UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Estudo das bases moleculares da especificidade pelo
substrato de uma beta-glicosidase (AF052729) de
*Spodoptera frugiperda***

Julio Henrique Kravcuks Rozenfeld

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

SÃO PAULO

Data do Depósito do Trabalho na SPG: ____/____/____

Dedico esta Dissertação a quem devo tudo:

Meus pais, Pawel e Ester Malke.

Agradecimentos

Agradeço a todas essas pessoas pelo convívio proveitoso, ajuda e amizade...

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Marana, pela orientação e ajuda para vencer obstáculos.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia: Lúcio, Fábio, Marcelo e Fabiane.

Aos professores Walter Terra e Clélia Ferreira e a todos os amigos do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Fernando (Mig), Ana, Fábio (Pererê), Luiza, Ivanilde, Lucas Guerra, Daniela Beton, Thaís, Érica, Alexandra e Ciça.

Ao professor Henning Ulrich, à Paromita e aos demais amigos do Laboratório de Neurociência.

Aos professores Chuck, Ronaldo, Alícia e Bettina, pelas agradáveis discussões nos almoços.

À Débora, Diorge, Henrique Ramos e demais colegas de Pós-Graduação.

Ao Erich, Heberty, Douglas, Gracielle, Maynara e demais amigos do Laboratório de Viabilidade Celular.

À minha avó Sara, aos meus tios Eduardo e Doba e ao meu primo Abel, que sempre me acolheram com coração aberto e prato cheio.

Aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação.

Ao Departamento de Bioquímica do IQUSP pela excelente infra-estrutura.

Ao CNPq e à Fapesp pelo apoio financeiro.

Abreviaturas

Abs	Absorbância
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FPLC	Fast performance liquid chromatography
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
Fuc	Fucosídeo
Gal	Galactosídeo
Glc	Glucosídeo
IPTG	Isopropil β -tiogalactosídeo
MU β Fuc	Metilumbeliferil β -D-fucopiranosídeo
MU β Gal	Metilumbeliferil β -D-galactopiranosídeo
MU β Glc	Metilumbeliferil β -D-glucopiranosídeo
NP β Fuc	p-Nitrofenil β -D-fucopiranosídeo
NP β Gal	p-Nitrofenil β -D-galactopiranosídeo
NP β Glc	p-Nitrofenil β -D-glucopiranosídeo
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-ácido acético-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Sf β Gli50	β -glicosidase (Mr 50.000) de <i>Spodoptera frugiperda</i>

Índice

Abreviaturas	04
1- Resumos	07
1.1- Resumo	07
1.2- Abstract	09
2- Introdução	10
2.1- Enzimas e sua especificidade	10
2.2- Especificidade pelo substrato em β -glicosidases	12
2.3- Sf β gli50 como modelo de estudo	22
2.4- Manipulação de especificidade em β -glicosidases	28
2.5- Objetivos do Projeto	30
3- Materiais e Métodos	31
3.1- Mutagênese Sítio-Dirigida	31
3.2- Transformação de bactérias competentes	32
3.3- Purificação dos plasmídeos a partir de cultura de bactérias	33
3.4- Reação de sequenciamento de DNA	33
3.5- Expressão das Sf β gli50 recombinantes com vetor pT7-7	33
3.6- Lise das células induzidas	34
3.7- Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Phenyl HI PREP	34
3.7.1- Detecção das Sf β Gli50 recombinantes após a cromatografia hidrofóbica	35
3.8- Concentração das amostras de proteínas	36

3.9- Produção, purificação e caracterização dos duplos-mutantes utilizando o vetor pET46	36
3.9.1- Produção e expressão dos duplos-mutantes em pET46	36
3.9.2- Purificação das Sfβgli50 recombinantes através de Cromatografia de Afinidade em coluna de Níquel-Sepharose	38
3.9.3- Caracterização dos duplos-mutantes	39
3.10 – Produção, purificação e caracterização de SfβGli50 mutantes nas posições H142 e N186	39
3.10.1- Produção e expressão de H142A e de N186A	39
3.10.2 – Purificação das Sfβgli50 recombinantes através de Cromatografia de Afinidade em coluna de calmodulina-agarose	40
3.10.3- Caracterização dos mutantes H142A e N186A	41
3.11- Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida com SDS	41
3.12- Eletroforese em gel de agarose	42
3.13- Meios	42
3.13.1- LB líquido (Luria-Bertani)	42
3.13.2- Placas LB-Ágar	42
3.14- Mapas dos plasmídeos utilizados	43
4- Resultados e discussão	44
4.1- Considerações iniciais	44
4.2- Modelo para previsão da especificidade de Sfβgli50	45
4.3- Papel dos resíduos H142 e N186 na especificidade de Sfβgli50	89
5- Conclusões	101
6- Bibliografia	103

1- Resumos

1.1- Resumo

A β -glicosidase digestiva (Mr 50.000) de *Spodoptera frugiperda* (Sf β gli50) possui em seu sítio ativo resíduos de aminoácido que interagem de forma não-covalente com o substrato. Essas interações não-covalentes garantem a especificidade da enzima em relação a seus substratos.

Esse trabalho visa estudar o papel desses aminoácidos e suas interações com o substrato na especificidade da Sf β gli50.

Para isso, um modelo de previsão de especificidade baseado nas energias de interação entre diferentes resíduos de aminoácidos das posições 451 e 39 da Sf β gli50 e as hidroxilas 4 e 6 do glicone do substrato foi elaborado e testado através da produção e caracterização de três duplos-mutantes (S₄₅₁N₃₉, S₄₅₁E₃₉ e A₄₅₁E₃₉) da Sf β gli50.

O modelo mostrou-se apropriado qualitativamente para previsão do comportamento da especificidade frente a glucosídeos e galactosídeos, mas totalmente inadequado para previsões de preferência frente a fucosídeos e galactosídeos.

Estas conclusões indicaram que pressupostos iniciais do modelo, como independência das interações com o substrato e conservação estrutural do sítio ativo nos mutantes, estavam errados.

Analizou-se também a contribuição de outros dois resíduos do subsítio do glicone para a especificidade da Sf β gli50: H142 e N186, cujas energias de interação ainda não haviam sido determinadas.

Experimentos de mutação sítio-dirigida foram realizados para introduzir resíduos de Alanina nas posições 142 e 186. Os mutantes H142A e N186A foram expressos em bactéria e em seguida parcialmente purificados.

O mutante N186A apresentou baixa atividade catalítica, o que limitou sua caracterização. Por outro lado, a determinação de parâmetros cinéticos (V_{max} e V_{max}/K_m) mostrou que, em contraste com a Sfβgli50 selvagem, o mutante H142A é menos específico, principalmente no que diz respeito a fucosídeos.

1.2-Abstract

The Mr 50,000 *Spodoptera frugiperda* β -glycosidase (Sf β gli50) has active site amino acid residues that interact non-covalently with the substrate. These non-covalent interactions determine the enzyme's specificity towards its substrates.

This work aims to study the role of these amino acids and its interactions with the substrate in the specificity of Sf β gli50.

A specificity prediction model was created for such purpose. This model is based on interaction energies between different amino acid residues in positions 451 and 39 of the enzyme and hydroxyls 4 and 6 of the substrate's glycone.

The production and characterization of three double-mutants (S₄₅₁N₃₉, S₄₅₁E₃₉ and A₄₅₁E₃₉) were used to test the model, which proved to be qualitatively appropriate to predict the Sf β gli50 specificity when comparing glucosides to galactosides. However, the model failed to predict the differences in specificity between fucosides and galactosides.

These results indicate that the model's assumptions of independent interactions with the substrate and structural conservation of the active site in the mutants were wrong.

Sf β gli50 glycone residues H142 and N186, whose interaction energies had not been previously determined, were also investigated. Site-directed mutagenesis replaced the former residues in positions 142 and 186 for Alanine. The mutant proteins H142A and N186A were synthesized in bacteria and partially purified.

Mutant N186A presented low catalytic activity, hindering its characterization. In contrast, mutant H142A is less specific than the wild-type Sf β gli50. Kinetic parameters indicated that it is specially less specific to fucosides.

2- Introdução

2.1- Enzimas e sua especificidade

Enzimas são catalisadores biológicos capazes de acelerar a velocidade de reações químicas em até 10^{17} vezes (Fersht, 1998). Elas se destacam, entre outras propriedades, pela especificidade em relação ao substrato e ao produto da reação catalisada.

Especificidade em relação ao substrato pode ser entendida como a capacidade de discriminação entre diferentes substratos, isto é, a “preferência” da enzima frente a diferentes substratos. Essa capacidade está relacionada com as taxas de catálise e de ligação ao substrato, ou seja, com k_{cat} e K_m ou, mais precisamente, com a razão k_{cat} / K_m (Fersht, 1998).

A Teoria de Estado de Transição mostra-se uma ferramenta muito útil para abordar o problema da especificidade porque permite relacionar diferenças de k_{cat}/K_m com diferenças de energia disponível para estabilizar o estado de transição.

O estado de transição é definido como a espécie química mais instável no caminho da reação e apresenta uma diferença de energia em relação aos reagentes em seu estado fundamental ($\Delta G^\ddagger$). É possível relacionar $\Delta G^\ddagger$ com a constante de velocidade de decomposição do substrato partindo-se de duas premissas: (1) o substrato e o estado de transição estão em equilíbrio termodinâmico e (2) a taxa de formação e decomposição do estado de transição é a mesma da frequência de vibração de uma ligação que está se formando ou decompondo e depende das constantes de Boltzmann ($k_B = 1,3807 \text{ J/mol}$), Planck ($h = 6,6261 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$) e da temperatura absoluta (T) em que ocorre a reação.

Assim, é possível derivar que (Fersht, 1998):

$\Delta G^\ddagger = -RT \ln(k_1 \cdot h / k_B \cdot T)$, onde R é a constante dos gases (8,3144 J/mol.K) e k_1 é a taxa de decomposição do substrato.

No caso de reações químicas catalisadas por enzimas, k_1 pode corresponder ao k_{cat} / K_m e deste modo $\Delta G^\ddagger$ representa a diferença de energia entre as formas livres de E e S e o complexo $ES^\ddagger$. Percebe-se que $\Delta G^\ddagger$ e k_{cat} / K_m são inversamente proporcionais.

A especificidade enzimática pode ser relacionada com a complementaridade em termos de interações não-covalentes entre o sítio ativo da enzima e o estado de transição do substrato (Fersht, 1998). Assim, a preferência de uma enzima frente a uma série de substratos resulta de diferenças nas interações não-covalentes formadas no complexo enzima-estado de transição ($ES^\ddagger$), ou seja, alterações na estrutura do substrato modificam a energia disponível para estabilizar o complexo $ES^\ddagger$ e isso resulta em diferenças na velocidade da reação, expressas em diferentes k_{cat} / K_m .

Portanto, teoricamente, o planejamento e a previsão da especificidade de uma enzima podem ser efetuados a partir do conhecimento das energias de interação entre a enzima e o estado de transição ($S^\ddagger$). Dispondo de uma base contendo dados da energia destas interações para uma série de aminoácidos seria possível prever a energia disponível para estabilizar $S^\ddagger$ em novas combinações de aminoácidos do sítio ativo.

2.2- Especificidade pelo substrato em β -glicosidases

β -glicosidases são enzimas pertencentes ao grupo das glicosídeo hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β entre um monossacarídeo e um grupo que pode ou não ser um carboidrato.

As glicosídeo hidrolases foram classificadas segundo similaridades de seqüência e de estrutura em 104 famílias (Coutinho & Henrissat, 2003). Essa classificação facilita a identificação de resíduos de aminoácidos que apresentam função homóloga em glicosídeo hidrolases de uma mesma família.

Seguindo esse critério de classificação, as β -glicosidases pertencem às famílias 1 e 3. Nesse trabalho, o modelo de estudo foi uma β -glicosidase da família 1 (vide adiante), logo, a descrição das β -glicosidases focará características dessa família.

As β -glicosidases da família 1 removem um monossacarídeo da extremidade não-redutora dos seus substratos em cada ciclo catalítico. Essa reação de hidrólise pode ser dividida em duas etapas: a primeira, chamada glicosilação, resulta na formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato; a segunda, chamada desglicosilação, corresponde à hidrólise do intermediário covalente. Ambas as etapas envolvem a formação de complexo $ES^\ddagger$. Ácidos carboxílicos da cadeia lateral de dois resíduos de glutamato pertencentes ao sítio ativo estão envolvidos nessas reações; um age como catalisador ácido/base e o outro como nucleófilo (Kempton & Withers, 1992; Figura 1).

É importante ressaltar que o mecanismo de reação das glicosídeo hidrolases da família 1 conserva a configuração do carbono anomérico, diferentemente do que ocorre, e.g., em glicosídeo hidrolases das famílias 6, 9, 14,

Figura 1 - Esquema da reação de hidrólise de uma ligação glicosídica catalisada por uma β -glicosidase (Baseado em Kempton & Withers, 1992).

15, 19 e 45. A diferença entre estas glicosídeo hidrolases está na maior distância entre o nucleófilo e o carbono anomérico nas enzimas inversoras quando comparadas às enzimas retentoras. Essa maior distância permite que nas enzimas inversoras o resíduo que age como nucleófilo ative uma molécula de água que ataca o carbono anomérico gerando um produto com estereoquímica oposta à do substrato (Davies & Henrissat, 1995; Figura 2).

Atualmente, a família 1 das glicosídeo hidrolases contém 663 β -glicosidases seqüenciadas, das quais há 16 estruturas terciárias disponíveis. Estas enzimas apresentam uma estrutura terciária do tipo $(\beta/\alpha)_8$ barril com sítio ativo localizado na porção C-terminal (“topo” do barril), sendo rodeado pelos “loops” que conectam as α -hélices às folhas β . (Davies & Henrissat, 1995; Coutinho & Henrissat, 2003; Figura 3).

A topologia do sítio ativo das β -glicosidases da família 1, assim como as das famílias 2, 14, 15, 33 e 34, é conhecida como “bolso” ou “cratera”, e é adaptada para reconhecer a extremidade não-redutora de um glicosídeo (Figura 4). Isso confere a essas glicosídeo hidrolases uma adaptação a substratos com grande número de extremidades não-redutoras de cadeia disponíveis, como, por exemplo, grânulos nativos de amido. Outras duas topologias, denominadas “fissura” e “túnel”, são comuns a glicosídeo hidrolases que hidrolisam ligações no meio de cadeias de glicosídeos poliméricos. Endoglucanases das famílias 6 e 7 e lisozimas das famílias 22, 23 e 24 apresentam “fissuras”. Cellobiohidrolases das famílias 6 e 7 apresentam “túneis”, que na verdade são topologias em que “loops” mais longos cobrem parte das “fissuras”. Os “túneis”, ao permitirem a liberação de produtos concomitantemente à manutenção da ligação das enzimas aos

Figura 2- Os dois mecanismos de hidrólise enzimática da ligação glicosídica: (a) mecanismo retentor; (b) mecanismo inversor. **A** representa o resíduo doador de prótons e **B** representa o nucleófilo/base. As diferentes distâncias entre os resíduos catalíticos determinam o tipo de mecanismo (adaptado de Davies & Henrissat, 1995).

Figura 3- Representação em fita ("ribbon") de famílias de glicosídeo hidrolases segundo a classificação de Coutinho and Henrissat (2003). Fitas β estão representadas em azul e α -hélices em vermelho. (a) Família 1 ; (b) outras famílias: 2; 6c (celohidrobiolase); 6e (endoglucanase); 7c (celohidrobiolase); 7e (endoglucanase); 14; 15; 22; 23; 24; 33; 34 (adaptado de Davies & Henrissat, 1995).

Figura 4. Os três tipos de sítios ativos encontrados em glicosídeo hidrolases: (a) "bolso" ou "cratera" (glucoamilase de *Aspergillus awamori*); (b) "fenda" (endoglucanase E2 de *Thermomonospora fusca*); (c) "túnel" (cellohidrolase II de *Trichoderma reesei*). Os resíduos catalíticos estão marcados em laranja (adaptado de Davies & Henrissat, 1995).

polissacarídeos, criam condições para processividade nessas enzimas (Davies & Henrissat, 1995; Figura 4).

O sítio ativo das β -glicosidases da família 1 é formado por diversos subsítios, padrão compartilhado pelas demais glicosídeo hidrolases. O subsítio que interage com o monossacarídeo da extremidade não-redutora do substrato é chamado de subsítio -1 (subsítio do glicone) e os subsítios que interagem com o restante do substrato recebem índices positivos (+1, +2, +3, etc.) e formam a região de ligação do aglicone do substrato. O ponto de clivagem do substrato localiza-se entre o subsítio -1 (do glicone) e o +1 (região de ligação do aglicone) (Davies, 1997; Figura 5).

Em cada subsítio a cadeia lateral de um aminoácido hidrofóbico forma uma plataforma sobre a qual posiciona-se um monossacarídeo do substrato, enquanto que as cadeias laterais de aminoácidos polares formam ligações de hidrogênio com hidroxilas do substrato. A partir de glicosídeo hidrolases da família 1 cristalizadas com ligante no subsítio -1 é possível estabelecer quais resíduos interagem com quais hidroxilas do glicone, já que muitos resíduos são conservados em enzimas dessa família (Burmeister *et al.*, 1997; Gloster *et al.*, 2004). O triptofano que serve como plataforma hidrofóbica, por exemplo, interage com a hidroxila 4 do glicone (OH4). Com essa mesma hidroxila interagem um resíduo de glutamato e um de glutamina.

A hidroxila 2 (OH2) interage com um outro resíduo de glutamato que cumpre a função de nucleófilo catalítico, sendo essa interação importante para a catálise (vide adiante). OH2 também interage com resíduos de asparagina e histidina. Esse mesmo resíduo de histidina interage com a hidroxila 3 (OH3). Por

Figura 5- Esquema representativo da nomenclatura de subsítios em glicosídeo hidrolases. São representados 4 subsítios: o do glicone (-1), situado próximo da extremidade não-redutora antes do ponto de clivagem; e 3 subsítios correspondentes à região de ligação do aglicone, situados próximos da extremidade redutora, a partir do ponto de clivagem.

sua vez, OH3 interage com um resíduo de triptofano (que não é o mesmo da plataforma hidrofóbica). Por fim, a hidroxila 6 (OH6) interage com o mesmo resíduo de glutamato que faz ponte de hidrogênio com OH4. Em 6-fosfo- β -glicosidases, um resíduo de serina substitui o glutamato na interação com o grupo fosfato.

Essa rede de pontes de hidrogênio, esquematizada na Figura 6, é detectada tanto em ES quanto no intermediário covalente e acredita-se que ela também esteja presente em ES[‡]. Assim, é proposto que essa rede de pontes de hidrogênio formado no subsítio -1 determina a especificidade das β -glicosidases pelo glicone, já que os diferentes glicones reconhecidos por essas enzimas diferem basicamente no posicionamento das hidroxilas. A análise das energias dessas pontes e de seu posicionamento sustentam essa hipótese (Fernandez *et al.*, 1995; Namchuk & Withers, 1995; Marana *et al.*, 2002).

Estudos com três diferentes enzimas mostram que as energias de interação com OH2 são as maiores responsáveis pela estabilização de ES[‡]. Entretanto, as interações com as demais hidroxilas são importantes para o controle da especificidade do subsítio -1 (Marana, 2006).

No que diz respeito à região de ligação do aglicone, existem apenas 2 enzimas que foram cristalizadas com ligantes no subsítio +1. Análise dessas estruturas aponta para a presença de outras interações hidrofóbicas além da existente entre o substrato e a plataforma hidrofóbica. Pontes de hidrogênio também foram detectadas, mas não estudadas (Czjzek *et al.*, 2000; Verdoucq *et al.*, 2004).

A família 1 agrupa 15 diferentes números EC (Enzyme Commission, IUPAC-IUB), o que indica que as β -glicosidases dessa família hidrolisam uma variada gama de substratos. Elas são capazes de reconhecer glicones como glicose, galactose, fucose, manose, xilose, 6-fosfo-glicose e 6-fosfo-galactose. Entre os aglicones a diversidade é ainda maior e inclui monossacarídeos, oligossacarídeos e grupos alquil e aril.

As β -glicosidases são um bom modelo para estudo da especificidade enzimática porque hidrolisam com diferentes eficiências essa grande variedade de substratos. Em muitos casos, as estruturas desses substratos diferem pontualmente entre si, o que possibilita correlacionar as diferenças na estrutura do substrato com alterações na energia das interações não-covalentes no complexo enzima - estado de transição ($ES^\ddagger$), i.e., com a energia disponível para estabilizar o estado de transição (Namchuk & Withers, 1995; Marana *et al.*, 2002). Portanto, é possível entender a diferença de eficiência na catálise dos vários substratos em termos de energia disponível para estabilizar o complexo $ES^\ddagger$.

2.3- Sf β gli50 como modelo de estudo

Neste projeto utilizamos como modelo de estudo uma β -glicosidase (Mr 50.000 – 509 aminoácidos – AF052729) digestiva da larva de *Spodoptera frugiperda* (Sf β gli50), uma mariposa (Lepidoptera: Noctuidae) cuja larva ataca milho. Essa β -glicosidase foi classificada como uma enzima da família 1 das glicosídeo hidrolases (Marana *et al.* 2000). O alinhamento de seqüências com outras enzimas dessa família revela que a Sf β gli50 possui quatro subsítios (-1, +1, +2 e +3) e que E187 e E399 são os resíduos catalíticos, sendo que o primeiro atua como doador de prótons e o segundo como nucleófilo.

O alinhamento de seqüências de aminoácidos entre β -glicosidases já cristalizadas, como a mirosinase de *Sinapis alba* (Burmaister *et al.*, 1997), que apresenta 34% de identidade com a Sf β gli50, indicou também que nesta enzima o subsítio -1 é formado por W444 (plataforma hidrofóbica), E451, Q39, N186 e H142 (formadores de pontes de hidrogênio) (Figura 7). Este subsítio interage com fucose, glucose e galactose (Marana *et al.*, 2001). A preferência relativa por esses três monossacarídeos, que são representados na Figura 8, é, respectivamente, de 100%, 43% e 3%.

A energia das ligações de hidrogênio no complexo ES[‡] entre aminoácidos deste subsítio (E451 e Q39) e as hidroxilas do glicone (hidroxilas 4 e 6) já foram determinadas, sendo que a especificidade da Sf β gli50 frente ao glicone do substrato pode ser entendida com base nestas interações (Marana *et al.*, 2002; Figura7). O papel dos resíduos N186 e H142 ainda não foi estudado.

A determinação das energias de interação entre E451 e Q39 e as hidroxilas do glicone foi realizada através da comparação das diferenças de energia ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre a Sf β gli50 selvagem e mutantes para a hidrólise de substratos que diferiam entre si no posicionamento e presença das hidroxilas 4 e 6. Nesses mutantes os resíduos das posições 451 e 39 foram individualmente substituídos por alaninas, de forma a abolir interações existentes (Marana *et al.*, 2002).

O resíduo E451 interage mais fortemente com o substrato que o resíduo Q39 (Tabela 1). A mudança de OH4 da posição equatorial para a posição axial diminui a energia das pontes de hidrogênio, afetando principalmente a interação com E451(redução de 43,6% nesse caso e de 26,9% no caso de Q39). Assim, mudanças na distância e no ângulo existente na ponte de hidrogênio entre E451 e

Figura 7 – Esquema representando as ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) entre as hidroxilas do glicone do substrato (Glc) e os aminoácidos do subsítio -1 da Sfgli50. 6, hidroxila do carbono 6; 4, hidroxila do carbono 4; 3, hidroxila do carbono 3. O aminoácido W₁₄₄ (plataforma hidrofóbica) foi omitido para maior clareza.

Figura 8- Monossacarídeos que interagem com o subsítio -1 de Sfβgl50. A: β-D-glicose; B: β-D-galactose; C: β-D-fucose. Em vermelho estão destacadas as hidroxilas ligadas ao carbono 4 e em azul estão destacadas as hidroxilas do carbono 6 ou o próprio (no caso da fucose).

Tabela 1- Energias de interação (kJ/mol) entre resíduos de aminoácidos nas posições 39 e 451 e as respectivas hidroxilas (OHs) do glicone.

hidroxilas	Resíduo de aminoácido na posição 39			Resíduo de aminoácido na posição 451			
	Q	E	N	E	Q	D	S
OH4e	19.3 ± 0.6	8.9 ± 0.3	6.1 ± 0.3	33.2 ± 0.7	32.2 ± 0.5	21.3 ± 0.6	10.6 ± 0.5
OH4a	14.1 ± 0.3	8.2 ± 0.3	3.1 ± 0.2	18.7 ± 0.2	13.6 ± 0.2	8.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1
OH6	3.3 ± 0.4	2.8 ± 0.3	-2.0 ± 0.3	-4.4 ± 0.4	-11.5 ± 0.3	-6.9 ± 0.3	-5.0 ± 0.3

OH4e—hidroxila do carbono 4 equatorial; **OH4a**—hidroxila do carbono 4 axial; **OH6**—hidroxila do carbono 6.

Dados obtidos em Marana *et al.*, 2004.

Os valores estão expressos como a variação de energia correspondente ao rompimento da interação. Logo, valores positivos representam interações que estabilizam ES[‡] e valores negativos indicam interações que desestabilizam ES[‡].

OH4 determinam a preferência por glucosídeos e galactosídeos, que diferem apenas na posição dessa hidroxila (Marana *et al.*, 2002).

De forma semelhante, a interação de OH6 é mais intensa com E451. Entretanto, essa interação é desfavorável e está relacionada principalmente com impedimento estérico, sendo mais importante no que diz respeito à diferença de especificidade entre galactosídeos e fucosídeos, já que esses carboidratos diferem exclusivamente na posição 6 (nos fucosídeos um grupo metil substitui a hidroxila). A preferência por fucosídeos diminui, por exemplo, quando o glutamato é substituído por uma alanina, cuja cadeia lateral é menor e, portanto, diminui o impedimento estérico sobre OH6 dos galactosídeos. Q39 tem interação favorável com OH6, mas é mais fraca (Marana *et al.*, 2002).

Recentemente nosso grupo de pesquisa finalizou a avaliação do efeito da troca dos resíduos de aminoácidos das posições 451 e 39 na energia dessas pontes de hidrogênio, usando a mesma estratégia utilizada para determinar as energias de interação entre E451 e Q39 e as hidroxilas do substrato (Marana *et al.*, 2004; Tabela 1). Este estudo corrobora a tese de que as interações entre os resíduos nas posições 451 e 39 e a OH4 são responsáveis pela preferência entre glucosídeos e galactosídeos e de que as interações entre esses resíduos e OH6 determinam a preferência por fucosídeos *versus* glucosídeos ou galactosídeos. Mostra ainda que, apesar de não terem a mesma eficiência que a Sfβgli50 selvagem, os mutantes estudados ainda são capazes de interagir com S[‡], o que indica que outros resíduos, como N186 e H142, podem ser importantes na interação com S[‡].

2.4- Manipulação de especificidade em β -glicosidases

Existem três estratégias gerais para a investigação e manipulação da especificidade em enzimas: (1) uso de substratos modificados; (2) evolução dirigida seguida de seleção dos mutantes e (3) mutação sítio-dirigida de aminoácidos escolhidos. Parâmetros cinéticos são usados nas três estratégias com o objetivo de análise.

A primeira estratégia, que usa substratos com diferenças pontuais entre si, tem como desvantagem o fato de não discriminar entre diferentes interações que podem ocorrer com a mesma porção do substrato. É o caso dos trabalhos de Fernandez *et al.* e Namchuk & Withers (ambos de 1995), em que hidroxilas do glicone são substituídas por átomos de hidrogênio ou flúor. O hidrogênio elimina a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio e o flúor pode agir apenas como receptor de pontes de hidrogênio. Porém, se uma hidroxila interage com resíduos diferentes simultaneamente, não se pode atribuir uma eventual mudança de especificidade a apenas um resíduo; a caracterização precisa fica comprometida. Por outro lado, esses trabalhos são pioneiros ao demonstrar a correlação entre as pontes de hidrogênio e a especificidade pelo substrato em β -glicosidases.

A segunda estratégia chama-se evolução dirigida porque se baseia na seleção de mutantes a partir de uma biblioteca, que pode ser formada, entre outras, por duas técnicas principais: PCR sujeito a erro e "DNA shuffling". No PCR sujeito a erro, a reação é realizada na presença de manganês, que diminui a fidelidade da DNA polimerase, levando a erros na amplificação do DNA e à formação de uma população de variantes (Fersht, 1998). No "DNA shuffling",

“pools” de genes com diferentes mutações são fragmentados com o auxílio de enzima de restrição e remontados através de PCRs com e sem “primers”. Isso permite a formação de genes recombinantes (Stemmer, 1994).

Essa estratégia tem como desvantagem a dependência de um método acurado de seleção dos mutantes para que, por exemplo, mutantes que catalisam reações secundárias indesejadas não sejam selecionados (Feng *et al.*, 2005). A evolução dirigida tem sido amplamente utilizada: Matsumura & Ellington (2001), por exemplo, transformaram uma β -glucuronidase em β -galactosidase. Alguns grupos obtiveram grande sucesso: Mayer *et al.* (2000) transformaram uma β -glicosidase de *Agrobacterium* em glicosintase e Kim *et al.* (2004) ampliaram a eficiência catalítica e a especificidade da glicosintase mutante. Já Feng *et al.* (2005) conseguiram converter uma β -glicosidase em β -transglicosidase.

Cabe destacar que nesses trabalhos a compreensão de porquê as mutações selecionadas proporcionam mudanças de atividade, eficiência catalítica ou especificidade só é conseguida com investigações *a posteriori*. Não se consegue por esse método estabelecer uma relação de causa e efeito antes da seleção dos mutantes. Isso compromete a generalização do mecanismo de mudança e impede sua aplicação racional em outros casos.

A terceira estratégia, mutagênese sítio-dirigida, tem como desvantagem a dependência de um modelo estrutural acurado. O trabalho de Hancock *et al.* (2005) utilizou com sucesso essa estratégia para desenvolver glicosidases promíscuas capazes de sintetizar bibliotecas de glicosídeos, com clara finalidade industrial. Nesse trabalho foi utilizada uma β -glicosidase da família 1 cuja estrutura já havia sido resolvida por cristalografia.

Essa terceira estratégia, combinada com o uso de substratos diferentes (como no caso da estratégia 1), já foi utilizada por nosso grupo de pesquisa para estudar a especificidade de Sfβgli50 (Marana *et al.*, 2002 e 2004). O presente trabalho segue a mesma linha.

2.5- Objetivos

Os objetivos desta dissertação são:

- 1) Desenvolver e testar um modelo para previsão da especificidade pelo glicone de mutantes da Sfβgli50;
- 2) Avaliar a importância dos resíduos H142 e N186 na especificidade de Sfβgli50.

3- Materiais e Métodos

3.1- Mutagênese Sítio-Dirigida

Para os experimentos de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado o protocolo do kit “QuikChange Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene), usando como molde um plasmídeo pT7-7 que continha como inserto um fragmento de DNA que codifica a Sfβgli50 selvagem.

Esse experimento consiste na amplificação em termociclador de toda a extensão do vetor utilizando dois “primers” mutagênicos, que durante a amplificação são incorporados aos produtos da reação (fitas “filhas”), resultando em vetores contendo a mutação desejada. Como cada proteína mutante deveria, nesse caso, conter duas mutações, o experimento foi realizado em dois passos, i.e, em cada passo foi realizada a extensão do vetor com um par de “primers” específicos para os sítios a serem mutados.

Foram utilizados os seguintes pares de “primers” (os nucleotídeos em negrito indicam os códons mutados):

Par 1 (E₄₅₁S):

5' gga gtc taa tgg aca act tt **tca** tgg atg gag ggt tat att gag cg 3'

5' cgc tca ata taa ccc tac atc ca **tga** aaa gtt gtc cat tag act cc 3'

Par 2 (E₄₅₁A):

5' gga gtc taa tgg aca act tt **gcc** tgg atg gag ggt tat att gag cg 3'

5' cgc tca ata taa ccc tac atc ca **ggc** aaa gtt gtc cat tag act cc 3'

Par 3 (Q₃₉E):

5' cgc tac agc ctc cta c **gag** atc gaa ggt gct tgg 3'

5' cca agc acc ttc gat **ctc** gta gga ggc tgt agc g 3'

Par 4 (Q₃₉N):

5' cgc tac agc ctc cta c **aac** atc gaa ggt gct tgg 3'

5' cca agc acc ttc gat **gtt** gta gga ggc tgt agc g 3'

Assim, para os mutantes S₄₅₁N₃₉ foram utilizados os pares 1 e 4; para os mutantes S₄₅₁E₃₉, os pares 1 e 3; e para os mutantes A₄₅₁E₃₉, os pares 2 e 3.

A reação de amplificação utilizou 16 ciclos, sendo cada ciclo constituído dos seguintes passos:

30 segundos a 95°C (desnaturação do DNA molde)

60 segundos a 55°C (anelamento dos “primers” mutagênicos)

15 minutos a 68°C (elongamento das fitas “filhas”)

Após a amplificação das fitas “filhas” contendo as mutações, a mistura da reação foi incubada “overnight” a 37°C com 1µl da enzima *DpnI* (10U). Essa enzima reconhece e hidrolisa especificamente seqüências de DNA metilado, como aquele presente no plasmídeo molde. Dessa forma é possível eliminar especificamente o plasmídeo molde (não-mutado).

Uma alíquota de 1µl do produto da digestão foi utilizada para transformar bactérias competentes que foram então plaqueadas em LB-Ágar (ampicilina 50µg/ml); essas bactérias possuem ligases capazes de fechar os “nicks” das fitas “filhas”. As colônias obtidas nesse experimento foram utilizadas para multiplicar e purificar os plasmídeos. Esses plasmídeos foram submetidos a sequenciamento de DNA para verificar a incorporação das mutações desejadas.

3.2- Transformação de bactérias competentes

Alíquotas de 1µl do plasmídeo pT7-7 contendo os genes selvagem e mutante da *Sfβgli50* foram separadamente adicionadas a 200µl de células

competentes (BL21DE3) e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 30 segundos e novamente transferidas para o gelo por mais 3 min. Foi adicionado então 0,5ml de meio LB e essas soluções foram incubadas por 1 hora a 37°C, para recuperação das células e expressão da resistência ao antibiótico de seleção. Então, as soluções foram plaqueadas em LB-Ágar com ampicilina (50µg/ml) e incubadas “overnight” a 37°C, obtendo-se colônias isoladas.

3.3- Purificação dos plasmídeos a partir de cultura de bactérias

Os plasmídeos foram purificados utilizando-se o protocolo Wizard Miniprep (Promega) a partir de 2,0ml de cultura de bactérias cultivadas durante 16h. O rendimento e a pureza dos plasmídeos purificados foram avaliados através de determinação da absorbância das amostras a 260 e 280nm.

3.4- Reação de sequenciamento de DNA

Para verificar a incorporação das mutações, os plasmídeos pT7-7 contendo os insertos supostamente mutados foram seqüenciados na central de sequenciamento de DNA do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP-São Paulo.

3.5- Expressão das Sfβgli50 recombinantes com vetor pT7-7

As colônias transformadas eram crescidas “overnight” em 6ml de meio LB contendo carbenicilina (50µg/ml) sob agitação de 250rpm a 37°C. Esses 6ml eram então inoculados em 500ml de LB e crescidos sob as mesmas condições de pressão seletiva, temperatura e agitação até atingirem densidade óptica em 600nm entre 0,6 e 1,0. Quando atingiam valores nesse intervalo, era colocado no

meio o indutor IPTG (1mM). A indução ocorria a 250rpm e 25°C, por um período de 3 horas.

Após esse período as células eram sedimentadas por centrifugação a 7000 xg por 15min a 4°C e então armazenadas a -20°C. Foram coletadas alíquotas de 50µl de bactérias induzidas e não-induzidas para verificar, através de SDS-PAGE, se houve produção da proteína recombinante mutante.

3.6- Lise das células induzidas

As células induzidas (contendo as proteínas recombinantes mutantes e selvagem) foram ressuspensas em 30ml de tampão de lise (HEPES 50mM pH 8,0, contendo 150mM NaCl, 0,2% (m/v) de lisozima e 0,1% (v/v) de Triton X-100) e incubadas a temperatura ambiente sob agitação leve durante 30min.

Após esse procedimento as células sofreram 4 ciclos de sonicação: cada ciclo compreendia um pulso de 30s em “output” 4 em um sonicador Branson com “microtip” seguido por 3min de incubação em gelo. Cada amostra sonicada foi então centrifugada a 7000xg por 20min a 4°C em rotor SS-34 em centrífuga Sorvall. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C.

3.7- Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Phenyl HI PREP

Os lisados obtidos a partir da lise das bactérias induzidas foram misturados com tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,4M na proporção de 2:1 e incubados “overnight” a 4°C. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 7000 xg a 4°C e os sobrenadantes contendo as proteínas recombinantes foram coletados. Esses sobrenadantes foram analisados em cromatografia líquida em FPLC utilizando a coluna de interação hidrofóbica Phenyl HI PREP (Amersham Pharmacia Biotech).

Para esse procedimento foram utilizados dois tampões:

Tampão A: fosfato de sódio 50mM pH 7,0;

Tampão B: fosfato de sódio 50mM pH 7,0 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,7M.

Os sobrenadantes contendo as enzimas de interesse foram injetados na coluna cromatográfica sob um fluxo de 2,0ml/min de uma mistura de 25% de Tampão A e de 75% de Tampão B, ou seja, 1,275M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão fosfato 50mM pH 7. As proteínas que não ficaram retidas pela coluna foram lavadas com 100ml da mistura de 25% de Tampão A e de 75% de Tampão B, também sob um fluxo de 2,0ml/min.

As proteínas retidas pela coluna foram eluídas com um gradiente linear (200ml) de 1,275M a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As frações de 3,0ml coletadas durante essa etapa foram utilizadas para detecção de atividade de β -glicosidase.

3.7.1- Detecção das Sf β gli50 recombinantes após a cromatografia hidrofóbica

No caso dos ensaios para detecção da enzima selvagem o substrato utilizado no ensaio foi o NP β Glc 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6, enquanto que para detecção das enzimas mutantes foi utilizado o substrato MU β Glc 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6.

O p-nitrofenolato liberado na hidrólise de NP β Glc foi detectado pela absorbância em 420nm, após a interrupção de reação de hidrólise através da adição de tampão carbonato-bicarbonato pH 10.

A hidrólise de MU β Glc libera metil-umbeliferona, molécula que pode ser excitada por luz no comprimento de onda de 360nm e que emite luz no comprimento de onda de 450nm, podendo assim ser quantificada. Neste caso,

para interromper a reação de hidrólise foi utilizado um tampão Glicina-NH₄OH 100mM pH 10,5.

A pureza das enzimas foi verificada através de SDS-PAGE seguido por coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

3.8- Concentração das amostras de proteínas

As amostras (2,5ml) de proteínas dos mutantes S₄₅₁N₃₉, S₄₅₁E₃₉ e A₄₅₁E₃₉ foram concentradas em filtros Centriplus YM-10 (Amicon/Millipore) através de centrifugação a 3000 xg por 45min.

Assim, as amostras contendo os mutantes S₄₅₁N₃₉, S₄₅₁E₃₉ e A₄₅₁E₃₉ foram concentrados aproximadamente 25, 12 e 6 vezes, respectivamente.

3.9- Produção, purificação e caracterização dos duplos-mutantes utilizando o vetor pET46

3.9.1- Produção e expressão dos duplos-mutantes em pET46

O vetor pET46 codifica o inserto de interesse ligado a uma cauda de 6 histidinas na sua porção N-terminal, permitindo a purificação da proteína de interesse através de cromatografia de afinidade por Níquel.

A clonagem dos mutantes da Sfβgli50 no vetor pET46 foi realizada conforme o protocolo presente no kit “Ek / LIC Cloning” (Novagen). Os mutantes foram amplificados através de reações de PCR utilizando como molde os insertos presentes em pT7-7.

Para isso, foram utilizados os seguintes primers:

PET46BG3C:

5'- gag gag aag ccc ggt tca atg tcc ctc atc tat agt c -3'

PET46BG5N:

5'- gac gac gac aag atc cag cag cgc cgc ttc ccc gat gac -3'

Em seguida, os produtos de PCR foram tratados com T4 DNA polimerase com excesso de ATP para que fossem obtidos insertos com extremidades coesivas. Os insertos resultantes foram então anelados ao vetor já linearizado. Os produtos da reação de anelamento foram utilizados para transformar bactérias competentes conforme descrito no item 3.2.

As etapas de purificação dos plasmídeos e sequenciamento de DNA seguiram os protocolos descritos nos itens 3.3 e 3.4. Para o sequenciamento foram utilizados os seguintes “primers”:

T7:

5'- taa tac gac tca cta tag gg -3'

Fim:

5'- gaa cca gtc gct gat gag -3'

2X0:

5'- cct gtc tcc taa gtt cag c -3'

GOL:

5'- cag cca ttc tca agt gat gta g -3'

Again:

5'- ggt ccg aga aat cta ctt c -3'

pET46REV:

5'- gtc cat gtg ctg gcg ttc -3'

Para garantir que não houve falhas no processo de clonagem, os plasmídeos pET46 contendo os insertos que codificam A₄₅₁E₃₉, S₄₅₁N₃₉ e S₄₅₁E₃₉ foram seqüenciados e as seqüências de DNA foram traduzidas e alinhadas com a

da SfbgI50 selvagem utilizando as ferramentas presentes no “site” www.expasy.org (ClustalW com matriz Blosom).

A expressão das proteínas recombinantes foi feita conforme o item 3.5 e a lise das células induzidas seguiu o protocolo do item 3.6. Entretanto, o tampão de lise nesse caso consistiu de 20mM de fosfato de sódio, 0,5M de NaCl, 20mM de imidazol (pH 7,4), 0,2% (m/v) de lisozima e 0,1% (v/v) de Triton X-100. A expressão foi confirmada por análise em gel de SDS-PAGE (segundo descrito no item 3.11).

3.9.2- Purificação das SfbgI50 recombinantes através de Cromatografia de Afinidade em coluna de Níquel-Sepharose

Os lisados obtidos na etapa anterior foram analisados em cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Níquel-Sepharose (HisTrap FF 1ml, Amersham Biosciences).

Nesse procedimento foram utilizados dois tampões:

Tampão de ligação: fosfato de sódio 20mM pH 7,4, NaCl 0,5M e imidazol 20mM;

Tampão de eluição: fosfato de sódio 20mM pH 7,4, NaCl 0,5M e imidazol 500mM.

Em cada cromatografia, 5ml de lisado foram injetados na coluna sob um fluxo de 1ml/min. Vinte volumes de coluna (20ml) de tampão de ligação foram utilizados para remover as proteínas não ligadas na coluna. Em seguida, as proteínas ligadas especificamente na coluna foram eluídas utilizando 5 volumes de coluna (5ml) de tampão de eluição. Durante essas duas etapas foram coletadas frações de 0,5ml.

A atividade β -glicosidásica foi então detectada através de ensaios com NP β Fuc 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. A pureza das enzimas foi

verificada através de SDS-PAGE seguido por coloração com Comassie Blue R-250 0,1% (p/v) em solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

3.9.3- Caracterização dos duplos- mutantes

Os duplos-mutantes da Sfbglic50 foram ensaiados com diferentes concentrações de NPβFuc, NPβGlc e NPβGal preparadas em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) foram calculados a partir do ajuste na equação de Michaelis-Menten dos dados de velocidade de hidrólise e concentração de substrato usando o software EnzFitter (Elsevier-Biosoft, Cambridge, UK).

3.10 – Produção, purificação e caracterização de Sfbglic50 mutantes nas posições H142 e N186

3.10.1- Produção e expressão dos mutantes H142A e de N186A

Os mutantes H142A e N186A foram produzidos conforme descrito no item 3.1. Para isso foram utilizados os “primers” abaixo (em negrito estão indicadas as trincas de bases dos aminoácidos mutados) e como molde o vetor pCAL-n-Flag contendo o inserto de Sfbglic50 selvagem. Esse vetor codifica o inserto de interesse ligado na sua porção N-terminal a um peptídeo que tem afinidade por calmodulina na presença de Cálcio.

H142A1:

5'- ct cct ctg atc acg ctc tac **gct** tgg gat ctt cct caa aag ctg -3'

H142A2:

5'- cag ctt ttg agg aag atc cca **agc** gta gag cgt gat cag agg ag -3'

N186A1:

5'- gtc aag atg ttc atc act ttc **gcc** gag cct aga gag att tgc -3'

N186A2:

5'- gca aat ctc tct agg ctc **ggc** gaa agt gat gaa cat ctt gac -3'

Os plasmídeos obtidos foram então seqüenciados conforme descrito no item 3.4 para confirmar a correta incorporação das mutações.

A transformação de bactérias (BL21DE3) competentes, a purificação dos plasmídeos e a expressão das proteínas de interesse (inclusive a selvagem) seguem os protocolos descritos nos itens 3.2, 3.3 e 3.5.

A lise das células induzidas seguiu o protocolo do item 3.6. Entretanto, o tampão de lise nesse caso consistiu de HEPES 50mM (pH 8), NaCl 150mM, acetato de magnésio 1mM, imidazol 1mM, cloreto de cálcio 2mM, lisozima 0,2% (m/v) e Triton X-100 0,1% (v/v). A expressão foi confirmada por análise em gel de SDS-PAGE (segundo descrito no item 3.11).

3.10.2 – Purificação das Sfβgli50 recombinantes através de Cromatografia de Afinidade em coluna de calmodulina-agarose

Os lisados obtidos na etapa anterior foram analisados em cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de calmodulina-agarose (Calmodulin Affinity Resin, Stratagene).

Nesse procedimento foram utilizados dois tampões:

Tampão de ligação: HEPES 50mM pH 8, NaCl 150mM, acetato de magnésio 1mM, imidazol 1mM e cloreto de cálcio 2mM;

Tampão de eluição: HEPES 50mM pH 8, NaCl 150mM e EDTA 2mM.

Em cada cromatografia, 2ml de lisado foram injetados na coluna sob um fluxo de 0,5ml/min. Dez volumes de coluna (40ml) de tampão de ligação foram utilizados para remover as proteínas não ligadas na coluna. Em seguida, as

proteínas ligadas especificamente na coluna foram eluídas utilizando 5 volumes de coluna (20ml) de tampão de eluição. Durante essas duas etapas foram coletadas frações de 0,5ml.

A atividade de β -glicosidase foi então detectada conforme descrito no item 3.7.2. A pureza das enzimas foi verificada através de SDS-PAGE seguido por coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

3.10.3- Caracterização dos mutantes H142A e N186A

Os mutantes H142A e N186A foram ensaiados com diferentes concentrações do substrato MU β Glc preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_m) foram calculados a partir do ajuste na equação de Michaelis-Menten dos dados de velocidade de hidrólise e concentração de substrato usando o software EnzFitter (Elsevier-Biosoft, Cambridge, UK).

O mutante H142A também foi ensaiado com os substratos NP β Glc, NP β Gal e NP β Fuc preparados em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6, sendo também nesse caso calculados os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m .

3.11- Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Antes de serem submetidas à eletroforese, as amostras de proteínas foram misturadas com tampão de corrida (Tris-HCl 120mM pH6,8; SDS 5% (m/v); β -mercaptoetanol 1,3mM; EDTA 1,0mM, glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)) e então fervidas por 5 minutos.

O gel de poliacrilamida 10% e SDS 1% foi preparado segundo Laemmli (1970). A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987) ou

com Comassie Blue R-250 0,1% (p/v) preparado em uma solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

3.12- Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados em uma concentração final de 1% (m/v) de agarose em tampão TAE 1X (o tampão TAE 50x é composto por 242g de Tris, 57,1ml de ácido acético glacial e 37,2g de EDTA e tem pH 8,5). As amostras de DNA foram misturadas na proporção de 1:10 com uma solução de azul de bromofenol e glicerol 30% em água. Após as eletroforeses, os géis foram tratados com brometo de etídeo (0,5mg/ml) para a visualização das bandas de DNA, já que o DNA complexado com o brometo de etídeo apresenta coloração laranja na presença de luz ultravioleta (312nm).

3.13- Meios

3.13.1- LB líquido (Luria-Bertani)

10g NaCl, 10g bactotripton e 5g de extrato de levedura foram dissolvidos em 1l de água milliQ e autoclavados.

3.13.2- Placas LB-Ágar

Foram adicionados 20g de bactoágar para 1l de meio LB. Após a autoclavagem a mistura foi distribuída em placas de Petri. Quando necessário foi adicionado antibiótico antes do meio solidificar.

3.14- Mapas dos plasmídeos utilizados

Seguem abaixo os mapas dos plasmídeos pT7-7 (Tabor & Richardson, 1985), pET46 (Novagen) e pCAL-n-Flag (Stratagene) utilizados nesse trabalho:

4- Resultados e discussão

4.1- Considerações iniciais

A especificidade é uma propriedade enzimática fundamental dos sistemas biológicos e pode ser expressa como a “preferência” de uma enzima frente a uma série de substratos, sendo esta “preferência” quantificada em termos de atividade relativa. Um parâmetro apropriado para cálculo da atividade relativa é o k_{cat} / K_m . A especificidade resulta de uma complementaridade em termos de interações não-covalentes entre resíduos de aminoácidos do sítio ativo das enzimas e grupos do estado de transição do substrato (Fersht, 1998).

Embora as bases moleculares da especificidade pelo substrato sejam aparentemente simples, os insucessos na tentativa de manipular planejadamente esta propriedade demonstram o pouco conhecimento existente a respeito dos princípios que determinam a relação estrutura-função em proteínas. Em muitos casos, a simulação ou previsão teórica da conseqüência de uma mutação pontual sobre a estrutura de uma enzima e sua interação com um ligante ainda é sujeita a imprecisões.

Um caso exemplar desta limitação é a substituição do resíduo F198 do subsítio +1 da β -glicosidase de *Zea mays* por valina. Dados estruturais mostram que esta mutação, aparentemente pouco drástica, provoca uma cascata de mudanças conformacionais que culmina com a alteração da estrutura geral deste subsítio. Este resultado não era passível de previsão utilizando as técnicas de modelagem molecular atuais (Verdoucq *et al.*, 2003).

A imprevisibilidade das conseqüências estruturais de uma mutação também limita o uso de ferramentas de mecânica molecular (QM/MM) para

cálculo do perfil de energia ao longo de uma coordenada de reação, pois o posicionamento espacial dos átomos envolvidos é essencial neste procedimento. Logo, previsões de constantes de velocidade e especificidade são limitadas nestes casos.

Este projeto foi uma tentativa de contornar estas limitações. O modelo de previsão de especificidade desenvolvido partiu de um conjunto de dados que correlacionam diretamente a troca individual de resíduos do sítio ativo de uma β -glicosidase com a especificidade destes mutantes simples e propôs uma forma de combinar estes efeitos em duplos-mutantes dessa enzima. Estes efeitos foram expressos em termos da energia de interação entre os resíduos do sítio ativo e hidroxilas do glicone no complexo $ES^\ddagger$. O sucesso desta abordagem poderia indicar um caminho mais simples e rápido na construção de enzimas com especificidade planejada.

4.2- Modelo para previsão da especificidade de SfbgIi50

Sabe-se que os três principais tipos de glicones reconhecidos pela SfbgIi50, glucosídeos, galactosídeos e fucosídeos, diferem exclusivamente quanto às hidroxilas dos carbonos 4 e 6 (Figura 8). Pode-se, assim, assumir que a especificidade frente a estes tipos de glicones é determinada pela estabilidade relativa dos complexos $ES^\ddagger$, que é afetada exclusivamente pelas interações de Q39 e E451 com as hidroxilas 4 e 6 (Marana *et al.*, 2002; Figura 7).

Os efeitos da substituição através de mutagênese sítio-dirigida do resíduo E451 por Q, D, S e A e do resíduo Q39 por E, N e A nestas interações em $ES^\ddagger$ e na especificidade de SfbgIi50 já foram avaliados (Tabela 1). Combinando-se os diferentes resíduos já introduzidos nas posições 39 e 451 é possível obter 20

mutantes de SfbgI50. Dentre estes, 8 já foram previamente caracterizados (Marana *et al.*, 2002 e 2004), enquanto os 12 restantes nunca foram estudados (Figura 9). Assim, a partir deste conjunto de dados este projeto tentou desenvolver e testar um modelo simples, rápido e independente de dados estruturais para previsão da especificidade destes 12 novos mutantes da SfbgI50.

Este modelo assume que a energia total disponível para estabilizar o $S^\ddagger$ corresponde a somatória das energias de cada interação formada entre E e $S^\ddagger$. Logo, diferenças no nível de energia entre dois $ES^\ddagger$ são resultantes apenas das interações que são diferentes entre estes complexos. Portanto, no caso da SfbgI50, as diferenças na estabilidade de $[E\text{-glucosídeo}]^\ddagger$, $[E\text{-galactosídeo}]^\ddagger$ e $[E\text{-fucosídeo}]^\ddagger$ são decorrentes apenas das interações entre E451 e as hidroxila 4 (OH4) e/ou 6 do glicone (OH6), e também entre Q39 e OH4 e/ou OH6. Estes glicones diferem apenas nestas hidroxilas, enquanto que todas as demais interações devem ser iguais independentemente do tipo de glicone, pois estes apresentam OH3 e OH2 no mesmo posicionamento (Figura 8).

Outro pressuposto inicial deste modelo foi que as interações de E451 e Q39 com OH6 e OH4 são independentes entre si, ou seja, as interações formadas por E451 não são afetadas por Q39 e vice-versa, sendo isto válido para qualquer resíduo na posição 451 e 39. Este pressuposto simplifica o início do trabalho, pois não há informações prévias sobre a influência de um destes resíduos sobre as interações do outro. Este pressuposto é apoiado pelo trabalho de Wells (1990) que catalogou 69 casos em 5 diferentes enzimas de simples adição do efeito de mutações na estabilização do $ES^\ddagger$. Este autor observou que a combinação de

		posição 451				
		E	Q	D	S	A
Posição 39	Q	Q ₃₉ -E ₄₅₁ (selvagem)	Q ₃₉ -Q ₄₅₁	Q ₃₉ -D ₄₅₁	Q ₃₉ -S ₄₅₁	Q ₃₉ -A ₄₅₁
	E	E ₃₉ -E ₄₅₁	E ₃₉ -Q ₄₅₁	E ₃₉ -D ₄₅₁	E ₃₉ -S ₄₅₁	E ₃₉ -A ₄₅₁
	N	N ₃₉ -E ₄₅₁	N ₃₉ -Q ₄₅₁	N ₃₉ -D ₄₅₁	N ₃₉ -S ₄₅₁	N ₃₉ -A ₄₅₁
	A	A ₃₉ -E ₄₅₁	A ₃₉ -Q ₄₅₁	A ₃₉ -D ₄₅₁	A ₃₉ -S ₄₅₁	A ₃₉ -A ₄₅₁

Figura 9– Combinações de resíduos de aminoácido nas posições 451 e 39 da Sfsqli50 indicando os mutantes possíveis para o sítio ativo desta enzima. A área marcada em azul indica os mutantes já construídos e analisados (8) e a área em vermelho indica mutantes ainda desconhecidos (12) e que podem apresentar especificidade diferente daquela da enzima selvagem.

mutações simples não é simplesmente aditiva quando os aminoácidos mutados estão muito próximos ($<4\text{\AA}$) ou as mutações resultam em amplas alterações estruturais. Ao menos em princípio, este não parece ser o caso dos resíduos Q39 e E451, cujos C δ estão 5.4 $\text{\AA}$ distantes entre si.

Assumiu-se também que embora o exato posicionamento das hidroxilas dos glicones em $ES^\ddagger$ seja desconhecido, ele será o mesmo a partir de uma dada orientação da hidroxila no substrato. Assim, por exemplo, as OH4 axial de galactose e fucose assumem o mesmo posicionamento em $ES^\ddagger$. Deve ser destacado que este pressuposto é consequência da atual suposição de que todos os diferentes glicones sigam o mesmo roteiro de alteração conformacional na passagem $S \rightarrow ES \rightarrow ES^\ddagger$, que envolve a mudança da conformação de “cadeira” para “sofá” (Figura 1).

Embora certamente este roteiro não possa ser diretamente acompanhado para um substrato, análogos do estado de transição derivados de glucose e galactose (D-glucohidroximolactama e D-galactohidroximolactama) apresentam a mesma afinidade pelo sítio ativo da β -glicosidase de *Sulfolobus solfataricus* ($K_t=1,0\mu\text{M}$), além de formarem complexos EI estruturalmente muito semelhantes (Gloster *et al.*, 2004). Estes resultados reforçam a hipótese de que a alteração conformacional na formação de $ES^\ddagger$ é a mesma para todos os glicones aqui estudados.

Estabelecidos estes critérios, conhecendo-se a composição de resíduos nas posições 39 e 451 da Sf β gli50 e a orientação das hidroxilas do glicone, a energia total disponível para estabilizar $ES^\ddagger$ é calculada somando-se a energia das interações formadas em cada um dos complexos (Figura 10).

Figura 10- Esquema das interações não-covalentes formadas no complexo ES[‡] da Sfβgl50 e diferentes glicones. As interações (linhas tracejadas) são marcadas por uma letra (φ ou η) que identifica a posição do sítio ativo (39 ou 451, respectivamente) que interage com hidroxilas do glicone (4e=hidroxila 4 equatorial, 4a=hidroxila 4 axial, 6=hidroxila 6). A letra S identifica interações formadas por 4a e/ou 6 com outros resíduos do subsítio -1, exceto 451 e 39. As letras dentro das caixas correspondem a aminoácidos que podem ser encontrados naquelas posições nos duplos-mutantes de Sfβgl50. [E-glc][‡], [E-gal][‡] e [E-fuc][‡] representam as energias disponíveis para estabilizar os respectivos complexos ES[‡]

Usando esta estratégia foi calculada a energia disponibilizada pelas interações com as OH4 e OH6 para estabilizar $S^{\ddagger}$ de glucosídeos, galactosídeos e fucosídeos para os 12 duplos-mutantes de S β gli50 que ainda não haviam sido estudados (Figura 11).

Lembrando que a energia disponibilizada pelas interações com OH4 e OH6 para estabilizar $S^{\ddagger}$ e a velocidade de hidrólise dos substratos (expressa em k_{cat} / K_m) são proporcionais, nota-se na Figura 11 que independentemente dos resíduos presentes nas posições 39 e 451, fucosídeos sempre são os substratos hidrolisados com maior velocidade.

Outra tendência prevista é que redução da extensão da cadeia lateral do resíduo 451 está relacionada com uma troca na preferência de glucosídeos para galactosídeos. Assim, indo da esquerda para a direita em qualquer linha da Figura 11 nota-se uma inversão nas energias disponíveis para estabilizar glucosídeos e galactosídeos.

Por outro lado, a troca do resíduo na posição 39 não altera a preferência por glucosídeos e galactosídeos. Logo, as energias disponíveis para estabilizar glucosídeos e galactosídeos não se alteram em uma mesma coluna da Figura 11.

Finalmente, uma tendência geral observada é que todos os duplos-mutantes apresentam menor atividade catalítica sobre qualquer um dos 3 tipos de substrato quando comparados com a S β gli50 selvagem, conforme evidenciado pelas energias disponíveis para estabilizar $ES^{\ddagger}$ nos 12 duplos-mutantes (Figura 11), que são menores do que para a enzima selvagem.

Figura 11. Combinações de aminoácidos nas posições 39 e 451 da Sfgli50 e as previsões de energias de estabilização do complexo enzima-estado de transição (ES[‡]) para diferentes substratos (glc:glucosídeo; fuc:fucosídeo; gal:galactosídeo). A numeração que identifica os duplos-mutantes segue a mesma ordem da Figura 9. 1=Q₄₅₁E₃₉, 2=D₄₅₁E₃₉, 3=S₄₅₁E₃₉, 4=A₄₅₁E₃₉, 5=Q₄₅₁N₃₉, 6=D₄₅₁N₃₉, 7=S₄₅₁N₃₉, 8=A₄₅₁N₃₉, 9=Q₄₅₁A₃₉, 10=D₄₅₁A₃₉, 11=S₄₅₁A₃₉, 12=A₄₅₁A₃₉.

A diferença entre as energias disponíveis para estabilizar dois diferentes tipos de substrato pode ser correlacionada com a razão entre as suas constantes de hidrólise utilizando a equação:

$\Delta\Delta G^\ddagger = RT\ln(c_1/c_2)$, onde $R=8,3144$ J/K, $T=303$ K e c_1/c_2 corresponde à razão entre o k_{cat}/K_m da hidrólise dos dois substratos.

Deste modo, esta abordagem foi usada para calcular a razão entre k_{cat}/K_m prevista para hidrólise dos pares de substrato fucosídeo/galactosídeo (fuc/glc), fucosídeo/galactosídeo (fuc/gal) e galactosídeo/glucosídeo (gal/glc). Estas três razões caracterizam a especificidade de cada um dos inéditos 12 duplos-mutantes da Sf β gli50 (Tabela 2). A produção destes duplos-mutantes seguida da caracterização de sua especificidade pode ser utilizada para testar experimentalmente o modelo de previsão de especificidade de Sf β gli50.

Frente ao perfil de especificidade dos 12 duplos-mutantes (Tabela 2), optou-se por utilizar a preferência relativa por glucosídeo *versus* galactosídeo como parâmetro para escolha dos duplos-mutantes a serem usados no teste do modelo de previsão de especificidade dos mutantes de Sf β gli50.

A razão de atividade entre glucosídeo e galactosídeo é critério adequado para essa escolha porque vários duplos-mutantes (por exemplo, 3, 4, 7, 8, 11 e 12 – Tabela 2) são teoricamente mais ativos sobre galactosídeos do que glucosídeos, uma diferença clara em relação à enzima selvagem que hidrolisa galactosídeos cerca de 14 vezes mais lentamente que glucosídeos. A utilização de razões de atividade envolvendo fucosídeos não é tão apropriada porque a atividade sobre fucosídeo é maior na enzima selvagem e nos mutantes, conforme evidenciado

Tabela 2 – Previsões das razões entre k_{cat}/K_m para um par de substratos com diferentes tipos de glicone

Duplo mutante	fuc/glc	fuc/gal	gal/glc
Selvagem*	3	40	0,07
1 - Q451E39	65	819	0,1
2 – D451E39	85	132	1
3 – S451E39	787	62	13
4 – A451E39	1082	9	127
5 – Q451N39	174	5506	0,01
6 – D451N39	230	887	0,3
7 – S451N39	2124	417	5
8 – A451N39	2918	57	51
9 – Q451A39	259	2489	0,1
10 – D451A39	342	401	1
11 – S451A39	3159	189	17
12 – A451A39	4339	26	167

* Dados retirados de Marana *et al.*, 2002

pelas razões fuc/glc e fuc/gal sempre maiores do que 1 na Tabela 2. Logo, alterações desta razão poderiam não ser tão claramente detectáveis quanto a inversão de especificidade frente a galactosídeos e glucosídeos.

Com vistas à utilização deste critério para testar as previsões de especificidade, foram escolhidos os duplos-mutantes 7 (S₄₅₁N₃₉), 3 (S₄₅₁E₃₉) e 4 (A₄₅₁E₃₉) para serem produzidos como proteínas recombinantes e caracterizados. Todos eles apresentam teoricamente maior atividade sobre galactosídeos do que glucosídeos, sendo até possível que a atividade sobre este substrato não seja detectada. Note que para os mutantes 3, 4 e 7 a razão fuc/glc é muito alta, indicando forte redução da hidrólise de glucosídeo. Por fim, os três deverão ter maior atividade sobre fucosídeos.

Deve-se salientar que o mesmo critério já discutido poderia levar à escolha dos mutantes 8 (A₄₅₁N₃₉), 11 (S₄₅₁A₃₉) e 12 (A₄₅₁A₃₉). Entretanto, considerando a redução das energias disponíveis para estabilizar o S[‡] (Figura 11) seria provavelmente inviável detectar a atividade catalítica destes mutantes sobre glucosídeos e galactosídeos, enquanto que ensaios de atividade enzimática com tempos longos (cerca de 24 horas) permitiriam o estudo dos duplos-mutantes escolhidos com pelo menos dois substratos (galactosídeos e fucosídeos).

Deste modo, a primeira etapa na tentativa de testar o modelo para previsão de especificidades da Sfβgli50 foi construir os vetores para expressão dos duplos-mutantes. Para tal, foi utilizado em experimentos de mutação sítio-dirigida um plasmídeo pT7-7 que codifica a Sfβgli50 selvagem, que já estava disponível no laboratório.

Os experimentos de mutação sítio-dirigida foram bem sucedidos, uma vez que, como visto na Figura 12, as mutações foram corretamente incorporadas.

Utilizando-se estes plasmídeos, os mutantes S₄₅₁N₃₉, S₄₅₁E₃₉ e A₄₅₁E₃₉, foram expressos nas bactérias BL21DE3, conforme mostra o gel de SDS-PAGE em que são comparadas amostras de proteína total das bactérias induzidas e não-induzidas (Figura 13). Pode-se notar que a expressão foi pouco eficiente, já que as bandas das proteínas de interesse não se destacam frente às bandas das demais proteínas presentes nas bactérias induzidas.

Apesar disso, os lisados de bactérias induzidas foram submetidos à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl HI PREP para purificação das enzimas mutantes. Este tipo de cromatografia foi escolhido pois anteriormente tinha se mostrado eficiente para purificação da Sfβgli50 selvagem e seus mutantes (Marana *et al.*, 2002, 2003 e 2004). Conforme pode ser visto na Figura 14, em virtude da baixa atividade enzimática há dificuldade para discernir entre o pico de atividade β-glicosidásica e oscilações da linha de base nas cromatografias das Sfβgli50 mutantes (Figuras 14 A, N e E).

Devido a esta dificuldade, a identificação das frações cromatográficas que continham a atividade dos duplos-mutantes foi orientada pela posição de eluição da enzima selvagem, que é facilmente detectada (Figura 14 Wt). Assim, os tubos

Figura 12- Eletroferogramas das reações de sequenciamento dos plasmídeos pT7-7 codificando as SfβGli50 mutantes $S_{451}N_{39}$, $S_{451}E_{39}$, e $A_{451}E_{39}$. As caixas vermelhas indicam os nucleotídeos mutados. Os aminoácidos mutados são indicados embaixo dos respectivos códon. Nas seqüências em que aparecem as fitas "anti-sense", os códon "sense" são explicitados.

Figura 13- Análise em SDS-PAGE da expressão das β -glicosidases (Sf β GII50) mutantes em células BL21DE3. As proteínas marcadas pelos quadrados indicam as mutantes induzidas. A indução da expressão foi feita com IPTG 1mM por 3 horas a 25°C. padrão: padrão de peso molecular; 1: S₄₅₁N₃₉ não-induzido; 2: S₄₅₁N₃₉ induzido; 3: S₄₅₁E₃₉ não-induzido; 4: S₄₅₁E₃₉ induzido; 5: A₄₅₁E₃₉ não-induzido; 6: A₄₅₁E₃₉ não-induzido. O gel continha 10% de poliacrilamida e foi corado com Coomassie Blue R-250. Foram aplicados 20 μ l de amostra em cada raia.

Figura 14- Cromatografia hidrofóbica em coluna Phenyl HI PREP do lisado de bactérias BL21DE3 induzidas a expressarem a SfβGli50 selvagem e mutantes. **WT**- SfβGli50 selvagem; **A**- mutante A₄₅₁E₃₉ ("pool"= tubos 43 e 44); **N**- mutante S₄₅₁N₃₉ ("pool"= tubos 39 a 42); **E**- mutante S₄₅₁E₃₉ ("pool"= tubos 42 a 44). A atividade β-glicosidásica foi detectada com NPβGlc (selvagem) ou MUβGlc (mutantes) 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH6. O quadrado rosa indica a concentração de sulfato de amônio necessária para eluição da atividade β-glicosidásica.

correspondentes aos picos de atividade β -glicosidásica foram reunidos em “pools” e analisados por SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 15). Conforme pode ser observado, todos os “pools” contêm proteínas altamente enriquecidas, inclusive estando purificadas nos casos de $S_{451}E_{39}$ e $A_{451}E_{39}$.

Dispondo de amostras de pelo menos dois mutantes totalmente purificadas, considerou-se que seria válido tentar caracterizar a especificidade destas enzimas, apesar de sua baixa atividade catalítica. Para isso, amostras dos “pools” foram concentradas utilizando filtros Centriplus (item 3.8 de Materiais e Métodos) em uma tentativa de aumentar a concentração dos duplos-mutantes e facilitar a detecção da atividade enzimática.

Assim, a atividade de β -glicosidase presente nas amostras concentradas foi ensaiada com MU β Fuc 0,5mM. Devido ao longo tempo de ensaio, foram preparados tubos contendo apenas substrato a fim de se detectar uma eventual hidrólise espontânea do MU β Fuc. De fato, as velocidades de hidrólise apresentadas nas Figuras 16 B, C e D já foram corrigidas subtraindo-se a hidrólise espontânea do substrato. Todos os mutantes apresentaram atividade sobre esse substrato, entretanto trata-se de uma atividade muito inferior à da enzima selvagem (Figura 16). Contudo, nota-se que para todos duplos-mutantes foi detectada atividade enzimática uma vez que as velocidades de hidrólise do substrato em todas as amostras foram maiores que as dos controles sem enzima.

Infelizmente o substrato MU β Gal se mostrou muito pouco solúvel, inviabilizando uma comparação da preferência destas enzimas por fucosídeos e galactosídeos.

Figura 15. Análise em SDS-PAGE dos "pools" formados a partir de frações das cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Phenyl HI PREP das SfbGII50 mutantes. As bandas correspondendo às enzimas de interesse estão assinaladas pela seta. O gel era de poliácridamida 10% e foi corado com nitrato de prata.

Figura 16- Ensaios de atividade enzimática das amostras contendo as β -glicosidases mutantes concentradas com o auxílio de filtros Centriplus. Os ensaios foram realizados com MU β Fuc 0,5mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. **A-** Sfgli50 selvagem (não concentrada); **B-** mutante S₄₅₁N₃₉ (concentrada 25x); **C-** mutante S₄₅₁E₃₉ (concentrada 12x); **D-** mutante A₄₅₁E₃₉ (concentrada 6x). Os valores de velocidade de hidrólise do substrato pelas enzimas mutantes apresentados acima já foram corrigidos através da subtração da velocidade de hidrólise espontânea do substrato.

Os resultados obtidos até este ponto mostraram que seria viável caracterizar as Sfβgli50 duplo-mutantes, apesar de sua baixa atividade. Porém, maiores quantidades de enzima seriam necessárias. Além disso, uma simplificação do procedimento de purificação aliado a um método mais “brando” (sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) poderiam ampliar a recuperação da atividade enzimática dos duplos-mutantes, favorecendo, assim, sua caracterização.

Assim, como as enzimas mutantes deveriam ser produzidas em maior escala, optou-se por expressá-las utilizando o vetor pET46. Além da alta produção da proteína recombinante, outra vantagem deste sistema de expressão é que ele permite purificar a enzima recombinante através de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose. Isso porque em vetor pET46 a proteína de interesse é expressa ligada a uma cauda de 6 Histidinas na sua porção N-terminal. Essa cauda tem afinidade por cátions divalentes, como Níquel.

A subclonagem dos segmentos de DNA que codificam os duplos-mutantes em pET46 foi feita conforme descrito em Materiais e Métodos. O resultado deste experimento foi confirmado através de amplificação por PCR dos insertos a partir destas construções em pET46 e de sequenciamento de DNA (Figuras 17 e 18) com subsequente comparação com a seqüência da Sfβgli50 selvagem (Figuras 19, 20 e 21).

A análise em eletroforese em gel de agarose mostra que os produtos amplificados em PCR a partir das diferentes construções em pET46 apresentam o mesmo tamanho do fragmento de DNA que codifica a Sfbgli50 selvagem (Figura 17), enquanto que nota-se pelo resultado dos sequenciamentos de DNA (Figuras 18, 19, 20 e 21) que as mutações continuavam corretamente incorporadas e que

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados em PCR dos plasmídeos pET46 codificando duplos-mutantes da SfbgII50. P: padrão de peso molecular (1kb DNA ladder); 1 e 2: pET46 codificando a SfbgII50 selvagem; 3 e 4: pET46 codificando o mutante A₄₅₁E₃₉₁; 5 a 8: pET46 codificando o mutante S₄₅₁N₃₉₁; 9 a 12: pET46 codificando o mutante S₄₅₁E₃₉₁. As reações 1, 3, 5, 6, 9 e 10 utilizaram "primers" específicos para as extremidades 5' e 3' da SfbgII50. As reações 2, 4, 7, 8, 11 e 12 utilizaram os "primers" usados para clonar os insertos em pET46.

Figura 18- Eletroferogramas das reações de seqüenciamento dos mutantes $A_{451}E_{39}$, $S_{451}N_{39}$ e $S_{451}E_{39}$, respectivamente. A seta azul indica o códon que codifica o N-terminal de Sfgli50 e a vermelha indica o início do HisTag. Esse seqüenciamento foi feito com um primer específico para o promotor T7 presente no plasmídeo pET46. Os aminoácidos do HisTag estão em vermelho, e os do N-terminal das Sfgli50 mutantes aparecem em azul.

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

                                     ↓
Sfbetagli      QRRFPDDFLFGTATASYQIEGAWDEDGKGGENIWDYMVHN
Fim             QRRFPDDFLFGTATASYEIEGAWDEDGKGGENIWDYMVHN
                *****:*****

Sfbetagli      TPEVIRDLSNGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPAGIA
Fim             TPEVIRDLSNGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPAGIA
                *****

Sfbetagli      FYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPQKLQELGGFANPLISDWFEDYARVVFENFGDRVK
2X0             FYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPQKLQELGGFANPLISDWFEDYARVVFENFGDRVK
                *****

Sfbetagli      MFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAKAYYLYDREFRPVQGG
2X0             MFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAKAYYLYDREFRPVQGG
                *****

Sfbetagli      QCGITISVNWFGPATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPKELSDKIAEKSAQ
Gol             QCGITISVNWFGPATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPKELSDKIAEKSAQ
                *****

Sfbetagli      QGYPWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDFFGVNHYTAFLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWA
Gol             QGYPWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDFFGVNHYTAFLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWA
                *****

Sfbetagli      DDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWSTDESRENSLIDDDRIQY
Again           DDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWSTDESRENSLIDDDRIQY
                *****

                                     ↓
Sfbetagli      YRASMESLLNCLDDGINLKGYMAWSLMDNFEWMEGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKAA
pET46REV       YRASMESLLNCLDDGINLKGYMAWSLMDNFAWMEGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKAA
                *****

Sfbetagli      FVYKHIIKHRVVDY EYEPETMVM TIDEGH
pET46REV       FVYKHIIKHRVVDY EYEPETMVM TIDEGH
                *****

```

Figura 19- Alinhamento das seqüências do mutante A451E39 e da Sfbglic50 selvagem através do programa Clustal W. Os primers usados no sequenciamento foram **Fim**, **2X0**, **Gol**, **Again** e **pET46REV**. Notar as sobreposições entre as seqüências. As posições 39 e 451 estão assinaladas em negrito e destacadas por uma seta.

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

                                     ↓
Sfbetagli      QRRFPDDFLFGTATASYQIEGAWDEDGKGENIWDYMVHN
T7             QRRFPDDFLFGTATASYNIEGAWDEDGKGENIWDYMVHN
               *****:*****

Sfbetagli      TPEVIRDLNSGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPAGIA
Fim            TPEVIRDLNSGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPAGIA
               *****

Sfbetagli      FYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPQKLQELGGFANPLISDWFEDYARVVFENFGDRVK
2x0            FYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPQKLQELGGFANPLISDWFEDYARVVFENFGDRVK
               *****

Sfbetagli      MFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAKAYYLYDREFRPVQGG
2x0            MFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAKAYYLYDREFRPVQGG
               *****

Sfbetagli      QCGITISVNWFGPATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPELSDKIAEKSAQ
Gol            QCGITISVNWFGPATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPELSDKIAEKSAQ
               *****

Sfbetagli      QGYPWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDFFGVNHYTAFLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWA
Gol            QGYPWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDFFGVNHYTAFLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWA
               *****

Sfbetagli      DDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWSTDESRENSLIDDDRIQY
Again          DDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWSTDESRENSLIDDDRIQY
               *****

                                     ↓
Sfbetagli      YRASMESLLNCLDDGINLKGYMAWSLMDNFEWMEGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKAA
Again          YRASMESLLNCLDDGINLKGYMAWSLMDNFSWMEGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKAA
               *****

Sfbetagli      FVYKHIIKHRVVDYEYEPETMVMVTIDEGH
pET46REV       FVYKHIIKHRVVDYEYEPETMVMVTIDEGH
               *****

```

Figura 20- Alinhamento das seqüências do mutante S451N39 e da Sfβgli50 selvagem através do programa Clustal W. T7, Fim, 2X0, Gol, Again e pET46REV foram os primers usados no sequenciamento. Notar as sobreposições entre as seqüências. As posições 39 e 451 estão assinaladas em negrito e destacadas por uma seta.

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

                                     ↓
Sfbetagli      QRRFPDDFLFGTATASYQIEGAWDEDGKGENIWDYMVHN
T7             QRRFPDDFLFGTATASYEIEGAWDEDGKGENIWDYMVHN
               *****:*****

Sfbetagli      TPEVIRDLSNGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPAGIA
Fim            TPEVIRDLSNGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPTGMANEVNPAGIA
               *****

Sfbetagli      FYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPQKLQELGGFANPLISDWFEDYARVVFENFGDRVK
2X0            FYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPQKLQELGGFANPLISDWFEDYARVVFENFGDRVK
               *****

Sfbetagli      MFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAKAYYLYDREFRPVQGG
2X0            MFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAKAYYLYDREFRPVQGG
               *****

Sfbetagli      QCGITISVNWFGPATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPKELSDKIAEKSAQ
Gol            QCGITISVNWFGPATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPKELSDKIAEKSAQ
               *****

Sfbetagli      QGYPWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDFFGVNHYTAFLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWA
Gol            QGYPWSRLPEFTEEEKAFVRGTSDFFGVNHYTAFLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWA
               *****

Sfbetagli      DDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWSTDESRENSLIDDDRIQY
Again          DDSWLKSASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWSTDESRENSLIDDDRIQY
               *****

Sfbetagli      YRASMESLLNCLDDGINLKGYMAWSLMDNFEWMEGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKAA
pET46REV       YRASMESLLNCLDDGINLKGYMAWSLMDNFSWMEGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKAA
               *****

Sfbetagli      FVYKHIIKHRVVDY EYEPETMVMTIDEGH
pET46REV       FVYKHIIKHRVVDY EYEPETMVMTIDEGH
               *****

```

Figura 21- Alinhamento das seqüências do mutante S451E39 e da Sfβgli50 selvagem através do programa Clustal W. T7, Fim, 2X0, Gol, Again e pET46REV foram os primers usados no sequenciamento. Notar as sobreposições entre as seqüências. As posições 39 e 451 estão assinaladas em negrito e destacadas por uma seta.

não ocorreram outras alterações, como mutações secundárias (Figuras 19, 20 e 21) ou alteração da fase de leitura (Figura 18), durante o procedimento de clonagem em pET46. A seguir, utilizando estes plasmídeos, os mutantes foram expressos em células de *E. coli* da linhagem BL21DE3 de forma satisfatória, conforme evidenciado pela análise em SDS-PAGE (Figura 22). Percebe-se claramente a presença de uma proteína com peso molecular relativo de cerca de 50kDa presente exclusivamente nas amostras provenientes de bactérias induzidas.

As bactérias induzidas a produzir as Sfβgli50 mutantes foram lisadas e este material foi utilizado na tentativa de purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade em coluna HisTrap FF.

Durante as cromatografias de afinidade foram detectados, para os três duplos-mutantes, dois picos de atividade: um nas frações correspondentes às proteínas não retidas pela coluna e outro nas frações correspondentes à eluição das proteínas ligadas especificamente pela coluna (Figuras 23, 24 e 25).

Análises em SDS-PAGE indicaram que os duplos-mutantes estavam presentes no pico de atividade da região de “eluição específica”, e também que foram muito enriquecidos (praticamente purificados). As atividades presentes nas frações correspondentes às proteínas não-retidas pela coluna, por outro lado, devem ser resultantes da ação de β-glicosidase própria da bactéria. As Figuras 26, 27 e 28 apresentam os géis que corroboram essas afirmações, pois mostram que as frações eluídas durante a “lavagem” da coluna não contém a proteína induzida, enquanto esta é muito abundante nas frações correspondentes a “eluição

Figura 22- Análise em SDS-PAGE da expressão das β -glicosidases (Sf β Gal50) mutantes em células BL21DE3 utilizando pET46 como vetor. A indução da expressão foi feita com IPTG 1mM por 3 horas a 25°C. **P: padrão de peso molecular; 1: A₄₅₁E₃₉ não-induzido; 2: A₄₅₁E₃₉ induzido; 3: S₄₅₁N₅ não-induzido; 4: S₄₅₁N₅ induzido; 5: S₄₅₁E₃₉ não-induzido; 6: S₄₅₁E₃₉ não-induzido.** O gel continha 10% de poliacrilamida e foi corado com Comassie Blue R-250. Foram aplicados 20 μ l de amostra em cada raia.

Figura 23- Cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose do lisado de bactérias produzindo o mutante A₄₅₁E₃₉. Foram injetados 5ml de lisado na coluna cromatográfica. O ponto vermelho indica o início da eluição com tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4, NaCl 0,5M e imidazol 500mM (fração número 52). A atividade β -glicosidásica foi detectada com NP β Fuc 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os tubos 58, 59 e 60 foram reunidos em "pool" para subsequente caracterização cinética.

Figura 24. Cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose do lisado de bactérias produzindo o mutante $S_{451}N_{39}$. Foram injetados 5ml de lisado na coluna cromatográfica. O ponto vermelho indica o início da eluição com tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4, NaCl 0,5M e imidazol 500mM (fração número 54). A atividade β -glicosidásica foi detectada com NP β Fuc 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os tubos 59, 60 e 61 foram reunidos em "pool" para subsequente caracterização cinética.

Figura 25- Cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose do lisado de bactérias produzindo o mutante $S_{451}E_{39}$. Foram injetados 5ml de lisado na coluna cromatográfica. O ponto vermelho indica o início da eluição com tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4, NaCl 0,5M e imidazol 500mM (fração número 56). A atividade β -glicosidásica foi detectada com NP β Fuc 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os tubos 62, 63 e 64 foram reunidos em "pool" para subsequente caracterização cinética.

Figura 26. Análises em SDS-PAGE das frações da cromatografia do lisado de bactérias produzindo o mutante $A_{451}E_{39}$. induzido: amostra das proteínas totais da bactéria induzida a produzir o mutante $A_{451}E_{39}$; 8 a 15: frações de número 8 a número 15; 56 a 63: frações de número 56 a número 63.

Figura 27- Análises em SDS-PAGE das frações da cromatografia do lisado de bactérias produzindo o mutante $S_{451}N_{39}$. induzido: amostra das proteínas totais da bactéria induzida a produzir o mutante $S_{451}N_{39}$; 57 a 62: frações de número 57 a número 62; 12 a 14: frações de número 12 a número 14.

Figura 28- Análises em SDS-PAGE das frações da cromatografia do lisado de bactérias produzindo o mutante S_{451E39} , induzido: amostra das proteínas totais da bactéria induzida a produzir o mutante S_{451E39} ; 14 a 16: frações de número 14 a número 16; 59 a 64: frações de número 59 a número 64.

específica”. Este resultado exclui a hipótese de que o pico de atividade β -glicosidásica observado durante a lavagem da coluna correspondesse a excesso de proteína das Sf β gli50 mutantes que não havia sido retido pela coluna.

Os “pools” (Figuras 23, 24 e 25) resultantes das cromatografias foram, para cada um dos mutantes, reunidos e ensaiados para a determinação dos parâmetros cinéticos para hidrólise de NP β Fuc, NP β Glc e NP β Gal (Figuras 29 a 34).

Esta caracterização mostrou que nenhum dos três mutantes apresentou atividade sobre NP β Glc mesmo em ensaios de 24 horas. Porém, foi possível avaliar os parâmetros cinéticos para hidrólise de fucosídeos e galactosídeos (Tabela 3). De fato, as previsões do modelo indicavam que os três mutantes escolhidos deveriam ser mais ativos sobre fucosídeos e galactosídeos do que sobre glucosídeos (Tabela 2).

Vale lembrar que a Sf β gli50 selvagem é cerca de 14 vezes mais ativa sobre NP β Glc do que sobre NP β Gal. Logo, a presença de atividade sobre galactosídeos e ausência de atividade sobre glucosídeos torna a especificidade dos duplos-mutantes claramente distinta daquela da enzima selvagem e é coerente com as previsões do modelo, que indicavam uma inversão na preferência dos duplos-mutantes frente a galactosídeos e glucosídeos em relação a enzima selvagem.

Portanto, no que tange à previsão da preferência por glucosídeos e galactosídeos, glicones que diferem apenas no posicionamento da OH4, o modelo se mostrou apropriado ao menos qualitativamente. No entanto, a ausência de

Figura 29- Efeito da concentração do substrato (NPβFuc) sobre a atividade do mutante A₄₅₁E₃₉. Inseto: plot de Lineweaver-Burk. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados a partir destes gráficos usando o "software" EnzFitter.

Figura 30- Efeito da concentração do substrato (NPβGal) sobre a atividade do mutante A₄₅₁E₃₉. Inseto: plote de Lineweaver-Burk. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados a partir destes gráficos usando o "software" EnzFitter.

Figura 31- Efeito da concentração de substrato (NPβFuc) sobre a atividade do mutante S₄₅₁N₃₉. Inseto: plot de Lineweaver-Burk. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados a partir destes gráficos usando o "software" EnzFitter.

Figura 32. Efeito da concentração de substrato (NPβGal) sobre a atividade do mutante S₄₅₁N₃₉. Inseto: plot de Lineweaver-Burk. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados a partir destes gráficos usando o "software" EnzFitter.

Figura 33- Efeito da concentração do substrato (NPβFuc) sobre a atividade do mutante S₄₅₁E₃₉. Inseto: plot de Lineweaver-Burk. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados a partir destes gráficos usando o "software" EnzFitter.

Figura 34. Efeito da concentração de substrato (NPβGal) na atividade do mutante S₄₅₁E₃₉. Inseto: plot de Lineweaver-Burk. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados a partir destes gráficos usando o "software" EnzFitter.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos dos duplos-mutantes da SfbgII50.

		A ₄₅₁ E ₃₉	S ₄₅₁ N ₃₉	S ₄₅₁ E ₃₉	Selvagem
NPβFuc	V_{max} (nmols/min)	0,090±0,003	0,0236 ±0,0005	0,70 ±0,04	3300 ± 100*
	K_m (mM)	2,6 ± 0,2	1,51 ±0,09	2,9 ± 0,3	0,49 ± 0,04
	V_{max} / K_m	0,034	0,015	0,241	6700 ± 70*
NPβGal	V_{max} (nmols/min)	0,047 ± 0,001	0,058 ± 0,002	0,24 ± 0,01	350 ± 10*
	K_m (mM)	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,32 ± 0,07	2,0 ± 0,2
	V_{max} / K_m	0,361	0,483	0,75	170 ± 20*

Os parâmetros cinéticos foram calculados com o software Enzfitter

* Valores de k_{cat} ($10^3 s^{-1}$) e k_{cat}/K_m ($10^3 s^{-1} mM^{-1}$) extraídos de Marana *et al.* (2002)

atividade sobre NP β Glc impediu a verificação desta adequação no aspecto quantitativo.

Por outro lado, com base nos parâmetros cinéticos para hidrólise de fucosídeos e galactosídeos (Tabela 3), a especificidade de cada um dos duplos-mutantes frente a esses dois tipos de glicone foi determinada calculando-se a razão entre os $V_{m\acute{a}x} / K_m$ para hidrólise de NP β Fuc e NP β Gal (aqui chamado de $V_{m\acute{a}x} / K_m$ relativo) (Tabela 4).

Conforme pode ser visto (Tabela 4), os resultados obtidos não são coerentes com as previsões. Todos os três duplos-mutantes deveriam ter maior preferência por fucosídeos do que por galactosídeos, porém nota-se o oposto; os duplos-mutantes são mais ativos sobre galactosídeos.

A previsão apontava que o mutante A₄₅₁E₃₉ seria cerca de 9 vezes mais ativo sobre fucosídeos do que sobre galactosídeos, enquanto que nos mutantes S₄₅₁N₃₉ e S₄₅₁E₃₉ essa diferença de atividade seria de cerca de 400 e 60 vezes, respectivamente. Observou-se, entretanto, que os mutantes A₄₅₁E₃₉, S₄₅₁N₃₉ e S₄₅₁E₃₉ apresentam atividades cerca de 10, 30 e 3 vezes maior sobre galactosídeos, respectivamente.

Levando em consideração a especificidade da Sf β gli50 selvagem, cuja atividade sobre fucosídeos é cerca de 40 vezes maior do que galactosídeos, percebe-se que no caso do mutante A₄₅₁E₃₉ era prevista uma queda nesta preferência ($V_{m\acute{a}x} / K_m$ relativo previsto de 9), enquanto que para S₄₅₁N₃₉ e S₄₅₁E₃₉ previa-se um aumento na preferência por fucosídeos ($V_{m\acute{a}x} / K_m$ relativos de 417 e 62, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4- Comparação entre os V_{max}/K_m relativos previstos e experimentais para os substratos NPβFuc e NPβGal para os três duplos-mutantes da SfβgII50.

Mutantes	V_{max}/K_m relativo ^(a)	
	previsto	experimental
4- A ₄₅₁ E ₃₉	9	0,09
7- S ₄₅₁ N ₃₉	417	0,03
3- S ₄₅₁ E ₃₉	62	0,3

^(a) V_{max}/K_m relativo corresponde à razão entre o V_{max}/K_m para hidrólise de NPβFuc e NPβGal.

Razão entre o k_{cat}/K_m para hidrólise de NPβFuc e NPβGal para SfβgII50 selvagem é igual a 40 (Marana *et al.*, 2002)

Portanto, o resultado obtido para o mutante A₄₅₁E₃₉ é ao menos qualitativamente coerente com a tendência da previsão, embora tenha sido observada muito mais do que uma queda na preferência por fucosídeos, mas sim uma inversão de especificidade ($V_{m\acute{a}x} / K_m$ relativo= 0,09). Entretanto, os resultados observados para S₄₅₁N₃₉ e S₄₅₁E₃₉ são contrários à tendência das previsões, pois nestes casos houve forte redução da preferência por fucosídeos.

Como no que tange a preferência por fucosídeos *versus* galactosídeos as previsões para A₄₅₁E₃₉ seguiam a direção oposta àquelas para S₄₅₁N₃₉ e S₄₅₁E₃₉, mas o resultado experimental mostra os três duplos-mutantes com especificidade semelhante (maior preferência por galactosídeos), é possível que o mesmo fenômeno explique a especificidade destas três enzimas.

Nenhum dos resíduos introduzidos nestes duplos-mutantes, A e S na posição 451 e N e E na 39, haviam individualmente convertido a Sfβgli50 em uma galactosidase (Marana *et al.*, 2004). Logo, deve ser a ação combinada destas mutações que promove a conversão da especificidade nestes duplos-mutantes.

É proposto que nas β-glicosidasas exista uma interação desfavorável a formação de ES[‡] entre a hidroxila 6 do glicone e o sítio ativo, que é até superior às interações favoráveis formadas pela hidroxila 6 com Q39 (Fernandez *et al.*, 1995; Marana *et al.*, 2002; Marana, 2006). Assim, fucosídeos que não possuem a hidroxila 6 são mais eficientemente hidrolisados do que galactosídeos.

Portanto, aparentemente a troca simultânea dos resíduos 39 e 451 alterou a região do sítio ativo que interage com a hidroxila 6, removendo as interações desfavoráveis à formação de ES[‡] e neste cenário hipotético, as interações

favoráveis com a hidroxila 6 passaram a preponderar, favorecendo a hidrólise dos galactosídeos em detrimento dos fucosídeos.

Caso esta dedução esteja correta, um dos pressupostos iniciais do modelo de previsão de especificidade é falso, pois as interações entre os resíduos 451 ou 39 e as hidroxilas 4 ou 6 não são independentes.

A fim de avaliar a extensão desta interação, de posse dos dados de especificidade dos duplos-mutantes e dos mutantes simples, foi utilizada uma abordagem proposta por Wells (1990) para análise de proteínas com múltiplas mutações.

Segundo este autor, o efeito de duas mutações simultâneas na energia de ativação ($\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XY}$) é descrito por:

$\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XY} = \Delta\Delta G^{\ddagger}_X + \Delta\Delta G^{\ddagger}_Y + \Delta G^{\ddagger}_I$, onde $\Delta G^{\ddagger}_I$, chamado de energia de acoplamento, reflete a extensão em que a alteração na energia de interação entre os aminoácidos das posições X e Y afetam a estabilização de $ES^{\ddagger}$. $\Delta\Delta G^{\ddagger}_X$ e $\Delta\Delta G^{\ddagger}_Y$ representam as mudanças de energias para mutantes simples nas posições X e Y.

Como neste trabalho foi abordada a especificidade frente a fucosídeos e galactosídeos, o parâmetro $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XY}$ pode ser calculado para ambos substratos. A diferença entre eles pode ser escrita como:

$$\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XYFuc} - \Delta\Delta G^{\ddagger}_{XYGal} = (\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XFuc} - \Delta\Delta G^{\ddagger}_{XGal}) + (\Delta\Delta G^{\ddagger}_{YFuc} - \Delta\Delta G^{\ddagger}_{YGal}) + (\Delta G^{\ddagger}_{IFuc} - \Delta G^{\ddagger}_{IGal})$$

Sabe-se que $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XY}$ representa a diferença de energia entre um duplo-mutante e a enzima selvagem, então $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XY} = -RT\ln(c_{mut}/c_{selv})$, onde $c = k_{cat}/K_m$. Assim, o termo $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{XYFuc} - \Delta\Delta G^{\ddagger}_{XYGal}$ pode ser reescrito como $RT\ln(c_{selvFuc}/c_{selvGal} \times c_{mutGal}/c_{mutFuc})$.

Portanto, todos os termos da equação acima podem ser calculados a partir dos parâmetros cinéticos dos duplos ou simples mutantes, exceto $\Delta G_{\text{IFuc}}^{\ddagger} - \Delta G_{\text{IGal}}^{\ddagger}$. Embora este termo reflita a energia de interação entre dois resíduos em uma mesma SfbgI50 duplo-mutante, porém em dois diferentes $\text{ES}^{\ddagger}$, ele pode dar uma aproximação da magnitude da interação entre os resíduos nas posições 451 e 39.

Feitos os cálculos utilizando dados da Tabela 3 e da literatura (Marana *et al.*, 2004), nota-se que para $\text{A}_{451}\text{E}_{39}$ o “termo de acoplamento” ($\Delta G_{\text{IFuc}}^{\ddagger} - \Delta G_{\text{IGal}}^{\ddagger}$) é de 11kJ/mol, em $\text{S}_{451}\text{N}_{39}$ observa-se -5,7kJ/mol e para $\text{S}_{451}\text{E}_{39}$ este valor é de 13kJ/mol. Portanto, são valores diferentes de zero, como seria observado caso as mutações tivessem efeito simplesmente aditivo (Wells, 1990). Deve ser destacado que estes valores somente foram obtidos graças à caracterização dos duplos-mutantes, não podendo ser calculados *a priori*.

A comparação de pares de duplos-mutantes que diferem em apenas um resíduo, por exemplo $\text{S}_{451}\text{N}_{39}$ e $\text{S}_{451}\text{E}_{39}$, revela grande diferença entre os “termos de acoplamento” (-5,7 *versus* 13 kJ/mol), confirmando a suposição intuitiva de que a “energia de acoplamento” é dependente dos resíduos presentes nas posições 451 e 39.

Esta constatação mostra ser inviável a elaboração do modelo de previsão como aqui proposto, pois para obtenção das “energias de acoplamento” é preciso produzir e caracterizar os duplos-mutantes, desvirtuando assim a proposta inicial que era partir de uma base pequena de dados e gerar previsões para um número maior de SfbgI50 mutantes sem necessidade de informações prévias sobre elas.

Em conclusão, a estratégia para previsão da especificidade de duplos-mutantes da SfbgI50 se mostrou qualitativamente apropriada para indicar o

comportamento dos mutantes frente a glucosídeos e galactosídeos, ou seja, glicones com diferenças na hidroxila 4. Porém, a estratégia é inadequada para previsão do comportamento frente a glicones com diferenças na hidroxila 6 (fucosídeos e galactosídeos). Isto se deve provavelmente a alterações estruturais do sítio ativo decorrentes da mutação e a uma interdependência das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo com as hidroxilas do glicone.

4.3- Papel dos resíduos H142 e N186 na especificidade de Sfβgli50

O outro objetivo desse projeto foi analisar a contribuição para a especificidade da Sfβgli50 de outros dois resíduos do subsítio do glicone: H142 e N186, cujas energias de interação ainda não foram determinadas. Esses resíduos interagem através de pontes de hidrogênio com as hidroxilas 3 e 2 do glicone, respectivamente (Burmeister *et al.*, 1997).

Assim, vetores pCAL-n –Flag contendo insertos de SfβGli50 selvagem foram submetidos a reações de mutagênese sítio-dirigida que permitiram a incorporação de alaninas no lugar dos resíduos 142 e 186 (Figura 35). Optou-se pela substituição destes resíduos por alaninas a fim de remover qualquer interação com o glicone.

A expressão dos mutantes H142A e N186A em bactérias da linhagem BL21DE3 foi realizada com sucesso, como mostra a Figura 36. O vetor pCAL-n-Flag, utilizado nesse sistema de expressão, codifica o inserto de interesse ligado a um peptídeo em sua porção N-terminal. Esse peptídeo tem afinidade por calmodulina na presença de íons cálcio, e isso permite que a proteína de interesse

Figura 35- Eletroferogramas das reações de sequenciamento dos plasmídeos pCAL-n-Flag codificando as Sfgli50 mutantes H142A e N186A. As caixas vermelhas indicam os nucleotídeos mutados.

Figura 36- Análise em SDS-PAGE da expressão das Sfggli50 recombinantes em células BL21DE3 transformadas com o plasmídeo pCAL-n-Flag. Os quadrados indicam as proteínas de interesse. Nas raia: P- Padrão de peso molecular; 1- Bactérias não transformadas e não-induzidas; 2- Bactérias não transformadas e induzidas; 3- Bactérias transformadas com plasmídeo contendo inserto de Sfggli50 selvagem, mas não-induzidas; 4- Bactérias transformadas com plasmídeo contendo inserto de Sfggli50 selvagem e induzidas; 5- Bactérias não-induzidas transformadas com plasmídeo contendo inserto do mutante N186A; 6- Bactérias induzidas transformadas com plasmídeo contendo inserto do mutante N186A; 7- Bactérias não-induzidas transformadas com plasmídeo contendo inserto do mutante H142A; 8- Bactérias induzidas transformadas com plasmídeo contendo inserto do mutante H142A. O gel continha poliácilamida 10% e foi corado com Coomassie Blue R-250. Foram aplicados 20µl de amostra em cada raia.

seja purificada através de cromatografia de afinidade por calmodulina-agarose (item 3.10.2 e Figura 37).

Nota-se que a cromatografia funcionou apropriadamente uma vez que a atividade da enzima selvagem foi recuperada na forma de um único pico durante a eluição da coluna com tampão contendo EDTA (Figura 37A). Observa-se também que nas cromatografias do lisado contendo os mutantes H142A (Figura 37B) e N186A (Figura 37C) recupera-se um pico de atividade β -glicosidásica majoritário durante a lavagem da coluna, que corresponde provavelmente a uma β -glicosidase bacteriana. Porém, a atividade dos mutantes H142A e N186A é seguramente distinguível da linha de base (insertos das Figuras 37B e 37C, respectivamente) e sua eluição coincide com a da enzima selvagem (Figura 37A).

As frações com atividade β -glicosidásica eluídas com tampão contendo EDTA foram reunidas formando os materiais H142A e N186A, que foram caracterizados em experimentos de cinética enzimática.

A caracterização destes mutantes foi iniciada com ensaios enzimáticos com MU β Glc (Figuras 38 e 39), a partir dos quais determinou-se que H142A tem $V_{m\acute{a}x} = 4,1 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$ nmols/min e $K_m = 1,4 \pm 0,3$ mM; e que N186A tem $V_{m\acute{a}x} = 8,1 \times 10^{-4} \pm 6 \times 10^{-5}$ nmols/min e $K_m = 1,5 \pm 0,4$ mM. Cabe lembrar que estudos anteriores mostraram que o peptídeo ligado à enzima não afeta os parâmetros cinéticos da Sf β gli50 selvagem (Marana *et al.*, 2002).

Nota-se que os mutantes H142A e N186A apresentam K_m para MU β Glc semelhante àquele da enzima selvagem ($2,3 \pm 0,1$ mM; Marana *et al.*, 2001). Porém, comparações da velocidade de hidrólise do substrato não são possíveis,

Figura 37-Cromatografias de afinidade em coluna de calmodulina-agarose utilizando o lisado de bactérias BL21 DE3 transformadas com pCAL-n-Flag codificando as Sfgli50 recombinantes. A atividade β -glicosidásica foi detectada utilizando NP β Glc (selvagem) e MU β Glc (mutantes) 4mM em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. Os pontos vermelhos indicam o início da eluição das proteínas ligadas especificamente à coluna utilizando o tampão de eluição contendo EDTA (ver Materiais e Métodos).

A- Sfgli50 selvagem; **B**- Mutante H142A; **C**- Mutante N186A.

Figura 38- Efeito da concentração do substrato MUβGlc na atividade do mutante H142A. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. O inserto mostra o plot de Lineweaver-Burk. A partir dos dados desse ensaio foram calculados os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m). Estes cálculos foram feitos com o auxílio do programa EnzFitter.

Figura 39- Efeito da concentração do substrato MUβGlc na atividade do mutante N186A. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. O inserto mostra o plot de Lineweaver-Burk. A partir dos dados desse ensaio foram calculados os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m). Estes cálculos foram feitos com o auxílio do programa EnzFitter.

pois os mutantes não foram completamente purificados. Logo, diferenças no $V_{m\acute{a}x}$ podem ser reflexo apenas de diferentes quantidades de enzima ativa no ensaio.

A menor atividade catalítica do mutante N186A fez com que a caracterização fosse levada adiante apenas com o mutante H142A.

O mutante H142A foi ensaiado com os substratos NP β Glc, NP β Gal e NP β Fuc (Figuras 40, 41 e 42). Como mostrado pelas razões $V_{m\acute{a}x} / K_m$ (Tabela 5), o mutante H142A é cerca de 3 vezes mais ativo sobre fucosídeos e glucosídeos do que galactosídeo. Em contraste, a Sf β gli50 selvagem é 33 vezes mais ativa sobre fucosídeos do que sobre galactosídeos e 2 vezes mais ativa sobre fucosídeos do que sobre glucosídeos (Marana *et al.*, 2001).

Estes dados indicam que a mutação H142A tornou a especificidade de Sf β gli50 muito mais ampla, principalmente por um decréscimo na preferência por fucosídeos. Uma vez que em β -glicosidases resíduos equivalentes à H142 interagem com as hidroxilas 2 e 3, este resultado é de difícil interpretação, pois fucosídeos, galactosídeos e glucosídeos não diferem quanto ao posicionamento destas hidroxilas. Portanto, embora alterações na posição 142 sejam promissoras para ampliação da especificidade de Sf β gli50, as bases deste fenômeno não são claras.

Figura 40- Efeito da concentração do substrato NPβFuc na atividade do mutante H142A. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. O inserto mostra o plot de Lineweaver-Burk. Os dados obtidos a partir desse ensaio permitiram a determinação de parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m), sendo que os cálculos foram feitos com o auxílio do programa EnzFitter.

Figura 41- Efeito da concentração do substrato NPβGal na atividade do mutante H142A. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. O inserto mostra o plot de Lineweaver-Burk. Os dados obtidos a partir desse ensaio permitiram a determinação de parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m), sendo que os cálculos foram feitos com o auxílio do programa EnzFitter.

Figura 42- Efeito da concentração do substrato NPβGlc na atividade do mutante H142A. O substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6. O inserto mostra o plot de Lineweaver-Burk. Os dados obtidos a partir desse ensaio permitiram a determinação de parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m), sendo que os cálculos foram feitos com o auxílio do programa EnzFitter.

Tabela 5- Parâmetros cinéticos do mutante H142A para os três NP β Glicosídeos.

Mutante H142A	V_{m2x} (nmols/min)	K_m (mM)	V_{m2x}/K_m (nmols/min. mM)
NP β Glc	0,0081 $\pm$ 0,0004	0,8 $\pm$ 0,1	0,010
NP β Fuc	0,024 $\pm$ 0,001	2,0 $\pm$ 0,2	0,012
NP β Gal	0,0097 $\pm$ 0,0008	3,0 $\pm$ 0,6	0,0032

5- Conclusões

As S β gli50 mutantes S₄₅₁N₃₉, S₄₅₁E₃₉ e A₄₅₁E₃₉ foram produzidas como proteínas recombinantes em bactérias BL21DE3 utilizando o vetor pET46; essas enzimas foram parcialmente purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap FF.

Nenhum dos três mutantes têm atividade sobre NP β Glc, embora apresentem atividade sobre NP β Gal maior que sobre NP β Fuc.

A hidrólise de galactosídeos e simultânea ausência de atividade sobre glucosídeos indicou que o modelo de previsão é, ao menos qualitativamente, apropriado para sugerir o comportamento da especificidade dos duplos-mutantes frente a glicones que diferem quanto ao posicionamento da hidroxila 4.

Por outro lado, a preferência por galactosídeos em detrimento de fucosídeos mostra que o modelo não gera previsões corretas quanto ao comportamento da especificidade dos mutantes frente a glicones com diferenças na hidroxila 6.

Estas conclusões indicam que a construção de um modelo para previsão de especificidade simples e independente de dados estruturais é provavelmente inviável.

As enzimas S β gli50 selvagem e os mutantes H142A e N186A foram produzidas como proteínas recombinantes em bactérias BL21DE3 utilizando o vetor pCAL-n-Flag; estes mutantes foram parcialmente purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de calmodulina-agarose.

Os parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_m) foram determinados para a hidrólise de MU β Glc, NP β Glc, NP β Gal e NP β Fuc pelo mutante H142A, indicando que esta mutação torna a especificidade da Sf β gli50 pelo glicone menos restritiva.

6- Bibliografia

- Blum H., Beir H. & Gross H.(1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Burmeister W.P., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S. & Henrissat B. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 15, 663-675.
- Coutinho P.M. & Henrissat B. (2003). Carbohydrate active enzymes server. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>
- Czjzek M., Cicek M., Zamboni V., Bevan D.R., Henrissat B. & Esen A. (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glycosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glycosidase-DIMBOA, -DIMBOA-Glc and -dhurrin complexes. *PNAS* 97, 13555-13560.
- Davies G. & Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.
- Davies G.J., Wilson K.S. & Henrissat B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hidrolases. *Biochemical J.* 321, 557-559.
- Fernandez P., Cañada F.J., Jiménez-Barbero J. & Martín-Lomas M. (1995). Substrate specificity of small-intestine lactase:study of the steric effects and hydrogen bonds involved in enzyme-substrate interaction. *Carbohydrate Research* 271, 31-42.
- Feng H.Y., Drone J., Hoffmann L., Tran V., Tellier C., Rabiller C. & Dion M. (2005). Converting a β -glycosidase into a β -transglycosidase by directed evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44):37088-37097.

- Fersht, A. (1998). Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman Co.-NY-USA.
- Gloster T.M., Roberts S., Ducros V.M.A, Perugino G., Rossi M., Hoos R., Moracci M., Vasella A. & Davies G.J. (2004). Structural studies of the β -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors. *Biochemistry*, 43:6101-6109.
- Hancock S.M., Corbett K., Fordham-Skelton A.P., Gatehouse J.A. & Davis B.G. (2005). Developing promiscuous glycosidases for glycoside synthesis: Residues W433 and E432 in *Sulfolobus solfataricus* β -glycosidase are important glucoside- and galactoside specificity determinants. *ChemBioChem* 6, 866-875.
- Kempton J.B. & Withers S.G. (1992). Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: Kinetic studies. *Biochemistry* 31, 9961-9969.
- Kim Y.W., Lee S.S., Warren R.A.J. & Withers S.G. (2004). Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (41):42787-42793.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T7. *Nature* 227, 680-685.
- Mayer C., Zechel D.L., Reid, S.P., Warren A.J. & Withers S.G. (2000). The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS Letters* 466, 40-44.

- Marana S.R., Terra W.R. & Ferreira C. (2000). Purification and properties of a β -glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30(12), 1139-1146.
- Marana S.R., Jacobs-Lorena, M., Terra W.R. & Ferreira C.(2001). Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. *Biochim. Biophys. Acta* 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 the specificity of an insect β -glycosidase. *Eur. J. Biochem.* 269, 3705-3714.
- Marana S.R., Andrade, E.H.P., Ferreira C. & Terra W.R. (2004). Investigation of the substrate specificity of a β -glycosidase from *Spodoptera frugiperda* using site-directed mutagenesis and bioenergetic analysis. *Eur. J. Biochem.* 271, 4169-4177.
- Marana S.R. (2006). Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life - Critical Reviews* (em impressão).
- Matsumura I. & Ellington A.D. (2001). *In vitro* evolution of β -glucuronidase into a β -galactosidase proceeds through non-specific intermediates. *J. Mol. Biol.* 305:331-339.
- Namchuk M.N. & Withers S.G. (1995). Mechanisms of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions. *Biochemistry* 34, 16194-16202.
- Stemmer W.P.C. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *PNAS*, 91:10747-10751.

- Tabor S. & Richardson C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA Polymerase/
Promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.
PNAS 82: 1074-1078
- Verdoucq L., Czjzek M., Moriniere J., Bevan D.R. & Esen A. (2003). Mutational and
structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum β -
glucosidases. Journal of Biological Chemistry, 278:25055-25062.
- Wells J.A. (1990). Additivity of mutational effects in proteins. Biochemistry
29(37):8509-8517.

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome: Julio Henrique Kravcuks Rozenfeld

Local e data de nascimento: São Paulo, 23 de Julho de 1981

Educação

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (2000-2003)

Ocupação

Bolsista de Mestrado, CNPq (2004-2006). Projeto: Bases moleculares da especificidade da β -glicosidase digestiva de *Spodoptera frugiperda*

Comunicações em Congressos

Rozenfeld J.H.K., Mendonça L.M.F., Marana S.R.: Molecular basis of the substrate specificity in a beta-glycosidase. XXXIV Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2 a 5 de Julho de 2005 em Águas de Lindóia, São Paulo.