## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

## VITOR MEDEIROS ALMEIDA

## Identificação de domínios em β-glicosidases GH1 através da análise de sua estabilidade

Versão corrigida da dissertação defendida O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 11/05/2016

## VITOR MEDEIROS ALMEIDA

## Identificação de domínios em β-glicosidases GH1 através da análise de sua estabilidade

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

São Paulo 2016

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

Almeida, Vitor Medeiros
A447i Identificação de domínios em β-glicosidases GH1 através da análise de sua estabilidade / Vitor Medeiros Almeida. -- São Paulo, 2016. 75p.
Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica Orientador: Marana, Sandro Roberto
1. Enzimologia 2. Proteínas I. T. II. Marana, Sandro Roberto, orientador.
574.1925 CDD

### Dedico este trabalho:

Aos que me suportam diariamente, e aos que deixam saudade.

#### AGRADECIMENTOS

Pela paciência tendendo ao infinito e por não descontar nos seus alunos a raiva que sente quando a máquina de café o faz perder dinheiro, agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Sandro Roberto Marana.

Aos que estão ou passaram pelo Laboratório de Enzimologia nesses dois últimos anos: Ao Dr Fábio Tamaki pelo permanente incentivo e com idéias produtivas. À Valquíria por ser solidária e sempre compartilhar seu conhecimento. À Maíra por me salvar incontável vezes nos experimentos e por isso acelerar este trabalho em algumas ordens de grandeza. À Juliana por ser tão dedicada e sempre alegrar o ambiente de trabalho. Aos alunos de IC Matheus, Thabata e Franscisco por me mostrarem que sempre temos muito a aprender.

Aos meus amigos do Espírito Santo, por não me abandonarem apesar da distância.

Aos meus amigos da pensão 1127, que conseguiram transformar aquela casa no meu lar por um ano.

Ao Gláucio, Iuri, Paulo, Daniel, João, Jec e Ravena por serem minha família aqui em São Paulo.

À minha namorada, Juliana, por ser meu porto seguro.

À minha família por me apoiarem desde o começo e me darem a segurança de saber que sempre terei em quem me amparar nos piores momentos. Em especial à minha mãe e minha avó, por serem minhas eternas chaperonas e me fazerem aprender o real significado da palavra saudade.

Ao meu pai, que mesmo depois de tantos anos, soube o momento exato de voltar pra minha vida e nunca hesitar em ajudar.

À CAPES pela bolsa de mestrado, me permitindo focar integralmente na pesquisa, ao CNPq e FAPESP por investirem no nosso grupo de pesquisa.

#### RESUMO

Almeida, V.M. **Identificação de domínios em β-glicosidases GH1 através da análise de sua estabilidade**. 2016.72p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introdução e objetivos: β-glicosidases da família GH1 das glicosil-hidrolases possuem um dobramento do tipo barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Propõe-se que proteínas com este dobramento, que usualmente classificam-se como tendo um único domínio, na verdade são compostas por dois domínios, cada um deles correspondendo a um "meio barril" ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>. Assim, as proteínas com dobramento barril  $(\beta/\alpha)_8$  seriam provenientes de uma duplicação e fusão gênica de um ancestral "meio barril" ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>. O objetivo geral deste projeto é investigar a existência de dois domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>, as metades N- e C-terminal, na estrutura ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barril da  $\beta$ -glicosidase A de *Thermotoga maritima* (bglTm) e  $\beta$ -glicosidase B de *Paenibacillus* polymyxa (bglB) por meio de análise da desnaturação térmica e química dessas enzimas. **Resultados:** Para atingir esse objetivo foram introduzidas mutações que rompem contatos não covalentes entre os supostos domínios destas  $\beta$ -glicosidases. Os segmentos de DNA que codificam as enzimas selvagem e mutantes foram clonados em plasmídeo de expressão pLATE51 e as enzimas recombinantes expressas em Escherichia coli BL21(DE3). Foram purificadas com sucesso as enzimas selvagens e duas mutantes de bgITm, denominadas T1 e T2, que possuem 2 e 4 mutações respectivamente em resíduos interface inter-metades. Para confirmar o enovelamento destas proteínas na recombinantes foi empregada a análise de estruturas secundárias por dicroísmo circular, também o espectro de fluorescência intrínseca de triptofano e sua supressão por acrilamida e finalmente foram determinados parâmetros cinéticos. Observou-se que não houve mudanças significativas na exposição dos triptofanos das proteínas recombinantes, sugerindo que se encontram enoveladas, o que está de acordo com a observação de que as proteínas recombinantes mantêm sua atividade catalítica. Já pela análise de dicroísmo circular concluiu-se que a mutante T1 possui dobramento semelhante à selvagem bglTm e que T2 apresenta diferenças significativas, sendo as porcentagens de  $\alpha$ -hélice de 21%, 22% e 10% para bglTm, T1 e T2, respectivamente. Em seguida demonstrou-se que T1 mantém a termo estabilidade semelhante à selvagem, enquanto que T2 tem termo estabilidade reduzida, apresentando  $k_{obs}$  de 0,3 min<sup>-1</sup> em 80°C e de 0,06 min<sup>-1</sup> em 75 °C.. O cálculo de  $T_m$  através de Differential Scanning Fluorimetry foi feito para bglB e T2 (42 e

81.7 °C respectivamente), enquanto que bglTm e T1 mantiveram-se estáveis na faixa de temperatura analisada (até 95°C). Na análise do efeito da temperatura sobre a estrutura das mutantes T1 e T2 não se observou nenhuma evidência da presença dos dois supostos domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>. A análise da desnaturação por cloreto de guanidina mostrou que o c<sub>50</sub> diminuiu para T2 (2,4 M), mas não mostrou alteração para T1 (4,5 M) em comparação à bglTm (4,3 M). Coerentemente, a estabilidade da enzima selvagem e de T1 na ausência de desnaturante é a mesma ( $\Delta G_{H_2O} = 5,2$  kcal/mol), mas se reduziu para a T2 ( $\Delta G_{H_2O} = 3,5$  kcal/mol). Os cálculos do parâmetro *m* mostraram uma cooperatividade semelhante na desnaturação de bglTm, T1 e T2, não evidenciando independência entre os dois supostos domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>. Em conclusão, a análise estabilidade da  $\beta$ -glicosidase bglTm frente à temperatura e ao cloreto de guanidina não revelaram a presença dos domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> que correspondem às metades N- e C-terminal desta  $\beta$ -glicosidase.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glicosidases; Glicosil-hidrolase 1; enzimologia; barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>; estabilidade de proteínas

#### ABSTRACT

Almeida V.M. **Domains identification on GH1 β-glucosidases through stability analysis.** 2016. 72p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

**Introduction and Aims:** β-glucosidases from the family GH1 of the glycosil-hidrolases presents a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel folding. These proteins are usually classified as single domain, however it has been alternatively proposed that they actually are formed by two "half barrel" ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>. Thus, ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel proteins had evolved from an "half barrel" ancestor that underwent a duplication-fusion event. The general goal of this project is the search for the two putative  $(\beta/\alpha)_4$  domains, which form the N- and C-terminal ends of the  $\beta$ -glucosidase A from Thermotoga maritima (bgITm) and  $\beta$ -glucosidase B from Paenibacillus polymyxa (bglB), detecting their presence through the thermal and chemical stability of these  $(\beta/\alpha)_8$ barrel proteins. Results: Site-directed mutagenesis was employed to replace residues forming non-covalent interaction between the putative  $(\beta/\alpha)_4$  domains. DNA segments coding for bglB, bglTm and mutant bglTm were cloned into the pLATE51 expression vector and produced as recombinant proteins in E. coli BL21(DE3). The bglB, bglTm and two mutant bgITm, hereafter called T1 and T2, with 2 and 4 mutations respectively on residues in the interface between the protein halves, were purified. They were stable folded as shown by detecting their catalytic activity upon two different substrates and also by circular dichroism (CD) and tryptophan fluorescence analysis. Nevertheless, T2 showed a decrease in the  $\alpha$ -helix content (10 %) in the CD analysis, whereas bgITm and T1 are similar (22 %). The wild-type bgITm and T1 are thermostable, whereas T2 was inactivated after pre-incubation at high temperature ( $k_{obs} = 0.3 \text{ min}^{-1}$  at 80 °C and 0.06 min<sup>-1</sup> at 75 °C). The Differential Scanning Fluorimetry experiments revealed T<sub>m</sub> of 42 e 81.7 °C for bglB and T2, respectively, whereas wild-type bgITm and mutant T1 did not showed any thermal transition up to 95 °C. Indeed, the analysis of the thermal stability of T1 and T2 did not reveal any evidence of the putative  $(\beta/\alpha)_4$  domains. Following that, the analysis of the protein denaturation by guanidine hydrochloride showed that the c<sub>50</sub> for T2 was reduced (2.4 M), whereas no modification was observed for bgITm and T1 (4,3 and 4,5 M, respectively). In agreement the stability of bgITm and T1 ( $\Delta G_{H_2O} = 5.2$  kcal/mol) is similar, but it was reduced for T2 ( $\Delta G_{H_2O}$  = 3,5 kcal/mol). The *m* parameter showed a similar cooperative denaturation for wild-type bgITm and mutants T1 and T2, but no evidence of the independent unfolding of the putative  $(\beta/\alpha)_4$  domains was found. **Conclusion:** In

conclusion, the analysis of the thermal and chemical stability of the bgITm did not reveal the presence of the putative  $(\beta/\alpha)_4$  domains that form the N- and C-terminal end of these  $\beta$ -glucosidase.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase; glycosyl-hidrolase 1; enzimology;  $(\beta/\alpha)_8$  barrel; stability of proteins.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- GH Glicosil Hidrolases
- CAZY Carbohydrate Active Enzymes
- ES Complexo enzima-substrato
- E + P Enzima mais Produto
- NP para-nitrofenil
- Glc Glicosídeo
- TIM Triose Fosfato Isomerase
- bglTm Beta glicosidase A de Thermotoga maritima
- bglB Beta glicosidase B de Paenibacillus polymyxa
- LB Luria Broth ou meio de cultura Luria
- DO Densidade óptica
- rpm Rotações por minuto
- IPTG isopropil-beta-D-tiogalactosídeo
- Ni-NTA Resina de agarose carregada com níquel
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PNPG para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosídeo
- PNPF para-nitrofenil-beta-D-fucopiranosídeo
- T<sub>m</sub> Temperatura de melting ou temperatura de transição
- DSF Differential scanning fluorimetry ou varredura de fluorimetria diferencial
- CD Circular Dichroism ou dicroísmo circular
- CP6 Tampão citrato fosfato, pH 6
- His-tag Cauda de histidina
- [S] Concentração de substrato
- ua Unidades arbitrárias

1.	Introdução	10
	1.1. β-glicosidases	10
	1.2. Domínios em (β/α)	13
	1.3. Enzimas modelo nesta dissertação	17
2.	Objetivos	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
	3.1. Cepas	. 21
	3.2. Meios de cultura	21
	3.3. Construção de vetores de expressão para β-glicosidases selvagens e mutantes.	21
	3.4. Produção de células competentes com cloreto de cálcio	24
	3.5. Transformação de <i>E. coli</i> BL21(DE3) por choque térmico	24
	3.6. Expressão de proteínas recombinantes em bactérias	. 24
	3.7. Purificação de enzimas recombinantes	. 25
	3.8. Determinação de atividades $\beta$ -glicosidásicas	. 26
	3.9. Determinação da concentração de proteínas	. 26
	3.10. SDS-PAGE	. 27
	3.11. Western blotting	. 27
	3.12. Analise estrutural das $\beta$ -glicosidases recombinantes	. 27
	3.13. Cinética de inativação térmica de β-glicosidases recombinantes	30
	3.14. Determinação de T <sub>m</sub> para $\beta$ -glicosidases recombinantes	30
	3.15. Desnaturação por cloreto de guanidina e calculo do parametro m	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
	4.1.Construção das $\beta$ -glicosidases mutantes	32
	4.2. Clonagem dos segmentos de DNA que codificam as enzimas mutantes	40
	4.3. Expressão e purificação das enzimas selvagens	42
	4.4. Expressão e purificação das enzimas mutantes	43
	4.5. Cálculo de parâmetros cinéticos para as β-glicosidases selvagens e mutantes	48
	4.6. Análise das $\beta$ -glicosidases selvagens e mutantes por dicroísmo circular	52
	4.7. Análise da estrutura das $\beta$ -glicosidases por fluorescência intrínseca do triptofanc	55
	4.8. Cinetica de inativação termica	57
	4.9. Determinação de Tm por dicroismo circular para as $\beta$ -glicosidases	63
	4.10. Determinação de 1 m por <i>Differential Scanning fluorimetry</i> para as β-glicosidase	S 65
	4.11. Desnaturação por cioreto de guanidina e calculo do parametro m	67
E		70
э.		1 Z

## SUMÁRIO

#### Introdução

#### 1.1- $\beta$ -glicosidases

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas encontradas em todos os tipos de seres vivos, realizando a hidrólise de ligações glicosídicas na posição beta entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e outra molécula. Na maioria dos casos a hidrólise é catalisada por dois resíduos de aminoácidos ácidos, sendo um doador de próton e o outro nucleófilo (Davies e Henrissat, 1995). Na maioria dos exemplares desta classe, sua ação consiste em remover o monossacarídeo terminal não redutor de uma ligação  $\beta$ -glicosídica (Cairns e Esen, 2010), mas existem casos em que a enzima possui atividade de transglicosilação (Goyal *et al.*, 2002). A interação entre resíduos catalíticos e as regiões glicone (carboidrato) e aglicone dos substratos já foi intensivamente estudado em algumas famílias dessa classe de enzimas (Marana, 2006).

Em bactérias e fungos, β-glicosidases participam de um complexo enzimático responsável pela degradação da celulose. Especificamente, degradam oligossacarídeos de cadeia pequena e a celobiose, que são produtos da ação de endoglucanases e celobiohidrolases (Cairns e Esen, 2010)

Algumas plantas e insetos possuem glicosídeos, que quando ingeridos por predadores e hidrolisados por β-glicosidases liberam compostos cianogênicos, servindo assim como um mecanismo de defesa para esses organismos (Esen, 1993). Em plantas, sua função também inclui a produção de fito-hormônios, produção de pigmentos e desenvolvimento da semente (Bhatia, Mishra e Bisaria, 2002).

Em humanos, β-glicosidases estão presentes em várias etapas do metabolismo de glicolipídeos e glicosídeos dietéticos, sinalização celular e

degradação de glicolipídeos nos lisossomos. A deficiência de β-glicosidase lisossomal leva ao surgimento da doença de Gaucher, cujo principal tratamento é a reposição enzimática (Grace *et al.*, 1994).

β-glicosidases são utilizadas na conversão de biomassa em biocombustíveis (Singhania *et al.*, 2013). Esse processo é feito utilizando enzimas isoladas e organismos fermentadores. Inicia-se com uma endoglucanase, que hidrolisa ligações internas da celulose gerando extremidades acessíveis a ação da segunda classe de enzimas do processo, as celobiohidrolases, que a partir dessas extremidades geram o produto celobiose. A celobiose, finalmente, é degradada por β-glicosidases formando duas moléculas de glicose. Um dos fatores que potencializam a importância das β-glicosidases neste processo é o fato da celobiose ser um inibidor de endoglucanase e de celobiohidrolases (Lynd *et al.*, 2002).

#### 1.1.1 - Classificação

As β-glicosidases (EC 3.2.1.21) são encontradas em sete classes de glicosil hidrolases (GH) de acordo com o banco de dados *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZY), são elas: GH1, GH2, GH3, GH5, GH9, GH30 e GH116. A classificação das glicosil hidrolases é feita baseada na similaridade da sequência de aminoácidos (Henrissat, 1991), e consequentemente, enzimas pertencentes à mesma família possuem o mesmo dobramento terciário. As glicosil hidrolases podem também ser divididas em clãs de acordo com a estrutura terciária, um exemplo disso é o clã A (GH1, GH2, GH5, GH10, GH17, GH26, GH30, GH35, GH42, GH50, GH51, GH53, GH72, GH79, GH86, GH113 e GH128) composto por enzimas que possuem o dobramento de barril (β/α)<sub>8</sub>. O foco desse trabalho são as β-glicosidases da família GH1, que contém atualmente 115 enzimas de Archaea, 9314 de Bacteria, 965 de Eukaria e 1 de vírus (CAZy)..

#### 1.1.2 - Mecaniso de catálise da família GH1

#### 1.1.2.1 - Hidrólise

A reação de hidrólise realizada por essas enzimas ocorre pelo mecanismo de retenção da configuração, em que carboidrato liberado como produto final da reação possui a mesma estereoquímica do substrato em que ele pertencia. A hidrólise é dividida em duas etapas, a de glicosilação e a de desglicosilação (Figura 1). Na primeira etapa ocorre a interação da enzima livre com o substrato, formando um intermediário covalente que é hidrolisado na segunda etapa, liberando o produto. O ácido carboxílico da cadeia lateral de dois glutamatos posicionados no sítio ativo está envolvido nessa reação, um atuando como ácido/base catalítico e outro como nucleófilo (Cairns e Esen, 2010)





#### 1.1.2.2 - Transglicosilação

Além da rota de hidrólise, algumas β-glicosidases possuem a capacidade de transglicosilar. Após a formação do intermediário covalente, ao invés da molécula de

água quebrar a ligação enzima-substrato e regenerar a enzima, uma segunda molécula de substrato pode se ligar a esse intermediário, formando um produto de transglicosilação. A figura 2, adaptada de Frutuoso e Marana (2013), esquematiza as duas rotas.



Figura 2: Esquema representando as rotas de hidrólise e de transglicosilação de  $\beta$ -glicosidases. Enzima (E) se liga ao substrato *p*-nitrofenil beta-glicosídeo (Glc-NP), formando um intermediário covalente e a liberação do primeiro produto para-nitrofenil (NP). Após, a água pode reagir causando hidrólise e a liberação do segundo produto glicosídeo (Glc) e regenerando a enzima, ou pode haver a adição de um segundo substrato e formando outro produto diferente, o glicosídeo-glicosídeoparanitrofenil (Glc-Glc-NP). Adaptado de Frutuoso e Marana (2013).

#### 1.2- Domínios em $(\beta/\alpha)_8$ barris

Domínios são regiões de uma proteína que possuem todas as interações necessárias para se enovelar de forma estável e independente (Poter e Rose, 2012). Os dois bancos de dados mais utilizados para a classificação de domínios são CATH (Orengo *et al.*, 1997) e SCOP (Murzin *et al.*, 1995), e ambos se baseiam em algoritmos computacionais para a determinação de domínios, porém utilizam a observação visual como julgamento final (Porter e Rose, 2012). A dependência da intuição visual introduz muitas ambiguidades, pois é impossível determinar visualmente se uma região de determinada proteína é capaz de se enovelar de forma independente e estável. Devido a essa ambiguidade, é possível encontrar

exemplos em que a quantidade de domínios apresentado por um banco de dados difere do outro (Bruning e Shamoo, 2004).

Recentemente foi desenvolvido um método de determinação de domínios que se baseia na estabilidade termodinâmica relativa de segmentos proteicos *in situ* e incisados (Porter e Rose, 2012). Nesta definição, domínio é um segmento contíguo de uma proteína que possui a mesma estabilidade, avaliada pelo  $\Delta\Delta G$  da transferência de água para ureia, quando se encontra isolado ou no interior da estrutura proteica, contendo assim todas as interações necessárias para se enovelar. Neste trabalho de Porter e Rose, 8 das 9 classes de proteínas estudadas resultaram em uma quantidade de domínios superior a relatada pelos banco de dados SCOP e CATH, sendo uma dessas o barril TIM ou barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Figura 3). De fato, outros trabalhos também mostraram evidências de que Triose Fosfato Isomerases de coelho e *Trypanosoma brucei* podem conter dois ou até três domínios (Chanez-Cardenas *et al.*, 2002; Pan, Raza e Smith, 2004).



Figura 3: Triosefosfato isomerase (TIM) cadeia A de *Thermotoga maritima*. PDB 1B9B. Proteína com formato barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> colorido de acordo com a estrutura secundária.

Nesta mesma linha um estudo com a subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase, um barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, de *Escherichia coli* indicou que fragmentos contendo as primeiras quatro unidades  $\beta/\alpha$  tinham dobramento estável (Zitzewitz *et al.*, 1999). Esta hipótese de

fato ganhou destaque com a determinação das estruturas cristalográficas de duas enzimas que catalisam reações sucessivas na biossíntese da histidina (HisA e HisF) em *Thermatoga maritima* que revelou estruturas ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barris com dois subdomínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> que se sobrepõem estruturalmente (rmsd 1,5 e 2,0 Å). Estes dados sugerem que HisA e HisF teriam evoluído a partir de um ancestral composto por um "meiobarril" ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> (Lang *et al.*, 2000). Estudos posteriores mostraram que embora as duas metades de HisF fossem estáveis e estivessem enoveladas, elas eram cataliticamente inativas. Porém, a co-expressão em bactéria ou a renaturação conjunta das metades HisF-N e HisF-C resultou num complexo estequiométrico e com atividade catalítica. Estes dados suportam o modelo de que o barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> de HisF evoluiu a partir de um meio-barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> ancestral (Hocker *et al.*, 2001).

Deste modo, os estudos de identificação de domínios (Porter e Rose, 2012), bem como de evolução (Lang *et al.*, 2000 e Hocker *et al.*, 2001), sugerem que as proteínas ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> são formadas por dois domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> que correspondem às suas metades N e C-terminal. Posteriormente, Nagano *et al.* (2002) analisaram 76 diferentes famílias de enzimas que adotam o dobramento ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barril encontrando evidências que os domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> evoluíram pela duplicação de uma unidade ( $\beta/\alpha$ )<sub>2</sub>.

Seguindo nesta linha, Höcker *et al.* (2004) simularam a evolução de um  $(\beta/\alpha)_8$  barril através da combinação dos domínios  $(\beta/\alpha)_4$  de HisF e HisA gerando o híbrido HisFA que adotou um dobramento estável. Posteriormente, Seitz *et al.* (2007) produziram a quimera HisFCC, que combina os dois domínios  $(\beta/\alpha)_4$  da metade C-terminal de HisF ligados em série. Neste trabalho com poucas mutações sítio-dirigidas na interface entre os dois domínios foi produzida uma variante de HisFCC que assumiu um dobramento estável.

Adicionalmente através de reconstrução computacional da evolução de HisF, foi proposto que a unidade ( $\beta/\alpha$ )1-2 seria o ancestral que através de uma duplicação e fusão originou o domínio ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> N-terminal que por sua vez originou o ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barril (Richter *et al.*, 2010). Ainda neste trabalho a unidade ( $\beta/\alpha$ )1-2 de HisF foi produzida como proteína recombinante e formou um tetrâmero estável através de pontes dissulfeto estrategicamente introduzidas por mutagênese. Por outro lado, trabalhando com fragmentos da Triptofano Sintetase de *E. coli*, Akanuma e Yamagishi (2011) chegaram à conclusão que a unidade central a unidade ( $\beta/\alpha$ )3-4 seria o módulo básico para formação deste ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barril.

Finalmente, baseando-se em observações experimentais da existência de  $(\beta/\alpha)_8$  barril parciais estáveis e cataliticamente ativos onde "faltam" unidades  $(\beta/\alpha)_2$ , Setiyaputra *et al.* (2011) propuseram que as proteínas  $(\beta/\alpha)_8$  barril evoluíram a partir de um "pool" de diferentes unidades  $(\beta/\alpha)_2$ , quartos de barril, que por combinação e fusão originaram domínios  $(\beta/\alpha)_4$ , os quais por sua vez deram origem à  $(\beta/\alpha)_8$  barris homogêneos (como HisF e HisA) e heterogêneos (Triptofano Sintetase).

Aliando-se a abordagem termodinâmica (Porter e Rose, 2012) e evolutiva (Lang *et al.*, 2000 e Hocker *et al.*, 2001) para definição dos domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>, Smith *et al.* (2012) buscando desenvolver um método computacional para construção de  $\beta$ -glicosidases GH1 quiméricas com propriedades interessantes do ponto de vista biotecnológico, notaram que o "bloco mínimo" para quimerogênese destas enzimas era o meio-barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>. É importante notar que estes autores chegaram a esta conclusão por uma via totalmente independente das abordagens acima. De fato, a estrutura de diferentes  $\beta$ -glicosidases GH1 foi representada com uma rede de contatos entre resíduos e buscaram-se os pontos em que esta rede podia ser cortada rompendo o menor número possível de contatos. Em suma, o "bloco

proteico" a ser retirado mantinha a maior parte de seus contatos internos, sem obrigatoriedade de ser um segmento contínuo da proteína. Nota-se que esta definição e a de "domínio termodinâmico (Porter e Rose, 2012) são convergentes, embora empreguem linguagem distinta. De fato, ambos métodos chegaram a conclusão que  $\beta$ -glicosidases GH1, ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barris, são compostas por dois domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> que correspondem aos meio-barris N- e C-terminais.

Considerando que os domínios  $(\beta/\alpha)_4$  sejam termodinamicamente independentes e estáveis como sugerem os estudos de identificação de domínios, as propriedades da proteínas  $(\beta/\alpha)_8$  barril devem resultar de uma combinação das propriedades individuais de cada domínio. Teoricamente as interações não covalentes inter-domínios seriam a base física para combinação destas propriedades individuais, ou seja, através destas interações os domínios se influenciam mutuamente, gerando as propriedades gerais da proteína. Contudo, a real contribuição das interações inter-domínios e os princípios desta "combinação" não são conhecidos.

#### 1.3 – Enzimas modelo nesta dissertação

As β-glicosidases empregadas como modelos experimentais nesta dissertação são enzimas que pertencem a família 1 das glicosídeo hidrolases (GH1). Especificamente a β-glicosidase A (GH1) da bactéria termófila *Thermatoga maritima* (bglTm; Uniprot: Q08638; PDB: 10D0; 446 resíduos) foi intensamente estudada quanto à relação de sua estrutura com a afinidade por inibidores e também se mostrou estável por até 4 h a 80 °C (Zechel *et al.*, 2003; Gloster *et al.*, 2006). Acredita-se que bglTm esteja relacionada à degradação de celulose. A β-glicosidase B (GH1) produzida pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* (bglB, Uniprot: P22505; PDB: 209P; 448 resíduos) localiza-se majoritariamente no periplasma e tem

preferência por celobiose e oligocelodextrinas, sendo assim relacionada à hidrólise de oligocelodextrinas derivadas de celulose (González-Candelas *et al.*, 1989; Isorna *et al.*, 2007). bglB é homóloga à bglA, também de *P. polymyxa* (45% de identidade), que se inativa em 20 min quando mantida à 48 °C (Lopes-Camacho *et al.*, 1996). Assim, ambas enzimas, bglTm e bglB, possuem tamanho semelhante e adotam um dobramento do tipo ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barril. A sequência primária e secundária é mostrada nas figuras 4 e 5.



Figura 4: Sequência primária e representação esquemática das estruturas secundárias da proteína bglB de *Paenibacillus polymyxa*, PDB 2O9P. Legenda: Folha beta; Volta; Alfa hélice; Ponte dissulfeto; Hélice 3/10; Ponte beta. Baseado no PDB 2O9P disponível em RCSB Protein Data Bank.



Figura 5: Sequência primária e representação esquemática das estruturas secundárias da proteína bgITm de *Thermotoga maritima*, PDB 1OIN. Legenda: Folha beta; Volta; Volta; Alfa hélice; Fonte dissulfeto; Hélice 3/10; Ponte beta. Baseado no PDB 1OIN disponível em RCSB Protein Data Bank.

#### 2 - Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é investigar a existência de dois domínios  $(\beta/\alpha)_4$ , as metades N- e C-terminal, na estrutura  $(\beta/\alpha)_8$  barril da  $\beta$ -glicosidases A de *Thermotoga maritima* e  $\beta$ -glicosidase B de *Paenibacillus polymyxa* através da análise da desnaturação térmica e química destas enzimas.

Para atingir o objetivo acima serão usadas como modelos experimentais as formas selvagens da  $\beta$ -glicosidase bglA de *Thermatoga maritima*, denominada **bgITm** neste trabalho, (bactéria termófila; Zechel *et al.*, 2003), bglB de *Paenibacillus polymyxa*, denominada **bglB** neste trabalho, (bactéria mesófila; Isorna *et al.* 2007) e mutantes construídos de modo a remover interações não-covalentes entre os dois potenciais domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub>, metades N- e C-terminal, destas  $\beta$ -glicosidases.

#### 3 - Materiais e Métodos

#### 3.1 – Cepas

Para a preparação das construções de DNA plasmidial foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* XL-1 *Blue*. Já para a expressão das proteínas selvagens e mutantes foi utilizado a cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3).

#### 3.2- Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram o Luria Broth (LB) e o Luria Broth Agar (LB-ágar) distribuídos pela HIMEDIA®. A preparação foi feita de acordo com o fabricante, que consistem em adicionar 20 g do meio em 1 litro de água para o LB e 35 g do meio em 1 litro de água para o LB-ágar. As concentrações finais dos reagentes são: 10 g/L de caseína, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de cloreto de sódio para o meio LB, e as mesmas concentrações, acrescida em 15 g/L de ágar para o LB-ágar. Os meio foram autoclavados após a sua preparação.

# 3.3 – Construções dos vetores de expressão para β-glicosidases selvagens e mutantes

Os segmentos de DNA que codificam β-glicosidase A de *Thermotoga maritma* (bglTm), β-glicosidase B de *Paenibacillus polymyxa* (bglB) e os mutantes foram adquiridos junto a empresa Genescript® e subclonados no vetor de expressão pLATE51 (ThermoScientific®). (Figura 6).



Figura 6: Mapa do vetor pLATE51

#### 3.3.1- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas de interesse adquiridas junto à GeneScript são fornecidas em plasmídeo pUC57. Para a amplificação das sequências correspondentes às enzimas recombinantes foi feito PCR em termociclador Veriti® (Applied Biosystems), utilizando os *primers* (iniciadores) da tabela 1. A DNA polimerase utilizada para amplificação foi a *PfuUltra hotstart DNA polymerase* (Agilent Technologies). A desnaturação do DNA foi feita a 95 °C, o anelamento dos *primers* a 62 °C e a polimerização do DNA a 72 °C. Foram feitos 20 ciclos de amplificação.

A mistura de reação de amplificação teve a seguinte composição:

- 5,0 µL de *PfuUltra HF reaction buffer*
- 1,0 µL da mistura de dNTP 10 mM
- 0,5 µL do iniciador sense 100 µM
- 0,5 μL do iniciador antisense 100 μM
- 1,0 μL de DNA (10-100 ng/μL)
- 1,0 µL da enzima PfuUltra Hotstart DNA Polymerase;
- H<sub>2</sub>O qsp 50 μl

Tabela 1: Primers utilizados para amplificar as enzimas selvagens (bgIB ebgITm) e seus mutantes.

Nome	Sequência
bgIB 5N	5' GGTGATGATGATGACAAGAGCGAGAATACCTTTATATTTCCTG 3'
bgIB 3C	5' GGAGATGGGAAGTCATTAAAACCCCGTTCTTCGCCATCAT TTG 3'
bglTm 5N	5' GGTGATGATGATGACAAGAACGTGAAAAAGTTCCCTGAAGGATTCC 3'
bglTm 3C	5' GGAGATGGGAAGTCATTATCAGTCTTCCAGACCGTTGTTTTTAAC 3'

As sequências em negrito são regiões de pareamento ao pLATE51, e o restante são regiões para pareamento específico nas sequências codificadoras das enzimas.

#### 3.3.2 – Eletroforese em gel de agarose 2%

Eletroforeses em gel de agarose 2 % (p/v) foram feitas em tampão TAE (Tris-Acetato 0,04 M e EDTA 2 mM, pH 8,5). A montagem do gel e a corrida foram feitas na cuba de eletroforese Horizon 58 (Whatman), aplicando corrente de 80 V por 60 min. As bandas foram visualizadas com imersão do gel em solução de brometo de etídio 0,5 µg/ml por 15 min seguida por colocação sobre luz UV (312nm) em um transiluminador. Quando foi necessário, para a extração da banda de interesse do gel de agarose foi utilizado o *kit* "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega Corporation®).

#### 3.3.3 – Ligação no pLATE51.

Para gerar as extremidades de fita simples nos produtos de PCR previamente extraídos de gel de agarose, as quais são necessárias para pareamento no vetor pLATE51, que é um plasmídeo do tipo LIC (Clonagem independente de ligação), estes produtos foram incubados por 5 min com T4 DNA polimerase em um meio de reação contendo apenas dGTP como nucleotídeo. Nessas condições, a T4 tem atividade de 3'-5' exonuclease até a primeira ocorrência de citosina na fita complementar. Para pareamento, o produto dessa reação foi incubado com o plasmídeo pLATE51 por 5 min a temperatura ambiente. O

plasmídeo resultante desta incubação foi transformado em XL-1 Blue (como é descrito no item 3.3). A partir das colônias transformadas esse DNA plasmidial foi posteriormente extraído utilizando o *kit* "Wizard Plus SV minipreps DNA purification system" (Promega Corporation).

#### 3.4 – Produção de células competentes com cloreto de cálcio

Um pré-inóculo do estoque de *E. coli* BL21(DE3) foi crescido overnight a 37°C em meio de cultura LB líquido com adição de tetraciclina 15 µg/ml. Este foi vertido em um erlenmeyer de 2 L contendo 500 ml de LB com a mesma concentração de tetraciclina do pré-inóculo. O meio de cultura foi então incubado em *shaker* com velocidade 150 rpm e temperatura 37 °C até atingir DO (densidade ótica) em comprimento de onda de 600 nm entre 0,3 e 0,5. Essa cultura foi então centrifugada e ressuspendida 5 vezes em cloreto de cálcio 0,1 M gelado. Posteriormente as alíquotas de bactérias competentes foram armazenadas em solução de cloreto de cálcio 0,1M com 15 % de glicerol a -80 °C.

#### 3.5 – Transformação de *E. coli* BL21(DE3) por choque térmico

O plasmídeo codificando as proteínas de interesse foi incubado por 30 min em gelo junto com bactérias BL21(DE3) competentes, seguido de um choque térmico a 42 °C em banho-maria por 20 s, e posteriormente voltando para o gelo por 3 min. As bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo LB-ágar com ampicilina 50 μg/ml para seleção e incubadas por 16 horas em estufa a 37 °C.

#### 3.6 – Expressão de proteínas recombinantes em bactérias

A indução da expressão das enzimas recombinantes foi feita em células *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). Inicialmente foi preparado um pré-inóculo em 5 mL de meio LB com ampicilina (50 µg/mL) com uma colônia previamente transformada com o vetor de expressão codificando a enzima de interesse. Este pré-inóculo foi então

incubado a 37 °C por 12 h a 150 rpm. Após este período, o pré-inóculo foi adicionado a 500 mL do mesmo meio com antibiótico, voltando a ser incubado nas mesmas condições até atingir uma densidade óptica em 600 nm entre 0,4 e 0,6. Ao atingir valores neste intervalo foi adicionado IPTG 1 mM (isopropil-β-D-tio-galactosídeo em água) como indutor da expressão da proteína recombinante. A seguir as células foram incubadas a 20 °C por 24 h a 150 rpm. Terminado este período, as células foram sedimentadas por centrifugação por 30 min a 7.000 xg, 4°C, e congeladas a -20°C.

#### 3.7 – Purificação de enzimas recombinantes

#### 3.7.1. Lise das bactérias induzidas.

O sedimento das bactérias induzidas a expressar enzimas de interesse foi ressuspenso em 5 mL de tampão de lise (fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; NaCl 100 mM; imidazol 20 mM). Após o período de incubação de 45 min em temperatura ambiente sob leve agitação, a suspensão foi sonicada (4 ciclos de sonicação de 15 s em "output" 3 em um Sonicador Branson com intervalos de 3 min de incubação em gelo). Na sequência, o material lisado foi centrifugado a 7.000 xg, 4 °C por 30 min para eliminar os fragmentos de bactérias lisadas.

#### 3.7.2. Sedimentação por afinidade com resina Ni-NTA.

Cada 1 mL de sobrenadante do lisado foi incubado com 300 µL de resina de Ni-NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada com tampão de lise. Foram realizadas 5 lavagens com 750 µL de tampão de lise por centrifugação 13.200 xg por 1 min. As proteína ligadas á resina foram eluídas com a adição de 200 µL de tampão de lise acrescido de 500 mM de imidazol seguida incubação por 30 min em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante. Posteriormente, a amostra eluída com imidazol foi submetida à cromatografia em coluna "fast-

desalting" de 5 ml (HiTrap desalting column – GE Healthcare) equilibrada com tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0 ou tampão fosfato de potássio 20mM pH 7,0, quando necessário.

#### 3.7.3. Cromatografia de troca iônica em sistema FPLC

Quando somente a sedimentação por afinidade não foi suficiente para a purificação da enzima recombinante, fez-se necessária a realização de um método adicional de purificação, sendo então utilizada a cromatografia de troca iônica com coluna Mono Q<sup>™</sup> 5/50 GL em sistema *Fast protein liquid chromatography* (FPLC). Os tampões HEPES 20 mM pH 7,0 (Tampão A) e HEPES 20 mM pH 7,0 com NaCl 1 M (Tampão B) foram utilizados em um gradiente de 20 até 80% do tampão B para a separação e eluição das proteínas. Foi empregado um fluxo de 1 ml/min e frações de 0,4 ml foram coletadas. A fração contendo a enzima de interesse foi identificada por ensaio de atividade enzimática (item 3.8) e SDS-PAGE (item 3.10).

#### **3.8–** Determinações de atividade β-glicosidásica

A atividade  $\beta$ -glicosidásica foi detectada utilizando os substratos cromogênicos *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (PNPG) e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo (PNPF) em várias concentrações diferentes, preparados em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0. As misturas de reação foram incubadas a 30 °C por intervalos de tempo e em seguida a hidrólise do substrato foi interrompida com solução de carbonato de sódio 250 mM pH 11. O produto *p*-nitrofenolato formado foi detectado por meio da absorbância em 415 nm.

#### 3.9 – Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nos materiais contendo enzimas purificadas foi determinada através de absorção de luz UV (280 nm). Para tal, inicialmente foi calculado o coeficiente de extinção molar para as enzimas mutantes através do

programa "ProtParam tool" (Expasy). Em seguida, foi medida a absorbância em 280 nm de alíquotas das amostras de enzimas previamente misturadas na proporção 1:10 em uma solução desnaturante (tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,5 com cloreto de guanidina 6 M).

#### 3.10 – SDS-PAGE

Eletroforeses em gel de poliacrilamida 12 % na presença de SDS 0,1% (SDS-PAGE) foram executadas segundo Laemmli (1970). As amostras contendo proteínas (10 µL) juntamente com 10 µL de tampão de amostra (tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2,5% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,36 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0,05 % (p/v)) foram previamente fervidas por 10 min. A coloração dos géis foi feita com Comassie Blue R-250 0,1% (p/v) preparado em uma solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

#### 3.11 – Western Blotting

A separação das proteínas foi feita seguindo o protocolo de SDS-PAGE do item 3.8. Então, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose Trans-Blot® (Bio-Rad) em equipamento *Trans-Blot® Semi-dry transfer cel (*Bio-Rad) por 30 min em 15 V. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado (5 %; p/v) preparada em tampão TBS (tris-HCI 50 mM e NaCl 150 mM) para bloqueio. Posteriormente a membrana foi incubada com o anticorpo Penta-his HRP conjugate (Qiagen®) também preparado na solução de leite desnatado citada acima. Finalmente as proteínas reconhecidas pelo anticorpo foram detectadas como o *kit* Opti-4CN<sup>™</sup> (Bio-Rad), específico para atividade de fosfatase alcalina que se encontra covalentemente ligada ao anticorpo.

#### **3.12 – Análise estrutural das β-glicosidases recombinantes**

#### 3.12.1 - Coleta de espectros de fluorescência intrínseca de proteínas

Espectros de fluorescência dos resíduos de triptofano das proteínas foram coletados a 30 °C com excitação em 295 nm e emissão em uma faixa de 305 até 400 nm. Foi empregado um espectrofluorímetro F4500 Hitachi ajustado com abertura de fenda (slit; ex/em) de 5,0/5,0 nm, velocidade de varredura de 30 nm/min e tempo de integração de 1 s. A amostra foi mantida termostatizada em cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm e todas as faces transparentes.

## 3.12.2 - Supressão de fluorescência intrínseca de proteínas por acrilamida

Espectros de emissão de fluorescência proteica foram coletados segundo descrito no item anterior na presença de concentrações crescentes (até 0,5 M) de acrilamida. O efeito supressor foi analisado por meio da razão da intensidade de emissão máxima na ausência de supressor sobre a emissão máxima na presença da acrilamida ( $F_0/F$ ) plotada em função da concentração de acrilamida (Eftink e Ghiron, 1976). A constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) calculada a partir destes gráficos indicou o grau de acessibilidade dos resíduos de triptofano ao supressor acrilamida. A equação 1 descreve este fenômeno.

Equação 1:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \text{Ksv} [Q]$$

F<sub>0</sub> é a intensidade de emissão máxima na ausência do supressor; F é a intensidade de emissão máxima na presença do supressor (acrilamida); Ksv a constante de Stern-Volmer e [Q] a concentração do supressor (acrilamida).

#### 3.12.3 – Determinação de parâmetros cinéticos (Km e kcat)

A partir das amostras de enzimas purificadas foram determinadas as velocidades iniciais de hidrólise de diferentes concentrações do substrato. O conjunto de dados de velocidade inicial (nmols de produto gerado/min) *versus* a

concentração de substrato (mM) foi ajustado na equação de Michaelis-Menten, quando a enzima mostrou padrão michaeliano, e alternativamente na equação modificada para contemplar o direcionamento de parte de população de enzimas para catálise de reação de transglicosilação, (equação 2), quando a enzima não mostrou padrão michaeliano típico. Nesta equação K<sub>B</sub> refere-se à ligação de uma segunda molécula do substrato para formação de um complexo envolvido na reação de transglicosilação. Para estes ajustes foi utilizado o programa Enzfitter (Leatherbarrow R.J., Elsevier – Biosoft, 1987), que permitiu a determinação do K<sub>m</sub> e  $k_{cat}$ .

Equação 2:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S] (1 + \frac{K_s}{K_B} + \frac{[S]}{k_B})}$$

 $v_0$  é a velocidade inicial;  $V_{max}$  a velocidade máxima; [S] a concentração de substrato;  $K_s$  a constante de dissociação do primeiro substrato e  $K_B$  se refere a ligação do segundo substrato.

#### 3.12.4 – Determinação de espectros de dicroísmo circular

Espectros de dicroísmo circular das β-glicosidases recombinantes foram coletados na faixa de 190 a 240 nm (UV distante e próximo) em um espectropolarímetro Jasco J-815 A (Central Analítica do IQUSP) com amostras preparadas em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 na concentração de 0,5 a 2 μM em cubetas circulares ou retangulares com caminho ótico de 0,1 cm. A velocidade de varredura foi de 60 nm/min, tempo de resposta de 8 s e abertura de fenda de 1 nm. Os dados coletados após 8 acumulações foram tratados para cálculo da média e linha de tendência no software Origin 7.0 e o conteúdo de elementos de

estrutura secundária foi previsto com o software K2D3 (Louis-Jeune, Andrade-Navarro e Perez-Iratxeta, 2012).

#### **3.13 – Cinética de inativação térmica de β-glicosidases recombinantes**

# 3.13.1 - Cinética de inativação térmica acompanhada pela atividade enzimática

Para determinação da estabilidade térmica, amostras das  $\beta$ -glicosidases selvagem e mutantes foram incubadas a 47 °C, sendo retiradas alíquotas após 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 min. Com estas alíquotas foram feitos ensaios de atividade enzimática a 30 °C utilizando *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo 8 mM em tampão citrato fosfato 100 mM pH 6. Os ensaios foram interrompidos pela adição de 0,1 mL de solução carbonato de sódio 250 mM pH 11, detectando-se a absorção do *p*-nitrofenolato em 415 nm. Em seguida foram construídos gráficos de logaritmo da porcentagem de atividade enzimática remanescente em função do tempo de inativação (Segel, 1993), a partir dos quais pode ser avaliada a constante de velocidade de inativação ( $k_{obs}$ ).

#### 3.14 – Determinação de $T_m$ para $\beta$ -glicosidases recombinantes

#### 3.14.1 - Determinação de T<sub>m</sub> por "Differential Scanning Fluorimetry"

A temperatura de transição de desnaturação ( $T_m$ ) foi determinada para as  $\beta$ glicosidases recombinantes utilizando "varredura de fluorimetria diferencial" (DSF) (Pantoliano *et al.*, 2001). Foi empregada 1,6 µg de  $\beta$ -glicosidase em tampão fosfato de potássio 20mM pH 7,0 completando o volume de reação para 22,5 µL com água aos quais foi acrescentado 2,5 µL de corante SyproOrange® (Sigma-Aldrich) previamente diluído 100x. As amostras foram submetidas a um gradiente crescente de temperatura entre 25°C e 95°C em um equipamento de gRT PCR (Applied Bioscience ABI7500) no modo de "*melting temperature*". As leituras de fluorescência foram coletadas com o filtro para o corante Syber Green.

#### 3.14.2 – Determinação de *T*<sub>m</sub> por espectros de dicroísmo circular

As medidas de elipsidade a 222 nm, 215 nm e 208nm ( $[\theta]_{220nm}$ ,  $[\theta]_{215 nm}$  e  $[\theta]_{208nm}$ ) foram utilizadas como indicadores da desnaturação proteica. A estabilidade estrutural das proteínas foi analisada na faixa de temperatura de 20 °C a 90 °C com incrementos variáveis de acordo com a estabilidade da proteína. Medidas de elipsidade do tampão (branco) foram tomadas na menor e maior temperatura para garantir a estabilidade de leitura do equipamento.

#### 3.14.3 – Cálculo de *T*<sub>m</sub>

Para calcular o valor de  $T_m$  a partir dos gráficos de DSF e CD foi utilizada a equação 3.

Equação 3

$$y = (B_1 + B_2 * X) + \frac{(A - (B_1 + B_2 * X))}{(1 + Exp\left(\frac{(X - X_0)}{dx}\right)}$$

Em que A corresponde ao sinal na região de pré-transição, B1 e B2 descrevem o sinal na região pós-transição,  $X_0$  à temperatura de transição de desnaturação ( $T_m$ ), dx descreve a inclinação na região de transição, X é a temperatura e y é o sinal de fluorescência ou elipsidade molar experimental. Nota-se que essa equação considera a região de pré-transição sem inclinação (paralela ao eixo x).

#### 3.15 – Desnaturação por cloreto de guanidina e cálculo do parâmetro m

O espectro de fluorescência intrínseca das proteínas recombinantes foi acompanhada em fluorímetro Hitachi 4500 na presença de diferentes concentrações do desnaturante cloreto de guanidina (0 M; 0,36 M; 0,72 M; 1,1 M; 1,45 M; 1,8 M;

2,18 M; 2,54 M; 2,9 M; 3,27 M; 3,63 M; 4 M; 4,36 M; 4,72 M; 5,1 M; 5,45 M; 5,8 M; 6,18 M; 6,54 M; 6,9 M; 7,27 M) preparadas em tampão CP6. Para tal foi usada uma solução estoque de cloreto de guanidina 8M preparada em tampão CP6. A fluorescência foi acompanhada com excitação em 295nm e espectro de emissão entre 305 e 420 nm. Para a construção dos gráficos de % de proteína nativa em função da concentração de desnaturante foram utilizadas as leituras de fluorescência no comprimento de onda máximo encontrado no espectro coletado na presença de 7,0 M de cloreto de guanidina. Para confirmação dos parâmetros obtidos, ajustes foram repetidos empregando como referência a leitura de fluorescência no  $\lambda$  máximo na ausência de desnaturante.

Para calcular os parâmetros que descrevem a desnaturação proteica foi utilizada a equação 3, porém neste caso  $x_0$  é a concentração de transição de desnaturação ( $c_{50}$ ) e x é a concentração de desnaturante (M) e y é o sinal de fluorescência. A partir de dx foi calculado o parâmetro m, que descreve o efeito do desnaturante sobre a estabilidade ( $\Delta G$ ) da proteína, usando a relação dx = RT/m (Pace and Scholtz, 1997).

#### 4 - Resultados e Discussão

#### 4.1- Construção das β-glicosidases mutantes

Mutações foram planejadas a fim de tentar desfazer contatos "inter-metades" das proteínas bgITm de *Thermotoga maritma* e bgIB de *Paenibacillus polymyxa* (Figura 7).

![](_page_34_Figure_0.jpeg)

Figura 7: Esquema demonstrando uma proteína no formato barril  $(\beta/\alpha)_8$ , em que as metades N e C sao os dois potenciais domínios "meio-barris"  $(\beta/\alpha)_4$ . O esquema superior representa a proteína selvagem, e a inferior uma mutante. Os traços azuis representam interações não-covalentes que existem entre resíduos (círculos vermelhos e verdes) dos dois potenciais domínios. Círculos amarelos representam mutações feitas a fim de romper parte dessas interações.

Para planejamento das mutações foi inicialmente necessário determinar quais resíduos de aminoácidos compõem a metade N e a metade C. Para tal não foi feita uma simples divisão aritmética, mas de fato foi preciso analisar a estrutura primária e terciária de bglTm e bglB, a fim de identificar o segmento de estrutura primária contendo 4 folhas  $\beta$  e 4  $\alpha$ -hélices contíguas, os quais compõem cada metade ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> (Tabela 2 e Figura

8). Para esta análise da estrutura terciária foi utilizado o software Pymol.

Enzima	Metade N	Metade C
bglTm	1-214	215-445
bglB	1-216	217-448

Tabela 2: Definição de resíduos de aminoácidos das metades  $(\beta/\alpha)_4$  das enzimas estudadas.

![](_page_35_Figure_0.jpeg)

Figura 8: Estrutura terciária de bglTm (esquerda) e bglB (direita). A região em vermelho é a metade N-terminal, e em verde a metade C-terminal, conforme descrito na tabela 2.

Definidas as metades N- e C-terminal que compõem os potenciais domínios  $(\beta/\alpha)_4$  destas  $\beta$ -glicosidases, foi utilizado o software NanoHub (Rafferty e Martini, 2010) para obter-se um mapa de contatos destas proteínas (Figura 9) e a partir deste, construiu-se um gráfico de contatos inter-metades e intra-metades para cada proteína (Figuras 10 e 11).

![](_page_35_Figure_3.jpeg)

Figura 9: Mapa de contatos das  $\beta$ -glicosidases bglB (a) e bglTm (b) obtido através do software NanoHub. Foi utilizada a distância de até 8Å entre carbonos  $\alpha$  para definir um contato.


Figura 10: Contatos inter-metades (azul) e intra-metades (vermelho) dos resíduos de aminoácidos de bglB de acordo com o resultado do mapa de contatos da figura 9.



Figura 11: Contatos inter-metades (azul) e intra-metades (vermelho) dos resíduos de aminoácidos de bgITm de acordo com o resultado do mapa de contatos da figura 9.

Os gráficos das figuras 10 e 11 foram usados como base para analisar a distribuição espacial dos principais sítios candidatos para mutações, troca por alanina, tentando manter o seguinte critério de seleção: resíduos com maior número de contatos inter-metades, porém com menor número de contatos intra-metade. Para, dessa forma, atingir o objetivo, que é romper contatos entre as metades, sem comprometer significativamente a sua estabilidade isoladamente.

Assim, foram planejados três mutantes com diferentes números de mutações para cada uma das enzimas selvagens estudadas, e estes foram denominados T1, T2 e T3 para os mutantes de bglTm com 2, 4 e 6 mutações,

respectivamente, e B1, B2 e B3 para os mutantes de bglB com 2, 4 e 6 mutações, respectivamente. (Tabelas 3 e 4; Figura 12).

Tabela 3: Número de resíduos trocados por alanina e quantidade teórica de contatos inter-metade rompidos nos mutantes de bgIB e bgITm.

Proteína	Nome do	№ de	Contatos rompidos
	mutante	mutações	
	B1	2 resíduos	11
bglB	B2	4 resíduos	18
	B3	6 resíduos	42
	T1	2 resíduos	17
bglTm	T2	4 resíduos	22
	Т3	6 resíduos	36

O número de contatos rompidos foi baseado no mapa de contatos elaborado com critério de 8 Å entre  $C\alpha$ , complementado por inspeção das estruturas no Pymol usando como critério de contato a distância de 4 Å entre quaisquer átomos dos resíduos de aminoácido

## Tabela 4: Mutações selecionadas para as β-glicosidases em estudo.

Mutante	Mutações
B1	F12A/K217A
B2	F12A/K217A/C57A/I286A
B3	W410A/C57A/F192A/I286A/M443A/L73A
T1	W12A/I217A
T2	W12A/I217A/F404A/H195A
Т3	Y271A/L198A/W406A/D49A/R426A/L71A





Figura 12 – Distribuição das mutações selecionadas na estrutura de bglB e bglTm. Em forma de esfera estão identificados os resíduos que sofreram mutação e os resíduos que estão em contato com eles. A) B1; B) B2 C) e D) B3; E) T1; F) T2; G e H) T3. Em vermelho a metade N-terminal, em verde a C-terminal.

A figura 13 demonstra o que foi buscado na seleção dos pontos de mutação. Um resíduo pertencente a uma metade, que está fazendo muitos contatos com a outra metade, como é o caso da mutação F12A mostrada nesta figura.





Figura 13: a) Em evidência a fenilanina 12 (metade N-terminal, em vermelho) e em forma de linha estão todos os resíduos da metade C-teminal (em verde) que estão até 3 Å de distância de qualquer átomo desta fenilanina, o que se considera estar em contato. b) a fenilanina 12 mostrada em a) foi substituída por alanina (F12A), que possui cadeia lateral menor, desfazendo os contatos que eram feitos com os resíduos da outra metade.

## 4.2 – Clonagem dos segmentos de DNA que codificam as enzimas mutantes

Uma vez planejadas as mutações, os segmentos de DNA que codificam as seis enzimas mutantes foram sintetizados pela empresa GeneScript. Para transferência para o vetor de expressão, inicialmente estes insertos foram amplificados. A figura 14 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose com amostras da reação de amplificação por PCR do segmento de DNA que codifica as enzimas mutantes em estudo. Pode-se perceber que os produtos da amplificação, todos do mesmo tamanho, estão entre o padrão de 1000 pb e 1500 pb, corroborando o seu tamanho esperado de aproximadamente 1340 pb (1344 e 1338 pb para bglB e bglTm, respectivamente).



Figura 14: Gel de agarose 2% do produto da amplificação por PCR dos segmentos de DNA que codificam os mutantes B1, B2, B3, T1, T2 e T3.

Para a ligação destes segmentos de DNA de interesse no plasmídeo pLATE51 eles foram extraídos a partir de gel de agarose preparativo (Figura 15) utilizando o kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega). Deste gel foi recortada e extraída a banda de interesse, em torno de 1440 pb, e ligada por meio de estratégia "Ligase Independent Cloning" ao vetor de expressão pLATE51 segundo instruções do fabricante.



Figura 15: Gel preparativo de agarose dos segmentos de DNA que codificam as enzimas mutantes B1 – B3 e T1 – T3. As bandas de interesse estão em evidência.

### 4.3 – Expressão e purificação das enzimas selvagens

Os plasmídeos referentes às enzimas selvagens já haviam sido previamente preparados em nosso laboratório no mesmo vetor pLATE51. As enzimas selvagens (bglB e bglTm) foram expressas como proteínas recombinantes em bactérias BL21(DE3) e a seguir purificadas por afinidade à resina de Níquel-agarose diretamente a partir da fração solúvel do lisado das bactérias induzidas (como descrito no item 3.7) com IPTG. Na figura 16 é possível perceber a banda correspondente à proteína induzida quando comparado o material induzido com o não-induzido. É possível também notar que a purificação foi bem sucedida para ambas as proteínas.



Figura 16: SDS-PAGE das amostra obtidas em diferentes etapas da purificação da bglB de *Paenibacillus polymyxa* (a) e bglTm de *Thermatoga maritima* (b). Lisado corresponde à fração solúvel do lisado celular.

Para se certificar que as proteínas induzidas e purificadas eram de fato bglB e bglTm foi feito western-blotting para detectar a cauda de histidina (His-tag), a qual é adicionada na extremidade N-terminal das enzimas recombinantes quando expressas usando o vetor pLATE51. Como pode ser visto na figura 17, as proteínas reconhecidas no western-blotting estão presentes apenas no lisado bacteriano após a indução por IPTG e no material purificado, o que indica fortemente que são bgIB e bgITm.



Figura 17: Western-blotting para identificação das β-glicosidases recombinantes através de anticorpo contra a cauda de histidina presente nestas enzimas. As colunas A,B e C são referentes a bgliB, D,E e F referentes a bgliTm. Em A e D foi aplicado bactérias antes da indução por IPTG; B e E após a indução por IPTG; C e F o material após a purificação em resina Ni-NTA.

## 4.4 – Expressão e purificação das enzimas mutantes.

As enzimas mutantes foram também expressas em bactérias BL21(DE3) empregando o mesmo procedimento das enzimas selvagens. Das seis mutantes inicialmente planejadas, só foi bem sucedida a expressão e purificação de duas, T1 e T2. Diferentemente das enzimas selvagens, a purificação das mutantes não foi

eficiente quando feita apenas por afinidade com a resina de níquel-agarose, como pode ser visto na figura 18.



Figura 18: SDS-PAGE das amostras obtidas na purificação das proteínas mutantes por afinidade em resína de Ni-NTA. As amostras foram eluídas em tampão com 500mM de imidazol. Todos as colunas da figura representam o material eluído após a tentativa de purificação. A seta indica a proteína recombinante.

Para obter as mutantes (T1 e T2) isoladas, foi necessária outra etapa de purificação. Empregando o material eluído da cromatografia de afinidade foi feita então uma cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ 5/50 com gradiente de 20 até 80 % de NaCl 1M em tampão HEPES 20mM pH 7 (Figuras 19 e 22). As enzimas mutantes foram eluídas em diferentes frações, como pode ser visto nos ensaios de atividade  $\beta$ -glicosidásica nas figuras 20 e 23 e nos géis de SDS-PAGE das figuras 21 e 24.



Figura 19 - Cromatrografia de troca iônica em coluna MonoQ da amostra eluída dm cromatografia de afinidade contendo a mutante T1. A linha mais clara mostra o perfil de absorção em 280nm. A linha mais escura indica o gradiente de NaCI. Para eluição foi empregado um tampão HEPES 20mM pH 7 em um fluxo de 1,0 mL/min.



Figura 20: Ensaio de atividade enzimática para  $\beta$ -glicosidase utilizando substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e as frações eluídas na cromatografia de troca iônica da amostra contendo a enzima T1. Cada fração possui aproximadamente 0,4 ml.

Para confirmar que as proteínas em questão são realmente as recombinantes construídas, sua presença foi detectada por western-blotting usando anticorpo para cauda de histidinas (Figuras 17 e 20).



Figura 21: SDS-PAGE das frações 32 a 39 da cromatografia de troca iônica da amostra contendo o mutante T1 e a membrana resultante do western blotting usando o anticorpo para cauda de histidinas. A seta indica a proteína recombinante. MW, padrões de peso molecular.



Figura 22 - Cromatrografia de troca iônica em coluna MonoQ da amostra eluída em cromatografia de afinidade contendo a mutante T2. A linha mais clara mostra o perfil de absorção em 280nm. A linha mais escura indica o gradiente de NaCl. Para eluição foi empregado um tampão HEPES 20mM pH 7 em um fluxo de 1,0 mL/min.



Figura 23: Ensaio de atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase utilizando substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e as frações da cromatografia de troca iônica da amostra contendo a enzima T2. Cada fração possui aproximadamente 0,4ml.



Figura 24: SDS-PAGE das frações 31 a 38 da cromatografia de troca iônica da amostra contendo o mutante T2 e a membrana resultante do western blotting usando o anticorpo para cauda de histidinas. A seta indica a proteína recombinante. MW, padrões de peso molecular.

Em conclusão nota-se que ambos mutantes foram purificados praticamente até a homogeneidade, embora ainda seja perceptível a presença de pequena quantidade de contaminante na amostra de T1.

## 4.5 – Cálculo de parâmetros cinéticos para as β-glicosidases selvagens e mutantes

Após a produção e purificação das enzimas recombinantes, é preciso avaliar se elas estão corretamente enoveladas. Uma forma prática para esta avaliação é medir a atividade enzimática utilizando substratos que sabidamente são alvo das enzimas selvagens. Assim para as enzimas selvagens, T1 e T2, foi feita a determinação de  $k_{cat}$  e  $K_m$  utilizando os substratos sintéticos *p*-nitrofenil- $\beta$ -Dglucopiranosídeo (PNPG) e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo (PNPF).



Figuras 25: Efeito da concentração do substrato (PNPG e PNPF) na atividade de bglB de *Paenibacillus polymyxa*. A linha representa o ajuste dos dados experimentais na equação cinética apropriada.



Figuras 26: Efeito da concentração do substrato (PNPG e PNPF) na atividade de bglTm de *Thermotoga maritima*. A linha representa o ajuste dos dados experimentais na equação cinética apropriada.



Figura 27 : Efeito da concentração de dois substratos (PNPG e PNPF) na atividade de T1. A linha representa o ajuste dos dados experimentais (losangos) na equação cinética apropriada.



Figura 28 : Efeito da concentração de dois substratos (PNPG e PNPF) na atividade de T2. A linha vermelha representa o ajuste dos dados experimentais (losangos) na equação cinética apropriada.

Tabela	5:	Valores	de	<b>k</b> cat	е	Km	para	0	substrato	PNPG	para	as	enzimas
selvage	ens	e os mut	ante	es T1	е	T2							

Enzima	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	<i>K</i> <sub>m</sub> (mM)	<b>k</b> <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>
bglB	$2,13 \pm 0,08$	6,1±0.5	0,35
bgITm	$3,9 \pm 0,1$	$0,63 \pm 0,07$	6,19
T1	29 ± 2	0,7 ± 0,1	41,4
T2	21,1 ± 0,2	$0,48 \pm 0,04$	43,9

Tabela 6: Valores de  $k_{cat}$  e  $K_m$  para o substrato PNPF para as enzimas selvagens e os mutantes T1 e T2

Enzima	$k_{cat}(s^{-1})$	К <sub>т</sub> (mM)	<b>k</b> <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>
bglB	Nd*	Nd*	0,17
bglTm	7,4 ± 0,1	$2,2 \pm 0,2$	3,63
T1	Nd*	Nd*	0,74
T2	Nd*	Nd*	0,97

\* Nd, não determinável, pois como visto nas figuras 25,27 e 28, não foi possível atingir  $V_{max}$  nas concentrações em que o substrato PNPF é solúvel. O parâmetro  $k_{cat}/K_m$  de bgliB, T1 e T2 para PNPF foi calculado a partir da inclinação da reta dos dados de menor [S] nas figuras 25, 27 e 28.

Nota-se que todas as enzimas recombinantes produzidas apresentam atividades catalíticas, sugerindo que se encontram enoveladas. As enzimas bglTm, T1 e T2 também apresentam  $K_m$  para PNPG muito semelhante, sugerindo que têm afinidade semelhante por este substrato, reforçando assim a sugestão de que se encontram enoveladas.

Adicionalmente é bem evidente que para o substrato PNPG o perfil de atividade *versus* [S] de bglTm e T1 é diferente de um padrão michaeliano, visto por exemplo para bglB. Uma das hipóteses para observação desse perfil é a ocorrência de transglicosilação catalisada por bglTm e T1 (ver em introdução, 1.1.2). Diferentemente, o mutante T2 não exibe o mesmo perfil de atividade *versus* [S], sugerindo que não catalise de modo significativo reações de transglicosilação na faixa de [S] estudada. Adicionalmente, nota-se que diferentemente da enzima selvagem não se atinge  $V_{max}$  para hidrólise de PNPF por T1 e T2, possivelmente por um aumento no  $K_m$  para este substrato. Portanto, as diferenças na catálise de reação de transglicosilação com PNPG por T2 e no  $K_m$  para PNPF de T1 e T2 sugerem que apesar de enoveladas, estas proteínas mutantes podem ter diferenças estruturais.

Considerando que T1 e T2 teoricamente perderam interações nãocovalentes entre suas metades N- e C-terminais, não é inesperado que apresentem diferenças estruturais em relação à enzima selvagem bglTm. Contudo, o rompimento destas interações não foi suficiente para desestabilizar a forma nativa destas enzimas mutantes e assim como a bglTm selvagem elas encontram-se enoveladas. 4.6 – Análise da estrutura das β-glicosidases selvagens e mutantes por dicroísmo circular

Para corroborar a hipótese do correto enovelamento das enzimas em estudo, e para comparar as mutantes com as selvagens, foram coletados espectros de dicroísmo circular na faixa de comprimento de onda do UV distante (Figuras 29 até 32)



Figura 29: Espectro de dicroísmo circular da enzima selvagem bglB.



Figura 30: Espectro de dicroísmo circular da enzima selvagem bglTm.



Figura 31: Espectro de dicroísmo circular da enzima mutante T1.



Figura 32: Espectro de dicroísmo circular da enzima mutante T2.

É possível observar nos espectros de dicroísmo circular que as enzimas em estudo possuem um perfil de proteínas enoveladas. Apesar do ruído no caso do espectro para as mutantes T1 e T2, possivelmente resultante da baixa concentração destas proteínas, esta observação se sustenta. As proporções de elementos de estruturas secundárias (Tabela 4) mostram que o mutante T1 possui estrutura semelhante ao seu correspondente selvagem, a bglTm, enquanto T2 tem diferenças significativas.

Enzima	α hélice	Folha β		
bglB	21%	27%		
bglTm	22 %	26 %		
T1	29 %	21 %		
Τ2	10 %	33 %		

Tabela 7: Proporções de elementos de estrutura secundária calculada a partir dos espectros de dicroísmo circular.

Foi usado o programa K2D3 para deconvolução dos espectros.

Na figura 33 foi feita a sobreposição dos espectros das figuras 30 e 31, para facilitar a visualização de que bglTm e T1 possuem semelhante conjunto de estruturas secundárias.



Figura 33: Sobreposição dos espectros de dicroísmo circular (figuras 30 e 31) de bglTm, em vermelho, e T1, em azul.

Portanto, os resultados da análise estrutural por dicroísmo circular concordam com os experimentos de cinética enzimática, mostrando as enzimas selvagens e mutantes enoveladas e indicando diferenças estruturais, especialmente em T2.

# 4.7 – Análise da estrutura das β-glicosidases selvagens e mutantes por fluorescência intrínseca do triptofano e supressão por acrilamida

Quando excitada em 295nm, as proteínas emitem fluorescência proveniente, em grande parte, dos aminoácidos triptofano. A acrilamida é um eficiente apagador dessa fluorescência e pode ser usado para determinar a exposição desses resíduos em proteínas (Eftink e Ghiron, 1976). Coletando espectros com crescentes concentrações de acrilamida, é possível determinar a constante colisional de apagamento ( $K_{sv}$ ), já que F<sub>0</sub>/F = 1 +  $K_{sv}$ [Q], onde F<sub>0</sub> e F são a fluorescência num determinado comprimento de onda sem e com apagador, *K*sv a constante de apagamento e [Q] a concentração de acrilamida (Eftink e Ghiron, 1976).

No espectro de emissão fluorescência intrínseca do triptofano todas as enzimas em estudo possuem um perfil parecido, com a fluorescência máxima num comprimento de onda compatível com o de proteínas nativas, como pode ser visto na figura 34. As bglTm e bgliB possuem 15 e 16 resíduos de triptofano respectivamente



Figura 34: Espectros de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano com excitação de 295nm mostrando que as 4 enzimas estudadas possuem um perfil parecido, que é compatível com o de enzimas nativas.

Para analisar se as disposições dos triptofanos das enzimas mutantes mudaram em comparação com sua selvagem, foi feita uma análise da supressão da fluorescência com adição crescente de acrilamida. A partir disso foram construídos gráficos relacionando  $F_0/F$  com a concentração de acrilamida, o resultado pode ser visto na figura 35.



Figura 35: Relação de F<sub>0</sub>/F dos espectros de supressão de fluorescência com a concentração de acrilamida.

A partir das retas obtidas na figura 35, é possível calcular o K<sub>sv</sub> relacionado à inclinação das retas. O resultado obtido é mostrado na figura 36 e indica que não há diferença significativa na exposição dos resíduos de triptofano na estrutura terciária das proteínas estudadas. Mesmo no caso de T1, o menor valor de K<sub>sv</sub> assemelha-se aqueles de bgITm e T2 quando considerado o erro experimental. Em suma, os resultados destes experimentos são coerentes com a análise de cinética enzimática e dicroísmo circular, indicando que as proteínas recombinantes encontram-se enoveladas.



Figura 36: Valores de  $K_{sv}$  para as enzimas bglTm, T1, T2 e bglB com seus respectivos desvios padrão.

### 4.8 – Cinética de inativação térmica

Considerando que T1 e T2 estão enoveladas, para tentar verificar a existência de dois potenciais domínios em sua estrutura, foi inicialmente analisada a cinética de inativação térmica destas enzimas e das selvagens. Em tese é possível detectar a contribuição dos dois potenciais domínios  $(\alpha/\beta)_4$  no padrão de perda de atividade enzimática frente à diferentes temperaturas. Apesar de não contarmos com mutantes de bglB, a caracterização desta enzima foi mantida para fins de comparação e padronização de experimentos.

Primeiramente o ensaio foi feito a 47 °C, e, como esperado, para bglB (Figura 37), ocorreu perda de atividade com o passar do tempo. Em cerca de 20 minutos a enzima inativou-se quase completamente (2% de atividade remanescente) através de um processo de desnaturação que não aparenta envolver a formação de intermediários, seguindo uma cinética de primeira ordem com um  $k_{obs}$  de 0,19 min<sup>-1</sup>.



Figuras 37: Inativação térmica de bgIB de Paenibacillus polymyxa em 47 °C.

Já para bglTm, T1 e T2, a incubação a 47 °C não alterou a atividade enzimática remanescente, sugerindo uma manuntenção de sua estrutura terciária no intervalo de tempo analisado. (Figuras 38, 39 e 40)



Figura 38: Atividade relativa de bgITm de *Thermotoga maritima* em função do tempo de préincubação a 47 °C.



Figura 39: Atividade relativa da β-glicosidase T1 em função do tempo de pré-incubação a 47 °C.



Figura 40: Atividade relativa da β-glicosidase T2 em função do tempo de pré-incubação a 47 °C.

A fim de observar o padrão de inativação, buscando investigar a existência de dois componentes, foram testadas temperaturas maiores para bglTm, T1 e T2. A mutante T1 manteve-se estável nas temperaturas de 70 e 80 °C (Figura 41).



Figura 41: Atividade relativa da mutante T1 após diferentes tempos de pré-incubação a 70 (A) e 80 °C (B).

A mutante T2 se mostrou estável a 70 °C no tempo analisado (Figura 42A), porém quando foi incubada a 80°C foi observada uma rápida perda de atividade com  $k_{obs}$  de 0,3 min<sup>-1</sup> (Figura 42B).



Figura 42: Inativação térmica da mutante T2 a 70 (A) e 80 °C (B).

Dada a perda de atividade ter sido muito abrupta (cerca de 10 min até 2 % de atividade remanescente), não foi possível analisar precisamente a cinética do processo de inativação em busca de múltiplos componentes. Para contornar este problema, o experimento foi feito em uma temperatura intermediária a 70 e 80 °C. Assim, a cinética de inativação térmica a 75°C, como esperado, mostrou-se de relativamente mais lenta, com  $k_{obs}$  de 0,06 min<sup>-1</sup> (Figura 43), porém o padrão de perda de atividade foi linear, de primeira ordem e sem intermediários. Portanto não

apresentou nenhum indício de inativação distinta e independente entre as metades N- e C-terminal, potenciais domínios  $(\alpha/\beta)_4$ .



Figura 43: Inativação térmica da mutante T2 a 75 °C.

Em conclusão, T2 termoestabilidade tem reduzida, característica marcantemente distinta da selvagem bglTm, que muito provavelmente emerge da redução no número de interações entre as metades N- e C-terminais. Contudo, mesmo nesta situação não é possível detectar a inativação distinta de cada um destes potenciais domínios  $(\alpha/\beta)_4$ . Este resultado pode indicar que a hipótese da existência dos dois domínios nas  $\beta$ -glicosidases GH1 não é verdadeira. Alternativamente, os dois potenciais domínios  $(\alpha/\beta)_4$  podem apresentar cinética de inativação semelhante, sendo indistinguíveis no experimento escolhido. Deste modo, outras abordagens foram empregadas na análise da desnaturação de bglB, bglTm, T1 e T2 (itens 4.9 a 4.11 a seguir).

4.9 – Determinação de  $T_m$  por dicroísmo circular para as  $\beta$ -glicosidases selvagens e mutantes.

O dicroísmo circular é uma boa ferramenta para analisar a estrutura secundária das proteínas. A elipsidade molar obtida em 222nm e 208nm se refere ao conteúdo de  $\alpha$ -hélices na proteína, enquanto que a leitura em 215nm se refere a folhas  $\beta$  (Greenfield, 2006). Então, essa técnica pode ser utilizada para acompanhar como essas estruturas se comportam com o incremento gradual de temperatura. Assim, em proteínas termolábeis é possível determinar a temperatura de *melting* ou transição ( $T_m$ ), na qual 50% da população de uma proteína encontra-se enovelada e 50% desenovelada.

Deste modo, esse experimento pode ser usado para identificar a presença de dois domínios independentes nas enzimas mutantes caso estes apresentem diferenças quanto a  $T_m$ . A bglB mostrou um perfil de desnaturação típico de uma transição simples e sem intermediários entre a forma nativa e a desnaturada (Figura 44), exibindo uma  $T_m$  de 42 °C (Tabela 8).

Comprimento de onda	T <sub>m</sub> (°C)
222nm	41,97
215nm	41,24
208nm	43,20

Tabela 8: *T*<sub>m</sub> calculado para bglB usando Dicroísmo Circular.



Figura 44: Leituras de elipsidade molar em 222nm (A), 215nm (B) e 208nm (C) da proteína bglB de *Paenibacilus polymyxa* e bglTm de *Thermotoga maritima* com incremento de temperatura.

Já bglTm e a mutante T1 mostraram-se estáveis em todos os comprimentos de onda testados na faixa de temperatura estudada (20 °C até 90 °C). Por outro lado, a mutante T2, que como já demonstrado no item 4.8, possui termoestabilidade diminuída em relação à selvagem, teve essa característica corroborada quando sua desnaturação térmica foi analisada pela elipsidade em 222nm. Porém, na faixa de temperatura analisada observa-se apenas o início da transição e não se atingiu o patamar da pós-transição (Figura 45. Então não foi possível calcular o  $T_m$ . Deste modo, não foi possível verificar se a desnaturação de T2 envolveria duas temperaturas de transição distintas, potencialmente relacionadas aos domínios C- e N-terminais.



Figura 45: Leituras de elipsidade molar em 222nm das mutantes T1 (\*) e T2 (\*).

## 4.10 - Determinação de $T_m$ por Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

## para β-glicosidases selvagens e mutantes

A desnaturação de uma proteína pode ser acompanhada com o corante Sypro Orange, o qual quando ligado a porções hidrofóbicas aumenta a emissão de fluorescência. Assim, quando desnaturada, a região hidrofóbica do "core" proteico é exposta, permitindo a ligação do Sypro Orange e emissão de fluorescência.

A  $T_m$  de bglB, avaliada por DSF (Figura 46A), foi de 41,8 °C, igual aquela medida pelo experimento de dicroísmo circular (Figura 44). Já bglTm, como esperado, não apresentou temperatura de transição confirmando mais uma vez sua estabilidade na faixa de temperatura estudada.



Figura 46: Determinação de temperatura de transição ( $T_m$ ) através da técnica de "Differential Scanning fluorimetry" da proteína bglB de *Paenibacilus polymyxa* (A), bglTm de *Thermatoga maritima* (B), a mutante T1 (C) e a mutante T2 (D).

Na análise dos dados para T1 e T2, inicialmente é importante notar que a transição que ocorre em torno de 55°C nas figuras 46 C e D possivelmente são decorrentes

de contaminação na amostra, visto que ocorre para ambas amostras na mesma faixa de temperatura e adicionalmente essa transição não foi vista nos experimentos do cálculo de  $T_m$  por dicroísmo circular.

Com esta observação em vista, nota-se que corroborando os resultados de dicroísmo circular e de cinética de inativação térmica, a mutante T2 mostrou termoestabilidade diminuída em relação à selvagem bglTm, com  $T_m$  de 82,7 °C (Figura 46D). Esta  $T_m$  parece de acordo com a desnaturação térmica segundo dicroísmo circular (Figura 45), onde se observa um aparente início de transição no limite superior das temperaturas avaliadas (80 a 90 °C). No experimento de DSF a mutante T1 exibe um início de transição acima de 85 °C (Figura 46C), mas como não se atingiu a pós-transição, apenas se deduz que sua  $T_m$  esteja acima de 85 °C. Apesar da mudança de  $T_m$  para mutante T2, não é possível identificar evidências de uma dupla transição correspondendo aos dois supostos domínios desta proteína.

Em conclusão a abordagem de desnaturação térmica, seja pela cinética ou temperatura de transição, mostra claramente que as mutações W12A, I217A, F404A e H195A reduzem a estabilidade térmica de bgITm, contudo não revelaram nenhum indício da existência de dois domínios nesta β-glicosidase.

### 4.11– Desnaturação por cloreto de guanidina e cálculo do parâmetro *m*.

Acompanhando a perda de estrutura de uma proteína com a adição de um desnaturante é possível analisar a cooperatividade deste processo de desnaturação. Proteínas cuja desnaturação exibe alta cooperatividade seguem um modelo de "dois estados", ou seja, no equilíbrio só possuem formas completamente nativas ou completamente desnaturadas (Poter e Rose, 2012; Auton *et al.*, 2007; Pace e Scholtz, 1992). Proteínas que podem formar múltiplos intermediários durante o processo de desnaturação ou ainda que possuem mais de um domínio com

diferentes estabilidade apresentam menor cooperatividade no processo de desnaturação. Uma forma de avaliar a cooperatividade da desnaturação de proteínas é através do cálculo do parâmetro *m*, que é proveniente de uma relação entre o  $\Delta G$  de desnaturação e a concentração do desnaturante (Poter e Rose, 2012; Pace e Scholtz, 1992).

A figura 47 mostra o comportamento das proteinas bgITm, T1 e T2 frente a diferentes concentrações de cloreto de guanidina acompanhado pela fluorescência intrínseca de triptofano. Observa-se uma transição simples em todos os casos, porém há diferenças na  $c_{50}$ . A enzima selvagem bgITm exibe  $c_{50}$  de 4,3 M, a mutante T1 de 4,5 M e a mutante T2 de 2,4 M. Deste modo, as quatro mutações sítio-dirigidas introduzidas em T2 (W12A, I217A, F404A e H195A) reduziram a estabilidade de bgITm frente ao desnaturante.





Figura 47 – Efeito do cloreto de guanidina na estabilidade de bglTm de *Thermatoga maritima* (A), da mutante T1 (B) e da mutante T2 (C). A estabilidade estrutural foi avaliada pela fluorescência de resíduos de triptofano destas proteínas, sendo expressa em termos de fluorescência relativa no  $\lambda$  máximo da proteína na presença do cloreto de guanidina 7,3 M.

A partir destes dados foram estimados os parâmetros da equação que descreve esta transição (ver item 3.15 de Material e Métodos) e com base neste ajuste determinada a porcentagem de proteína nativa em cada concentração de cloreto de guanidina (Pace e Scholtz, 1992), assumindo que na ausência do desnaturante toda a população de proteínas da amostra encontrava-se na forma

nativa (Figura 48). É possível observar o diferente perfil de desnaturação das três enzimas, mostrando diferenças no  $c_{50}$  e no parâmetro *m*, que é proporcional à inclinação da fase de transição.



Figura 48: Relação entre a porcentagem de proteína desnaturada e a concentração de cloreto de guanidina para bgITm selvagem e as mutantes T1 e T2..

Tabela 9: Parâmetros de desnaturação química das β-glicosidases selvagem e

Enzima	с <sub>50</sub> (М)	<i>m</i> (kcal/mol/M)	ΔG <sub>H2</sub> 0 (kcal/mol)
bglTm	4.3	1,2	5,2
T1	4.5	1,4	5,3
T2	2.4	1,6	3,5

mutantes.

Dados baseados em dois experimentos independentes. O desvio padrão para as medidas de m é 0,2 kcal/mol/M, para c<sub>50</sub> é 0,2 M e para  $\Delta G_{H_2O}$  é 0,5 kcal/mol.

Ao analisar o parâmetro *m* nota-se que a desnaturação da mutante T1 e T2 apresentam cooperatividade semelhante aquela da enzima selvagem. Este resultado mostra mais uma vez que não há indícios de independência entre as metades C- e
N- terminal, potenciais domínios de bglTm. Por outro lado, coerentemente com os dados de  $c_{50}$ , a mutante T2 tem menor  $\Delta G_{H_2O}$  de desdobramento, indicando sua menor estabilidade na ausência de desnaturante, enquanto que a proteína selvagem e a mutante T1 também é semelhante quanto a este aspecto. Esta observação também está de acordo com os dados de estabilidade térmica de T2.

Finalmente como experimentos cinética de desnaturação, os de determinação de temperatura de transição e desnaturação por cloreto de guanidina não revelaram a presença dos dois domínios  $(\beta/\alpha)_4$  de bglTm podemos especular que estes domínios, apesar de independentes, tenham propriedades similares. Assim, passaram despercebidos em nossos experimentos. Alternativamente, as diferenças de estabilidade entre os dois domínios  $(\beta/\alpha)_4$  podem ser pequenas demais para serem detectadas nos experimentos usados. Também é possível que o número de mutações introduzidas em T1 e T2 não foi suficiente para "individualizar" os domínios  $(\beta/\alpha)_4$ . Por fim, apesar da contradição com a literatura atual, devemos especular que as  $\beta$ -glicosidases sejam compostas de um único domínio. Contudo, deste rol de possibilidades, esta última nos parece a menos provável.

## 5 - Conclusões

As β-glicosidases recombinantes, bglB e bglTm selvagens e mutantes T1 e T2, produzidas tiveram a purificação bem sucedida e mostraram-se enoveladas, como foi evidenciado com ensaios de atividade enzimática, espectro de dicroísmo circular e ensaios de supressão de fluorescência intrínseca por acrilamida.

Adicionalmente, mostrou-se que as substituições de dois resíduos de aminoácido hidrofóbicos W12 e I217 por alanina no mutante T1 não se mostrou suficiente para alterar significativamente a estrutura terciária desta proteína. Porém, essas substituições causaram uma pequena diminuição da sua termoestabilidade, como visto no princípio de transição em experimento de DSF. Já a estabilidade desta mutante em água ( $\Delta G_{H_2O}$  de desdobramento = 5,3 kcal/mol) e frente ao desnaturante cloreto de guanidina ( $c_{50} = 4,5$  M) são semelhantes à enzima selvagem.

A substituição por alanina de três resíduos hidrofóbicos (W12, I217 e F404) e um carregado (H195) alterou significamente a estrutura da mutante T2 e causou uma diminuição na sua termoestabilidade, com  $T_m$  de 82,7 °C calculado por DSF. Estas mutações também causaram diminuição da estabilidade de T2 em água ( $\Delta G_{H_2O}$  de desdobramento = 3,5 kcal/mol) e da sua resistência frente a cloreto de guanidina (c<sub>50</sub> = 2,4 M)..

Finalmente os experimentos de cinética de desnaturação, determinação de temperatura de transição (por dicroísmo circular e DSF) e desnaturação por cloreto de guanidina não revelaram a presença dos dois potenciais domínios ( $\beta/\alpha$ )<sub>4</sub> da  $\beta$ -glicosidase bglTm.

## 6- Referências

AKANUMA S,; YAMAGISHI A. Roles for the two N-terminal ( $\beta/\alpha$ ) modules in the folding of a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel protein as studied by fragmentation analysis. **Proteins**.; vol. 79, n. 1, p. 221-231, 2011.

AUTON M.; BOLEN D.W. Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA. Vol. 102 p. 15065–15068, 2005.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Crit Rev Biotechnol**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.

BRUNING, J. B.; SHAMOO, Y. Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. **Structure**, v. 12, n. 12, p. 2209-19, Dec 2004.

CHANEZ-CARDENAS, M. E. et al. Unfolding of triosephosphate isomerase from Trypanosoma brucei: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. **Arch Biochem Biophys**, v. 399, n. 2, p. 117-29, Mar 15 2002.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure,** v. 3, n. 9, p. 853-9, Sep 15 1995.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 672-80, Feb 10 1976.

ESEN, A.; b-Glucosidases, overview. In: Esen, A. (Ed.), b-Glucosidase: **Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society**, Washington, DC, pp. 1–1 1993

FRUTUOSO M.A., Marana S.R. A single amino acid residue determines the ratio of hydrolysis to transglycosylation catalyzed by beta-glucosidases. **Protein Peptide** Lett, v.20 p. 102-106. 2013

GLOSTER TM, Macdonald JM, Tarling CA, Stick RV, Withers SG, Davies GJ. Structural, thermodynamic, and kinetic analyses of tetrahydrooxazine-derived inhibitors bound to  $\beta$ -glucosidases. **J Biol Chem**, vol. 279 p. 49236–49242, 2004.

GONZALEZ-CANDELAS L, Aristoy MC, Polaina J, Flors A. Cloning and characterization of two genes from Bacillus polymyxa expressing beta-glucosidase activity in Escherichia coli. **Appl Environ Microbiol.** vol. 55 p. 3173–3177, 1989.

GOYAL, K. et al. Enhancement of transglycosylation activity by construction of chimeras between mesophilic and thermophilic beta-glucosidase. **Arch Biochem Biophys**, v. 407, n. 1, p. 125-34, Nov 1 2002.

GRACE, M. E. et al. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. **J Biol Chem**, v. 269, n. 3, p. 2283-91, Jan 21 1994.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nat Protoc**, v. 1, n. 6, p. 2527-35, 2006.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**, v. 280 (Pt 2), p. 309-16, Dec 1991.

HOCKER, B. et al. Dissection of a (betaalpha)8-barrel enzyme into two folded halves. **Nat Struct Biol**, v. 8, n. 1, p. 32-6, Jan 2001.

HOCKER B, Claren J, Sterner R. Mimicking enzyme evolution by generating new (beta, alpha)8-barrels from (beta, alpha)4-half-barrels. **Proc Natl Acad Sci USA**.; v. 101, p. 16448–16453, 2004.

ISORNA P, Polaina J, Lorena LG, Canada FJ, Gonzalez B, Julia SA. Crystal structures of Paenibacillus polymyxa  $\beta$ -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. **J Mol Biol**.vol. 371 p. 1204–1218, 2007.

KETUDAT CAIRNS, J. R.; ESEN, A. beta-Glucosidases. **Cell Mol Life Sci,** v. 67, n. 20, p. 3389-405, Oct 2010.

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

LANG, D. et al. Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1546-50, Sep 1 2000.

LEATHERBARROW R.J. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. **Trends Biochem. Sci**. vol. 15 p. 455–458, 1990.

LIEBERMAN, R. L. et al. Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 2, p. 101-7, Feb 2007.

LOPEZ-CAMACHO, C., J. Salgado, J. L. Lequerica, A. Madarro, E. Ballestar, L. Franco, and J. Polaina Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa*  $\beta$ -glucosidase A. **Biochem. J.** vol. 314 p. 833-838, 1996.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins,** v. 80, n. 2, p. 374-81, Feb 2012.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 66, n. 3, p. 506-77, table of contents, Sep 2002.

MARANA, S. R. Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. **IUBMB Life,** v. 58, n. 2, p. 63-73, Feb 2006.

MURZIN, A. G. et al. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. **J Mol Biol**, v. 247, n. 4, p. 536-40, Apr 7 1995

Nagano N, Orengo CA, Thornton JM. One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. **J Mol Biol**.; v. 321 n. 5, p. 741–765, 2002

ORENGO, C. A. et al. CATH--a hierarchic classification of protein domain structures. **Structure**, v. 5, n. 8, p. 1093-108, Aug 15 1997.

Pace, C. N.; Shirley, B. A.; Thompson, J. A. Em Protein structure: a practical approach; Creighton, T. E., ed.; IRL: Oxford, cap. 13, 1989.

PAN, H.; RAZA, A. S.; SMITH, D. L. Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. **J Mol Biol**, v. 336, n. 5, p. 1251-63, Mar 5 2004.

PORTER, L. L.; ROSE, G. D. A thermodynamic definition of protein domains. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 109, n. 24, p. 9420-5, Jun 12 2012.

Richter M, Bosnali M, Carstensen L, Seitz T, Durchschlag H, Blanquart S, Merkl R, Sterner R. Computational and experimental evidence for the evolution of a (beta alpha)8-barrel protein from an ancestral quarter-barrel stabilised by disulfide bonds. **J Mol Biol.** ; vol. 398 p. 763–773, 2010

Segel I.H. Enzyme Kinetics : Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. **Wiley–Interscience**; New edition, 1993.

Seitz T, Bocola M, Claren J, Sterner R. Stabilisation of a (beta/alpha)8-Barrel Protein Designed from Identical Half Barrels. **J Mol Biol**. ; v. 372 n.1, p. 114–129, 2007.

Setiyaputra, S., Mackay, J. P., and Patrick, W. M. The structure of a truncated phosphoribosylanthranilate isomerase suggests a unified model for evolution of the  $(\beta\alpha)$ 8 barrel fold. **J. Mol. Biol**. vol. 408, p. 291-303, 2011.

SINGHANIA, R. R. et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresour Technol**, v. 127, p. 500-7, Jan 2013.

Smith MA, Romero PA, Wu T, Brustad EM, Arnold FH. Chimeragenesis of distantlyrelated proteins by noncontiguous recombination. **Protein Sci**.vol. 22 n. 2, p.231– 238, 2012.

Zechel DL, Boraston AB, Gloster T, et al. Iminosugar glycosidase inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to  $\beta$ -glucosidases. **J Am Chem Soc**.vol. 125 p. 14313–14323, 2003.

Zitzewitz, J.A., Gualfetti, P.J., Perkons, I.A., Wasta, S.A., and Matthews, C.R.. Identifying the structural boundaries of independent folding domains in the alpha subunit of tryptophan synthase, a beta/alpha barrel protein. **Protein Sci**. vol. 8 p. 1200–1209, 1999