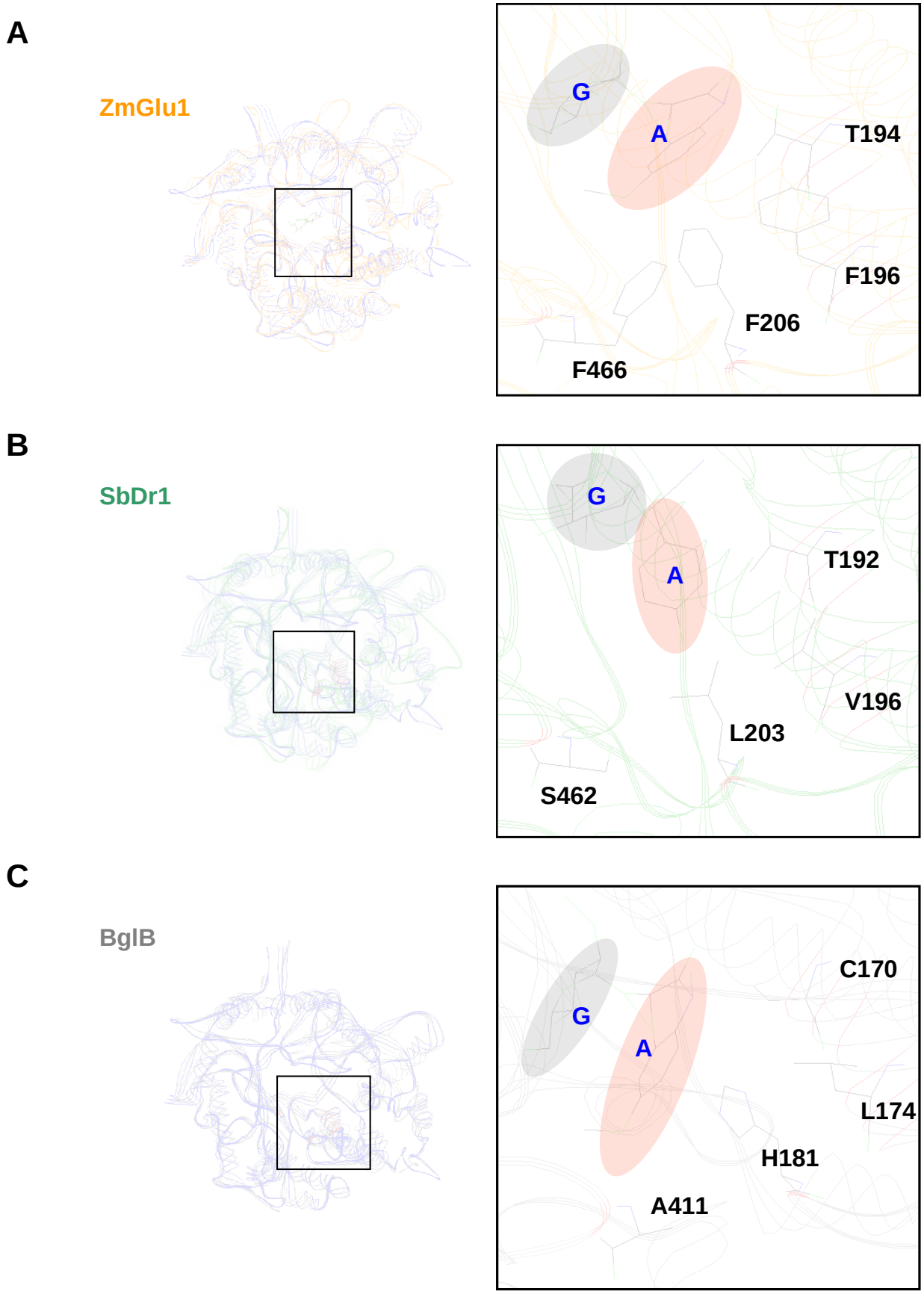
Apesar desta aparente correlação entre o tipo de resíduos no subsítio +1 e a preferência pelo aglicone, a efetiva participação dos resíduos E190, E194 e K201 (e mesmo de resíduos equivalentes a estes) na interação com o aglicone ainda não havia sido demonstrada experimentalmente.

```
Agrobacterium sp.     166 VATFNEPWCAVWLSHLYGVHAPGE 189
H. sapiens            160 WITINEANVLSVMSYDLGMFPPGI 183
S. bicolor            235 WLTFNEPETFCSVSYGTGVLAPGR 268
Z. mays               240 WLTFNEPQTFTSFSYGTGVFAPGR 263
T. molitor            181 WMTFNEIMQICEAGYSGGSFAPYI 204
S. frugiperda         182 FITFNEPREICFEGYGSATKAPIL 205
                              *:**  ↑  ↑.:  .  ↑ *

Agrobacterium sp.     408 MDNFEWAEGYR 418
H. sapiens            420 LDNFEWNQGYS 430
S. bicolor            507 LDNFEWSSGYT 517
Z. mays               514 LDNFEWFAGFT 524
T. molitor            441 MDNFEWMAGYT 451
S. frugiperda         447 MDNFEWMEGYI 457
                              :*****↑ *:
```

FIGURA 2.4.9.1. Alinhamento entre a β-glicosidase de *Spodoptera frugiperda* , Sfβgli50, e 5 outras β-glicosidases de BACTERIA (*Agrobacterium sp.* (P12614)) e EUKARIA (*Homo sapiens* (Q9H227), *Sorghum bicolor* (Q41290), *Zea mays* (P49235) e *Tenebrio molitor* (Q9GSE6)). As setas indicam os resíduos analisados neste trabalho em *S. frugiperda* e seus correspondentes em outras β-glicosidases (em negrito). As seqüências foram obtidas no CAZY databank (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY) e os alinhamentos foram feitos usando o CLUSTAL X.1.83 (Thompson *et al.*, 1997).

FIGURA 2.4.9.2.


A
ZmGlu1
G
A
T194
F196
F206
F466
B
SbDr1
G
A
T192
V196
L203
S462
C
BglB
C170
G
A
L174
H181
A411
G Glicone
A Aglicone

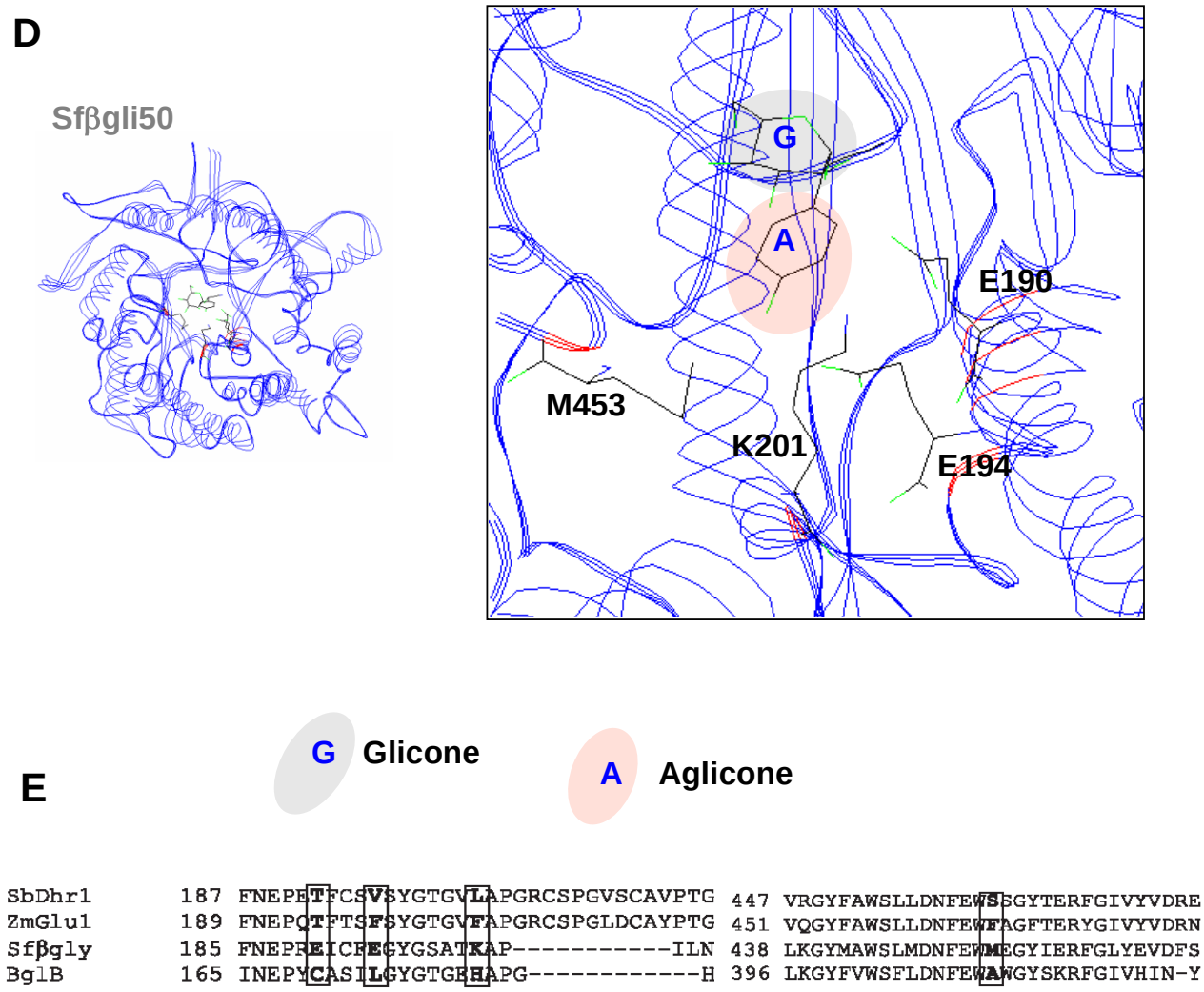


FIGURA 2.4.9.2. Representação esquemática mostrando os resíduos equivalentes em **(A)** milho, *Zea mays* (Zmglu1; arquivo no pdb: 1e56; estrutura em laranja), **(B)** sorgo, *S. bicolor* (SbDr1; arquivo no pdb: 1v03; estrutura em verde) e **(C)** *P. polymyxa* (BglB; arquivo no pdb: 2Z1S; estrutura em cinza) cujas estruturas estão sobrepostas a da **(D)** *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50; estrutura em azul). **(E)** Alinhamento entre estas β-glicosidases (destacados nos retângulos estão os resíduos correspondentes ao E190, E194, K201 e M453 da Sfβgli50 nestas outras enzimas). As seqüências de aminoácidos destas enzimas foram obtidas no CAZY databank (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY) e o alinhamento foi feito usando o CLUSTAL X.1.83 (Thompson *et al.*, 1997). As estruturas foram visualizadas utilizando o Deep View / Swiss PDB Viewer v3.7 (Guex and Peitsh, 1997). Mais detalhes ver item 4.10..

2.5. Porque utilizar β-glicosidases GH 1 como modelo experimental?

Como comentado, as β-glicosidases da família 1 das GH são enzimas que possuem importantes papéis em diversos processos biológicos sendo também importantes em termos quantitativos em todos os grupos, Eukaria, Archea e Bacteria. Além disto, há aplicações industriais em que este grupo de enzimas está envolvido. Por exemplo, pode-se citar a participação em uma das etapas da produção de etanol. Consequentemente, o entendimento dessas enzimas é relevante para os processos em que estejam envolvidas.

Além destes fatores, deve novamente ser ressaltado que as β-glicosidases são enzimas muito conservadas em termos de estrutura secundária e terciária. Porém, mesmo assim podem possuir propriedades catalíticas muito distintas, sendo a especificidade pelo substrato o melhor exemplo. Em geral elas tendem a ter uma ampla especificidade pelo substrato, mas com preferências muitas vezes distintas, ou seja, há enzimas que hidrolisam os mesmos substratos, mas com eficiências diferentes sobre cada um destes. No entanto, também há casos em que a especificidade é bem restrita. As β-glicosidases são as CAZymes melhor caracterizadas e ainda "continua a ser um campo em ascensão" (Henrissat *et al*., 2005), com muitos detalhes estruturais e de mecanismos a serem estudados, como os processos de transglicosilação, especificidade pelo aglicone e muitos outros. Assim, um dos grandes méritos do estudo das β-glicosidases é o acréscimo do conhecimento sobre as bases moleculares das propriedades catalíticas, podendo ser em termos funcionais, estruturais ou evolutivos.

3. OBJETIVOS.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo das bases moleculares da especificidade pelo substrato em β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases, utilizando como modelo experimental uma β-glicosidase pertencente a larva de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). De tal forma que este trabalho pode ser dividido em duas etapas:

1ª Analisar o papel na modulação da especificidade pelo substrato e na catálise dos resíduos da Sfβgli50 correspondentes aos encontrados nas β-glicosidases de milho e de sorgo que interagem com o aglicone. Estes resíduos são: E190, E194, M453 e K201.

2ª Identificar resíduos ou regiões da Sfβgli50 que participem do processo de modulação da especificidade pelo substrato e que ainda não tenham sido descritos na literatura.

A primeira etapa foi executada através de mutagênese sítio-dirigida dos resíduos E190, E194, M453 e K201, seguida por caracterizações cinéticas destas enzimas mutantes com substratos e inibidores (figura 3.1. ETAPA 01).

A segunda etapa foi realizada por meio da técnica de mutagênese aleatória *in vitro* selecionando enzimas mutantes da Sfβgli50 com especificidade pelo substrato alterada (figura 3.1. ETAPA 02).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO: 1ª ETAPA.

5.1. Construção, indução e purificação das Sfβgli50 mutantes.

As estruturas espaciais de ZmGlu1, SbDhr1 e BglB, como já comentado, revelaram alguns grupos de resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação do aglicone. Percebe-se como elemento estrutural em comum neste sítio ativo para estas enzimas a presença de uma plataforma basal formada por um resíduo de triptofano (W378 em ZmGlu1, W376 em SbDhr1 e W328 em BglB). Pode-se também perceber que há porções deste sítio que são variáveis, formadas por T194, F198, F205 e F466 em ZmGlu1 e por T192, V196, L203 e S462 em SbDhr1. Estes resíduos correspondem a C170, L174, H181e A411 em BglB, os quais, juntamente com Y196, N223, E225, Q316 e W412 formam o sítio de ligação do aglicone e que podem estar potencialmente envolvidos na ligação do aglicone (Figura 2.4.9.2.). Existem ainda outros resíduos cujo papel é ajudar no posicionamento dos resíduos que interagem diretamente com o aglicone (resíduo da plataforma basal e os resíduos variáveis).

Assim, com base no alinhamento de seqüências e comparações estruturais (figura 2.4.9.2. - E) os resíduos E190, E194, K201 e M453, os quais correspondem aos resíduos T194, F198, F205 e F466 em ZmGlu1, T192, V196, L203 e S462 em SbDhr1 e C170, L174, H181e A411 em BglB podem ser parte do sítio de ligação do aglicone da Sfβgli50 (figura 2.4.9.2. - D). Assim, tendo por objetivo estabelecer a contribuição relativa desses resíduos para a interação com diferentes tipos de aglicone, eles foram trocados através de

mutagênese sítio-dirigida, gerando as mutantes E190A, E190Q, E194A, K201A, K201F e M453A. As trocas feitas para A tiveram como objetivo remover a cadeia lateral que pode interagir com o aglicone. As mutações E190Q e K201F foram planejadas de tal forma que os resíduos E190 e K201 fossem trocados pelos seus resíduos correspondentes, Q e F, na β-glicosidase de *Tenebrio molitor*, a qual possui cerca de 45% de identidade e 65% de similaridade com a Sfβgli50. A enzima de *Tenebrio molitor* foi previamente caracterizada (Ferreira *et al.,* 2001), mostrando diferenças na especificidade pelo aglicone em relação à Sfβgli50. Além disto, é possível verificar que outras β-glicosidases, como a de *Homo sapiens* e *Zea mays*, também apresentam F nesta posição (figura 2.4.9.1.).

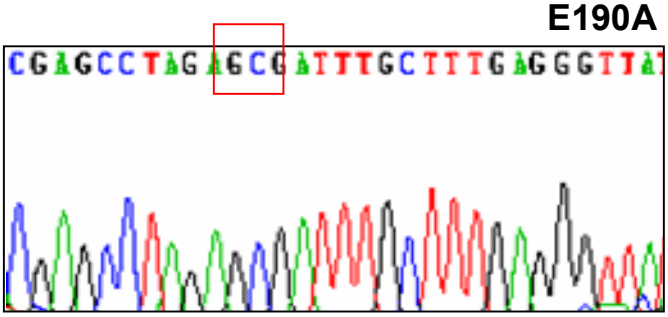
As mutações foram inseridas na Sfβgli50 por meio de mutagênese sítio-dirigida (item 4.1.), e a seguir o inserto dos plasmídeos pT7-7 codificando estas Sfβgli50 mutantes foi seqüenciado por inteiro (item 4.2.) para que fosse verificada a inserção das mutações planejadas e a ausência de mutações secundárias (figura 5.1.1.). Em seguida, estas enzimas mutantes foram expressas em bactérias BL21-DE3 (item 4.3.) sendo sua produção verificada através de SDS-PAGE. Estas bactérias foram lisadas e as Sfβgli50 mutantes foram purificadas por precipitações com sulfato de amônio e cromatografias em sistema FPLC (item 4.4.), sendo a eficiência deste procedimento verificada por meio de SDS-PAGE (figuras 5.1.2. até 5.1.8.). Estas Sfβgli50 mutantes e selvagem purificadas foram caracterizadas cineticamente através da determinação do K_m, V_{max} e k_{cat} para alguns substratos (*p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPβgluco ou gluco), *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo (pNPβfuco ou fuco), *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (pNPβgala ou gala), *p*-

nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPβxilo ou xilo) e metilumbeliferil-β-D-glucopiranosídeo (MUβgluco) (item 4.9.1.) (figuras 5.1.9. até 5.1.15.; tabela 5.1.1.). Também foi determinada a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i) (figuras 5.1.16.; tabela 5.1.2.) e, consequentemente, a energia de ligação entre inibidor e enzima (ΔG^o) para alquil-β-glicosídeos (metil-β-D-glucopiranosídeo, hexil-β-D-glucopiranosídeo, heptil-β-D-glucopiranosídeo, octil-β-D-glucopiranosídeo e nonil-β-D-glucopiranosídeo), fenil-β-glicosídeo e oligocelodextrinas (celobiose, celotriose, celotetraose e celopentaose) (itens 4.9.3. e 4.9.4.).

FIGURA 5.1.1.

E190A

A

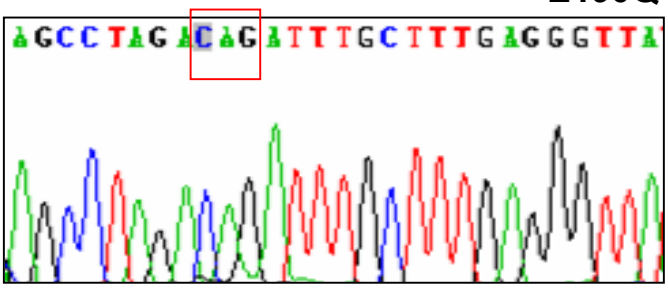


B

```
        E  P  R  A  I  C  F  E  G
       GAGCCTAGAGCGATTTGCTTTGAGGGTT
559    ..........A................. 686
187     E  P  R  E  I  C  F  E  G   195
```

E190Q

A

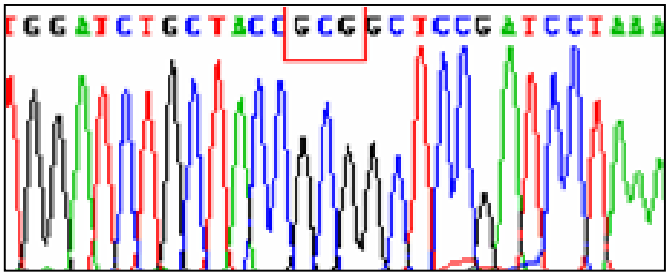


B

```
        E  P  R  Q  I  C  F  E  G
       GAGCCTAGACAGATTTGCTTTGAGGGTT
559    .........G................. 686
187     E  P  R  E  I  C  F  E  G   195
```

K201A

A

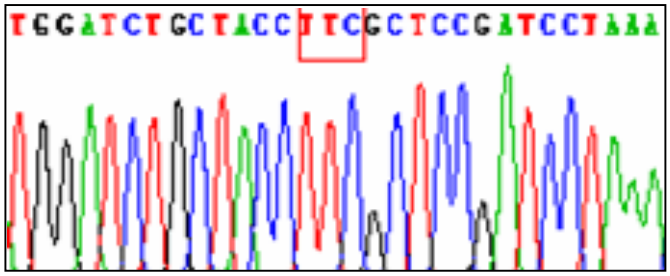


B

```
        G  S  A  T  A  A  P  I  L  N
.      TGGATCTGCTACCGCGGCTCCGATCCTAAA
588   .............AA................ 617
197     G  S  A  T  K  A  P  I  L  N  206
```

K201F

A



B

```
        G  S  A  T  F  A  P  I  L  N
.      TGGATCTGCTACTTCGGCTCCGATCCTAAA
588   .............AAG............... 617
197     G  S  A  T  K  A  P  I  L  N  206
```

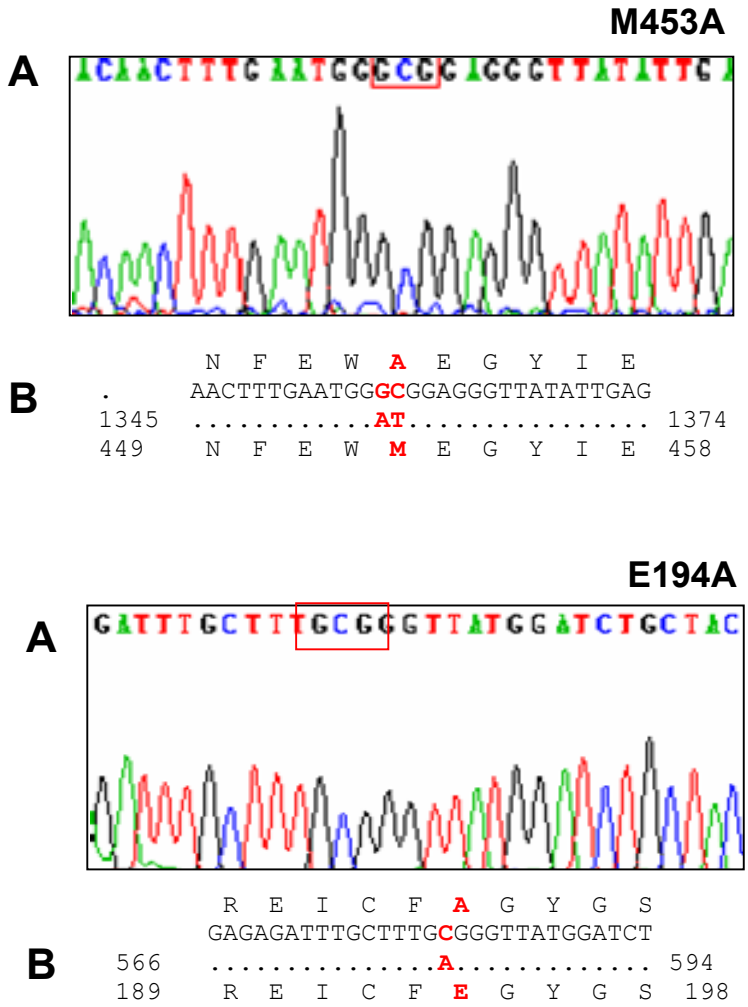


FIGURA 5.1.1. Sequenciamento do inserto dos vetores pT7-7 codificando as Sfβgli50 mutantes E190A, E190Q, K201A, K201F, M453A e E194A. **(A)** Detalhe do eletroferograma da reação de sequenciamento destacando dentro do retângulo vermelho o códon com mutação. **(B)** Detalhe do alinhamento entre a Sfβgli50 selvagem e as respectivas enzimas mutantes destacando em vermelho os aminoácidos e nucleotídeos mutados. Mais detalhes ver item 4.2..

TABELA 5.1.1. Parâmetros de cinética do estado estacionário para a hidrólise de *p*-nitrofenil-β-D-glicosídeos pela Sfβgli50 selvagem e mutantes.

enzima	substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1},mM^{-1})	k_{cat}/K_m relativo
	Fuco	0,59 ± 0,05	0,348 ± 0,009	0,58 ± 0,05	100
	Gluco	1,05 ± 0,05	0,59 ± 0,01	0,533± 0,002	90
E190A	Gala	8,2 ± 0,2	0,072 ± 0,001	0,0087 ± 0,0002	1,5
	Xilo	4,9 ± 0,4	0,00188 ± 0,00009	0,00038 ± 0,00003	0,06
	MUβgluco	6,3 ± 0,6	0,020 ± 0,001	0,0031 ± 0,0003	0,5
	Fuco	0,38 ± 0,03	0,98 ± 0,01	2,5 ± 0,2	100
	Gluco	1,20 ± 0,07	0,56 ± 0,01	0,46 ± 0,02	18
E194A	Gala	9,0 ± 0,3	0,189 ± 0,003	0,0210 ± 0,0007	0,8
	Xilo	4,8 ± 0,2	0,0127 ± 0,0003	0,0026 ± 0,0001	0,1
	MUβgluco	2,6 ± 0,1	0,2674 ± 0,0004	0,102 ± 0,003	3,9
	Fuco	0,71 ± 0,05	2,43 ± 0,03	3,4 ± 0,2	100
	Gluco	2,6 ± 0,2	0,66 ± 0,02	0,25 ± 0,02	7,5
K201A	Gala	4,9 ± 0,3	0,058 ± 0,001	0,0118 ± 0,0007	0,3
	Xilo	2,4 ± 0,1	0,0073 ± 0,0001	0,0030 ± 0,0001	0,09
	MUβgluco	2,6 ± 0,2	0,032 ± 0,001	0,0123 ± 0,0001	0,3
	Fuco	0,65 ± 0,04	4,15 ± 0,05	6,3 ± 0,4	100
	Gluco	1,26 ± 0,03	1,52 ± 0,01	1,20 ± 0,02	18
M453A	Gala	4,4 ± 0,2	0,174 ± 0,004	0,039 ± 0,002	0,6
	Xilo	3,6 ± 0,3	0,0238 ± 0,0009	0,0066 ± 0,0006	0,1
	MUβgluco	1,7 ± 0,1	0,62 ± 0,01	0,36 ± 0,02	5,7
	Fuco	0,62 ± 0,06	8,9 ± 0,1	14 ± 1	87
	Gluco	1,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,3 ± 0,2	20
K201F	Gala	6,2 ± 0,3	4,03 ± 0,09	0,65 ± 0,03	3,9
	Xilo	1,04 ± 0,06	0,089 ± 0,001	0,085 ± 0,005	0,5
	MUβgluco	0,08 ± 0,01	1,32 ± 0,08	16 ± 2	100
	Fuco	0,66 ± 0,04	0,668 ± 0,009	1,00 ± 0,06	100
	Gluco	2,10 ± 0,09	0,65 ± 0,01	0,31 ± 0,01	30
E190Q	Gala	9,9 ± 0,5	0,153 ± 0,003	0,0154 ± 0,0008	1,5
	Xilo	4,7 ± 0,4	0,0211 ± 0,0008	0,0044 ± 0,0004	0,4
	MUβgluco	6,2 ± 0,4	0,114 ± 0,004	0,018 ± 0,001	1,8
	Fuco	0,8 ± 0,1	2,4 ± 0,5	3,0 ± 0,7	100
	Gluco	0,47 ± 0,01	0,56 ± 0,01	1,19 ± 0,03	39
Sfβgli50	Gala	2,1 ± 0,2	0,17 ± 0,01	0,080 ± 0,009	2,7
selvagem	Xilo	0,52 ± 0,04	0,0140 ± 0,0001	0,026 ± 0,002	0,9
	MUβgluco	2,3 ± 0,1	1,73 ± 0,09	0,75 ± 0,05	25

Os parâmetros foram determinados utilizando-se no mínimo 10 diferentes concentrações de substratos e os ajustes na equação de Michaelis-Menten foram feitos através do software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

TABELA 5.1.2. Dados de inibição para a Sfβgli50 selvagem e mutantes.

inibidor	E190A	E194A	K201A	M453A
	K_i (mM)			
fenilβglc	30 ± 2	36 ± 1	74 ± 4	52 ± 1
metilβglc	8,0 ± 0,2	10,1 ± 0,1	15,6 ± 0,4	10,2 ± 0,4
celobiose	17 ± 1	1,2 ± 0,1	81 ± 3	5,2 ± 0,3
celotriose	2,3 ± 0,2	0,070 ± 0,004	0,41 ± 0,01	0,09 ± 0,01
celotetraose	2,4 ± 0,1	0,14 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,21 ± 0,01
celopentaose	2,0 ± 0,1	0,20 ± 0,01	2,3 ± 0,1	0,26 ± 0,01
hexilβglc	32 ± 2	8,0 ± 0,4	10,0 ± 0,6	5,6 ± 0,2
heptilβglc	21 ± 1	3,6 ± 0,1	4,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1
octilβglc	10,3 ± 0,6	1,49 ± 0,03	2,52 ± 0,09	1,30 ± 0,06
nonilβglc	5,9 ± 0,2	0,83 ± 0,02	1,16 ± 0,04	0,50 ± 0,03

inibidor	K201F	E190Q	Sfβgli50 selvagem
	K_i (mM)		
fenilβglc	48 ± 1	78 ± 1	47 ± 5
metilβglc	10 ± 1	12,1 ± 0,3	6,4 ± 0,8
celobiose	30 ± 1	13,7 ± 0,4	2,8 ± 0,2
celotriose	0,04 ± 0,01	8,6 ± 0,3	0,85 ± 0,02
celotetraose	0,25 ± 0,03	19,6 ± 0,7	0,29 ± 0,04
celopentaose	0,30 ± 0,02	16,2 ± 0,3	0,56 ± 0,02
hexilβglc	3,3 ± 0,2	44,9 ± 0,7	9,8 ± 0,5
heptilβglc	1,12 ± 0,06	21,8 ± 0,5	5,9 ± 0,3
octilβglc	0,42 ± 0,03	11,0 ± 0,2	4,0 ± 0,3
nonilβglc	0,13 ± 0,01	5,7 ± 0,3	1,69 ± 0,03

Todos os ensaios apresentaram um padrão de inibição competitiva linear simples. Os valores de K_i foram calculados usando o software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987) e os dados foram obtidos com cinco diferentes concentrações de substrato (MUβgluco) na presença de cinco diferentes concentrações de inibidor.

5.2. Interações entre grupos alquil e o sítio de ligação de aglicones da Sfβgli50.

Baseado nos valores de K_i (tabela 5.1.2.), foram calculadas as energias de ligação (ΔG^o) (de acordo como descrito nos itens 4.9.3. e 4.9.4.) das Sfβgli50 selvagem e mutantes com o radical pentil formado pelos grupos metil 2 a 6 de um aglicone tipo alquil (chamado de alquil inicial) (figura 5.2.1.). Este parâmetro foi calculado pela substração do ΔG^o para hexil-β-D-glucopiranosídeo pelo ΔG^o para metil-β-D-glucopiranosídeo. Estes dados indicaram uma ligação favorável (ΔG^o de -2,9 kJ.mol^{-1}) entre o alquil inicial e a Sfβgli50 selvagem. Contudo, a energia desta interação foi reduzida para as mutantes E194A, K201A e M453A. A mutação K201F não afetou a ligação desse radical. A ligação do alquil inicial no sítio de ligação do aglicone foi desfavorável para as mutantes E190A (ΔG^o de +3,5 kJ.mol^{-1}) e E190Q (ΔG^o de +3,3 kJ.mol^{-1}). Foram estas duas mutações que produziram os efeitos mais drásticos sobre a ligação do alquil inicial , convertendo uma interação favorável em uma interação desfavorável.

Além disso, foi determinada a energia de ligação da porção terminal do aglicone tipo alquil (do sétimo ao nono grupo metil) pela subtração do ΔG^o para nonil-β-D-glucopiranosídeo do ΔG^o para hexil-β-D-glucopiranosídeo. Verifica-se que a interação favorável (ΔG^o de -4,9 kJ.mol^{-1}) para a ligação da porção terminal do aglicone tipo alquil observada para a Sfβgli50 selvagem não foi significativamente afetada pelas mutações, exceto no caso da mutante K201F, cuja interação com o alquil terminal tornou-se mais favorável (ΔG^o de -8,1 kJ.mol^{-1}) (figura 5.2.1.).

Assim, os resultados indicam que os resíduos E190, E194, K201 e M453 fazem parte do sítio de ligação do aglicone da Sfβgli50 e interagem com a porção inicial de grupos alquil compreendida do 2º ao 6º grupo metil. Por outro lado, a ligação de radicais alquil na porção mais externa do sítio de ligação ao aglicone, a qual é ocupada pelo 7º ao 9º grupo metil, sugere não ser influenciada por estes resíduos.

A energia de ligação para um aglicone formado por um radical fenil foi calculada através da subtração do ΔG^o para fenil-β-D-glucopiranosídeo pelo ΔG^o para metil-β-D-glucopiranosídeo. Estes dados mostram uma ligação desfavorável do aglicone tipo fenil com a Sfβgli50 selvagem e com todas as suas mutantes. Verifica-se que não houve grandes alterações, sendo que as mutações E190A e E194A apresentaram uma pequena redução dessa interação desfavorável (cerca de 40%) (figura 5.2.1.). Desse modo, em contraste com a ligação dos aglicones tipo alquil, estas mutações simples foram incapazes de causar grandes alterações na interação de um aglicone tipo fenil com a Sfβgli50.

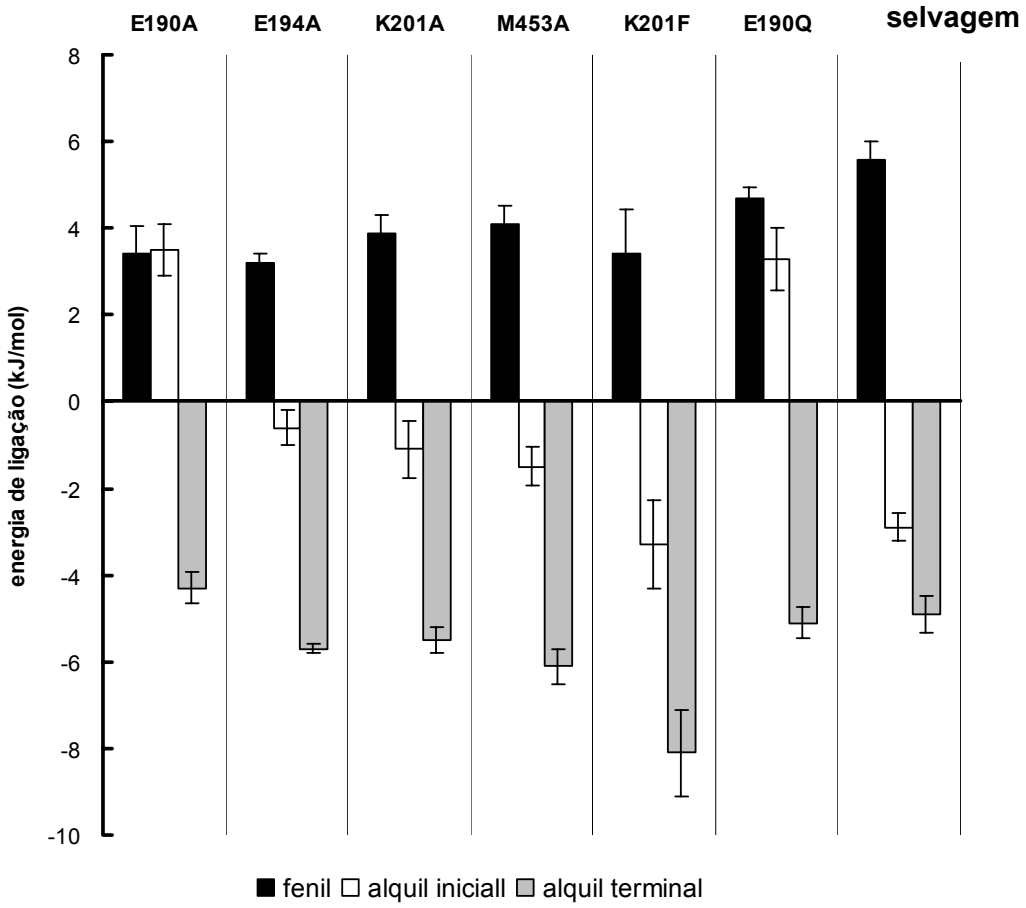


FIGURA 5.2.1. Energia de interação entre diferentes aglicones do tipo alquil inicial, terminal e fenil e a Sfβgli50 selvagem e mutantes (E190A, E194A, K201A, M453A, K201F e E190Q. Valores negativos correspondem a interações favoráveis, enquanto os valores positivos representam ligações desfavoráveis. As barras pretas indicam aglicones formados por um radical fenil; as barras brancas indicam a porção inicial de um aglicone do tipo alquil (radicais formados pelo 2º ao 6º grupo metileno) e as barras cinza indicam a porção terminal de um aglicone do tipo alquil (radicais formados pelo 7º ao 9º grupo metileno). Mais detalhes ver item 4.9.4..

5.3. Interações entre unidades de glicose e o sítio de ligação de aglicones da Sfβgli50.

Em seguida, foram determinados os K_is entre oligocelodextrinas e as Sfβgli50 selvagem e mutantes (tabela 5.1.2.) (item 4.9.3.). Com base nestes resultados foram calculadas as energias de ligação para cada unidade de glicose do aglicone (ΔG^o / unidade de glicose) (item 4.9.4.) (figura 5.3.1.). A unidade de glicose que forma a extremidade não redutora do aglicone foi chamada de primeira unidade de glicose, enquanto as outras unidades de glicose foram seqüencialmente nomeadas em direção à extremidade redutora do aglicone.

Como pode ser verificado (figura 5.3.1.), as mutações E190A, E190Q, K201A, K201F e E194A afetaram a ligação da primeira unidade de glicose do aglicone ($\Delta\Delta G^o$ = +3,3, +1,7, +5,5, +4,1 e -3,9, kJ.mol^{-1}, respectivamente). Com um desfavorecimento da ligação para os quatro primeiros e um aumento da energia de ligação para a enzima mutante E194A. A enzima mutante M453A não sofreu nenhuma alteração neste parâmetro.

Em relação à segunda unidade de glicose do aglicone, as enzimas mutantes M453A, K201A e K201F tiveram um aumento da afinidade ($\Delta\Delta G^o$ = -4,2, -7,3 e -10 kJ.mol^{-1}, respectivamente). Contudo, as mutantes E190A e E194A não sofreram alteração nessa interação, enquanto que, a mutante E190Q sofreu uma grande redução da afinidade pela segunda unidade de glicose.

Assim, os dados indicam que os resíduos E190 e E194 interagem com a primeira unidade de glicose do aglicone. Já o resíduo M453 interage com a segunda unidade de glicose do aglicone, enquanto, o resíduo K201 interage com ambas as unidades de glicose, primeira e segunda.

As enzimas mutantes E194A, K201A, K201F, M453A e E190Q também sofreram alterações significativas na ligação com a terceira unidade de glicose

($\Delta\Delta G^o$ = +2,5, +1,4, +5,3, +2,8 e + 2,8 kJ.mol^{-1}, respectivamente). Além disso, os dados sugerem que a quarta unidade de glicose não é ligada pelas Sfβgli50 mutantes, assim como verificado para a selvagem.

Levando em consideração a concepção de que cada unidade de glicose do aglicone interage com uma porção específica do sítio de ligação do aglicone, os subsítios, e tendo como base os dados apresentados, pode-se supor que os resíduos E190 e E194 estão posicionados em uma região interna do sítio de ligação do aglicone. Provavelmente, estes resíduos estejam no subsítio +1, pois eles influenciam a ligação da primeira unidade de glicose. Por outro lado, o resíduo M453 pode estar posicionado no subsítio +2, porque este resíduo influencia a ligação da segunda unidade de glicose do aglicone. O resíduo K201 pode fazer parte dos subsítios +1 e +2, ou estar localizado na interface entre estes subsítios, pois afeta simultaneamente a ligação da primeira e da segunda unidade de glicose do aglicone. Esta proposta está de acordo também com os dados para os aglicones tipo alquil, pois o radical pentil formado pelo 2º ao 6º grupos metil, alquil inicial, ocupa o subsítio +1 e parte do +2. Assim, os resíduos E190, E194, K201 e M453 podem interagir com a porção inicial de um aglicone tipo alquil e com diferentes unidades de glicose de um aglicone oligossacarídico.

Ainda pode ser verificado que a figura 5.3.1. mostra que as mutações K201A e K201F afetam as interações com as primeiras três unidades de glicose do aglicone e a mutação M453A causa modificações nas interações com a segunda e a terceira unidade de glicose. Isto sugere que modificações nas interações com uma unidade de glicose específica do aglicone pode alterar a conformação e/ou “liberdade” das outras unidades de glicose que fazem parte do aglicone, afetando suas interações com os subsítios seguintes.

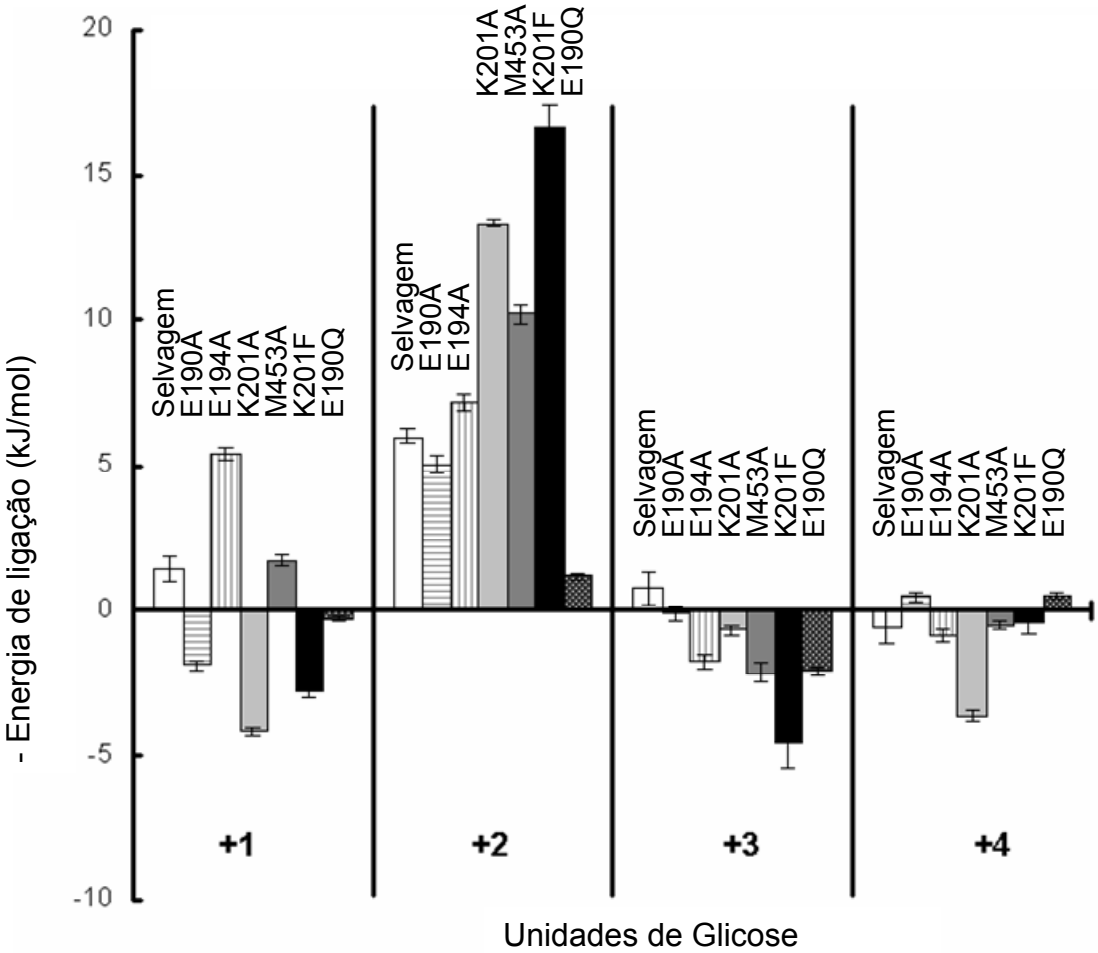


FIGURA 5.3.1. Energia de interação entre unidades de glicose do aglicone com a Sfβgli50 selvagem e mutantes (E190A, E194A, K201A, M453A, K201F e E190Q). Os valores positivos representam interações favoráveis, enquanto os valores negativos correspondem a interações desfavoráveis. As unidades de glicose são numeradas da extremidade não redutora para a redutora do aglicone. Mais detalhes ver item 4.9.4..

5.4. Análise comparativa dos efeitos mutacionais.

Baseando-se na caracterização da ligação de diferentes tipos de aglicone pela Sfβgli50, uma análise comparativa dos efeitos mutacionais revelou, conforme discutido abaixo, que os resíduos E190, E194, K201 e M453 possuem diferentes papéis na determinação da especificidade da Sfβgli50 pelo aglicone do substrato.

A ligação desfavorável de um grupo fenil observado para a Sfβgli50 selvagem como para todas as mutantes sugere que, embora um aglicone volumoso e apolar como o radical fenil possa formar interações favoráveis com a plataforma basal do subsítio +1 (W444 na Sfβgli50), a sua ligação é dominada por interações desfavoráveis formadas simultaneamente com os resíduos polares E190, E194 e K201. De tal forma que a troca destes resíduos por A, a qual tem uma cadeia lateral pequena, provocou uma pequena redução na interação desfavorável com este radical, mas não foi suficiente para reverter esta situação (figura 5.2.1.). Assim, o efeito combinatório destes resíduos polares dificulta a ligação do grupo fenil. Curiosamente, os grupos alquil não sofrem esta ação, isto talvez seja devido ao fato de serem mais compactos e flexíveis.

De fato os resíduos E190, E194, K201 e M453 contribuíram para a ligação favorável da porção inicial de um aglicone do tipo alquil. Destes resíduos, o E190 é o mais importante para esta interação, pois as mutações E190A e E190Q resultaram em um grande decréscimo da afinidade pelo alquil inicial ($\Delta\Delta G^{o}$ = 6,4 e 6,2 kJ.mol-1, respectivamente) (figura 5.4.1.). A analisar da estrutura obtida por homologia para a Sfβgli50 sugere que o resíduo E190 interage por meio de uma interação eletrostática com a R189. Esta interação pode ter como um de seus efeitos restringir as conformações da R189 impedindo a aproximação destes dois resíduos carregados com o aglicone do

tipo alquil. De tal forma, a remoção do E190 pode causar restrições estéricas e repulsão entre o grupo alquil inicial e a cadeia lateral dessa arginina. Um efeito similar seria verificado no caso da mutante E190Q.

Os resíduos E194, K201 e M453 contribuem de modo similar para a ligação do radical alquil inicial, pois a troca destes resíduos por A resultou em um decréscimo da afinidade por este grupo aproximadamente de mesma magnitude para estas três mutantes ($\Delta\Delta G^o \sim 2$ kJ.mol^{-1}) (figura 5.4.1.).

Entretanto, os resíduos E190, E194, K201 e M453 mostraram diferentes contribuições para a ligação de unidades de glicose do aglicone. O resíduo M453 não afeta a ligação da primeira unidade de glicose ($\Delta\Delta G^o \sim 0$ kJ.mol^{-1}). O resíduo E194 tem um efeito desfavorável na ligação da primeira unidade de glicose, pois a troca de E194 por A aumentou em cerca de 3,9 kJ.mol^{-1} a afinidade para esta unidade de glicose. Na busca de uma hipótese para explicar este efeito, a análise da estrutura obtida por homologia para a Sfβgli50 permite verificar que o E194 está rodeado de resíduos polares capazes de fazer ligações de hidrogênio (T200, S198 e K201, os quais estão a 4,1, 3,6 e 3,4 Å da cadeia lateral do E194, respectivamente) e pode, assim, participar de uma rede de ligações de hidrogênio. Deste modo, ao ser mutado por A, a remoção da cadeia lateral do E194 talvez possa ter permitido que novas ligações de hidrogênio entre os resíduos T200, S198 e K201 fossem estabelecidas com as hidroxilas da primeira unidade de glicose, proporcionando um aumento da afinidade por este ligante na mutante E194A .

Os resíduos E190 e K201 podem formar interações que são importantes para a ligação da primeira unidade de glicose do aglicone, porque as trocas destes resíduos por A causaram grandes decréscimos na afinidade por glicose destas mutantes ($\Delta\Delta G^o$ = +3,9 e +5,6 kJ.mol^{-1}, respectivamente). O resíduo E190 corresponde a T194 na β-glicosidase ZmGlu1, a qual pode formar uma ligação de hidrogênio com o aglicone do substrato dimboa-Glc (figura 5.4.2.).

Pode-se ressaltar ainda que o resíduo K201 corresponde ao resíduo H181 na β-glicosidase BglB no qual interage através de uma ligação de hidrogênio com unidades de glicose do subsítio +1 desta enzima (Isorna *et al*., 2007) (figura 5.4.1.).

Nota-se que a mutação K201F reduziu a afinidade pela primeira unidade de glicose, mas não afetou a ligação da porção inicial do aglicone alquil (figura 5.5.2.). Além disso, a mutante K201F teve um aumento da afinidade pela porção terminal de aglicones tipo alquil (figura 5.2.1.). Nas β-glicosidases de *Tenebrio molitor* (Tmβgly; AF312017) e *Cavia porcelus* (Cpβgly; U50545) o resíduo que corresponde ao K201 em Sfβgli50 é trocado por F (F200 e F179, respectivamente). Em uma comparação entre estas enzimas notou-se que para a Sfβgli50 selvagem cada radical metil do aglicone aumenta em 1,6 $kJ.mol^{-1}$ a afinidade para alquil-β-glucosideos, enquanto que para a mutante K201F este valor passou a ser de 2,6 $kJ.mol^{-1}$ (figura 5.4.3.), o qual é similiar ao valor descrtio na literatura para a β-glicosidase Cpβgly (3,0 $kJ.mol^{-1}$) (Gopalam *et al*., 1989), mas é muito maior do que o encontrado para a β-glicosidase Tmβgly (1,0 kJ.mol-1) (Ferreira *et al*., 2001). De fato, para a Sfβgli50 a mutação K201F foi a única que alterou significativamente a contribuição de cada radical metil do aglicone para a afinidade pelos alquil β-glucosídeos. O fato desta troca de um resíduo polar carregado positivamente por um resíduo apolar provocar este aumento na afinidade por grupos alquil é mais um indício de que o resíduo da posição 201 interage com o aglicone. Deve ser ressaltado que infelizmente não temos dados na literatura do efeito que mutações por K nos resíduos F200 e F179 das β-glicosidases Tmβgly e Cpβgly, respectivamente, causariam na energia de ligação para grupos alquil. Pois, se fossem verificados decréscimos desta energia, teríamos uma confirmação dos resultados aqui observados e este seria mais um indício de que os resíduos equivalentes a K201 têm um papel chave na ligação com o aglicone do tipo alquil em β-glicosidases.

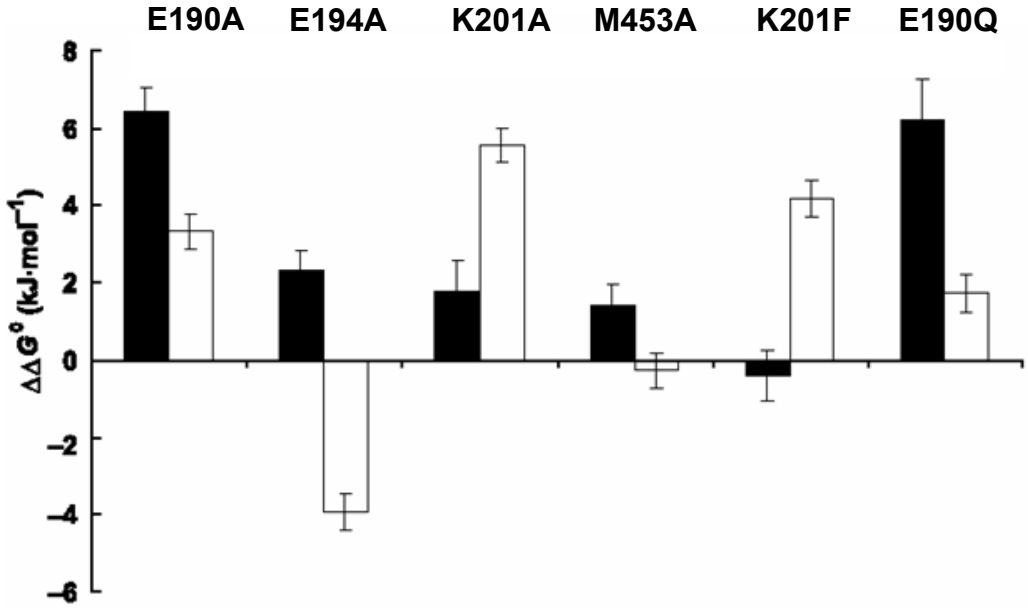


FIGURA 5.4.1. Efeito mutacional ($\Delta\Delta G^o$) sobre a energia de ligação de radicais alquil e unidades de glicose do aglicone. Barras pretas correspondem aos radicais alquil e barras brancas correspondem a unidades de glicose. Valores positivos de $\Delta\Delta G^o$ correspondem a um decréscimo na afinidade, enquanto os valores negativos de $\Delta\Delta G^o$ representam um aumento da afinidade. Mais detalhes ver item 4.9.4..

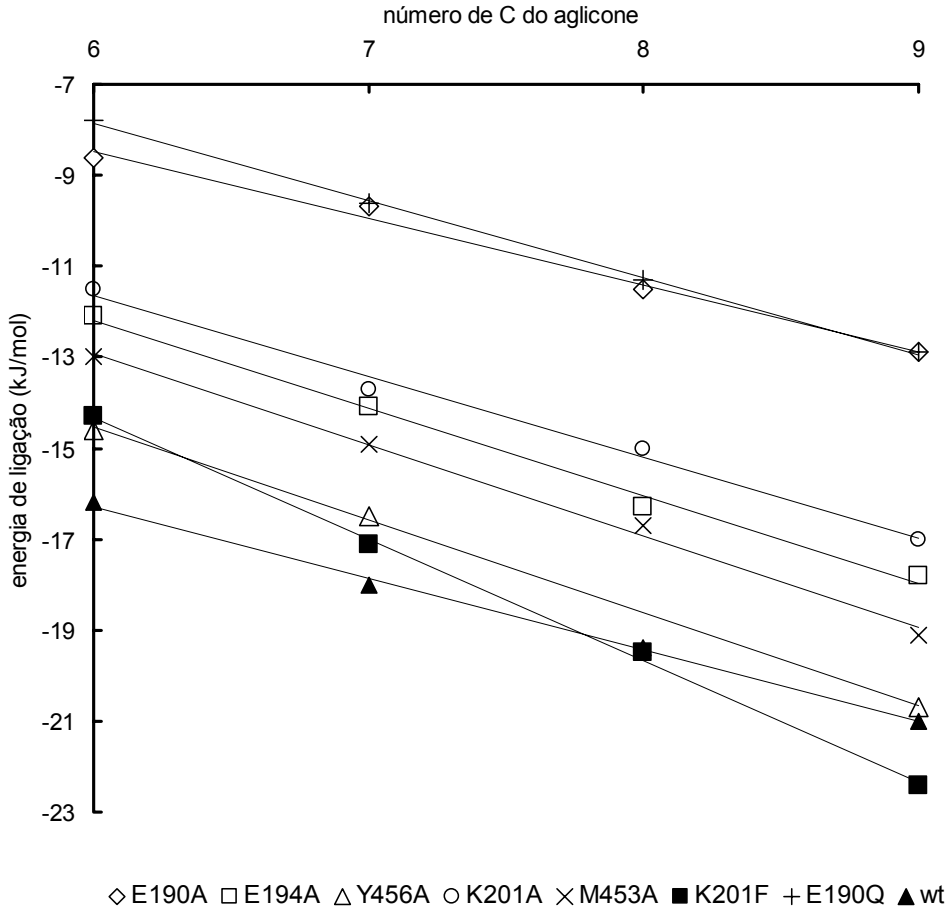


FIGURA 5.4.3. Variação da energia livre *(ΔG^o)* de associação de alquil-β-D-glucosídeos em função do número de carbonos do aglicone destes compostos para a Sfβgli50 selvagem (wt) e mutantes (E190A, E194A, K201A, M453A, K201F e E190Q). Os alquil-β-D-glucosídeos utilizados foram: hexil, heptil, octil e nonil β-D-glucopiranosídeos

5.5. Papel conjunto dos resíduos que interagem com o aglicone.

Os dados comentados nos itens 5.1. a 5.4. sugerem que o balanço das interações entre os resíduos E190, E194 e K201 com o aglicone, mais especificamente com a porção do aglicone que ocupa o subsítio +1, modula a especificidade por unidades de glicose *versus* grupos alquil na Sfβgli50. O resíduo E190 favorece a ligação dos radicais alquil (alquil inicial) e também a primeira unidade de glicose de aglicones oligossacarídicos. O E194 favorece a ligação dos grupos alquil e desfavorece a ligação por unidades de glicose. Enquanto que o K201 é mais importante para a ligação de unidades de glicose, apesar de também interagir favoravelmente com grupos alquil (figura 5.4.1.). Assim, mesmo considerando que a contribuição relativa para a especificidade pelo aglicone no subsítio +1 dos resíduos correspondentes ao E190, E194 e K201 em outras β-glicosidases pode ser diferente, pois existe uma ampla variedade de resíduos ocupando estas posições, podemos supor que seja mantida a sua participação diferencial. Desse modo, a modulação da especificidade pelo aglicone através de um balanço das interações formadas com estes três resíduos pode ser uma tendência geral nas β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases.

5.6. Papel catalítico dos resíduos E190, E194, M453 e K201 da Sfβgli50.

Foram determinados os parâmetros cinéticos de estado estacionário para a hidrólise de *p*-nitrofenil-β-glucosídeos e metilumbeliferil-β-glucosídeo para a Sfβgli50 selvagem e mutantes (Tabela 5.1.1.). Estes dados foram

usados para avaliar o efeito das mutações dos resíduos E190, E194, K201 e M453 sobre a estabilidade do complexo $ES^{\ddagger}$ para *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (gluco), *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo (fuco), *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (gala) e *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (xilo). A figura 5.6.1. mostra que todas mutações causaram desestabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ para todos os substratos testados, exceto a mutante K201F que proporcionou estabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ para os substratos *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo e *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo. A desestabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ indica uma redução da velocidade de hidrólise do substrato. A existência desses efeitos sugere que esses resíduos participam da catálise enzimática estabilizando o complexo $ES^{\ddagger}$. Considerando que o mecanismo catalítico das β-glicosidases é dividido em duas etapas (glicosilação e desglicosilação (item 2.4.5.; figura 2.4.5.1.)), e que o aglicone é liberado na primeira etapa, as interações desses resíduos com o aglicone provavelmente contribuem para a estabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ na etapa de glicosilação.

A análise da figura 5.6.1. permite-nos ressaltar dois pontos. Primeiramente, a comparação destes efeitos mutacionais com os efeitos obtidos para as mutações dos resíduos Q39 e E451 (os quais são resíduos envolvidos na ligação do glicone interagindo com ele e participando do processo de modulação da especificidade pelo glicone na Sfβgli50 (Marana *et al.,* 2002)), mostra que os efeitos de desestabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ verificado pelas mutações dos resíduos que ligam o aglicone são menores do que os efeitos observados para os resíduos do subsítio -1 (Q39 e E451) (figura 5.6.1.). Isto é um indício de que a energia das interações não-covalentes da enzima com o glicone disponíveis para estabilizar o complexo $ES^{\ddagger}$ devem estar

concentradas em alguns poucos resíduos do subsítio -1 (por exemplo nos resíduos Q39 e E451 (Marana *et al.,* 2002)), enquanto as interações com o aglicone que estabilizam o complexo $ES^{\ddagger}$ são mais homogeneamente distribuídas entre vários resíduos. O segundo ponto a ser ressaltado leva em consideração que os dados apresentados na figura 5.6.1 são para substratos que somente diferem na porção do glicone. Assim, o fato dos resultados obtidos para E190A, E194A, K201A e M453A tenderem a ser semelhantes ou mais homogêneas para a mesma enzima mutante quando comparamos com as desestabilizações para as mutantes dos resíduos que interagem com o glicone (Q39 e E451) sugere que os resíduos E190, E194, K201 e M453 não interajam diretamente com o glicone do substrato. Logo, eles participam do processo de catálise enzimática estabilizando o complexo $ES^{\ddagger}$, interagindo unicamente com o aglicone.

Considerando este último dado, procurou-se determinar os efeitos das alterações da estrutura do glicone na estabilidade do complexo $ES^{\ddagger}$ ($\Delta\Delta G^{\ddagger}$) para a Sfβgli50 selvagem e mutantes através de comparações dos k_{cat} / K_m para a hidrólise de *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo e *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo. Os $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ calculados a partir destes k_{cat} / K_m, por serem determinados para uma série de substratos que diferem unicamente na porção do glicone, representam o modo pelo qual as interações dentro do subsítio -1 são afetadas pela modificação da estrutura do glicone, em particular pelo posicionamento espacial de alguns de seus grupos hidroxila. Assim, duas β-glicosidades que apresentem exatamente os mesmos padrões de interações dentro do subsítio -1 devem ser igualmente afetadas pela alteração do glicone. De tal forma que o plote destes valores

($\Delta\Delta G^{\ddagger}$), para as duas enzimas, uma em relação à outra, deve originar uma reta com uma inclinação e coeficiente de correlação de 1 (Withers e Rupitz, 1990). De acordo com os dados da tabela 5.6.1. a comparação entre a Sfβgli50 selvagem e mutantes gerou retas com inclinações e coeficientes de correlação muito próximas de 1. Isto indica que as enzimas mutantes para os resíduos que ligam o aglicone possuem interações com glicone muito similares às encontradas na enzima selvagem, exceto a enzima mutante K201F que apresentou uma inclinação distinta de 1. No entanto, isto se deve ao tipo de troca desta mutante, pois a mutante K201A apresentou um padrão igual ao das demais enzimas mutantes (E190, E194 e M453). Assim, estes dados reforçam a idéia de que as contribuições dos resíduos E190, E194, K201 e M453 para a catálise devem resultar exclusivamente das interações com o aglicone.

A mutação K201F foi a que apresentou efeitos mais discordantes dos observados para as demais enzimas mutantes. Ela apresentou, como já dito, efeitos distintos até mesmo da enzima K201A. Levando em consideração os dados para a K201A podemos afirmar que os resultados da enzima K201F se devem ao tipo de troca (para um resíduo volumoso e apolar) em conjunto com a importância que a posição 201 possui na interação com o aglicone. Desse modo, esta mutação influenciou o padrão de interações com os *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeos no subsítio -1 através de modificações nas interações com seu aglicone (tabela 5.6.1.). Isto sugere que na mutante K201F a ligação do glicone e do aglicone são interdependentes. Torna-se relevante relembrar que foi comentado o fato do resíduo K201 ser correspondente ao H181 em BglB, o qual supostamente delineia um canal pelo qual é liberado o aglicone na etapa de glicosilação (Isorna *et al*., 2007) (figura 5.6.2.). Desse modo, pode-se supor

que os efeitos da mutação K201F na catálise da Sfβgli50 sejam os resultados de alterações neste canal que interferem na velocidade das etapas de glicosilação e desglicosilação. Consequentemente, esta mutante teria não somente um desbalanço na estabilização do complexo $ES^{\ddagger}$, mas também na liberação do aglicone causando a interdependência entre ligação do glicone e do aglicone.

TABELA 5.6.1. Parâmetros de relação linear de energia livre (LFER) entre a Sfβgli50 selvagem e mutantes:

Parâmetros LFER	E190A	E194A	K201A	M453A	K201F	E190Q
inclinação	1,0	0,98	1,0	1,0	0,58	0,9
coeficiente de correlação linear	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99

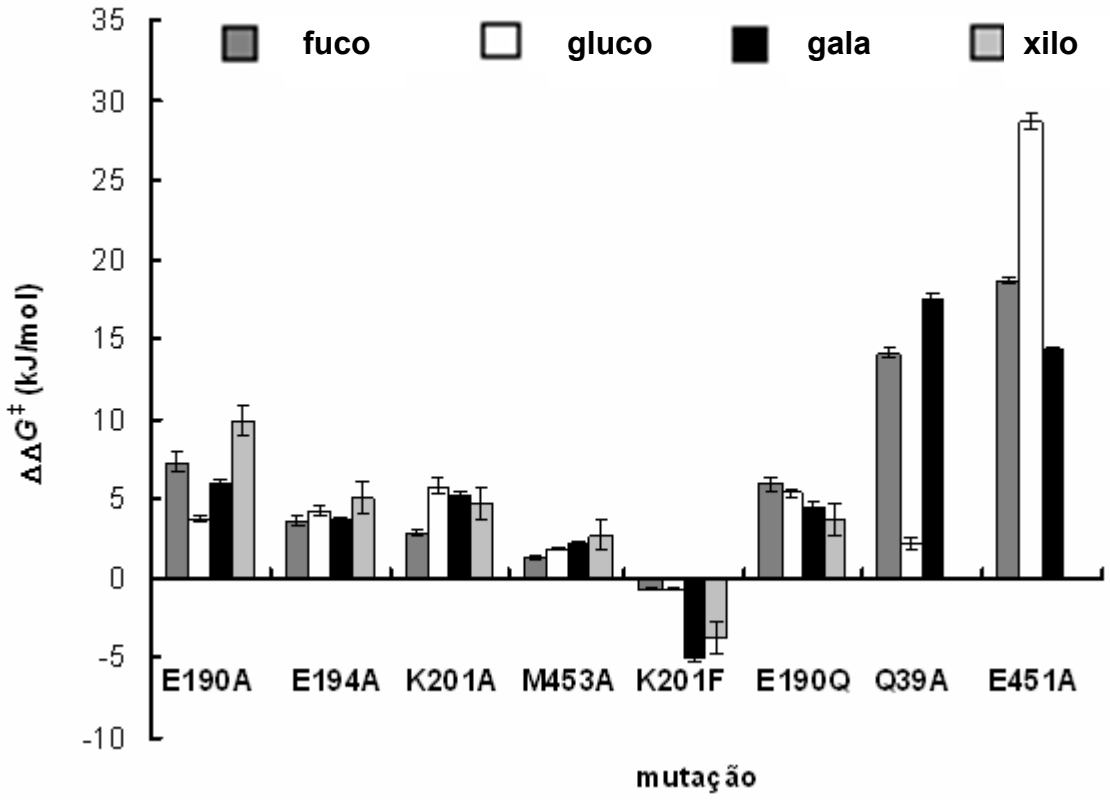


FIGURA 5.6.1. Efeito mutacional sobre a estabilidade do complexo ES‡ (ΔΔ*G*‡**)** envolvendo diferentes substratos para a Sfβgli50 selvagem (wt) e mutantes do sítio de ligação do aglicone (E190A, E194A, K201A, M453A, K201F e E190Q) e mutantes do sítio de ligação do glicone (Q39A e E451A) (Marana *et al.,* 2002).

(gluco = p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo, fuco = p-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo, gala = p-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo e xilol = p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo).

5.7. Papel dos resíduos que interagem com o aglicone na distorção do substrato.

Retomando a idéia apresentada no item anterior de que os dados sugerem que os resíduos E190, E194, K201 e M453 contribuem para a catálise enzimática interagindo com o aglicone pode-se ainda salientar a existência na literatura de hipóteses que, baseadas unicamente em dados estruturais, sugeriam a importância das interações com o aglicone para a catálise, especificamente interações existentes no subsítio +1, contribuindo para a distorção do substrato, o qual assumiria uma conformação de barco torcido (Zechel e Withers, 2000). Esta distorção do glicone permitiria um alinhamento do nucleófilo catalítico com o carbono anomérico do monossacarídeo do glicone e colocaria o oxigênio glicosídico em uma posição apropriada para a protonação pelo resíduo catalítico que age como ácido geral (ver mecanismo catalítico das β-glicosidases, item 2.4.5.). Os dados apresentados até o momento neste trabalho para estes resíduos que interagem com o aglicone não comprovam esta hipótese de distorção do glicone baseada em interações com o aglicone, porém eles concordam com esta hipótese, uma vez que comprovam a participação destes resíduos na catálise enzimática, estabilizando o complexo $ES^{\ddagger}$. Considerando que os dados sugerem esta participação na catálise sem interagir diretamente com o glicone, uma forma possível de atuação deles no mecanismo catalítico pode ser contribuindo para a distorção do substrato.

5.8. Conclusões.

Em síntese os resultados apresentados nesta primeira etapa deste trabalho indicam que os resíduos E190, E194, K201 e M453 da β-glicosidase de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50) são resíduos que fazem parte do sítio de ligação do aglicone, interagindo e modulando na ligação destes. Os resultados também sugerem que E190 favorece a ligação da porção inicial de aglicones do tipo alquil inicial e também da primeira unidade de glicose de aglicones oligossacarídicos no subsítio +1 de ligação do aglicone, onde o balanço entre as interações com os resíduos E194 e K201 determina a preferência entre unidades de glicose *versus* radicais alquil. E194 favorece a ligação de radicais do tipo alquil do aglicone, enquanto K201 é mais relevante para a ligação de unidades de glicose em detrimento de radicais do tipo alquil. Os três resíduos E190, E194 e K201 reduzem a afinidade por radicais do tipo fenil. M453 favorece a ligação da segunda unidade de glicose de aglicones oligossacarídicos e também da porção inicial de aglicones do tipo alquil. Nenhum destes quatro resíduos analisados interage com a porção terminal de aglicones do tipo alquil. Os dados também sugerem que os resíduos E190, E194, K201 e M453 participam do processo de catálise enzimática, contribuindo de forma similar e individualmente fraca na estabilização do complexo $ES^{\ddagger}$, por meio unicamente de interações com a porção do aglicone do substrato, de tal forma que a ação destes resíduos se dá durante a etapa de glicosilação. Por fim, revelou-se que as interações destes resíduos com o aglicone não influenciam na ligação do glicone.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO: 2ª ETAPA.

5.9. "Varredura" da "biblioteca" de mutantes aleatórios da Sfβgli50.

Seguindo os passos descritos no item 4.12. foram construídas as bibliotecas de mutantes aleatórios por meio de mutagênese *in vivo*. Em seguida, iniciou-se o processo de "varredura" por meio dos ensaios enzimáticos com o objetivo de selecionar mutantes com a especificidade pelo substrato alterada (item 4.13.). Três "bibliotecas" foram "varridas", as que correspondiam à geração 30, 40 e 70. Destas somente a "varredura" da biblioteca da geração 70 apresentou um resultado favorável, talvez devido ao maior tempo de propagação desta biblioteca, permitindo um maior acúmulo de mutações.

Foram "varridas" 4032 colônias da "biblioteca" da geração 70, tendo sido selecionadas 38 colônias de 25 "deep wells" como sendo candidatas a expressarem Sfβgli50 mutantes com alterações na especificidade pelo substrato (figura 5.9.1.), por apresentarem uma razão de atividade sobre substratos que se diferenciava da Sfβgli50 selvagem em um número de desvios maior ou igual a 2,5 ou menor ou igual a -2,5 (valores limítrofes determinados para ensaios da Sfβgli50 selvagem, de acordo com o item 4.13.). Ressaltando que colônias lisadas sem atividade β-glicosidásica foram excluídas da análise.

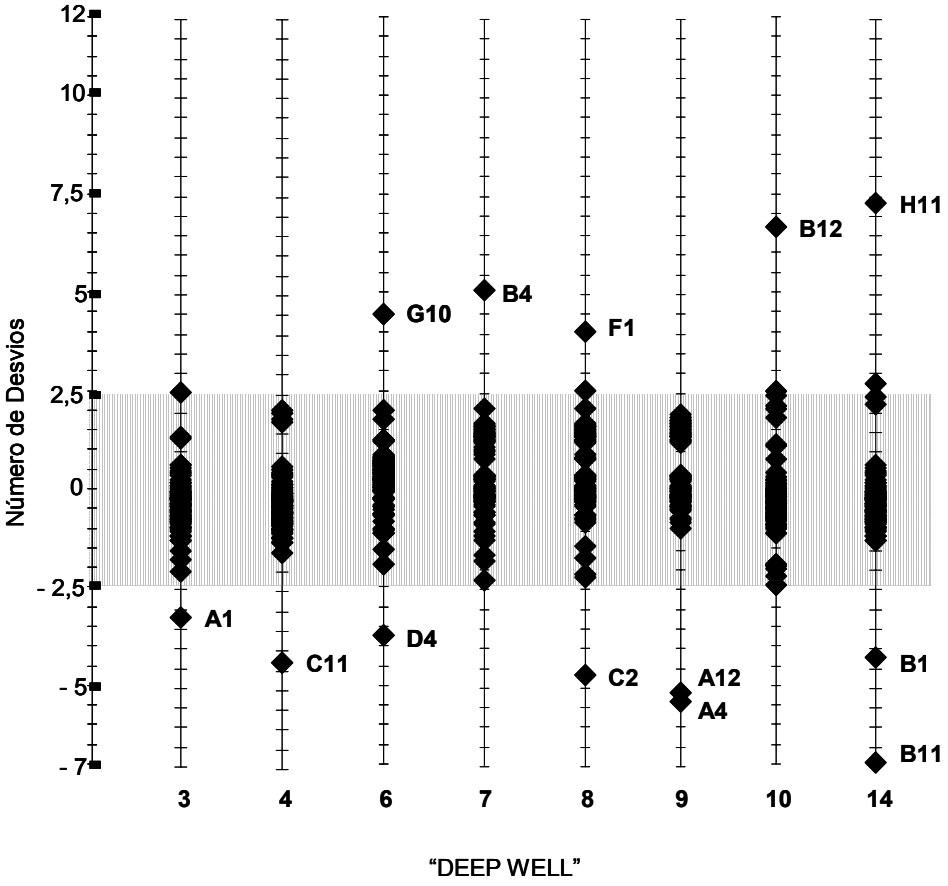
As 38 colônias pré-selecionadas passaram por uma segunda etapa de "varredura" na qual o número amostral de ensaios por colônia foi maior, variando de 32 a 64 (item 4.14.). Além destas mais 2 colônias que não apresentaram valores de número de desvios fora da faixa limítrofe também

foram reensaiadas para que servissem como um controle desta etapa. Esta segunda etapa da “varredura”, os reensaios, visava confirmar a especificidade alterada e, conseqüentemente eliminar falsos positivos (colônias que não expressavam Sfβgli50 mutantes com especificidade pelo substrato alterada, mas que devido a erros experimentais apresentaram um número de desvios fora da faixa limítrofe da selvagem). Dessas 40 colônias somente 14 confirmaram ser produtoras de Sfβgli50 mutantes com especificidade pelo substrato alterada (tabela 5.9.1.), pois nos reensaios apresentaram valores de número de desvios acima ou abaixo dos valores limítrofes.

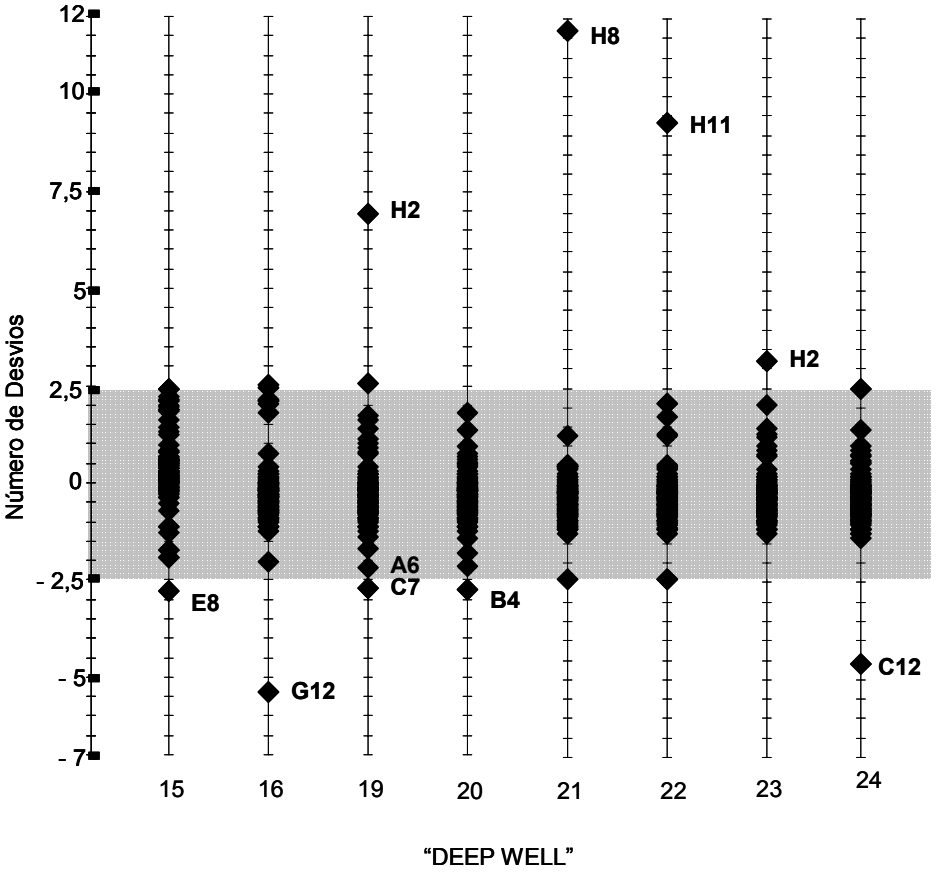
O passo seguinte foi identificar as mutações nestas enzimas. Como descrito no item 4.15., o DNA plasmidial destas 14 colônias foi extraído e o inserto da Sfβgli50 submetido à seqüenciamento (figuras 5.9.2.) revelando que todas as 14 Sfβgli50 mutantes selecionadas possuíam mutações simples, das quais somente uma resultou de uma transversão (16G12, guanina 467 para timina) (tabela 5.9.1.). Deve ser ressaltado que dentre estas 14 enzimas, duas possuem a mesma mutação (19C7 e 15E8 possuem a mutação G1420A, resultando na troca do aminoácido R474 por H), embora tenham sido selecionadas independentemente.

A

FIGURA 5.9.1.



B



C

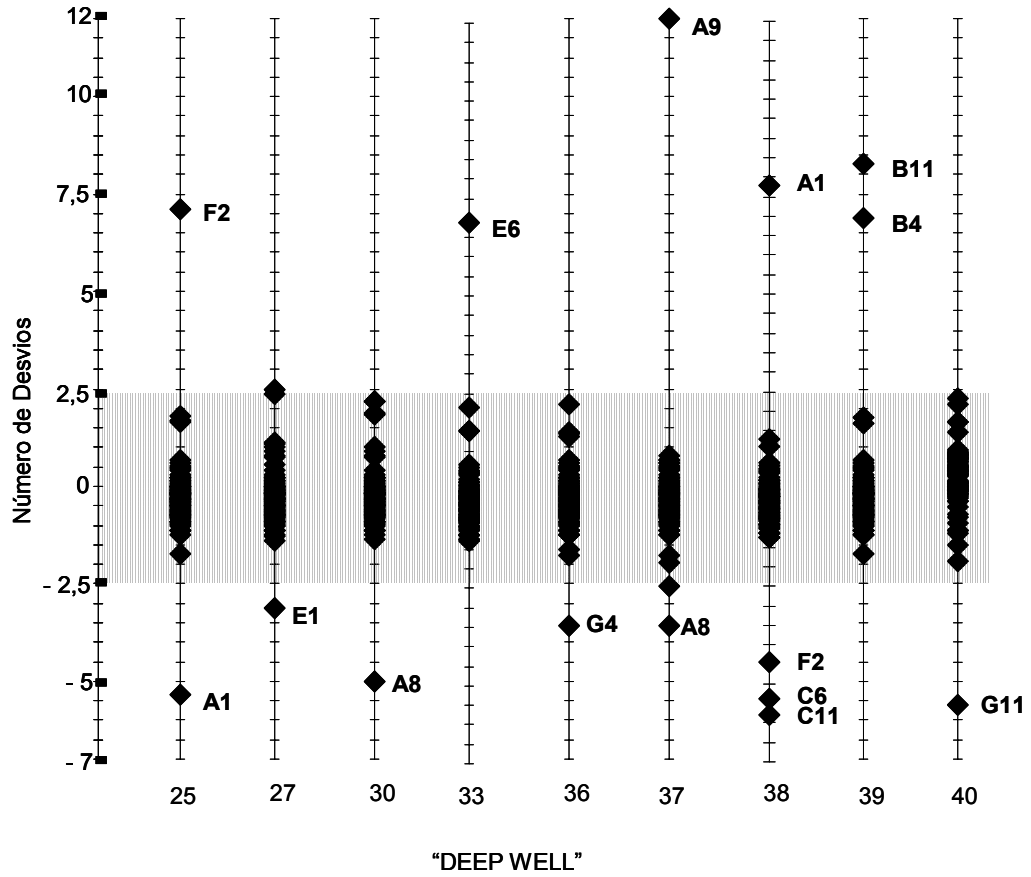
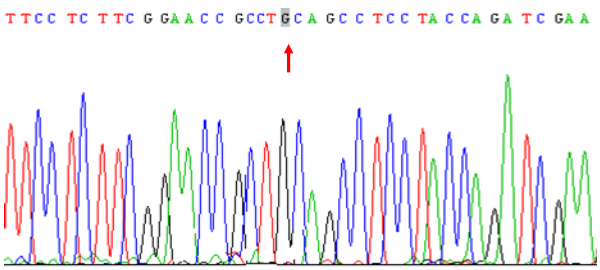


FIGURA 5.9.1. Distribuição do número de desvios da razão de atividade de gluco por fuco das colônias "varridas". Somente estão presentes os dados para os "deep wells" que tiveram colônias selecionadas como sendo candidatas a expressarem Sfβgli50 mutantes com alterações na especificidade pelo substrato. A faixa em cinza compreende aos valores limítrofes de número de desvios da razão de atividade sobre o substrato gluco por fuco determinados para ensaios da Sfβgli50 selvagem (entre -2,5 e 2,5). A sigla de uma letra e um número ao lado dos pontos fora da faixa cinza corresponde a localização no "deep well" dessas colônias. **(A)** "deep wells": 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 14. **(B)** "deep wells": 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23 e 24. **(C)** "deep wells": 25, 27, 30, 33, 36, 37, 38, 39 e 40. Deve ser ressaltado que colônias lisadas sem atividade β-glicosidásica foram excluídas da análise. Mais detalhes ver item 4.13..

FIGURA 5.9.2.

4C11 (T35A)

A

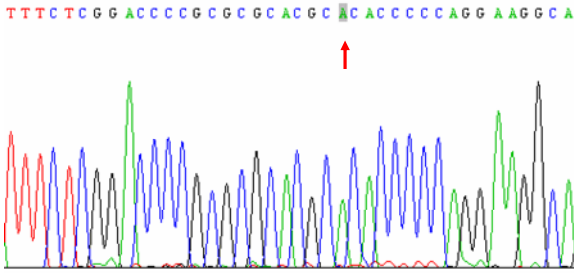


B

```
     Q  Q  R  R  F  P  D  D  F  L  F  G  T  A  A  A  S  Y  Q  I
47   GCAGCAGCGCCGCTTCCCCGATGACTTCCTCTTCGGAACCGCTGCAGCCTCCTACCAGAT  106
60   ..............................................A...............  119
     Q  Q  R  R  F  P  D  D  F  L  F  G  T  A  T  A  S  Y  Q  I
```

19C7 (R474H)

A

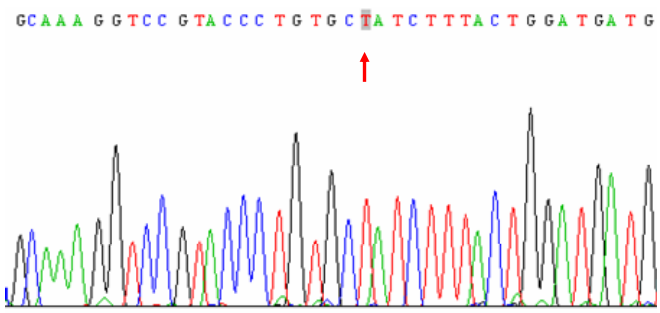


B

```
        S  D  P  A  R  T  H  T  P  R  K
        TCGGACCCCGCGCGCACGCACACCCCCAGGAAG
1402    ...................G.............  1434
 468     S  D  P  A  R  T  R  T  P  R  K   478
```

6G10 (P348L)

A

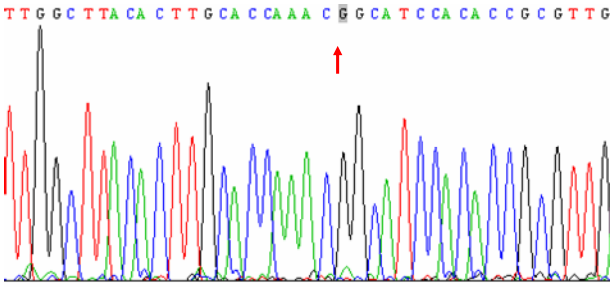


B

```
        G  P  Y  P  V  L  S  L  L  D
        GGTCCGTACCCTGTGCTATCTTTACTGGA
1027    ................C............  1054
 343     G  P  Y  P  V  P  S  L  L  D   352
```

19H2 (S378G)

A

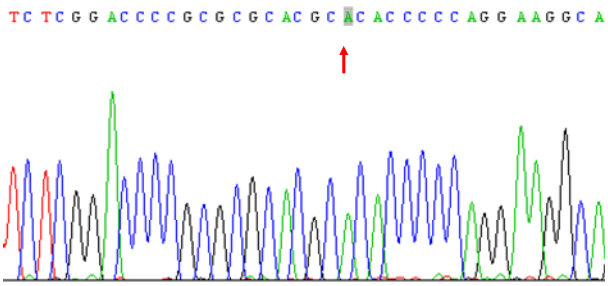


B

```
        L  A  P  N  G  I  H  T  A  L  T  H  L
        ACTTGCACCAAACGGCATCCACACCGCGTTGACCCACCTG
1119    .............A........................  1158
 374     L  A  P  N  S  I  H  T  A  L  T  H  L   386
```

15E8 (R474H)

A

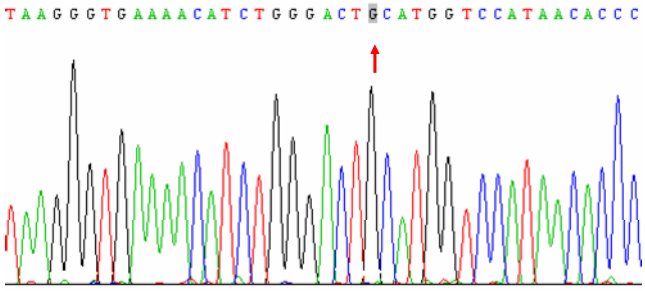


B

```
        S  D  P  A  R  T  H  T  P  R  K
        TCGGACCCCGCGCGCACGCACACCCCCAGGAAG
1402    ...................G.............  1434
 468     S  D  P  A  R  T  R  T  P  R  K   478
```

21H8 (Y56C)

A

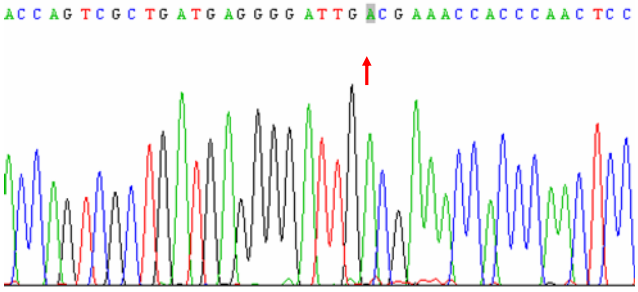


B

```
        E  D  G  K  G  E  N  I  W  D  C  M  V  H
        GAAGATGGTAAGGGTGAAAACATCTGGGACTGCATGGTCCATA
136     ...................................A........  178
 46      E  D  G  K  G  E  N  I  W  D  Y  M  V  H    59
```

16G12 (A156V)

A

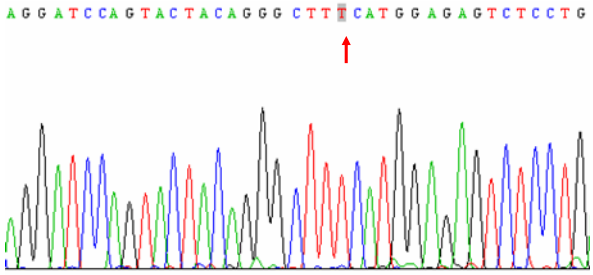


B

```
        G  G  F  V  N  P  L  I
        GGTGGTTTCGTCAATCCCCTCATC
459     ..........A..............  480
153     G  G  F  A  N  P  L  I    160
```

23H2 (S424F)

A



B

```
        Y  Y  R  A  F  M  E  S  L  L
        TACTACAGGGCTTTCATGGAGAGTCTCCTG
1258    .............C................  1287
 420     Y  Y  R  A  S  M  E  S  L  L    429
```

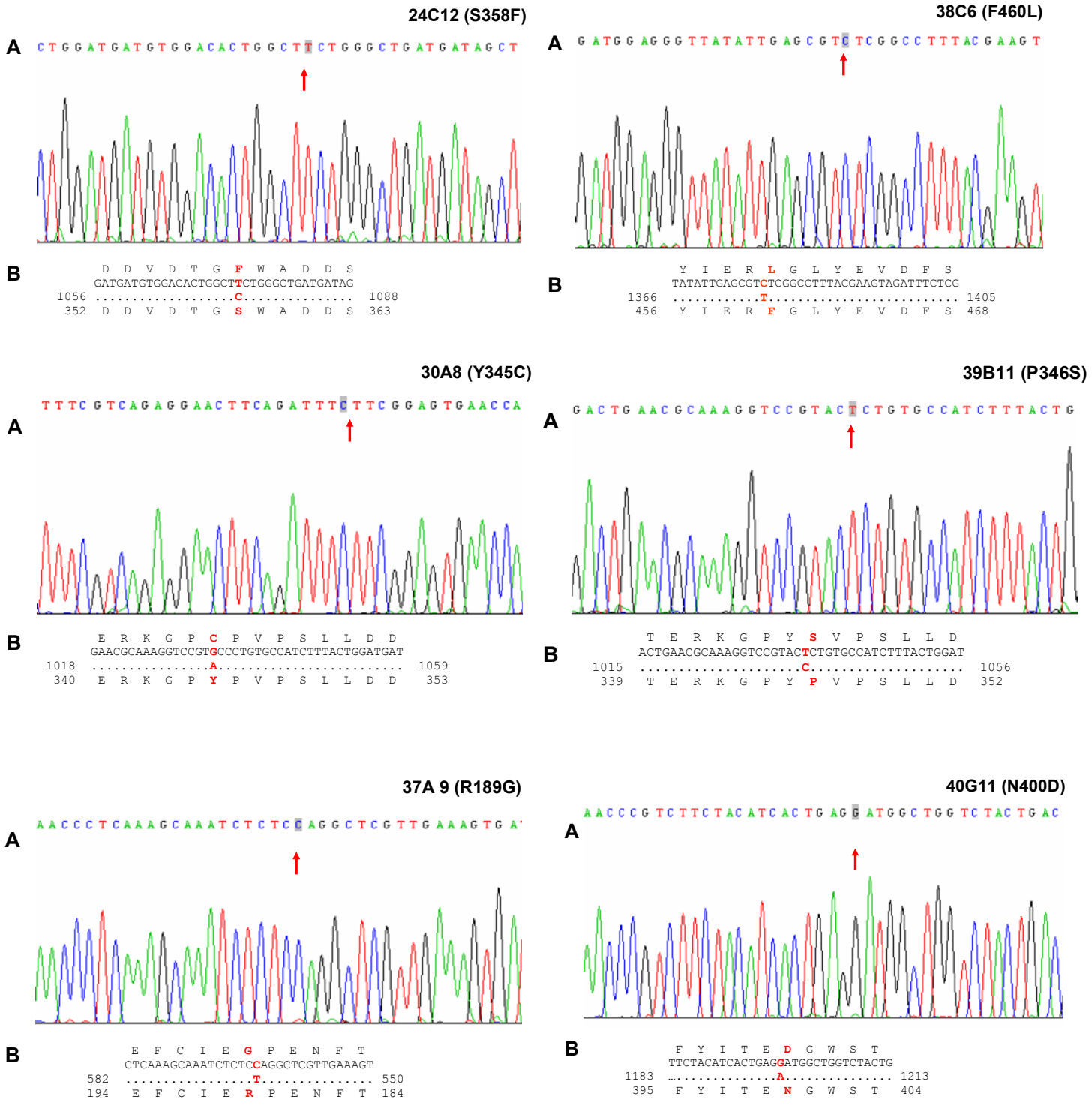


FIGURA 5.9.2. Sequenciamento das Sfβgli50 mutantes selecionadas através da "varredura". **(A)** Detalhe do eletroferograma da reação de sequenciamento destacando com uma seta vermelha o nucleotídeo mutado. **(B)** Detalhe do alinhamento da Sfβgli50 selvagem com a mutante destacando em vermelho os aminoácidos e nucleotídeos alterados. A apresentação segue a seguinte ordem: 4C11(T35A), 6G10 (P348L), 15E8 (R474H), 16G12 (A156V), 19C7 (R474H), 19H2 (S378G), 21H8 (Y56C), 23H2 (S424F), 24C12 (S358F), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G), 38C6 (F460L), 39B11 (P346S) e 40G11 (N400D). Mais detalhes ver itens 4.2. e 4.22..

TABELA 5.9.1. Dados dos ensaios das 40 Sfβgli50 candidatas a serem enzimas mutantes. **(A)** Mutantes que confirmaram ter especificidade pelo substrato alterada após a segunda "varredura". **(B)** Candidatos que não confirmaram ter especificidade alterada após a segunda "varredura".

(A)

	Razão Substrato A/B*		Número de desvios		MUTAÇÃO	
candidatos [1]	Varredura [2]	Reensaio [3]	Varredura [2]	Reensaio [3]	aminoácido [4]	nucleotídeo [5]
4C11	0,27	0,20±0,03	-4,3	-5	T 35 A	A 103 G
6G10	0,72	0,69±0,04	4,4	5,5	P 348 L	C 1043 T
15E8	0,36	0,31±0,02	-2,8	-3	R 474 H	G 1420 A
16G12	0,77	0,7±0,1	-5,4	8,71	A 156 V	G 467 T
19C7	0,37	0,31±0,03	-2,7	-3,1	R 474 H	G 1420 A
19H2	0,81	0,74±0,04	6,9	8	S 378 G	A 1132 G
21H8	1,06	0,63±0,03	11,7	3,4	Y 56 C	A 167 G
23H2	0,66	0,67±0,07	3,2	4,18	S 424 F	C 1271 T
24C12	0,27	0,28±0,04	-4,6	-3,75	S 358 F	G 1073 A
30A8	0,75	0,77±0,05	-5	4,4	Y 345 C	A 1034 G
37A9	1,2	1,0±0,2	12	8,7	R 189 G	A 566 G
38C6	0,22	0,18±0,02	-5,4	-6	F 460 L	T 1378 C
39B11	0,91	0,67±0,06	8,3	4	P 346 S	G 1036 A
40G11	0,78	0,74±0,07	-5,6	3,8	N 400 D	A 1198 G

1. a nomenclatura utilizada para se referir as colônias selecionadas indica o número da placa de "deep well" da "varredura", seguida pela letra e número do poço na qual a colônia se encontra.
2. nessa primeira etapa da "varredura" o número amostral é 1 para todas as 4032 colônias.
3. nessa segunda etapa da "varredura" o número amostral variou entre 32 a 64.
4. a primeira letra indica o aminoácido encontrado na Sfβgli50 selvagem seguido pelo seu número na seqüência primária. A segunda letra corresponde ao aminoácido que substituiu o original neste mutante.
5. a primeira letra indica o nucleotídeo encontrado na Sfβgli50 selvagem seguida pelo seu número. A segunda letra corresponde ao nucleotídeo que substituiu o original.
* substrato A = gluco; substrato B = fuco.

TABELA 5.9.1. Continuação:

(B)

	Razão Substrato A/B*		Número de desvios	
1 candidatos	2 Varredura	3 Reensaio	2 Varredura	3 Reensaio
3A1	0,31	0,45±0,05	-3,11	0,22
6D4	0,28	0,47±0,04	-3,78	0,44
7B4	0,68	0,49±0,02	5,11	0,89
8C2	0,24	0,44±0,04	-4,67	-0,22
8F1	0,66	0,46±0,05	4,07	0,22
9A4	0,22	0,42±0,03	-5,11	-0,67
9A12	0,21	0,44±0,03	-5,33	-0,22
10B12	0,75	0,45±0,04	6,67	0,16
14H11	0,78	0,44±0,04	7,33	-0,22
14B11	0,14	0,43±0,04	-6,89	-0,44
14B1	0,26	0,47±0,05	-4,22	0,44
19A6	0,34	0,48±0,04	-2,54	0,67
20B4	0,34	0,47±0,05	-2,74	0,44
22H11	0,87	0,38±0,04	9,33	-1,56
25A1	0,21	0,54±0,03	-5,33	2,00
25F2	0,77	0,52±0,35	7,11	1,56
27E1	0,31	0,40±0,03	-3,11	-1,11
28G1 (4)	0,36	0,39±0,04	-2,00	-1,33
29B7 (5)	0,41	0,38±0,09	-0,89	-1,56
33.E6	0,76	0,42±0,03	6,89	-0,67
36G4	0,29	0,38±0,03	-3,56	-1,56
37A8	0,38	0,43±0,03	-3,56	-0,44
38C11	0,19	0,53±0,03	-5,78	1,78
38F2	0,25	0,44±0,07	-4,44	-0,22
38A1	0,8	0,39±0,09	7,78	-1,33
39B4	0,76	0,47±0,03	6,89	0,44

1. a nomenclatura utilizada para se referir as colônias selecionadas indica o número da placa de “deep well” da “varredura”, seguida pela letra e número do poço na qual a colônia se encontra.
2. nessa primeira etapa da “varredura” o número amostral é 1 para todas as 4032 colônias.
3. nessa segunda etapa da “varredura” o número amostral variou entre 32 a 64.
* substrato A = gluco; substrato B = fuco.
4 e 5. mesmo não apresentando número de desvios fora dos limites de -2,5 a 2,5 estas duas enzimas foram reensaiadas como um controle.

5.9.1. Sfβgli50 mutantes selecionadas.

As mutações encontradas no processo de "varredura" estão presentes em α-hélices, fitas-β e em alças que conectam estas duas estruturas na Sfβgli50 (figura 5.9.1.1.). Sendo que em termos estruturais muitos dos resíduos mutados encontram-se em segmentos que possuem grande sobreposição com outras β-glicosidases, como pode ser verificado para os resíduos S424, presente em uma α-hélice, S358, no início de uma fita-β, S378, presente em uma α-hélice, Y56, presente em uma α-hélice, T35, presente no início de uma alça, R474, presente em uma fita-β e o F460, presente em uma alça (figura 5.9.1.2. - B, C, H, I, J e L, respectivamente). Os demais estão em estruturas secundárias que não apresentam uma boa sobreposição com os respectivos trechos de outras β-glicosidases.

Das 14 mutantes, duas provavelmente foram selecionadas pelo fato de possuírem trocas em resíduos que estão dispostos ao lado de resíduos do sítio ativo que são essenciais a catálise, estas são a 40G11 (N400D) e a 37A9 (R189G). O resíduo N400 está disposto ao lado do resíduo catalítico E399 (doador de prótons) e o R189 está ao lado do E190 (resíduo que interage com o aglicone analisado na primeira parte deste trabalho) e está próximo do ácido catalítico E187 (figura 5.9.1.2. - A e F, respectivamente). Das outras doze mutantes selecionadas, três possuem trocas em uma mesma alça, a qual localiza-se a aproximadamente 22 Å do sítio ativo (distância em relação ao nucleófilo catalítico, E399). Estas três mutantes são: 6G10 (P348L), 30A8

(Y345C) e 39B11 (P346S), as quais estão a cerca de 22 Å, 21 Å e 23 Å de distância do nucleófilo catalítico, E399, respectivamente. Embora tenham sido selecionadas independentemente, as três apresentam trocas de resíduos presentes na mesma alça cuja característica marcante é ser constituída de resíduos de prolina alternados por outros aminoácidos que são pouco volumosos (figura 5.9.1.2. - E). A seleção destas três mutantes criadas aleatoriamente e selecionadas de forma independente, mas pelo mesmo critério (possuir especificidade pelo substrato alterada), pode ser vista como um indício do papel desta alça na modulação desta propriedade enzimática na Sfβgli50. Das nove mutantes restantes, duas apresentaram o mesmo aminoácido trocado, a R474 por uma H (mutantes 19C7 e 15E8) (figura 5.9.1.2. - H) o que também pode ser entendido como um indício da importância deste resíduo para a atividade enzimática e especificidade desta enzima. R474 está a cerca de 14 Å do nucleófilo catalítico, E399. Uma das sete enzimas mutantes selecionadas restantes, a 4C11 (T35A), possui mutação em um trecho de aminoácidos relativamente conservado. Esta T35 é a segunda T que está presente em um trecho da Sfβgli50 representado por 32-GTATASYQ-39, o qual apresenta os resíduos de G e Q conservados e uma tendência a possuir aminoácidos de cadeias laterais pequenas. A T35 trocada na mutante 4C11 da Sfβgli50 é relativamente conservada, somente sendo substituída por S ou V, tanto em β-glicosidases de Eukaria, Bacteria e Archea (figura 5.9.1.2. – I; figura 5.9.1.3.). Pode-se ressaltar que a Q39 presente neste trecho é um resíduo que está no sítio ativo das Sfβgli50, estando envolvida na preferência pelo glicone

do substrato (Marana *et al*., 2002). Das seis enzimas mutantes restantes, cinco delas, 23H2 (S424F), 24C12 (S358F), 19H2 (S378G), 21H8 (Y56C) e 38C6 (F460L), apresentam trocas em segmentos que possuem grande sobreposição com outras β-glicosidases, como comentado no início deste tópico (figura 5.9.1.2. – B, C, D, H e L, respectivamente). Estas trocas estão a aproximadamente 13 Å, 24 Å, 15 Å, 27 Å e 10 Å do nucleófilo catalítico, E399, respectivamente. A mutante que resta, a 16G12 (A156V), como será discutido mais adiante, apresenta troca em um resíduo que não apresenta conservação nem na seqüência de aminoácidos, nem em termos da estrutura secundária do trecho no qual este resíduo se encontra (figura 5.9.1.2. – G).

Por fim, considerando que o objetivo principal, nesta etapa, era a identificação de resíduos que participem da modulação da especificidade pelo substrato e que ainda não tivessem sido descritos na literatura, pode-se assumir que esta meta foi parcialmente alcançada. Agora a principal perspectiva é elucidar a participação destes resíduos no mecanismo de modulação da especificidade pelo substrato em Sfβgli50.

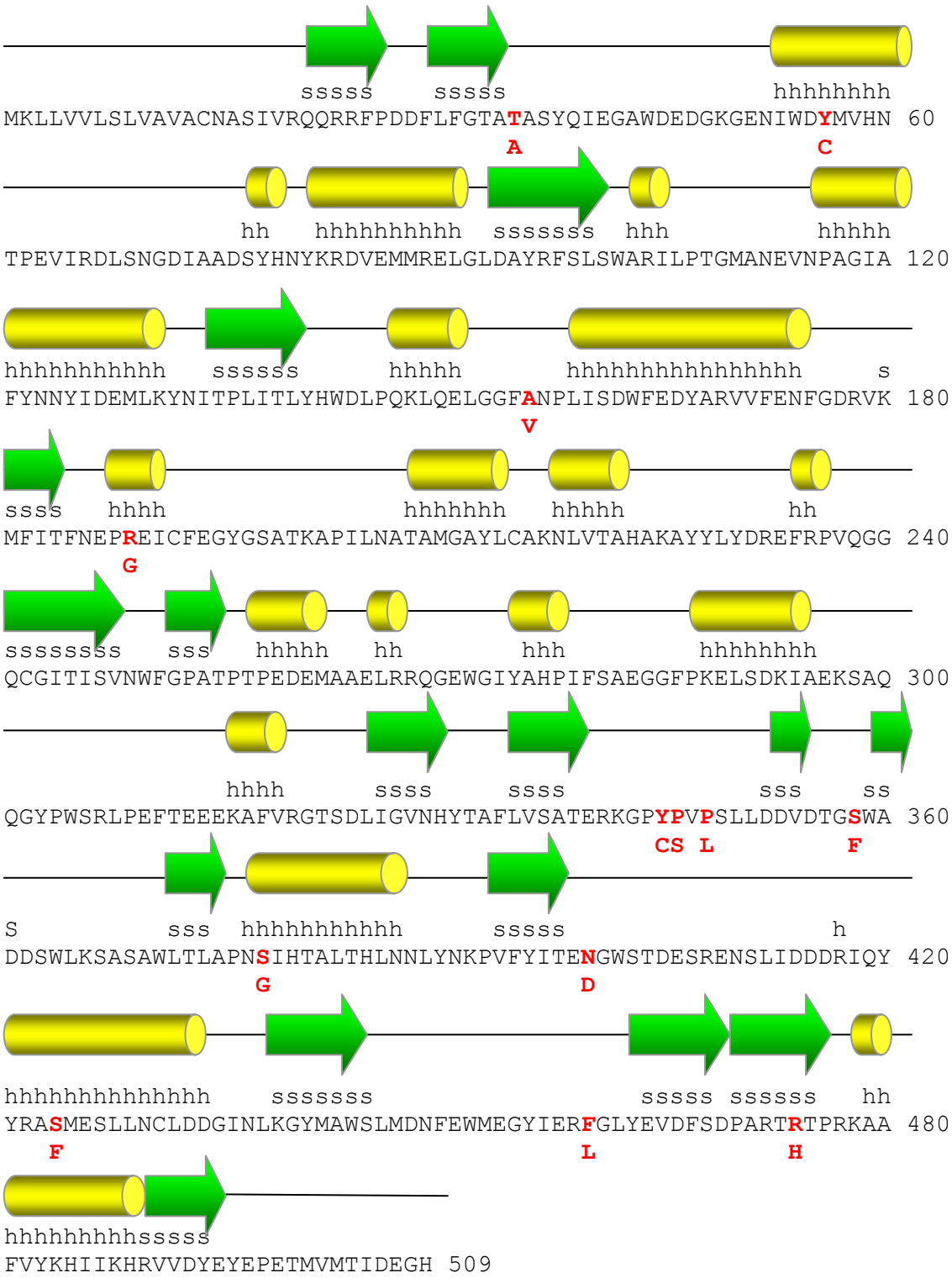


FIGURA 5.9.1.1. Representação da distribuição das mutações selecionadas nos elementos de estrutura secundária ao longo da seqüência de aminoácidos da Sfβgli50. Os aminoácidos em vermelho foram encontrados mutados no processo de "varredura". Embaixo de cada um desses aminoácidos encontra-se a sigla do pelo qual ele foi trocado. Acima da seqüência de aminoácidos encontra-se a predição de estrutura secundária baseada no Swiss PDB Viewer (h = α-hélice (cilindro amarelo); s= fita-β (seta verde)).

FIGURA 5.9.1.2. Modelo da estrutura terciária da Sfβgli50 destacando os resíduos que foram encontrados mutados no processo de "varredura" (os resíduos estão em estrutura de bastão com o trecho da estrutura secundária em vermelho). Os resíduos E399 e E187, resíduos catalíticos, também estão destacados. **(A)** Mutação N400D (mutante 40G11). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo N400 mutado. (2) detalhe da estrutura secundária do trecho em que se encontra a mutação destacando alguns resíduos (T387, resíduo catalítico E399, N400 (em azul), W401 e o resíduo catalítico E187). (3) resíduo N400 mutado por D. **(B)** Mutação S424F (23H2). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo S424 mutado. (2) detalhe da estrutura secundária, α-hélice, em que se encontra a mutação. (3) resíduo S424 mutado por F. (4) sobreposição da Sfβgli50 com a Zmglu1. (5) sobreposição da Sfβgli50 com a BglB. **(C)** Mutação S358F (24C12). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho no qual se encontram os resíduos S358 e S378 mutados. (2) estrutura terciária em uma posição de melhor visualização. (3) detalhe da estrutura secundária do trecho em que se encontram estas mutações. (4) resíduo S358 mutado por F. (5) sobreposição da Sfβgli50 com a BglB. (6) sobreposição da Sfβgli50 com a Zmglu1. **(D)** Mutação S378G (19H2). **(E)** Mutações Y345C (30A8), P346S (39B11) e P348L (6G10). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontram os resíduos mutados. (2) estrutura terciária em uma posição de melhor visualização. (3) detalhe destacando os resíduos G343, P344, Y345, P346, V347, P348 e S349 (em azul estão os mutados). (4) resíduo Y345 mutado por C. (5) resíduo P348 mutado por L. (6) resíduo P346 mutado por S. **(F)** Mutação R189G (37A9). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo mutado R189. (2) estrutura terciária em uma posição de melhor visualização. (3) detalhe destacando o resíduo mutado R189, mais os resíduos E190, P188 e os dois resíduos catalíticos, E187 e E399. (4) resíduo R189 mutado por G. **(G)** Mutação A156V (16G12). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo mutado A156. (2) estrutura terciária em uma posição de melhor visualização. (3) detalhe destacando o resíduo mutado A156. (4) resíduo A156 mutado por V. **(H)** Mutação Y56C (21H8). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo mutado. (2) estrutura terciária em uma posição de melhor visualização. (3) detalhe destacando o resíduo mutado Y56. (4) resíduo Y56 mutado por C. (5) sobreposição da Sfβgli50 com a Zmglu1. (6) sobreposição da Sfβgli50 com a BglB. **(I)** Mutação T35A (4C11). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo mutado T35. (2) detalhe destacando o segmento de aminoácidos 32-GTATASYQ-39 (em azul encontra-se o resíduo mutado, T35), também está representado o resíduo catalítico E187. (3) resíduo T35 mutado por A. (4) sobreposição da Sfβgli50 com a Zmglu1. (5) sobreposição da Sfβgli50 com a BglB. Os alinhamentos correspondem aos aminoácidos que constituem estes trechos nas respectivas enzimas (Zmglu1 em laranja, BglB em verde, e Sfβgli50 em azul). **(J)** Mutação R474H (mutantes 19C7 e 15E8). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo mutado R474. (2) estrutura terciária em uma posição de melhor visualização. (3) detalhe da estrutura secundária, fita-β, na qual se encontra este resíduo mutado. (4) sobreposição da Sfβgli50 com a BglB. (5) sobreposição da Sfβgli50 com a Zmglu1. **(L)** Mutação F460L (38C6). (1) estrutura terciária com o trecho em vermelho correspondendo ao qual onde se encontra o resíduo mutado F460. (2) detalhe da estrutura secundária da alça na qual se encontra este resíduo mutado. (3) resíduo F460 mutado por L. (4) sobreposição da Sfβgli50 com a BglB. (5) sobreposição da Sfβgli50 com a Zmglu1. BglB = β-glicosidase de *Paenibacillus polymyxa* (estrutura em verde; arquivo no pdb: 2Z1S). ZmGlu1 = β-glicosidase de *Zea mays*, milho (estrutura em laranja; arquivo no pdb: 1e56). Outros detalhes ver item 4.10..

A

```
Spodoptera frugiperda          DDFLFGTATASYQIEGAWDEDGKGENIWDYMVHNTPEVIRDLSN------ 70
Pyrococcus furiosus            EEFLFGTATAAHQIE--------GDNKWNDWWY-YEQIGKLPYK------ 41
Thermococcus sp                DGFLLGTATSSYQIE--------GDNVWSDWWY-WAEKGKLPP------- 39
Streptomyces griseus           TGFRWGTATAAYQIEGGATEHGRTPSIWDTFSR-TPGKVRNGDT------ 69
Thermus thermophilus           --FLWGVATSAYQIEGATQEDGRGPSIWDAFAQ-RPGAIRDGST------ 48
Micrococcus antarcticus        KEFLWGSATAAAQIEGAGHSYGKEDSVWDAFAR-KEGAIAGGEN------ 55
Paenibacillus polymyxa         ATFMWGTSTSSYQIEGGTDEGGRTPSIWDTFCQ-IPGKVIGGDC------ 52
Bacillus sp                    KDFVWGTATASYQIEGAYNEDGRGMSIWDTFSR-TPGKVVNGDT------ 50
Thermotoga maritima            EGFLWGVATASYQIEGSPLADGAGMSIWHTFSH-TPGNVKNGDT------ 50
Clostridium cellulovorans      KDFIFGTATAAYQIEGAYKEDEKGESIWDRFSH-IPGNVAKMHN------ 50
Lactococcus lactis             KDFIFGGATAAYQAEG---ATHTDGKGPVAWDKYLEDNYWYTAE------ 47
Streptococcus sanguinis        KDFIFGGATAAYQAEG---ATHTDGKGPVAWDKYLEDNYWYTAE------ 47
Mycoplasma mycoides            KDFWWGAASSGCQTESD--KDKPNLNIMDYWYKQTPTDFYDNKG------ 63
Salmonella enterica            KDFLWGGAVAAHQVEGGWNKDGKGPSICDVLTGGAHGVPREITQNVVAGK 57
Escherichia coli               KDFLWGGAVAAHQVEGGWNKGGKGPSICDVLTGGAHGVPREITKEVLPGK 59
Yersinia pestis                KDFLWGGAVAAHQVEGGWDKGGKGVSIADVLSGGSHGVDRVMTDGVLEGY 66
Vibrio cholerae                NDFLWGGAVAAHQVEGGWDQGGKGVSIVDVLTRGAHEVPRRITDGVMEDE 57
Staphylococcus aureus          RNFMWGGALAANQFEGGYDKGGKGLSVIDVMTSGAHGKARQITKSIDQNH 55
Enterococcus faecium           KNFLWGGSIAAHQCEGAWQEGGKGPAIMDYVRQGSYQVPRQIDTIISSEA 54
Listeria innocua               KDFLWGSASAAYQIEGAWDADGKGKSVWDEYVR----IPGTTFKGTNG-- 54
```

B

```
Spodoptera frugiperda          ---------------SIVR-----------QQRRFPDDFLFGTATASYQI 40
Drosophila melanogaster        ---------------SPVS-----------QTRRFPNDFLWGVGSSSYQI 41
Brevicoryne brassicae          ------------------------------MDYKFPKDFMFGTSTASYQI 20
Tenebrio molitor               ---------------DVP-------------DYYFPDGFVFGAATAAYQV 39
Cavia porcellus                --------------------------------MAFPADLVGGLPTAAYQV 18
Xenopus tropicalis             SRPRTAKHSAIYYSQVIRKNGIPQGREDEFFYGEFPKDFAWSVASAAFQI 88
Homo sapiens                   ----------------AARKGSPE--EASFYYGTFPLGFSWGVGSSAYQT 52
Trifolium repens               -------------TSTNAVEASTLLDIGNLSRSSFPRGFIFGAGSSAYQF 55
Vicia sativa                   -------------TPSQEVHPSHYATT--FNKSLFPKDFLFGIGSSAYQV 57
Viburnum furcatum              SLKVNAKLASADDTSSNFNKDNWLASADELSRS-FPPGFLFGGGSASYQY 89
Lycopersicon esculentum        -----------DDDDDDVSPENTILDTGGLSRESFPKGFTFGTATSAYQV 62
Oryza sativa                   ------------DAGAAAVPKPNWL--GGLSRAAFPKRFVFGTVTSAYQV 58
Cucurbita pepo                 --------------MDDVVNNNSQRMDMIRR-SSFPEDFVFGTASSAYQY 35
Digitalis lanata               --------------MTNESNHTDHNVTRASFNFSNGEKFVFGSATSAYQI 36
Arabidopsis thaliana           -------------SPITVYGGAVCPASSTFGRGSFPDGFLFGATTSAFQH 54
Sinapis alba                   -------------CQENLP--FTCGNTDALNSSSFSSDFIFGVASSAYQI 40
Sorghum bicolor                RRSNLSFRPRAQTISSESAGIHRLSPWEIPRRDWFPPSFLFGAATSAYQI 91
Zea mays                       RRCNLSFTTRSARVGSQ-NGVQMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQI 93
Avena sativa                   RRCNLTLSSRAARISSALESAKQVKPWQVPKRDWFPPEFMFGAASAAYQI 89
Talaromyces emersonii          --------------------MTTTETPTTTTTSTLPPDFLWGFATASYQI 30
Leucophaea maderae             ---------------DIPSEAILDNNIPLINNLTFPDGFLFGAATAAYQI 55
Caenorhabditis elegans         ----------------------------MSLPTKFPKNFQLATATAAYQI 22
Leishmania infantum            ------------------------------MSSKFPDHFLWGGAVAANQV 20
                                                                     :  .   :: *
```

FIGURA 5.9.1.3. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Em vermelho está o trecho de aminoácidos 32-GTATASYQ-39 da Sfβgli50 e em amarelo estão os aminoácidos correspondentes a estes nas β-glicosidases de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA.

5.9.2. Produção e purificação das Sfβgli50 mutantes selecionadas na "varredura".

As Sfβgli50 mutantes selecionadas na "varredura" foram expressas em larga escala como proteína heteróloga em bactéria, *E. coli* BL21-DE3, (item 4.16.) (figura 5.9.2.1.) e o sobrenadante do lisado destas bactérias foi utilizado em um processo de purificação em cromatografia de afinidade (item 4.17.) (figura 5.9.2.2. e 5.9.2.3.), cuja eficiência foi confirmada através de SDS-PAGE (item 4.8.) (figura 5.9.2.4.).

Deve ser ressaltado que na cromatografia de afinidade a atividade β-glicosidásica intrínseca da bactéria não coelui com a da Sfβgli50 recombinante. Isto pode ser deduzido a partir da análise da cromatografia do lisado obtido da indução da mesma linhagem de bactéria, *E. coli* BL21-DE3, que expressa uma Sfβgli50 mutante que não apresenta atividade enzimática. De tal forma que qualquer atividade β-glicosidásica verificada nesta cromatografia, realizada com os mesmos parâmetros que a da Sfβgli50 selvagem, deve-se a atividade β-glicosidásica intrínseca desta bactéria cultivada na condição empregada para a indução da proteína heteróloga. De acordo com o cromatograma da figura 5.9.2.2. – B, C e D a atividade intrínseca é eluída na 1ª e 2ª etapas da cromatografia (nas quais é feita a aplicação do lisado e eluição de proteínas que liguem de forma inespecífica, respectivamente), enquanto a Sfβgli50 recombinante é eluída na 3ª etapa e exibe uma maior velocidade de hidrólise do substrato.

Para a purificação de cada uma das Sfβgli50 mutantes, como comentado no item 4.17.2., foram realizadas entre 8 e 15 cromatografias. Em

seguida, como descrito no item 4.8., foi feito um gel de SDS-PAGE para alíquotas dos tubos 05, 06, 07 e 08 da 3ª etapa da cromatografia de cada Sfβgli50 mutante (figura 5.9.2.4. – A até H).

Observa-se que a Sfβgli50 (selvagem ou mutantes) encontra-se purificada nestas 4 frações. Contudo, a fração 05 é a mais rica dentre elas. De tal forma que foi reunido um "pool" das amostras do tubo 05 de cada uma das cromatografias para a mesma enzima mutante e feito um gel de SDS-PAGE, corado pelo método de nitrato de prata (figura 5.9.2.4 - I, J e L), o que confirmou a pureza de cada uma das Sfβgli50 (selvagem e mutantes). Então, dando prosseguimento ao trabalho, este material foi usado para a caracterização cinética destas enzimas.

FIGURA 5.9.2.1.

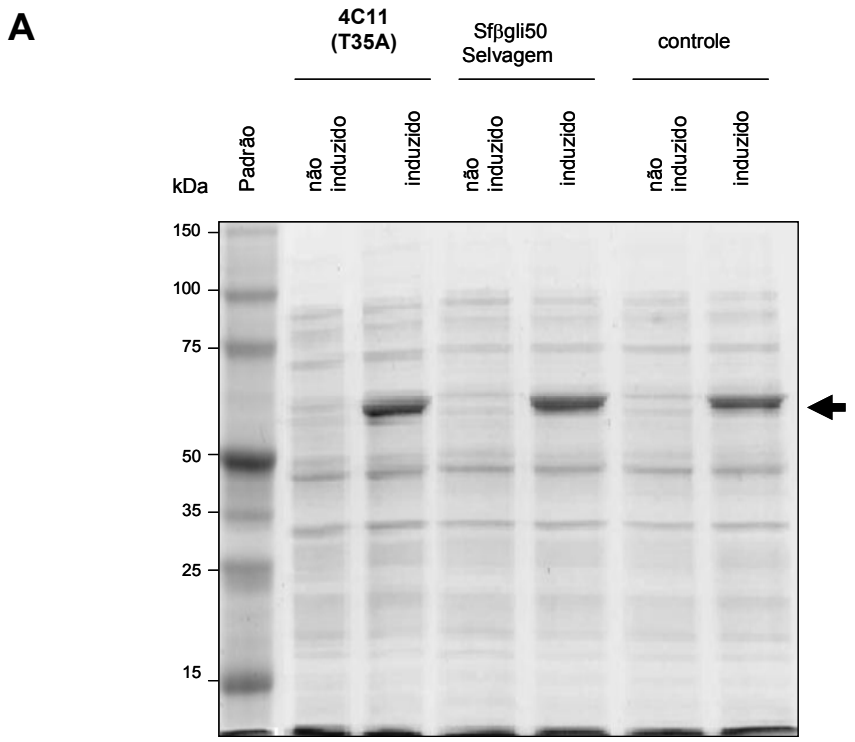


FIGURA 5.9.2.4. Géis de SDS-PAGE (poliacrilamida 10 %, SDS 0,1%, Laemmli, 1970) das Sfβgli50 recombinante selvagem e mutantes selecionadas na "varredura" e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de calmodulina-agarose (Stratagene). **(A, B, C, D, E, F, G** e **H)** amostras dos tubos 05, 06, 07 e 08 da cromatografia de afinidade de cada Sfβgli50 mutante (corados com Comassie Blue-R250 0,1% (p/v) em metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)). **(I, J** e **L)** "pool" de amostras do tubo 05 de todas as cromatografias realizadas para a mesma Sfβgli50 mutante (corados com nitrato de prata, Blum *et al.*, 1987). **(A)** 4C11(T35A). **(B)** 23H2 (S424F) e 40G11 (N400D). **(C)** 6G10 (P348L) e 19H2 (S378G). **(D)** 21H8 (Y56C) e 30A8 (Y345C). **(E)** 19C7 (R474H) e 38C6 (F460L). **(F)** 37A9 (R189G) e Sfβgli50 selvagem. **(G)** 24C12 (S358F) e 39B11 (P346S). **(H)** 16G12 (A156V) e controle. **(I)** 21H8 (Y56C), 19C7 (R474H), 38C6 (F460L), 24C12 (S358F), 16G12 (A156V) e 23H2 (S424F). **(J)** Sfβgli50 selvagem, 4C11(T35A) e 6G10 (P348L). **(L)** 4C11(T35A), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G), 40G11 (N400D), 19H2 (S378G) e 39B11 (P346S). Mais detalhes ver itens 4.8. e 4.17..

5.9.3. Caracterização cinética das Sfβgli50 mutantes selecionadas.

A caracterização cinética das Sfβgli50 mutantes selecionadas no processo de "varredura" consistiu da determinação das velocidades de hidrólise para diferentes concentrações do substrato (*p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPβgluco ou gluco), *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo (pNPβfuco ou fuco), *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (pNPβgala ou gala), *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPβxilo ou xilo) e metilumbeliferil-β-D-glucopiranosídeo (MUβgluco)) de tal forma que fossem obtidos os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} para a enzima selvagem e mutantes (item 4.19.) (tabela 5.9.3.1.; figura 5.9.3.1.). Também foi feita a determinação da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i) para 10 diferentes inibidores do tipo competitivo linear simples (oligossacarídeos: celobiose, celotriose, celotetraose e celopentaose; alquil-β-glicosídeos: metil-β-D-glucopiranosídeo, hexil-β-D-glucopiranosídeo, heptil-β-D-glucopiranosídeo, octil-β-D-glucopiranosídeo e nonil-β-D-glucopiranosídeo; fenil-β-D-glucopiranosídeo) (item 4.19.) (tabela 5.9.3.2.; figura 5.9.3.2.).

FIGURA 5.9.3.1 - Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática da Sfβgli50 selvagem e mutantes. Os substratos **(A)** *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo (pNPβfuco), **(C)** *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPβgluco), **(E)** *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (pNPβgala), **(G)** *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPβxilo) e **(I)** metilumbeliferil-β-D-glucopiranosídeo (MUβgluco) foram preparados em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 6,0. **(B)**, **(D)**, **(F)**, **(H)** e **(J)** são os plotes de Lineweaver-Burk, respectivamente, para cada substrato. Os dados foram ajustados na equação de Michaelis-Menten através do programa Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987). A apresentação segue a seguinte ordem: 4C11(T35A), 6G10 (P348L), 16G12 (A156V), 19C7 (R474H), 19H2 (S378G), 21H8 (Y56C), 23H2 (S424F), 24C12 (S358F), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G), 38C6 (F460L), 39B11 (P346S), 40G11 (N400D) e Sfβgli50 selvagem. Mais detalhes ver itens 4.9. e 4.19..

TABELA 5.9.3.1. Parâmetros de cinética do estado estacionário para a hidrólise de pNPβglicosídeos pela Sfβgli50 selvagem e mutantes selecionadas na varredura.

enzima	substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1},mM^{-1})	k_{cat}/K_m relativo
Sfβgli50 selvagem	Fuco	0,54 ± 0,02	0,542 ± 0,005	1,01 ± 0,04	100
	Gluco	0,74 ± 0,03	0,197 ± 0,02	0,26± 0,01	26
	Gala	3,0 ± 0,1	0,0280 ± 0,0004	0,0092 ± 0,0004	0,9
	Xilo	2,2 ± 0,1	0,00273 ± 0,00006	0,00125 ± 0,00008	0,12
	MUβgluco	2,7 ± 0,1	0,0516 ± 0,0008	0,019 ± 0,001	19
4C11 (T35A)	Fuco	0,37 ± 0,03	0,126 ± 0,002	0,33 ± 0,01	100
	Gluco	0,76 ± 0,06	0,0415 ± 0,0008	0,054 ± 0,002	16
	Gala	2,0 ± 0,2	0,0063 ± 0,0002	0,0031 ± 0,0001	1
	Xilo	2,1 ± 0,2	0,00099 ± 0,00003	0,00046 ± 0,00001	0,1
	MUβgluco			0,00088 ± 0,00001	0,3
6G10 (P348L)	Fuco	0,46 ± 0,02	0,175 ± 0,001	0,38 ± 0,02	100
	Gluco	1,6 ± 0,1	0,129 ± 0,003	0,082 ± 0,005	22
	Gala	2,64 ± 0,08	0,015 ± 0,001	0,0058 ± 0,0002	1,5
	Xilo	4,02 ± 0,024	0,00315 ± 0,00009	0,00078 ± 0,00005	0,2
	MUβgluco	3,2 ± 0,1	0,0353 ± 0,0004	0,0109 ± 0,0004	3
16G12 (A156V)	Fuco	0,36 ± 0,02	0,138 ± 0,002	0,38 ± 0,03	100
	Gluco	0,66 ± 0,04	0,0612 ± 0,0009	0,092 ± 0,006	24
	Gala	2,42 ± 0,07	0,00709 ± 0,00006	0,00293 ± 0,00009	0,7
	Xilo	2,38 ± 0,08	0,00121 ± 0,00002	0,00050 ± 0,00002	0,13
	MUβgluco	3,3 ± 0,2	0,0125 ± 0,0003	0,0038 ± 0,0002	0,98
19C7 (R474H)	Fuco	0,50 ± 0,09	0,0182 ± 0,0006	0,036 ± 0,007	100
	Gluco	1,7 ± 0,1	0,00245 ± 0,00009	0,0014 ± 0,0001	3,9
	Gala	3,5 ± 0,2	0,000282 ± 0,000007	0,000081 ± 0,000005	0,2
	MUβgluco	1,16 ± 0,05	0,0000394 ± 0,0000004	0,000034 ± 0,000001	0,09
19H2 (S378G)	Fuco	0,32 ± 0,03	0,0232 ± 0,0004	0,073 ± 0,006	100
	Gluco	0,54 ± 0,07	0,0194 ± 0,0006	0,035 ± 0,004	49
	Gala	3,9 ± 0,3	$1,60.10^{-3} \pm 0,6.10^{-4}$	0,00041 ± 0,00004	0,6
	Xilo	1,9 ± 0,1	$2,08.10^{-4} \pm 0,7.10^{-5}$	0,000108 ± 0,000009	0,14
	MUβgluco	1,3 ± 0,1	$3,7.10^{-3} \pm 0,8.10^{-4}$	0,0028 ± 0,0003	3,8
21H8 (Y56C)	Fuco	0,45 ± 0,01	0,278 ± 0,001	0,62 ± 0,02	100
	Gluco	0,85 ± 0,02	0,1308 ± 0,0008	0,154 ± 0,004	25
	Gala	2,8 ± 0,1	0,0138 ± 0,0002	0,0048 ± 0,0002	0,8
	Xilo	2,28 ± 0,09	0,00208 ± 0,00003	0,00091 ± 0,00004	0,14
	MUβgluco	1,8 ± 0,1	0,0116 ± 0,0002	0,0063 ± 0,0004	10

Os parâmetros foram determinados utilizando-se no mínimo 10 diferentes concentrações de substratos e os ajustes na equação de Michaelis-Menten foram feitos através do software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

TABELA 5.9.3.1. Continuação:

enzima	substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1},mM^{-1})	k_{cat}/K_m relativo
	Fuco	1,24 ± 0,06	0,0078 ± 0,0001	0,0063 ± 0,0003	100
23H2	Gluco	2,4 ± 0,2	0,0025 ± 0,0001	0,0010 ± 0,0001	16
(S424F)	Gala	3,2 ± 0,2	0,000169 ± 0,000003	0,000051 ± 0,000003	0,8
	Xilo	3,7 ± 0,3	0,0000271 ± 0,000001	0,0000072 ± 0,0000006	0,11
	MUβgluco	3,4 ± 0,3	0,00033 ± 0,00001	0,000094 ± 0,000009	1,5
	Fuco	0,79 ± 0,04	0,209 ± 0,002	0,26 ± 0,01	100
24C12	Gluco	0,86 ± 0,03	0,0803 ± 0,0007	0,093 ± 0,003	35
(S358F)	Gala	9,9 ± 0,7	0,036 ± 0,001	0,0036 ± 0,0003	1,3
	Xilo	4,2 ± 0,3	0,00239 ± 0,00008	0,00056 ± 0,00005	0,2
	MUβgluco	1,81 ± 0,08	0,00723 ± 0,00009	0,0039 ± 0,0002	1,5
	Fuco	0,77 ± 0,03	0,238 ± 0,002	0,31 ± 0,01	100
	Gluco	1,17 ± 0,03	0,131 ± 0,001	0,112 ± 0,003	36
30A8	Gala	5,9 ± 0,3	0,0198 ± 0,0004	0,0033 ± 0,0002	1,1
(Y345C)	Xilo	4,3 ± 0,2	0,002134 ± 0,00005	0,00049 ± 0,00003	0,16
	MUβgluco	2,5 ± 0,1	0,0090 ± 0,0001	0,0035 ± 0,0002	1,1
	Fuco	0,94 ± 0,06	1,77 ± 0,03	1,8 ± 0,1	100
37A9	Gluco	0,89 ± 0,07	0,78 ± 0,02	0,87 ± 0,07	46
(R189G)	Gala	*	*	0,0176 ± 0,0002	24
	Xilo	2,9 ± 0,2	0,0168 ± 0,0007	0,0056 ± 0,0006	0,3
	MUβgluco	3,1 ± 0,2	0,226 ± 0,005	0,073 ± 0,004	3,9
	Fuco	2,11 ± 0,06	0,0547 ± 0,0006	0,0258 ± 0,0008	100
38C6	Gluco	2,6 ± 0,1	0,0045 ± 0,0008	0,0016 ± 0,0003	6,5
(F460L)	Gala	3,8 ± 0,2	0,00164 ± 0,00003	0,00042 ± 0,00002	1,6
	Xilo	7,3 ± 0,7	0,00017 ± 0,00001	0,000023 ± 0,000003	0,1
	MUβgluco	2,5 ± 0,2	0,000096 ± 0,000002	0,000037 ± 0,000003	0,14
	Fuco	0,35 ± 0,02	0,305 ± 0,003	0,86 ± 0,05	100
39B11	Gluco	0,84 ± 0,03	0,178 ± 0,002	0,209 ± 0,007	24
(P346S)	Gala	2,2 ± 0,1	0,0151 ± 0,0002	0,0067 ± 0,0004	0,8
	Xilo	2,29 ± 0,07	0,00207 ± 0,00002	0,00090 ± 0,00003	0,1
	MUβgluco	1,3 ± 0,1	0,0158 ± 0,0004	0,012 ± 0,001	1,4
	Fuco	0,75 ± 0,07	0,00391 ± 0,00008	0,0052 ± 0,0005	100
40G11	Gluco	3,2 ± 0,3	0,00226 ± 0,00008	0,00069 ± 0,000006	13
(N400D)	Gala	11,2 ± 0,4	0,000406 ± 0,000008	0,000036 ± 0,000001	0,7
	MUβgluco	3,5 ± 0,3	0,000234 ± 0,000007	0,000065 ± 0,000006	1,3
	MUβgluco	3,4 ± 0,3	0,00033 ± 0,00001	0,000094 ± 0,000009	1,5

(*) como o gráfico de v *versus* [S] apresentou-se linear, somente foi possível estimar k_{cat}/K_m a partir da inclinação da reta obtida.
Os parâmetros foram determinados utilizando-se no mínimo 10 diferentes concentrações de substratos e os ajustes na equação de Michaelis-Menten foram feitos através do software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

FIGURA 5.9.3.2.

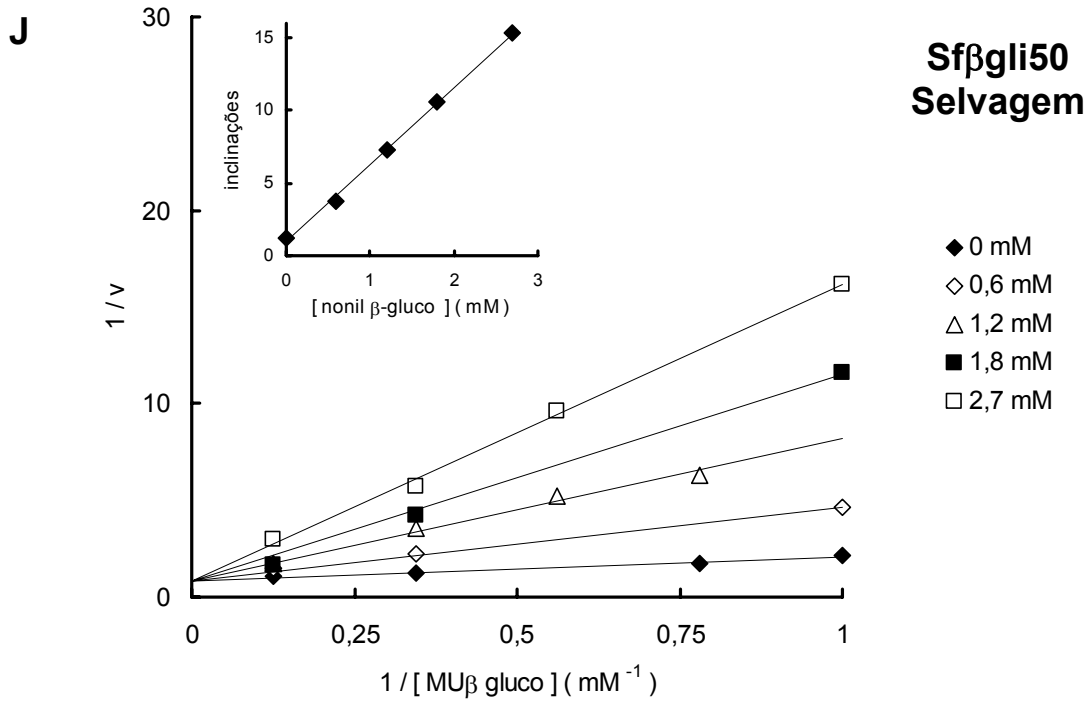


FIGURA 5.9.3.2. Inibição por **(A)** fenil-β-D-glucopiranosídeo, **(B)** metil-β-D-glucopiranosídeo, **(C)** celobiose, **(D)** celotriose, **(E)** celotetraose, **(F)** celopentaose, **(G)** hexil-β-D-glucopiranosídeo, **(H)** heptil-β-D-glucopiranosídeo, **(I)** octil-β-D-glucopiranosídeo e **(J)** nonil-β-D-glucopiranosídeo da atividade enzimática das Sfβgli50 selvagem e mutantes sobre MUβgluco. A apresentação segue a seguinte ordem: 6G10 (P348L), 16G12 (A156V), 21H8 (Y56C), 39B11 (P346S), 30A8 (Y345C), 38C6 (F460L), 4C11 (T35A), 37A9 (R189G), 24C12 (S358F) e Sfβgli50 selvagem. A Sfβgli50 utilizada foi produzida através do sistema de expressão heteróloga em pCal-n-Flag-Sfβgli50. O substrato e o inibidor foram preparados em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 6,0. Ao lado de cada gráfico estão as concentrações utilizadas para cada inibidor. Os respectivos replotes de inclinações da reta obtida no plote de Lineweaver-Burk estão apresentadas como insertos em cada gráfico dos inversos. Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

TABELA 5.9.3.2. Dados de inibição para a Sfβgli50 selvagem e mutantes selecionadas na "varredura":

inibidor	Sfβgli50 selvagem	6G10 (P348L)	38C6 (F460L)	39B11 (P346S)
	K_i (mM)			
fenilβglc	50 ± 2	47 ± 2	48 ± 2	64 ± 2
metilβglc	5,1 ± 0,5	20,6 ± 0,5	20 ± 1	5,1 ± 0,4
celobiose	3,1 ± 0,1	23,4 ± 0,8	25 ± 1	7 ± 1
celotriose	0,33 ± 0,02	1,57 ± 0,07	0,85 ± 0,02	0,20 ± 0,02
celotetraose	0,19 ± 0,01	1,87 ± 0,09	0,82 ± 0,04	0,16 ± 0,01
celopentaose	0,3 ± 0,03	0,89 ± 0,01	1,13 ± 0,07	0,23 ± 0,02
hexilβglc	5,2 ± 0,7	15 ± 1	17 ± 1	9 ± 1
heptilβglc	1,6 ± 0,2	3,6 ± 0,2	8,1 ± 0,5	2,1 ± 0,5
octilβglc	0,54 ± 0,09	1,1 ± 0,1	3,7 ± 0,2	0,64 ± 0,01
nonilβglc	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,01	1,4 ± 0,1	0,2 ± 0,07

inibidor	21H8 (Y56C)	16G12 (A156V)	24C12 (S358F)
	K_i (mM)		
fenilβglc	46 ± 2	156 ± 2	22 ± 2
metilβglc	9,5 ± 0,4	5,1 ± 0,3	21,4 ± 0,5
celobiose	9 ± 1	24,7 ± 0,7	28,2 ± 0,6
celotriose	0,33 ± 0,04	0,85 ± 0,05	2,8 ± 0,1
celotetraose	0,60 ± 0,02	0,67 ± 0,04	4,4 ± 0,1
celopentaose	0,56 ± 0,03	0,88 ± 0,01	3,7 ± 0,1
hexilβglc	13 ± 1	27 ± 2	12,8 ± 0,9
heptilβglc	4,5 ± 0,2	9,4 ± 0,6	4,2 ± 0,5
octilβglc	1,7 ± 0,1	3,2 ± 0,2	1,57 ± 0,05
nonilβglc	0,64 ± 0,01	1,13 ± 0,02	0,60 ± 0,06

inibidor	4C11 (T35A)	30A8 (Y345C)	37A9 (R189G)
	K_i (mM)		
fenilβglc	460 ± 18	70 ± 2	371 ± 2
metilβglc	24,4 ± 0,3	18 ± 1	37 ± 2
celobiose	4,4 ± 0,3	26 ± 2	21 ± 1
celotriose	0,089 ± 0,005	1,00 0,03	1,3 ± 0,1
celotetraose	3,1 ± 0,1	1,23 ± 0,05	2,6 ± 0,1
celopentaose	6,2 ± 0,2	2,28 ± 0,04	3,0 ± 0,1
hexilβglc	4,8 ± 0,2	12,5 ± 0,4	17 ± 1
heptilβglc	11 ± 1	6,2 ± 0,2	11 ± 1
octilβglc	17,4 ± 0,1	3,0 ± 0,1	8,0 ± 0,3
nonilβglc	32 ± 1	1,3 ± 0,1	5,8 ± 0,2

Para todos os inibidores verificou-se um padrão de uma inibição competitiva linear simples. Os valores de K_i foram calculados usando o software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987). Os dados foram obtidos com cinco diferentes concentrações de substrato (MUβgluco) na presença de cinco diferentes concentrações de inibidor.

5.9.4. Efeitos mutacionais sobre a especificidade pelo substrato nas Sfβgli50 mutantes selecionadas.

Após a caracterização cinética (item 4.19.; tabela 5.9.3.1.; figura 5.9.3.1.) determinou-se o quanto a especificidade pelo substrato de cada Sfβgli50 mutante selecionada na "varredura" difere daquela da enzima selvagem. Para isto utilizou-se a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para o par de substratos da seleção: *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo (fuco) e *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (gluco). A especificidade pelo substrato da enzima selvagem frente a estes substratos foi expressa pela razão de k_{cat}/K_m para gluco por fuco, enquanto que alterações na especificidade pelo substrato para uma enzima mutante foram expressas através da divisão da razão de k_{cat}/K_m para gluco por fuco da enzima mutante pela razão da selvagem. A partir destes dados agrupou-se estas enzimas em três grupos: as que apresentaram uma especificidade mais "restrita" , mais "homogênea" ou com alterações "pontuais" (figura 5.9.4.1.).

O primeiro destes grupos, especificidade mais "restrita", corresponde às enzimas mutantes que tendem a ter uma razão de k_{cat}/K_m de gluco por fuco menor do que a encontrada na selvagem (19C7 (R474H), 38C6 (F460L), 40G11 (N400D), 4C11 (T35A) e 23H2 (S424F)). Tais enzimas apresentam-se com um aumento da preferência por fucosídeo quando comparadas a selvagem. Logo, pode-se dizer que elas tiveram uma "restrição" de sua especificidade (figura 5.9.4.1.- A).

O segundo grupo, com especificidade mais “homogênea”, corresponde às enzimas mutantes que mostraram um aumento da razão de k_{cat}/K_m de gluco por fuco (24C12 (S358F), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G) e 19H2 (S378G)). De tal forma que a preferência destas enzimas por fucosídeo foi reduzida em comparação à enzima selvagem (figura 5.9.4.1.- C).

O terceiro grupo, mutantes com especificidade com alterações “pontuais”, corresponde as que tiveram valores de razão de k_{cat}/K_m de gluco por fuco similares à selvagem (6G10 (P348L), 16G12 (A156V), 21H8 (Y56C) e 39B11 (P346S)) (figura 5.9.4.1.- B). A primeira vista pode parecer contraditório o fato destas enzimas não terem alterações evidentes na especificidade pelo substrato, pois foram selecionadas em um processo de “varredura” cujo critério de escolha era a alteração deste parâmetro. No entanto, esta contradição pode começar a ser resolvida a partir da constatação de que apesar das alterações nos valores de eficiência catalítica frente a gluco e fuco, estas enzimas mutantes mantiveram a mesma proporção observada para a selvagem. Por exemplo, a mutante 16G12 (A156V) apresenta quedas de 2,8 e 2,6 vezes em seus valores de k_{cat}/K_m sobre gluco e fuco, respectivamente, em relação a selvagem. Assim, sua razão de k_{cat}/K_m de gluco por fuco é de 0,24, muito similar ao da selvagem (0,25). O mesmo pode ser verificado para as demais mutantes deste grupo: 6G10 (P348L) apresentou quedas de 3,1 e 2,6 para gluco e fuco, respectivamente; 21H8 (Y56C) apresentou quedas de 1,7 e 1,6 para gluco e fuco, respectivamente; 39B11 (P346S) apresentou pequenas quedas em torno de 1,2 para os dois substratos. Assim, as razões de k_{cat}/K_m

de gluco por fuco para estas três mutantes foram de 0,22, 0,25 e 0,24, respectivamente (selvagem 0,25). Estas similaridades foram geradas principalmente porque todas estas enzimas mutantes tiveram uma queda maior no k_{cat} para fuco em comparação ao obtido para gluco e um maior aumento no K_m para gluco em comparação ao obtido para fuco.

Além disto, deve ser levado em consideração que a "varredura" baseia-se na razão das velocidades de hidrólise de gluco por fuco e isto não necessariamente é igual a razão k_{cat}/K_m. Por exemplo, em [S] > K_m a velocidade pode refletir principalmente k_{cat} . Logo, o procedimento utilizado na "varredura" não tem a obrigatoriedade de selecionar mutantes com diferenças na razão k_{cat}/K_m. Assim, é provável que as quatro mutantes deste grupo tenham sido selecionadas a partir de ensaios feitos com concentração de substrato em que a velocidade da reação refletia o k_{cat} .

Uma análise mais detalhada da caracterização cinética destas enzimas mutantes selecionadas na "varredura" será feita mais adiante em conjunto com outros dados.

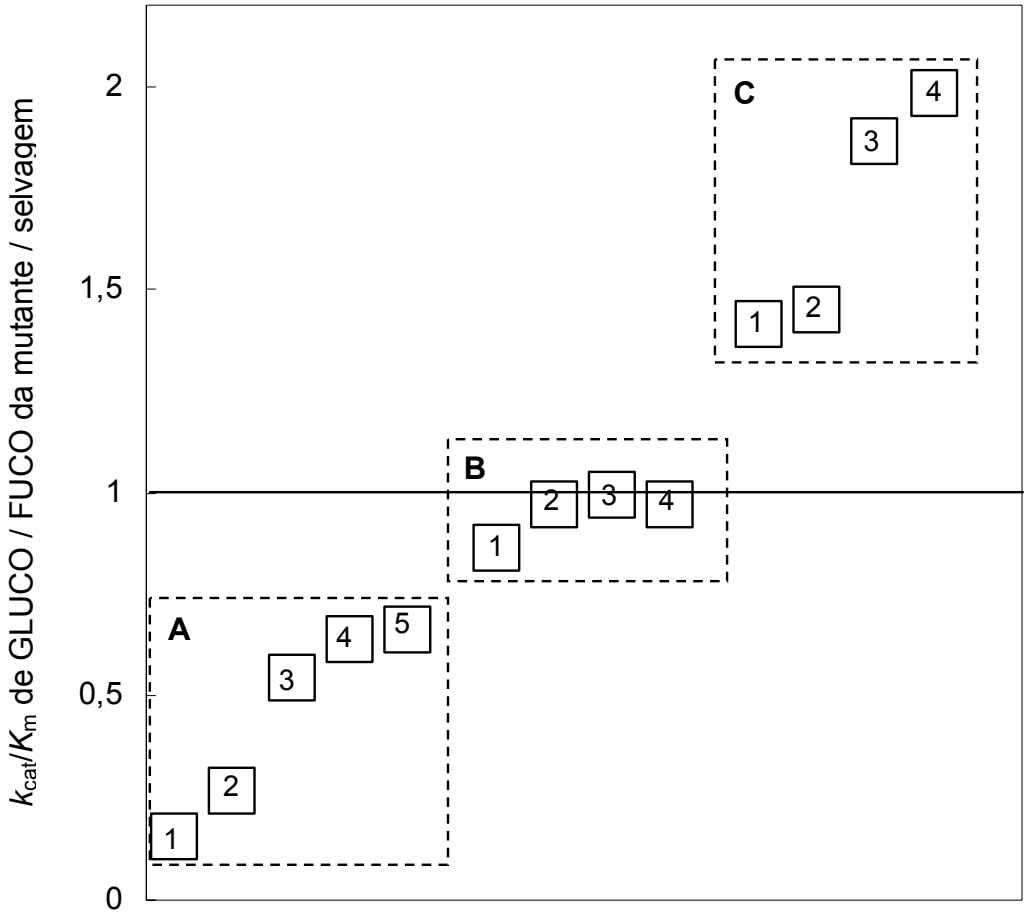


FIGURA 5.9.4.1. Agrupamento das Sfβgli50 mutantes selecionadas no processo de "varredura" com base no quanto a razão de k_{cat}/K_m de GLUCO/FUCO das Sfβgli50 mutantes correspondem a da enzima selvagem. **(A)** Especificidade mais "restrita": (1) 19C7 (R474H), (2) 38C6 (F460L), (3) 40G11 (N400D), (4) 4C11 (T35A) e (5) 23H2 (S424F), **(B)** Especificidade com alteração "pontual": (1) 6G10 (P348L), (2) 16G12 (A156V), (3) 21H8 (Y56C) e (4) 39B11 (P346S) e **(C)** Especificidade mais "homogênea": (1) 24C12 (S358F), (2) 30A8 (Y345C), (3) 37A9 (R189G) e (4) 19H2 (S378G).

5.9.5. Efeitos mutacionais sobre a interação com grupos alquil e unidades de glicose nas Sfβgli50 mutantes selecionadas.

Baseado nos valores de K_is (tabela 5.9.3.2. e figura 5.9.3.2.) obtidos na caracterização cinética das mutantes selecionadas na "varredura" foram calculadas as energias de ligação (ΔG^o) de acordo com o descrito no item 4.9.3 e 4.9.4. Assim, determinou-se a energia de ligação de um aglicone do tipo fenil, como já comentado, através da subtração da energia de ligação obtida para fenil-β-D-glucopiranosídeo por metil-β-D-glucopiranosídeo (figura 5.9.5.1.). Em seguida, foi determinada a variação da energia livre (ΔG^o) de ligação de alquil-β-D-glucosídeos em função do número de carbonos do aglicone (de 6 a 9 carbonos) destes compostos para a Sfβgli50 selvagem e mutantes (figura 5.9.5.2.). E por fim, determinou-se a energia de interação entre unidades de glicose do aglicone com a Sfβgli50 selvagem e mutantes (figura 5.9.5.3).

Assim como a Sfβgli50 selvagem, todas as mutantes analisadas, exceto 24C12 (S358F), não interagem favoravelmente com um aglicone do tipo fenil. Porém, as mutações 6G10 (P348L), 30A8 (Y345C) e 38C6 (F460L) reduziram esta tendência. Já a mutação 21H8 (Y56C) tornou a interação ainda mais desfavorável (figura 5.9.5.1.).

As mutações selecionadas também afetaram a interação da Sfβgli50 com aglicones do tipo alquil contendo entre 6 e 9 carbonos (figura 5.9.5.2.). Em todos os casos, exceto a mutação 39B11 (P346S), há alteração na intensidade da interação, sendo esta sempre mais fraca para as enzimas mutantes. Este resultado é evidenciado pela não sobreposição das retas correspondentes às enzimas selvagens e mutantes, sendo que os valores de energia de ligação

para enzimas mutantes são sempre “menos negativos” levando estas retas para uma posição acima daquela da enzima selvagem. Além disso, no caso das mutações 4C11 (T35A), 30A8 (Y345C) e 37A9 (R189G) há modificação também no ganho de afinidade proporcionado pela adição de cada um dos carbonos do aglicone ($\Delta\Delta G^o/C$; inclinação nos gráficos da figura 5.9.5.2.). As mutações 30A8 (Y345C) e 37A9 (R189G) reduziram este parâmetro para 1,8 e 0,92 kJ/mol por carbono, contudo o aumento da extensão do grupo alquil ainda favorece a ligação do aglicone como também ocorre na Sfβgli50 selvagem (2,8 kJ/mol por carbono). Porém, a mutação 4C11 (T35A) reverteu totalmente esta situação, sendo que a adição de cada grupo metil reduz a afinidade pela enzima mutante em 1,5 kJ/mol. Considerando que um aglicone do tipo fenil ocupa o subsítio +1 e aglicones do tipo hexil e nonil, dada sua extensão, interagem principalmente com o subsítio +2, pode-se assumir que algumas das mutações selecionadas (24C12 (S358F), 6G10 (P348L), 38C6 (F460L), 21H8 (Y56C), 4C11 (T35A), 30A8 (Y345C) e 37A9 (R189G))além de afetar o subsítio -1, onde se liga o glicone, também influenciaram os subsítios de ligação do aglicone.

Esta tendência também pode ser observada na análise das energias de ligação das unidades de glicose de aglicones oligossacarídicos (figura 5.9.5.3). Assim, as mutações 4C11 (T35A) e 16G12 (A156V) causaram aumento e redução, respectivamente, da afinidade pela primeira unidade de glicose do aglicone (ligação no subsítio +1). Estas mesmas mutações juntamente com 21H8 (Y56C), 30A8 (Y345C) e 39B11 (P346S) causaram aumentos na afinidade por unidades de glicose no subsítio +2. Finalmente apenas a mutação 4C11 (T35A) causou clara queda na afinidade da Sfβgli50 pela

terceira unidade de glicose do aglicone. Assim, dentre estas mutantes analisadas, os dados indicam que a mutação 4C11 (T35A) foi aquela que consistentemente causou claras alterações na ligação do aglicone. Finalmente, salienta-se que as mutações foram selecionadas quanto a sua preferência pelo glicone (fucosídeo versus glucosídeo) e deste modo não necessariamente as tendências de alteração da afinidade pelo aglicone se correlacionam diretamente com as novas preferências pelo glicone nas Sfβgli50 mutantes. De qualquer modo, o conjunto de dados de inibição confirmam que as mutações alteram as propriedades de afinidade do sítio ativo da Sfβgli50.

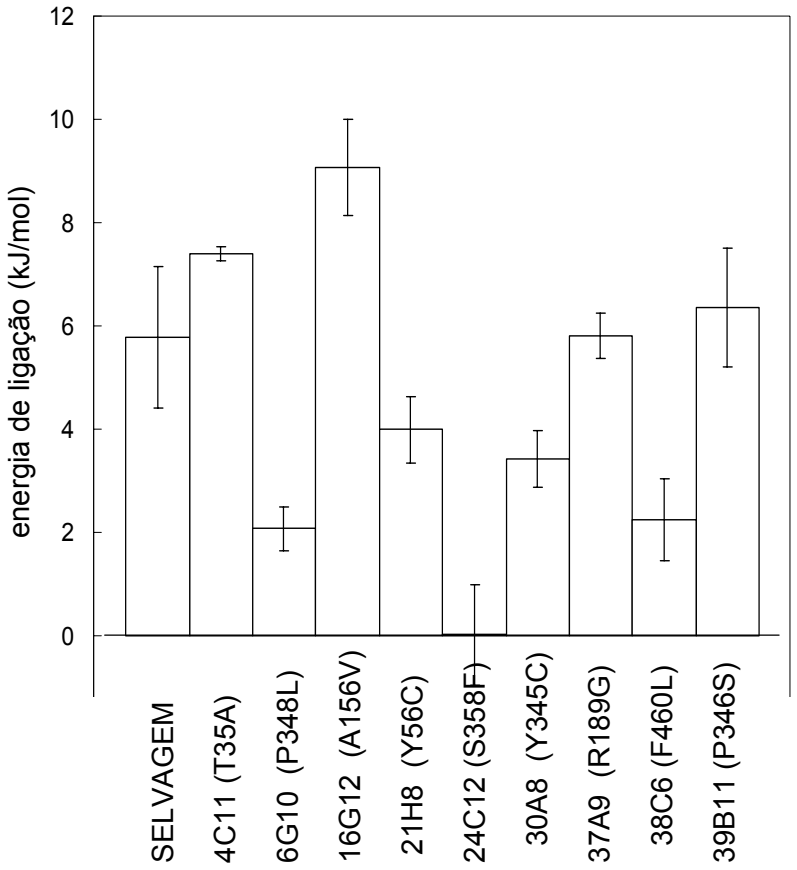


FIGURA 5.9.5.1. Energia de ligação *(*ΔG^o) de um aglicone do tipo fenil para a Sfβgli50 selvagem e mutantes. Valores positivos de *(*$\Delta G^o > 0$) indicam uma ligação desfavorável.

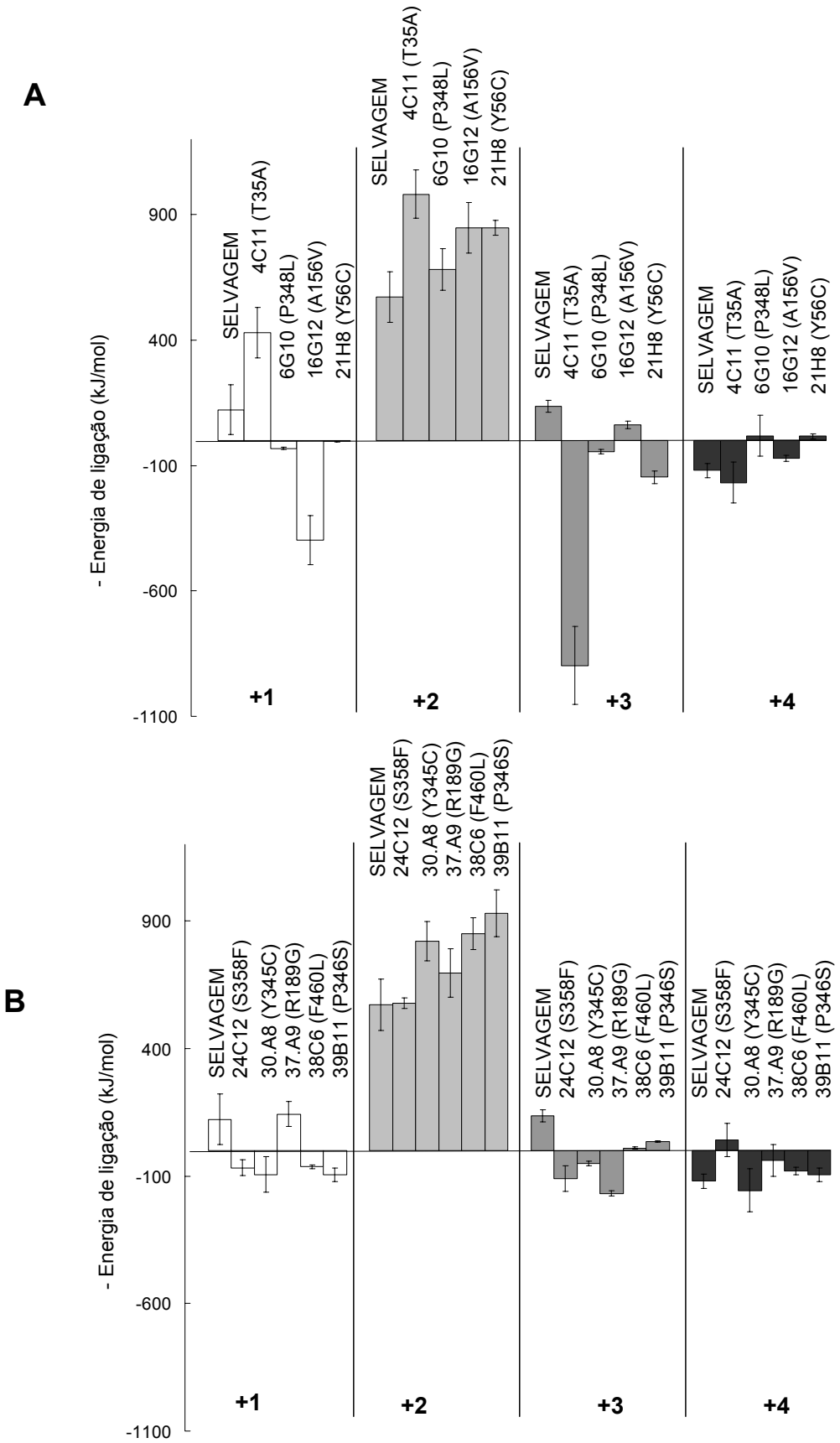


FIGURA 5.9.5.3. Energia de interação de unidades de glicose do aglicone com a Sfβgli50 selvagem e mutantes. **(A)** 4C11 (T35A), 6G10 (P348L), 16G12 (A156V) e 21H8 (Y56C) e **(B)** 24C12 (S358F), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G), 38C6 (F460L) e 39B11 (P346S). Os valores positivos representam interações favoráveis, enquanto os valores negativos correspondem a interações desfavoráveis. As unidades de glicose são numeradas da extremidade não redutora para a redutora do aglicone.

5.10. Mutações sítio-dirigida de resíduos possivelmente relacionados aos selecionados na "varredura" da "biblioteca" de mutantes aleatórios da Sfβgli50.

A caracterização cinética das enzimas mutantes selecionadas na "varredura" mostrou claros efeitos sobre a especificidade (figura 5.9.4.1.) da Sfbgli50, indicando que as mutações alteraram o sítio ativo desta enzima. Assim, o passo seguinte foi procurar elucidar o meio pelo qual estes resíduos mutados afetam a catálise enzimática e/ou especificidade pelo substrato na Sfβgli50. Assim, primeiramente foram feitas mutações por A dos resíduos selecionados na "varredura", exceto para a mutante 4C11 cuja troca já era por uma A (T35A), com o objetivo de verificar o efeito da remoção da cadeia lateral. Assim, foram criadas as enzimas mutantes: P346A, P348A, Y345A, S424A, S358A, S378A, Y56A, F460A, N400A, R474A e R189A. Para os resíduos Y345 e N400 além das mutações por A também foi construída uma enzima mutante adicional na qual a troca foi realizada por F e V, respectivamente, gerando as mutantes Y345F e N400V. A troca de Y por F visa remover a porção polar da cadeia lateral que poderia participar de ligações de hidrogênio. Já a troca de N por V remove a porção polar da cadeia lateral e busca manter o volume ocupado. Além disto, baseando-se na estrutura terciária obtida por homologia para a Sfβgli50 e nos dados de "contatos" entre resíduos da Sfβgli50 fornecidos pelo programa iMOLTALK (item 4.10.) foram identificados resíduos que estão próximos (a menos de 3,4 Å) aos resíduos selecionados na "varredura". Tais

resíduos são: P344, D362, E458, M57, S403, S349, S198, R268, R97, M442, Q269, H330, Y331 e M447. Desse modo foram criadas as enzimas mutantes: P344A, E458A, E458D, M57A, S403A, S349A, S198A, R268M, Q269A, H330A, M442A, M447A, Y331F, R97M, R97K e Y331F/R97M (mutação dupla).

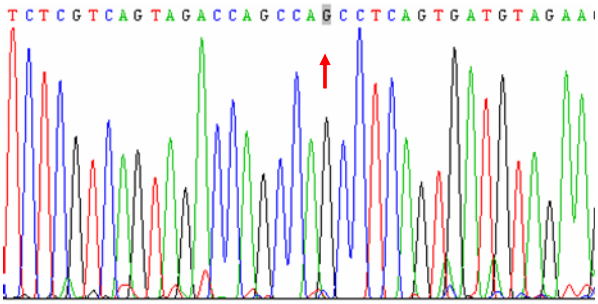
Finalmente, além de todas estas mutações foram ainda criadas duas Sfβgli50 mutantes, Y228F e Y167F, com o objetivo de verificar o efeito sobre a especificidade pelo substrato resultante de mutação em resíduos que estão em regiões distintas das analisadas.

As mutações foram feitas de acordo com o protocolo SOEing ("Splicing by overlap extension") de McPherson and Moller, 2006, (item 4.21.) (figura 5.10.1.). Em seguida, a inserção das mutações foi verificada através do seqüenciamento dos plasmídeos contendo o inserto da Sfβgli50 com a mutação (itens 4.2. e 4.15.) (figura 5.10.2.). Então, estas Sfβgli50 mutantes foram expressas como proteína heteróloga em bactéria, *E. coli* BL21-DE3 (item 4.16.) (figura 5.10.3.) e o sobrenadante do lisado destas bactérias foi utilizado em um processo de purificação em cromatografia de afinidade (item 4.17.) (figura 5.10.4.), cuja eficiência foi verificada através de SDS-PAGE (item 4.8.) (figuras 5.10.5. e 5.10.6.). Para maiores detalhes do processo de purificação em cromatografia de afinidade em coluna de calmodulina-agarose (Stratagene) verificar item 5.9.2..

FIGURA 5.10.2.

N400A

A

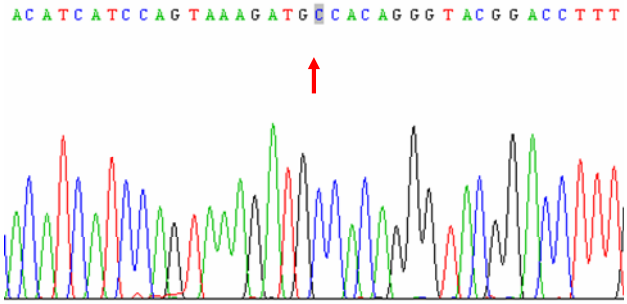


B

```
      T  E  A  G  W  S
     ACTGAGGCTGGCTGGTCT
1194 ......AA........... 1212
398   T  E  N  G  W  S  404
```

P348A

A

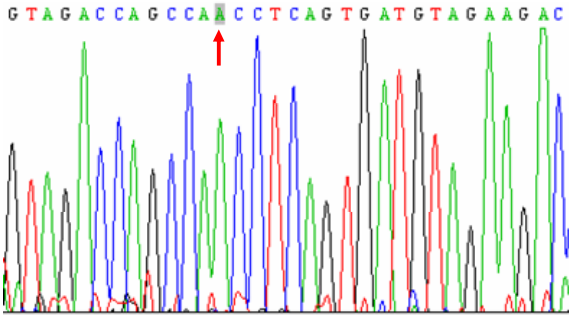


B

```
      P  Y  P  V  A  S  L  L  D  D
     CCGTACCCTGTGGCATCTTTACTGGATGAT
1032 ............C................. 1059
344   P  Y  P  V  P  S  L  L  D  D   353
```

N400V

A

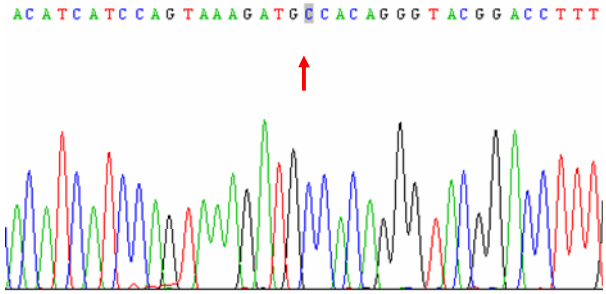


B

```
      T  E  V  G  W  S
     ACTGAGGTTGGCTGGTCT
1194 ......AA........... 1212
398   T  E  N  G  W  S  404
```

P348A

A

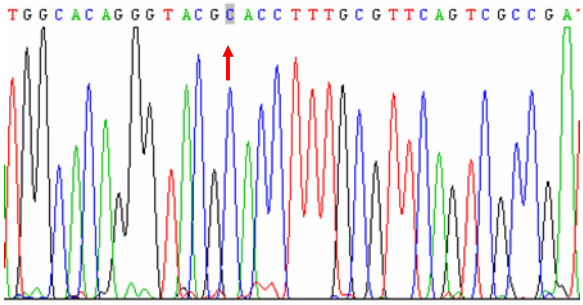


B

```
      P  Y  P  V  A  S  L  L  D  D
     CCGTACCCTGTGGCATCTTTACTGGATGAT
1032 ............C................. 1059
344   P  Y  P  V  P  S  L  L  D  D   353
```

P344A

A

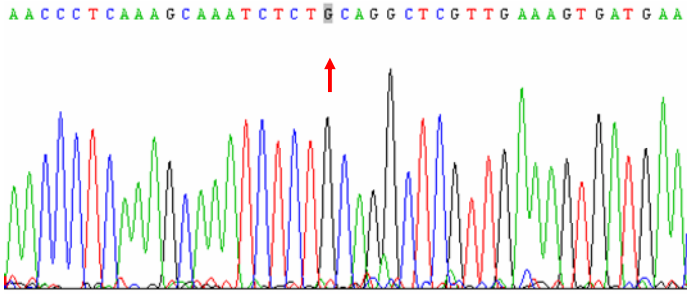


B

```
      E  R  K  G  A  Y  P  V  P
     GAACGCAAAGGTGCGTACCCTGTGCCA
1020 ............C.............. 1044
340   E  R  K  G  P  Y  P  V  P 348
```

R189A

A

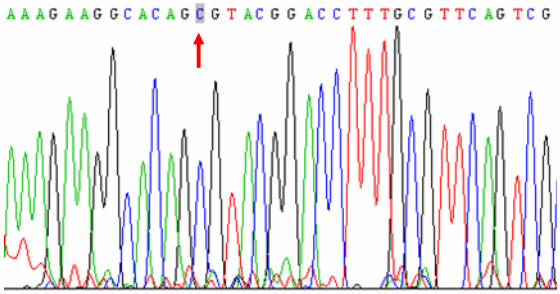


B

```
      N  E  P  A  E  I  C
     AACGAGCCTGCAGAGATTTGC
558  .........AG........... 576
186   N  E  P  R  E  I  C   192
```

P346A

A

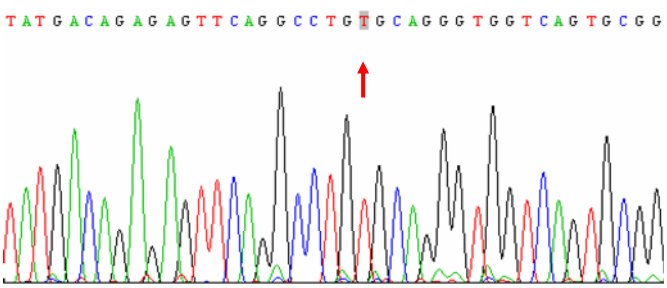


B

```
      G  P  Y  A  V  P  S  L
     GGTCCGTACGCTGTGCCATCTTTA
1029 .........C............. 1050
343   G  P  Y  P  V  P  S  L   350
```

R268M

A



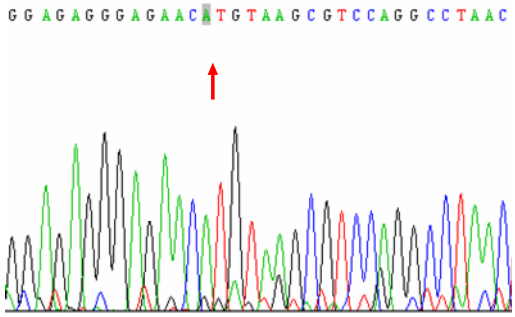
B

```
      A  A  E  L  R  M  Q  G  E  W
     GCTGCTGAACTTAGGATACAGGGTGAGTGG
789 ................A............ 818
263  A  A  E  L  R  R  Q  G  E  W  212
```

FIGURA 5.10.2.

R97M

A

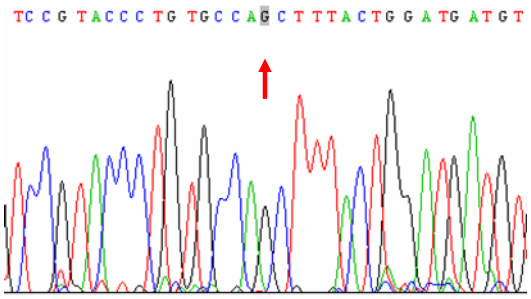


B

```
      A  Y  M  F  S  L
     GCTTACATGTTCTCCCTC
295  .......G..........  300
 95  A  Y  R  F  S  L   100
```

S349A

A

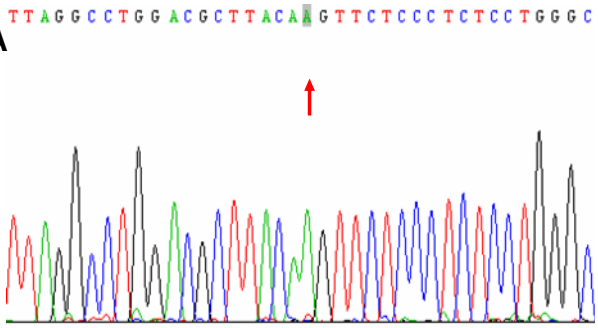


B

```
        P  V  P  A  L  L  D  D
       CCTGTGCCAGCTTTACTGGATGAT
1038   .........G..............  1059
 346    P  V  P  S  L  L  D  D   353
```

R97K

A

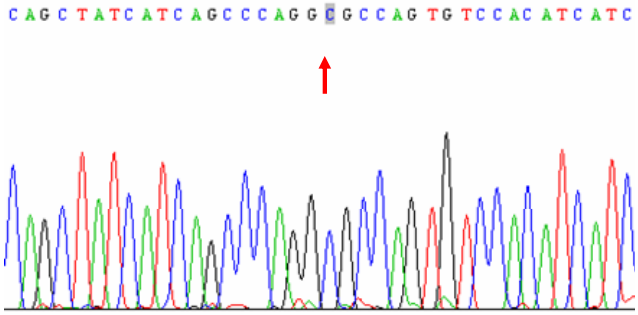


B

```
        D  A  Y  K  F  S  L  S
       GACGCTTACAAGTTCTCCCTCTCC
292    ..........G.............  303
 94     D  A  Y  R  F  S  L  S   101
```

S358A

A

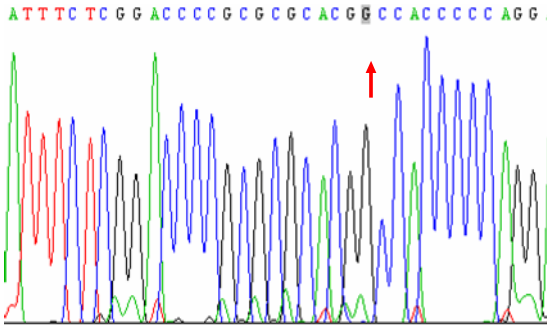


B

```
        D  D  V  D  T  G  A  W  A  D  D  S  W
       GATGATGTGGACACTGGCGCCTGGGCTGATGATAGCTGG
1056   ...................T....................  1062
 352    D  D  V  D  T  G  S  W  A  D  D  S  W   354
```

R474A

A

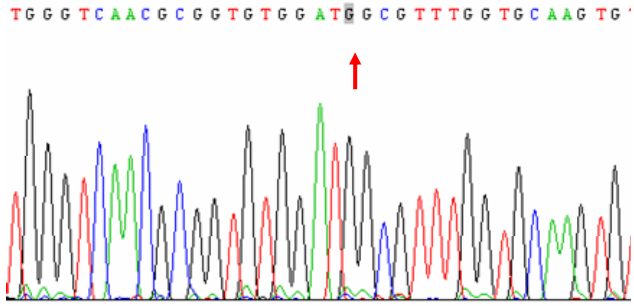


B

```
        A  R  T  A  T  P
       GCGCGCACGATGACCCCC
1413   .........CGC......  1428
 471    A  R  T  R  T  P   476
```

S378A

A

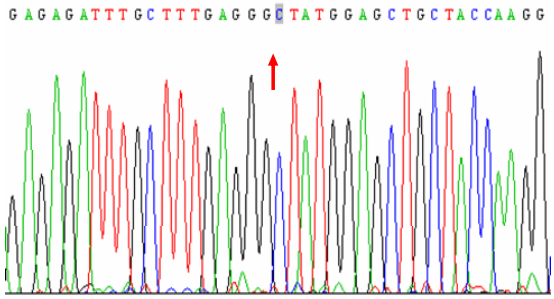


B

```
        L  A  P  N  A  I  H  T  A  L  T  H
       CTTGCACCAAACGCCATCCACACCGCGTTGACCCAC
1122   .............AG......................  1155
 374    L  A  P  N  S  I  H  T  A  L  T  H   385
```

S198A

A

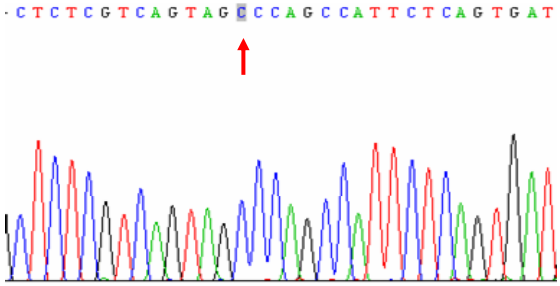


B

```
        G  Y  G  A  A  T  K  A  P
       GGTTATGGAGCTGCTACCAAGGCTCCG
585    .........T................  609
195     G  Y  G  S  A  T  K  A  P   203
```

S403A

A



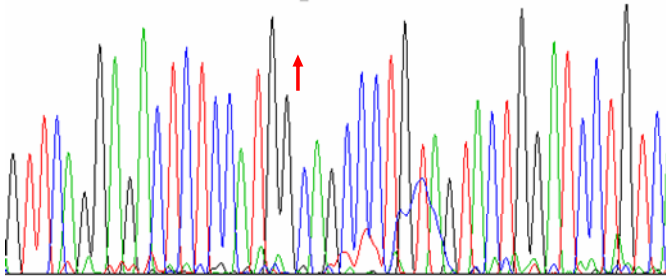
B

```
        T  E  N  G  W  A  T  D  E  S  R  E
       ACTGAGAATGGCTGGGCTACTGACGAGAGCCGAGAG
1194   ................T...................  1227
 398    T  E  N  G  W  S  T  D  E  S  R  E   409
```

FIGURA 5.10.2.

S424A

A

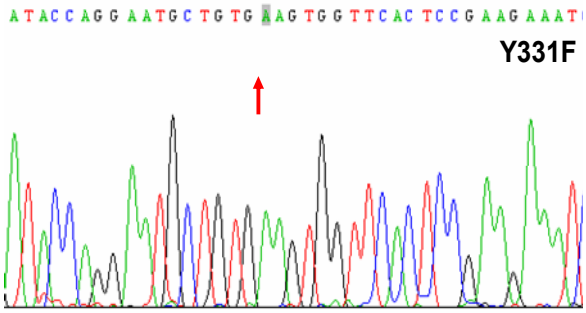


B

```
        Y  R  A  A  M  E  S
       TACAGGGCTGCCATGGAGAGT
1263   .........T...........   1281
 421    Y  R  A  S  M  E  S    427
```

Y331F

A

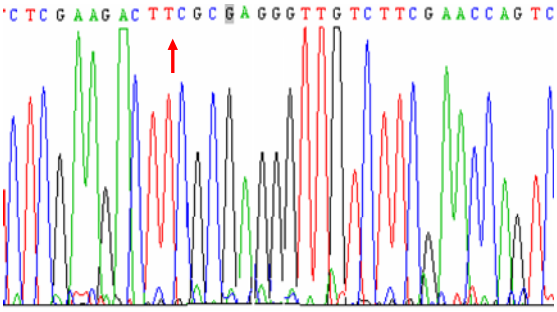


B

```
        V  N  H  F  T  A  F  L  V  S
       GTGAACCACTTCACAGCATTCCTGGTATCG
984    ..........A...................   1011
328     V  N  H  Y  T  A  F  L  V  S    337
```

Y167F

A

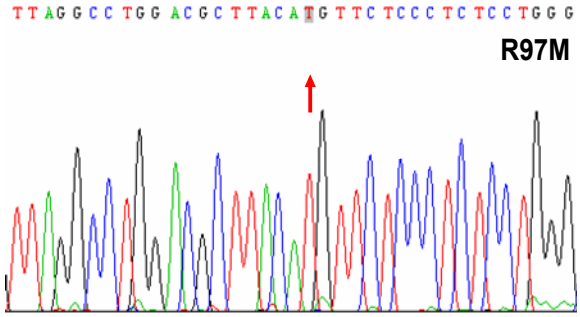


B

```
        F  E  D  F  A  R  V
       TTCGAAGACTTCGCGAGGGTT
492    ..........A..........   510
164     F  E  D  Y  A  R  V    170
```

R97M

A

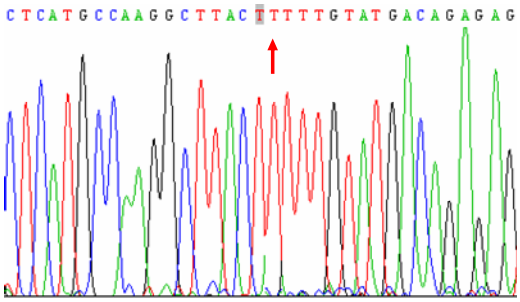


B

```
        D  A  Y  M  F  S  L  S
       GACGCTTACATGTTCTCCCTCTCC
292    ..........G..............   303
 94     D  A  Y  R  F  S  L  S    101
```

Y228F

A

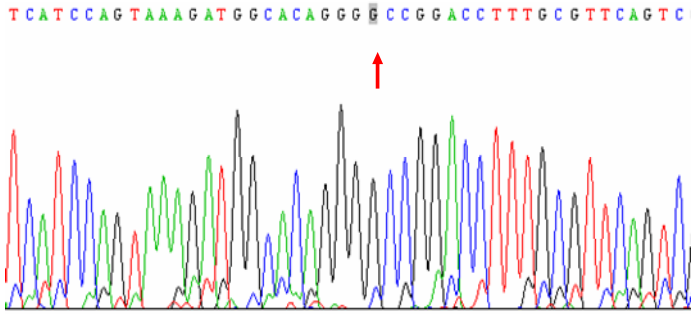


B

```
        A  K  A  Y  F  L  Y  D  R
       GCCAAGGCTTACTTTTGTATGACAGA
672    .............T.............   696
224     A  K  A  Y  Y  L  Y  D  R    232
```

Y345A

A

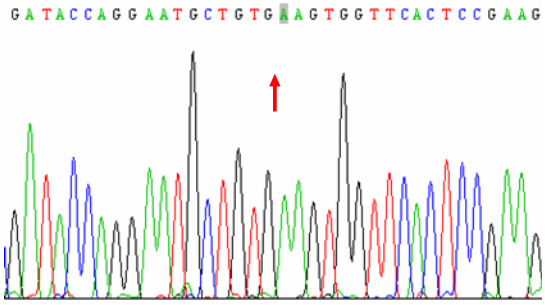


B

```
        K  G  P  A  P  V  P
       AAAGGTCCGGCCCCTGTGCCA
1026   .........TA..........   1044
 342    K  G  P  Y  P  V  P    348
```

Y331F

A

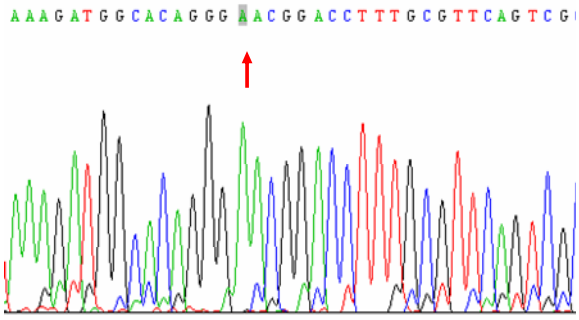


B

```
        N  H  F  T  A  F  L  V
       AACCACTTCACAGCATTCCTGGTA
987    .......A................   1008
329     N  H  Y  T  A  F  L  V    336
```

Y345F

A



B

```
        K  G  P  F  P  V  P
       AAAGGTCCGTTCCCTGTGCCA
1026   .........TA..........   1044
 342    K  G  P  Y  P  V  P    348
```

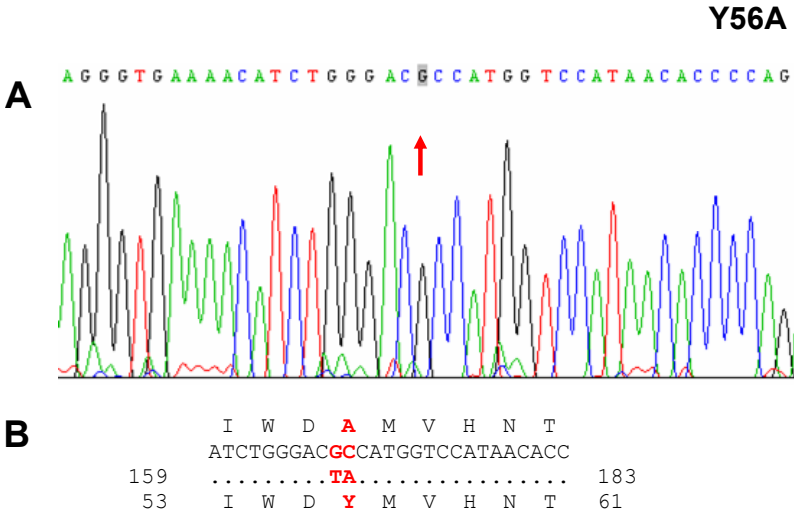


FIGURA 5.10.2. Sequenciamento das Sfβgli50 mutantes geradas por mutagênese sítio-dirigida planejadas a partir das mutantes selecionadas na "varredura" da "biblioteca" de mutantes aleatórios da Sfβgli50. **(A)** Detalhe do eletroferograma da reação de sequenciamento destacando onde a seta indica o nucleotídeo mutado. **(B)** Detalhe do alinhamento entre a Sfβgli50 selvagem e a respectiva enzima mutante destacando em vermelho os aminoácidos e nucleotídeos alterados. A apresentação segue a seguinte ordem: D362A, E458D, E458A, F460A, H330A, M442A, M447A, M57A, N400A, N400V, P344A, P346A, P348A, Q269A, R189A, R268M, R474A, R97K, R97M, S198A, S349A, S358A, S378A, S403A, S424A, Y167F, Y228F, Y331F, Y331F/R97M, Y345A, Y345F e Y56A. Mais detalhes ver itens 4.2. e 4.22..

FIGURA 5.10.4.

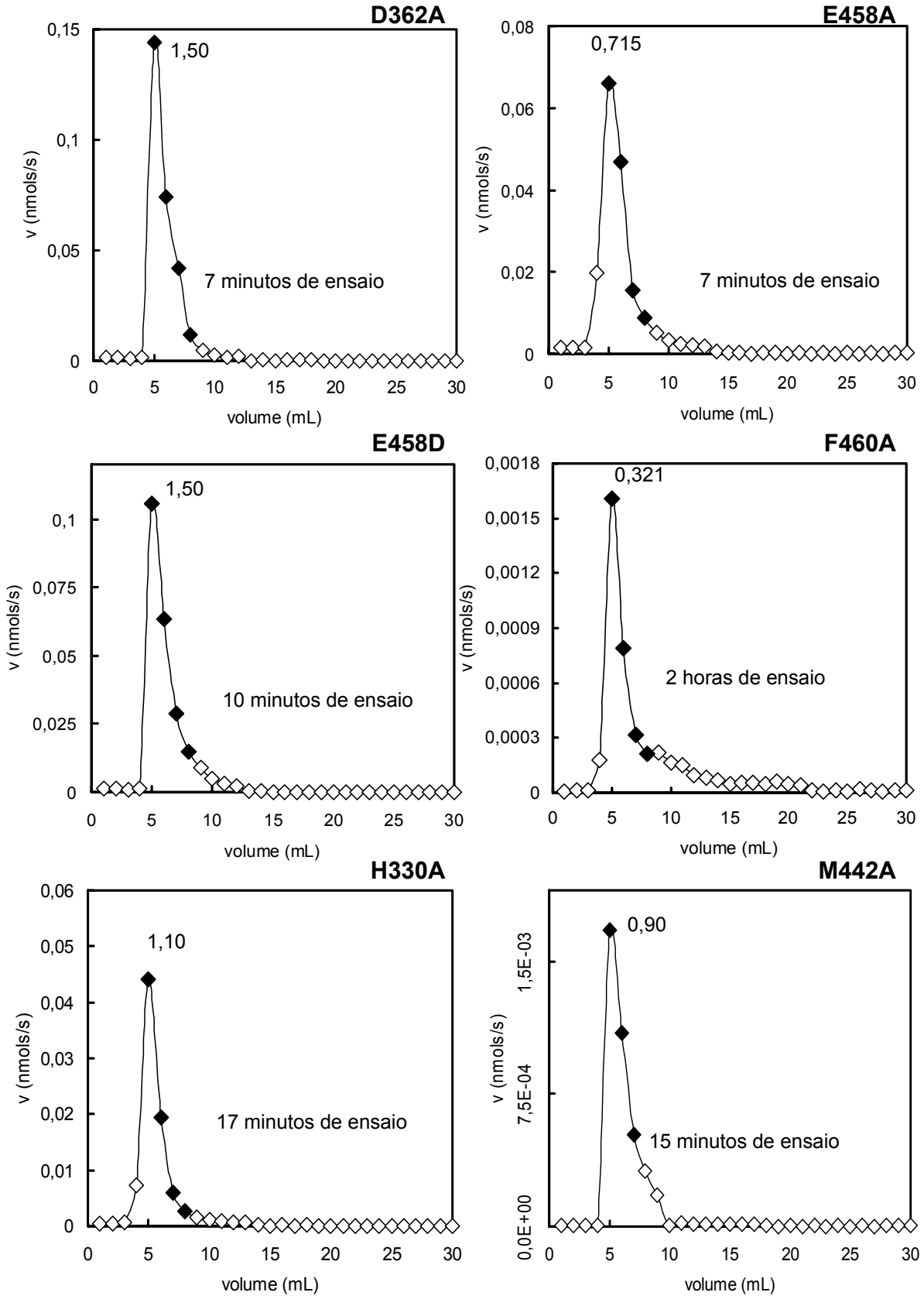

D362A
1,50
7 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
E458A
0,715
7 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
E458D
1,50
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
F460A
0,321
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
H330A
1,10
17 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
M442A
0,90
15 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)

FIGURA 5.10.4.

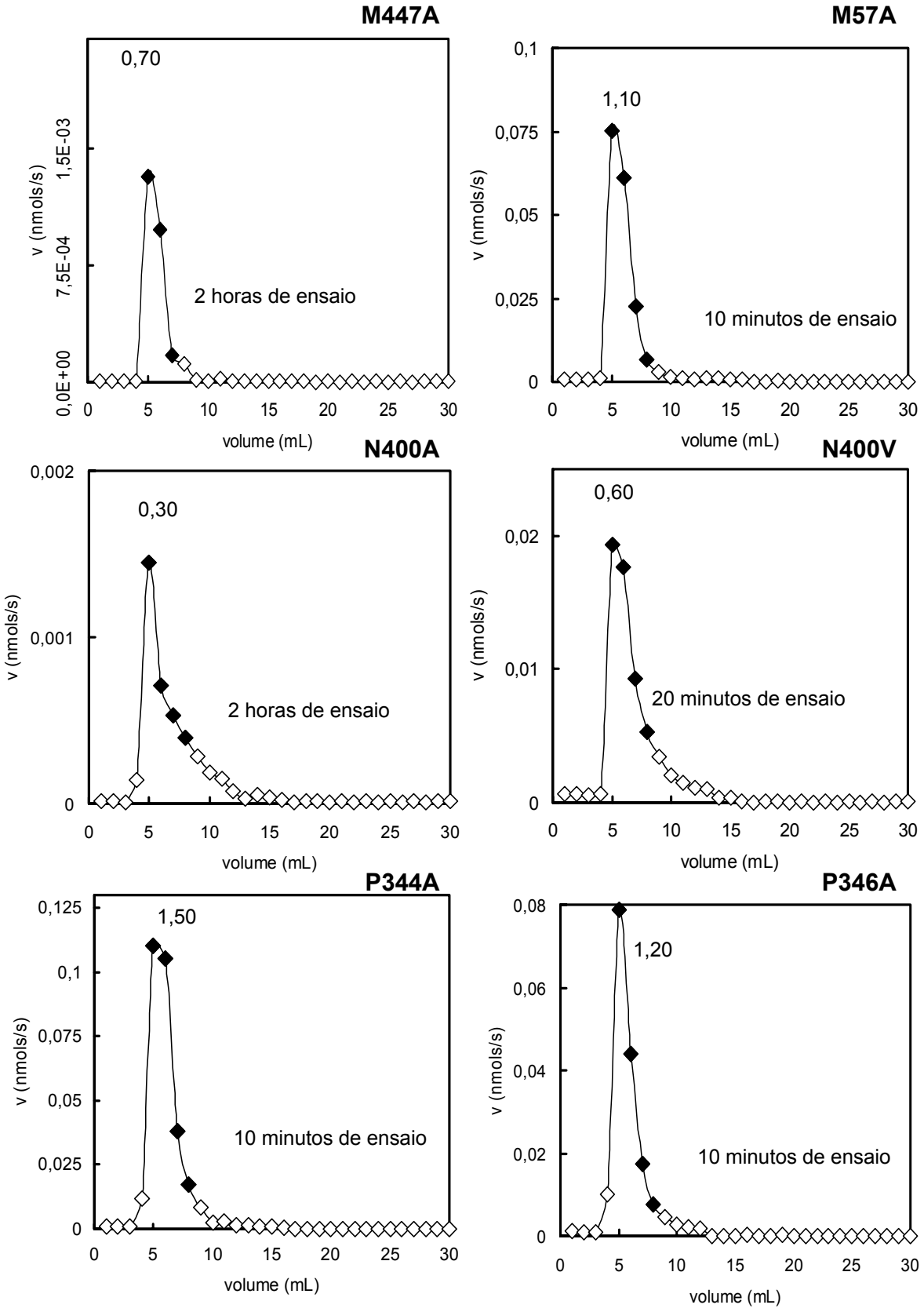

M447A
0,70
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
0,0E+00
7,5E-04
1,5E-03
volume (mL)
M57A
1,10
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
0,1
0,075
0,05
0,025
0
volume (mL)
N400A
0,30
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
0,002
0,001
0
volume (mL)
N400V
0,60
20 minutos de ensaio
v (nmols/s)
0,02
0,01
0
volume (mL)
P344A
1,50
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
0,125
0,1
0,075
0,05
0,025
0
volume (mL)
P346A
1,20
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
0,08
0,06
0,04
0,02
0
volume (mL)

FIGURA 5.10.4.

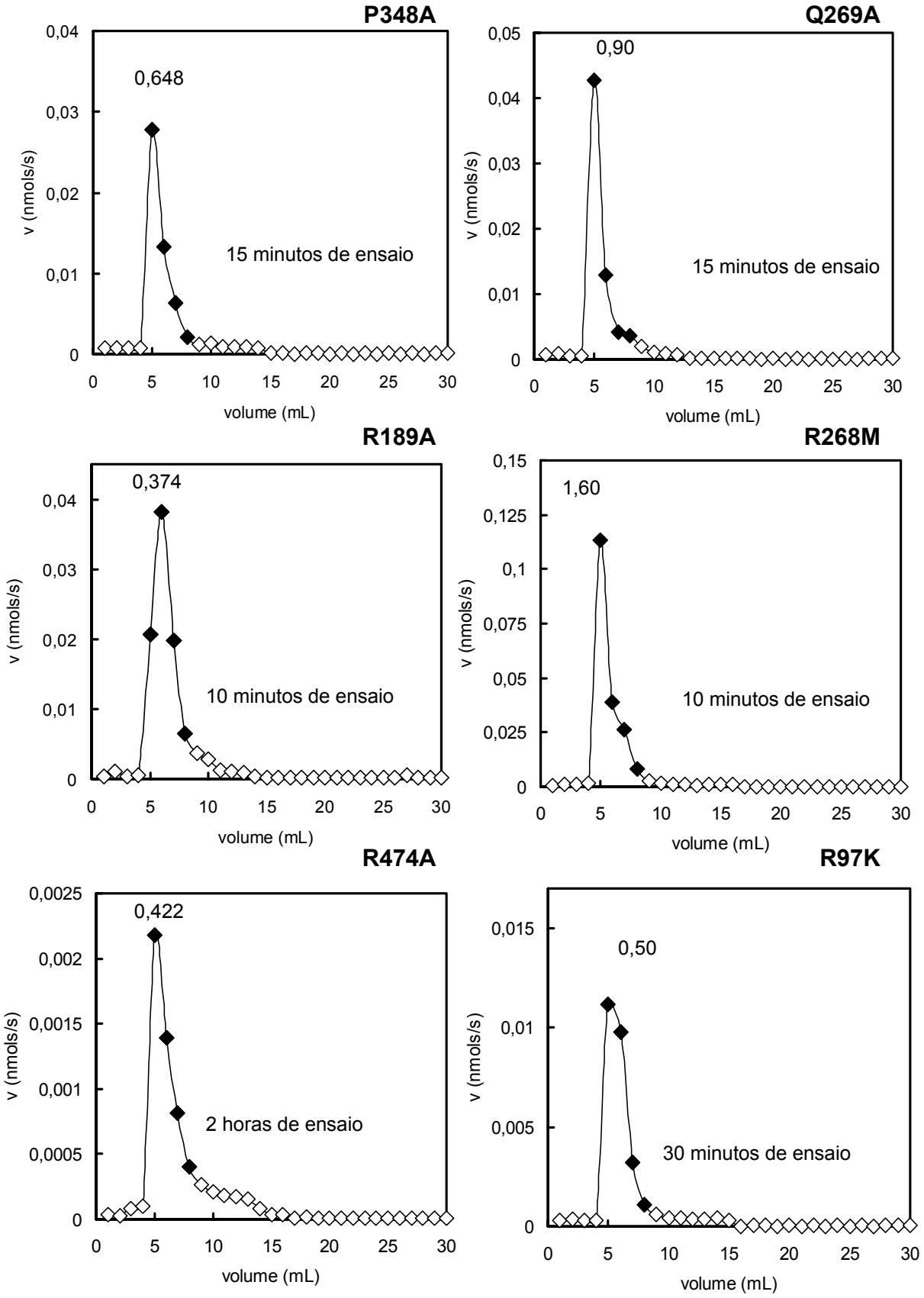

P348A
0,648
15 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
Q269A
0,90
15 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
R189A
0,374
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
R268M
1,60
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
R474A
0,422
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
R97K
0,50
30 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)

FIGURA 5.10.4.

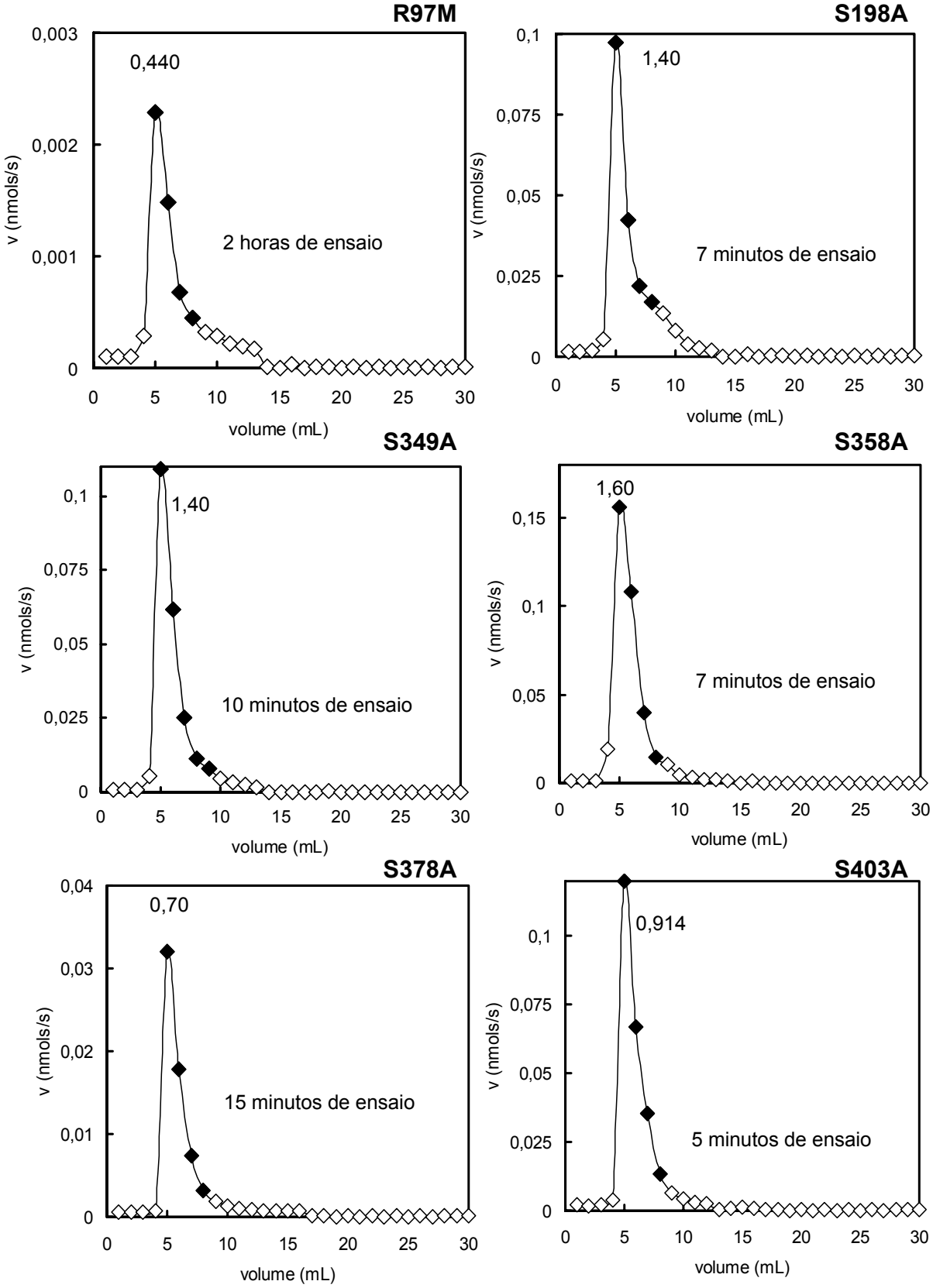
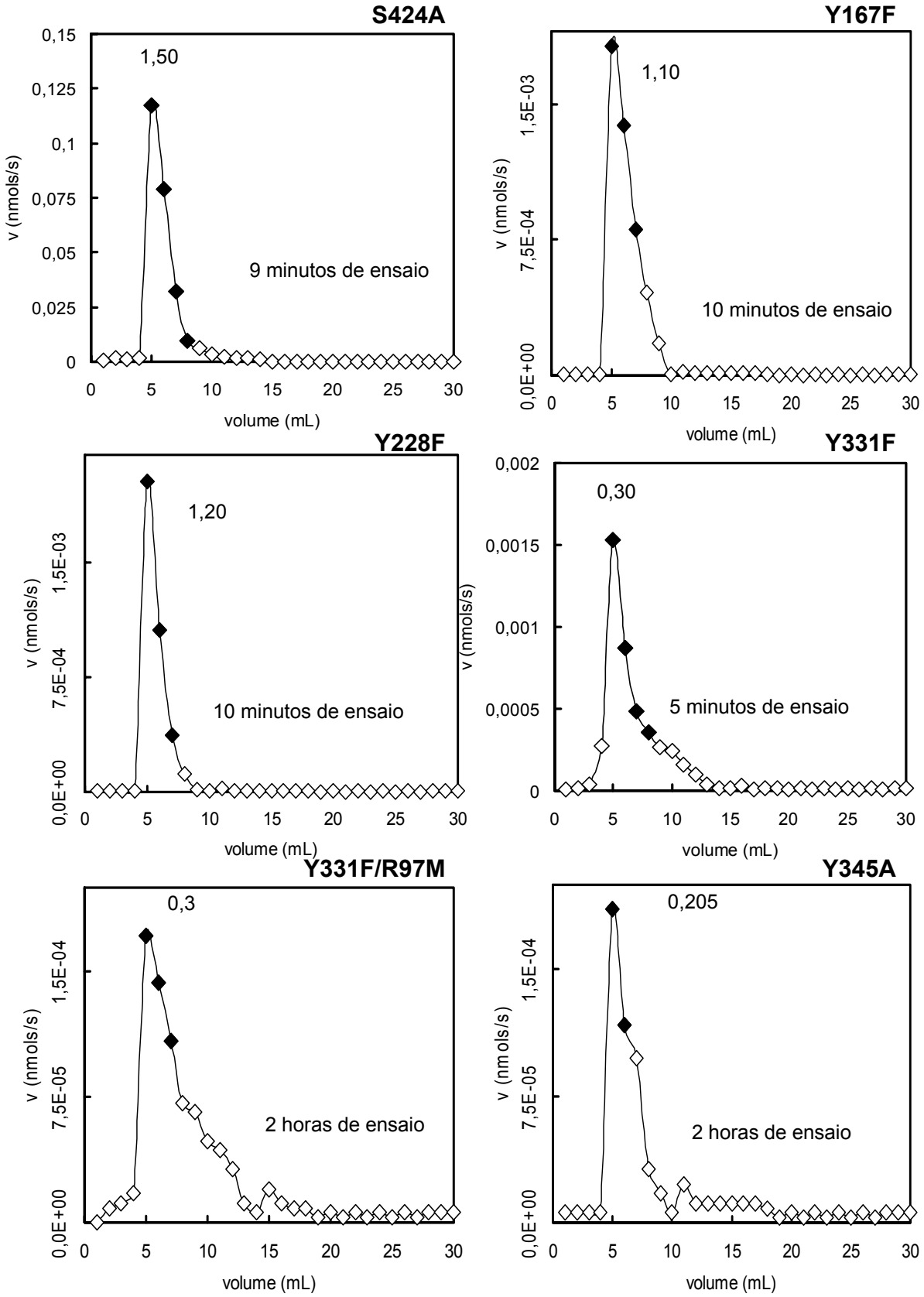

R97M
0,440
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
S198A
1,40
7 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
S349A
1,40
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
S358A
1,60
7 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
S378A
0,70
15 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
S403A
0,914
5 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)

FIGURA 5.10.4.


S424A
1,50
9 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
Y167F
1,10
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
Y228F
1,20
10 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
Y331F
0,30
5 minutos de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
Y331F/R97M
0,3
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)
Y345A
0,205
2 horas de ensaio
v (nmols/s)
volume (mL)

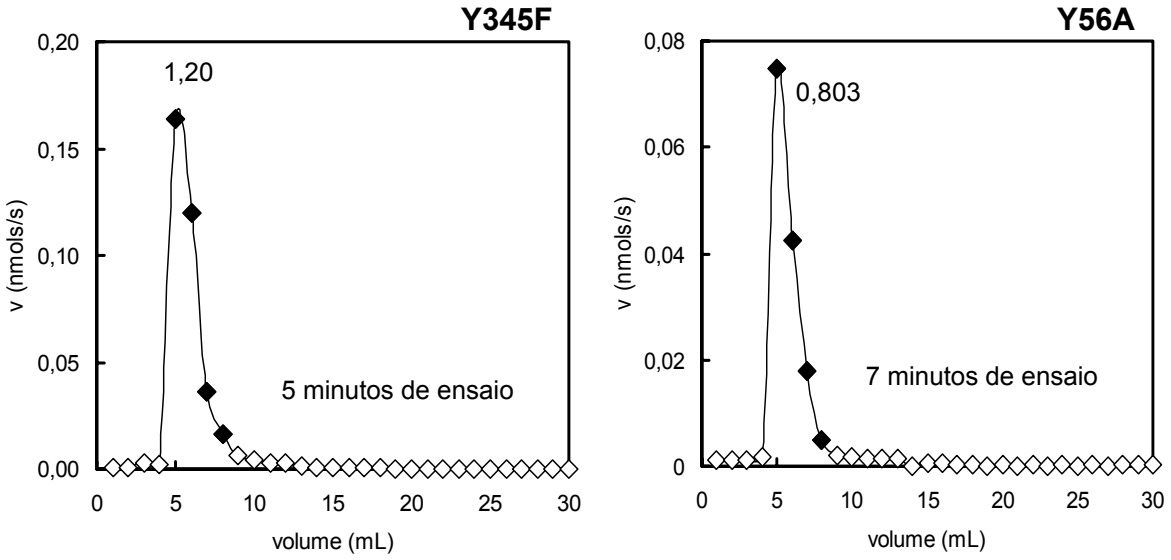


FIGURA 5.10.4. Purificação das Sfβgli50 mutantes em cromatografia de afinidade em coluna de calmodulina-agarose (Stratagene). Cada cromatografia foi realizada por meio de 3 etapas, no entanto somente a 3ª etapa está ilustrada aqui. Na 1ª etapa, foram feitas 4 aplicações de 50 μL de lisado sempre seguidas pela eluição de 1 volume de coluna do tampão CBB contendo Triton X-100 (0,1 μL/mL). Na 2ª etapa é fetia a eluição de 5 volumes de coluna do tampão CBB contendo Triton X-100 (1 μL/mL) e NaCl 1M. Na 3ª etapa é feita a eluição das proteínas ligadas a resina por meio da aplicação de 1 volume de coluna de tampão EB-1 ("elution buffer": tampão hepes 50 mM, EDTA 2 mM e NaCl 150 mM, pH 7,0). Em seguida é feita a aplicação de mais 9 volumes de coluna do tampão EB-2 (igual ao EB-1, exceto pela concentração de EDTA que passa a ser de 10 mM). As frações coletadas (1mL) foram utilizadas para a realização do ensaio de atividade β-glicosidásica (nmols/s) com fuco 2 mM em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 6,0. Os losangos em preto indicam as maiores atividades enzimáticas obtidas para a cromatografia daquela mutante. Acima do pico está o valor obtido de absorbância e ao lado está o tempo de ensaio a 30°C em horas. Para maiores detalhes ver item 4.17.. A apresentação segue a seguinte ordem: D362A, E458D, E458A, F460A, H330A, M442A, M447A, M57A, N400A, N400V, P344A, P346A, P348A, Q269A, R189A, R268M, R474A, R97K, R97M, S198A, S349A, S358A, S378A, S403A, S424A, Y167F, Y228F, Y331F, Y331F/R97M, Y345A, Y345F e Y56A.

TABELA 5.10.1. Continuação:

enzima	substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1},mM^{-1})	k_{cat}/K_m relativo
	Fuco	0,24 ± 0,01	0,00112 ± 0,00001	0,0047 ± 0,0003	100
N400A	Gluco	1,0 ± 0,06	0,00071 ± 0,00001	0,00071 ± 0,00005	15
	Gala	*	*	0,0000086 ± 2.10^{-7}	0,2
	Fuco	0,51 ± 0,03	0,0088 ± 0,0001	0,017 ± 0,001	100
N400V	Gluco	1,7 ± 0,1	0,0061 ± 0,0002	0,0036 ± 0,0003	21
	Gala	4,2 ± 0,2	0,000455 ± 0,000008	0,000107 ± 0,000005	0,6
	Fuco	0,44 ± 0,03	0,459 ± 0,005	1,04 ± 0,07	100
	Gluco	0,88 ± 0,05	0,227 ± 0,003	0,25 ± 0,01	25
P344A	Gala	3,8 ± 0,2	0,0199 ± 0,0003	0,0052 ± 0,0003	0,5
	Xilo	1,4 ± 0,1	0,00186 ± 0,00003	0,0013 ± 0,0001	0,12
	Fuco	0,8 ± 0,01	0,097 ± 0,003	0,11 ± 0,02	100
	Gluco	1,64 ± 0,07	0,0374 ± 0,0006	0,023 ± 0,001	20
P346A	Gala	5,6 ± 0,4	0,0036 ± 0,0001	0,00063 ± 0,00005	0,5
	Xilo	1,4 ± 0,1	0,000223 ± 0,000004	0,00015 ± 0,00001	0,13
	Fuco	2,7 ± 0,2	0,053 ± 0,01	0,019 ± 0,001	100
P348A	Gluco	1,3 ± 0,1	0,0066 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002	2,5
	Gala	2,9 ± 0,1	0,000162 ± 0,000003	0,000055 ± 0,000003	0,3
	Fuco	0,31 ± 0,02	0,0619 ± 0,0006	0,19 ± 0,01	100
Q269A	Gluco	0,35 ± 0,02	0,0268 ± 0,0003	0,074 ± 0,005	38
	Gala	2,4 ± 0,1	0,00203 ± 0,00004	0,00084 ± 0,00005	0,4
	Xilo	1,19 ± 0,07	0,000302 ± 0,000006	0,00025 ± 0,00002	0,1
	Fuco	2,63 ± 0,08	0,0098 ± 0,0001	0,0037 ± 0,0001	100
R189A	Gluco	4,0 ± 0,3	0,0044 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0001	29
	Gala	0,37 ± 0,04	0,000104 ± 0,000002	0,00028 ± 0,00003	7,5
	Fuco	0,24 ± 0,02	0,492 ± 0,006	1,9 ± 0,1	100
	Gluco	0,21 ± 0,01	0,0378 ± 0,0004	0,17 ± 0,1	8,9
R268M	Gala	1,51 ± 0,08	0,00489 ± 0,00007	0,0032 ± 0,0002	0,2
	Xilo	0,71 ± 0,04	0,000426 ± 0,000005	0,00059 ± 0,00003	0,02
	Fuco	1,5 ± 0,1	0,00374 ± 0,00007	0,0025 ± 0,0002	73
R474A	Gluco	0,25 ± 0,02	0,00085 ± 0,00001	0,0034 ± 0,0003	100
	Gala	*	*	0,0000084 ± 2.10^{-7}	0,2

Os parâmetros foram determinados utilizando-se no mínimo 10 diferentes concentrações de substratos e os ajustes na equação de Michaelis-Menten foram feitos através do software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

TABELA 5.10.1. Continuação:

enzima	substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1},mM^{-1})	k_{cat}/K_m relativo
	Fuco	0,82 ± 0,09	0,0296 ± 0,0009	0,035 ± 0,004	66
R97K	Gluco	0,30 ± 0,01	0,0166 ± 0,0001	0,054 ± 0,003	100
	Gala	1,9 ± 0,1	0,00073 ± 0,00002	0,00037 ± 0,00002	0,7
	Xilo	0,94 ± 0,07	0,000325 ± 0,000006	0,00034 ± 0,00002	0,6
	Fuco	0,26 ± 0,02	0,00544 ± 0,00006	0,021 ± 0,001	100
R97M	Gluco	0,90 ± 0,08	0,00324 ± 0,00007	0,0035 ± 0,0003	17
	Gala	2,91 ± 0,07	0,00342 ± 0,00002	0,00117 ± 0,00003	5,5
	Fuco	0,45 ± 0,02	0,278 0,002	0,61 0,03	100
	Gluco	0,54 ± 0,02	0,099 0,001	0,182 0,008	29
S198A	Gala	1,22 ± 0,04	0,0120 0,0001	0,0098 0,0004	1,6
	Xilo	1,2 ± 0,1	0,00144 0,00005	0,0012 0,0001	0,2
	Fuco	0,51 ± 0,2	0,455 ± 0,003	0,87 ± 0,03	100
	Gluco	1,08 ± 0,04	0,273 ± 0,003	0,252 ± 0,009	28
S349A	Gala	3,7 ± 0,1	0,0544 ± 0,0005	0,0144 ± 0,0004	1,6
	Xilo	2,15 ± 0,05	0,00452 ± 0,00004	0,00209 ± 0,00005	0,2
	Fuco	0,55 ± 0,03	0,326 ± 0,003	0,58 ± 0,03	100
	Gluco	1,14 ± 0,05	0,169 ± 0,002	0,148 ± 0,006	25
S358A	Gala	2,29 ± 0,09	0,0180 ± 0,0002	0,0078 ± 0,0003	1,3
	Xilo	1,5 ± 0,1	0,00168 ± 0,00004	0,00112 ± 0,00009	0,2
	Fuco	0,31 ± 0,01	0,258 ± 0,002	0,81 ± 0,04	100
S378A	Gluco	0,34 ± 0,03	0,092 ± 0,001	0,27 ± 0,02	33
	Gala	2,8 ± 0,2	0,0114 ± 0,0003	0,0041 ± 0,0003	0,5
	Xilo	0,79 ± 0,04	0,00082 ± 0,00001	0,00103 ± 0,00005	0,12
	Fuco	0,63 ± 0,2	0,00287 ± 0,00005	0,0045 ± 0,0001	6,6
	Gluco	0,82 ± 0,04	0,0563 ± 0,0008	0,068 ± 0,004	100
S403A	Gala	5,6 ± 0,4	0,0109 ± 0,0004	0,0019 ± 0,0001	2,8
	Xilo	2,3 ± 0,02	0,00113 ± 0,00004	0,00048 ± 0,00005	0,7
	Fuco	0,53 ± 0,03	0,269 ± 0,002	0,50 ± 0,02	100
	Gluco	1,08 ± 0,55	0,130 ± 0,002	0,120 ± 0,006	24
S424A	Gala	4,2 ± 0,1	0,0140 ± 0,0002	0,0033 ± 0,0001	0,7
	Xilo	1,8 ± 0,1	0,00086 ± 0,00002	0,00047 ± 0,00003	0,1

Os parâmetros foram determinados utilizando-se no mínimo 10 diferentes concentrações de substratos e os ajustes na equação de Michaelis-Menten foram feitos através do software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

TABELA 5.10.1. Continuação:

enzima	substrato	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1},mM^{-1})	k_{cat}/K_m relativo
	Fuco	0,48 ± 0,03	0,00176 ± 0,00002	0,0036 ± 0,0003	86
Y331F	Gluco	0,105 ± 0,008	0,000444 ± 0,000006	0,0042 ± 0,0003	100
	Gala	1,46 ± 0,08	0,000433 ± 0,000006	0,00029 ± 0,00002	7
Y331F/	Fuco	0,36 ± 0,03	0,000109 ± 0,000001	0,00030 ± 0,00002	27
R97M	Gluco	0,082 ± 0,004	0,0000905 ± 0,0000008	0,00111 ± 0,00006	100
	Fuco	0,52 ± 0,02	0,575 ± 0,004	1,09 ± 0,04	100
Y167F	Gluco	0,74 ± 0,04	0,213 ± 0,003	0,29 ± 0,02	26
	Gala	2,9 ± 0,1	0,0296 ± 0,0004	0,0102 ± 0,0005	0,9
	Xilo	1,97 ± 0,1	0,00284 ± 0,00006	0,00144 ± 0,00008	0,1
	Fuco	0,53 ± 0,02	0,564 ± 0,004	1,05 ± 0,04	100
Y228F	Gluco	0,87 ± 0,06	0,215 ± 0,004	0,25 ± 0,02	23
	Gala	3,1 ± 0,1	0,029 ± 0,004	0,0095 ± 0,0004	0,9
	Xilo	2,2 ± 0,1	0,0028 ± 0,0006	0,0013 ± 0,0007	0,1
Y345A	Fuco	0,79 ± 0,04	0,000661 ± 0,000008	0,00084 ± 0,00005	100
	Gluco	0,128 ± 0,007	0,000366 ± 0,000004	0,0028 ± 0,0002	30
	Fuco	0,46 ± 0,01	0,407 ± 0,003	0,88 ± 0,03	100
Y345F	Gluco	1,48 ± 0,09	0,225 ± 0,005	0,15 ± 0,01	17
	Gala	5,0 ± 0,3	0,0235 ± 0,0005	0,0046 ± 0,0004	0,5
	Xilo	1,9 ± 0,1	0,00127 ± 0,00003	0,00064 ± 0,00004	0,07
	Fuco	0,72 ± 0,03	0,359 ± 0,003	0,49 ± 0,02	100
Y56A	Gluco	0,83 ± 0,05	0,122 ± 0,002	0,147 ± 0,008	29
	Gala	2,8 ± 0,1	0,0109 ± 0,0001	0,0039 ± 0,0002	0,8
	Xilo	1,63 ± 0,08	0,00107 ± 0,00002	0,00066 ± 0,00003	0,13

Os parâmetros foram determinados utilizando-se no mínimo 10 diferentes concentrações de substratos e os ajustes na equação de Michaelis-Menten foram feitos através do software Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

(*) como o gráfico de v *versus* [S] apresentou-se linear, somente foi possível estimar k_{cat}/K_m a partir da inclinação da reta obtida.

5.11. Análise conformacional e de estabilidade térmica das Sfβgli50 mutantes.

Em paralelo a caracterização cinética das Sfβgli50 selvagem e mutantes procurou-se verificar a estabilidade destas enzimas nas condições de ensaio enzimático (item 4.20.), foi testada a estabilidade térmica acompanhada por meio da atividade enzimática (item 4.21.) e da fluorescência intrínseca de triptofanos (item 4.18.). Além disso, procurou-se fazer uma análise conformacional destas enzimas por meio de espectros de fluorescência intrínseca e do efeito supressor de acrilamida sobre esta fluorescência (4.18.).

5.11.1. Estabilidade nas condições de ensaio enzimático das Sfβgli50 mutantes.

Foram realizados ensaios de atividade enzimática (item 4.20.) com amostras dessas Sfβgli50 mutantes incubadas nas mesmas condições dos ensaios enzimáticos da caracterização cinética (mesmo tampão, pH, temperatura e maior tempo de incubação do ensaio). A seguir, as atividades enzimáticas foram comparadas com aquelas de amostras que não foram pré-incubadas (figura 5.11.1.1.). Nota-se que todas as amostras apresentaram as mesmas atividades enzimáticas antes e após o período de pré-incubação (tabela 5.11.1.1. e figura 5.11.1.1). Portanto, as Sfβgli50 selvagem e mutantes são estáveis nas condições utilizadas nos ensaios enzimáticos e, consequentemente, as quedas de atividade enzimática verificadas nas mutantes, através da caracterização cinética, não são resultantes de desnaturação destas enzimas ao longo do tempo de ensaio.

TABELA 5.11.1. Atividade enzimática das Sfβgli50 selvagem e mutantes antes e após pré-incubação nas condições de ensaio para a caracterização cinética:

mutantes	Atividade enzimática "tempo zero" (1) (nmols/min)	Atividade enzimática "tempo final" (2) (nmols/min)	Tempo de pré-incubação (3) (horas)
4C11 (T35A)	0,215 ± 0,003	0,218 ± 0,001	30
6G10 (P348L)	0,43 ± 0,01	0,457 ± 0,005	30
16G12 (A156V)	0,294 ± 0,004	0,29 ± 0,01	5
19C7 (R474H)	0,039 ± 0,001	0,040 ± 0,001	30
19H2 (S378G)	0,127 ± 0,002	0,128 ± 0,002	30
21H8 (Y56C)	0,678 ± 0,002	0,68 ± 0,01	5
23H2 (S424F)	0,0345 ± 0,0002	0,0346 ± 0,0004	30
24C12 (S358F)	0,65 ± 0,01	0,67 ± 0,01	6
30A8 (Y345C)	0,40 ± 0,01	0,405 ± 0,005	5
37A9 (R189G)	0,562 ± 0,004	0,59 ± 0,01	18
38C6 (F460L)	0,114 ± 0,003	0,115 ± 0,002	30
39B11 (P346S)	0,809 ± 0,003	0,80 ± 0,02	30
40G11 (N400D)	0,0253 ± 0,0003	0,0257 ± 0,0004	30
D362A	1,67 ± 0,05	1,70 ± 0,05	24
E458A	1,76 ± 0,04	1,81 ± 0,03	43
E458D	1,49 ± 0,01	1,46 ± 0,01	22
F460A	0,030 ± 0,003	0,031 ± 0,003	24
H330A	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	27
M57A	1,20 ± 0,01	1,20 ± 0,03	24
M442A	0,0073 ± 0,0001	0,0075 ± 0,0001	27
M447A	0,0080 ± 0,0001	0,0078 ± 0,0001	27
N400A	0,0095 ± 0,0001	0,0096 ± 0,0001	30
N400V	0,055 ± 0,001	0,054 ± 0,001	20
P344A	2,11 ± 0,01	2,04 ± 0,04	20

(1) ensaio enzimático com as amostras não incubadas nas mesmas condições dos ensaios enzimáticos da caracterização cinética;
(2) ensaio enzimático com as amostras que foram incubadas nas mesmas condições dos ensaios enzimáticos da caracterização cinética. Utilizou-se como tempo de incubação ("tempo final") o maior tempo utilizado nesta caracterização;
(3) tempo utilizado na caracterização cinética para cada Sfβgli50 mutante que foi utilizado como tempo de incubação das amostras para testar a estabilidade nas condições de ensaio.

TABELA 5.11.1.1. Continuação.

mutantes	Atividade enzimática "tempo zero" (1) (nmols/min)	Atividade enzimática "tempo final" (2) (nmols/min)	Tempo de pré-incubação (3) (horas)
P346A	0,60 ± 0,01	0,60 ± 0,01	22
P348A	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	22
Q269A	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,01	27
R97K	0,116 ± 0,002	0,118 ± 0,003	27
R97M	0,027 ± 0,005	0,027 ± 0,004	20
R189A	0,098 ± 0,002	0,103 ± 0,002	24
R268M	3,02 ± 0,06	2,97 ± 0,06	24
R474A	0,012 ± 0,005	0,015 ± 0,005	22
S198A	1,280 ± 0,002	1,29 ± 0,03	24
S349A	1,79 ± 0,04	1,77 ± 0,04	30
S358A	2,27 ± 0,03	2,4 ± 0,1	24
S378A	0,45 ± 0,01	0,456 ± 0,005	30
S403A	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	24
S424A	0,78 ± 0,01	0,77 ± 0,02	24
Y167F	1,69 ± 0,01	1,68 ± 0,01	20
Y228F	0,40 ± 0,02	0,39 ± 0,02	24
Y331F	0,0182 ± 0,0003	0,0179 ± 0,0005	24
Y331F/R97M	0,0027 ± 0,0000	0,0032 ± 0,0001	30
Y345A	0,0125 ± 0,0002	0,0127 ± 0,0003	24
Y345F	2,53 ± 0,08	2,6 ± 0,1	22
Y56A	1,63 ± 0,02	1,67 ± 0,03	24
Selvagem	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,02	5

(1) ensaio enzimático com as amostras não incubadas nas mesmas condições dos ensaios enzimáticos da caracterização cinética;
(2) ensaio enzimático com as amostras que foram incubadas nas mesmas condições dos ensaios enzimáticos da caracterização cinética. Utilizou-se como tempo de incubação ("tempo final") o maior tempo utilizado nesta caracterização;
(3) tempo utilizado na caracterização cinética para cada Sfβgli50 mutante que foi utilizado como tempo de incubação das amostras para testar a estabilidade nas condições de ensaio.

5.11.2. Determinação da estabilidade térmica a 50°C por meio de atividade enzimática.

Tendo sido verificada a estabilidade das Sfβgli50 selvagem e mutantes nas condições de ensaio enzimático, procurou-se verificar se as alterações na eficiência catalítica das Sfβgli50 mutantes não resultava de uma desestruturação global destas enzimas. Para tal, optou-se inicialmente por avaliar a estabilidade térmica destas mutantes por meio da determinação de atividade enzimática remanescente após períodos de pré-incubação a 50°C. Assim, como descrito no item 4.21., amostras das enzimas foram incubadas a 50°C e alíquotas foram retiradas em tempos determinados e utilizadas para a realização de ensaios de atividade enzimática com estas alíquotas. Em seguida foram construídos gráficos do porcentual de atividade remanescente *versus* o tempo de pré-incubação. As inclinações de tais gráficos refletem a estabilidade térmica a 50°C para as Sfβgli50 mutantes e selvagem (figura 5.11.2.1), pois esta inclinação é proporcional à constante de velocidade para o processo de desnaturação térmica. Assim, a análise destas inclinações revela que não há diferenças significativas na estabilidade térmica destas enzimas a 50°C (tabela 5.11.2.1.), sugerindo que as Sfβgli50 mutantes não apresentam alterações significativas na sua estrutura global e não se encontram desenoveladas. Deve ser ressaltado que estes testes não foram realizados para todas as Sfβgli50 mutantes, pois os tempos de ensaios necessários para as enzimas cuja eficiência catalítica é muito pequena tornar-se-iam inviáveis.

TABELA 5.11.2.1. Constantes de velocidade observadas para o processo de inativação térmica (50°C) da Sfβgli50 selvagem e mutantes determinadas através de ensaios enzimáticos:

Mutantes	k_{obs}	Mutantes	k_{obs}
SELVAGEM	0,031 ± 0,001	S198A	0,032 ± 0,001
4C11 (T35A)	0,031 ± 0,001	S349A	0,032 ± 0,001
6G10 (P348L)	0,032 ± 0,001	S358A	0,0303 ± 0,0005
16G12 (A156V)	0,032 ± 0,001	S378A	0,031 ± 0,001
21H8 (Y56C)	0,003 ± 0,001	S424A	0,032 ± 0,001
24C12 (S358F)	0,032 ± 0,001	Y167F	0,0303 ± 0,0007
30A8 (Y345C)	0,0314 ± 0,0004	Y228F	0,0311 ± 0,0007
37A9 (R189G)	0,032 ± 0,001	Y345F	0,032 ± 0,001
38C6 (F460L)	0,032 ± 0,0001	Y56A	0,0316 ± 0,0006
39B11 (P346S)	0,0310 ± 0,0003		
D362A	0,032 ± 0,001		
E458A	0,033 ± 0,001		
E458D	0,035 ± 0,001		
M442A	0,0309 ± 0,0012		
M447A	0,0304 ± 0,0009		
M57A	0,0323 ± 0,0006		
N400V	0,031 ± 0,001		
P344A	0,033 ± 0,001		
P346A	0,032 ± 0,0001		
P348A	0,003 ± 0,001		
Q269A	0,0311 ± 0,0005		
R189A	0,0325 ± 0,0006		
R268M	0,0313 ± 0,0005		
R97K	0,0317 ± 0,0004		

5.11.3. Espectros de fluorescência intrínseca das Sfβgli50 mutantes.

Além da caracterização do perfil de estabilidade térmica por meio da atividade enzimática, tendo em vista uma análise conformacional das Sfβgli50 mutantes em relação a selvagem, foram determinados os espectros de fluorescência intrínseca destas enzimas (item 4.18.). A análise destes espectros revela, primeiramente, que todas as Sfβgli50 mutantes estão enoveladas (figura 5.11.3.1.), pois todas apresentam um espectro de fluorescência intrínseca (perfil em azul) drasticamente distinto do obtido quando estas enzimas são submetidas a condições desnaturantes (perfil em verde), além de possuírem máximos de emissão na mesma região da selvagem (figura 5.11.3.1.).

No entanto, algumas Sfβgli50 mutantes apresentaram espectros de fluorescência intrínseca com uma pequena alteração em comparação à selvagem. A análise visual do perfil dos espectros permite verificar que tal alteração ocorre somente nas mutantes 21H8 (Y56C), 16G12 (A156V), 4C11 (T35A), 19H2 (S378G), 6G10 (P348L), N400V, Q269A, R268M, R189A, R97K e S424A.

Considerando que o perfil geral de um espectro de fluorescência intrínseca para uma proteína é resultante das emissões individuais de resíduos de triptofanos mais “escondidos” do solvente (classe A, emissão na faixa de 305 a 320 nm), “medianamente expostos” (classes S, I e II, emissão na faixa de 320,2 a 350 nm) e “mais expostos” (classe III, emissão na faixa de 350 a 400 nm) iniciou-se uma análise comparativa dos espectros determinando a contribuição porcentual de cada classe na área total do espectro. Esta divisão

em classes foi proposta por Shen *et al*., 2008, para decomposição de espectros de fluorescência intrínseca de proteínas. No entanto, a abordagem aqui empregada não tem o objetivo de indicar o número de triptofanos em cada classe, mas tem o propósito de permitir uma comparação dos espectros que vá além da sua simples visualização. Assim, calculou-se para cada espectro as três áreas correspondentes às emissões nas faixas de comprimentos de onda (λ) de 305 a 320, 320,2 a 350 e 350,2 a 400 nm (tabela 5.11.3.1.). De tal forma que alterações porcentuais nas áreas de um espectro em conjunto com o comprimento de onda de máxima emissão (pico do espectro) fornecem um parâmetro de alterações conformacionais da enzima.

A análise dos espectros com base na área porcentual permite verificar um número maior de mutantes com pequenas alterações em relação a Sfβgli50 selvagem. Considerando uma variação de área acima de 1% como significativa, pois a partir deste limiar observa-se as linhas dos espectros se separando (por exemplo, o espectro da mutante N400V, 37A9 (R189G) ou E458D), as mutantes 4C11 (T35A), 19H2 (S378G), 6G10 (P348L), 16G12 (A156V), 21H8 (Y56C), P344A, Q269A, R189A, R268M e S424A apresentaram tendência de aumento no porcentual da área do espectro correspondente à emissão dos triptofanos “mais expostos” (faixa 350,2 a 400nm), sem que ocorra queda da área correspondente à emissão dos triptofanos “mais escondidos” (faixa de 305 à 320 nm), exceto no caso das mutantes 21H8 (Y56A) e S424A. As mutantes 37A9 (R189G), E458D, N400V, R97K, S349A, S378A, Y331F e Y331F/R97M apresentaram uma tendência de aumento no porcentual da área do espectro correspondente à emissão dos triptofanos “mais escondidos”. Em relação ao comprimento de onda (λ) de máxima emissão, pico do espectro, as

alterações estão dentro de uma faixa de -2 a +3 nm em relação ao da selvagem (λ máximo de 337,2), sendo que os maiores deslocamentos do pico foram verificados para as mutantes 21H8 (Y56C), 6G10 (P348L) e 4C11 (T35A) (+ 4,6, +6 e +6 nm, respectivamente).

Considerando que estas alterações nos formatos dos espectros de emissão correspondem a modificações no ambiente onde os resíduos de triptofano se encontram, pode-se assumir que embora todas as Sfβgli50 mutantes encontrem-se enoveladas, há indícios que pelo menos 17 delas possuam alterações estruturais em relação à forma da selvagem. Não pode ser excluído que alterações em menor grau e que não podem ser detectadas pelo procedimento empregado não tenham ocorrido nas demais mutantes. Finalmente, deve ser destacado que não há como correlacionar diretamente a tendência de modificação do porcentual da área de uma faixa do espectro de fluorescência intrínseca com o grau de alteração conformacional, nem o tipo de alteração ou onde ocorreu, pois o espectro representa, como já comentado, a soma das emissões de todos os triptofanos da proteína.

TABELA 5.11.3.1. Distribuição porcentual das áreas do espectro de fluorescência intrínseca e comprimento de onda do pico de emissão máxima (λ máximo) da Sfβgli50 selvagem e mutantes segundo faixas de emissão:

	Faixas de emissão (nm)			**λ máximo**
mutantes	**305/320** (1)	**320,2/350** (2)	**350,2/400** (3)	**(nm)**
Selvagem	10,8	46,6	42,6	337,2
4C11(T35A)	10,9	44,2	44,9	343,2
6G10 (P348L)	11,1	44,7	44,2	343,2
16G12 (A156V)	10,5	44,4	45,1	341,8
19C7 (R474H)	11,4	45,8	42,8	340,6
19H2 (S378G)	10,7	44,3	45,0	341,0
21H8 (Y56C)	9,7	42,1	48,2	341,8
23H2 (S424F)	11,6	45,9	42,5	340,8
24C12 (S358F)	11,1	46,2	42,7	338,2
30A8 (Y345C)	11,3	46,3	42,4	337,6
37A9 (R189G)	12,4	47,2	40,4	335,4
38C6 (F460L)	11,4	46,6	42,0	335,4
39B11 (P346S)	11,6	45,8	42,7	336,2
40G11 (N400D)	11,8	46,0	42,1	335,6
D362A	11,2	45,5	43,2	336,8
E458A	11,1	46,2	42,7	338,2
E458D	12,3	45,9	41,8	339,0
F460A	11,6	46,4	42,0	337,4
H330A	11,1	46,5	42,4	340,6
M442A	11,4	46,6	42,0	340,6
M447A	11,3	46,5	42,3	339,0
M57A	11,3	46,5	42,3	339,0
N400A	11,7	46,6	41,6	340,0
N400V	12,5	46,1	41,4	338,8

(1) faixa de λ que corresponde a emissões de triptofanos “mais escondidos”;
(2) faixa de λ que corresponde a emissões de triptofanos “medianamente expostos”;
(3) faixa de λ que corresponde a emissões de triptofanos “mais expostos”.
Divisão do espectro de fluorescência intrínseca baseada em Shen *et al*., 2008.

TABELA 5.12.3.1. Continuação.

	Faixas de emissão (nm)			λ máximo
mutantes	**305/320** (1)	**320,2/350** (2)	**350,2/400** (3)	**(nm)**
P344A	10,6	45,7	43,7	340,6
P346A	11,5	16,4	42,1	336,0
P348A	11,4	46,5	42,1	335,4
Q269A	11,6	44,7	43,7	341,0
R189A	11,5	44,9	43,6	336,0
R268M	11,7	44,6	43,7	338,4
R474A	11,2	46,4	42,3	335,4
R97K	13,5	46,2	40,3	335,4
R97M	11,7	46,5	41,8	338,0
S198A	11,4	46,0	42,5	338,2
S349A	12,5	46,7	40,8	338,0
S358A	11,3	46,4	42,3	340,6
S378A	12,0	46,1	41,9	340,6
S403A	11,3	45,9	42,9	335,4
S424A	9,7	43,2	47,1	340,4
Y167F	11,4	46,5	42,1	335,4
Y228F	11,2	46,3	42,5	337,6
Y331F	12,1	46,4	41,6	339,8
Y345A	11,4	46,3	42,3	338,4
Y345F	11,6	46,3	42,1	339,0
Y56A	11,5	46,2	42,3	337,4
Y331F/R97M	12,1	46,6	41,3	338,8

(1) faixa de λ que corresponde a emissões de triptofanos “mais escondidos”;
(2) faixa de λ que corresponde a emissões de triptofanos “medianamente expostos”;
(3) faixa de λ que corresponde a emissões de triptofanos “mais expostos”.

Divisão do espectro de fluorescência intrínseca baseada em Shen *et al.*, 2008.

5.11.4. Determinação da estabilidade térmica das Sfβgli50 mutantes através do espectro de fluorescência intrínseca.

Considerando que os espectros de fluorescência intrínseca indicam que as Sfβgli50 mutantes encontram-se enoveladas, mas possuem alterações estruturais em relação a selvagem, optou-se por acompanhar o efeito da temperatura sobre a estrutura destas enzimas através da fluorescência intrínseca. A ampla distribuição dos resíduos de triptofanos na Sfβgli50 e a sensibilidade da fluorescência destes resíduos ao ambiente físico-químico, torna a fluorescência um bom parâmetro para acompanhar a desnaturação térmica da Sfβgli50. Este parâmetro é provavelmente superior aos experimentos de inativação térmica acompanhados pela atividade enzimática, pois pode indicar pequenas alterações em porções localizadas da enzima que não atingem o sítio ativo e, assim, não afetariam a atividade enzimática. Além disso, por não depender da atividade enzimática este experimento pode ser executado mesmo para as Sfβgli50 mutantes que possuam baixa eficiência catalítica. Levando isto em conta fez-se esta série de ensaios nos quais se determinou os espectros de fluorescência intrínseca para as amostras de Sfβgli50 mutantes incubadas por diferentes períodos a 50°C (item 4.18.) (figura 5.11.4.1.). A inclinação obtida no gráfico de fluorescência remanescente (Log (F/F0)) *versus* tempo de incubação é proporcional à constante de velocidade do processo de alteração estrutural da enzima. Assim, torna-se possível comparar a alteração da conformação destas Sfβgli50 mutantes em relação a selvagem (tabela 5.11.4.1.).

A análise dos dados (tabela 5.12.4.1.) permite verificar que apenas no caso da mutante 39B11 (P346S) o perfil de inativação térmica apresentou um

valor de inclinação semelhante a Sfβgli50 selvagem (selvagem: -0,0064 ± 0,00004; mutante 39B11 (P346S): -0,0063 ± 0,0003). Para as mutantes 19C7 (R474H), 6G10 (P348L), P344A, 30A8 (Y345C), Y345F, 37A9 (R189G), R189A, Y228F, S403A, R474A, H330A, 4C11 (T35A), 40G11 (N400D), 23H2 (S424F) os gráficos tiveram um pequeno aumento de sua inclinação (valores em torno de -0,0041 a -0,0052). Todas as demais mutantes tiveram aumentos mais marcantes (valores na faixa de -0,0037 a -0,00134). Portanto, a principio estes resultados sugerem que para todas as Sfβgli50 mutantes, com exceção da 39B11 (P346S), a velocidade do processo de alteração conformacional na temperatura de 50°C é mais lenta. Este fato sugere que estas Sfβgli50 mutantes são conformacionalmente distintas da forma selvagem, resultado que concorda com a observação anterior de que um conjunto de Sfβgli50 mutantes apresenta espectros de fluorescência intrínseca que não se sobrepõem com a forma selvagem.

Há trabalhos que apontam para mutantes de β-glicosidases da família 1 nos quais estas enzimas também apresentaram-se mais estáveis frente a temperatura do que suas respectivas formas selvagens. Withers *et al*., 1992, ao acompanhar as mudanças conformacionais de 3 enzimas mutantes da β-glicosidase de *Agrobacterium,* quando incubadas por diversos tempos também a 50°C, comenta que duas delas são um pouco mais estáveis. O mesmo autor em outro trabalho, Withers *et al*., 1995, realizando o mesmo experimento com uma mutante simples e uma com dupla mutação da β-glicosidase de *Agrobacterium* ressalta que estas duas enzimas apresentaram-se mais estáveis do que a selvagem. No entanto, em nenhum destes trabalhos este fato é discutido a fundo.

TABELA 5.11.4.1. Constantes de velocidade (k_{obs}) observadas para o processo de alteração da conformação da Sfβgli50 selvagem e mutantes a 50°C:

Mutantes	k_{obs}	Mutantes	k_{obs}
4C11 (T35A)	0,0045 ± 0,0001	P344A	0,0042 ± 0,0001
6G10 (P348L)	0,0043 ± 0,0001	P346A	0,0018 ± 0,0001
16G12 (A156V)	0,00297 ± 0,00003	P348A	0,0035 ± 0,0001
19C7 (R474H)	0,0046 ± 0,0001	Q269A	0,0032 ± 0,0001
19H2 (S378G)	0,0028 ± 0,0001	R189A	0,0043 ± 0,0001
21H8 (Y56C)	0,0043 ± 0,0001	R268M	0,00255 ± 0,00005
23H2 (S424F)	0,0048 ± 0,0001	R474A	0,00517 ± 0,00004
24C12 (S358F)	0,00208 ± 0,00004	R97K	0,00195 ± 0,00003
30A8 (Y345C)	0,0052 ± 0,0004	R97M	0,0029 ± 0,0004
37A9 (R189G)	0,0049 ± 0,0001	S198A	0,0028 ± 0,0001
38C6 (F460L)	0,0036 ± 0,0001	S349A	0,0022 ± 0,0002
39B11 (P346S)	0,0063 ± 0,0003	S358A	0,00273 ± 0,00003
40G11 (N400D)	0,0041 ± 0,0001	S378A	0,00217 ± 0,00002
D362A	0,00248 ± 0,00002	S403A	0,0041 ± 0,0001
E458A	0,0032 ± 0,0001	S424A	0,00310 ± 0,00004
E458D	0,00202 ± 0,00004	Y167F	0,0036 ± 0,0001
F460A	0,00313 ± 0,00003	Y228F	0,0044 ± 0,0001
H330A	0,0041 ± 0,0001	Y331F	0,00172 ± 0,00003
M442A	0,0036 ± 0,0001	Y331F/R97M	0,00134 ± 0,00002
M447A	0,0035 ± 0,0001	Y345A	0,0037 ± 0,0001
M57A	0,0027 ± 0,0002	Y345F	0,0042 ± 0,0001
N400A	0,00158 ± 0,00005	Y56A	0,00256 ± 0,00002
N400V	0,00105 ± 0,00001	Selvagem	0,0064 ± 0,00004

5.11.5. Apagamento de fluorescência intrínseca das Sfβgli50 mutantes.

Para averiguar a hipótese levantada no item anterior de que as Sfβgli50 mutantes analisadas apresentam-se conformacionalmente distintas da forma selvagem foram realizados ensaios de supressão ou apagamento de fluorescência intrínseca por meio da adição de acrilamida (item 4.18.). Estes ensaios foram feitos, assim como os ensaios do item anterior, nas mesmas condições dos ensaios feitos para a caracterização cinética destas enzimas (figura 5.11.5.1). Observa-se que a redução da fluorescência expressa por F0/F é diretamente proporcional à concentração do supressor acrilamida, sugerindo que o fenômeno de apagamento resulta de "encontros" entre os triptofanos excitados e a acrilamida. Neste caso, a probabilidade destes encontros pode ser expressa pela constante de Sterner-Volmer (K_{sv}) calculada a partir da inclinação dos gráficos acima referidos (tabela 5.12.5.1.).

Como pode ser verificado todas as Sfβgli50 mutantes apresentaram aumentos no K_{sv} (tabela 5.11.5.1.). Este valor passou de 1,7 na selvagem para algo em torno de 2,9 a 3,6. Sendo que as mutantes 39B11 (P346S), N400A e S378A foram as que apresentaram maiores valores, 5,4, 4,1 e 4,0, respectivamente.

Aumentos ou quedas nos valores de K_{sv} (tabela 5.11.5.1.) indicam alterações na exposição dos resíduos de triptofanos da proteína, respectivamente, maior e menor "exposição destes ao agente apagador", acrilamida. Assim, o aumento dos K_{sv} para a Sfβgli50 mutantes refletem mudanças conformacionais destas enzimas. Deve-se também ressaltar que não há como inferir onde ou como tais alterações ocorreram, pois todas levaram a uma maior exposição de um ou mais triptofanos da Sfβgli50. Embora

os experimentos de estabilidade térmica acompanhados por fluorescência intrínseca e os experimentos de supressão de fluorescência levem a mesma conclusão, as Sfβgli50 mutantes apresentam alterações conformacionais em comparação com a forma selvagem, não é possível estabelecer uma correlação entre os K_{sv} com as constantes de velocidade observadas para o processo de alterações conformacionais (tabela 5.11.4.1). Também não é possível correlacionar estes dois dados com a estabilidade térmica determinada via ensaios enzimáticos, pois enzimas que se mostram estáveis termicamente em termos de atividade enzimática apresentam alteração conformacional, de acordo com os dados de apagamento de fluorescência intrínseca e da estabilidade térmica através da fluorescência intrínseca.

Em conclusão, os experimentos de inativação térmica determinada por atividade enzimática e os espectros de fluorescência intrínseca sugerem que as Sfβgli50 mutantes encontram-se enoveladas, provavelmente apresentando o mesmo tipo de estrutura terciária global que a Sfβgli50 selvagem. Contudo, a análise da contribuição porcentual de classes de triptofanos para o formato final do espectro de fluorescência indica que a estrutura de algumas Sfβgli50 mutantes não é idêntica a da selvagem, ou seja, as mutações podem ter causado “alterações conformacionais” que modificam o grau de exposição dos triptofanos. A ocorrência destas “alterações localizadas” é confirmada pelos experimentos de supressão de fluorescência com acrilamida. Além disso, as “conformações” da forma selvagem e mutantes parece ser mantida por conjuntos ao menos parcialmente distintos de interações não-covalentes, pois respondem de forma diferente ao aumento de temperatura conforme revelado nos experimentos de determinação de estabilidade térmica por meio de fluorescência intrínseca.

TABELA 5.11.5.1. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para o apagamento por acrilamida da fluorescência intrínseca da Sfβgli50 selvagem e mutantes:

Mutantes	K_{sv}	Mutantes	K_{sv}
4C11(T35A)	2,73 ± 0,04	P344A	3,38 ± 0,03
6G10 (P348L)	3,3 ± 0,1	P346A	3,0 ± 0,1
16G12 (A156V)	3,4 ± 0,1	P348A	3,6 ± 0,1
19C7(R474H)	2,9 ± 0,1	Q269A	3,3 ± 0,1
19H2 (S378G)	3,2 ± 0,1	R189A	2,7 ± 0,1
21H8 (Y56C)	2,95 ± 0,03	R268M	3,57 ± 0,04
23H2 (S424F)	3,61 ± 0,03	R474A	2,7 ± 0,1
24C12 (S358F)	3,0 ± 0,1	R97K	3,05 ± 0,05
30A8 (Y345C)	2,9 ± 0,1	R97M	2,5 ± 0,1
37A9 (R189G)	2,93 ± 0,04	S198A	3,3 ± 0,1
38C6 (F460L)	3,06 ± 0,03	S349A	3,4 ± 0,1
39B11 (P346S)	5,4 ± 0,1	S358A	2,98 ± 0,03
40G11 (N400D)	3,6 ± 0,1	S378A	4,05 ± 0,02
D362A	2,85 ± 0,02	S403A	3,3 ± 0,1
E458A	2,96 ± 0,04	S424A	2,8 ± 0,1
E458D	2,67 ± 0,05	Y167F	3,2 ± 0,1
F460A	3,2 ± 0,1	Y228F	3,2 ± 0,1
H330A	3,02 ± 0,04	Y331F	3,3 ± 0,1
M442A	3,54 ± 0,04	Y331F/R97M	2,43 ± 0,04
M447A	2,41 ± 0,04	Y345A	3,0 ± 0,1
M57A	2,76 ± 0,03	Y345F	3,0 ± 0,1
N400A	4,1 ± 0,1	Y56A	3,3 ± 0,1
N400V	3,3 ± 0,1	Selvagem	1,72 ± 0,03

5.12. Qualquer mutação na Sfβgli50 causa alterações nos parâmetros cinéticos?

A análise das tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1. mostra que as mutações sobre a Sfβgli50 causaram uma grande variedade de alterações dos parâmetros cinéticos e consequentemente da especificidade pelo substrato o que pode trazer à tona o questionamento se toda e qualquer mutação na Sfβgli50 causa uma alteração nestes parâmetros. A resposta está na análise dos resultados das mutações Y167F, Y228F, P344A e S349A. Ressaltando que as duas primeiras mutantes foram criadas com o objetivo de responder a esta questão, enquanto que as mutações P344A e S349A foram construídas por serem resíduos que estão ao lado das mutações da alça "rica em prolinas" selecionadas na "varredura" (figura 5.9.1.1. e 5.9.1.2.; tabela 5.9.1.).

Destes resíduos somente o Y167 tende a ser conservado em β-glicosidases de Eukaria (figura 5.15.1.). Além disto, nenhuma das duas Y mutadas faz ligações de hidrogênio com outros resíduos por meio da hidroxila da sua cadeia lateral. Contudo, estas Y parecem ser importantes para "ocupar volume" na estrutura da Sfβgli50, pois as cadeias laterais destes resíduos estão voltadas para a face interna de alças preenchendo completamente esta região.

Os resultados da caracterização cinética (figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revelam que estas quatro mutações não causaram efeitos sobre os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m em relação à Sfβgli50 selvagem.

Logo, não é qualquer mutação em qualquer resíduo que causa alguma alteração nas propriedades catalíticas da Sfβgli50. Consequentemente, as mutações selecionadas na “varredura” e aquelas construídas com base nestas primeiras podem revelar informações sobre como os resíduos externos ao sítio ativo podem afetar a especificidade pelo substrato na Sfβgli50.

Além disto, os dados de fluorescência intrínseca revelam que estas Sfβgli50 mutantes também se apresentaram enoveladas. Porém, os dados de estabilidade térmica a 50°C determinados através da fluorescência intrínseca e do apagamento da fluorescência intrínseca sugerem que estas Sfβgli50 mutantes devem apresentar alterações conformacionais em relação a selvagem (tabela 5.11.4.1. e 5.11.5.1.). Ressaltando que não há como inferir onde tais alterações conformacionais na estrutura da Sfβgli50 tenham ocorrido. Também não há como ser feita uma correlação entre tais alterações com a presença ou a ausência de Sfβgli50 mutantes afetadas cineticamente. Porém, pode-se propor que a existência de alterações conformacionais não implica obrigatoriamente em efeitos sobre os parâmetros cinéticos na Sfβgli50.

A

```
Spodoptera frugiperda        TPLITLYHWDLPQKLQEL-GGFAN---PLISDWFEDYARVVFENFGDRVK 180
Drosophila melanogaster      TPMVTIYHWELPQKLQEL-GGWTN---PEIIPLFKDYARLVLEMYGDRVK 181
Brevicoryne brassicae        IPLVTMYHWDLPQYLQDL-GGWVN---PIMSDYFKEYARVLFTYFGDRVK 160
Tenebrio molitor             EPYVTMFHWDLPQPLQDE-GGWPD---RKLADYFVDYARVLFENFGDRIK 179
Cavia porcellus              TPVVTLYHFDLPQALEDQ-GGWLS---EAIIEVFDKYAQFCFSTFGNRVR 158
Xenopus tropicalis           EPQVTLYHWDLPQELQNM-GGWEN---ETMVQWFKEYADLIFQKLGDKVK 227
Homo sapiens                 TPIVTLHHWDLPQLLQVKYGGWQN---VSMANYFRDYANLCFEAFGDRVK 194
Trifolium repens             QPFVTLFHWDLPQVLEDEYGGFLN--SG-VINDFRDYTDLCFKEFGDRVR 197
Vicia sativa                 IPFVTLFHWDLPQSLEDEYKGFLS--SK-VVKDFENYADFVFKTYGDRVK 197
Viburnum furcatum            EPFVTIFHWDLPQGLENEYDGFLS--GQ-IVNDYRDYAEVCFQEFGDRVK 231
Lycopersicon esculentum      TPYANLNHYDLPQALQDRYNGWLG--RE-VVKDFADYAEFCFKTFGDRVK 201
Oryza sativa                 TPYVNLYHYDLPLALEKKYGGWLN--AK-MADLFTEYADFCFKTFGNRVK 197
Cucurbita pepo               KPYVTLFHWDVPEALEIEYGGFLN--RQ-IVEHFQEFAELCFKEFGKKVK 177
Digitalis lanata             QPYVTLFHWDLPLALELEYGGFLDKDKR-IVEHFRDYAELCFWEFGDRVK 180
Arabidopsis thaliana         TPLVTLFQWDVPQALEDEYGGFLS--DR-ILEDFRDFAQFAFNKYGDRVK 196
Sinapis alba                 TPFVTLFHWDLPQTLQDEYEGFLD--PQ-IIDDFKDYADLCFEEFGDSVK 180
Sorghum bicolor              EPYITIFHWDTPQALVDAYGGFLDEED---YKDYTDFAKVCFEKFGKTVK 233
Zea mays                     EPYVTIFHWDVPQALEEKYGGFLDKSHKSIVEDYTYFAKVCFDNFGDKVK 238
Avena sativa                 KPYITLFHWDTPQALADEYKDFLDRRI---VKDYTDYATVCFEHFGDKVK 231
Talaromyces emersonii        EPFVTLFHWDLPDELMKRYGGMLN--KEEFVADYANYARVVFNALGSKVK 172
Leucophaea maderae           MPLVTMYHWDLPQNLQTY-GGWLN---ESIVPLYVSYARVLFENFGDRVK 195
Caenorhabditis elegans       EPIVTLFHFDMPLSIYDNGTSWLN---KENCEHFEKFADLCFQKFGDLVK 162
Leishmania infantum          QPLITLSHYEMPYGLVKRYGGWGS---RKTIGFFERYARTVKERYKHKVK 166
                              *  .: ::: *  :     .  .         :  ::          ::
```

B

```
Spodoptera frugiperda        AKAYYLYDREFRPVQGGQCGITISVNWFGPATP---TPEDEMAAELRRQG 270
Drosophila melanogaster      AEVVHMYRELFQPRQGGRMGITLDTSWPEPRDPN--SAEDREASERAMQF 272
Brevicoryne brassicae        GKAYRLYEEMFKPTQNGKISISISGVFFMPKNAE--SDDDIETAERANQF 250
Tenebrio molitor             GRTYRLYDSDFRAEQNGQIGIAIDSYWHEPNYAD--RETDQEASEVDMQL 270
Cavia porcellus              ARAWHSYDSLFREKQKGMVSLSLFCIWPQPENPN--SVLDQKAAERAINF 249
Xenopus tropicalis           AEAWHLYNDKYRAAQGGLISITVNSDWAEPRNPY--KQEDVEAARRYLSF 319
Homo sapiens                 AKTWHSYNTTWRSKQQGLVGISLNCDWGEPVDIS--NPKDLEAAERYLQF 285
Trifolium repens             AEAVHVYKTKYQAYQKGKIGITLVSNWLMPLDD--NSIPDIKAAERSLDF 297
Vicia sativa                 AAAAKLYKTKYQAHQKGNIGATLVTHYFEPHS---NSAADRVAASRALDF 297
Viburnum furcatum            AAVAQLYKNKYQASQKGQIGIVLVCFWMVPYS---DCPYDCEAAQRALDF 327
Lycopersicon esculentum      ASAAQRYREKYQEKQKGKFGILLDFVWYEPLT---KGKADNYAAQRARDF 301
Oryza sativa                 AAAVARYRTKYQAAQQGKVGIVLDFNWYEALS---NSTEDQAAAQRARDF 294
Cucurbita pepo               AAAVNVYQTKYQEDQKGEIGITLESTWYVPYSD--S-EADKKARDRAFDF 278
Digitalis lanata             AAAVRLYKTKFQAYQGGKIGMTNNVTYYLPYDE--KYHEDVEASKRGVDF 377
Arabidopsis thaliana         AEAVEEFR-KCGKCTGGKIGIVQSPMWFEPYDKKSTSSPSEEIVKRAMDF 299
Sinapis alba                 AKVVDLYR-KNYTHQGGKIGPTMITRWFLPYN--DTDRHSIAATERMKEF 281
Sorghum bicolor              AETVDIYN-KYHKGADGRIGLALNVFGRVPYT---NTFLDQQAQERSMDK 333
Zea mays                     AEAVDLYN-KHYKRDDTRIGLAFDVMGRVPYG---TSFLDKQAEERSWDI 338
Avena sativa                 AETVDVYN-KFYKGDDGQIGMVLDVMAYEPYG---NNFLDQQAQERAIDF 332
Talaromyces emersonii        GTVVDIYRREFKEKQGGEIGITLNGDWAEPWDP--ENPADVEACDRKIEF 272
Leucophaea maderae           ARAYHMYDEEFRESQKGKISIAPNIMWGLPVNVT--SLDDWEATARYLLF 285
Caenorhabditis elegans       AKIYRNYQKNYKETQNGLIGITNGGRFCLPASD---SPADLDACNRALDW 259
Leishmania infantum          ARAVKACHEIVPD---GKIGNMLLGGIVYPLSCR----PEDVLETQRQNR 250
                             .                 .         .         .
```

FIGURA 5.12.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). **(A)** Em vermelho está o resíduo Y167 da Sfβgli50 mutado por F e em amarelo estão os Y correspondentes a estes resíduos em outras β-glicosidases GH 1. **(B)** Em vermelho está o resíduo Y228 da Sfβgli50 também mutado por F. Todos os organismos destes alinhamentos pertencem ao grupo Eukaria. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13. Análise da caracterização das Sfβgli50 mutantes.

Como comentado no item 5.10, foram utilizados os dados de distâncias e de interações entre os resíduos da Sfβgli50 fornecidos pelo programa iMOLTALK (item 4.10) para a construção de "mapas de contatos" (figura 5.13.1.) entre os resíduos selecionados na "varredura" com outros resíduos, sendo que alguns destes foram mutados através de mutagênese sítio-dirigida. Deve ser ressaltado que os dados de distância e interações entre os resíduos (tabela 5.13.1.) restringem-se a distâncias menores de 3,4 Å, limiar utilizado para tentar selecionar apenas contatos que estejam relacionados a algum tipo de interação não-covalente. Os únicos resíduos que não se encontram nestes "mapas de contatos" são os resíduos A156 e Y56, os quais foram selecionados na "varredura" em mutantes onde haviam sido trocados por V e C, respectivamente. Estes resíduos foram excluídos do mapa de "contatos" por não ser viável aprofundar a análise seguindo a lógica utilizada para os demais resíduos. Os resíduos Y228 e Y167, os quais também não estão no "mapa de contatos" foram mutados por F, através de mutagênese sítio-dirigida, com o intuito de demonstrar a existência de mutações neutras, assim, não há razão para analisar seus contatos.

À primeira vista os "mapas de contatos" já fornecem como um dado sugestivo da importância dos resíduos analisados o fato de existirem poucos resíduos intermediários entre os selecionados na "varredura" e aqueles que estão no interior do sítio ativo da Sfβgli50 interagindo diretamente com o substrato.

Um exemplo do que foi citado acima é o resíduo S424 trocado por uma F na 23H2 (enzima selecionada na "varredura") e por A (mutante gerada por

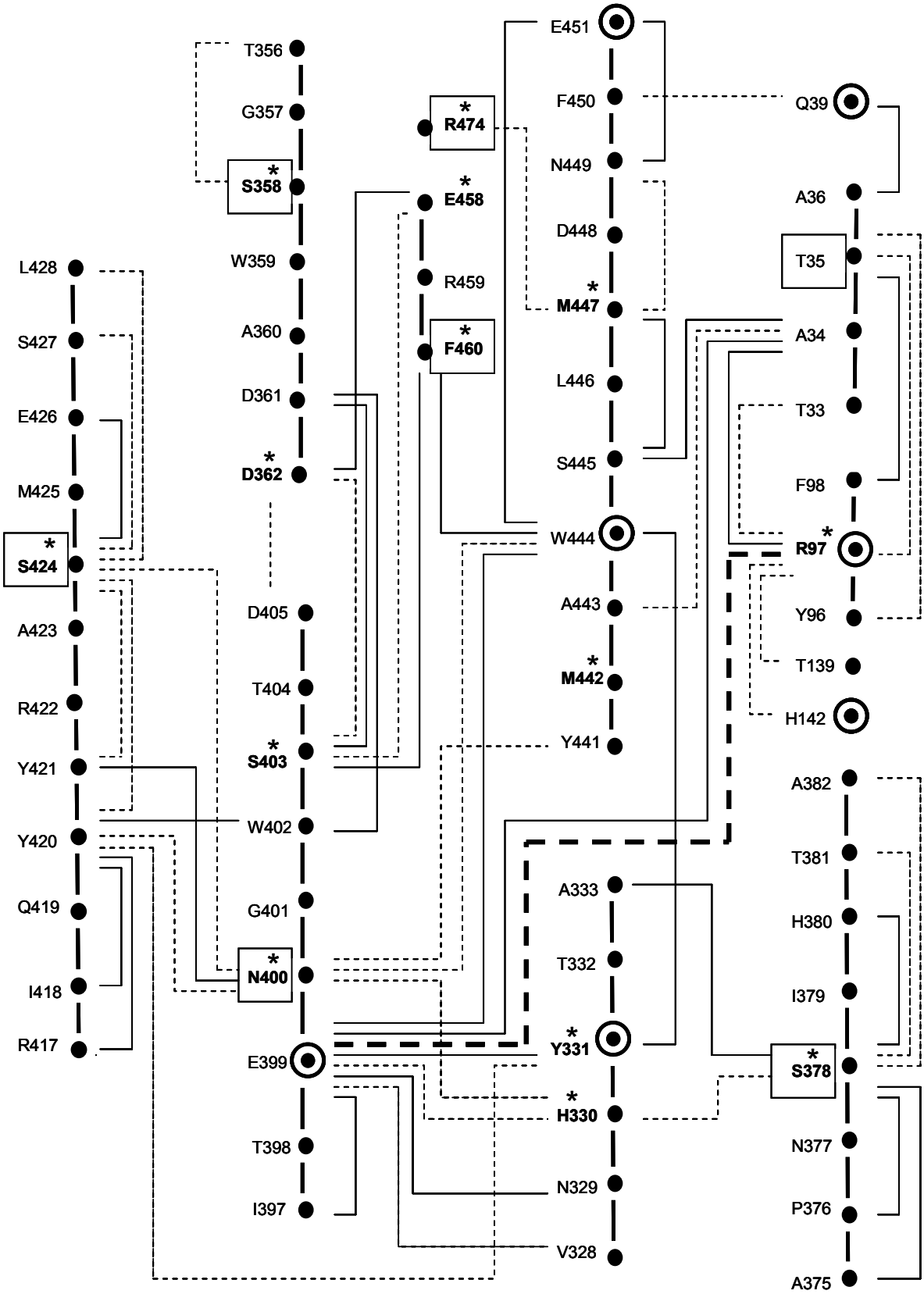
mutagênese sítio-dirigida). Este resíduo, de acordo com a estrutura terciária obtida por homologia para a Sfβgli50, encontra-se afastado do sítio ativo (cerca de 10 Å de distância entre a OH da S424 e o grupo COOH do nucleófilo catalítico, E399), mas, segundo o "mapa de contatos" é capaz de fazer ligação de hidrogênio com o resíduo N400 (figura 5.13.1. - A), o qual por sua vez esta em contato com o nucleófilo catalítico, E399, podendo talvez, assim, interferir na catálise enzimática. Ressaltando que o resíduo N400 também foi alvo de mutação na enzima mutante 40G11 (N400D) selecionada na "varredura". Além disto, o resíduo S424 faz interações com outros resíduos que também interagem com o N400, como o Y420 e Y421, podendo talvez amplificar a importância da interação deste resíduo.

De acordo com o mapa de "contatos" e a tabela de distâncias e interações entre os resíduos da Sfβgli50 (figura 5.13.1. - A e B) os resíduos S378, T35, F460, R189, P348, P346 e Y345 os quais também foram selecionados na "varredura" por terem sido trocados por F, A, L, G, L, S e C, nas mutantes 24C12, 4C11, 38C6, 37A9, 6G10, 39B11 e 30A8, respectivamente, também apresentam poucos resíduos intermediários entre eles e algum resíduo que está no sítio ativo da Sfβgli50 modulando a ligação do substrato.

Assim, o passo seguinte foi a análise dos dados obtidos na caracterização cinética dos resíduos mutados da Sfβgli50 em conjunto com os mapas de "contatos" (figura 5.13.1. - A e B) e a tabela de distâncias e interações entre os resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.13.1.), tendo em vista a participação destes resíduos na especificidade pelo substrato.

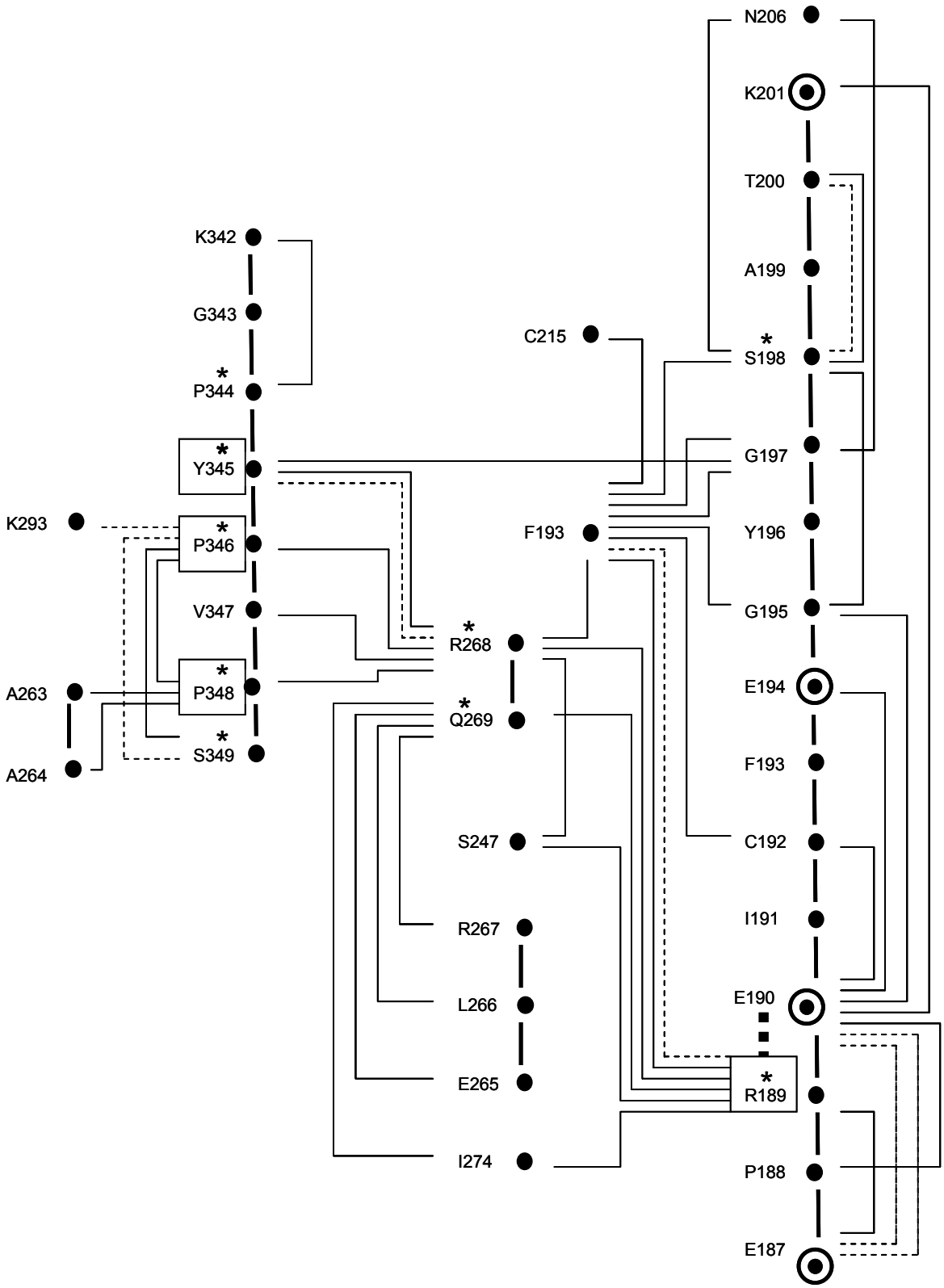
A

FIGURA 5.13.1.

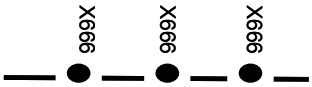


B

FIGURA 5.13.1.



SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS MAPAS DE "CONTATOS" (A) E (B):



resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas;

contato entre resíduos de aminoácidos (distância < 3,4 Å);

Ligação de H entre resíduos de aminoácidos (distância < 3,4 Å);

resíduo de aminoácido do sítio ativo;

resíduo de aminoácido selecionado na "varredura";

X666 A letra indica o aminoácido e seu número na Sfβgli50;

Ligação salina entre a R189 e o E190.

Ligação salina entre a R97 e o E399.

***** Resíduo de aminoácido mutado por mutagênese sítio-dirigida

FIGURA 5.13.1. Mapas de "contatos" entre alguns resíduos de aminoácidos da Sfβgli50 construídos com base nos dados fornecidos pelo programa iMOLTALK (tabela 5.12.1.). **(A)** Mapa de "contatos" entre os resíduos T35, R97, H330, Y331, S358, D363, S378, N400, S403, S424, M442, M447, F460, E458 e R474 analisados neste trabalho. **(B)** Mapa de "contatos" entre os resíduos P344, Y345, P346, P348, S349, R268, Q269, R189 e S198 analisados neste trabalho. Deve ser ressaltado que mais de um "contato" ou mais de uma ligação de hidrogênio entre os mesmos resíduos foram representados com apenas uma linha para facilitar a visualização. Mais detalhes ver tabela 5.13.1. e item 4.10..

5.13.1. Efeitos decorrentes de mutações do resíduo N400.

O resíduo N400 foi um dos resíduos mutados encontrado entre as enzimas selecionadas na "varredura", mutante 40G11 (N400D) (figura 5.9.1. e tabela 5.9.1.). Além desta mutação este resíduo também foi trocado, através de mutagênese sítio-dirigida, por mais dois resíduos, A e V, de tal forma que fosse possível verificar o efeito da troca por uma cadeia lateral menor e da remoção dos grupos formadores de ligação de hidrogênio. Deve ser ressaltado que o N400 encontra-se ao lado do nucleófilo catalítico, E399, (figura 5.9.1.2. - A) e que talvez esta proximidade possibilite ao N400 modular o pK_a desse resíduo catalítico ou alterar seu posicionamento no sítio ativo. A tabela com os dados de distância e interações entre alguns dos resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.13.1.) mostra que este resíduo, N400, faz pelo menos 4 ligações de hidrogênio com outros resíduos presentes em trechos distantes. Dessas, 3 são feitas através de sua cadeia lateral (Nδ2 do N400 com o O do "backbone" da H330; Oδ1 do N400 faz duas ligações de hidrogênio, uma com o Oγ da S424 e outra com a OH da cadeia lateral da Y441). A outra ligação de hidrogênio é feita por meio de seu "backbone" com o resíduo que forma a plataforma basal do glicone, W444 (O do N400 com o N do W444 ambos do "backbone"). Como pode ser verificado (tabela 5.13.1.) o resíduo N400 ainda possui diversos pontos de "contatos" com átomos de outros resíduos que estão a menos de 3,4 Å de distância (Y420 e Y421). A figura 5.13.1.1. - A e B mostra-nos que o resíduo N400 está no trecho I/VTENG onde está o E que age como nucleófilo catalítico, E399. Percebe-se que este N é um resíduo muito conservado tanto em Bacteria, Archea e Eukaria. Nota-se também que alguns dos resíduos

indicados no mapa de “contatos” e na tabela com os dados de distância e interações entre resíduos para a Sfβgli50 que fazem interações com o N400 também tendem a ser conservados, como a Y441, o W444 (formador da plataforma basal do glicone) e os resíduos Y420 e Y421, com poucas trocas (figura 5.13.1.1. - C e D). Assim, as ligações de hidrogênio e a proximidade com muitos outros resíduos podem ser indícios de que o N400 pode ter um importante papel no mecanismo catalítico das β-glicosidases. Além disto, talvez a tendência de conservação entre alguns dos resíduos que o N400 faz interações sugira que ele seja um ponto de contato entre um trecho distante do sítio ativo com o resíduo catalítico E399.

A análise dos dados da caracterização cinética para as mutantes N400D (40G11), N400V e N400A (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revela que o principal efeito mutacional é a queda da atividade enzimática. A queda do k_{cat}/K_m para a mutante N400D foi em torno de 190, 370 e 250 vezes, enquanto que para a mutante N400A foi de 200, 360 e 1000 vezes e, por fim, para a mutante N400V foi de 60, 70 e 85 vezes, em relação a enzima selvagem, para os substratos fuco, gluco e gala, respectivamente. De tal forma que as menores quedas de atividade enzimática foram para a troca por uma V. Das três mutantes, N400V foi também a que sofreu menor alteração em termos de especificidade, pois a eficiência catalítica relativa conservou a mesma proporção entre os substratos que a enzima selvagem (26% na selvagem e 21% na mutante N400V para gluco em relação a fuco). As mutantes N400D e N400A também conservaram fuco como sendo o substrato mais eficientemente hidrolisado, mas apresentaram uma redução na eficiência catalítica relativa de gluco e gala (15% e 0,2% para N400A, 14% e 0,7% para

N400D para gluco e gala sempre em relação a fuco, respectivamente) (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.). Assim, ambas mutações produziram o mesmo efeito de aumentar a preferência da Sfβgli50 por fuco.

Considerando nas mutantes N400D, N400V e N400A que a interação do N400 com o resíduo W444, formador da plataforma basal do subsítio do glicone, tenha sido conservada, pois trata-se de uma ligação de hidrogênio entre átomos do "backbone" (O de N400 e N do W444), as alterações de especificidade nas mutantes N400D e N400A não se originaram de efeitos sobre este "contato direto". Assim, resta supor que as alterações devem se originar a partir de perturbações nos "contatos" com os demais resíduos (H330, Y420 e Y441), os quais de fato envolvem a cadeia lateral de N400.

Assim, pode ser proposto que a perda das várias interações com H330, Y420, S424 e Y441 tenha alterado o posicionamento do segmento que contém N400 e, então, deste modo o contato deste resíduo com o W444 tenha sido alterado. Como a plataforma basal do glicone, W444, interage com o anel do glicone e forma uma ligação de hidrogênio com a sua hidroxila 4, que difere entre fuco e gluco, a perturbação do contato com o N400 e uma possível alteração do posicionamento da plataforma basal modificariam a especificidade da Sfβgli50.

A menor alteração de especificidade na mutante N400V pode indicar que embora a cadeia lateral de V não possa formar ligações de hidrogênio, ela teria volume suficiente para manter o posicionamento do segmento de N400 e não afetar sua interação com o W444.

FIGURA 5.13.1.1.

A

```
Spodoptera frugiperda        YNKPVFYITENGWSTD-----ESRENSLIDDDRIQYYRASMESLLNCLD- 433
Pyrococcus furiosus          G--KPLYITENGIAT------------LDDEWRIEFIIQHLQYVHKAIE- 351
Thermococcus sp              G--LPLYVTENGIAT------------LDDEWRVEFIVQHLQYVHKALK- 347
Streptomyces griseus         PSVP-VLVTENGAAYDD---YADPEGEVHDPERVAYLDAHLAAVHRAIA- 416
Thermus thermophilus         P-WP-LYVTENGAAYPD---LWTGEAVVEDPERVAYLEAHVEAALRARE- 374
Micrococcus antarcticus      ANLPSLYITENGASYTD---TVTEAGTVEDPEREEYILNHLDAVVRAIA- 413
Paenibacillus polymyxa       SKGLPILITENGAAMRD---ELVN-GQIEDTGRHGYIEEHLKACHRFIE- 391
Bacillus sp                  GDVP-IYITENGACYED---ELTQEGRVHDAKRADYFKKHFIQCHRLIE- 389
Thermotoga maritima          NPPE-VYITENGAAFDD---VVSEDGRVHDQNRIDYLKAHIGQAWKAIQ- 387
Clostridium cellulovorans    GNID-LYITENGAAFND---MVNRDGKVEDENRLDYLYTHFAAALSAIE- 388
Lactococcus lactis           PNYKKIYITENGLGYKD--QFVDKT--VYDDGRIDYVKQHLEVLSDAIA- 410
Streptococcus sanguinis      PNYKKIYITENGLGYKD--EFVDNT--VYDDARIDYVKQHLEVLSDAIV- 410
Mycoplasma mycoides          DN-IPWIVSENGIGVSDENRFLNKQGYIDDQYRIDFIKEHLIYLYKAIE- 420
Salmonella enterica          Q--KPLFIVENGFGAYDKVE---EDGGINDDYRIDYLRAHIEEMKKAVTY 412
Escherichia coli             Q--KPLFIVENGFGAYDKVE---EDGSINDDYRIDYLRAHIEEMKKAVTY 414
Yersinia pestis              Q--KPLFIVENGFGAIDKVA---ADGMVHDDYRIAYLKAHIEQMKKAVFE 422
Vibrio cholerae              Q--KPIFVVENGLGALDTVE---ADGSINDDYRIRYLSEHIAAVKQAIDY 413
Staphylococcus aureus        Q--LPLFIVENGFGAVDEV----VDGHIHDDYRIEYLKAHITAAIEAVDQ 413
Enterococcus faecium         G--LPIIITENGLGAIDVLT---DDKNIHDEYRIEYLKQHIQQMKIAIEE 410
Listeria innocua             A--LPILITENGLGEFDKL----VDGEVNDDYRIDYLSAHATAIRDAIS- 414
                                   : ***              : *  *  :
```

B

```
Spodoptera frugiperda        ---KSASAWLTLAP----NSIHTALTHLNNLYNKP-----VFYITENGWS 403
Drosophila melanogaster      ---GSGSVWLKVYP----KGMYNLLMWIHREYNAP-----EIIVTENGVS 409
Brevicoryne brassicae        ---PNETPYIIPVP----EGLRKLLIWLKNEYGNP-----QLLITENGYG 378
Tenebrio molitor             ---GSASSWLKVVP----WGLNKLLVWIKDHYDNP-----PVLITENGFD 400
Cavia porcellus              ---GVG--WVRVVP----WGIRKLLNYIKDTYNNP-----VIYITENGFP 377
Xenopus tropicalis           ---GSGSNWLRVTP----FGLRRLLNWIKETYNNP-----PIYVTENGIS 448
Homo sapiens                 ---DLGSKWLYSVP----WGFRRLLNFAQTQYGDP-----PIYVMENGAS 415
Trifolium repens             --RAASI-WIYVYPYMFIQEDFEIFCYILKINIT----ILQFSITENGMN 426
Vicia sativa                 --ATDLN-WLYVYP----KGIHSLVTHMKDVYKN----PIVY-ITENGVA 420
Viburnum furcatum            --ATGTP-AFCFCP----EGIRDLLVYTKEKYNN----PIIY-ITECGLA 451
Lycopersicon esculentum      --RAHSY-WLYIVP----WGLYKAINYVKEHYGN----PTII-LAENGMD 425
Oryza sativa                 --QANSN-WLYIVP----WGMYGCVNYIKQKYGN----PTVV-ITENGMD 418
Cucurbita pepo               --KVSSSSWLAVYP----HGLKELLIYIKEKYND-----PVIYITENGYL 403
Digitalis lanata             --QCGQGGWIYIYP----RGLYLILIEMTNKFKDKNDQGPLIYITENGAS 507
Arabidopsis thaliana         --SQPATAKYPVCA----DGLRKVLKYIKENYND-----PEIIVTGNGYK 424
Sinapis alba                 KDKADSTDNIYYYP----KGIYSVMDYFKNKYYN-----PLIYVTENGIG 413
Sorghum bicolor              ---PTGNAWINMYP----KGLHDILMTMKNKYGN-----PPMYITENGMG 459
Zea mays                     ---PMGNPWIYMYP----EGLKDLLMIMKNKYGN-----PPIYITENGIG 464
Avena sativa                 ---DVGMYFIYSYP----KGLKNILLRMKEKYGN-----PPIYITENGTA 458
Talaromyces emersonii        ---ETQCEWLRPFP----LGFRKLLKWLADRYNN-----PKIYVTENGTS 394
Leucophaea maderae           ---SNTSSWESVAP----ISLRSIMNWITGRYGNKY----ELFITENGAD 418
Caenorhabditis elegans       ------ETWVRYAP----DGLFGLLKYVRDKYNN-----IPVFITENGCM 380
Leishmania infantum          ------------------VGLRYLLNVLYDRYQKP------LFIVENGVG 366
                                                          .                 :
```

C

```
Spodoptera frugiperda        RIQYYRASMESLLNCLD- 433    DGINLKGYMAWSL 446
Pyrococcus furiosus          RIEFIIQHLQYVHKAIE- 351    DGLDVRGYFYWSF 364
Thermococcus sp              RVEFIVQHLQYVHKALK- 347    EGIDVRGYFYWSL 360
Streptomyces griseus         RVAYLDAHLAAVHRAIA- 416    DGVDVRGYFLWSL 429
Thermus thermophilus         RVAYLEAHVEAALRARE- 374    EGVDLRGYFVWSL 387
Micrococcus antarcticus      REEYILNHLDAVVRAIA- 413    DGVDVRGYFVWSL 426
Paenibacillus polymyxa       RHGYIEEHLKACHRFIE- 391    EGGQLKGYFVWSF 404
Bacillus sp                  RADYFKKHFIQCHRLIE- 389    SGVPLKGYFAWSL 402
Thermotoga maritima          RIDYLKAHIGQAWKAIQ- 387    EGVPLKGYFVWSL 400
Clostridium cellulovorans    RLDYLYTHFAAALSAIE- 388    AGVPLKGYYIWSF 401
Lactococcus lactis           RIDYVKQHLEVLSDAIA- 410    DGANVKGYFIWSL 423
Streptococcus sanguinis      RIDYVKQHLEVLSDAIV- 410    DGANVKGYFIWSL 423
Mycoplasma mycoides          RIDFIKEHLIYLYKAIE- 420    QGSNCFGYQMWTL 433
Salmonella enterica          RIDYLRAHIEEMKKAVTY 412    DGVDLMGYTPWGC 425
Escherichia coli             RIDYLRAHIEEMKKAVTY 414    DGVDLMGYTPWGC 427
Yersinia pestis              RIAYLKAHIEQMKKAVFE 422    DGVDLMGYTPWGC 435
Vibrio cholerae              RIRYLSEHIAAVKQAIDY 413    DGVEVMGYTPWGC 426
Staphylococcus aureus        RIEYLKAHITAAIEAVDQ 413    DGVDLIGYTPWGI 426
Enterococcus faecium         RIEYLKQHIQQMKIAIEE 410    DQVDCFGYLTWAP 423
Listeria innocua             RIDYLSAHATAIRDAIS- 414    DGVDMLGYCTWSF 427
                                :                          **  *   *  .
```

D

```
Spodoptera frugiperda        ESR------ENSLIDDDRIQYYRASMESLLNCL-DDGINLKGYMAWSL 446
Drosophila melanogaster      ---------RGGLEDYARVDYYNLYLSAVLDAM-EDGANISGYIAWSL 448
Brevicoryne brassicae        ---------DGQLDDFEKISYLKNYLNATLQAMYEDKCNVIGYTVWSL 414
Tenebrio molitor             ---------TGELDDYDRANYYKQYLYEILKAINEEECNVIGYTAWSL 440
Cavia porcellus              DP--------PSIDDTQRWECFRQTFEELFKAIHVDKVNLQLYCAWSL 419
Xenopus tropicalis           G---------TNLKDVWREHYYKYYINEALKAVKYDGADLRGYAAWSL 489
Homo sapiens                 FH-------CTQLCDEWRIQYLKGYINEMLKAIK-DGANIKGYTSWSL 457
Trifolium repens             NDATL--PVEEALLNTYRIDYYYRHLYYIRSAIRAG-SNVKGFYAWSF 473
Vicia sativa                 RNDSI--PISEARKDGIRISYHDNHLKFLLQGIKDG-ANVKGYYAWSF 467
Viburnum furcatum            NIN----TVDQGVKDVERVEFYYEHLKFLRSAIKKG-VNVKGFFTWSL 496
Lycopersicon esculentum      GNIT----LPKALHDTKRINYYKSYLQQLKKTVDDG-ANVIGYFAWSL 470
Oryza sativa                 ANLS----RDQYLRDTTRVHFYRSYLTQLKKAIDEG-ANVAGYFAWSL 463
Cucurbita pepo               DSP----NVDELLRDERRVKYFHDHLYYLYEAIEAG-VKVRGYFAWSL 448
Digitalis lanata             ANTTF--TVCEARYDPIRVLYHNDHLWYLKKAMEDG-VNLKGYFIWSF 554
Arabidopsis thaliana         LEEKD--VLPDALSDSNRKYYHMRHLMALHGAVCEDKVNVKGYFVSSL 472
Sinapis alba                 GDEN----RNQSMLDYTRIDYLCSHLCFLNKVIKEKDVNVKGYLAWAL 459
Sorghum bicolor              DKGD--LPKPVALEDHTRLDYIQRHLSVLKQSIDLG-ADVRGYFAWSL 506
Zea mays                     DTKETPLPMEAALNDYKRLDYIQRHIATLKESIDLG-SNVQGYFAWSL 512
Avena sativa                 DGWGN-PPMTDPLDDPLRIEYLQQHMTAIKEAIDLGRRTLRGHFTWSL 507
Talaromyces emersonii        GESDK--PLEEVLNDEFRVQYYRDYIGAMVDAVAQDGVNVKAYMAWSL 442
Leucophaea maderae           ---------KGQLNDTKRITYLATYLTEVLKAIFIDEIKMKALTVWSL 458
Caenorhabditis elegans       VGGEG-RKEEEILDDKHRIKFISGHLEAVAKALEEG-CNVIGYTLWTL 428
Leishmania infantum          DRIEA----DGSINDDYRIDYLNDHLVQVAEAIDDG-VEVMGYTSWGP 411
                              *                  :  :       :      :      :
```

FIGURA 5.13.1.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases. (**A** e **B**) Em azul está o trecho I/VTENG onde está o E que age como nucleófilo catalítico sendo que em vermelho está o N400 da Sfβgli50 trocado por D na mutante 40G11 a qual foi selecionada na "varredura". Em amarelo estão os resíduos correspondentes a estes em outras β-glicosidases GH 1 de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. (**C** e **D**) Em vermelho está o resíduo S424 da Sfβgli50 encontrado mutado na "varredura" (mutante 23H2 (S424F). Em azul estão os resíduos Y420, Y421 e 441-YMAW-444 (ressaltando que o W444 corresponde à plataforma basal do glicone). Em amarelo estão os resíduos correspondentes a estes em outras β-glicosidases que são iguais aos da Sfβgli50 e em verde os correspondentes a estes resíduos, mas que são diferentes dos encontrados na Sfβgli50. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.2. Efeitos decorrentes de mutações do resíduo S424.

O resíduo S424 foi também um dos resíduos mutados encontrado entre as enzimas selecionadas na “varredura”, mutante 23H2 (S424F) (figura 5.9.1. e tabela 5.9.1.). Além desta troca este resíduo foi trocado por A, através de mutação sítio-dirigida, de forma que fosse possível verificar o efeito da remoção da hidroxila de sua cadeia lateral.

De acordo com o mapa de “contatos” e a tabela com os dados de distância e interações entre resíduos para a Sfβgli50 (tabela 5.13.1. e figura 5.13.1.) o resíduo S424 esta a menos de 3,4 Å de uma série de 5 resíduos posicionados no trecho de aminoácidos de 420 a 428 podendo fazer até 5 ligações de hidrogênio com estes resíduos. Destas ligações de hidrogênio somente uma é feita através de sua cadeia lateral (Oγ com o O do “backbone” da Y420), sendo as demais feitas por átomos de seu “backbone” (N com o O da Y420 e da Y421; O com o N da S427 e com o N da L428). Além disto, como já comentado, S424 é capaz de fazer ligação de hidrogênio com o resíduo N400 (Oγ com o Oδ1 do N400) (tabela 5.13.1.). Este conjunto de interações entre átomos do “backbone” atua na manutenção da α-hélice formada pelo trecho de aminoácidos de 420 a 428 (figura 5.9.1.2. – B) a qual encontra-se na superfície da Sfβgli50 enquanto o trecho no qual se localiza o resíduo N400 encontra-se no sítio ativo (figura 5.9.1.2. - A e B). Isto pode ser visto como um indício da centralidade e importância do papel do resíduo N400 na catálise da Sfβgli50. O resíduo Y420, o qual também está na mesma α-hélice que a S424, tende a ser conservado entre as β-glicosidases, tanto em Bacteria, Archea e Eukaria, como já comentado, com poucas trocas por F ou C (figura 5.13.1.1. -

C e D). No entanto, a S424 é variável, mas com uma tendência a ser uma H nas β-glicosidases de Bacteria e Archea, enquanto em Eukaria tende a ter uma A nesta posição (figura 5.13.1.1. - C e D).

A análise dos dados da caracterização cinética para as mutantes do resíduo S424 (S424A e S424F) (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revela que a mutação S424A tem um impacto muito menor que a S424F. Na mutante S424A há uma queda da eficiência catalítica em torno de 2 vezes para os substratos fuco e gluco e em torno de 3 vezes para gala. Já na mutante S424F a queda é em torno de 160, 260 e 180 vezes para fuco, gluco e gala, respectivamente. Esse efeito menor para a mutante S424A também é verificado em termos de especificidade pelo substrato, pois a eficiência catalítica relativa da S424A não foi alterada (24% para gluco e 0,7% para gala em relação ao substrato fuco). A mutante S424F sofreu uma redução para gluco (gluco 16% e gala 0,8% em relação ao fuco) (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.).

Considerando que das seis ligações de hidrogênio que a S424 é capaz de fazer somente duas são feitas através de sua cadeia lateral, a troca deste resíduo por A somente remove estas duas interações. Uma destas ligações de hidrogênio é feita com o resíduo N400 e a outra é com a Y420, como já comentado, que também faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo N400. Assim, a pequena queda na eficiência catalítica para a mutante S424A, sem alteração na especificidade pelo substrato, sugere que seja decorrente do efeito da perda dessa interação com o N400 (item 5.13.1.). Além disso, mesmo com a perda da interação S424-N400, os segmentos contendo estes resíduos

podem ter se mantido relativamente inalterados, pois foi introduzida uma cadeia lateral pequena e o contato de Y420-N400 pode ter sido mantido.

O fato da mutação S424F ter apresentado uma maior queda da eficiência catalítica e alteração da especificidade pelo substrato, mesmo que pequena, pode ser um efeito da troca por um resíduo mais volumoso. Isto pode ter "perturbado" as interações que o S424 faz com resíduos da "vizinhança". Um desses resíduos pode ter sido o N400, o que explicaria o efeito similar ao encontrado para as mutantes N400D e N400A, quando considerados os substratos fuco e gluco. Assim, pode ser proposto que a mutação S424F causaria uma alteração na interação com o N400 e esta poderia se propagar modificando a interação deste resíduo com a plataforma basal do glicone, W444, o que explicaria a alteração da especificidade pelo substrato.

5.13.3. Papel conjunto dos resíduos N400 e S424.

A semelhança de efeito sobre a atividade enzimática e a coerência das alterações da eficiência catalítica relativa sugere que os resíduos S424 e N400 atuam em conjunto modulando estas propriedades enzimáticas. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que S424 e N400 foram alvos de mutações selecionadas independentemente na "varredura" (item 5.9.). O "mapa de contatos" entre resíduos da Sfβgli50 (figura 5.13.1.) permite propor que as mutações de S424 atingem o sítio ativo por meio de N400. Assim, S424, N400, E399 e W444 formariam uma "via de contatos" através da qual mutações em S424 se propagariam e afetariam a atividade e a especificidade pelo substrato da Sfβgli50.

5.13.4. Efeitos decorrentes de mutações sobre o resíduo M442.

Apesar do resíduo M442 não estar a menos de 3,4 Å do resíduo N400 a mutação M442A causou um efeito de alteração da eficiência catalítica similar a da mutação N400A e N400D. Conforme foi proposto (item 5.13.1.), as mutações N400A e N400D causaram efeitos na especificidade pelo substrato da Sfβgli50 através de alterações no posicionamento de W444, o qual forma a plataforma basal que interage com o glicone do substrato. A queda da atividade enzimática verificada para a mutante M442A foi em torno de 230 e 390 vezes para os substratos fuco e gluco, respectivamente, em relação a enzima selvagem. A especificidade pelo substrato na M442A também alterou-se de modo similar a N400A e N400D, tendo sido observada uma queda da eficiência catalítica relativa para gluco em relação a selvagem (26% na selvagem para 16% na M442A) (tabela 5.10.1.), sendo que todas conservam fuco como o substrato mais eficientemente hidrolisado. Esta semelhança com as mutantes N400A e N400D pode ser um indício de que o resíduo M442 ao ser mutado alterou o posicionamento da plataforma basal do glicone, W444, de modo semelhante ao proposto para as mutantes N400D e N400A. E talvez isto seja devido a proximidade entre a M442 e o W444.

De fato a observação de que a mutação de um resíduo vizinho (M442) ao W444 tem o mesmo efeito sobre a especificidade que a mutação de um resíduo distante (N400), reforça a proposta de que o efeito mutacional de N400A e N400D propaga-se até o W444.

5.13.5. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos H330, S378 e Y331.

Um dos resíduos mutado encontrado entre as Sfβgli50 selecionadas na "varredura" foi o S378, mutante 19H2 (S378G) (figura 5.9.1. e tabela 5.9.1.). Para entender o modo pelo qual este resíduo participa na determinação da especificidade pelo substrato foram criadas as mutantes S378A, H330A e Y331F. A mutante H330A foi construída porque a H330 está a menos de 3,4 Å do resíduo S378 e faz ligação de hidrogênio com a S378 (Nε2 da H330 e o Oγ da S378) (tabela 5.13.1 e figura 5.13.1). Além disto, H330 faz uma ligação de hidrogênio com o nucleófilo catalítico, E399 (N do "backbone" da H330 com o O, também do "backbone", do E399). A mutante Y331F foi construída porque a Y331 está ao lado da H330. Além disso, três pontos a respeito do resíduo Y331 devem ser ressaltados: o primeiro é que a Y331 modula o pK_a do nucleófilo catalítico, E399 (Marana *et al*., 2003); o segundo ponto é que a Y331 faz ligação de hidrogênio com a Y420 (tabela 5.13.1.), resíduo que faz ligação de hidrogênio tanto com a S424, como também com o resíduo N400, ambos selecionados como resíduos mutados na "varredura"; o terceiro ponto é a proximidade de Y331 com o resíduo formador da plataforma basal do glicone, W444 (OH da Y331 está a menos de 3,4 Å do Cγ, Cδ2 e Cε3 do W444). Esta proximidade talvez permita que o Y331 também module o posicionamento da plataforma basal e, consequentemente, afete a interação dela com o glicone do substrato. Assim, o resíduo Y331 poderia afetar a atividade enzimática como também a especificidade pelo substrato.

Destes três resíduos, H330, Y331 e S378, somente a tirosina é conservada nas β-glicosidases de Eukaria, Bacteria e Archea, com algumas

poucas trocas para F em Eukaria (figura 5.13.5.1.). A H330 tende a ser uma Y e a S378 na Sfβgli50 é muito variável nas demais β-glicosidases (figura 5.13.5.1.). No entanto, pode-se perceber uma tendência dos resíduos correspondentes a S378 nas demais β-glicosidases a serem pouco volumosos.

A caracterização cinética das mutantes para estes três resíduos, S378, H330 e Y331, revela que as quedas da atividade enzimática destes mutantes não foram tão drásticas como as verificadas para as mutações do resíduo N400 (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.). Para a mutação 19H2 (S378G) a redução da atividade enzimática foi de 14, 7 e 22 vezes para os substratos fuco, gluco e gala, respectivamente. A mutação S378A não gerou grandes alterações na eficiência catalítica, sendo a maior redução verificada para o substrato gala (em torno de 2 vezes menor do que na enzima selvagem). A mutante H330A apresentou quedas de atividade de 7, 2 e 14 vezes para os substratos fuco, gluco e gala, respectivamente, em relação a Sfβgli50 selvagem. Finalmente a mutação Y331F produziu a maior queda da atividade enzimática dentre estas mutações, reduções de 280, 61 e 31 vezes na atividade sobre fuco, gluco e gala, respectivamente.

Apesar dos pequenos efeitos sobre a atividade enzimática quando comparados às mutações do resíduo N400, a caracterização cinética das mutantes é reveladora no que se refere à especificidade pelo substrato. A análise da eficiência catalítica relativa das mutantes S378G, S378A, Y331F e H330A revela que a mutação S378A provocou aumento da eficiência catalítica relativa sobre gluco, passando de 26% na Sfβgli50 selvagem para 33% nesta mutante. Coerentemente a mutação S378G também gerou aumento da eficiência catalítica relativa por gluco (passou a ser 49%). Este mesmo efeito foi

produzido pela mutação H330A, sendo que neste caso a eficiência catalítica relativa sobre gluco foi de 75%. Mas, o efeito mais drástico foi verificado para a mutante Y331F. Esta mutante apresentou gluco como o substrato melhor hidrolisado, passando a eficiência catalítica sobre fuco à segunda posição, tornando-se 86% da exibida sobre gluco. Assim, os dados sugerem que a proximidade do resíduo Y331 com a plataforma basal do glicone, W444, realmente seja importante para a especificidade pelo substrato, já que a simples remoção da hidroxila da Y331 alterou este parâmetro. A coerência dos efeitos mutacionais sobre a especificidade pelo substrato e a existência de contatos entre S378, H330, Y331, E399 e W444 sugere que uma "via de contatos" partindo do resíduo S378 se conecta com o sítio ativo por meio do Y331 através da H330 (figura 5.13.1.). De tal forma que influencia tanto a atividade enzimática, afetando o nucleófilo catalítico (E399), como também a especificidade pelo substrato, afetando a plataforma basal do glicone, W444.

A menor queda na atividade enzimática observada para a mutante S378A quando comparada à mutante S378G sugere que mesmo uma cadeia lateral não polar, mas que ocupe volume semelhante à serina já é suficiente para manter o posicionamento relativo entre os segmentos que contem S378 e H330. A remoção total da cadeia lateral na mutante S378G, provavelmente, eliminou qualquer contato entre este resíduo e o segmento do resíduo H330 e Y331. Este pode ser o fator responsável pela maior queda na atividade enzimática desta mutante em relação a mutação S378A e H330A, talvez por alterar o posicionamento da H330 e da Y331, interferindo em seus contatos com outros resíduos.

O fato de ter sido verificada uma crescente queda da atividade enzimática e um aumento da eficiência catalítica relativa sobre gluco causada pelas mutações S378A, H330A e Y331F, respectivamente, pode ser também um indício da ordem de importância destes resíduos na modulação da especificidade pelo substrato. Pois destes três resíduos, Y331 está diretamente em contato com o W444 e E399. Assim, é plausível que os efeitos mais drásticos tenham sido verificados na mutação Y331F. De modo análogo, é plausível que em segundo lugar, em termos de efeito sobre a especificidade pelo substrato, fique a mutação do resíduo H330, pois este é o resíduo que está mais próximo da Y331 e faz ligação de hidrogênio com o nucleófilo catalítico, E399 (uma ligação de hidrogênio entre "backbones"), mas não está em "contato direto" com o W444. Finalmente, S378 não interage diretamente com nenhum resíduo do interior do sítio ativo.

Este gradiente nos efeitos mutacionais é sugestivo, aparentando que a alteração provocada pela mutação teria mais "formas e oportunidades para se acomodar à medida que cresce a distância do sítio ativo".

Por fim, é interessante observar que as mutações em S378, H330 e Y331 promovem um aumento na preferência da Sfβgli50 por gluco, enquanto em contraste as mutações em S424 e N400 diminuem a preferência por gluco. Aparentemente, estas duas "vias de contato" atingem a plataforma basal do glicone, W444, causando modificações distintas (figura 5.13.1.).

FIGURA 5.13.5.1.

A

```
Spodoptera frugiperda        PWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDLIGVNHYTAFLVS-------------ATE 340
Pyrococcus furiosus          KAYRVPQSD----------ADFIGINYYTASEVR-------------HSW 276
Thermococcus sp              RTFDVPASG----------LDWLGMNYYNIMKVR-------------AVR 274
Streptomyces griseus         DWSFVRDGDLEVTS---TPIDSLGINYYSPSVVS-----AG--------T 325
Thermus thermophilus         ----ILSRDLELVA---RPLDFLGVNYYAPVRVA-----PG--------T 293
Micrococcus antarcticus      LAEVIEAGDLEIIS---QPIDFLGVNHYHDDNVSGHPLPAGQP-QPVVPT 321
Paenibacillus polymyxa       GLDFVQPGDMELIQ---QPGDFLGINYYTRSIIR--------------ST 306
Bacillus sp                  VEVPIQPGDMETIA---QPIDFIGVNFYSGGFGR---------------Y 303
Thermotoga maritima          PEN--YKDDMSEIQ---EKIDFVGLNYYSGHLVK---------------F 302
Clostridium cellulovorans    IMPELPKELFTEVF---ETSDFLGINYYTRQVVK---------------N 303
Lactococcus lactis           GELDLRDEDFQALDAAKDLNDFLGINYYMSDWMQAFDG------ETEIIH 315
Streptococcus sanguinis      GQLDLRDEDFAALEAAKDLNDFLGINYYMSDWMRDFDG------ETEIIH 315
Mycoplasma mycoides          DQLELN-------EIKKTRIDFLAVNYYQPARVQAPLN------NLTSST 330
Salmonella enterica          FNIKMDDGDLEVLR--EGTCDYLGFSYYMTNAVKAEG-GSGDA------- 329
Escherichia coli             FNIKMEDGDLDVLR--EGTCDYLGFSYYMTNAVKAEG-GTGDA------- 331
Yersinia pestis              FNIHMEEGDLETLR--DGCADYMGLSYYMSNAVSAINPGSGNS------- 339
Vibrio cholerae              IEIEMQAGDEQILR--QGCADYLAISYYMTNIVSAAPEQEGET------- 330
Staphylococcus aureus        YDVGWQEGDDSILQ--QGTVDYIGFSYYMSTAVKHDVDTTVENN------ 329
Enterococcus faecium         IKLTITENDKYMFS--KGTLDFIGMNYYASSVAKYEGAAEEKS------- 329
Listeria innocua             IAPVIEDGDMELLA--SAKPDFMGVNYYQSATVAYNPLDGVGQNNEMNFT 323
                                                          * :....*
```

B

```
Spodoptera frugiperda        RGTSDLIGVNHYTAFLVSA 338   P----NSIHTALTHLNNLYNKP-----VFYITE 399
Drosophila melanogaster      RGTSDFFGINSYTSNLVTS 341   P----KGMYNLLMWIHREYNAP-----EIIVTE 405
Brevicoryne brassicae        KGTADFYALNHYSSRLVTF 316   P----EGLRKLLIWLKNEYGNP-----QLLITE 374
Tenebrio molitor             KGTFDFLGLNHYSSDKVYF 336   P----ISLRSIMNWITGRYGNKY----ELFITE 414
Cavia porcellus              KGTADFFAVQYYTTRFIRH 316   P----WGLNKLLVWIKDHYDNP-----PVLITE 396
Xenopus tropicalis           KGTHDFFGLNHYTTVLAAP 385   P----WGIRKLLNYIKDTYNNP-----VIYITE 373
Homo sapiens                 KGTSDFLGLGHFTTRYITE 351   P----WGVRKLLKYIKDTYNNP-----VIYITE 373
Trifolium repens             NGSFDFIGINYYSSSYIS- 352   P----FGLRRLLNWIKETYNNP-----PIYVTE 444
Vicia sativa                 KGSYDFLGVNYYSTYYAQ- 352   P----WGFRRLLNFAQTQYGDP-----PIYVME 411
Viburnum furcatum            KGSIDFLGLNYYTSIYAA- 382   PYMFIQEDFEIFCYILKINIT----ILQFSITE 422
Lycopersicon esculentum      KGSFDYVGINQYTSYYMY- 356   P----KGIHSLVTHMKDVYKN----PIVY-ITE 416
Oryza sativa                 KGSADYIGINQYTASYMK- 349   P----EGIRDLLVYTKEKYNN----PIIY-ITE 447
Cucurbita pepo               MNSFDFLGINYYTANYAK- 333   P----WGLYKAINYVKEHYGN----PTII-LAE 421
Digitalis lanata             RGSYDFLGVNYYTTYYAI- 332   P----WGMYGCVNYIKQKYGN----PTVV-ITE 414
Arabidopsis thaliana         KGSYDFVGINYFTSTFVAH 355   P----HGLKELLIYIKEKYND-----PVIYITE 399
Sinapis alba                 KGSYDFLGLNYYFTQYAQP 337   P----RGLYLILIEMTNKFKDKNDQGPLIYITE 503
Sorghum bicolor              VGSYDMIGINYYTSTFSKH 319   A----DGLRKVLKYIKENYND-----PEIIVTG 420
Zea mays                     AGSYNMLGLNYYTSRFSKN 394   P----KGIYSVMDYFKNKYYN-----PLIYVTE 409
Avena sativa                 VSSYDFVGINYYTSRFAKH 388   P----KGLHDILMTMKNKYGN-----PPMYITE 455
Talaromyces emersonii        HGSNDFYGMNHYCENYIRN 328   P----EGLKDLLMIMKNKYGN-----PPIYITE 460
Leucophaea maderae           KGTADYFAFNAYTAFLVNK 353   P----KGLKNILLRMKEKYGN-----PPIYITE 454
Caenorhabditis elegans       KGSTDFLGINYYLSHIVRN 316   P----LGFRKLLKWLADRYNN-----PKIYVTE 390
Leishmania infantum          RETIDFISFSYYMSGCVTT 318   P----DGLFGLLKYVRDKYNN-----IPVFITE 376
                               : :  ..  :                          .                 :
                                                        -----VGLRYLLNVLYDRYQKP------LFIVE 362
```

C

```
Spodoptera frugiperda        RKGPYPVPSLLDDVDTGSWADDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLN-NL 389
Pyrococcus furiosus          NPLKFFFDAKLADVSE---------RKTQMGWSVYPRGIYIALKKAS-KY 316
Thermococcus sp              NPLRR-FAVEDAGVS----------RKTDMGWSVYPKGIYDGLRAFA-EY 312
Streptomyces griseus         SESPSPWAGAERHVAFTPAA----GPRTAMDWPVDADGLYELLTRLRDEL 371
Thermus thermophilus         GTLP---------VRYLPPE----GPATAMGWEVYPEGLHHLLKRLGREV 330
Micrococcus antarcticus      DSPKSSPFVGSEYVTFPARD----LPRTAMGWEVNPEGLRVLLNRLNQDY 367
Paenibacillus polymyxa       NDAS------LLQVEQVHME----EPVTDMGWEIHPESFYKLLTRIEKDF 346
Bacillus sp                  KEG-----EGLFDCEEVQVG----FDKTFMDWNVYAEGLYKVLSWVHEEY 344
Thermotoga maritima          DP------DAPAKVSFVERD----LPKTAMGWEIVPEGIYWILKKVKEEY 342
Clostridium cellulovorans    NS------EAFIGAESVAMD----NPKTEMGWEIYPQGLYDLLTRIHRDY 343
Lactococcus lactis           NGKGEKGSSKYQIKGVGRRVAPDYVPRTDWDWIIYPEGLYDQIMRVKNDY 365
Streptococcus sanguinis      NGKGEKGSSKYQIKGVGRRESPTHIPKTDWDWIIYPQGLYDQIMRIKKDY 365
Mycoplasma mycoides          ELKLENWFLPYTNKNIRIN--------PYRGWEIHPQTLYDIAIDIKNNY 372
Salmonella enterica          ----------ISGFEGSVPN--PYVKASDWGWQIDPVGLRYSLCELYERY 367
Escherichia coli             ----------ISGFEGSVPN--PYVKASDWGWQIDPVGLRYALCELYERY 369
Yersinia pestis              ----------LSGFEGSVPN--PHVKASDWGWQIDPVGLRYSLSVLYERY 377
Vibrio cholerae              ----------TSLFETSRLN--PYLPASDWGWQIDPQGLRYALSELYERY 368
Staphylococcus aureus        --------IVNGGLNHSVEN--PHIATSDWGWAIDPDGLRYTLNVLYDRY 369
Enterococcus faecium         ------------ALFGGLQN--PYLVTSKWGWTIDPTGLRYLLNYTYRKY 365
Listeria innocua             GKKGSTKETGVPGVYKKVVN--PFVKTTNWDWTIDPKGLQIALRRINSRY 371
                                                          .     : .  :
```

FIGURA 5.11.5.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases. (**A** e **B**) Em vermelho estão os resíduos H330 e Y331 na Sfβgli50, os quais foram trocados por A, e em amarelo estão os resíduos correspondentes a estes em outras β-glicosidases GH 1 de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. (**B** e **C**) Em vermelho está o resíduo S378 da Sfβgli50 encontrado mutado entre as Sfβgli50 selecionadas na "varredura" (19H2 (S378G)) alinhado com os correspondentes a este resíduo em β-glicosidases de **(C)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.6. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos F460 e S403.

O resíduo F460 foi encontrado trocado por L na mutante 38C6 selecionada na "varredura" (figura 5.9.1. e tabela 5.9.1.). Trata-se de um resíduo relativamente conservado em β-glicosidases de Eukaria, sendo substituído apenas por Y (figura 5.11.6.1.). Com o objetivo de entender o modo pelo qual F460 participa do controle da especificidade pelo substrato foi criada a enzima mutante F460A, de tal forma que fosse removida grande parte da sua cadeia lateral. A análise do "mapa de contatos" entre os resíduos (figura 5.13.1.; tabela 5.13.1.) mostra que F460, mesmo possuindo uma cadeia lateral volumosa, não faz muitos contatos, estando a menos de 3,4 Å apenas do resíduo S403 e do resíduo W444, o qual constitui a plataforma basal do glicone (Cβ da S403 com o Cε1 do resíduo F460; O da F460 com o O do W444 (ambos do "backbone") e o Cζ3 do F460 com o Cδ1 e Cε1 do W444). Assim, também foi criada a mutação S403A, a qual reduz a extensão da cadeia lateral da S403, mas não elimina o possível "contato" entre as cadeias laterais da F460 e S403. De acordo com a figura 5.13.6.1. - C e D o resíduo S403 da Sfβgli50 não é conservado em outras β-glicosidases. No entanto, pode-se verificar que em Bacteria e Archea todos os resíduos correspondentes a este são pouco

volumosos (resíduos de A ou G). Em Eukaria tal tendência pode também ser vista, porém há algumas enzimas com resíduos volumosos.

A caracterização cinética destas mutantes, primeiramente revela que as duas mutações da F460 causaram maiores quedas da atividade enzimática do que a mutação do resíduo S403 (500, 70 e 50 vezes para a F460A, 40, 160 e 21 vezes para a F460L e 200, 4 e 5 vezes para a S403A, referentes à atividade sobre os substratos fuco, gluco e gala, respectivamente) (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.). No entanto, as mutantes F460L e F460A apresentaram padrões distintos de especificidade pelo substrato. A primeira apresentou uma redução da sua eficiência catalítica relativa sobre gluco. Já a segunda mutação, F460A, tornou gluco o substrato mais eficientemente hidrolisado, passando a eficiência catalítica relativa sobre fuco a ser 48% sobre a de gluco. A mutante S403A mostrou um padrão de especificidade similar a da mutante F460A, com gluco tornando-se o substrato mais eficientemente hidrolisado e com uma queda mais drástica da eficiência catalítica relativa de fuco (6,6 %) em relação a gluco.

Estes dados para as mutações F460L e F460A podem ser um indício de que o volume ocupado pelo resíduo F460 no interior da estrutura da Sfβgli50 pode ser relevante e determine o posicionamento da plataforma basal do glicone, W444. A remoção do anel fenílico, por meio da troca por A, pode ter "aberto espaço" para um deslocamento do W444, alterando os "contatos" com o glicone e causando queda da atividade enzimática e modificação da especificidade pelo substrato. Os dados da mutante S403A reforçam tal idéia, pois nesta mutante não se eliminou o possível contato entre a cadeia lateral deste resíduo e a F460 (o Cβ ainda está presente). Contudo com a remoção do volume da cadeia lateral, devido a remoção da hidroxila, o padrão de especificidade pelo substrato foi alterado, como na mutação F460A.

FIGURA 5.13.6.1.

A

```
Spodoptera frugiperda          DGINLKGYMAWSLMDNFEWMEG-YIERFGLYEVDFSDPARTRT---PRKA 479
Pyrococcus furiosus            DGLDVRGYFYWSFMDNYEWREG-FEPRFGLVEVDYETFERR-----PRKS 395
Thermococcus sp                EGIDVRGYFYWSLVDNYEWAEG-FRPRFGLVEVDYETFERK-----PRKS 391
Streptomyces griseus           DGVDVRGYFLWSLLDNFEWAYG-YSKRFGIVHVDFASQRRT-----AKDS 460
Thermus thermophilus           EGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFG-YTRRFGLYYVDFPSQRRI-----PKRS 418
Micrococcus antarcticus        DGVDVRGYFVWSLLDNFEWAWG-YAKRFGIIHVDYQTQVRT-----IKNS 457
Paenibacillus polymyxa         EGGQLKGYFVWSFLDNFEWAWG-YSKRFGIVHINYETQERT-----PKQS 435
Bacillus sp                    SGVPLKGYFAWSLLDNFEWAEG-YVKRFGIVYTDYKTLKRY-----PKDS 433
Thermotoga maritima            EGVPLKGYFVWSLLDNFEWAEG-YSKRFGIVYVDYSTQKRI-----VKDS 431
Clostridium cellulovorans      AGVPLKGYYIWSFMDNFEWAEG-YEKRFGIVHVNYKTQERT-----IKKS 432
Lactococcus lactis             DGANVKGYFIWSLMDVFSWSNG-YEKRYGLFYVDFDTQERY-----PKKS 454
Streptococcus sanguinis        DGANVKGYFIWSLMDVFSWSNG-YEKRYGLFYVDFETQERY-----PKKS 454
Mycoplasma mycoides            QGSNCFGYQMWTLIDNWSWANG-FKNRYGFISLDTKTLKRT-----IKKS 464
Salmonella enterica            DGVDLMGYTPWGCIDCVSFTTGQYSKRYGFIYVNKHDDGTGDMSRSRKKS 462
Escherichia coli               DGVDLMGYTPWGCIDCVSFTTGQYSKRYGFIYVNKHDDGTGDMSRSRKKS 464
Yersinia pestis                DGVDLMGYTPWGCIDCVSFTTGEYSKRYGFIYVDKNDDGTGTMARSRKLS 472
Vibrio cholerae                DGVEVMGYTPWGCIDCVSFTTGEYKKRYGFIYVDKHDDGSGTMARAKKKS 463
Staphylococcus aureus          DGVDLIGYTPWGIIDIVSFTTGEMKKRYGLIYVDRDNDGHGTMERLKKDS 463
Enterococcus faecium           DQVDCFGYLTWAPIDLVSATTGEMKKRYGFIYVDKDDEGNGTLERYKKDS 460
Listeria innocua               DGVDMLGYCTWSFTDLLSWLNG-YQKRYGFVYVDRDVEDDAPMTRIPKKS 463
                                    **  *   *  .   *    *:*:   :             : :
```

B

```
Spodoptera frugiperda        AWSLMDNFEWMEG-YIERFGLYEVDFSDP---ARTRTPRKAAFVYKHIIK 488
Drosophila melanogaster      AWSLMDSYEWKAG-FSEKFGLYHVDFNSP---QRTRTPKISARVFAQLCK 490
Brevicoryne brassicae        VWSLLDNFEWFYG-YSIHFGLVKIDFNDP---QRTRTKRESYTYFKNVVS 460
Tenebrio molitor             AWSLMDNFEWMAG-YTQRFGMHYVDFDDP---ERPRTRKLSSYVYNNIIT 482
Cavia porcellus              AWSLLDNFEWNDG-YSKRFGLFHVDFEDP---AKPRVPYTSAKEYAKIIR 461
Xenopus tropicalis           AWSLMDNFEWAAG-YTERFGLYYVNFTDP---GVPRIPKDSVKYYRSIIQ 531
Homo sapiens                 SWSLLDKFEWEKG-YSDRYGFYYVEFNDR---NKPRYPKASVQYYKKIII 499
Trifolium repens             AWSFLDCNEWFAG-FTVRFGLNFVD------------------------- 493
Vicia sativa                 AWSFSDSYEWDAG-YTLRFGIIYVDFKD----NLRRYPKYSALWLQKFLL 508
Viburnum furcatum            TWSLLDDWEWNSG-FNVRFGIVYIDHED----GLKRYLKYSALWFKKLFG 537
Lycopersicon esculentum      AWSLLDNFEWRLG-YTSRFGIVYVDFN-----TLRRYPKMSAYWFKKLLK 510
Oryza sativa                 AWSLLDNFEWLSG-YTSKFGIVYVDFN-----TLERHPKASAYWFRDMLK 503
Cucurbita pepo               AWSLLDNFEWANG-YSMRFGLTYVDFKN----DLTRTQKDSAKWFLNFLT 489
Digitalis lanata             IWSFADNFEWNAG-YTSRFGIFYVDFVNG---QYTRYPKSSALWWTNFLH 596
Arabidopsis thaliana         VSSLMDGLEWEDG-YKTRSGLYYVDYGH----NMGRHEKQSAKWLSKLLE 513
Sinapis alba                 AWALGDNYEFNKG-FTVRFGLSYIDWNN----VTDRDLKKSGQWYQSFIS 500
Sorghum bicolor              AWSLLDNFEWSSG-YTERFGIVYVDREN----GCERTMKRSARWLQEFNG 547
Zea mays                     AWSLLDNFEWFAG-FTERYGIVYVDRNN----NCTRYMKESAKWLKEFN- 553
Avena sativa                 TWSLIDNFEWSLG-YLSRFGIVYIDRND----GCKRIMKKSAKWLKEFNG 548
Talaromyces emersonii        AWSLLDNFEWSEG-YRSRFGVTYVDYKN----GQKRIPKKSALVIGELFN 483
Leucophaea maderae           VWSLIDNFEWADG-YTSKWGLYHVDFNDP---ERKRTPKASSHFMENVTS 500
Caenorhabditis elegans       LWTLMDNFEWDDG-FGVKFGICRVDFDSP---DKTRTMKYSAKYYQTFIR 470
Leishmania infantum          SWGPIDLVSASKAEMSKRYGFIYVDRDDAGNGSLERHRKKSFYWYRDVIQ 457
                                 *  .   .    : *.  ::
```

C

```
Spodoptera frugiperda        NGWSTDESR 408
Drosophila melanogaster      NGVSD---- 410
Brevicoryne brassicae        NGYGD---- 379
Tenebrio molitor             NGFSD---- 419
Cavia porcellus              NGFPQDDP- 381
Xenopus tropicalis           NGISERG-- 451
Homo sapiens                 NGASQKFH- 419
Trifolium repens             NGMNEFNDA 431
Vicia sativa                 NGVAQSRND 425
Viburnum furcatum            CGLAEANIN 456
Lycopersicon esculentum      NGMDYAGNI 430
Oryza sativa                 NGMDQPANL 423
Cucurbita pepo               NGYLDYDSP 408
Digitalis lanata             NGASENANT 512
Arabidopsis thaliana         NGYKETLEE 429
Sinapis alba                 NGISTPGDE 418
Sorghum bicolor              NGMGDIDKG 464
Zea mays                     NGIGDVDTK 469
Avena sativa                 NGTADMDGW 463
Talaromyces emersonii        NGTSVKGES 399
Leucophaea maderae           NGFAD---- 419
Caenorhabditis elegans       NGCMDLVGG 385
Leishmania infantum          NGVGAKDRI 371
                              *
```

D

```
Spodoptera frugiperda        400 NGWSTD 405
Pyrococcus furiosus          325 NGIAT- 330
Thermococcus sp              321 NGIAT- 326
Streptomyces griseus         380 NGAAYD 385
Thermus thermophilus         338 NGAAYP 343
Micrococcus antarcticus      378 NGASYT 383
Paenibacillus polymyxa       357 NGAAMR 362
Bacillus sp                  354 NGACYE 359
Thermotoga maritima          352 NGAAFD 357
Clostridium cellulovorans    353 NGAAFN 358
Lactococcus lactis           376 NGLGYK 381
Streptococcus sanguinis      376 NGLGYK 381
Mycoplasma mycoides          382 NGIGVS 387
Salmonella enterica          376 NGFGAY 381
Escherichia coli             377 NGFGAY 382
Yersinia pestis              386 NGFGAI 391
Vibrio cholerae              377 NGLGAL 382
Staphylococcus aureus        377 NGFGAV 382
Enterococcus faecium         374 NGLGAI 379
Listeria innocua             389 NGLGEF 384
```

FIGURA 5.13.6.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). **(A e B)** Em vermelho está o resíduo F460 da Sfβgli50 e em amarelo estão os correspondentes a este resíduo nas β-glicosidases de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. **(C e D)** Em vermelho está o resíduo S403 da Sfβgli50 e em amarelo estão os correspondentes a este resíduo nas β-glicosidases de **(C)** EUKARIA e **(D)** BACTERIA e ARCHEA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.7. Semelhanças entre as mutações dos resíduos S403, F460, Y331, H330 e S378.

De acordo com os dados as mutações entre os resíduos S403, F460, Y331, H330 e S378 apresentam como ponto em comum a alteração da especificidade pelo substrato favorecendo (para as mutações S378A, S378G e H330A) ou tornando gluco o substrato melhor hidrolisado em detrimento de fuco (mutações Y331F, F460A e S403A). Este efeito deve-se a alterações em "contatos" com a plataforma basal do glicone, W444. A tabela de "contatos" entre os resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.11.1.) mostra que o W444 está a menos de 3,4 Å de pelo menos 12 átomos de 5 resíduos, sendo que em um destes ele forma uma ligação de hidrogênio (O do W444 com o N do N400, ambos do "backbone"). Esta proximidade com vários resíduos se deve ao fato desse resíduo ser volumoso, mas pode também ser entendido como um indício da importância de seu papel para a Sfβgli50.

Nas glicosil hidrolases da família 1 esta plataforma basal é muito conservada (figura 5.11.9.1.) e tem como possível papel realizar interações com o monossacarídeo que constitui o glicone. Interações do tipo "empilhamento" entre o anel hidrofóbico do resíduo constituinte da plataforma

basal do glicone com o anel do monossacarídeo do glicone favorece o posicionamento do glicone e o estabelecimento do complexo $ES^{\ddagger}$. Há também a formação de ligações de hidrogênio entre a plataforma basal e o glicone (Nε1 da plataforma com a OH4 do glicone) (Zechel *et al*., 2003; Verdoucq *et al*., 2004; Czjzek *et al*., 2001 e Zouhar *et al*., 2001), como comentado no item 2.4.8. (figura 2.4.8.1.). Logo, possíveis alterações na "liberdade de posicionamento" que as mutações Y331F, F460A, S403A, S378A, S378G e H330A possam ter causado na plataforma basal devem ter interferido nas interações do tipo "empilhamento" do glicone, mais precisamente do tipo fuco, e o efeito final foi à alteração da especificidade acompanhada de queda da atividade enzimática (ressaltando que o parâmetro cinético mais alterado nestas mutantes foi justamente a eficiência catalítica).

5.13.8. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos S358, D362 e E458.

A S358 foi substituído por F na Sfβgli50 mutante 24C12 selecionada na "varredura" (figura 5.9.1. e tabela 5.9.1.). O alinhamento de β-glicosidases GH 1 de Eukaria revela que S358 não é conservado e, além disso, está presente em um trecho de aminoácidos que também não são conservados (figura 5.11.10.1.). Em termos estruturais também não há uma boa sobreposição entre o trecho em que este resíduo se encontra na Sfβgli50 com outras β-glicosidases, formando alças com tamanhos distintos, pois há alguns "gaps" neste trecho quando as comparamos (ver sobreposição entre Sfβgli50 com Zmglu1 e BglB, figura 5.9.1.2. - C e D). A análise do mapa de "contatos" e da tabela de distâncias e interações entre resíduos da Sfβgli50 (figura 5.13.1.;

tabela 5.13.1.) mostra que S358 faz unicamente uma ligação de hidrogênio entre seu Oγ com o Oγ1 do resíduo T356.

Na tentativa de entender a participação da S358 na atividade e especificidade da Sfβgli50 foi criada uma mutante na qual se remove a hidroxila de sua cadeia lateral, S358A. Além disto, procurou-se possíveis "conexões" da alça em que este resíduo se encontra com trechos que se conectem com o sítio ativo (figura 5.13.1.; tabela 5.13.1.). Assim, foram selecionados os resíduos D362 e E458, tendo sido criadas as mutantes D362A, E458A e E458D. De acordo com o mapa de "contatos" (figura 5.13.1.) o resíduo D362 é capaz de fazer uma ligação de hidrogênio com a S403 (N do D362 com o O da S403, ambos do "backbone"), além de possuir um "contato" com o resíduo E458 (C do "backbone" do D362 com o Oε2 do E458 e o O também do "backbone" do D362 com Cδ, Oε1 e Oε2 do E458). Este segundo resíduo, E458, por sua vez, faz uma ligação de hidrogênio com a S403 (Oγ da S403 com Oε2 do E458) e está a um resíduo da F460. Como já comentado tanto a S403 como a F460 fazem "contatos" com o W444, plataforma basal do glicone (item 5.13.6.).

Assim, a análise destas cinco enzimas mutantes (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revela que as alterações de atividade enzimática não foram tão drásticas, com reduções de 4, 3 e 2,5 vezes para a mutante S358F, 2,3, 2,3 e 2 vezes para a mutante D362A, 2,6, 8 e 3 vezes para a mutante E458A e 2, 4,5 e 3 vezes para a mutante E458D sobre os substratos fuco, gluco e gala, respectivamente, enquanto a mutação S358A causou uma queda inexpressiva de atividade (1,7, 1,7 e 1,2 vezes sobre os substratos fuco, gluco e gala).

Em termos de especificidade pelo substrato as mutações D362A e S358A não causaram alterações, sendo observada 25% de atividade sobre gluco em relação a fuco para ambos. As mutantes do resíduo E458 apresentaram queda da eficiência catalítica relativa de gluco sobre fuco, passando de 26% na enzima selvagem para 11% na E458D e 8,2% na E458A. A mutante S358F apresentou um aumento na eficiência catalítica relativa de gluco sobre fuco (35%).

Assim, buscando verificar a possibilidade de propagação de efeitos da mutação S358F até o sítio ativo, mais especificamente até a plataforma basal do glicone, W444, através de uma "via de contatos" que envolveria D362, S403 e E458, foi feita inicialmente uma análise do efeito das mutações no ponto mais próximo ao sítio ativo (figura 5.13.1.). Os dados das mutantes E458A e E458D indicam que a remoção ou alteração da ligação de hidrogênio entre o resíduo E458 e a S403 ($O\gamma$ da S403 com o $O\varepsilon2$ do E458) e de possíveis interações com o D362 (devido a remoção do $C\delta$, $O\varepsilon1$ e $O\varepsilon2$ do E458, os quais ficam a menos de 3,4 Å de átomos do "backbone" do D362A), nas mutantes E458A e E458D, tiveram como efeito a redução da eficiência catalítica relativa de gluco em relação à fuco. Assim, pode ser proposto que mutações do resíduo E458 têm o efeito "transmitido" ao sitio ativo "via conexão" com a S403, F460 e o W444. Deve ser ressaltado que, como foi comentado anteriormente, E458A e E458D foram, dentre às mutações analisadas neste item, aquelas que causaram maior queda da atividade enzimática. Tendo sido maior para a mutante E458A (eficiência catalítica de E458A foi 1,3, 2 e 1,2 vezes menor do que a da mutante E458D sobre fuco, gluco e gala, respectivamente), talvez devido à remoção mais drástica da cadeia lateral na troca de E para A.

Considerando a hipótese de uma “via que conectaria” a S358 ao sítio ativo, um possível ponto intermediário seria o resíduo D362. No entanto, para mutante D362A não se verificou alterações em termos de especificidade pelo substrato. Porém, todas as possíveis interações usuais que este resíduo seria capaz de fazer na enzima selvagem ainda estariam presentes na mutante D362A, pois ele faz uma ligação de hidrogênio com a S403 através de átomos do seu “backbone”, assim como também são átomos de seu “backbone” que estão a menos de 3,4 Å do resíduo E458. Isto justificaria não terem sido verificadas alterações na sua especificidade pelo substrato na mutação D362A.

Finalmente, observa-se que a mutação S358A não tem efeito sobre a especificidade pelo substrato da Sfβgli50, enquanto que S358F (24C12) causou aumento da preferência por gluco em relação à fuco. Esta diferença pode ser um efeito da acomodação de um resíduo muito mais volumoso, F, onde antes existia uma S, ao contrário do que ocorre na mutação S358A cuja alteração de volume não deve ser tão drástica. Assim, o efeito “drástico” da mutação S358F pode ter se “propagado” alterando o posicionamento do resíduo D362, o qual faz ligação de hidrogênio com a S403 e “contatos” com o E458 e, consequentemente, ter atingido resíduos como a F460 e a plataforma basal do glicone, W444, alterando a especificidade pelo substrato e também provocando queda da atividade enzimática.

A

```
Spodoptera frugiperda          RKGPYPVPSLLDDVDTGSWADDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLN-NL 389
Pyrococcus furiosus            NPLKFFFDAKLADVSE---------RKTQMGWSVYPRGIYIALKKAS-KY 316
Thermococcus sp                NPLRR-FAVEDAGVS----------RKTDMGWSVYPKGIYDGLRAFA-EY 312
Streptomyces griseus           SESPSPWAGAERHVAFTPAA----GPRTAMDWPVDADGLYELLTRLRDEL 371
Thermus thermophilus           GTLP---------VRYLPPE----GPATAMGWEVYPEGLHHLLKRLGREV 330
Micrococcus antarcticus        DSPKSSPFVGSEYVTFPARD----LPRTAMGWEVNPEGLRVLLNRLNQDY 367
Paenibacillus polymyxa         NDAS------LLQVEQVHME----EPVTDMGWEIHPESFYKLLTRIEKDF 346
Bacillus sp                    KEG-----EGLFDCEEVQVG----FDKTFMDWNVYAEGLYKVLSWVHEEY 344
Thermotoga maritima            DP------DAPAKVSFVERD----LPKTAMGWEIVPEGIYWILKKVKEEY 342
Clostridium cellulovorans      NS------EAFIGAESVAMD----NPKTEMGWEIYPQGLYDLLTRIHRDY 343
Lactococcus lactis             NGKGEKGSSKYQIKGVGRRVAPDYVPRTDWDWIIYPEGLYDQIMRVKNDY 365
Streptococcus sanguinis        NGKGEKGSSKYQIKGVGRRESPTHIPKTDWDWIIYPQGLYDQIMRIKKDY 365
Mycoplasma mycoides            ELKLENWFLPYTNKNIRIN--------PYRGWEIHPQTLYDIAIDIKNNY 372
Salmonella enterica            ----------ISGFEGSVPN--PYVKASDWGWQIDPVGLRYSLCELYERY 367
Escherichia coli               ----------ISGFEGSVPN--PYVKASDWGWQIDPVGLRYALCELYERY 369
Yersinia pestis                ----------LSGFEGSVPN--PHVKASDWGWQIDPVGLRYSLSVLYERY 377
Vibrio cholerae                ----------TSLFETSRLN--PYLPASDWGWQIDPQGLRYALSELYERY 368
Staphylococcus aureus          --------IVNGGLNHSVEN--PHIATSDWGWAIDPDGLRYTLNVLYDRY 369
Enterococcus faecium           ------------ALFGGLQN--PYLVTSKWGWTIDPTGLRYLLNYTYRKY 365
Listeria innocua               GKKGSTKETGVPGVYKKVVN--PFVKTTNWDWTIDPKGLQIALRRINSRY 371
                                                              .     : .  :
```

B

```
Spodoptera frugiperda          RGTSDLIGVNHYTAFLVSATERK--GPYPVPSLLDDVDTG-SWADDSWL- 365
Drosophila melanogaster        RGTSDFFGINSYTSNLVTSNGHNNTGKFPVPSFNHDMGVVESQEGVDWP- 371
Brevicoryne brassicae          KGTADFYALNHYSSRLVTF---GSDPN---PNFNPDASYV-TSVDEAWLK 340
Tenebrio molitor               KGTFDFLGLNHYSSDKVYF---AEDGAGDHPSHWADTGVI-GYQDASWP- 362
Cavia porcellus                KGTADFFAVQYYTTRFIRH---KENKEAE-LGILQDAEIE-LFSDPSWK- 341
Xenopus tropicalis             KGTHDFFGLNHYTTVLAAP---LDFPEGD-PTYDADRGTA-VMSDRTWL- 410
Homo sapiens                   KGTSDFLGLGHFTTRYITE---RNYPSRQGPSYQNDRDLI-ELVDPNWP- 377
Trifolium repens               NGSFDFIGINYYSSSYIS-NAPSHGNAKPSYSTNPMTNISFE-KHGIPLG 382
Vicia sativa                   KGSYDFLGVNYYSTYYAQ-SAPLT-TVNRTFYTDIQANVSPL-KNGAPIG 381
Viburnum furcatum              KGSIDFLGLNYYTSIYAA-NNESPNPHDISYTTDSRVNLFQK-RDGILIG 412
Lycopersicon esculentum        KGSFDYVGINQYTSYYMY-DPHYTTPQPLGYQQDWNVGFAYD-RKGVPIG 386
Oryza sativa                   KGSADYIGINQYTASYMK-GQQLMQQTPTSYSADWQVTYVFA-KNGKPIG 379
Cucurbita pepo                 MNSFDFLGINYYTANYAK-DNPSDIHPAQSYLNDIHATLSTD-CDGISIG 363
Digitalis lanata               RGSYDFLGVNYYTTYYAI-NLPIPPIAPPNYFSDMGVLSTPT-RGGVPIG 462
Arabidopsis thaliana           KGSYDFVGINYFTSTFVAHTDN-VNPEKPSWEADSRLQLHSNNVDGFKIG 385
Sinapis alba                   KGSYDFLGLNYYFTQYAQPSPNPVNSTNHTAMMDAGAKLTYINASGHYIG 368
Sorghum bicolor                VGSYDMIGINYYTSTFSKHIDLSPNNSPVLNTDDAYASQETKGPDGNAIG 420
Zea mays                       AGSYNMLGLNYYTSRFSKNIDISPNYSPVLNTDDAYASQEVNGPDGKPIG 425
Avena sativa                   VSSYDFVGINYYTSRFAKHIDISPEFIPKINTDDVYSNPEVNDSNGIPIG 419
Talaromyces emersonii          HGSNDFYGMNHYCENYIRNRTGEPDPEDTAGNLDILME----DKNGNPIG 355
Leucophaea maderae             KGTADYFAFNAYTAFLVNK---SNTENL-TPSWAHDLAIS-AYEGSNWLI 379
Caenorhabditis elegans         KGSTDFLGINYYLSHIVRN---LNDGEEPASQSERDAAYAFNEGKWEKIC 344
Leishmania infantum            RETIDFISFSYYMSGCVTTDEQQNNAARANILNMVPNPHLASSEWGWQID 339
                                 : :  ..  :
```

FIGURA 5.13.8.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Em vermelho está o resíduo S358 da Sfβgli50 o qual foi substituído por F na mutante 24C12 selecionada na "varredura". **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.9. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos T35 e R97.

A T35 foi mutada por A na enzima 4C11 selecionada na "varredura". Como já comentado anteriormente (item 5.9.) este resíduo encontra-se no início de uma alça (32-GTATASYQ-39) da Sfβgli50 que tende a ter uma estrutura secundária conservada e aminoácidos com cadeias laterais pouco volumosas (figura 5.9.1.1.; figura 5.9.1.2. - I e figura 5.11.9.3.). Um dos resíduos que faz parte dessa alça é o Q39, o qual é muito conservado entre as β-glicosidases GH 1 e que faz ligações de hidrogênio com a OH3 e OH4 do glicone (Marana *et al*., 2002).

O mapa e a tabela de "contatos" entre os resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.13.1.; figura 5.13.1.) mostram que o resíduo T35 faz ligações de hidrogênio com os resíduos Y96 e R97 (Oγ1 da T35 com a OH da Y96; N da T35 e o O da R97, ambos do "backbone") e está a menos de 3,4 Å da F98 (O do "backbone" da T35 com o Cα da F98). Sabe-se que o resíduo R97 participa da modulação do pK_a do nucleófilo catalítico, E399 (Marana *et al*., 2003) (NH2 da R97 faz uma ligação salina ou eletrostática com o Oε2 do E399), e, de acordo com o mapa de "contatos", também é capaz de fazer uma ligação de hidrogênio com a H142 que também é um resíduo do sítio ativo (NH2 da R97 com o Nε2 da H142) e capaz de fazer uma ligação de hidrogênio com a OH2 e OH3 do glicone (Marana, 2006). De acordo com a figura 5.13.9.1. o trecho de aminoácidos 96-YRF-98 tende a ser conservado nas β-glicosidases tanto de Eukaria como em algumas de Bacteria, sendo que o resíduo R97 tende a ser conservado nas β-glicosidases de todos os grupos (Eukaria, Bacteria e Archea). Como na Sfβgli50 mutante selecionada na "varredura" a cadeia lateral da T35 já havia sido removida, devido a troca por A, foram feitas mutações no

resíduo R97, criando a mutante R97M e R97K, com a finalidade de verificar o efeito da retirada da carga positiva e da diminuição da cadeia lateral conservando a carga positiva, respectivamente.

A caracterização cinética das mutantes T35A, R97M e R97K (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) mostra que as quedas mais drásticas de atividade enzimática foram verificadas para as mutantes do resíduo R97 (queda de 29 e 5 vezes para a mutante R97K, 48 e 74 vezes para a mutante R97M e de 3 e 5 vezes para a mutante T35A sobre os substratos fuco e gluco, respectivamente). Em relação à especificidade pelo substrato, as mutações T35A e R97M apresentaram uma pequena queda da eficiência catalítica sobre gluco em relação à fuco, passando de 26 % na selvagem para 16 % e 17 % na T35A e R97M, respectivamente. No entanto, a mutação R97K apresentou uma inversão da especificidade pelo substrato, passando a hidrolisar gluco preferencialmente (a eficiência catalítica sobre fuco passou a ser de 66% em relação à gluco).

Considerando que a mutação R97M remove as ligações de hidrogênio com H142 e a interação eletrostática com E399, pode-se concluir que estes "contatos" sejam importantes na modulação da especificidade pelo substrato da Sfβgli50. Do mesmo modo a mutação T35A somente altera o "contato" formado entre o Oγ1 da T35 e a OH da Y96. Assim, a semelhança entre as alterações da especificidade pelo substrato causada pelas mutações T35A e R97M sugere que o resíduo T35 afeta a especificidade "via" interação com a Y96 que, por estar ao lado da R97 (Cβ e o Cγ da Y96 estão a menos de 3,4 Å do N do "backbone" da R97, assim como também o C e O do "backbone" da Y96 em relação ao Cα da R97) pode, talvez, influenciar seu posicionamento, causando uma alteração semelhante à remoção das interações da R97 com a H142 e o

E399 na mutação R97M. A maior queda de atividade enzimática causada pela mutação R97M em comparação a mutação T35A pode ser devido à total remoção de suas ligações de hidrogênio com H142 e E399 e não somente a uma perturbação delas, como é imaginado que deva ter ocorrido na mutação T35A.

Na mutação R97K há um encurtamento da extensão da cadeia lateral do resíduo 97, mas com a manutenção da carga positiva. Assim, mesmo que a ligação de hidrogênio com o H142 e a interação eletrostática com o E399 mantenham-se nesta mutante elas devem estar alteradas. Estas alterações, provavelmente enfraquecendo estas ligações devido um aumento da distância entre os átomos envolvidos, podem ser as responsáveis pela inversão da especificidade pelo substrato. Além desta possível "via" conectando T35/Y96/R97 e os resíduos H142 e E399, podem haver outras formas da R97 e T35 atuarem sobre resíduos do sítio ativo. O resíduo T35 está ao lado do resíduo A34 e A36. A tabela de distâncias e interações entre resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.13.1. e figura 5.13.1.) revela que a A34 está próxima do nucleófilo catalítico, E399, e dos resíduos A443 e S445, os quais estão ao lado da plataforma basal do glicone, W444. A34 também faz uma ligação de hidrogênio com a A443 (N da A34 com o O da A443, ambos do "backbone"). Além disso, o Cβ da A34 e o Oε1 do E399, o Cα da A34 e o O do "backbone" da R97, o O da A34 e o N mais o Cα da S445, ambos do "backbone", estão todos a menos de 3,4 Å de distância. A A36 está ao lado do resíduo Q39 (O está a menos de 3,4 Å do N do resíduo Q39, ambos do "backbone"). Assim, uma hipótese mais abrangente para entender parte do efeito das mutações T35A, R97M e R97K pode incluir às pequenas alterações no contato com Q39 e o segmento que contém W444 e E451.

A

```
Spodoptera frugiperda          ---GDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPA 117
Pyrococcus furiosus            ---SGKACNHWEFYKEDIQLMASLGYNAYRFSIEWSRLFPE--ENKFNEE 86
Thermococcus sp                ---AGKACNSWELYEKDLELMAGLGYAAYRFSIEWGRVFPE--EGRPNEE 84
Streptomyces griseus           ---GDIAADHLHRMPDDVALMKELGVTDYRFSVSWPRVQPT-GRGPAVER 115
Thermus thermophilus           ---GEPACDHYRRYEEDIALMQSLGVRAYRFSVAWPRILPE-GRGRINPK 94
Micrococcus antarcticus        ---LEVAVDHYHRYREDVQLMRELGLDSYRFSTSWARVVPG-GR-TVNPE 100
Paenibacillus polymyxa         ---GDVACDHFHHFKEDVQLMKQLGFLHYRFSVAWPRIMPA-AG-IINEE 97
Bacillus sp                    ---GDIACDSYHRYEEDIALLKNLGVKAYRFSIAWPRIYPD-GDGELNQK 96
Thermotoga maritima            ---GDVACDHYNRWKEDIEIIEKLGVKAYRFSISWPRILPE-GTGRVNQK 96
Clostridium cellulovorans      ---GDIACDHYHRYKEDVQLLKSLGIKSYRFSIAWPRIFPK-GFGEINQK 96
Lactococcus lactis             ---P--ASDFYHKYPVDLELAEEYGVNGIRISIAWSRIFPTGYG-EVNEK 91
Streptococcus sanguinis        ---P--ASDFYHKYPVDLKLAEEYGVNGIRISIAWSRIFPTGYG-EVNPK 91
Mycoplasma mycoides            ---PNITCDTYSNYKTDVKLMSEIGLNSFRTSIQWTRLIKNLYTGEVDLK 110
Salmonella enterica            YYPNHEAVDFYGHYKEDIRLFAEMGFKCFRTSIAWTRIFPNGDESQPNEA 107
Escherichia coli               YYPNHEAVDFYGHYKEDIKLFAEMGFKCFRTSIAWTRIFPKGDEAQPNEE 109
Yersinia pestis                RYPNHEAVDFYSHYKEDIALFAEMGFKCFRTSIAWTRIFPHGDEQQPNEA 116
Vibrio cholerae                FYPNHQAVDFYHHYKEDIALFAEMGFKCFRTSIAWTRIFPNGDEAEPNEA 107
Staphylococcus aureus          YYPNHEGIDFYHRYKEDIALFNEMGLKCLRTSIAWTRIFPNGDEDVPNEE 105
Enterococcus faecium           TYPSHMGIDLYHQYKSDIRLFSEMGFTALRISIDWSRIFPNGDDEQPNQE 104
Listeria innocua               ----DVAVDHYHRYKEDVKLMAEAGLKAYRFSIAWTRIFPNG-KGEVNEA 99
                                      :       *: :    *    * *  * *:
```

B

```
Spodoptera frugiperda          EMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGM-ANEVNPAGIAFYNNYIDEMLKYNI 134
Drosophila melanogaster        QMVKELHVGTYRFSLSWPRIMPGGY-MNHVSTAGIKYYSNLIDELLRYNI 135
Brevicoryne brassicae          AIIKDLNLKFYRFSISWARIAPSGV-MNSLEPKGIAYYNNLINELIKNDI 114
Tenebrio molitor               QMLKTLGVNFYRFSIAWSRVLPTGK-ADEVNQAGIDYYNNLIDELLANDI 133
Cavia porcellus                KCIKQLGLTHYRFSISWSRLLPDGT-TGFINQKGVDYYNKIIDDLLTNGV 112
Xenopus tropicalis             EMLRNLKVSHYRFSISWPRVLPDGT-VKSFNQAGLDYYIRLIDALLAANI 181
Homo sapiens                   ILLRELHVNHYRFSLSWPRLLPTGIRAEQVNKKGIEFYSDLIDALLSSNI 147
Trifolium repens               GIMKDQNMDSYRFSISWPRILPKGKLSGGINHEGIKYYNNLINELLANGI 150
Vicia sativa                   KIVKEIGLDSYRFSISWSRIFPKGK--GEVNPLGVKFYNNVINEILANGL 150
Viburnum furcatum              KLMKKIGVNGFRFSISWTRILPSGKLCGGVNKEGVAFYNSLINELLANGI 184
Lycopersicon esculentum        DLMAKLNFEAYRFSISWSRIFPNGT--GKVNWKGVAYYNRLIDYMLKRGI 154
Oryza sativa                   NLMKSLNFDAYRFSISWSRIFPDGE--GRVNQEGVAYYNNLINYLLQKGI 150
Cucurbita pepo                 ALMKSIGFGVYRFSIARTRILPLGKLSGGVNKDGIEYYHNLIDELLANGI 130
Digitalis lanata               KIMKRAGLEAYRFSISWPRILPGGKLSTGVNKEGIKYYNDLIDAIIAEGM 131
Arabidopsis thaliana           QLLKKLNMDAFRFSISWSRIFPHGKKDKGVSETGVKFYNDLINELIANGV 149
Sinapis alba                   DVLDELNATGYRFSIAWSRIIPRGKRSRGVNEKGIDYYHGLISGLIKKGI 133
Sorghum bicolor                RLLKEMGMDAYRFSISWPRILPKGTLAGGINEKGVEYYNKLIDLLLENGI 186
Zea mays                       RLLKEMGMDAYRFSISWPRILPKGTKEGGINPDGIKYYRNLINLLLENGI 188
Avena sativa                   RMLKEIGMDSYRFSISWPRILPKGTLDGGINHEGIQYYNDLLDCLIENGI 184
Talaromyces emersonii          EILKKYGAKIYRFSLSWPRIIPLGGRNDPINEKGLQFYSKFLDDLHAAGI 124
Leucophaea maderae             QAAKTMGLDSYRFSMSWPRIMPTGF-PDNINQKGIDYYNNLINELVDNGI 149
Caenorhabditis elegans         ALLSKIGVTSYRFSISWSRILPDGT-LKTINEDGIQFYRDICLLLRDNGI 115
Leishmania infantum            ALFAEMGFKCLRTSIAWTRIFPQGD-EDTPNEAGLAFYDRLFDEMAKYGI 119
                                         * *:: .*: * *      .  *: :*      :   .:
```

FIGURA 5.13.9.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Em vermelho estão os resíduos Y96, R97 e F98 da Sfβgli50 e em amarelo estão os correspondentes a estes resíduos nas β-glicosidases de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.10. Efeitos decorrentes da dupla mutação Y331F/R97M.

A Sfβgli50 duplo mutante Y331F/R97M foi construída com o objetivo de observar como efeitos de mutações em resíduos de “vias de contato” distintas se combinam e convergem para o sítio ativo. Assim, os dados observados para esta dupla mutação demonstram o fato de que os efeitos de mutações isoladas não são simplesmente somados em uma dupla mutação. Diferentemente da mutante R97M que possui a preferência por fuco ampliada, esta Sfβgli50 duplamente mutante apresenta uma eficiência catalítica relativa alterada, tornando-se gluco o substrato melhor hidrolisado, assim como na mutação simples Y331F. Porém, a queda da preferência por fuco é ainda maior do que aquela verificada para a mutante Y331F. Na mutação simples Y331F o substrato fuco passou a ter uma eficiência catalítica relativa em torno de 86% em relação a gluco, enquanto esta dupla mutação reduziu a eficiência catalítica relativa de fuco para 27% (tabela 5.10.1.1.).

A queda da atividade enzimática também reflete o fato dos efeitos da dupla mutação não serem decorrente de uma simples multiplicação dos efeitos observados nas mutantes simples. Assim, observou-se uma queda de atividade sobre fuco e gluco de cerca de 3000 e 230 vezes para a dupla mutação, 50 e 74 para a mutante R97M e 280 e 61 vezes para a mutante Y331F, respectivamente.

Sabe-se que os dois resíduos mutados, como já comentado, participam da modulação do pK_a do nucleofilo catalítico, E399, na Sfβgli50 (Marana *et al.*, 2003). Logo, a maior queda da atividade enzimática pode ser devido à perda total dessa modulação, o que elevaria o pK_a do nucleofilo catalítico, E399,

tornando-o inapto à participar da catálise em pH 6,0. Pode-se sugerir que a modificação muito mais drástica da preferência pelo substrato na Y331F/R97M pode refletir uma combinação de efeitos sobre a plataforma basal do glicone, W444, pois os dados sugerem que tanto R97 como Y331 participam de "vias de contato" que atingem o W444 no interior do sítio ativo (itens 5.13.5. e 5.13.9.).

5.13.11. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos R474 e M447.

O resíduo R474 foi substituído por H na mutante 19C7 selecionada na "varredura" (item 5.9.). Trata-se de um resíduo muito conservado entre as β-glicosidases GH 1 de Eukaria e que na Sfβgli50 está presente no final de uma α-hélice (figura 5.9.1.1.; figura 5.9.1.2. - J; figura 5.13.11.1.).

De acordo com o mapa de "contatos" e a tabela de distâncias e interações entre resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.13.1.; figura 5.13.1.) o resíduo R474 somente faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo M447 (NH1 da R474 faz uma ligação de hidrogênio com o Sδ da M447) além de terem outros átomos de suas cadeias laterais a menos de 3,4 Å (Cβ da M447 com o NH1 da R474 e o Sδ da M447 com o NH2 da R474). Este resíduo, M447, está no trecho de aminoácidos 443-AWSLMDNFE-451 que contém a plataforma basal do glicone, W444, e o resíduo E451 que interage com a OH4 e OH6 do glicone (Marana *et al*., 2002). Assim, o resíduo R474 poderia influenciar a especificidade e atividade enzimática ao afetar este trecho de aminoácidos. Deve ser ressaltado que este trecho de aminoácidos possui resíduos muito

conservados, como o W, a S e o E. Porém, a M447 tende a ser substituída por L nas β-glicosidases de Eukaria e em algumas de Bacteria (figura 5.13.11.1.).

Considerando que a R474 está mais próxima da M447, criou-se uma Sfβgli50 mutante M447A, além de uma R474A. A caracterização cinética destas mutantes (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revelou que a remoção das cadeias laterais da R474 e da M474 (mutações por A) causaram alterações da especificidade pelo substrato e da atividade enzimática. De tal forma que gluco tornou-se o substrato melhor hidrolisado, sendo que a eficiência catalítica sobre fuco passou a ser de 75% e 71% em relação à gluco para R474A e M447A, respectivamente. Também houve uma queda de atividade enzimática sobre todos os substratos (de 400 e 76 vezes para a R474A e de 440 e 80 vezes para a M447 sobre fuco e gluco, respectivamente).

Esta inversão da especificidade se assemelha a verificada com as mutações Y331F, F460A e S403A, cujos dados, como já comentados (item 5.13.7.), sugerem que tenham provocado alterações no posicionamento da plataforma basal do glicone, W444. Considerando que tanto na mutação M447A como na R474A houve a remoção da ligação de hidrogênio entre estes dois resíduos. Isto indica a importância do “contato” entre R474 e M447 para a manutenção do posicionamento do trecho de aminoácidos 443-AWSLMDNFE-451 e, assim, para que a plataforma basal do glicone tenha uma disposição favorável ao estabelecimento do complexo ES. Como o trecho de aminoácidos 443-AWSLMDNFE-451 também contém E451 que interage com a OH4 e OH6 do glicone, pode-se sugerir que a inversão de especificidade também poderia

ser conseqüência de modificações na interação de E451 com a OH6, que está presente em gluco, mas ausente em fuco.

A mutação R474H causou uma diminuição da eficiência catalítica relativa sobre gluco, passando de 26% na selvagem para 4% na mutante. Este efeito foi devido a uma queda mais drástica da atividade enzimática sobre gluco (185 vezes) do que fuco (28 vezes). Assim, pode se supor que na mutante R474H novos “contatos” tenham sido formados entre o anel da H com a M447 resultando em um efeito distinto da mutação R474A sobre o trecho de aminoácidos 443-AWSLMDNFE-451.

A

```
Spodoptera frugiperda          DGINLKGYMAWSLMDNFEWMEG-YIERFGLYEVDFSDPARTRT---PRKA 479
Pyrococcus furiosus            DGLDVRGYFYWSFMDNYEWREG-FEPRFGLVEVDYETFERR-----PRKS 395
Thermococcus sp                EGIDVRGYFYWSLVDNYEWAEG-FRPRFGLVEVDYETFERK-----PRKS 391
Streptomyces griseus           DGVDVRGYFLWSLLDNFEWAYG-YSKRFGIVHVDFASQRRT-----AKDS 460
Thermus thermophilus           EGVDLRGYFVWSLMDNFEWAFG-YTRRFGLYYVDFPSQRRI-----PKRS 418
Micrococcus antarcticus        DGVDVRGYFVWSLLDNFEWAWG-YAKRFGIIHVDYQTQVRT-----IKNS 457
Paenibacillus polymyxa         EGGQLKGYFVWSFLDNFEWAWG-YSKRFGIVHINYETQERT-----PKQS 435
Bacillus sp                    SGVPLKGYFAWSLLDNFEWAEG-YVKRFGIVYTDYKTLKRY-----PKDS 433
Thermotoga maritima            EGVPLKGYFVWSLLDNFEWAEG-YSKRFGIVYVDYSTQKRI-----VKDS 431
Clostridium cellulovorans      AGVPLKGYYIWSFMDNFEWAEG-YEKRFGIVHVNYKTQERT-----IKKS 432
Lactococcus lactis             DGANVKGYFIWSLMDVFSWSNG-YEKRYGLFYVDFDTQERY-----PKKS 454
Streptococcus sanguinis        DGANVKGYFIWSLMDVFSWSNG-YEKRYGLFYVDFETQERY-----PKKS 454
Mycoplasma mycoides            QGSNCFGYQMWTLIDNWSWANG-FKNRYGFISLDTKTLKRT-----IKKS 464
Salmonella enterica            DGVDLMGYTPWGCIDCVSFTTGQYSKRYGFIYVNKHDDGTGDMSRSRKKS 462
Escherichia coli               DGVDLMGYTPWGCIDCVSFTTGQYSKRYGFIYVNKHDDGTGDMSRSRKKS 464
Yersinia pestis                DGVDLMGYTPWGCIDCVSFTTGEYSKRYGFIYVDKNDDGTGTMARSRKLS 472
Vibrio cholerae                DGVEVMGYTPWGCIDCVSFTTGEYKKRYGFIYVDKHDDGSGTMARAKKKS 463
Staphylococcus aureus          DGVDLIGYTPWGIIDIVSFTTGEMKKRYGLIYVDRDNDGHGTMERLKKDS 463
Enterococcus faecium           DQVDCFGYLTWAPIDLVSATTGEMKKRYGFIYVDKDDEGNGTLERYKKDS 460
Listeria innocua               DGVDMLGYCTWSFTDLLSWLNG-YQKRYGFVYVDRDVEDDAPMTRIPKKS 463
                                    **  *   *  .   *    *:*:   :             : :
```

B

```
Spodoptera frugiperda          AWSLMDNFEWMEG-YIERFGLYEVDFSDP---ARTRTPRKAAFVYKHIIK 488
Drosophila melanogaster        AWSLMDSYEWKAG-FSEKFGLYHVDFNSP---QRTRTPKISARVFAQLCK 490
Brevicoryne brassicae          VWSLLDNFEWFYG-YSIHFGLVKIDFNDP---QRTRTKRESYTYFKNVVS 460
Tenebrio molitor               AWSLMDNFEWMAG-YTQRFGMHYVDFDDP---ERPRTRKLSSYVYNNIIT 482
Cavia porcellus                AWSLLDNFEWNDG-YSKRFGLFHVDFEDP---AKPRVPYTSAKEYAKIIR 461
Xenopus tropicalis             AWSLMDNFEWAAG-YTERFGLYYVNFTDP---GVPRIPKDSVKYYRSIIQ 531
Homo sapiens                   SWSLLDKFEWEKG-YSDRYGFYYVEFNDR---NKPRYPKASVQYYKKIII 499
Trifolium repens               AWSFLDCNEWFAG-FTVRFGLNFVD-------------------------- 493
Vicia sativa                   AWSFSDSYEWDAG-YTLRFGIIYVDFKD----NLRRYPKYSALWLQKFLL 508
Viburnum furcatum              TWSLLDDWEWNSG-FNVRFGIVYIDHED----GLKRYLKYSALWFKKLFG 537
Lycopersicon esculentum        AWSLLDNFEWRLG-YTSRFGIVYVDFN-----TLRRYPKMSAYWFKKLLK 510
Oryza sativa                   AWSLLDNFEWLSG-YTSKFGIVYVDFN-----TLERHPKASAYWFRDMLK 503
Cucurbita pepo                 AWSLLDNFEWANG-YSMRFGLTYVDFKN----DLTRTQKDSAKWFLNFLT 489
Digitalis lanata               IWSFADNFEWNAG-YTSRFGIFYVDFVNG---QYTRYPKSSALWWTNFLH 596
Arabidopsis thaliana           VSSLMDGLEWEDG-YKTRSGLYYVDYGH----NMGRHEKQSAKWLSKLLE 513
Sinapis alba                   AWALGDNYEFNKG-FTVRFGLSYIDWNN----VTDRDLKKSGQWYQSFIS 500
Sorghum bicolor                AWSLLDNFEWSSG-YTERFGIVYVDREN----GCERTMKRSARWLQEFNG 547
Zea mays                       AWSLLDNFEWFAG-FTERYGIVYVDRNN----NCTRYMKESAKWLKEFN- 553
Avena sativa                   TWSLIDNFEWSLG-YLSRFGIVYIDRND----GCKRIMKKSAKWLKEFNG 548
Talaromyces emersonii          AWSLLDNFEWSEG-YRSRFGVTYVDYKN----GQKRIPKKSALVIGELFN 483
Leucophaea maderae             VWSLIDNFEWADG-YTSKWGLYHVDFNDP---ERKRTPKASSHFMENVTS 500
Caenorhabditis elegans         LWTLMDNFEWDDG-FGVKFGICRVDFDSP---DKTRTMKYSAKYYQTFIR 470
Leishmania infantum            SWGPIDLVSASKAEMSKRYGFIYVDRDDAGNGSLERHRKKSFYWYRDVIQ 457
                                   *  .   .    : *.  ::
```

FIGURA 5.13.11.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Em vermelho está o trecho de aminoácidos 443-AWSLMDNFE-451 no qual está a plataforma basal do glicone, W444, e o E451 que interage com a OH4 e OH6 do glicone do substrato. Também está em vermelho o resíduo R474 encontrado trocado por H na mutante 19C7 selecionada na "varredura" da Sfβgli50. Em amarelo estão os resíduos correspondentes e iguais a estes nas β-glicosidases de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.12. Efeitos decorrentes das mutações na "alça rica em prolinas" (resíduos 339 a 350).

Como já comentado anteriormente (item 5.9.), 3 das 14 enzimas mutantes selecionadas na "varredura" possuem trocas de resíduos da mesma alça (Y345C (30A8), P346S (39B11) e P348L (6G10)), a qual é formada pelos aminoácidos 339 até 350 (figura 5.9.1.1. e figura 5.9.1.2. - E). Esta alça possui como característica a presença de 3 resíduos de prolina separados por uma Y e uma V (339-TERKG**P**Y**P**V**P**SL-350). O trecho da cadeia polipeptídica no qual esta alça se encontra é muito variável mesmo para β-glicosidases de organismos pertencentes a um mesmo grupo, por exemplo, milho e sorgo (figura 5.13.12.1).

Para compreender o papel destes resíduos na modulação da especificidade pelo substrato na Sfβgli50 foram escolhidos os resíduos que, de acordo com o mapa de "contatos" e a tabela de distâncias e interações entre resíduos da Sfβgli50 (figura 5.13.1. – B e tabela 5.13.1.) estão próximos (a menos de 3,4 Å) desta alça ou que fazem ligações de hidrogênio com seus resíduos. Os resíduos escolhidos foram a R268 e a G197, sendo que somente a R268 faz uma ligação de hidrogênio com a alça (OH da Y345 com o Cα e com o C do "backbone" da G197; Cε1 da Y345 com o O do "backbone" da G197; NH1 da R268 com a OH da Y345 formando uma ligação de hidrogênio; NH1 da R268 com o Cε2 da Y345 e com o Cα da P346; Cβ da R268 com o Cδ da P348; N do "backbone" da V347 com o Cζ e o NH1 da R268 e o Cγ2 da V347 com o Nε da R268).

Como o mapa de "contatos" (figura 5.13.1.) sugere a R268 é a principal conexão da alça com outros resíduos, como a R189, Q269 e F193. A R268

está a menos de 3,4 Å da R189 (Cγ do E189 com o O da R268), a qual também foi um dos resíduos mutados encontrado em uma enzima selecionada na "varredura" (R189G (37A9)). Além deste, os outros dois resíduos próximos a R268, Q269 e F193, também estão próximos ao R189, o que reforça a hipótese de que a R268 possa "conectar" a "alça rica em prolinas" com a R189 (Nε da R189 com o Cδ e o Nε2 do resíduo Q269; Cζ da R189 com o Oε1 e o Nε2 do resíduo Q269; Cδ da R189 com o Nε2 do resíduo Q269; NH2 da R189 com o Oε1 do resíduo Q269; O do "backbone" da R189 com o Cδ2 e o N do "backbone" da F193 (ligação de hidrogênio)). O resíduo R189 é capaz de fazer uma interação eletrostática com o E190 (NH1 da R189 com o Oε1 do E190) (a participação de E190 na especificidade pelo substrato da Sfβgli50 foi discutida anteriormente (itens 5.1.- 5.8.), pois este resíduo faz parte do sítio de ligação do aglicone nesta enzima) e também está próximo do doador de prótons catalítico, E187 (N da R189 está a menos de 3,4 Å do C do E187, ambos do "backbone").

Assim, foram criadas as mutantes R268M, Q269A e R189A. O resíduo F193 não foi mutado, mas o resíduo que está a menos de 3,4 Å dele, a S198, foi trocada por A. Esta S198 está próxima a resíduos que estão do lado do K201 e do E194 (resíduos discutidos anteriormente por interagirem com o aglicone (itens 5.1.-5.8.)). Além destas, também foram criadas mutantes dos resíduos da alça. Para a Y345, que na mutante selecionada na "varredura" havia sido trocada por C (30A8), foram criadas mais duas mutantes, Y345A e Y345F. Para as P346 e P348, trocadas por S e L nas mutantes selecionadas na "varredura", respectivamente, foram geradas mutantes na qual a troca foi feita por uma A, P346A e P348A. Também foram criadas duas mutações dos resíduos P344 e S349, também pertencentes à alça, P344A e S349A.

A

```
Spodoptera frugiperda        TERKGPYPVPSLLDDVDTGSWADDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLN-NL 389
Pyrococcus furiosus          SWNPLKFFFDAKLADVSE---------RKTQMGWSVYPRGIYIALKKAS-KY 316
Thermococcus sp              EYNPLRR-FAVEDAGVS----------RKTDMGWSVYPKGIYDGLRAFA-EY 312
Streptomyces griseus         ELSESPSPWAGAERHVAFTPAA----GPRTAMDWPVDADGLYELLTRLRDEL 371
Thermus thermophilus         EVGTLP----------VRYLPPE----GPATAMGWEVYPEGLHHLLKRLGREV 330
Micrococcus antarcticus      DYDSPKSSPFVGSEYVTFPARD----LPRTAMGWEVNPEGLRVLLNRLNQDY 367
Paenibacillus polymyxa       DFNDAS------LLQVEQVHME----EPVTDMGWEIHPESFYKLLTRIEKDF 346
Bacillus sp                  EYKEG-----EGLFDCEEVQVG----FDKTFMDWNVYAEGLYKVLSWVHEEY 344
Thermotoga maritima          EYDP------DAPAKVSFVERD----LPKTAMGWEIVPEGIYWILKKVKEEY 342
Clostridium cellulovorans    DYNS------EAFIGAESVAMD----NPKTEMGWEIYPQGLYDLLTRIHRDY 343
Lactococcus lactis           DYNGKGEKGSSKYQIKGVGRRVAPDYVPRTDWDWIIYPEGLYDQIMRVKNDY 365
Streptococcus sanguinis      DYNGKGEKGSSKYQIKGVGRRESPTHIPKTDWDWIIYPQGLYDQIMRIKKDY 365
Mycoplasma mycoides          NYELKLENWFLPYTNKNIRIN--------PYRGWEIHPQTLYDIAIDIKNNY 372
Salmonella enterica          RY----------ISGFEGSVPN--PYVKASDWGWQIDPVGLRYSLCELYERY 367
Escherichia coli             RY----------ISGFEGSVPN--PYVKASDWGWQIDPVGLRYALCELYERY 369
Yersinia pestis              RY----------LSGFEGSVPN--PHVKASDWGWQIDPVGLRYSLSVLYERY 377
Vibrio cholerae              RY----------TSLFETSRLN--PYLPASDWGWQIDPQGLRYALSELYERY 368
Staphylococcus aureus        RY--------IVNGGLNHSVEN--PHIATSDWGWAIDPDGLRYTLNVLYDRY 369
Enterococcus faecium         KY----------ALFGGLQN--PYLVTSKWGWTIDPTGLRYLLNYTYRKY 365
Listeria innocua             RYGKKGSTKETGVPGVYKKVVN--PFVKTTNWDWTIDPKGLQIALRRINSRY 371
                                                          .     : .  :
```

B

```
Spodoptera frugiperda        RGTSDLIGVNHYTAFLVSATERK--GPYPVPSLLDDVDTG-SWADDSWL- 365
Drosophila melanogaster      RGTSDFFGINSYTSNLVTSNGHNNTGKFPVPSFNHDMGVVESQEGVDWP- 371
Brevicoryne brassicae        KGTADFYALNHYSSRLVTF---GSDPN---PNFNPDASYV-TSVDEAWLK 340
Tenebrio molitor             KGTFDFLGLNHYSSDKVYF---AEDGAGDHPSHWADTGVI-GYQDASWP- 362
Cavia porcellus              KGTADFFAVQYYTTRFIRH---KENKEAE-LGILQDAEIE-LFSDPSWK- 341
Xenopus tropicalis           KGTHDFFGLNHYTTVLAAP---LDFPEGD-PTYDADRGTA-VMSDRTWL- 410
Homo sapiens                 KGTSDFLGLGHFTTRYITE---RNYPSRQGPSYQNDRDLI-ELVDPNWP- 377
Trifolium repens             NGSFDFIGINYYSSSYIS-NAPSHGNAKPSYSTNPMTNISFE-KHGIPLG 382
Vicia sativa                 KGSYDFLGVNYYSTYYAQ-SAPLT-TVNRTFYTDIQANVSPL-KNGAPIG 381
Viburnum furcatum            KGSIDFLGLNYYTSIYAA-NNESPNPHDISYTTDSRVNLFQK-RDGILIG 412
Lycopersicon esculentum      KGSFDYVGINQYTSYYMY-DPHYTTPQPLGYQQDWNVGFAYD-RKGVPIG 386
Oryza sativa                 KGSADYIGINQYTASYMK-GQQLMQQTPTSYSADWQVTYVFA-KNGKPIG 379
Cucurbita pepo               MNSFDFLGINYYTANYAK-DNPSDIHPAQSYLNDIHATLSTD-CDGISIG 363
Digitalis lanata             RGSYDFLGVNYYTTYYAI-NLPIPPIAPPNYFSDMGVLSTPT-RGGVPIG 462
Arabidopsis thaliana         KGSYDFVGINYFTSTFVAHTDN-VNPEKPSWEADSRLQLHSNNVDGFKIG 385
Sinapis alba                 KGSYDFLGLNYYFTQYAQPSPNPVNSTNHTAMMDAGAKLTYINASGHYIG 368
Sorghum bicolor              VGSYDMIGINYYTSTFSKHIDLSPNNSPVLNTDDAYASQETKGPDGNAIG 420
Zea mays                     AGSYNMLGLNYYTSRFSKNIDISPNYSPVLNTDDAYASQEVNGPDGKPIG 425
Avena sativa                 VSSYDFVGINYYTSRFAKHIDISPEFIPKINTDDVYSNPEVNDSNGIPIG 419
Talaromyces emersonii        HGSNDFYGMNHYCENYIRNRTGEPDPEDTAGNLDILME----DKNGNPIG 355
Leucophaea maderae           KGTADYFAFNAYTAFLVNK---SNTENL-TPSWAHDLAIS-AYEGSNWLI 379
Caenorhabditis elegans       KGSTDFLGINYYLSHIVRN---LNDGEEPASQSERDAAYAFNEGKWEKIC 344
Leishmania infantum          RETIDFISFSYYMSGCVTTDEQQNNAARANILNMVPNPHLASSEWGWQID 339
                               : :  ..  :
```

FIGURA 5.13.12.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Em vermelho estão os resíduos que constituem a "alça rica em prolinas", 339-TERKGPYPVPSL-350, da Sfβgli50 que foram encontrados mutados em três enzimas selecionadas na "varredura" (Y345C (30A8), P346S (39B11) e P348L (6G10)) e em azul estão os demais resíduos constituintes dessa alça. Em amarelo estão os trechos de resíduos de aminoácidos correspondentes a esta alça em outras β-glicosidases GH 1 de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.12.1. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos R189 e S198.

A caracterização cinética das enzimas mutantes R189A, 37A9 (R189G) e S198A (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revela uma pequena tendência a um aumento da eficiência catalítica relativa sobre o substrato gluco, sendo este efeito mais pronunciado na mutação R189G (a eficiência catalítica sobre gluco passou de 26% na selvagem para 29% na R189A e S198A e atinge 46% na R189G). A mutação R189G também causou um pequeno aumento na atividade enzimática (2, 3,3 e 2 vezes sobre fuco, gluco e gala, respectivamente), enquanto R189A e S198A causaram quedas (270 e 240 vezes para a mutação R189A e 1,6 e 1,4 vezes para S198A sobre fuco e gluco, respectivamente).

Assim, os dados sugerem que o resíduo R189 tem um importante papel na atividade enzimática da Sfβgli50. Provavelmente isto resulta do fato dele fazer uma interação eletrostática com o E190, o qual pode formar ligações de hidrogênio com o doador de prótons catalítico (E187) e, assim, talvez modular seu posicionamento e sua desprotonação. Apoiando esta hipótese, nota-se que a mutação E190A, analisada anteriormente (itens 5.1. a 5.8.), apresentou resultados similares à da mutante R189A, causando uma queda da atividade enzimática (em uma intensidade menor que a R189A) e provocando um aumento da eficiência catalítica relativa sobre gluco (passou a ser 90% em relação à fuco).

O fato da mutação sobre o resíduo S198 ter provocado efeitos muito sutis talvez sugira que este resíduo tenha um papel de “preencher espaço” na estrutura com uma porção polar (sua OH), pois na sua troca por A nenhuma das possíveis interações com os resíduos T200 e E195, existentes na Sfβgli50 selvagem, seriam removidas. Assim, as pequenas alterações verificadas na

mutação S198A talvez sejam decorrentes da alteração do ambiente em que se encontra estes resíduos e, por conseqüência, alterações nos resíduos mais próximos que atuam no sitio ativo, K201 e E194.

Como já apresentado, os efeitos verificados para a troca da R189 por G foram distintos da troca por A. Ressaltando que ambas mutações removem a interação eletrostática com o E190. Assim, não fica claro a origem destes efeitos mutacionais distintos.

Uma hipótese a ser levantada para explicar este pequeno aumento da atividade enzimática para todos os substratos na mutação R189G pode ser baseada em alterações no "posicionamento" do trecho de aminoácidos em que este resíduo se encontra, o qual é o mesmo em que está o doador de prótons, E187, e o resíduo E190, 187-EPRE-190 (figura 5.9.2.1. e figura 5.9.2.2. - F). Ressaltando que a prolina deste trecho, P188, é relativamente conservada nas β-glicosidases de Eukaria e aparece em algumas de Bacteria (figura 5.13.12.1.). Se considerarmos que esta prolina tenha um papel de conferir maior "rigidez" a este trecho de aminoácidos, restringindo a sua "liberdade de posicionamento", e que isto pode ser necessário para que tais resíduos exerçam seu papel durante a catálise, pode-se supor que a troca da R189 por G tenha afetado a "liberdade de posicionamento" deste trecho de aminoácidos gerando o resultado distinto da mutação R189A. Uma hipótese mais ampla pode incluir a interação eletrostática da R189 com o resíduo E190 como um fator que também "contribua" para um "posicionamento" preciso do trecho 187-EPRE-190, de tal forma que na mutante R189G ele pôde assumir "posicionamentos" mais favoráveis ao estabelecimento do complexo $ES^{\ddagger}$, resultando em um pequeno aumento da atividade catalítica para todos os substratos. Porém, deve ser destacado que trata-se de uma hipótese não sustentada por dados deste trabalho.

A

```
Spodopterafrugiperda          YARVVFENFGDRVKMFITFNEPR---------EICFEGYGSATKAPILNA 207
Pyrococcusfuriosus            YVEKVAELLEK-VKLIATFNEPM---------VYVMMGYLTAYWPPFI-K 174
Thermococcussp                YVELIADNIEG-VELVATFNEPM---------VYVVASYVEGTWPPFR-K 172
Streptomycesgriseus           YAGLVAGALGDRVPTWTTLNEPW---------CAAFLGYGNGVHAPGR-T 204
Thermusthermophilus           YAEAVARALADRVPFFATLNEPW---------CSAFLGHWTGEHAPGL-R 183
Micrococcusantarcticus        YAETVHEKLGDRVKHWTTFNEPL---------CSSLIGYAAGEHAPGR-Q 189
Paenibacilluspolymyxa         YASVIMDRFGERINWWNTINEPY---------CASILGYGTGEHAPGH-E 186
Bacillussp                    YAETAFKAFGGKVKQWITFNETW---------CVSFLSNYIGAHAPGN-T 185
Thermotogamaritima            YSRVLFENFGDRVKNWITLNEPW---------VVAIVGHLYGVHAPGM-R 185
Clostridiumcellulovorans      YANLLFREFGDRVKTWITHNEPW---------VASYLGYALGVHAPGI-K 185
Lactococcuslactis             YAAFCFEEFPEVN-YWTTFNEIG---------PIGDGQYLVGKFPPGIKY 180
Streptococcussanguinis        YAAFCFEEFPEVR-YWTTFNEIG---------PIGDGQYLVGKFPPGIQY 180
Mycoplasmamycoides            YAKQCFKYFSDLVDYWTTFNEPV---------VLVDGCYLNKWYYPKIS- 199
Salmonellaenterica            FAEVVFERYKHKVKYWMTFNEIN--NQRNWRAPLFGYCCSGVVYTEHENP 205
Escherichiacoli               FAEVVFERYKHKVKYWMTFNEIN--NQRNWRAPLFGYCCSGVVYTEHENP 207
Yersiniapestis                FSEVVMARYKSKVKYWMTFNEIN--NQRNWKYPLFGYCCSGVVFTEQENP 214
Vibriocholerae                FAQVVMTRYQHKVKYWITFNEIN--NQCNWKLPIFGYCNSGMLYAEQDRP 205
Staphylococcusaureus          FARVVFERYKDKVTYWMTFNEIN--NQMDTSNPIFLWTNSGVALTENDNP 203
Enterococcusfaecium           FCQTMFESLKGKVHYWVTFNEMNHIDPQTEATDIFTYIIAGLKYSELENK 204
Listeriainnocua               YSTTLFKRYGDRVKYWVSLNEQN----------IFVGMGYGQALHPPKVS 189
                              :               : **
```

B

```
Spodoptera frugiperda         MFITFNEPREICFEGYGSATKAPI-------------------------- 204
Drosophila melanogaster       IWTTVNEPWHVCEHGYGVDYMAPS-------------------------- 205
Brevicoryne brassicae         WWITFNEPIAVCKG-YSIKAYAPN-------------------------- 183
Tenebrio molitor              YWMTFNEIMQICEAGYSGGSFAPY-------------------------- 203
Cavia porcellus               QWITINEPNVLCAMGYDLGFFAPG-------------------------- 182
Xenopus tropicalis            MWITFNEPYIIALLGYGYGNFAPG-------------------------- 251
Homo sapiens                  HWITFSDPRAMAEKGYETGHHAPG-------------------------- 218
Trifolium repens              YWSTLNEPWVFSNSGYALGTNAPG-RCSASN------------------- 227
Vicia sativa                  HWVTLNEPFSYALYGYNGGTFAPG-RCSKYAG------------------ 228
Viburnum furcatum             FWTTLNEPWTFCYNGYVNGSFAPG-RCSTCT------------------ 261
Lycopersicon esculentum       NWFSFNEPRVVAALGYDNGFFAPG-RCSKPFG------------------ 232
Oryza sativa                  HWFTFNEPRIVALLGYDQGTNPPK-RCTK--------------------- 225
Cucurbita pepo                HWITLNEQFIFTFKSYVIGEYAVG-RGA---------------------- 204
Digitalis lanata              HWITINEAWSYTVEGYVNGTCPPG-RGASAPSDDMALQTAEILRNRTLST 229
Arabidopsis thaliana          HWVTINEPYEFSRGGYETGEKAPG-RCSKYVN------------------ 227
Sinapis alba                  YWLTINQLYSVPTRGYGSALDAPG-RCSPTVD------------------ 211
Sorghum bicolor               NWLTFNEPETFCSVSYGTGVLAPG-RCSPGVS------------------ 264
Zea mays                      NWLTFNEPQTFTSFSYGTGVFAPG-RCSPGLD------------------ 269
Avena sativa                  NWFTFNEPHSFCGLGYGTGLHAPGARCSAGMT------------------ 263
Talaromyces emersonii         HWITFNEPWCNSVLGHNTGKHAPG-RTSDRTR------------------ 203
Leucophaea maderae            WWLTFNEPQFVSLG-YEFRVMAPG-------------------------- 218
Caenorhabditis elegans        TWITFNEINMQAWSSVVKIEGELWLCPD---------------------- 190
Leishmania infantum           HWLTFNEINMSLHAPFTGVGLAED-------------------------- 190
                               : :..:
```

FIGURA 5.13.12.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Em vermelho está o segmento de 187-EPRE-190 na Sfβgli50 e em amarelo estão os resíduos correspondentes a estes em outras β-glicosidases GH 1 de **(A)** BACTERIA, ARCHEA e **(B)** EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.12.2. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos R268 e Q269.

Foram criadas mutantes dos resíduos R268 e Q269 nas quais estes resíduos foram trocados por A. A caracterização cinética destas mutantes (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revelou efeitos distintos para estas mutações. A Q269A resultou em um pequeno aumento da eficiência catalítica relativa de gluco sobre fuco, enquanto a mutação R268M causou uma queda (a eficiência catalítica sobre gluco passou de 26% na selvagem para 38% na Q269A e 9% na R268M). A Q269A causou queda da atividade enzimática para todos os substratos (5, 3,5 e 11 vezes sobre fuco, gluco e gala, respectivamente), mas a mutação R268M causou um pequeno aumento da atividade enzimática sobre fuco (2 vezes em relação a selvagem) e queda para os demais substratos (1,5 e 3 vezes para fuco e gluco).

Os dados sugerem que de fato mutações que atinjam R268 e Q269 podem afetar a atividade enzimática e a especificidade pelo substrato da Sfβgli50. É possível que estes dois resíduos influenciem o sítio ativo por meio de seus “contatos” com a R189 (figura 5.13.1.), afetando o segmento 187-EPRE-190. Sendo que R268 promoveu um pequeno aumento da eficiência catalítica de fuco, assim como a mutação R189G.

5.13.12.3. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos P344, Y345, P346, P348 e S349.

A caracterização cinética mostra que mutações de alguns resíduos da "alça rica em prolinas" resultaram em efeitos com intensidades distintas, ou seja, alguns resíduos quando mutados resultam em efeitos mais drásticos do que outros.

Foram as mutações P348A, Y345A e P346A as que causaram maiores quedas de atividade enzimática (63 e 520 vezes para a P348A, 1200 e 90 vezes para a Y345A e 9 e 11 vezes para a P346A sobre os substratos fuco e gluco, respectivamente). Segundo o mapa de "contatos" e a tabela de distâncias e interações entre os resíduos da Sfβgli50 (figura 5.13.1.; tabela 5.13.1.) estes três resíduos, mais a V347, são os que se encontram mais próximos da R268 (a menos de 3,4 Å). Isto sugere que o efeito dessas mutações pode ser "propagado" "via contatos" com o resíduo R268.

Pode-se verificar que a mutação Y345A foi a que apresentou maior queda de atividade enzimática, mas com um pequeno aumento da eficiência catalítica relativa sobre gluco em relação a fuco (de 26% passou a ser 30%), resultante de uma queda desigual da atividade sobre fuco e gluco (queda maior na atividade sobre fuco). No entanto, este efeito não é resultante somente da remoção da ligação de hidrogênio entre a OH da Y345 e o NH1 da R268. Isto pode ser deduzido pelo fato de que a mutação Y345F também remove esta ligação e, mesmo assim, causou uma queda de atividade enzimática insignificante (queda de somente 1,1 e 1,7 vezes sobre fuco e gluco,

respectivamente) e uma pequena queda da eficiência catalítica relativa sobre gluco (passou de 26% para 18%). A mutação Y345C causou um aumento um pouco maior da eficiência catalítica relativa sobre gluco (36%) e uma pequena queda de atividade, porém maior do que a verificada para a Y345F (3,2 e 2,3 vezes sobre fuco e gluco, respectivamente). A gradativa queda de atividade à medida que se passa da mutação Y345F para Y345C e Y345A sugere que o "volume" da cadeia lateral do resíduo 345 deva ser importante para "preencher espaço" entre a alça e a R268. Assim, o pequeno aumento no "volume" da cadeia lateral na troca por C, em relação à troca por A, foi suficiente para que a queda de atividade não fosse tão drástica, como a grande queda de atividade enzimática observada para a mutante Y345A, na qual grande parte da cadeia lateral foi removida.

Pode-se também verificar que a mutação P348A mostra um efeito mais drástico do que a P346A. Isto também ocorre para a mutação P348L quando comparada com a mutação P346S (39B11) (queda de atividade enzimática de 2,6 e 3 vezes para a P348L (6G10) e uma queda insignificante de 1,2 e 1,2 para a P346S sobre os substratos fuco e gluco, respectivamente). Também observa-se que as mutações da P346 apresentaram pequenas quedas da eficiência catalítica relativa sobre gluco em comparação à fuco (26 % para a selvagem para 24 % e 20 % para P346S e P346A, respectivamente), enquanto para a mutação P348A a eficiência catalítica relativa sobre gluco teve uma grande queda, passando a ser de 2,5 %). Já as mutações P344A e S349A não resultaram em alterações significativas. A mutante P344A não apresentou alteração significativa de especificidade pelo substrato e nem quedas de

atividade enzimática, enquanto que a S349A mostrou um insignificante aumento da eficiência catalítica relativa sobre gluco em comparação à fuco (de 26% na selvagem para 28% na mutante). Ressalta-se que a troca de S349A não remove os possíveis “contatos” formados por S349 e nem sua ligação de hidrogênio com a P346, pois são todas entre átomos do “backbone”. Estes fatores sugerem que o resíduo P348 tem o papel mais importante entre as três P da alça formada pelos resíduos 339 a 350.

Em resumo, os dados acima sugerem que as mutações nos resíduos P348 e P346 possam afetar o “formato”, a “flexibilidade” e o “posicionamento” da alça 339-TERKGPYPVPSL-350, o que por sua vez alteraria o contato com o segmento que contém a R268. O “contato” entre a alça e este segmento parece ser feito através da Y345. Uma vez que o efeito mutacional atinja a R268, talvez ocorra a propagação “via” R268 e Q269, atingindo R189 e, por meio deste, atingir resíduos do sítio ativo, como E190 e E187 (figura 5.13.1.).

5.13.13. Efeitos decorrentes das mutações dos resíduos A156, Y56 e M57.

Como comentado no item 5.9. os resíduos A156 e Y56 foram encontrados mutados na “varredura” da Sfβgli50 (mutante 16G12 (A156V) e 21H8 (Y56C)). Um breve comentário a respeito destas duas mutações já foi feito no item 5.9.4., pois ambas mutantes se incluem no grupo das mutantes selecionadas na “varredura” que tem especificidade com alterações “pontuais” por apresentarem as razões de k_{cat}/K_m gluco por fuco similares a da Sfβgli50 selvagem.

Verifica-se que não há conservação do resíduo Y56 entre outras β-glicosidases, mas para a A156 há uma tendência a existir uma L nesta posição (figura 5.13.13.1.). No entanto, percebe-se que há conservação em termos de estrutura secundária da α-hélice em que a Y56 se encontra (figura 5.9.1.2. - H).

Assim, com o objetivo de entender a participação destes resíduos na catálise da Sfβgli50 foram criadas mais duas mutantes, Y56A e M57A. Este segundo resíduo foi mutado por estar ao lado da Y56 e estar mais próximo do sítio ativo.

A caracterização cinética das enzimas mutantes Y56C (21H8), Y56A e M57A (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.; figuras 5.9.3.1. e 5.10.1.1.) revela que elas não apresentaram alterações significativas da eficiência catalítica relativa. As quedas de eficiência catalítica sobre gluco e fuco não foram mais do que duas vezes em relação a selvagem (1,6 e 1,7 para a Y56C, 2 e 1,8 para a Y56A e 2,1 e 2 para a M57A, respectivamente sobre fuco e gluco).

A caracterização cinética da enzima mutante A156V (16G12) (tabela 5.9.3.1.; figuras 5.9.3.1.) mostra que também esta enzima não apresentou alterações significativas da sua eficiência catalítica relativa e exibiu apenas uma pequena queda de eficiência catalítica sobre fuco e gluco, 2,6 e 2,8 vezes, respectivamente, em relação a selvagem.

Considerando que nenhum destes resíduos está a menos de 3,4 Å de outros resíduos que os interliguem com o sítio ativo e não se verificou alteração na especificidade significativa, não foi possível interpretar os efeitos destas mutações seguindo uma lógica similar a que foi empregada para as demais mutações.

A

```
Spodoptera frugiperda        EGAWDEDGKGENIWDYMVHNTPEVIR-----DLSNGDIAADSYHNYKRDV 85
Drosophila melanogaster      EGGWNADDKGESIWDFLTHTHPEKIV-----DRSNGDVSADSYHQWKRDV 86
Brevicoryne brassicae        EGGWNEDGKGENIWDRLVHTSPEVIK-----DGTNGDIACDSYHKYKEDV 65
Tenebrio molitor             EGGWDEDGKGESIWDRGTHEHADWVA-----DNSNGDIACDSYHKYKEDV 84
Cavia porcellus              EGGWDADGRGPCVWDTFTHQGGERVF-----KNQTGDVACGSYTLWEEDL 63
Xenopus tropicalis           EGGWRADGKGLSIWDQFTHSPS-RIE-----DDSNGDVACNSYNMMERDV 132
Homo sapiens                 EGAWDQDGKGPSIWDVFTHSGKGKVL-----GNETADVACDGYYKVQEDI 97
Trifolium repens             EGAVNEGGRGPSIWDTFTHKYPEKIR-----DGSNADITVDQYHRYKEDV 100
Vicia sativa                 EGASNIDGRGPSIWDTFTKQHPEKIW-----DHSSGNIGADFYHRYKSDI 102
Viburnum furcatum            EGAVKEGGRTPSIWDTFAHEFPDKIA-----DGSNGDVAVDFYHRYKDDV 134
Lycopersicon esculentum      EGSASTEGRGPSIWDTFLK-IPGLEP-----NNANGEIAVDQYHRYKEDI 106
Oryza sativa                 EGMAASGGRGPSIWDAFAH-TPGNVA-----GNQNGDVATDQYHRYKEDV 102
Cucurbita pepo               EGDVFKDGKGPSTWDAYTHQHPERIA-----DHSNGDIAVDEYHRYKEDV 80
Digitalis lanata             EGCAMEFGKGLSVWDTWTLDKPGHII-----DGTNGNVAANQYHLFKEDM 81
Arabidopsis thaliana         EGAAEEGGRGSSIWDSFTLKQHSESN-----NNLDGRLGVDFYHHYKEDV 99
Sinapis alba                 EGTI---GRGLNIWDGFTHRYPNKSGP----DHGNGDTTCDSFSYWQKDI 83
Sorghum bicolor              EGAWNEDGKGPSTWDHFCHNFPEWIV-----DRSNGDVAADSYHMYAEDV 136
Zea mays                     EGAWNEDGKGESNWDHFCHNHPERIL-----DGSNSDIGANSYHMYKTDV 138
Avena sativa                 EGAWNEGGKGPSSWDNFCHSHPDRIM-----DKSNADVAANSYYMYKEDV 134
Talaromyces emersonii        EGAFDEDGRLPSIWDTFSK-TPGKVE-----DGTNGDVACDSYHRTGEDI 74
Leucophaea maderae           EGAWNVDGKGPSIWDEFTHTHPEIIT-----DHSTGDDACKSYYKYKEDV 100
Caenorhabditis elegans       EGAKNLDGRGFSTWDSIRSENGRIHD------NSDPDLSCEGRLKYKEDV 66
Leishmania infantum          EGAYQTDGKGLSTSDLQPQGIFGAIVPRVDGDSGIKDVAIDFYHRYPQDI 70
                             **     .:     *                                 *:
```

B

```
Spodoptera frugiperda        TPLITLYHWDLPQKLQEL-GGFAN---PLISDWFEDYARVVFENFGDRVK 180
Drosophila melanogaster      TPMVTIYHWELPQKLQEL-GGWTN---PEIIPLFKDYARLVLEMYGDRVK 181
Brevicoryne brassicae        IPLVTMYHWDLPQYLQDL-GGWVN---PIMSDYFKEYARVLFTYFGDRVK 160
Tenebrio molitor             EPYVTMFHWDLPQPLQDE-GGWPD---RKLADYFVDYARVLFENFGDRIK 179
Cavia porcellus              TPVVTLYHFDLPQALEDQ-GGWLS---EAIIEVFDKYAQFCFSTFGNRVR 158
Xenopus tropicalis           EPQVTLYHWDLPQELQNM-GGWEN---ETMVQWFKEYADLIFQKLGDKVK 227
Homo sapiens                 TPIVTLHHWDLPQLLQVKYGGWQN---VSMANYFRDYANLCFEAFGDRVK 194
Trifolium repens             QPFVTLFHWDLPQVLEDEYGGFLN--SG-VINDFRDYTDLCFKEFGDRVR 197
Vicia sativa                 IPFVTLFHWDLPQSLEDEYKGFLS--SK-VVKDFENYADFVFKTYGDRVK 197
Viburnum furcatum            EPFVTIFHWDLPQGLENEYDGFLS--GQ-IVNDYRDYAEVCFQEFGDRVK 231
Lycopersicon esculentum      TPYANLNHYDLPQALQDRYNGWLG--RE-VVKDFADYAEFCFKTFGDRVK 201
Oryza sativa                 TPYVNLYHYDLPLALEKKYGGWLN--AK-MADLFTEYADFCFKTFGNRVK 197
Cucurbita pepo               KPYVTLFHWDVPEALEIEYGGFLN--RQ-IVEHFQEFAELCFKEFGKKVK 177
Digitalis lanata             QPYVTLFHWDLPLALELEYGGFLDKDKR-IVEHFRDYAELCFWEFGDRVK 180
Arabidopsis thaliana         TPLVTLFQWDVPQALEDEYGGFLS--DR-ILEDFRDFAQFAFNKYGDRVK 196
Sinapis alba                 TPFVTLFHWDLPQTLQDEYEGFLD--PQ-IIDDFKDYADLCFEEFGDSVK 180
Sorghum bicolor              EPYITIFHWDTPQALVDAYGGFLDEED---YKDYTDFAKVCFEKFGKTVK 233
Zea mays                     EPYVTIFHWDVPQALEEKYGGFLDKSHKSIVEDYTYFAKVCFDNFGDKVK 238
Avena sativa                 KPYITLFHWDTPQALADEYKDFLDRRI---VKDYTDYATVCFEHFGDKVK 231
Talaromyces emersonii        EPFVTLFHWDLPDELMKRYGGMLN--KEEFVADYANYARVVFNALGSKVK 172
Leucophaea maderae           MPLVTMYHWDLPQNLQTY-GGWLN---ESIVPLYVSYARVLFENFGDRVK 195
Caenorhabditis elegans       EPIVTLFHFDMPLSIYDNGTSWLN---KENCEHFEKFADLCFQKFGDLVK 162
Leishmania infantum          QPLITLSHYEMPYGLVKRYGGWGS---RKTIGFFERYARTVKERYKHKVK 166
                              *  .: ::: *  :     .  .         :  ::          ::
```

FIGURA 5.13.13.1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases com a enzima de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). **(A)** Em vermelho está o resíduo Y56 da Sfβgli50 encontrado mutado por C na "varredura" (mutante 21H8) e em **(B)** está o resíduo A156 da Sfβgli50 encontrado mutado por V na "varredura" (mutante 16G12). Em verde no alinhamento B estão as L em outras β-glicosidases que correspondem a A156 da Sfβgli50. Os dois alinhamentos são com β-glicosidases de EUKARIA. Mais detalhes ver item 4.10..

5.13.14. Há correlação entre alteração conformacional e grupos de resíduos que compõem uma mesma "via de contatos"?

Os dados discutidos até o momento neste item sugerem que grupos de resíduos podem modular a especificidade pelo substrato na Sfβgli50 através de "vias de contatos" que conectam o exterior ao interior do sítio ativo. Assim, efeitos de mutações em resíduos que compõem uma "via" podem ser propagados através de suas conexões e atingirem outras porções da Sfβgli50, inclusive o sítio ativo. Entenda esta propagação por uma alteração no posicionamento espacial e no conjunto de interações não-covalentes formadas por um resíduo resultante de alterações em outro resíduo. Caso este efeito realmente ocorra, pode-se supor que as Sfβgli50 mutantes selecionadas na "varredura" e as construídas através de mutagênese sítio-dirigida apresentariam diferenças no seu conjunto de interações não-covalentes em relação à enzima selvagem, ou seja, poderiam exibir pequenas diferenças estruturais localizadas.

Considerando os dados já discutidos, poderia existir alguma relação entre as "vias de contato" propostas para os resíduos analisados neste trabalho e as alterações conformacionais das Sfβgli50 que tiveram tais resíduos mutados? De modo geral, as análises do perfil dos espectros de fluorescência intrínseca, os ensaios de estabilidade térmica determinada por meio da fluorescência intrínseca e os ensaios de apagamento de fluorescência intrínseca revelam que as Sfβgli50 mutantes possuem alterações estruturais localizadas e possuem conjuntos de interações não-covalentes distintas daquelas que mantêm a estrutura da enzima selvagem. Estas diferenças

poderiam representar as alterações causadas pela propagação das mutações através das “vias de contato” propostas. Assim, deste ponto de vista geral, a análise conformacional das mutantes parece confirmar a existência das “vias de contato”.

Deste modo, tentando aprofundar esta correlação inicialmente deve ser destacado que quando se verifica os dados provenientes dos experimentos de supressão da fluorescência intrínseca, K_{sv} , ou de inclinações dos ensaios de estabilidade térmica determinada por fluorescência intrínseca percebe-se que não existe uma correlação direta entre estes dois parâmetros. Também não há uma correlação direta da alteração da especificidade pelo substrato ou da atividade enzimática com a presença ou a intensidade da alteração conformacional representada através dos parâmetros acima citados. Assim, há mutantes nas quais a especificidade pelo substrato foi invertida, ou seja, passaram a preferir gluco ao invés de fuco, e que apresentaram parâmetros de alterações conformacionais similares aos de enzimas mutantes que tiveram pouca alteração de sua especificidade pelo substrato (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.). O mesmo ocorre na comparação entre as Sfβgli50 mutantes que apresentaram quedas drásticas de atividade enzimática e aquelas mutantes em que este parâmetro não foi significativamente alterado (tabelas 5.9.3.1. e 5.10.1.1.).

No entanto, quando os valores de K_{sv} são reunidos por grupos de mutantes para resíduos que possivelmente, segundo os dados já discutidos, possuem “contatos” entre si, nota-se que há uma tendência a agrupamentos entre eles (figura 5.13.14.1.), ou seja, mutantes de resíduos que compõem uma mesma “via de contatos” tendem a ter seus valores de K_{sv} mais similares entre

si. Assim, os valores médios de K_{sv} para mutantes de “vias” distintas tendem a ser diferentes.

Estes agrupamentos podem resultar do fato destes resíduos estarem relativamente próximos uns dos outros ou pelo fato de suas mutações causarem alterações conformacionais similares. Talvez uma associação dos dois fatores seja a melhor hipótese. De qualquer modo, seria esperado que mutações em resíduos que mantém “contatos” entre si (compõem uma mesma “via de contatos”) afetassem a mesma região da Sfβgli50, atingindo os mesmos triptofanos e alterando sua exposição aos supressor. Logo, estes agrupamentos reforçam a hipótese da existência de “vias de contato” que devem influenciam a especificidade pelo substrato na Sfβgli50.

Ainda há outros indícios que apóiam esta hipótese. Por exemplo, podemos verificar que os grupos G (mutantes 19C7 (R474H), R474A e M447A) e D (mutantes 4C11 (T35A), R97K e R97M) apresentam faixas de K_{sv} muito sobrepostas (figura 5.13.14.1), sendo que, de acordo com o mapa de “contatos” e com a tabela de distâncias e interações entre os resíduos da Sfβgli50 (tabela 5.13.1.; figura 5.13.1.) tratam-se de grupos de resíduos que possuem “contatos” com o trecho 443-AWSLMDNFE-451, ou seja, as mutações dos grupos G e D podem estar causando alterações que convergem para a mesma região, alterando de modo similar a exposição do(s) mesmo(s) resíduo(s) de triptofano(s) da Sfβgli50. A mesma sobreposição entre faixas de K_{sv} é verificada entre os grupos B (mutantes 24C12 (S358F), D362A, S358A) e E (mutantes 38C6 (F460L), F460A, S403A, E458A e E458D). Conforme comentado nos itens 5.13.6. e 5.13.8. estes dois grupos de mutações devem causar efeitos que se propagam até a F460 e por meio dela alterar o

posicionamento do W444 que forma a plataforma basal. Também os grupos A (mutantes H330A, S378A, 19H2 (S378G) e Y331F) e C (mutantes 23H2 (S424F), S424A, N400A, N400V, M442A e 40G11 (N400D)) exibem semelhanças nas faixas de K_{sv}, sendo que estes dois grupos de mutações parece que atingem o sítio ativo através de N400 (item 5.13.1.). Coerentemente, os grupos C (mutantes 23H2 (S424F), S424A, N400A, N400V, M442A e 40G11 (N400D)) e A (mutantes H330A, S378A, 19H2 (S378G) e Y331F) reúnem mutações cujos efeitos parecem atingir o sítio ativo por "vias de contato" distintas daquelas dos grupos D (mutantes 4C11 (T35A), R97K e R97M) e G (mutantes 19C7 (R474H), R474A e M447A) que apresentam valores de K_{sv} com pequenas sobreposições (figura 5.13.14.1). No entanto, deve-se reconhecer que esta análise apresenta limitações. Percebe-se que as mutações do grupo F, A e C apresentam faixas de K_{sv} sobrepostas, muito embora devam atingir o sítio ativo por "vias de contatos" diferentes segundo proposto nos itens 5.13.1., 5.13.2., 5.13.3, 5.13.5. e 5.13.12.. O mesmo vale para os grupos G e D (itens 5.13.9. e 5.13.11.) e também para os grupos B e E (itens 5.13.6. e 5.13.8.). Esta limitação provavelmente origina-se do fato de que a fluorescência intrínseca da Sfβgli50 resulta de um conjunto de triptofanos distribuídos pela enzima (figura 5.13.14.2.). Assim, é possível que as mutações dos grupos A - C e F afetem triptofanos diferentes, mas causem alterações do mesmo tipo na exposição destes resíduos. Assim, as faixas de K_{sv} coincidem, apesar das mutações estarem fisicamente separadas. Esta limitação seria superada somente se fosse possível observar a fluorescência intrínseca dos triptofanos da Sfβgli50 isolados.

O mesmo tipo de análise foi empregada para agrupar os dados de inclinações dos ensaios de estabilidade térmica a 50°C determinada através de fluorescência intrínseca (figura 5.13.14.3.). Também se pode perceber sobreposições entre os valores de inclinações para os mesmos grupos de resíduos que estão fisicamente mais próximos ou que mantenham algum contato. Porém, grupos como A (mutantes H330A, S378A, 19H2 (S378G) e Y331F) e C (mutantes 23H2 (S424F), S424A, N400A, N400V, M442A e 40G11 (N400D)) mantem-se com sobreposições com o grupo G (mutantes 19C7 (R474H), R474A e M447A). Nota-se, que as faixas de variação de inclinação dentro de um mesmo grupo são maiores do que no caso dos K_{sv} (figura 5.13.14.1.) e as faixas dos grupos A até G tendem a ser muito mais sobrepostas. Assim, mesmo sendo possível verificar uma tendência a "agrupamentos" das mutações dos resíduos que devam agir por mesmas "vias de contatos", percebe-se que é mais difícil observar neste caso do que nos agrupamentos feitos por meio dos $K_{sv.}$ Talvez esta observação resulte do fato de que neste experimento a fluorescência intrínseca acompanhada seja originada do conjunto total de triptofanos, enquanto que no experimento de supressão da fluorescência intrínseca acompanha-se o efeito da acrilamida sobre um grupo menor de triptofanos, pois nem todos estão igualmente expostos a este supressor.

Finalmente, mesmo levando em conta as limitações discutidas, pode-se admitir que os agrupamentos dos K_{sv} reforçam a hipótese da existência das "vias de contatos" que foram sugeridas por meio da caracterização cinética e da proximidade entre os resíduos.

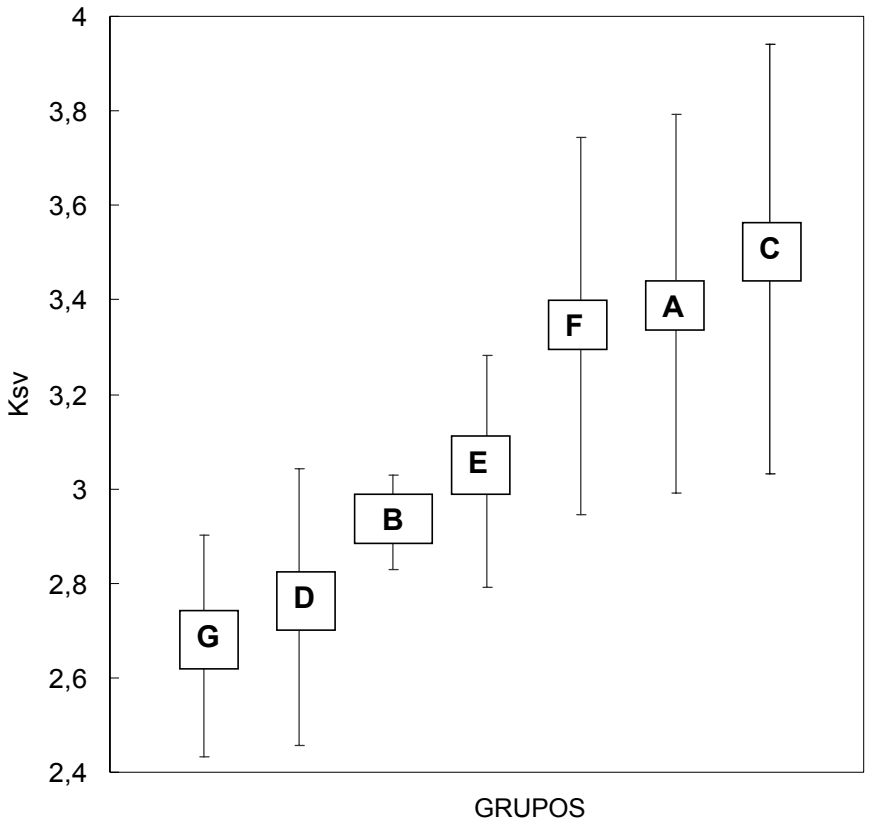


FIGURA 5.13.14.1. Faixas de K_{sv} para os grupos da Sfβgli50 com mutações em resíduos que compõem uma mesma "via de contatos". O quadrado indica o valor médio de K_{sv} para aquele grupo (indicado por uma letra em seu interior) e as barras mostram os limites. **Grupo A:** H330A, S378A, 19H2 (S378G) e Y331F; **GRUPO B** 24C12 (S358F), D362A, S358A; **GRUPO C**: 23H2 (S424F), S424A, N400A, N400V, M442A e 40G11 (N400D); **GRUPO D**: 4C11 (T35A), R97K e R97M; **GRUPO E**: 38C6 (F460L), F460A, S403A, E458A e E458D; **GRUPO F**: S189A, S349A, 37A9 (R189G), R189A, P344A, P346A, P348A, Q269A, R268M, Y345A, Y345F, 30A8 (Y345C), 39B11 (P346S) e 6G10 (P348L); **GRUPO G**: 19C7 (R474H), R474A e M447A.

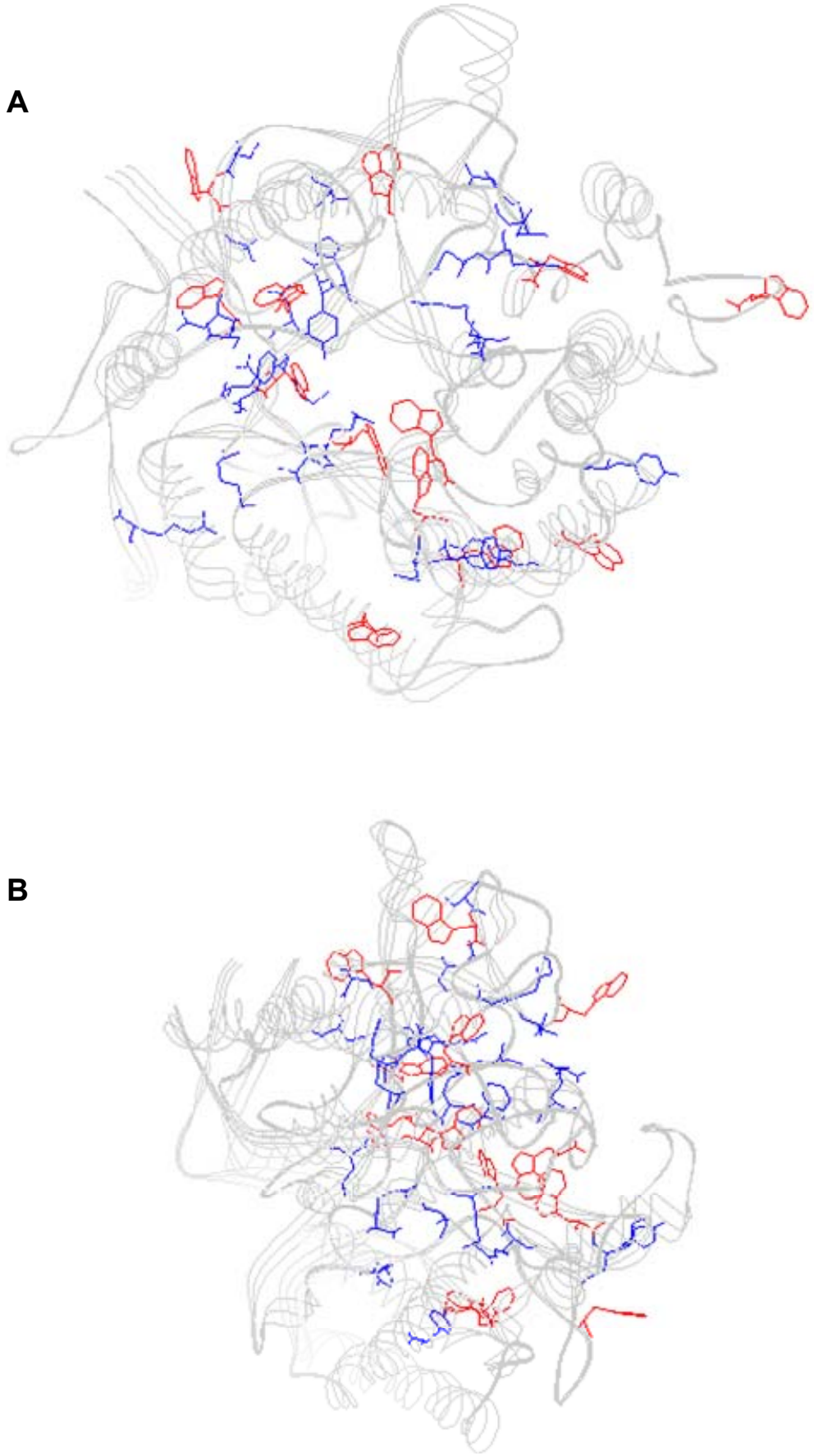


FIGURA 5.13.14.2. Distribuição dos resíduos de triptofanos na Sfβgli50. **(A)** visão geral de uma das faces da estrutura da Sfβgli50 com todos os resíduos de triptofanos em vermelho e todos os resíduos mutados em azul. **(B)** ilustra os mesmos resíduos da Sfβgli50 que a figura A, mas em uma visão lateral.

5.14. A hipótese das "Vias de contatos" em outras proteínas.

Esta segunda etapa do trabalho discutiu, com base nos dados apresentados, a hipótese da existência de "vias de contatos" que possibilitam a conexão entre resíduos externos com os que estão presentes no sítio ativo da Sfβgli50, sendo que a especificidade pelo substrato pode ser modulada através dessas "vias". Além dos dados apresentados que sustentam tal hipótese para a Sfβgli50, deve ser ressaltado que outros trabalhos propõem tais "vias de contatos" como fatores a serem considerados no processo de modulação das propriedades enzimáticas.

Trabalhos como os de Lockless e Ranganathan, 1999, Amitai *et al*., 2004, Socolich *et al*., 2005, Sol *et al*., 2006, Greene e Higman, 2003, e Sethi *et al*., 2009, apresentam tal hipótese de "redes" de resíduos que atuam em "conjunto". Por exemplo, Amitai *et al*., 2004, discute que são poucos os resíduos de uma proteína envolvidos diretamente na catálise e que os presentes no sítio ativo devem estar "conectados" a resíduos não-catalíticos, "incluindo resíduos muito distantes", que modulem a atividade protéica. Tal autor ainda propõe que a mesma pressão seletiva em famílias de proteínas seja o fator responsável pela "conservação em conjunto" de alguns resíduos não-cataliticos e que devem fazer parte de uma mesma "rede de trabalho". Socolich et al., 2005, utilizando um método estatístico para identificação de resíduos com "acoplamento" (co-evolução) em alinhamentos de múltiplas seqüências protéicas observa que os resíduos que co-evoluem estão

especialmente organizados em redes fisicamente conectadas ligando sítios funcionais distantes na estrutura protéica através de interações de “contato”.

No entanto, mesmo que a hipótese de “vias de contato” participando da modulação da especificidade pelo substrato na Sfβgli50 não se trate de uma idéia inovadora, as idéias discutidas neste trabalho, ao contrário dos trabalhos citados, apresentam tal hipótese com baseada em dados de caracterização cinética e comparações de estrutura com outras β-glicosidases. Além disto, trata-se do primeiro trabalho a apresentar tal hipótese para resíduos de uma β-glicosidase da família 1 das glicosídeo hidrolases.

5.15. Padrão de interações com os *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeos no subsítio -1.

Os itens anteriores formularam uma hipótese sobre como o efeito de mutações em pontos afastados do sítio ativo podem afetar a especificidade da Sfbgli50. Para isso foram analisadas 46 mutantes que apresentaram especificidades distintas. Assim, como um fechamento desta etapa buscou-se organizar estas enzimas através da comparação dos seus sítios ativos gerando conjuntos de enzimas mutantes que compartilham o mesmo padrão de interação do sítio ativo com o glicone do substrato. Logo, o foco da análise se deslocou para o sítio ativo como um todo e não se coloca mais sobre agrupamentos por “vias de contato”. Deste modo, esta comparação pode gerar

convergências, pois através de “vias de contato” distintas pode ser produzido o mesmo tipo de especificidade.

Com os dados de caracterização cinética para a série de *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeos procurou-se determinar a similaridade entre sítios ativos das enzimas mutantes e da selvagem através da relação linear de energia livre (LFER). De acordo com Whithers e Rupitz, 1990, a comparação dos dados de uma série de substratos com sutis diferenças, como é o casos dos *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeos utilizados neste trabalho, permite a comparação de sítios ativos de enzimas distintas que catalisem a mesma reação. Isto se deve ao fato de que se estas enzimas possuirem estados de transição idênticos, ou similares, quando tiverem seus valores de $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ plotados para uma série de substratos com sutis diferenças um em relação ao outro, devem apresentar um coeficiente angular em torno de 1 e um coeficiente de correlação linear também em torno de 1. Assim, diferenças nos tipos e forças das interações estabelecidas no estado de transição entre duas enzimas devem se refletir em alterações nas retas dos plotes dos $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ de uma enzima em relação a outra. Estas alterações ocorrem devido ao fato da variação de energia livre ($\Delta\Delta G^{\ddagger}$) para a hidrólise de uma série de substratos ser dependente das interações estabelecidas no complexo enzima-substrato no estado de transição ($ES^{\ddagger}$). Deve ser ressaltado que esta metodologia pode ser aplicada também para a comparação de uma enzima e suas mutantes. No caso deste trabalho as alterações sutis nos substratos estão concentradas especificamente na porção do glicone (mais especificamente nas hidroxilas; figura 4.9.1.1.), de tal forma

que, como comentado no item 5.6., este método fornece indícios das alterações do conjunto de interações do subsítio -1 com o glicone. Outro ponto importante é que as comparações somente foram viáveis para as Sfβgli50 mutantes para as quais foi possível a determinação dos parâmetros cinéticos para fuco, gluco e gala.

A tabela 5.15.1. mostra as comparações feitas das enzimas mutantes com a Sfβgli50 selvagem. Para facilitar a análise dessas comparações foram criadas três classes de faixas de inclinações. Uma classe inclui valores de inclinações que representam enzimas mutantes que não mostraram claras alterações nas interações com o glicone quando comparadas com a Sfβgli50 selvagem (inclinações de 0,85 a 1,15). Outra classe inclui enzimas mutantes que tendem a ter alguma alteração na interação com o glicone (inclinações de 0,70 a 0,85 e 1,15 a 1,30). E a última classe inclui as enzimas mutantes que apresentaram claras alterações nas interações com o glicone (inclinações menores do que 0,70 e maiores do que 1,30). Deve ser ressaltado que a escolha das faixas de inclinações foram feitas arbitrariamente, tendo como propósito facilitar a análise das comparações focalizando para as mutantes que tiveram maiores alterações.

De acordo com os dados da tabela 5.15.1. percebemos que as mutantes que se incluem na terceira classe, ou seja, as que apresentaram maiores alterações nas suas interações com o glicone, são a 38C6 (F460L), F460A, H330A, S403A, Y331F, N400A, R97M, H330A, R189A, R268M e R474A. Deve ser ressaltado que de todas estas dez enzimas mutantes incluídas nesta classe

somente duas, N400A e R189A, não apresentaram alterações drásticas da especificidade enzimática em relação a selvagem e que nem todas apresentaram grandes quedas de eficiência catalítica, por exemplo, a mutante R268M. Mas talvez o fato mais relevante seja que, como discutido no item 5.13., as mutações 38C6 (F460L), F460A, S403A, Y331F, N400A e R97M podem ter exercido seus efeitos sobre a especificidade enzimática e atividade catalítica através de interferências na plataforma basal, W444, e sobre o resíduo catalítico E399, respectivamente.

Na segunda classe, ou seja, as enzimas que têm uma pequena alteração na interação com o glicone, encontram-se as enzimas mutantes S378A, 19H2 (S378G), R97K, Q269A e 6G10 (P348L). Deve ser novamente ressaltado que os dados cinéticos sugerem que as mutações S378A e 19H2 (S378G) exercem seus efeitos através do Y331, o qual interage com o W444 que constitui a plataforma basal do subsítio -1.

Assim, resumidamente, há 15 Sfβgli50 mutantes que possuem um padrão de interações com o substrato que difere daquele presente na enzima selvagem. Contudo, isto não significa que há 16 tipos de sítio ativo distintos, pois algumas destas mutantes podem compartilhar padrões similares. Para detectar estes conjuntos foram feitas as comparações de relação linear de energia livre (LFER) das enzimas mutantes cujas enzimas mutantes tendem a ter alguma alteração na interação com o glicone (inclinações de 0,70 a 0,85 e 1,15 a 1,30) (figura 5.15.2. – B) e das que apresentaram claras alterações nas

interações com o glicone (inclinações menores do que 0,70 e maiores do que 1,30) (figura 5.15.2. – A), cada uma delas em relação as todas as demais.

Levando em consideração o critério de que comparações que resultam em inclinações entre 0,85 a 1,15 representam enzimas mutantes que possuem interações iguais ou muito similares com o glicone, pode-se perceber que estas Sfβgli50 mutantes apresentam similaridade com poucas das outras enzimas mutantes. A partir da tabela 5.15.2. foi possível agrupar estas 15 enzimas mutantes de acordo com as similaridades que elas possuem nas suas interações com o glicone dando origem a grupos (figura 5.15.1.). Nota-se que dentre estas 15 mutantes, as F460A e S403A estão agrupadas em dois subgrupos que possuem como pontos de intersecção a similaridade com as mutantes 38C6 (F460L) e Y331F. O mesmo acontece com os grupos formados pelas mutantes S378G, S378A, Q269A e R97K com o grupo da R474A que tem como intersecção as mutantes N400A, R268M e H330A. Percebe-se que as mutantes R97M e R189A formam um grupamento isolado das demais, assim como a mutante 6G10 (P348L). Portanto, a comparação das Sfbgli50 mutantes através da LFER revela 7 grandes tipos de padrão de interações com o glicone considerando os três substratos utilizados para a análise (fuco, gluco e gala).

TABELA 5.15.1. Parâmetros de relação linear de energia livre (LFER) entre a Sfβgli50 selvagem e mutantes.

mutante	inclinação	R	mutante	inclinação	R
23H2 (S424F)	1,10	0,99	N400V	1,07	0,99
16G12 (A156V)	1,03	0,99	P344A	1,14	0,99
19H2 (S378G)	1,19	0,99	P346A	1,09	0,99
30A8 (Y345C)	1,00	0,99	P348A	1,01	0,99
37A9 (R189G)	1,06	0,99	Q269A	1,23	0,99
38C6 (F460L)	0,70	0,98	R97K	1,18	0,99
39B11 (P346S)	1,03	0,99	R97M	0,51	0,99
40G11 (N400D)	0,99	0,99	R189A	0,50	0,99
6G10 (P348L)	0,85	0,99	R268M	1,30	0,99
19C7 (R474H)	1,13	0,99	R474A	1,44	0,99
24C12 (S358F)	0,93	0,99	S189A	0,88	0,99
21H8 (Y56C)	1,03	0,99	S349A	0,87	0,99
4C11 (T35A)	0,94	0,99	S358A	0,90	0,99
D362A	0,93	0,99	S378A	1,17	0,99
E458A	0,92	0,99	S403A	0,52	0,91
E458D	0,98	0,99	S424A	1,07	0,99
F460A	0,65	0,99	Y56A	1,05	0,99
H330A	1,30	0,99	Y331F	0,63	0,99
M57A	0,96	0,99	Y345F	1,09	0,99
N400A	1,33	0,99			

classe 0,85 a 1,15 em branco;
classe 0,70 a 0,85 e 1,16 a 1,30 em cinza claro;
classe menor de 0,70 e maior de 1,30 em cinza escuro.

R = coeficiente de correlação.

TABELA 5.15.2. Parâmetros de relação linear de energia livre (LFER) entre as **(B)** enzimas mutantes que tendem a ter alguma alteração na interação com o glicone (inclinações de 0,70 a 0,85 e 1,15 a 1,30) e **(A)** das que apresentaram claras alterações nas interações com o glicone (inclinações menores do que 0,70 e maiores do que 1,30) (figura 5.15.2. – A), cada uma delas em relação as todas as demais.

(A)	38C6 (F460L)		F460A		H330A		N400A		R189A		R268M		R474A		R97M		S403A		Y331F	
	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R
4C11 (T35A)	1,32	0,99	1,38	0,98	0,72	0,99	0,71	0,99	1,86	0,99	0,72	0,99	0,64	0,99	1,82	0,99	1,44	0,88 *	1,46	0,99
6G10 (P348L)	1,19	0,99	1,26	0,97	0,65	0,99	0,64	0,99	1,71	0,99	0,65	0,99	0,58	0,99	1,65	0,99	1,32	0,89 *	1,32	0,98
16G12 (A156V)	1,43	0,98	1,53	0,98	0,79	0,99	0,78	0,99	2,07	0,99	0,79	0,99	0,71	0,99	1,99	0,98	1,62	0,90	1,61	0,99
19C7 (R474H)	1,60	0,99	1,63	0,96	0,86	0,98	0,85	0,99	2,27	0,99	0,86	0,99	0,76	0,99	2,21	0,99	1,67	0,85 *	1,73	0,97
19H2 (S378G)	1,64	0,97	1,77	0,99	0,92	0,99	0,89	0,99	2,37	0,99	0,92	0,99	0,82	0,99	2,27	0,98	1,91	0,92	1,86	0,98
21H8 (Y56C)	1,43	0,98	1,52	0,98	0,79	0,99	0,77	0,99	2,06	0,99	0,79	0,99	0,70	0,99	1,98	0,99	1,61	0,90	1,60	0,99
23H2 (S424F)	0,91	0,92	1,67	0,99	0,85	0,99	0,83	0,99	2,18	0,98	0,84	0,98	0,76	0,99	2,08	0,96	1,83	0,95	1,74	0,99
24C12 (S358F)	1,29	0,98	1,38	0,98	0,72	0,99	0,70	0,99	1,87	0,99	0,72	0,99	0,64	0,99	1,79	0,99	1,47	0,91	1,60	0,99
30A8 (Y345C)	1,38	0,98	1,48	0,99	0,77	0,99	0,75	0,99	1,99	0,99	0,76	0,99	0,68	0,99	1,92	0,98	1,58	0,91	1,55	0,99
37A9 (R189G)	1,46	0,97	1,58	0,99	0,82	0,99	0,79	0,99	2,12	0,99	0,81	0,99	0,73	0,99	2,03	0,98	1,69	0,92	1,66	0,99
38C6 (F460L)	XXXX	XXXX	0,99	0,93	0,53	0,97	0,52	0,98	1,41	0,99	0,54	0,99	0,47	0,96	1,38	0,99	0,99	0,81 *	1,06	0,95
39B11 (P346S)	1,43	0,98	1,52	0,98	0,79	0,99	0,77	0,99	2,06	0,99	0,79	0,99	0,70	0,99	1,98	0,99	1,61	0,90	1,60	0,99
40G11 (N400D)	1,38	0,99	1,46	0,98	0,76	0,99	0,74	0,99	1,99	0,99	0,76	0,99	0,67	0,98	1,92	0,99	1,52	0,88 *	1,53	0,99
D362A	1,21	0,98	1,36	0,98	0,71	0,99	0,69	0,99	1,86	0,99	0,71	0,99	0,63	0,99	1,79	0,99	1,44	0,90	1,44	0,99
E458A	1,30	0,99	1,34	0,96	0,70	0,98	0,70	0,99	1,86	0,99	0,70	0,99	0,62	0,97	1,80	0,99	1,37	0,86 *	1,42	0,98
E458D	1,37	0,99	0,43	0,97	0,74	0,98	0,73	0,99	1,97	0,99	0,75	0,99	0,66	0,98	1,90	0,99	1,48	0,87 *	1,51	0,98
F460A	0,88	0,94	XXXX	XXXX	0,51	0,99	0,49	0,99	1,29	0,97	0,49	0,98	0,46	0,99	1,23	0,94	1,10	0,96	1,04	0,99
H330A	1,77	0,96	1,94	0,99	XXXX	XXXX	0,97	0,99	1,93	0,99	0,98	0,99	0,89	0,99	2,46	0,97	2,10	0,93	2,03	0,99
M57A	1,34	0,98	1,42	0,98	0,74	0,99	0,72	0,99	1,93	0,99	0,74	0,99	0,66	0,99	1,86	0,99	1,51	0,90	1,50	0,99
N400A	1,85	0,98	1,97	0,98	1,02	0,99	XXXX	XXXX	2,67	0,99	1,02	0,99	0,91	0,99	2,57	0,99	2,08	0,90	2,07	0,99
N400V	1,48	0,98	1,57	0,98	0,82	0,99	0,80	0,99	2,14	0,99	0,82	0,99	0,73	0,99	2,06	0,99	1,66	0,91	1,66	0,99
P344A	1,58	0,98	1,69	0,98	0,87	0,99	0,86	0,99	2,28	0,99	0,87	0,99	0,78	0,99	2,19	0,99	1,79	0,90	1,77	0,99
P346A	1,52	0,98	1,61	0,98	0,84	0,99	0,82	0,99	2,19	0,99	0,84	0,99	0,74	0,99	2,11	0,99	1,71	0,90	1,70	0,99
P348A	1,45	0,99	1,46	0,94	0,77	0,97	0,76	0,99	2,06	0,99	0,78	0,99	0,68	0,96	2,01	0,99	1,47	0,82 *	1,55	0,96
Q269A	1,69	0,98	1,83	0,99	0,94	0,99	0,92	0,99	2,46	0,99	0,94	0,99	0,84	0,99	2,36	0,99	1,96	0,92	1,92	0,99
R189A	0,69	0,99	0,72	0,97	0,37	0,98	0,37	0,99	XXXX	XXXX	0,38	0,99	0,33	0,98	0,97	0,99	0,74	0,86 *	0,76	0,98
R268M	1,82	0,98	1,91	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	2,62	0,99	XXXX	XXXX	0,88	0,99	2,52	0,99	2,04	0,88 *	2,02	0,99
R474A	1,96	0,95	2,18	0,99	1,12	0,99	1,08	0,99	2,87	0,98	1,10	0,98	XXXX	XXXX	2,73	0,96	2,38	0,94	2,27	0,99
R97K	1,59	0,95	1,78	0,99	0,92	0,99	0,88	0,99	2,33	0,99	0,89	0,98	0,81	0,99	2,22	0,96	1,94	0,95	1,85	0,99
R97M	0,72	0,99	0,73	0,95	0,38	0,97	0,38	0,99	1,02	0,99	0,39	0,99	0,34	0,96	XXXX	XXXX	0,73	0,83 *	0,77	0,96
S198A	1,22	0,98	1,29	0,98	0,67	0,99	0,66	0,99	1,76	0,99	0,67	0,99	0,60	0,99	1,69	0,99	1,37	0,90	1,36	0,99
S349A	1,21	0,98	1,28	0,98	0,66	0,99	0,65	0,99	1,73	0,99	0,66	0,99	0,59	0,99	1,67	0,99	1,35	0,90	1,35	0,99
S358A	1,25	0,98	1,33	0,98	0,69	0,99	0,68	0,99	1,81	0,99	0,69	0,99	0,62	0,99	1,75	0,99	1,41	0,90	1,40	0,99
S378A	1,62	0,97	1,75	0,99	0,90	0,99	0,88	0,99	2,35	0,99	0,90	0,99	0,81	0,99	2,26	0,98	1,86	0,92	1,83	0,99
S403A	0,66	0,81 *	0,83	0,96	0,42	0,94	0,39	0,90	1,01	0,87 *	0,39	0,89 *	0,73	0,98	0,94	0,83	XXXX	XXXX	0,85	0,95
S424A	1,48	0,98	1,58	0,98	0,82	0,99	0,80	0,99	2,15	0,99	0,82	0,99	0,73	0,99	2,06	0,98	1,67	0,90	1,66	0,99
Y331F	0,86	0,95	0,96	0,99	0,49	0,99	0,47	0,99	1,26	0,98	0,48	0,99	0,43	0,99	1,20	0,96	1,04	0,94	XXXX	XXXX
Y345F	1,51	0,98	1,60	0,98	0,83	0,99	0,81	0,99	2,18	0,99	0,83	0,99	1,68	0,99	2,10	0,99	1,68	0,89 *	1,68	0,99
Y56A	1,45	0,98	1,56	0,99	0,81	0,99	0,79	0,99	2,09	0,99	0,80	0,99	0,72	0,99	2,02	0,99	1,65	0,91	1,63	0,99

Inc = inclinação
R = coeficiente de correlação.
Em cinza estão as inclinações entre 0,85 e 1,15.
* indica valores de R (coeficiente de correlação) abaixo de 0,90.

TABELA 5.15.2. Continuação.

(B)	19H2 (S378G)		6G10 (P348L)		Q269A		R97K		S378A	
	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R	inc	R
4C11 (T35A)	0,79	0,99	1,10	0,99	0,76	0,99	0,78	0,99	0,79	0,99
6G10 (P348L)	0,71	0,99	XXXXXX	XXXXX	0,69	0,99	0,71	0,99	0,72	0,99
16G12 (A156V)	0,87	0,99	1,21	0,99	0,84	0,99	0,86	0,99	0,88	0,99
19C7 (R474H)	0,94	0,99	1,32	0,99	0,91	0,99	0,93	0,97	0,95	0,99
19H2 (S378G)	XXXXXX	XXXXX	1,39	0,99	0,96	0,99	1,03	0,99	1,01	0,99
21H8 (Y56C)	0,86	0,99	1,20	0,99	0,83	0,99	0,86	0,99	0,87	0,99
23H2 (S424F)	0,92	0,99	1,05	0,98	0,89	0,99	0,94	0,99	0,94	0,99
24C12 (S358F)	0,78	0,99	1,09	0,99	0,76	0,99	0,78	0,99	0,79	0,99
30A8 (Y345C)	0,83	0,99	1,16	0,99	0,81	0,99	0,83	0,99	0,84	0,99
37A9 (R189G)	0,89	0,99	1,25	0,99	0,86	0,99	0,89	0,99	0,90	0,99
38C6 (F460L)	0,57	0,97	0,82	0,99	0,56	0,98	0,57	0,95	0,58	0,98
39B11 (P346S)	0,86	0,99	1,20	0,99	0,83	0,99	0,86	0,99	0,87	0,99
40G11 (N400D)	0,82	0,99	1,16	0,99	0,80	0,99	0,82	0,99	0,84	0,99
D362A	0,78	0,99	1,08	0,99	0,75	0,99	0,77	0,99	0,78	0,99
E458A	0,77	0,99	1,07	0,99	0,74	0,99	0,76	0,98	0,78	0,99
E458D	0,81	0,99	1,14	0,99	0,79	0,99	0,81	0,98	0,82	0,99
F460A	0,55	0,99	0,76	0,98	0,53	0,99	0,56	0,99	0,56	0,99
H330A	1,08	0,99	1,51	0,99	1,05	0,99	1,09	0,99	1,12	0,99
M57A	0,80	0,99	1,12	0,99	0,78	0,99	0,81	0,99	0,82	0,99
N400A	1,16	0,99	1,56	0,99	1,08	0,99	1,11	0,99	1,13	0,99
N400V	0,89	0,99	1,25	0,99	0,86	0,99	0,89	0,99	0,91	0,99
P344A	0,96	0,99	1,33	0,99	0,92	0,99	0,96	0,99	0,97	0,99
P346A	0,91	0,99	1,28	0,99	0,88	0,99	0,91	0,99	0,93	0,99
P348A	0,84	0,98	1,19	0,99	0,81	0,98	0,83	0,96	0,86	0,98
Q269A	1,03	0,99	1,44	0,99	XXXXXX	XXXXX	1,03	0,99	1,05	0,99
R189A	0,41	0,99	0,58	0,99	0,40	0,99	0,41	0,98	0,42	0,99
R268M	1,09	0,99	1,52	0,99	1,05	0,99	1,08	0,99	1,10	0,99
R474A	1,21	0,99	1,68	0,99	1,17	0,99	1,22	0,99	1,23	0,99
R97K	0,99	0,99	1,37	0,99	0,96	0,99	XXXXXX	XXXXX	1,02	0,99
R97M	0,42	0,98	0,59	0,99	0,41	0,98	0,42	0,96	0,42	0,98
S198A	0,73	0,99	1,02	0,99	0,71	0,99	0,73	0,99	0,74	0,99
S349A	0,72	0,99	1,01	0,99	0,70	0,99	0,72	0,99	0,73	0,99
S358A	0,75	0,99	1,05	0,99	0,73	0,99	0,75	0,99	0,76	0,99
S378A	0,98	0,99	1,37	0,99	0,95	0,99	0,98	0,99	XXXXX	XXXXXX
S403A	0,45	0,93	0,60	0,89 *	0,43	0,92	0,46	0,95	0,45	0,92
S424A	0,89	0,99	1,25	0,99	0,87	0,99	0,89	0,99	0,92	0,99
Y331F	0,53	0,99	0,73	0,99	0,52	0,99	0,54	0,99	0,54	0,99
Y345F	0,91	0,99	1,27	0,99	0,88	0,99	0,91	0,99	0,92	0,90
Y56A	0,87	0,99	1,22	0,99	0,85	0,99	0,88	0,99	0,89	0,99

Inc = inclinação
R = coeficiente de correlação.
Em cinza estão as inclinações entre 0,85 e 1,15.
* indica valores de R (coeficiente de correlação) abaixo de 0,90.

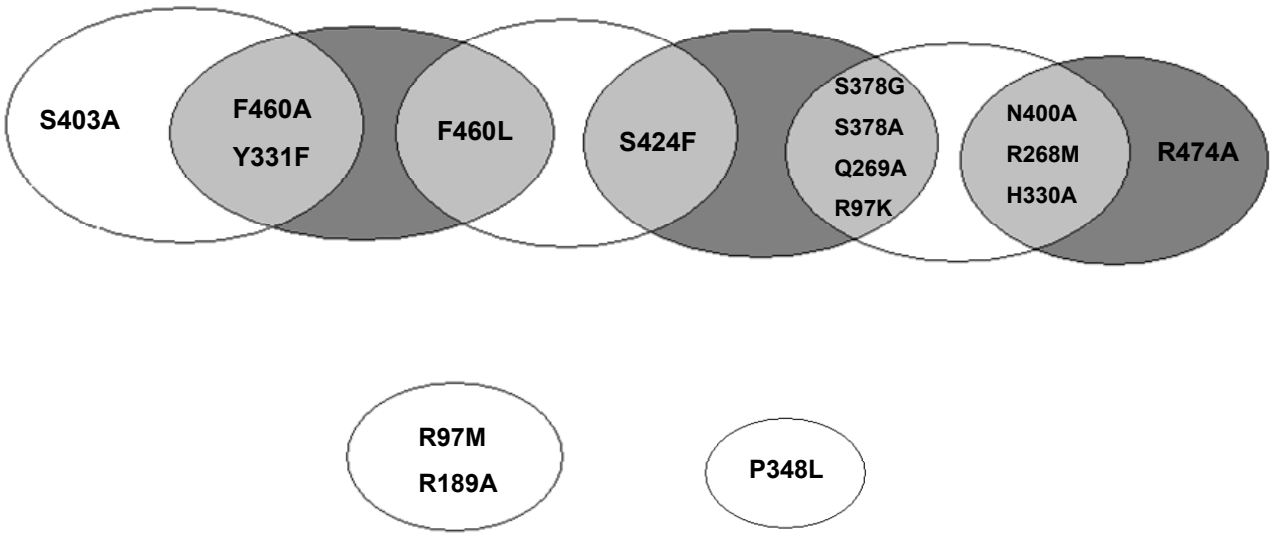


FIGURA 5.15.1. Agrupamento construído através das comparações de relação linear de energia livre (LFER) entre as mutantes F460A, 38C6 (F460L), Y331F, S403A, H330A, R97M, R189A, N400A, R474A, R268M, Q269A, R97K, S378A, 6G10 (P348L) e 19H2 (S378G) com cada uma das demais mutantes (tabelas 5.15.2. – A e B). Estas mutantes foram escolhidas por estarem incluídas na classe das enzimas mutantes que tendem a ter alguma alteração na interação com o glicone (inclinações de 0,70 a 0,85 e 1,15 a 1,30) e na classe das que apresentaram claras alterações nas interações com o glicone (inclinações menores do que 0,70 e maiores do que 1,30) na comparação com a Sfβgli50 selvagem. A mutante S424F não faz parte de nenhuma dessas classes mas foi incluída por ser um “elo” alguns grupos.

5.16. Determinação dos fatores de aceleração da reação de hidrólise catalisada pelas Sfβgli50 selvagem e mutantes.

Dispondo de uma população de mutantes de uma mesma enzima, buscou-se avaliar como as mutações introduzidas influenciaram o "poder catalítico" da Sfβgli50. Entende-se por "poder catalítico" a capacidade de acelerar uma reação química, ou seja, o número de vezes (fator de aceleração) que a velocidade da reação catalisada enzimaticamente é maior do que a velocidade da reação sem catalisador (espontânea). Assim, nesta etapa procurou-se princípios de funcionamento da enzima como um todo e não apenas como se propagavam os efeitos mutacionais como visto na etapa 2.

Para tal, como descrito no item 4.26. foram determinadas as constantes de velocidade da reação de hidrólise espontânea a 30°C dos substratos fuco, gluco, gala e xilo (figura 5.16.1.) resultando em, respectivamente, 6.10^{-10} s^{-1}, 2.10^{-10} s^{-1}, 3.10^{-10} s^{-1} e $2,5.10^{-10}$ s^{-1}. De tal forma foi possível calcular o número de vezes que as Sfβgli50 selvagem e mutantes aceleram estas reações de hidrólise, utilizando k_{cat} como parâmetro de constante de velocidade da reação catalisada (tabela 5.16.1. e figura 5.16.2.).

Os dados permitem perceber que somente três Sfβgli50 mutantes apresentaram fatores de aceleração da reação de hidrólise maiores do que a enzima selvagem (tabela 5.16.1. e figura 5.16.2.). A mutante 37A9 (R189G) é uma delas, tendo sido a única que mostrou aumento da aceleração da reação de hidrólise sobre todos os substratos. Para esta mutante os fatores de

aceleração são cerca de 2, 3,3, 2 e 4,5 vezes maiores que da Sfβgli50 selvagem sobre fuco, gluco, gala e xilo, respectivamente. Tal fato já havia sido constatado através da análise da eficiência catalítica. A mutante S349A apresentou um aumento da aceleração da reação de hidrólise sobre gala e xilo, sendo 1,6 e 1,7 vezes maiores que na enzima selvagem, respectivamente. Enquanto, a mutante R268M somente apresentou um aumento de cerca de 2 vezes sobre fuco.

As maiores quedas do fator de aceleração da reação catalisada em relação à enzima selvagem foram verificadas para o substrato fuco (cerca de 3000 vezes para a dupla mutante Y331F/R97M e 1200 vezes para a Y345A). Sobre os demais substratos os maiores valores de quedas obtidos foram de 520 e 400 vezes para gluco nas mutantes P348A e M442A, 1000 vezes para gala nas mutantes R474A e N400A e 173 e 50 vezes para xilo nas mutantes 23H2 (S424F) e 38C6 (F460L).

Nota-se que muitas mutações causaram efeitos muito mais drásticos em termos de aceleração relativa da reação de hidrólise dos substratos fuco e gluco do que em termos de eficiência catalítica relativa (tabela 5.14.2.). Por exemplo, as mutantes 19H2 (S378G), S358F, 30A8 (Y345C), R189G, F460A, M447A, Q269A, R474A, R97K, S378A, S403A, Y331F, Y331F/R97M e Y345F apresentaram fatores de aceleração da hidrólise de gluco que são maiores ou iguais àqueles de fuco, o que difere da enzima selvagem cujo fator de aceleração da hidrólise de fuco é 1,3 vezes maior do que para gluco. Estes dados podem indicar que estas mutações tornam a Sfβgli50 tão apta a

hidrolisar gluco quanto fuco, o que pode ser entendido como um indicador de especificidade enzimática. Neste sentido haveria uma aparente divergência entre os dados de aceleração relativa e eficiência catalítica relativa (k_{cat}/K_m relativo). Contudo, estes dois parâmetros não são diretamente comparáveis. Isto se deve, em parte, à constante de velocidade de hidrólise espontânea de gluco ser três vezes menor do que a de fuco. Assim, no cálculo do fator de aceleração o ponto de referência é diferente para cada substrato, o que não ocorre no cálculo da eficiência catalítica relativa. Além disso, como a eficiência catalítica relativa também leva em consideração o valor de K_m e o cálculo da aceleração relativa somente leva em conta o k_{cat}, as proporções destes dois parâmetros não necessariamente coincidem.

Os dados de aceleração da reação ainda nos permite verificar que o substrato fuco apresentou maior amplitude de variação para estes valores, seguido por gluco, gala e xilo (figura 5.16.3.). Dois fatos podem ser destacados: primeiro, pode ser observado que a diferença de amplitude de variação dos valores entre gluco e fuco é pequena e, segundo, a seqüência de amplitudes, do substrato com maior para o que teve menor amplitude de variação dos valores de aceleração da reação, é a mesma da preferência de substratos hidrolisados pela Sfβgli50 selvagem.

As razões para estas observações não são evidentes, mas pode-se supor que as mutações estão reduzindo a capacidade de aceleração da reação da Sfβgli50 para um “patamar básico” comum aos quatro substratos testados. Este “patamar básico” seria caracterizado por “elementos catalíticos do sítio

ativo" que favoreceriam indistintamente a hidrólise de qualquer um dos substratos usados. Por exemplo, a presença de um ácido catalítico deve favorecer de modo semelhante a hidrólise destes substratos. De fato, os menores fatores de aceleração (5.10^{+5}, $3,6.10^{+6}$, $1,2.10^{+5}$ e $2,9.10^{+4}$ para fuco, gluco, gala e xilo, respectivamente) são mais próximos entre si do que os respectivos valores de aceleração observados na enzima selvagem (tabela 5.16.1.). A forma mais ativa da Sfβgli50 teria um sítio ativo onde além destes "elementos catalíticos básicos" estariam "adicionados elementos" que favorecem ainda mais a hidrólise dos substratos preferenciais. Deste modo, as mutações poderiam estar prejudicando estes "elementos catalíticos adicionais" e, deste modo, os fatores de aceleração para as reações dos substratos preferencialmente hidrolisados teriam uma faixa maior de valores para oscilar até atingir o "patamar básico".

Além disto, há ainda uma outra observação que pode ser feita. Pode ser percebido que plotes das acelerações das reações de hidrólise de gluco *versus* fuco tendem a ter uma relação linear quando construídos para grupos das Sfβgli50 mutantes que mostram um padrão similar de especificidade por estes dois substratos, determinado, por exemplo, a partir da eficiência catalítica relativa (figura 5.16.4.). Assim, as enzimas mutantes divididas em três grupos, as que tendem a ter um aumento da eficiência catalítica sobre gluco (figura 5.16.4. – A), as que tendem a ter este aumento sobre fuco (figura 5.16.4. – C) e as que mostraram especificidades similares a selvagem (figura 5.16.4. – B) exibiram relação linear entre os fatores de aceleração para hidrólise de fuco e

gluco. O grupo A é constituído pelas mutantes 24C12 (S358F), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G), 19H2 (S378G), Y345A, F460A, Q269A, Y331F, Y331F/R97M, R474A, S349A, S198A, Y56A, S378A e R189A. O grupo B é constituído pelas mutantes 6G10 (P348L), 16G12 (A156V), 21H8 (Y56C), 38B11 (P346S), D362A, M57A, P344A, P346A, S424A, S358A e N400V. Sendo o grupo C constituído pelas mutantes 38C6 (F460L), 40G11 (N400D), 4C11 (T35A), 23H2 (S424F), 19C7 (R474H), E458A, E458D, P348A, R268M, R97M e N400A. Portanto, os dados sugerem que independentemente do efeito sobre a especificidade há uma "conexão" entre a capacidade de hidrolisar fuco e gluco nestas enzimas. Deve ser ressaltado que, como ilustrado pelas figuras 5.16.4. – D e E, o mesmo plote dos mesmos valores, mas sem separar as enzimas em grupos não resulta em uma boa relação linear (o coeficiente de correlação é baixo, menor do que 0,9).

A "conexão" entre os fatores de aceleração da reação de hidrólise de fuco e gluco não é uma observação intuitivamente esperada. Pode-se assumir que o fator de aceleração para um dos substratos, o qual está relacionado às interações não-covalentes que estabilizam o complexo $ES^{\ddagger}$, não é independente do fator para o segundo substrato. Isto é válido para qualquer uma das preferências da Sfβgli50 frente a fuco e gluco. Logo, mutações que tornam a Sfβgli50 "mais apta" a hidrolisar fuco necessariamente aumentam a capacidade de hidrolisar gluco, independentemente da especificidade (preferência relativa) por estes substratos. Curiosamente a conexão, embora presente, não ocorre do mesmo modo nos três grupos de mutantes. Assim, para as Sfβgli50 mutantes que um tem aumento na preferência por gluco,

ganhos na interação e na estabilização do complexo $ES^{\ddagger}$ de gluco se transferem quase integralmente para interação com fuco (inclinação = 0,9; figura 5.16.4. - A). Já para mutantes que tendem a ganhar preferência por fuco a transferência de ganhos de interação com fuco se transferem parcialmente para a ligação de gluco (inclinação = 0,26; figura 5.16.4. - C). As bases desta "conexão" talvez residam no fato destes substratos apresentarem estruturas semelhantes. Assim, não há como evitar que mutações que gerem ganho ou melhoria na interação com um deles não sejam ao menos parcialmente "aproveitadas" para interações com o outro substrato.

Por fim, estas duas observações anteriores, semelhança entre a amplitude de valores de aceleração da reação de hidrólise de fuco e gluco e a ocorrência de uma relação linear entre estes fatores de aceleração para mutantes da Sfβgli50 com padrão de especificidade semelhante, reforçam a idéia de que esta enzima foi "selecionada" para a hidrólise preferencial destes dois substratos, fuco ou gluco, em detrimento de gala e xilo. De fato, a mesma análise foi realizada para os outros substratos, apresentando relações menos consistentes (seus coeficientes de correlação linear são baixos, menores do que 0,9).

TABELA 5.16.1. Fatores de aceleração da reação de hidrólise dos substratos *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo (FUCO), *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (GLUCO), *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (GALA) e *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (XILO) para as Sfβgli50 selvagem e mutantes.

	substratos			
MUTANTES	**FUCO**	**GLUCO**	**GALA**	**XILO**
4C11 (T35A)	$5,7.10^{+08}$	$2,7.10^{+08}$	$1,0.10^{+07}$	$1,9.10^{+06}$
6G10 (P348L)	$6,3.10^{+08}$	$4,1.10^{+08}$	$1,9.10^{+07}$	$3,2.10^{+06}$
16G12 (A156V)	$6,3.10^{+08}$	$4,6.10^{+08}$	$9,6.10^{+06}$	$2,0.10^{+06}$
19C7 (R474H)	$6,1.10^{+07}$	$7,0.10^{+06}$	$2,7.10^{+05}$	-
19H2 (S378G)	$1,2.10^{+08}$	$1,8.10^{+08}$	$1,3.10^{+06}$	$4,4.10^{+05}$
21H8 (Y56C)	$1,0.10^{+09}$	$7,7.10^{+08}$	$1,6.10^{+07}$	$3,7.10^{+06}$
23H2 (S424F)	$1,0.10^{+07}$	$5,2.10^{+06}$	$1,7.10^{+05}$	$2,9.10^{+04}$
24C12 (S358F)	$4,4.10^{+08}$	$4,7.10^{+08}$	$1,2.10^{+07}$	$2,3.10^{+06}$
30A8 (Y345C)	$5,2.10^{+08}$	$5,6.10^{+08}$	$1,1.10^{+07}$	$2,0.10^{+06}$
37A9 (R189G)	$3,1.\ 10^{+9}$	$4,4.\ 10^{+9}$	$5,8.10^{+07}$	$2,3.10^{+07}$
38C6 (F460L)	$4,3.10^{+07}$	$8,7.10^{+06}$	$1,4.10^{+06}$	$9,3.10^{+04}$
39B11 (P346S)	$1,5.\ 10^{+9}$	$1,1.\ 10^{+9}$	$2,2.10^{+07}$	$3,6.10^{+06}$
40G11 (N400D)	$8,7.10^{+06}$	$3,5.10^{+06}$	$1,2.10^{+05}$	-
D362A	$7,3.10^{+08}$	$5,6.10^{+08}$	$1,7.10^{+07}$	$2,3.10^{+06}$
E458A	$6,5.10^{+08}$	$1,6.10^{+08}$	$9,2.10^{+06}$	$1,5.10^{+06}$
E458D	$8,7.10^{+08}$	$2,9.10^{+08}$	$1,1.10^{+07}$	$1,1.10^{+06}$
F460A	$3,2.10^{+06}$	$1,9.10^{+07}$	$6,0.10^{+05}$	-
H330A	$2,4.10^{+08}$	$5,5.10^{+08}$	$2,1.10^{+06}$	$1,1.10^{+06}$
M442A	$7,3.10^{+06}$	$3,4.10^{+06}$	-	-
M447A	$3,8.10^{+06}$	$1,7.10^{+07}$	-	-
M57A	$8,2.10^{+08}$	$6,4.10^{+08}$	$1,7.10^{+07}$	$3,3.10^{+06}$
N400A	$7,8.10^{+06}$	$3,6.10^{+06}$	$2,8.10^{+04}$	-
N400V	$2,8.10^{+07}$	$1,8.10^{+07}$	$3,5.10^{+05}$	-

TABELA 5.16.1. Continuação.

MUTANTES	substratos			
	FUCO	**GLUCO**	**GALA**	**XILO**
P344A	$1,7.\ 10^{+9}$	$1,3.\ 10^{+9}$	$1,7.10^{+07}$	$5,3.10^{+06}$
P346A	$1,8.10^{+08}$	$1,2.10^{+08}$	$2,1.10^{+06}$	$6,1.10^{+05}$
P348A	$3,2.10^{+07}$	$2,5.10^{+06}$	$1,8.10^{+05}$	-
Q269A	$3,2.10^{+08}$	$3,7.10^{+08}$	$2,8.10^{+06}$	$1,0.10^{+06}$
R189A	$6,2.10^{+06}$	$5,5.10^{+06}$	$9,2.10^{+05}$	-
R268M	$3,2.10^{+09}$	$8,5.10^{+08}$	$1,1.10^{+07}$	$2,4.10^{+06}$
R474A	$4,2.10^{+06}$	$1,7.10^{+07}$	$2,8.10^{+04}$	-
R97K	$5,8.10^{+07}$	$2,7.10^{+08}$	$1,2.10^{+06}$	$1,4.10^{+06}$
R97M	$3,5.10^{+07}$	$1,8.10^{+07}$	$3,8.10^{+06}$	-
S198A	$1,0.\ 10^{+9}$	$9,1.10^{+08}$	$3,2.10^{+07}$	$4,9.10^{+06}$
S349A	$1,5.\ 10^{+9}$	$1,3.\ 10^{+9}$	$4,7.10^{+07}$	$8,5.10^{+06}$
S358A	$9,7.10^{+08}$	$7,4.10^{+08}$	$2,6.10^{+07}$	$4,5.10^{+06}$
S378A	$1,4.10^{+9}$	$1,4.10^{+9}$	$1,3.10^{+7}$	$4,2.10^{+6}$
S403A	$7,5.10^{+6}$	$3,4.10^{+8}$	$6,2.10^{+6}$	$1,9.10^{+6}$
S424A	$8,3.10^{+8}$	$6,0.10^{+8}$	$1,1.10^{+7}$	$1,9.10^{+6}$
Y167F	$1,8.10^{+9}$	$1,5.10^{+9}$	$3,3.10^{+7}$	$5,0.10^{+6}$
Y228F	$1,8.10^{+9}$	$1,3.10^{+9}$	$3,0.10^{+7}$	$4,9.10^{+6}$
Y331F	$6,0.10^{+6}$	$2,1.10^{+7}$	$9,5.10^{+5}$	-
Y331F/R97M	$5,0.10^{+5}$	$5,6.10^{+6}$	-	-
Y345A	$1,4.10^{+6}$	$1,4.10^{+7}$	-	-
Y345F	$1,5.10^{+9}$	$7,5.10^{+8}$	$1,5.10^{+7}$	$2,6.10^{+6}$
Y56A	$8,2.10^{+8}$	$7,4.10^{+8}$	$1,3.10^{+7}$	$2,7.10^{+6}$
selvagem	$1,7.10^{+9}$	$1,3.10^{+9}$	$3,0.10^{+7}$	$5,1.10^{+6}$

TABELA 5.16.2. Dados de k_{cat}/K_m relativo e aceleração relativa da reação de hidrólise dos substratos para as Sfβgli50 selvagem e mutantes.

enzima	substrato	k_{cat}/K_m relativo	aceleração relativa
selvagem	fuco	100	100
	gluco	26	77
	gala	0,9	1,8
	xilo	0,12	0,3
16G12 (A156V)	fuco	100	100
	gluco	24	73
	gala	0,7	1,5
	xilo	0,13	0,32
19C7 (R474H)	fuco	100	100
	gluco	3,9	11
	gala	0,2	0,43
19H2 (S378G)	fuco	100	67
	gluco	49	100
	gala	0,6	0,75
	xilo	0,14	0,24
21H8 (Y56C)	fuco	100	100
	gluco	25	75
	gala	0,8	1,5
	xilo	0,14	0,36
23H2 (S424F)	fuco	100	100
	gluco	16	50
	gala	0,8	1,6
	xilo	0,11	0,3
24C12 (S358F)	fuco	100	94
	gluco	35	100
	gala	1,3	2,7
	xilo	0,2	0,51
30A8 (Y345C)	fuco	100	92
	gluco	36	100
	gala	1,1	2,1
	xilo	0,16	0,4
37A9 (R189G)	fuco	100	72
	gluco	46	100
	gala	24	1,3
	xilo	0,3	0,5
38C6 (F460L)	fuco	100	100
	gluco	6,5	20
	gala	1,6	3,2
	xilo	0,1	0,21
39B11 (P346S)	fuco	100	100
	gluco	24	73
	gala	0,8	1,5
	xilo	0,1	0,25
40G11 (N400D)	fuco	100	100
	gluco	13	41
	gala	0,7	1,3
4C11 (T35A)	fuco	100	100
	gluco	16	48
	gala	1	1,8
	xilo	0,1	0,3
6G10 (P348L)	fuco	100	100
	gluco	22	65
	gala	1,5	3
	xilo	0,2	0,5
D362A	fuco	100	100
	gluco	25	76
	gala	1,2	2,4
	xilo	0,13	0,31
E458A	fuco	100	100
	gluco	8,2	25
	gala	0,7	1,4
	xilo	0,09	0,23

TABELA 5.16.2. Continuação.

enzima	substrato	k_{cat}/K_m relativo	aceleração relativa
E458D	fuco	100	100
	gluco	11	33
	gala	0,6	1,3
	xilo	0,05	0,13
F460A	fuco	48	17
	gluco	100	100
	gala	4,7	3
H330A	fuco	100	43
	gluco	75	100
	gala	0,4	0,4
	xilo	0,2	0,2
M57A	fuco	100	100
	gluco	26	78
	gala	1	2
	xilo	0,16	0,4
M442A	fuco	100	100
	gluco	15	46
M447A	fuco	71	23
	gluco	100	100
N400V	fuco	100	100
	gluco	21	63
	gala	0,6	1,2
N400A	fuco	100	100
	gluco	15	45
	gala	0,2	0,36
P344A	fuco	100	100
	gluco	25	72
	gala	0,5	1
	xilo	0,12	0,3
P346A	fuco	100	100
	gluco	20	63
	gala	0,5	1
	xilo	0,13	0,33
P348A	fuco	100	100
	gluco	2,5	8
	gala	0,3	0,6
Q269A	fuco	100	85
	gluco	38	100
	gala	0,4	0,74
	xilo	0,1	0,3
R189A	fuco	100	100
	gluco	29	89
	gala	7,5	15
R268M	fuco	100	100
	gluco	8,9	27
	gala	0,2	0,33
	xilo	0,02	0,07
R474A	fuco	73	24
	gluco	100	100
	gala	0,2	0,16
R97K	fuco	66	22
	gluco	100	100
	gala	0,7	0,45
	xilo	0,6	0,51
R97M	fuco	100	100
	gluco	17	50
	gala	5,5	11
S198A	fuco	100	100
	gluco	29	89
	gala	1,6	3
	xilo	0,2	0,5

TABELA 5.16.2. Continuação.

enzima	substrato	k_{cat}/K_m relativo	aceleração relativa
S349A	fuco	100	100
	gluco	28	87
	gala	1,6	3
	xilo	0,2	0,6
S358A	fuco	100	100
	gluco	25	76
	gala	1,3	2,6
	xilo	0,2	0,5
S378A	fuco	100	100
	gluco	33	100
	gala	0,5	1
	xilo	0,12	0,3
S403A	fuco	6,6	2
	gluco	100	100
	gala	2,8	2
	xilo	0,7	0,6
S424A	fuco	100	100
	gluco	24	72
	gala	0,7	1,3
	xilo	0,1	0,23
Y167F	fuco	100	100
	gluco	26	80
	gala	0,9	2
	xilo	0,1	0,3
Y228F	fuco	100	100
	gluco	23	71
	gala	0,9	2
	xilo	0,1	0,3
Y331F	fuco	86	28
	gluco	100	100
	gala	7	4,5
Y331F/ R97M	fuco	27	9
	gluco	100	100
Y345A	fuco	100	10
	gluco	30	100
Y345F	fuco	100	100
	gluco	17	51
	gala	0,5	1
	xilo	0,07	0,2
Y56A	fuco	100	100
	gluco	29	90
	gala	0,8	1,6
	xilo	0,13	0,32

5.17. CONCLUSÕES da 2ª ETAPA.

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo das bases moleculares da especificidade pelo substrato em β-glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases, utilizando como modelo experimental uma β-glicosidase pertencente a larva de *Spodoptera frugiperda* (Sfβgli50). Deste modo, na segunda etapa deste trabalho, procurou-se identificar resíduos ou regiões da Sfβgli50 que participem do processo de modulação da especificidade pelo substrato e que ainda não tenham sido descritos na literatura.

Assim, selecionou-se 14 Sfβgli50 mutantes geradas por mutagênese aleatória in vivo (4C11(T35A), 6G10 (P348L), 15E8 (R474H), 16G12 (A156V), 19C7 (R474H), 19H2 (S378G), 21H8 (Y56C), 23H2 (S424F), 24C12 (S358F), 30A8 (Y345C), 37A9 (R189G), 38C6 (F460L), 39B11 (P346S) e 40G11 (N400D)). As análises de "contatos" envolvendo estes resíduos possibilitaram a construção de 32 novas Sfβgli50 mutantes com trocas em 27 diferentes resíduos (D362, E458, F460, H330, M442, M447, M57, N400, P344, P346, P348, Q269, R189, R268, R474, R97, S198, S349, S358, S378, S403, S424, Y167, Y228, Y331, Y345 e Y56).

Após indução da expressão de tais Sfβgli50 mutantes em sistema heterólogo de expressão em bactéria, os dados obtidos revelaram que todas mutantes apresentaram-se enoveladas e estáveis nas condições dos ensaios enzimáticos. A caracterização cinética destas mutantes em conjunto com os dados de alinhamento de estrutura primária e construções de mapas de "contatos" sugerem que alguns destes resíduos atuam em grupos e, assim, podem modular a especificidade pelo substrato na Sfβgli50 através de "vias de contatos" que conectam o exterior ao interior do sítio ativo. Assim, os efeitos de

mutações em resíduos que compõem uma “via” podem ser propagados através de suas conexões e, assim, atingirem outras porções da Sfβgli50, como o sítio ativo. Esta propagação deve se dar através de alterações no posicionamento espacial e no conjunto das interações não-covalentes entre os resíduos envolvidos.

Os resíduos S424 e N400 podem atuar em conjunto modulando a atividade enzimática e a eficiência catalítica relativa da Sfβgli50 de tal forma que efeitos de mutações na S424 atingem o sítio ativo por meio de N400. Assim, S424, N400, E399 e W444 devem constituir uma “via de contatos” .

Também os resíduos S378, H330 e Y331 podem atuar em grupo. Destes três resíduos, Y331 está diretamente em contato com o W444 e E399, o resíduo H330 é o que está mais próximo da Y331 e faz ligação de hidrogênio com o nucleófilo catalítico, E399, mas não está em “contato direto” com o W444, enquanto a S378 interage com a H330, mas não está em “contato” com nenhum resíduo do interior do sítio ativo. As mutações sobre tais resíduos revelaram, nesta ordem, uma crescente queda da atividade enzimática e um aumento da eficiência catalítica relativa sobre gluco, de tal forma que esta ordem de importância destes resíduos na modulação da especificidade pelo substrato parece correlacionada com sua distância (em termos de “contatos”) com resíduos do sítio ativo.

O fato das “vias de contatos” representadas por S378/H330/Y331 e S424/N400 terem efeitos distintos sobre a especificidade pelo substrato e, segundo discutido, atinjam a plataforma basal do glicone, sugere que elas causem modificações distintas no W444.

O resíduo F460 cuja cadeia lateral posiciona-se paralelamente ao W444 também deve determinar o posicionamento deste resíduo, sendo que tal idéia é reforçada pelos dados da mutação do resíduo S403.

Os resíduos S358, D362, S403, E458 e F460 podem formar uma “via que conectaria” a S358 ao W444 no sítio ativo. A mutação S358F causou aumento da preferência por gluco em relação à fuco. Assim, o efeito “drástico” desta mutação pode ter se “propagado” alterando o posicionamento do resíduo D362, o qual faz uma ligação de hidrogênio com a S403 e “contatos” com o E458 e ter atingido resíduos como a F460 e, consequentemente, a plataforma basal do glicone, W444, alterando a especificidade pelo substrato e provocando queda da atividade enzimática.

Os dados sugerem que o “contato” entre R474 e M447 seja importante para a manutenção do posicionamento do trecho de aminoácidos 443-AWSLMDNFE-451, no qual está a plataforma basal do glicone, W444. A remoção da ligação de hidrogênio entre R474 e M447 causou uma inversão da especificidade que se assemelha a verificada com as mutações Y331F, F460A e S403A.

Os dados sugerem ainda uma “via” representada por T35/Y96/R97 que conectaria o trecho de aminoácidos 34-ATA-36 com H142, E399, Q39, E451 e W444 que são resíduos do sítio ativo.

Logo, um ponto comum entre as “vias” apresentadas acima seria conectar e provocar alterações na plataforma basal do glicone, W444.

Além das “vias” propostas para os resíduos acima apresentados há também uma “via” envolvendo os resíduos constituintes da alça rica em prolinas (P344 a S349). Três das 14 enzimas mutantes selecionadas na “varredura” eram de trocas de resíduos desta mesma alça (P344, Y345 e P348). Os dados sugerem que Y345 presente na alça conecte-se a R268 e Q269 e que estes dois resíduos influenciem o sítio ativo por meio de seus “contatos” com a R189, presente no segmento 187-EPRE-190, o qual contem os resíduos do sítio ativo E190 e E187.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os resultados obtidos dentro da primeira etapa deste trabalho são uma contribuição inédita, uma vez que ainda não haviam caracterizações das interações entre o aglicone e o sítio ativo das β-glicosidases. Esta contribuição poderá ser significante, no futuro, para o aprimoramento do uso de β-glicosidases na produção de glicosídeos através de transglicosilação, pois é justamente na região de ligação do aglicone que se posiciona o aceptor na reação de síntese.

De forma complementar, os resultados obtidos dentro da segunda etapa deste trabalho ampliam os conhecimentos dos mecanismos que modulam a atividade enzimática das enzimas em geral e das β-glicosidases em particular. Considerando que a especificidade pelo substrato é uma das mais importantes propriedades das enzimas, estes resultados também podem contribuir para o desenvolvimento de β-glicosidases adequadas a processos biotecnológicos.

7. REFERÊNCIAS.

Aguilar, C. F., Sanderson, I., Moracci, M., Ciaramella, M., Nucci, R., Rossi, M. and Pearl, L.L.. 1997. **Crystal structure of O-glycosidase from the *Hyperthermophilic Archeon Sulfolobus solfataricus*: Resilience as Key Factor in Thermostability**. Journal of Molecular Biochemistry. Vol. 270. 789-802.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.. 1990. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol.. Vol 215 (3). 403-410.

Amitai, G., Shemesh, A., Sitbon, E., Shklar, M., Netanely, D., Venger, I., Pietrokovski, S.. 2004. **Network analysis of protein structures identifies functional residues.** Journal of Molecular biology. Vol. 344. 1135-1146.

Babcock, G.W., Esen, A.. 1994. **Substrate specificity of maize ß-glucosidase.** Plant Sci. Vol. 101. 31-39.

Bennett, R.N., Hick, A.J., Dawson, G.W., Wallsgrove, R. M.. 1995. **Glucosinolate Biosynthesis.** Plant Physiol. Vol. 109. 299-305.

Beutler, E.. 1992. **Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment.** Science. Vol. 256. 794-798.

Beutler, E., Beutler, L., West, C.. 2004. **Mutations in the gene encoding cytosolic β-glucosidase in Gaucher disease.** Journal. Lab. Clin. Med. Vol. 144. 65-68.

Barnett, C.B., Berka, R., Fowler, T.. 1991. **Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular ß-glucosidase from *Tricoderma reesei* : evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates**. Bio/Techn. Vol. 9. 562-567.

Barret, T., Suresh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J., Hughes, M.A.. 1995. **The crystal structure of a cyanogenic glicosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase**. Structure. Vol. 15. 951-960.

Blum, H., Beir, H., Gross, H.. 1987. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels.** Electrophoresis. Vol. 8. 93-99.

Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., Palme, K.. 1993. **Release of active cytokinin by a ß-glucosidase localized to the maize root meristem.** Science. Vol. 262. 1051-1054.

Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S. and 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. Vol. 5. 663-675.

Bones, A.M., Husebye, H., Arzt, S., Burmeister, W.P., Hartel, F.V., Brandt, A., Rossiter, J.T.. 2005. **Crystal structure at 1.1 Angstroms resolution of an insect myrosinase from Brevicoryne brassicae shows its close relationship to beta-glucosidases. Insect Biochem. Mol. Biol. 35:1311-1320.**

Cherry, J.R. and Fidantsef, A.L.. 2003. **Directed evolution of industrial enzymes**. Current Opinion in Biotechnology. Vol. 14. 438-443.

Chi Y-I, Martinez-Cruz, L.A., Jancarik, J., Swanson, R.V., Robertson, D.E and Kim, S.H.. 1999. **Crystal structure of the β-glycosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability**. Febs Letters. Vol. 445. 375-383.

Cicek, M., Blanchad, D., Bevan, D. R., and Esen A.. 2000. **The aglycone specificity-determining sites are diffrent in 2,4 dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize glycosidase) and Dhurrinase (Sorghum glucosidase).** The Jornal of Biological Chemistry. Vol. 275. 20002-20011.

Coutinho, P.M. and Henrissat, B.. 2007. **Carbohydrate active enzymes server**, http://afmb.cnrs-mrs.fr/Cazy.

Conn, E.E.. 1981. **Cyanogenesis glycosides. In: Stumpf P K, Conn (Eds) Biochemistry of Plants.** Academic Press, New York. Vol 7, pp. 479-500.

Creighton, T.. 1993. **Proteins: Structurres and molecular properties.** Second edition. W.H. Freeman and Company.

Cruz, I. e Resende Monteiro, M.A.. *Dezembro, 2004*. **Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum.*** ISSN 0102-0099. *Sete Lagoas, MG*

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D., Henrissat, B., Burmeister, W. and Esen, A.. 2000. **Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β-glucosidase and a model of its complex with p-nitropheyl-β-D-thioglucoside.** Biochemistry. Vol. 354. 37-46.

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D., Henrissat, B. and Esen, A.. 2001. **The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β-glucosidases is revelaed by crystal structure of mutant maize β-glicosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and – dhurrin complexes.** Proceedings of the National Academy of Science, vol. 97, 13555 – 13560.

Diemond, A.V., Scheib, H.. 2004. **iMOLTALK – a programming library for protein structures and structure analysis.** BMC Bioinformatics. Vol. 5. 39-46.

Eftink, M.R., Ghiron, C.A.. 1976. **Exposure of tryptophanyl residues in protein. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. Biochemistry.** Vol. 15. 672-680.

Esen, A.. 1993. **β-glucosidases: biochemistry and molecular biology,** ACS Symposium series.

Esen, A., Bevan, D.R., Moriniere, J., Czjzek, M. and Verdoucq, L.. 2003. **Mutational and strutural analysis of aglicone specificity in maize and sorghum β-glucosidases**. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278. 25055-25062.

Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J.. 1983. **Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants.** CRC Crit. Rev Food Sci. Nutr. Vol. 18. 123-201.

Fernandez, P., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., Martín-Lomas, M.. 1995. **Substrate specificity of small-intestinal lactase: study of the steric effects and hydrogen bonds involved in enzyme-substrate interaction.** Carbohydrate Research. Vol. 271. 31-42.

Fersht, A.. 1999. **Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and potein folding**, W.H. Freeman and Co, NY- USA.

Ferreira, C., Terra, W.R.. 1994. **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** Comp. Biochem. Physiol. Vol. 109B. 1-62.

Ferreira, C., Torres, B.B., Terra, W.R.. 1998. **Substrate specificities of midgut β-glycosidases from insects of different orders.** Comp. Biochem. Physiol. Vol. 119B. 219–225.

Ferreira, A.H.P., Marana, S.R., Terra, W.R. and Ferreira, C.. 2001. **Purification, molecular cloning, and properties of a β-glycosidase isolated from midgut lumem of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae.** Insect Biochem. Mol. Biol. Vol. 31. 1065-1076.

Fowler, T.. 1993. **Deletion of the *Tricoderma reesei* ß-glucosidase gene *bgl1*. In A. Esen ed. ß-Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology**. ACS symposium series 533. American Chemical Society. Washington D.C., pp. 56-65.

Fukuda, K., Mori, H., Okuyama, M., Kimura, A., Ozaki, H., Yoneyama, M. and Chiba, S.. 2002. **Identification of essential ionizable groups and evaluation of subsite affinities in the active site of β-glucosidase F1 from a *Streptomyces sp***. Bioscience and Biotechnology Biochemistry. Vol. 66. 2060-2067.

Gloster, T., Roberts, S., Ducros, V., Perugino, G., Rossi, M., Hoos, R., Moracci, M., Vasella, A. and Davies, G.. 2004. **Structural studies of the β-glicosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently bound inhibitors**. Biochemistry. Vol. 43. 6101-6109.

Greene, L. and Higman, V.. 2003. **Uncovering network systems within protein sctructures.** Journal of Molecular biology. Vol. 334. 781-791.

Greener, A., Callahan, M., Jerpseth, B.. 1996. **An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain – Methods in molecular biology: In vitro mutagenesis protocols.** Vol. 57. Humana Press Inc.. Totowa, HJ.

Geisler-Lee, J., Geisler, M., Coutinho, P.M., Sergerman, B., Nishikubo, N., Takahashi, J., Aspergorg, H., Djerbi, S., Master, E., Andersson-Gunneras, S., Sundberg, B., Karpinski, S., Teeri, T.T., Kleczkowski, L.A., Henrissat, B., Mellerowicz, E.J., 2006. **Poplar Carohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses.** Plant Physiology. Vol. 140. 946-962.

Gomori, G..1955. **Methods in enzymology - Preparation of buffers for use in enzyme studies**, Acad. Press INC., Publishers. Vol. 01. 138-146.

Gopalan, V., Daniels, L.B., Glew, R.W., Claeyssensi, M.. 1989. **Kinetic analysis of the interaction of alkylglycosides with two human β-glycosidases.** Biochemistry Journal. Vol. 262. 541-548.

Guex, N., Peitsch, M.C.. 1997. **Swiss-Model and Swiss- PDBViewer: An environment for comparative protein modeling.** Electrophoresis. Vol. 18. 214-272.

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R., Cordonnier, R.. 1985. **The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components.** Journal of Chromatografy. Vol.331. 83-90.

Hakulinen, N.I., Paavilainen, S., Korpela, T., Rouvinem, J.. 2000. **The crystal structure of β-glucosidase from *Bacillus circulans sp* alkalophilus: Ability to from long polymeric assemblies**. Journal of Structural Biology. Vol. 129. 69-79.

Halkier, A.B., Moller, B.L.. 1989. **Biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in seedlings of *sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involved.** Plant Physiol. Vol. 90. 1552-1559.

Henrissat, B.. 1991. **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities**. Biochem. Jounal. Vol. 280. 309-316.

Henrissat, B., and Davies, G. J.. 1997. **Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases.** Current Opinion in Structural Biology. Vol. 7. 637-644.

Henrissat, H., Coutinho, P. M., Stam, M., Blanc, E.. 2003. **Why are these so many carbohydrate-acive enzyme related genes in plants?** TRENDS in Plant Science. Vol.8, nº 12. 563-565.

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. Vol. 15. 637-645.

Hruska, A.J., 1988. **Cyanogenic glucosides as defense compounds. A review of the evidence.** J Chem Eco. Vol. 14. 2213-2217.

Hrmova, M., MacGregor, A., Biely, P., Stewart, R. J., and Fincher, G. B.. 1998. **Substrate binding and catalytic mechanism of a barley β-D-glucosidase/1,4 b-D-glucan exohydrolase.** J. Biol. Chem.. Vol. 273. 11134-11143.

Husebye, H., Arzt, S., Burmeister, W.P., Hartel, F.V., Brandt, A., Rossiter, J.T., Bones, A.M.. 2005. **Crystal structure at 1.1 Angstroms resolution of an insect myrosinase from Brevicoryne brassicae shows its close relationship to beta-glucosidases.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 35. 1311-1320.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R.. 1989**. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.** Gene, Vol. 77. 51-59.

Isorna, P., Polaina, J., Latorre-Garcia, L., Canãda, F.J., González, B., Sanz-Aparicio, J.. 2007. **Cristal 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. Vol. 371. 1204-1218.

Kakuta, Y., Noguchi, J., Hayashi, Y., Baba, Y., Okino, N., Kimura, M., Ito, M., 2008. **Crystal structure of the covalent intermediate of human cytosolic beta-glucosidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 374. :549-552.**

Kaper, T., Lebbink, J., Pouwels, J., Kopp, J., Schulz, G.E., Oost, J. and Vos, W.. 2000. **Comparative strutural analysis and substrate specificity engineering of the hyperthermostable β-glucosidase CelB from *Pyrococcus furiosus***. Biochemistry. Vol. 39. 4963-4970.

Kempton, J.B., Withers, S.G.. 1992. **Mechanism of *Agrobacterium* β-glicosidase: Kinetic studies**. Biochemistry. Vol. 31. 9961-9969.

Leoni, O., Iori, R., Palmieri, S., Espósito, E., Menegatti, E., Cortesi, R., Nastruzzi, C.. 1997. **Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and in vitro antiproliferative studies.** Bioorg Med Chem. Vol. 5. 1799-1806.

Laemmli, U.K.. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature. Vol. 227. 680-685.

Lockless, S. and Ranganathan, R.. 1999. **Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families.** Science. Vol. 286. 295-299.

Marana, S.R., Terra, W.R. & Ferreira, C.. 2000. **Purification and properties of a β-glycosidase purified from midgut cells of Spodoptera frugirperda (lepidoptera) larvae.** Insect Biochem. Mol. Biol.. Vol. 30. 1139-1146.

Marana, S.R., Jacobs-Lorena, M., Terra, W.R. and Ferreira, C.. 2001. **Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insects digestive β-glycosidase.** Biochimica and Biophys. Acta. Vol. 1545. 41 – 52.

Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C.. 2002. **The role of amino acid residues Q39 and E451 in the determination of substrate especificity of the *Spodoptera frugiperda* β-glycosidase.** Eur. J. Biochem. Vol. 269. 3705-3714.

Marana, S.R., Andrade, E.H.P., Mendonça, L.M.F., Ferreira, C. and Terra, W.R.. 2003. **The role of amino acid residues R97 and Y331 in the modulation of the pH optimum in a β-glycosidase.** Europen Journal of Biochemistry. Vol. 270. 4866-4875.

Marana, S.R.. 2006. **Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases.** IUMBM Life. Vol. 58. 63-73.

McPherson, M.J., Møller,S.G.. 2006. **PCR.** Second Edition. Taylor & Francis Group. ISBN: 0-4153-5547-8.

Morant, A.V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S.C., Sánchez-Pérez, R., Møller, B.L., Bak, S.. 2008. **β-Glucosidases as detonators of plant chemical defense.** Phytochemistry. Vol. 69. 1795–1813.

Niemeyer, H.M.. 1988. **Hydroxamic acid (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae.** Phytochemistry. Vol. 27. 3349-3358.

Nowacki, J., Bandurski, R.S.. 1980. **Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed in precursors of *Zea mays* L. (maize).** Plant Physiol. Vol. 65. 422-427.

Ohassi, T., Boggs, S., Robbins, P., Bahnson, A., Patrene, K., Wei, F., Wei, J., Li, J., Lucht, L., Fei, Y., Kimax, M., He, H., Mowery-Rushton, P., Barranger, J.A.. 1992. **Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerobrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of the bone marrow transduced by a retroviral vector.** Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 89. 11332-11336.

Oxtoby, E., Dunn, M.A., Pancoro, A., Hughes, M.A.. 1991. **Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic ß-glucosidase (Linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.).** Plant Mol Bio. Vol. 17. 209-219.

Poulton, J. E.. 1990. **Cyanogenesis in Plants**. Plant Physiol. Vol. 94. 401-405.

Quiocho, F.A.. 1986. **Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein sugar interactions.** Annual Review of Biochemistry. Vol. 55. 287-315.

Reetz, M.T., Jaeger, K.E.. 1999, **Superior biocatalysts by directed evolution**. Topics in Current Chemistry. Vol. 200. 31-57.

Roitner, M., Shalkhammer, T., Pittner, F.. 1984. **Characterization of naringinase from *Aspergillus niger*.** Monatsch Chem. Vol. 15. 1255-1267.

Sá-Correia, I., Fialho, A. M., Videira, P., Coutinho, P.M., Marques, A.R.. 2003. **Sphingomonas paucimobilis β-glucosidase Bgl1: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1**. Biochemistry journal, vol. 370. 793-804.

Said, S. and Pietro, R.C.L.R.. 2002. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Editora Eventos.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Second edition.

Sanz – Aparício, J., Hermoso, A. J., Martinez-Ripoll, M., Lequerica, L. J. and Polaina, J.. 1998. **Crystal structure of glycosidase A from *Bacillus polymyxa*: Insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases**. Journal of Molecular Biology. Vol. 275. 491 – 502.

Schliemann, W.. 1984. **Hydrolysis of conjugated giberellins by ß-glucosidases from Dwarf Rice (*Oryza sativa* L. cv. Tan-ginbozu).** Plant Physiol. Vol. 116. 123-132.

Sedlák, M., Drabina, P., Bílková, E., Simunek, P. and Buchta, V.. 2008. **New targeting system for antimycotic drugs: β-Glucosidase sensitive Amphotericin B–star poly(ethylene glycol) conjugate.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. Vol. 18. 2952–2956.

Segel, I.H.. 1993. **Enzyme kinetics.** Wiley, New York.

Sethi, A., Eargle, J., Black, A.A., Luthey-Schulten, Z.. 2009. **Dynamical network in tRNA: protein complexes.** PNAS. Vol. 106. 6620-6625.

Shapiro, T.A., Fahey, J. W., Wade, K.L., Stephenson, K. K., Talalay, P.. 1998. **Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isoyhiocyanates of cruciferous vegetables.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prew. Vol. 7. 1091- 2000.

Shen, C., Menon, R., Das, D., Bansal, N., Nahar, N., Guduru, N., Jaegle, S., Peckham, J., Reshetnyak, Y.K.. 2008. **The protein fluorescence and structural tookit: Database and programs for the analysis of protein fluorescence and sctrutural data.** Proteins. Vol. 71. 1744-1754.

Socolich, M., Lockless, S.W., Russ, W.P., Lee, H., Gardner, K.H., Ranganathan, R.. 2005. **Evolutionary information for specifying a protein fold.** Nature. Vol. 437. 512-518.

Sol, A. del, Fujuhashi, H., Amoros, D., Nussinov, R.. 2006. **Residues crucial for maintaining short paths n network communication mediate signaling in proteins.** Molecular systems biology. Vol. X. 1-12.

Tabor, S. and Richardson, C.C.. 1985. **A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.** Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 82. 1074-1078.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G.. 1997. **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Research. Vol. 25. 4876-4882.

Tribolo, S., Berrin, J.G., Kroon, P.A., Czjzek, M., Juge, N., 2007. **The crystal structure of human cytosolic beta-glucosidase unravels the substrate aglycone specificity of a family 1 glycoside hydrolase.** Journal of Molecular Biology. Vol. 370. 964-975.

Turner, N.J., Reuben, C., Alexeeva, M.. 2003. **Directed evolution of enzymes: new biocatalystis for asymetric synthesis.** The Royal Society of Chemistry. Vol. 1. 4133-4137.

Verdoucq, L., Czjzek, M., Moriniere, J., Bevan, D.R. and Esen, A.. 2003. **Mutational and strutural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum β-glucosidases**. Journal of Biology and Chemistry. Vol. 278. 25055-25062.

Verdoucq, L., Moriniere, J., Bevan, D., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. and Czjek, M.. 2004. **Strutural determinants of substrate specificity in family 1 β-glucosidases.** Journal of Biology and Chemistry. Vol. 279. 31796-31803.

van Weely, S., Brandsma, M., Strijland, A., Tager, J.M., Aerts, J.M.F.G.. 1993. **Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease.** Biochim Biophys Acta. Vol. 1181. 55-62.

Voet, D. and Voet, J.G.. 1995. **Biochemistry**. John Wiley & Sons, INC. Second edition.

Wiesmann, C., Hengstenberg, W. and Schulz, G.E.. 1997. **Crystal structures and mechanism of 6-phospho-β-galactosidase from *Lactococcus lactis***. Journal of Molecular. Vol. 269. 851-860.

Wiese, G., Grambow, H.. 1986. **Indole-3-methanol-ß-D-glucoside and Indole-3- carboxylic acid-ß-D-glucoside are products of indole-3-acetic acid degradation in wheat leaf segments.** Phytochemistry. Vol. 25. 2451.

Withers, S.G., Rupitz, K., Street, I.P.. 1988. **2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides. A new class of specific mechanism-based glycosidase inhibitors** Jounal Biological Chemistry. Vol. 263. 7929-7932.

Withers, S.G., Warren, R.A.J, Trimbur, D. and Rupitz, K., 1992. **Mechanistic consequencesof mutation of the active site nucleophile Glu 358 in *Agrobacterium* β-glucosidase.** Biochemistry. Vol. 31. 9979-9985.

Withers, S.G., Warren, R.A.J, Graham, R., Trimbur, D. and Wang, Q., 1995. **Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* β-glucosidase by kinetic analysis of mutants.** Biochemistry. Vol. 34. 14554-14562.

Withe, A., Rose, D.R.. 1997. **Mechanism of catalysis by retaining β-glycosyl hydrolases.** Current Opinion in Structural biology. Vol. 7. 645-651.

Rye, C.S., Withers, S.G.. 2000. **Glycosidase mechanisms.** Current Opinion in Chemical Biology. Vol. 4. 573-580.

Xu, Z., Escamilla-Treviño, L.L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D. R., Winkel, B.S.J., Mohamed, A., Cheng, C., Shih, M., Poulton, J.E., Esen, A.. 2004. **Functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana glycoside hydrolase family 1**. Plant Molecular Biology. Vol. 55. 347-367.

Zagrobelny, M., Bak, S., Møller, B.L.. 2008. **Cyanogenesis in plants and arthropods**. Phytochemistry. Vol. 69. 1457–1468.

Zechel, D.L. and Whiters, S.G.. 2000. **Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst.** Acc. Chem. Res. Vol. 33. 11-18.

Zechel, D. L., Boraston, A. B., Gloster, T., Braston, C.M., Macdonald, J. M., Tilbrook, D. M. G., Stick, R. V., and Davies, G. J.. 2003. **Iminosugar glycosidase inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to beta-glucosidases.** J. Am. Chem. Soc.. Vol. 125. 14313-14323.