UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FABIANE CHAVES CANÇADO

**Bases moleculares do efeito
do pH na atividade catalítica de duas
lisozimas digestivas de
Musca domestica (Diptera)**

São Paulo

Data de Depósito na SPG: 31/10/2008

FABIANE CHAVES CANÇADO

**Bases moleculares do efeito
do pH na atividade catalítica de duas
lisozimas digestivas de
Musca domestica (Diptera)**

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

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

**São Paulo
2008**

Fabiane Chaves Cançado

Bases Moleculares do efeito do pH na atividade catalítica de duas lisozimas digestivas de *Musca domestica* (Diptera)

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**Aos meus pais, Fabiano e Isabel, aos meus irmãos,
Rodrigo, Cássio e Cristiane e ao meu marido Márcio, com amor.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha família, minha saúde e capacidade de realizar esta tese.

Ao Prof. Sandro Roberto Marana, por me presentear com as “Bases moleculares do pH na atividade catalítica de duas lisozimas de *Musca domestica* (Diptera)”, oportunidade essencial na minha formação científica, em que pude desenvolver e aprimorar conceitos e procedimentos de cinética enzimática, biologia molecular e biologia estrutural. Obrigada pela orientação, suporte e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa do Centro de Biologia Estrutural do LMLS, pela oportunidade de colaboração, por ter sido essencial na obtenção e coleta de dados da difração de raios-X do cristal de lisozima 2 e na determinação das estruturas cristalográficas das lisozimas digestivas 1 e 2 de *Musca domestica*. Essas estruturas foram cruciais para respondermos nossa proposta científica.

À Dra. Amanda Abdalla Valério, que, juntamente com o cristalógrafo João Alexandre, me ajudou nos experimentos cristalográficos, mas principalmente por tornar as minhas idas a Campinas tão mais agradáveis.

À Prof^a. Clélia Ferreira e ao Prof. Walter Ribeiro Terra, por todos os ensinamentos proporcionados na área de enzimologia por intermédio da disciplina de Cinética Enzimática, que contribuíram para a interpretação e o melhor entendimento dos resultados aqui apresentados. Em especial, agradeço o tratamento carinhoso e convites para as festinhas e reuniões científicas do grupo de Bioquímica de insetos.

Ao Lúcio Mário Ferreira de Mendonça, por todo apoio e ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas enriquecedoras e pela amizade. Aos demais membros do Laboratório de Enzimologia, passados e presentes, pela valiosa troca de experiências na bancada: Marcelo Padilha, Júlio Rozenfeld, Mário Tomassi, Fábio Lin, Marcos Fujimoto, Maira Frutuoso, Nádia Henriques, Alessandro Natalini, Larissa Gonçalves e Gabriele Ruas. Agradeço ainda ao Édson Gomes, José Galeote e Sirlei Mendes de Oliveira, por todo apoio técnico e disponibilidade em ajudar e aos Profs. Manuel Troyano Pueyo e Robert Ivan Schumacher, sempre muito atenciosos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de insetos, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos e pelo ótimo convívio ao longo desses anos: Thaís Bifano, Érica Moreira, Maria Cícera Pereira, Ivan Bragatto, Fábio Mendes, Fábio Tamaki, Bruno Lira, Marcelo Padilha, Walciane da Silva, Christiane Cardoso, Flávia Bartolleti, Nathália Moreira, André Pimentel, Pedro Tizei, Lucas Guerra, Alexandra Dumont, Ana Gómez Duran, Adriana Lopes, Luiza Nakabayashi e Maria Ivanilde Marcelino. Em especial à Daniela Beton, por todas as dicas e protocolos de Biologia Molecular e ao Dr. Fernando Genta, que me aconselhou como aumentar a solubilidade do substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo utilizado nesta tese.

Aos funcionários Márcio Nardelli da Central Analítica, pela coleta dos espectros de Dicroísmo Circular das proteínas em estudo e à Luci Deise Navarro, pela rapidez e boa vontade na realização dos seqüenciamentos dos vários clones mutantes de lisozima 1 e 2 de *Musca domestica*.

Ao Prof. Paulo Lee Ho, do Instituto Butantan, que me forneceu gentilmente células de *Pichia pastoris* da linhagem GS115.

Ao Prof. Shaker Chuck Farah, pela cessão de placas, reagentes e sala termostaticada utilizadas no meu primeiro experimento de cristalização da lisozima 2 de *Musca domestica* e à sua aluna de doutorado Cristiane Guzzo, pelas valiosas discussões e dicas referentes à parte estrutural deste trabalho.

Ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), aos professores Sandro Marana, Fernando Genta, Ana Maria Carmona Ribeiro, Ronaldo Bento Quaggio, Mari Cleide Sogayar e Gláucia Mendes Souza, com os quais realizei estágio supervisionado em docência em disciplinas ligadas à Bioquímica experimental e Biologia Molecular, e aos alunos da Farmácia (2004 e 2005), da Química (2006) e Veterinária (2007), por me permitirem ganhar experiência como pesquisadora na comunicação de idéias, hipóteses e experimentos que são a base da ciência.

A toda minha família que sempre apoiou e respeitou minhas escolhas. Em especial, ao meu marido, Marcio Renato Cabral, por todos os fins de semana passados no laboratório e pelas várias semanas dormidas em Campinas, por toda ajuda na confecção desta tese, por ter ficado ao meu lado em todos os momentos de crise e acima de tudo pelo seu amor. Aos meus queridos pais, Fabiano de Cristo Rachid Cançado e Maria Isabel Chaves Cançado, pessoas maravilhosas que me ensinaram a encarar a vida com dignidade, a vencer os desafios e a sonhar. À minha irmã, Cristiane Chaves Cançado, melhor amiga que alguém pode ter na vida, por toda cumplicidade. Aos meus irmãos, Rodrigo Chaves Cançado e Cássio Chaves Cançado, grandes incentivadores, que sempre me deram todo apoio. Aos meus sobrinhos, reflexos de que a vida não se restringe a “livros e cadernos” e aos meus cunhados, sempre muito acolhedores em minhas idas a Belo Horizonte. Agradeço também ao meu tio, Eduardo Luís Rachid Cançado, que me recebeu aqui

em São Paulo com todo carinho e me deu literalmente “casa, comida e roupa lavada”.

Aos amigos desse Instituto que se fizeram presentes no decorrer deste trabalho: Carina Lofrego, por ter sido um ombro amigo em momentos de dificuldade; ao Renato Alvarenga, pelo empréstimo e ajuda na utilização do eletroporador; ao Rodrigo Resende, Patrícia Pessoa, Daniela Gonzalez, Layla Farage e Andréa Fogaça, pelas conversas e alegrias compartilhadas; ao Diorge de Souza e Roberto Salinas, pelas discussões referentes aos espectros de Dicroísmo Circular e à Juliana Naozuka, pelo empréstimo dos marcadores de massa molecular utilizados na confecção da curva de calibração das cromatografias de filtração em gel.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química e ao LNLS, por toda infra-estrutura disponibilizada, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, pela eficiência e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que passaram em minha vida e que, com um gesto ou mesmo uma palavra, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada!!!

**“O valor das nossas conquistas é medido
por aquilo que abrimos mão para conquistá-las”.**
(Mahatma Gandhi)

RESUMO

CANÇADO, F.C. **Bases moleculares do efeito do pH na atividade catalítica de duas lisozimas digestivas de *Musca domestica* (Diptera)**. 2008. 148p. Tese – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lisozimas são enzimas que fazem parte do mecanismo de defesa contra bactérias, no entanto lisozimas com função digestiva também são encontradas no trato digestivo de vertebrados e no intestino médio de insetos. As lisozimas digestivas de insetos são do tipo “c” e assim compartilham semelhanças estruturais e mecânicas com a lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL). Entretanto, para desempenhar sua função digestiva, as lisozimas de insetos apresentam algumas propriedades particulares entre as quais se destaca um pH ótimo mais ácido em relação às lisozimas não-digestivas.

Para elucidar as bases moleculares dessa diferença no pH ótimo, duas lisozimas digestivas (lisozima 1 – AAQ20048 e lisozima 2 – AAQ20047) da larva de *Musca domestica* (mosca – Diptera Cyclorrhapha), clonadas em *Pichia pastoris* e purificadas, foram caracterizadas estruturalmente e cineticamente com o substrato sintético (MUQ3) e natural (cápsulas de *Micrococcus lysodeikticus*).

Foi observado que o efeito do pH na atividade das lisozimas 1 e 2 sobre o MUQ3 é uma curva com formato de sino e pH ótimo mais ácido que o da HEWL. Essas curvas foram reflexos da diminuição simultânea dos valores de pK_a s do nucleófilo e do doador de prótons. Estruturas cristalográficas das lisozimas digestivas de *Musca domestica* foram obtidas a 1,9 Å e análise comparativa com a estrutura terciária da HEWL revelou resíduos de aminoácidos no ambiente do

nucleófilo (N₄₆) e do doador de prótons (S₁₀₆ e T₁₀₇) que podem estar envolvidos na modulação das constantes de ionização dos resíduos essenciais à catálise. Esses resíduos foram substituídos via mutagênese sítio-dirigida por D, V e A respectivamente e três mutantes simples (N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A) e um triplo (N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A) foram produzidos e purificados. Caracterização revelou que as contribuições individuais da N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ foram pequenas e próximas do limite de detecção da técnica utilizada. Por outro lado, o conjunto dos 3 aminoácidos foi responsável pelo pH ótimo ácido frente ao substrato sintético, elevando os valores de pK_as do nucleófilo e doador de prótons para valores muito semelhantes ao da HEWL. Diferentemente, essa tripla mutação não foi suficiente para elevar o pH ótimo da lisozima 2 sobre cápsulas de *Micrococcus lysodeikticus* para valores próximos àqueles de HEWL, sugerindo que as bases moleculares do pH ótimo frente ao substrato natural e sintético são diferentes.

Uma comparação estrutural entre lisozima 1 e HEWL sugere que os resíduos de aminoácidos carregados na superfície dessas lisozimas sejam importantes para determinação do pH ótimo. A investigação dessa hipótese foi feita substituindo 5 aminoácidos neutros e 1 ácido, via mutagênese sítio-dirigida, por resíduos básicos. A caracterização do mutante sêxtuplo revelou um aumento significativo nos valores de pH ótimo da lisozima 1, indicando que a redução da basicidade da superfície das lisozimas digestivas é determinante para seus pHs ótimos ácidos.

Palavras-chave: Lisozima, lisozima digestiva, pH ótimo, *Musca domestica*.

ABSTRACT

CANÇADO, F.C. **Molecular basis of the pH effect on the catalytic activity of two digestive lysozymes from *Musca domestica* (Diptera).** 2008. 148p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lysozymes are enzymes that are part of the defence mechanism against bacteria, however lysozymes with digestive function are also found in the digestive tract of vertebrates and in the insect midgut. The digestive lysozymes from insects are “c” type, so they share similar structural and mechanistic characteristics with hen egg-white lysozyme (HEWL). However, to perform their digestive function, insect lysozymes present some particular properties among them a more acidic pH optimum than that of non-digestive lysozymes.

To elucidate the molecular basis of this pH optimum difference, two digestive lysozymes (lysozyme 1 – AAQ20048 and lysozyme 2 – AAQ20047) from *Musca domestica* larvae (housefly – Diptera Cyclorrhapha), cloned in *Pichia pastoris* and purified, were structurally and kinetically characterized with synthetic (MUQ3) and natural (lyophilized cells of *Micrococcus lysodeikticus*) substrates.

It was observed that the pH effect on the activity of lysozymes 1 and 2 upon MUQ3 is a bell shaped curve exhibiting a more acidic pH optimum than that of HEWL. These curves result from simultaneous decrease of pK_a s values of the nucleophile and proton donor. Crystallographic structures of these digestive lysozymes from *Musca domestica* were obtained at 1.9 Å and comparative analysis with the tertiary structure of HEWL revealed amino acid residues in the catalytic nucleophile (N₄₆) and proton donor environment (S₁₀₆ and T₁₀₇) that may be involved in the modulation of ionization constants of those catalytic residues. N₄₆, S₁₀₆ and

T₁₀₇ were replaced via site-directed mutagenesis by D, V and A respectively and three simple (N₄₆D, S₁₀₆V and T₁₀₇A) and one triple (N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A) mutants were produced and purified. Their characterization revealed that the individual contributions of N₄₆, S₁₀₆ and T₁₀₇ were small and close to the detection borderline of the technique utilized. On the other hand, a set of these 3 amino acids was responsible by acidic pH optimum upon synthetic substrate, increasing the pK_as values of nucleophile and proton donor to similar values to that of the HEWL. Differently, this triple mutation was not enough to increase the pH optimum of lysozyme 2 upon lyophilized cells of *Micrococcus lysodeikticus* to values close to those of HEWL, suggesting that the molecular bases of pH optimum upon natural and synthetic substrates are different.

A structural comparison between lysozyme 1 and HEWL suggests that the charged amino acid residues on the surface of these lysozymes are important for pH optimum determination. The investigation of this hypothesis was done replacing 5 neutral and 1 acidic amino acids, via site-directed mutagenesis, by basic residues. The characterization of this mutant revealed a significant increase in the pH optimum values of lysozyme 1, suggesting that the reduction of basicity on the surface of the digestive lysozymes is a important factor in the determination of their acidic pH optimum.

Keywords: Lysozyme, digestive lysozyme, pH optimum, *Musca domestica*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelo estrutural de uma lisozima “c”	5
FIGURA 2. Esquema representando dois possíveis mecanismos catalíticos para a lisozima de clara de ovo de galinha.....	8
FIGURA 3. Alinhamento entre as lisozimas de <i>Musca domestica</i> e a lisozima de galinha.....	15
FIGURA 4. Diagrama esquemático da mutagênese sítio-dirigida pelo método da sobreposição na região mutada.....	27
FIGURA 5. Diagrama esquemático da mutagênese sítio-dirigida utilizando o “kit QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis” (stratagene).....	30
FIGURA 6. Purificação das lisozimas 1 e 2 de <i>Musca domestica</i> expressas em <i>Pichia pastoris</i>	51
FIGURA 7. Atividade das lisozimas 1 (A) e 2 (B) em função do pH e da força iônica frente às cápsulas de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> e efeito do pH na estabilidade das mesmas	53
FIGURA 8. Efeito da força iônica (μ) nos parâmetros cinéticos $V_{\max \text{ app}}$ (A) e $K_m \text{ app}$ (B) da lisozima 1 ($\blacktriangle$) e da lisozima 2 ($\blacklozenge$) de <i>Musca domestica</i>	56
FIGURA 9. Atividade das lisozimas 1 (A) e 2 (B) de <i>Musca domestica</i> e da lisozima da clara de ovo de galinha (C) em função do pH e da força iônica frente ao substrato sintético 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3)	58
FIGURA 10. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> frente a diferentes pHs....	60
FIGURA 11. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> em pHs que variaram de 2,68 a 7,33.....	63
FIGURA 12. Efeito do pH na atividade da lisozima 1 (A) e 2 (B) de <i>Musca domestica</i> e lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) (C) representado pelo plote $V_{\max \text{ app}}/K_m \text{ app}$ versus pH e $V_{\max \text{ app}}$ versus pH.....	65
FIGURA 13. Modelo estrutural da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i>	68

FIGURA 14. Cromatografia de filtração em gel da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i>	71
FIGURA 15. Diagrama de Ramachandran do modelo da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> obtido usando o programa PROCHECK.....	72
FIGURA 16. Alinhamento entre lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> (2FBD) e lisozima de galinha (1hew).....	73
FIGURA 17. Cristais de lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> e dados de difração de raios-X.....	75
FIGURA 18. Modelo estrutural da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>	77
FIGURA 19. Cromatografia de filtração em gel da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>	79
FIGURA 20. Diagrama de Ramachandran do modelo da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> obtido usando o programa PROCHECK.....	81
FIGURA 21. Superposição das estruturas cristalográficas das lisozimas digestivas de <i>Musca domestica</i> recombinantes expressas em <i>Pichia pastoris</i>	82
FIGURA 22. Comparação do microambiente do doador de prótons (A) e do nucleófilo (B) nas lisozimas 1 e 2 de <i>Musca domestica</i> (em verde musgo e em verde claro respectivamente) e na HEWL (em branco)	84
FIGURA 23. Esquema da construção do vetor pPIC9 (A) e pGEM-T (B) contendo o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>	85
FIGURA 24. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>	87
FIGURA 25. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> mutada nas posições N ₄₆ D (A), S ₁₀₆ V (B) e T ₁₀₇ A (C)	89
FIGURA 26. Seqüenciamento do vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> mutada nas posições N ₄₆ D (A), S ₁₀₆ V (B) e T ₁₀₇ A (C)	91
FIGURA 27. Purificação dos três mutantes simples da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> expressos em <i>Pichia pastoris</i>	95

FIGURA 28. Espectros de dicroísmo circular (A) e fluorescência intrínseca (B) da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> (MdL2) e dos mutantes MdL2-N ₄₆ D, MdL2-S ₁₀₆ V e MdL2-T ₁₀₇ A	97
FIGURA 29. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade dos mutantes N ₄₆ D (A), S ₁₀₆ V (B) e T ₁₀₇ A (C) da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> expressos em <i>Pichia pastoris</i> em pHs que variaram de 2,68 a 7,33.....	99
FIGURA 30. Efeito do pH na afinidade ($K_{m\ app}$) da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> (MdL2) e dos mutantes N ₄₆ D, S ₁₀₆ V e T ₁₀₇ A pelo substrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo.....	105
FIGURA 31. Efeito do pH na atividade catalítica dos mutantes da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> (N ₄₆ D, S ₁₀₆ V e T ₁₀₇ A) representado pelo plote $V_{max\ app}$ versus pH (A) e $V_{max\ app}/K_{m\ app}$ versus pH (B).....	107
FIGURA 32. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> mutada simultaneamente nas posições N ₄₆ D (A), S ₁₀₆ V e T ₁₀₇ A (B).....	111
FIGURA 33. Seqüenciamento do vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> mutada simultaneamente nas posições N ₄₆ D, S ₁₀₆ V e T ₁₀₇ A	112
FIGURA 34. Purificação do mutante triplo da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> expresso em <i>Pichia pastoris</i>	113
FIGURA 35. Espectros de dicroísmo circular (A) e fluorescência intrínseca (B) da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> (MdL2) e do mutante MdL2-N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A	115
FIGURA 36. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade do mutante N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> expresso em <i>Pichia pastoris</i> em pHs que variaram de 2,68 a 7,33.....	116
FIGURA 37. Efeito do pH na afinidade ($K_{m\ app}$) do mutante N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A pelo substrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo	119
FIGURA 38. Efeito do pH na atividade do mutante triplo da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> (N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A) representado pelo plote $V_{max\ app}$ versus pH (A) e $V_{max\ app}/K_{m\ app}$ versus pH (B)	120

FIGURA 39. Atividade da HEWL (A) e do mutante MdL2-N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A (B) em função do pH e da força iônica.....	124
FIGURA 40. Superfície eletrostática da lisozima 1 (A) e da lisozima 2 (B) de <i>Musca domestica</i>	126
FIGURA 41. Superfície eletrostática da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL)	127
FIGURA 42. Superfície eletrostática da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> (A) e da HEWL (B)	129
FIGURA 43. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> mutada simultaneamente nas posições Y ₁₃ K-A ₁₄ R (A), E ₃₀ K (B), T ₄₃ R (C), Y ₇₁ R (D) E Y ₁₁₀ R (E)	131
FIGURA 44. Seqüenciamento do vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> mutada simultaneamente nas posições Y ₁₃ K-A ₁₄ R-E ₃₀ K-T ₄₃ R-Y ₇₁ R-Y ₁₁₀ R.....	132
FIGURA 45. Purificação do mutante sêxtuplo da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> expresso em <i>Pichia pastoris</i>	133
FIGURA 46. Espectros de fluorescência intrínseca da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> (MdL1) e do mutante MdL1-Y ₁₃ K-A ₁₄ R-E ₃₀ K-T ₄₃ R-Y ₇₁ R-Y ₁₁₀ R	135
FIGURA 47. Atividade da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> (■) e do mutante MdL1-Y ₁₃ K-A ₁₄ R-E ₃₀ K-T ₄₃ R-Y ₇₁ R-Y ₁₁₀ R (◆) em função do pH nas forças iônicas 0,2 (A) e 0,1 (B)	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de pK_a s dos resíduos catalíticos das lisozimas 1 e 2 de <i>Musca domestica</i> e da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2}).....	66
TABELA 2. Dados estatísticos provenientes do refinamento da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i>	69
TABELA 3. Coleta de dados da difração de raios-X de um cristal único de lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> e processamento dos dados.....	76
TABELA 4. Dados estatísticos provenientes do refinamento da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>	78
TABELA 5. Parâmetros cinéticos ($V_{max\ app}$ e $K_m\ app$) da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> e dos mutantes MdL2-N ₄₆ D, MdL2-S ₁₀₆ V e MdL2-T ₁₀₇ A.....	98
TABELA 6. Valores de pK_a s dos resíduos catalíticos da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> e dos três mutantes simples (N ₄₆ D, S ₁₀₆ V e T ₁₀₇ A) nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2}).....	109
TABELA 7. Comparação dos valores dos pK_a s dos resíduos catalíticos da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> e da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2})	109
TABELA 8. Parâmetros cinéticos ($V_{max\ app}$ e $K_m\ app$) da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> , dos mutantes simples (N ₄₆ D, S ₁₀₆ V e T ₁₀₇ A) e triplo (N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A)	118
TABELA 9. Comparação dos valores de pK_a s dos resíduos catalíticos do mutante MdL2-N ₄₆ D-S ₁₀₆ V-T ₁₀₇ A e da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) com aqueles da lisozima 2 de <i>Musca domestica</i> nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2})	121

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AOX	Álcool oxidase
BLAST	“Basic Local Aligment Search Tool”
BMM	“Buffered Minimal Methanol”
CD	Dicroísmo Circular
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CP	Tampão citrato-fosfato de sódio bibásico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	2'-deoxi-nucleotídeos 5' trifosfatados
DO	Densidade óptica
DTT	1,4-ditiotreitol
EC	“Enzyme Comission number”
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	“Fast Performance Liquid Chromathography”
HEWL	“Hen Egg-White Lysozyme” – Lisozima da clara de ovo de galinha
LB	meio de Lúria Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MD	“Minimal Dextrose” - meio mínimo contendo dextrose
MdL1	Lisozima 1 de <i>Musca domestica</i>
MdL2	Lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>
MES	Morfolinoetanosulfônico
Me-U	4-metilumbeliferona
MM	massa molecular
Mr	massa molecular relativa

MUQ3	4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
PCR	<i>“polymerase chain reaction”</i> - reação em cadeia com DNA polimerase
PDB	<i>“Protein Data Bank”</i>
PEG	Polietilenoglicol
rms	<i>“root mean square deviation”</i> - raiz quadrada do quadrado do desvio padrão médio
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
YNB <i>“Yeast Nitrogen Base without amino acids”</i>	meio mínimo de suplemento de nitrogênio para levedura
YPD..... <i>“Yeast extract peptone dextrose”</i>	meio contendo extrato de levedura, peptona e dextrose
μ.....	força iônica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As lisozimas	1
1.2. Lisozimas “c” da família 22	4
1.3. Lisozimas digestivas	9
1.4. Lisozimas digestivas de insetos – <i>Musca domestica</i>	10
1.5. Bases moleculares do pH ótimo ácido das lisozimas digestivas de <i>Musca domestica</i> – MdL1 e MdL2	12
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Procedimentos para manipulação de bactérias	18
3.1.1. Manutenção e cultivo de bactérias	18
3.1.2. Preparação de bactérias competentes para transformação por CaCl_2	18
3.1.3. Transformação das células <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue competentes por choque térmico	19
3.2. Procedimentos para manipulação de leveduras	19
3.2.1. Manutenção e cultivo de leveduras	19
3.2.2. Preparação de leveduras competentes para transformação por eletroporação	20
3.2.3. Transformação de leveduras competentes por eletroporação	21
3.3. Procedimentos para manipulação e análise de DNA	22
3.3.1. Procedimentos gerais	22
3.3.2. Descrição dos iniciadores	22
3.3.3. Reações de mutagênese sítio-dirigida na sequência das lisozimas digestivas de <i>Musca domestica</i>	25
3.3.3.1. Reações de mutagênese sítio-dirigida na sequência da MdL1 ...	25
3.3.3.2. Reações de mutagênese sítio-dirigida na sequência da MdL2 ...	29
3.3.4. PCR em termociclador	31
3.3.5. Eletroforese em gel de agarose	32
3.3.6. Purificação do produto de PCR a partir do gel de agarose	32
3.3.7. Extração de plasmídeos	32

3.3.8. Seqüenciamento automatizado de DNA.....	33
3.4. Procedimentos para manipulação de proteínas.....	34
3.4.1. Expressão da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes em <i>Pichia pastoris</i>	34
3.4.2. Purificação das lisozimas recombinantes	35
3.4.2.1. Precipitação com sulfato de amônio – “Salting-out”	35
3.4.2.2. Cromatografia de troca iônica na Mono-S HR 5/5 em sistema FPLC.....	36
3.4.2.3. Cromatografia de troca iônica na High-Q em sistema FPLC.....	36
3.4.2.4. Cromatografia de troca iônica na Mono-Q HR 5/5 em sistema FPLC.....	37
3.4.3. Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	38
3.4.4. Determinação da concentração de proteína e ensaio de atividade enzimática.....	38
3.4.5. Caracterização cinética das lisozimas recombinantes.....	39
3.4.5.1. Efeito do pH e da força iônica na atividade catalítica das lisozimas recombinantes frente ao substrato <i>Micrococcus lysodeikticus</i> e MUQ3...	39
3.4.5.2. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	40
3.4.5.3. Determinação das constantes de ionização (pK_a) dos resíduos catalíticos das lisozimas recombinantes e da HEWL.....	41
3.4.5.4. Efeito do pH na estabilidade da MdL1 e MdL2 recombinantes.....	42
3.4.6. Caracterização estrutural das lisozimas recombinantes.....	42
3.4.6.1. Procedimentos prévios aos ensaios de cristalização da MdL2.....	42
3.4.6.2. Ensaios de cristalização.....	43
3.4.6.3. Coleta e processamento de dados da difração de raios-X de um cristal de MdL2 recombinante e “faseamento”.....	43
3.4.6.4. Refinamento e determinação da estrutura terciária da MdL1 e MdL2	44
3.4.6.5. Análise estrutural da MdL1 e MdL2	45
3.4.7. Caracterização das lisozimas recombinantes por outros métodos analíticos	46
3.4.7.1. Cromatografia da MdL1 e MdL2 em coluna de filtração em gel	46
3.4.7.2. Experimentos de Dicroísmo Circular (CD) da MdL2 e de seus mutantes	47
3.4.7.3. Fluorescência intrínseca da MdL1, MdL2 e de seus mutantes	48

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Purificação da MdL1 e da MdL2 recombinantes.....	49
4.2. Caracterização do efeito do pH e da força iônica na atividade da MdL1 e MdL2	52
4.3. Determinação dos pK_a s dos resíduos catalíticos da MdL1 e da MdL2.....	59
4.4. Determinação da estrutura cristalográfica da MdL1 e da MdL2.....	67
4.5. Identificação de aminoácidos envolvidos na modulação do pH ótimo por meio de comparação das estruturas da MdL1, MdL2 e HEWL.....	83
4.6. Caracterização do papel de aminoácidos envolvidos na modulação do pH ótimo na MdL1 e MdL2	85
5. CONCLUSÕES.....	138
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
7. LISTA DE ANEXOS.....	148

1. INTRODUÇÃO

1.1. As lisozimas

Lisozimas (EC 3.2.1.17) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de peptideoglicanas da parede celular de bactérias. Peptideoglicanas são compostos formados por polissacarídeos interligados por pequenos peptídeos, nos quais a porção polissacarídica é constituída por uma alternância entre o ácido N-acetilmurâmico (NAM; 2-acetoamido-2-deoxi-3-O-lactil-glucopiranoose) e a N-acetilglicosamina (NAG; 2-acetoamido-2-deoxi-glucopiranoose) unidos por ligações glicosídicas do tipo β entre os carbonos 1 e 4 (Chipman & Sharon, 1969).

A exemplo das demais glicosídeo hidrolases, as lisozimas estão inseridas em um sistema de classificação que se baseia na similaridade da seqüência de aminoácidos e dessa maneira, agrupa na mesma família enzimas que compartilham semelhança na estrutura espacial e no mecanismo da reação catalítica (Coutinho & Henrissat, 1999). Esse sistema conta atualmente com 112 famílias, sendo as lisozimas agrupadas nas famílias 22, 23, 24, 25 e 73 (<http://www.cazy.org/>).

Na família 22 estão reunidas as lisozimas do tipo “c” encontradas em vertebrados (anfíbios, peixes, aves e mamíferos) e invertebrados (crustáceos, aracnídeos e insetos). Essas lisozimas são formadas por uma combinação de α -hélices e fitas- β que geram uma estrutura conhecida como “*folding tipo lisozima*”. Nesse tipo de enovelamento α/β , uma profunda fenda contendo o sítio ativo divide a molécula em dois domínios; um formado principalmente por fitas- β e o outro, compreendendo segmentos do N e C-terminais, apresenta natureza helicoidal. Os dois domínios são ligados por uma α -hélice. Os representantes desse grupo têm de 119 a 130 resíduos de aminoácidos, entre os quais oito são cisteínas que formam quatro pontes dissulfeto totalmente conservadas. Essas enzimas catalisam a

hidrólise das ligações glicosídicas gerando um produto que mantém a configuração do carbono anomérico (mecanismo retentor) e os resíduos catalíticos (aspartato e glutamato) já foram identificados.

Em contraste com o mecanismo retentor das lisozimas “c”, as lisozimas das famílias 23, 24 e 25 catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas com inversão do carbono anomérico (mecanismo inversor) (Kuroki *et al.*, 1993; Fukamizo, 2000; Hemoso *et al.*, 2003). Na família 23, estão agrupadas lisozimas do tipo “g” encontradas em aves, mamíferos, peixes, répteis, fagos e bactérias. Nesse grupo, não existem muitas estruturas cristalográficas determinadas e características estruturais têm-se baseado na estrutura terciária da lisozima da clara de ovo de ganso. Esse polipeptídeo de 185 aminoácidos enovela-se novamente para formar uma fenda pronunciada contendo o sítio ativo que separa a molécula em dois domínios distintos: um domínio pequeno, contendo fitas- β e um segundo maior, rico em α -hélices. Essa enzima contém duas pontes dissulfetos e apenas um dos resíduos catalíticos (ácido glutâmico), que funciona como doador de prótons na catálise, foi identificado. Ainda que exista nessa enzima ambiente análogo de folhas- β àquele das lisozimas “c”, não foram identificados resíduos adequadamente próximos ao ácido glutâmico para formar o par catalítico (Grütter *et al.*, 1983; Weaver *et al.*, 1995; Monzingo *et al.*, 1996; Qasba *et al.*, 1997; Fukamizo, 2000; Pooart *et al.*, 2004).

Nessa família estão inseridas ainda transglicosilases líticas de bactérias e fagos que apresentam domínios catalíticos similares às hidrolases do tipo “g”. No entanto, completamente diferente dessas lisozimas, após a divagem da ligação glicosídica β -1,4, as transglicosilases catalisam a síntese de uma nova ligação glicosídica intramolecular entre o carbono 1 e 6 do resíduo do NAM formando o

ácido 1,6 anidro N-acetilmurâmico. Nas bactérias, esse composto está envolvido na sinalização para síntese localizada da camada de peptidoglicana, durante o crescimento da bactéria (Van Asselt *et al.*, 1999a; 1999b), atuando em cooperação com enzimas sintetizadoras de peptidoglicana. Nos fagos, essas transglicosilases atuam com outras enzimas que facilitam o seu acesso à parede celular para lisar a célula hospedeira (Fastrez, 1996).

Na família 24, estão presentes lisozimas de fungos, fagos e bactérias, sendo o representante clássico desse grupo uma lisozima do bacteriófago T4. Essa enzima de 164 aminoácidos enovela-se em uma estrutura formada por dois domínios, cujas interfaces geram uma fenda pronunciada contendo o sítio catalítico. Um domínio é formado por 5 fitas- β e uma α -hélice, enquanto o outro é predominantemente helicoidal. A conexão entre os dois domínios é feita por uma longa hélice formada por 20 aminoácidos e que se estende quase de uma extremidade a outra (Matthews & Remington, 1974; Weaver *et al.*, 1987). Matthews *et al.* (1981) identificaram, por comparação estrutural com uma lisozima da família 22, os aminoácidos D20 e E11 como sendo os resíduos catalíticos da lisozima do fago T4. No entanto, mutagênese sítio-dirigida revelou posteriormente que a enzima mantém alta atividade quando na posição 20, o aspartato é substituído por alanina ou cisteína (Hardy & Poteete, 1991; Rennell *et al.*, 1991). Esse resultado, associado ao fato de que outras lisozimas da família 24 apresentam outros aminoácidos nessa posição (Garvey *et al.*, 1986), descarta o aspartato como sendo essencial na catálise das lisozimas da família 24.

A primeira lisozima da família 25 foi descoberta e isolada de um fungo (*Chalaropsis*), no entanto atualmente os representantes majoritários desse grupo são lisozimas de fagos e bactérias. Similamente às lisozimas das famílias 22, 23 e 24, as lisozimas da família 25 catalisam a clivagem de ligações glicosídicas do tipo

β -1,4 entre unidades de NAM e NAG, mas elas também exibem a mesma atividade quando as unidades de NAM encontram-se acetiladas no C6, como é o caso de peptidoglicanas da parede celular de *Staphylococcus aureus*, que não são hidrolisadas por outras lisozimas. Essa diferença de atividade deve ser decorrente de características estruturais das lisozimas da família 25, não compartilhadas pelas lisozimas das famílias 22, 23 e 24. Embora seja fraca a correspondência de sequência primária existente entre as lisozimas dos três primeiros grupos, elas compartilham características estruturais, tais como enovelamento α/β e formação de dois domínios diferentes em composição de elementos de estrutura secundária. As lisozimas da família 25 são compostas de um único domínio e possuem enovelamento β/α -barril não usual, $(\beta/\alpha)_5\beta_3$. Nesse caso, as cinco primeiras fitas- β e α -hélices alternam-se, sendo seguidas pelas fitas β_6 , β_7 e β_8 após a quinta α -hélice. Todas as fitas- β estão dispostas paralelamente, exceto a última que corre no sentido antiparalelo às demais (Rau *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003). Nesse grupo, os resíduos catalíticos (aspartato e glutamato) já foram identificados (Hermoso *et al.*, 2003).

Por fim, a família 73 reúne lisozimas de fagos e bactérias com mecanismo e resíduos catalíticos desconhecidos.

1.2. Lisozimas “c” da família 22

Nessa família são classificadas as lisozimas animais, como aquela de clara de ovo de galinha (HEWL), a primeira enzima a ter sua estrutura terciária determinada (Blake *et al.*, 1965; Phillips, 1967).

As lisozimas “c” compartilham uma estrutura formada por dois domínios, um composto de fitas- β e o outro de α -hélices, que conjuntamente formam a cavidade do sítio ativo (Figura 1). O sítio ativo é subdividido em 6 subsítios e cada um deles

Figura 1. Modelo estrutural de uma lisozima "c". Os resíduos catalíticos estão representados em "bola e bastão". A seta indica a cavidade do sítio ativo. Adaptado de Matsuura et al. (2002).

liga-se a um monossacarídeo do substrato. Originalmente esses subsítios foram designados por letras (A a F) (ver esquema abaixo) (Phillips, 1967), porém a fim de uniformizar a nomenclatura entre todas as glicosídeo hidrolases, os subsítios podem ser também identificados por índices constituídos por números positivos e negativos (Davies, 1997).

Os subsítios que ligam a porção não-redutora do substrato, localizada antes da ligação hidrolisada, recebem índices negativos (-1, -2, -3, etc...), enquanto os

subsítios que ligam a porção redutora do substrato (após o ponto de clivagem) recebem índices positivos (+1, +2, +3, etc...).

Nas lisozimas “c”, a ligação glicosídica hidrolisada é aquela entre o NAM ligado no subsítio -1 e o NAG posicionado no subsítio +1. Os resíduos diretamente envolvidos no mecanismo de catálise são um ácido glutâmico e um aspartato (E₃₅ e D₅₂ no caso da HEWL).

No mecanismo proposto por Phillips (1967), a ligação do substrato no subsítio -1 leva à distorção do NAM que assume conformação de meia cadeira (ou sofá). O E₃₅ atua como ácido e protona o oxigênio da ligação glicosídica, enquanto o D₅₂ estabiliza eletrostaticamente a carga positiva que se forma no NAM (estado de transição – oxocarbonium). Essa ação coordenada libera do sítio ativo, como produto, a porção redutora do substrato. Simultaneamente o E₃₅ (agora desprotonado) subtrai um H⁺ de uma molécula de água, que por sua vez efetua ataque nucleofílico sobre o estado de transição gerando como produto final a porção não-redutora do substrato. (Figura 2 – via B). O D₅₂ também protege a face α do NAM de forma que a água ataca o estado de transição somente pela face β , gerando um produto com retenção de configuração do carbono anomérico.

Esse mecanismo foi adotado por muito tempo como paradigma para todas as β -glicosidases retentoras. Porém, o acúmulo de evidências experimentais acabou demonstrando que as β -glicosidases de fato utilizam um mecanismo com algumas diferenças, que envolve a formação de um intermediário covalente (glicosil-enzima) (Koshland, 1953; Sinnott, 1990; Kempton & Withers, 1992).

Recentemente evidências experimentais indicaram que as lisozimas também adotam esse mecanismo (Vocadlo *et al.*, 2001). De fato, esse mecanismo compartilha uma série de características como aquele proposto por Phillips (1967). O

substrato liga-se de forma distorcida no subsítio -1, o E₃₅ atua como doador de prótons, forma-se o estado de transição positivamente carregado e o primeiro produto deixa o sítio ativo. Porém, nesse caso o D₅₂ efetua um ataque nucleofílico no C1 do NAM ao invés de estabilizá-lo eletrostaticamente, formando um intermediário glicosil-enzima (porção não-redutora do substrato ligada covalentemente à cadeia lateral do D₅₂). Posteriormente, o E₃₅ atua como base ativando uma molécula de água que realiza ataque nucleofílico sobre o intermediário covalente, regenerando o D₅₂ e liberando o segundo produto (Figura 2 – via A).

Dessa forma, percebe-se que o mecanismo de catálise dessas lisozimas depende da ação coordenada de dois resíduos de aminoácidos com grupos carboxila em estados de ionização diferentes em sua cadeia lateral. De fato, E₃₅ apresenta um pK_a em torno de 6,5, enquanto o D₅₂ apresenta um pK_a próximo de 4 (Rupley, 1967; Sakakibara & Hamaguchi, 1968; Parsons & Raftery, 1969; Rand-Meier *et al.*, 1969; Parsons & Raftery, 1970; Parsons & Raftery, 1972a; Parsons & Raftery, 1972b, Nakae *et al.*, 1975; Yang & Hamaguchi, 1980; McKenzie & White, 1991; Inoue *et al.*, 1992a; Inoue *et al.*, 1992b; Abe *et al.*, 1995). Logo, no pH ótimo da enzima (5,2) o D52 encontra-se desprotonado e o E₃₅ está protonado.

A diferença de pK_a entre esses dois resíduos é consequência de propriedades particulares ao microambiente de cada um deles. O grupo carboxila do E₃₅ está alojado em um bolsão relativamente hidrofóbico formado pelas cadeias laterais da Q₅₇, W₁₀₈, V₁₀₉ e A₁₁₀, situação responsável pela elevação do pK_a desse resíduo. A cadeia lateral do D₅₂ encontra-se exposta ao solvente, e conseqüentemente apresenta um pK_a próximo daquele esperado para um grupo carboxila (Strynadka *et al.*, 1991).

Figura 2. Esquema representando dois possíveis mecanismos catalíticos para a lisozima de clara de ovo de galinha (Vocadlo et al., 2001). A via A (esquerda) envolve a formação de um intermediário covalente, enquanto a via B (direita) corresponde ao mecanismo proposto por Phillips (1967).

1.3. Lisozimas digestivas

Sua ação lítica sobre bactérias indica fortemente função de defesa para as lisozimas “c”. Porém, lisozimas “c” com função digestiva também estão envolvidas na digestão de bactérias em animais vertebrados com câmara de fermentação em seu tubo digestivo anterior, como por exemplo, os verdadeiros ruminantes (*Bos taurus*, *Ovis aries* e *Axis axis*) (Dobson *et al.*, 1984; Jollès *et al.*, 1984), os macacos (*Presbytis entellus*) (Dobson *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1987) e os bichos-preguiça (*Bradypus variegatus*) (Pacheco *et al.*, 2007) comedores de folhas e no intestino posterior de coelhos e roedores (Hammer *et al.*, 1987; Ito *et al.*, 1994), bem como em aves ingestoras de folhas (*Opisthocomus hoazin*), cujo mecanismo de fermentação encontra-se no papo (Grajal *et al.*, 1989; Ruiz *et al.*, 1994) ou mesmo em invertebrados que ingerem grandes quantidades de bactérias, como por exemplo, os insetos que se alimentam de matéria orgânica em decomposição (*Musca domestica*, *Drosophila melanogaster* e *Anastrepha fraterculus*) (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Kylsten *et al.*, 1992; Regel *et al.*, 1998; Lemos *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1993).

Nesses casos, a lisozima catalisa a hidrólise da parede bacteriana a fim de liberar os nutrientes incorporados nesse microorganismo. Portanto, no caso dos vertebrados fermentadores, os nutrientes presentes no alimento ingerido pelo animal são inicialmente digeridos e incorporados pelas bactérias que crescem na câmara de fermentação, e somente então são transferidos para o animal quando as bactérias são digeridas pelas lisozimas presentes em seu estômago ou no cólon descendente do intestino (Dobson *et al.*, 1984; Ito *et al.*, 1994). No caso dos insetos saprófagos, a fonte de nutrientes do alimento não é a matéria orgânica em decomposição, mas sim

as bactérias que vivem nesse material e são digeridas em uma região ácida do seu intestino médio (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

Para o desempenho dessa função, as lisozimas digestivas apresentam uma série de adaptações, como alta expressão no tubo digestivo (Irwin & Wilson, 1989; Kylsten *et al.*, 1992; Kornegay, 1996; Irwin, 1996), resistência à hidrólise por proteinases ácidas (como pepsina no estômago de vertebrados ou catepsina D no intestino médio de insetos) e pH ótimo mais ácido do que as lisozimas não-digestivas (Dobson *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1987; Stewart & Wilson, 1987, Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Jollès *et al.*, 1989; Lemos *et al.*, 1993; Kornegay *et al.*, 1994; Prager, 1996; Regel *et al.*, 1998). Em geral, em força iônica 0,1 o pH ótimo das lisozimas digestivas frente ao substrato *Micrococcus sp* fica em torno de pH 4-5, enquanto nessas mesmas condições o pH ótimo de uma lisozima não-digestiva varia de 7,5-8,5 (Saint-Blancard *et al.*, 1970; Dobson *et al.*, 1984; Lemos *et al.*, 1993; Prager, 1996; Park *et al.*, 1997; Regel *et al.*, 1998). Tratam-se de enzimas menos básicas, devido a uma redução do número de aminoácidos básicos (especialmente de argininas), que converge em valores de pI neutros ou mesmo ácidos para as lisozimas digestivas.

1.4. Lisozimas digestivas de insetos – *Musca domestica*

Atividade de lisozima “c” tem sido detectada no intestino de vários insetos (Lemos *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1993; Hultmark, 1996; Regel *et al.*, 1998; Kopáček *et al.*, 1999; Grunclová *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2006; Paskewit *et al.*, 2008; Ursic-Bedoya *et al.*, 2008). No grupo de insetos saprófagos dos Diptera Cyclorrhapha, a presença de altos níveis e atividade de lisozimas digestivas, em uma região extremamente ácida do intestino médio (pH 3,1) (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987),

permite que as bactérias presentes na matéria orgânica em decomposição sejam utilizadas como fonte de alimento.

Em *Musca domestica* (mosca – Diptera Cidorrhapha), foram purificadas e caracterizadas duas lisozimas digestivas que diferem entre si apenas quanto ao ponto isoelétrico (7,9 e 8,2) (Lemos *et al.*, 1993). Portanto, é provável que se tratem da mesma proteína, apenas com alguma diferença de modificação pós-traducional. Essas lisozimas apresentam pH ótimo ácido (4,5 em força iônica 0,1), sua afinidade pelo substrato diminui com o aumento da força iônica e são resistentes à ação da proteinase digestiva catepsina D presente no tubo digestivo da mosca. Posteriormente essa mesma lisozima foi purificada e totalmente seqüenciada (Ito *et al.*, 1995), revelando-se uma proteína de 122 aminoácidos, massa molecular de 13.816 D e pI de 7,7.

Mais recentemente duas diferentes lisozimas foram clonadas por RT-PCR a partir do tubo digestivo de *Musca domestica*. Uma delas (lisozima 1 – AY344589) apresenta seqüência idêntica àquela já obtida por Ito *et al.* (1995) e, portanto corresponde à lisozima caracterizada por Lemos *et al.* (1993). A segunda lisozima (lisozima 2 – AY344588) (122 aminoácidos, massa molecular 13.890 D e pI 6,7) apresenta 70% de identidade e 80% de similaridade com a lisozima 1.

As diferenças na seqüência de aminoácidos e no pI entre as lisozimas 1 e 2 (MdL1 e MdL2 respectivamente) indicam que a segunda enzima corresponde a uma lisozima intestinal de *Musca domestica* que ainda não havia sido caracterizada. De fato, Lemos *et al.* (1993) comentam a existência de uma atividade minoritária de lisozima digestiva que não foi purificada (cerca de 20%), a qual poderia corresponder à atividade da MdL2.

Baseado na similaridade de seqüência com a HEWL, MdL1 e MdL2 foram classificadas como lisozimas “c” da família 22. HEWL possui 38,8% e 36,4% de identidade com a MdL1 e a MdL2 respectivamente. Alinhamento de seqüências da HEWL com MdL1 e MdL2 permitiu também identificar os resíduos catalíticos nas lisozimas de inseto. Assim, no caso da MdL1, o nucleófilo catalítico é o D₅₀ e o doador de prótons catalítico é o E₃₂. Na MdL2, essas funções também são desempenhadas pelo D₅₀ e E₃₂, respectivamente (Figura 3).

1.5. Bases moleculares do pH ótimo ácido das lisozimas digestivas de *Musca domestica* – MdL1 e MdL2

Uma forma de se tentar identificar os mecanismos moleculares que levaram as lisozimas a se adaptarem à função digestiva é a comparação entre seqüências de lisozimas digestivas e não-digestivas. Essa abordagem tem gerado algumas hipóteses que tentam explicar as bases moleculares do pH ótimo ácido das lisozimas digestivas, porém essas hipóteses ainda devem ser comprovadas experimentalmente (Dobson *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1987; Stewart & Wilson, 1987; Prager *et al.*, 1996).

Uma vez que o pH ótimo de uma enzima é função dos pK_a s dos resíduos catalíticos, uma possível explicação para o pH ótimo ácido das lisozimas digestivas de *Musca domestica* seria uma redução dos pK_a s do D₅₀ e E₃₂.

O doador de prótons apresenta um pK_a próximo de 6,5 nas lisozimas não-digestivas, assim no caso de uma lisozima digestiva uma diminuição no valor desse pK_a poderia torná-lo mais semelhante ao de um glutamato livre, o que reduziria o seu pH ótimo e explicaria a adaptação da MdL1 e MdL2 ao ambiente ácido (pH 3,1) do intestino médio da mosca. Nas lisozimas não-digestivas, o elevado pK_a do doador de prótons é resultado do alojamento desse resíduo em uma cavidade apolar

protegida do solvente, formada pelas cadeias laterais da Q₅₇ (C^β e C^γ do metileno), W₁₀₈, V₁₀₉ e A₁₁₀ (Strynadka *et al.*, 1991). Baseando-se nessas informações estruturais e em experimentos de mutagênese sítio-dirigida, Inoue *et al.* (1992a) observaram uma redução no valor de pK_a do E₃₅ ao trocar W₁₀₈ por resíduos de aminoácidos mais polares (Y e Q). Além disso, substituição do nucleófilo catalítico por sua forma amida também convergiu na redução do pK_a do doador de prótons, indicando que interações eletrostáticas entre os íons carboxilatos do E₃₅ e do D₅₂ contribuem de maneira significativa para a elevação do pK_a da carboxila do doador de prótons catalítico.

Esses resultados explicam os valores de pK_as anormalmente altos para a carboxila do doador de prótons nas lisozimas da família 22, já que tanto as lisozimas de defesa, quanto as lisozimas digestivas apresentam os aminoácidos W₁₀₈, D₅₂ e E₃₅ (numeração da HEWL) (Figura 3). Dessa forma, é de se esperar que outros resíduos, agora presentes apenas nas lisozimas digestivas e ausentes nas lisozimas de defesa, estejam favorecendo a ionização do doador de prótons e contribuindo, conseqüentemente, para a redução dos valores de pK_as do E₃₂ na MdL1 e MdL2.

O alinhamento das seqüências de MdL1 e MdL2 com a de HEWL revela que existe uma serina e uma treonina (aminoácidos mais polares) no lugar da V₁₀₉ e da A₁₁₀ (na HEWL) (Figura 3), de modo a formar um bolsão menos hidrofóbico nessas lisozimas digestivas.

Na HEWL, o grupo carboxila do D₅₂, que atua como nucleófilo durante a catálise, apresenta um valor de pK_a mais próximo de uma carboxila típica. Um dos átomos de oxigênio da sua carboxila é capaz de formar ligações de hidrogênio com duas moléculas de água. O outro oxigênio está envolvido em uma rede de ligações de hidrogênio com a cadeia lateral da N₄₆, D₄₈, S₅₀ e N₅₉ (Strynadka *et al.*, 1991). De

qualquer forma, nas lisozimas digestivas uma diminuição no valor dessa constante de ionização seria possível. Elas não possuem o resíduo de aspartato na posição 48 (D₄₈), o qual é substituído por uma asparagina (Figura 3). Assim, uma possível repulsão gerada pelas cargas negativas das carboxilas do D₄₈ e do nucleófilo na HEWL e que estaria desfavorecendo a ionização desse último, não estaria presente nas lisozimas digestivas, resultando dessa forma, em uma diminuição do pK_a do nucleófilo (D₅₀).

Dados da literatura revelam que esse efeito de repulsão eletrostática alterando o pK_a de carboxilas é perfeitamente possível também no microambiente do nucleófilo catalítico. Caracterização do mutante N₄₆D, produzido via mutagênese sítio-dirigida na seqüência da HEWL (e que equivale à posição 44 nas lisozimas digestivas de *Musca domestica*), revela um pK_a de 4,7 para o aspartato 46. Esse valor alto de pK_a para um aspártico normal (Roxby & Tanford, 1971) é decorrente de repulsão eletrostática estabelecida entre o nucleófilo catalítico (D₅₂) com a forma ionizada do D₄₆ (Inoue *et al.*, 1992c).

Assim, novos efeitos de repulsão eletrostática envolvendo a N₄₆ no microambiente do nucleófilo (D₅₀) e a redução da hidrofobicidade, devido à presença de aminoácidos mais polares (S₁₀₆ e T₁₀₇), no microambiente do doador de prótons podem ser elementos-chave no processo de ionização das carboxilas dos resíduos catalíticos das lisozimas digestivas e, conseqüentemente, no pH ótimo mais ácido das lisozimas digestivas de *Musca domestica*.

Outra hipótese para explicar o pH ótimo das lisozimas digestivas foi proposta por Regel *et al.* (1998). Esses autores observaram que as lisozimas digestivas apresentam um resíduo de serina conservado na posição 98 (S₉₈) (numeração da MdL1) e sugeriram que esse resíduo poderia ter algum papel na alteração do pK_a

Os resíduos marcados com caixa verde e vermelha são possíveis diferenças no microambiente do nucleófilo e do doador de prótons respectivamente nas lisozimas digestivas quando comparadas com a HEWL. A serina 98 conservada nas lisozimas digestivas está marcada em azul. Resíduos indicados por círculos pretos são possíveis resíduos que formam os subsítios do sítio ativo. O asterisco indica resíduo totalmente conservado. MdL1, lisozima 1 de Musca domestica; MdL2, lisozima 2 de Musca domestica; HEWL, lisozima da clara de ovo de galinha.

dos resíduos catalíticos nessas lisozimas. Diferentemente da MdL1 e de outras lisozimas digestivas, a MdL2 não apresenta a “S₉₈”, a qual é substituída por lisina (Figura 3). Portanto, uma caracterização do efeito do pH na atividade dessa enzima poderia indicar se a presença da serina 98 tem de fato influência na determinação do pH ótimo ácido das lisozimas digestivas.

Além da comparação de seqüências de aminoácidos, outra abordagem apropriada para tentar identificar as bases moleculares do pH ótimo das lisozimas digestivas seria uma comparação estrutural entre lisozimas digestivas e não-digestivas. Essa comparação poderia ser apropriada nesse estudo por revelar, por exemplo, a presença da S₁₀₆ e T₁₀₇ no microambiente do doador de prótons catalítico e da N₄₆ no ambiente do nucleófilo, conforme sugerido por alinhamento de seqüências, bem como particularidades do ambiente dos resíduos catalíticos. Além disso, outras diferenças, externas ao sítio ativo, na estrutura terciária de lisozimas digestivas em relação às não-digestiva podem estar relacionadas à adaptação da MdL1 e MdL2 ao ambiente ácido do tubo digestivo de *Musca domestica*.

No entanto, embora seja antigo o estudo regulatório e bioquímico dessas lisozimas, bem como o estudo comparativo de suas propriedades com as de defesa, nenhuma estrutura terciária de lisozimas digestivas encontrava-se disponível no banco de dados de proteína (protein data bank; PDB) (Bemstein *et al.*, 1977). Todas as estruturas determinadas até então (cerca de 507), a partir de 17 diferentes tipos de lisozimas da família 22, estavam associadas à função imune.

2. OBJETIVOS

Essa tese teve por objetivo geral determinar as bases moleculares do efeito do pH na atividade catalítica de lisozimas digestivas de insetos, explicando particularmente o pH ótimo ácido apresentado pelas lisozimas de *Musca domestica*, MdL1 e MdL2.

Para alcançar esse objetivo geral foram estabelecidos alguns objetivos estratégicos:

1. Purificar MdL1 e MdL2 expressas como proteínas recombinantes em levedura *Pichia pastoris*.

2. Caracterizar o efeito do pH na atividade da MdL1 e da MdL2 sobre substrato sintético (4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo; MUQ3) e natural (cápsulas de *Micrococcus lysodeikticus*).

3. Determinar os pK_a s dos resíduos catalíticos da MdL1 e da MdL2 e estabelecer a correlação desses parâmetros com o pH ótimo dessas lisozimas.

4. Determinar a estrutura cristalina da MdL1 e da MdL2.

5. Comparar as estruturas da MdL1 e MdL2 com HEWL, a fim de identificar aminoácidos potencialmente envolvidos na modulação dos pK_a s dos resíduos catalíticos dessas lisozimas digestivas de inseto.

6. Caracterizar o papel dos resíduos identificados no objetivo 5 na modulação do pH ótimo da MdL1 e MdL2, utilizando experimentos de mutagênese sítio-dirigida seguidos pela expressão, purificação e caracterização quanto ao efeito do pH na atividade dessas lisozimas mutantes, determinando, quando necessário, valores de pK_a s dos resíduos catalíticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Procedimentos para manipulação de bactérias

3.1.1. Manutenção e cultivo de bactérias

Para a preparação das construções plasmidiais foi utilizada *Escherichia coli* cepa XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F'* [*proAB⁺ lac^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)*]).

As culturas das bactérias *E. coli* XL1-Blue foram mantidas em meio LB [triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v) pH 7,5] previamente autoclavado contendo glicerol 20% (v/v) a -80°C. Alíquotas desse estoque de XL1-Blue foram semeadas em placas de meio LB-ágar [triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v) e ágar 1,5% (m/v) pH 7,5] sem antibiótico e então incubadas a 37°C, por 16h.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB líquido sem antibiótico. Essa suspensão de células foi incubada a 37°C, por 16h a 160 rpm. Uma fração dessa cultura foi utilizada para obtenção de bactérias competentes.

3.1.2. Preparação de bactérias competentes para transformação por CaCl_2

Cerca de 2 mL do pré-inóculo, como descrito no item anterior, foram transferidos para 100 mL de meio LB líquido previamente autoclavado. As células foram então novamente incubadas em “shaker” a 37°C, por 2-3 horas, a 160 rpm até atingir uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5.

As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação a 4.000 rpm, por 10 minutos a 4°C (GSA SORVALL). O sedimento proveniente da centrifugação foi ressuspenso em 40 mL de

CaCl₂ 0,1 M estéril gelado e incubado em gelo por 1 hora. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. As bactérias foram então ressuspensas em 1 mL de CaCl₂ 0,1 M para uso imediato e para serem congeladas foi adicionado glicerol para concentração final de 15% (v/v) e alíquotas de 100 µL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

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

Aproximadamente 0,1 µg de DNA plasmidial foi adicionado a 100 µL de bactérias *Escherichia coli* XL1-Blue competentes e a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. As células foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio LB previamente autoclavado e a suspensão bacteriana foi incubada a 37°C, por 1 hora a 160 rpm. Esse material foi então semeado em placas de LB-ágar contendo 50 µg/mL de carbenicilina ou 50 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C, por 16h.

Colônias transformantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina ou 50 µg/mL de ampicilina e levadas ao “shaker” a 160 rpm, 37°C, por 16h. Essa suspensão de células foi utilizada para a extração de plasmídeos como descrito adiante.

3.2. Procedimentos para manipulação de leveduras

3.2.1. Manutenção e cultivo de leveduras

Para a expressão das proteínas recombinantes foi utilizada *Pichia pastoris* GS115. A cultura de *Pichia pastoris* foi mantida em meio YPD [extrato de levedura

1% (m/v), peptona 2% (m/v) e glicose 2% (m/v)] contendo glicerol 20% (v/v) a -80°C. Alíquotas desse estoque foram semeadas em placas de meio YPD-ágar [extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v), glicose 2% (m/v) e ágar 2% (m/v)] e incubadas a 28°C, por cerca de 24 horas.

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

3.2.2. Preparação de leveduras competentes para transformação por eletroporação

Cerca de 50 µL de pré-inóculo, obtido como descrito no item anterior, foram transferidos para 500 mL de meio líquido YPD previamente autoclavado. A suspensão de *Pichia pastoris* foi incubada a 28°C, por cerca de 20 horas a 160 rpm, até atingir uma $DO_{600nm} = 1,3-1,5$.

As células foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação a 1.500 xg, por 5 minutos a 4°C (GSA SORVALL). O sedimento foi ressuspensão em 500 mL de água Milli-Q estéril gelada e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais uma vez, só que agora com 250 mL de água Milli-Q estéril gelada. As células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1M estéril gelado e submetidas à centrifugação nas mesmas condições anteriores. Por fim, as células foram ressuspensas em sorbitol 1M estéril gelado e alíquotas de 80 µL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis.

3.2.3. Transformação de leveduras competentes por eletroporação

Aproximadamente 20 µg das construções do pPIC9 com o fragmento de DNA de interesse foram utilizados no processo de transformação por eletroporação em *Pichia pastoris*. Tais construções foram previamente linearizadas com a enzima de restrição *SacI* e então adicionadas separadamente a 80 µL de *Pichia pastoris* competentes. A mistura foi homogeneizada e então transferida para uma cubeta estéril (gene pulser cuvette 0,2 cm, BIO-RAD) resfriada por 5 minutos no gelo. Em seguida, as células juntamente ao DNA linear foram submetidas à eletroporação nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF e 200 Ω (BIO-RAD GenePulser). Imediatamente após o choque elétrico, foram adicionados à cubeta 500 µL de sorbitol 1M estéril gelado e alíquotas de aproximadamente 150 µL foram semeadas em placas MD-água [YNB 1,34% (v/v), biotina 4 X 10⁻⁵% (v/v), glicose 2% (m/v) e água 1,5% (m/v)]. As placas foram incubadas a 28°C, por cerca de 48 horas. As colônias isoladas foram transferidas para placas de YPD-água e incubadas a 28°C por uma noite. O palito utilizado para semear a colônia no YPD-água foi inoculado em YPD líquido por cerca de 48 horas, a 28°C, sob agitação contínua no “shaker” ou por 24 horas após inóculo direto da placa previamente semeada. Posteriormente, seguiu-se a indução da expressão de lisozimas recombinantes com metanol 1%, como será visto no item 3.4.1.

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

3.3. Procedimentos para manipulação e análise de DNA

3.3.1. Procedimentos gerais

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

As reações de digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição (1U/μg de DNA) foram incubadas a 37°C, por uma noite, acompanhadas de tampão apropriado. As reações de ligação do DNA ao vetor de expressão pPIC9 (Invitrogen) foram feitas utilizando a enzima T4 DNA ligase (1U/μg de DNA) e tampão apropriado, a 16°C, por uma noite. Já as reações de ligação ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega) ocorreram a 4°C.

3.3.2. Descrição dos iniciadores

Nas reações de mutagênese sítio-dirigida (ver item 3.3.3), foram utilizados os seguintes iniciadores para que ocorresse a introdução de 6 códonos mutantes na sequência da MdL1:

- Mutação Y₁₃K-A₁₄R

5' c tgc tcg ttg gcc cgt gaa atg **aaa cgc** ttg ggt gta cct aaa tcc g 3';

5' c gga ttt agg tac acc caa **gcg ttt** cat ttc acg ggc caa cga gca g 3'.

- Mutação E₃₀K

5' gg acc tgc att gct **aag** cac gaa tcc tcc tac 3';

5' gta gga gga ttc gtg **ctt** agc aat gca ggt cc 3'.

- Mutação T₄₃R

5' cc aac gtt gtt ggt ccc **cgc** aac tcc aac ggt tcc 3';

5' gga acc gtt gga gtt **gcg** ggg acc aac aac gtt gg 3'.

- Mutação Y₇₁R

5' cc aac ggc cgt ttc tcc **cgc** aac gaa tgc cac ttg 3';

5' caa gtg gca ttc gtt **gcg** gga gaa acg gcc gtt gg 3'.

- Mutação Y₁₁₀R

5' gg tcc acc tgg aag **cgc** tgc agc ggt tcc ttg 3';

5' caa gga acc gct gca **gcg** ctt cca ggt gga cc 3'.

Para a construção dos mutantes na sequência da MdL2, foram utilizados os iniciadores abaixo descritos:

- Mutação N₄₆D

5' ggc tcc ttg aac tcc **gac** ggc tcc cgc gac tat g 3';

5' c ata gtc gcg gga gcc **gtc** gga gtt caa gga gcc 3'.

- Mutação S₁₀₆V

5' ggc tgg act gcc tgg **gtc** acc tgg aag tac tg 3';

5' ca gta ctt cca ggt **gac** cca ggc agt cca gcc 3'.

- Mutação T₁₀₇A

5' gg act gcc tgg tcc **gcc** tgg aag tac tg 3';

5' ca gta ctt cca **ggc** gga cca ggc agt cc 3'.

De modo a gerar um mutante triplo para as posições N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A na sequência da MdL2, foi necessária a utilização de iniciadores com mutações simultâneas na sequência de nucleotídeos que codificam para V₁₀₆ e A₁₀₇:

- 5' ggc tgg act gcc tgg **gtc gcc** tgg aag tac tgt g 3';

- 5' c aca gta ctt cca **ggc gac** cca ggc agt cca gcc 3'.

Todos os iniciadores contendo os códons mutantes (em negrito) possuem temperatura de anelamento maior ou igual a 78°C, cerca de 40% de GC e os códons

mutantes estão localizados no meio do iniciador, com cerca de 10 a 15 bases de sequência correta em ambos os lados. Essas características são importantes para que haja incorporação das mutações com sucesso (Instruções do manual da Stratagene - *QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis kit*).

Os iniciadores 5N (MdL1-5N e MdL2-5N) e 3C (MdL1-3C e MdL2-3C) adicionados às reações em cadeia da DNA polimerase (PCR) permitiram a amplificação do gene da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes clonados no vetor pPIC9 ou no vetor pGEM-T. Eles se pareiam especificamente com a região equivalente ao N-terminal e C-terminal das lisozimas recombinantes respectivamente e correspondem à região marcada em negrito. Foram acrescentados ainda sítios de restrição para *XhoI* e *NotI* respectivamente (em itálico) e uma extensão que visa aumentar a eficiência de digestão pelas respectivas enzimas de restrição (sublinhado).

- MdL1-5N: 5' tct *ctc gag* aaa aga gag gct gaa gct **aag acc ttc act cgc tgc tcg** 3';
- MdL1-3C: 5' atta attc *gcggccgc* **tta aaa aca gtc gtt gat gct** 3';
- MdL2-5N: 5' tct *ctc gag* aaa aga gag gct gaa gct **aag acc ttc act cgt tgc tcc** 3';
- MdL2-3C: 5' atta attc *gcggccgc* **tta gaa gca gtc atc gat gga** 3'.

O iniciador utilizado nas reações de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T contendo o gene da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes foi o T7. Esse pareava com a fita sense do vetor pGEM-T:

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

Já nas construções com o vetor pPIC9, foram utilizados os iniciadores 5AOX e 3AOX. Esses se pareiam com a região 5' e 3' respectivamente do vetor pPIC9. As

seqüências de nucleotídeos desses iniciadores foram desenhadas analisando a seqüência de nucleotídeos do vetor pPIC9 fornecido pelo protocolo “*Pichia expression kit*” da Invitrogen e são eles:

- 5AOX: 5' gac tgg ttc caa ttg aca agc 3';
- 3AOX: 5' gca aat ggc att ctg aca tcc 3'.

Todos iniciadores foram encomendados a Dialab e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT).

3.3.3. Reações de mutagênese sítio-dirigida na seqüência das lisozimas digestivas de *Musca domestica*

3.3.3.1. Reações de mutagênese sítio-dirigida na seqüência da MdL1

Os experimentos de mutação sítio-dirigida no fragmento de DNA que codifica para a MdL1 foram realizados utilizando o método da sobreposição na região mutada de acordo com as instruções de Higuchi *et al* (1988) e Ho *et al.* (1989). A construção pPIC9-MdL1, obtida pelo Dr. Pedro Chimoy em seu pós-doutoramento (2003), foi utilizada como molde.

A reação consiste em duas etapas de reações em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Figura 4). Na primeira etapa são realizadas duas reações de PCR separadas para a introdução de cada mutação. Na reação de PCR1 é utilizado um iniciador específico correspondente ao começo da seqüência (MdL1-5N; em esquema denominado “I₁”) e um iniciador específico mutagênico reverso (em esquema denominado “I₂”). Na reação de PCR2 é utilizado um iniciador específico correspondente ao final da seqüência (MdL1-3C; em esquema denominado “I₄”) e um iniciador específico mutagênico da outra fita de DNA (em esquema denominado “I₃”). Esses iniciadores vão amplificar fragmentos de DNA que se sobrepõem na

região mutada. Na segunda etapa, os fragmentos de DNA produzidos, sobreponíveis na extremidade mutada, são adicionados em quantidades iguais, e utilizados para gerar o cDNA completo com a mutação e com sítios de restrição estratégicos para a clonagem no vetor de expressão.

Para a produção e a amplificação dos fragmentos de DNA oriundos da reação de PCR1 e PCR2 foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase (InvitrogenTM Life Technologies) em reações de 50 μ L contendo os iniciadores a 1 μ M, dNTPs 0,2 mM (para cada nucleotídeo), tampão da Taq DNA polimerase, cloreto de magnésio 1,5 mM e DNA molde em concentração variável (5 a 50 ng). Essas amostras sofreram desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguindo-se uma seqüência de 35 ciclos de desnaturação (30 segundos, 94°C), pareamento iniciador-molde (60 segundos, 60°C) e alongamento (60 segundos, 72°C). Por fim, a solução permaneceu por 7 minutos a 72°C.

Os fragmentos de DNA gerados no PCR1 e PCR2 foram digeridos com a *DpnI* (10U). Essa enzima reconhece uma seqüência de nucleotídeos GATC metilada na adenina. Dessa forma, apenas o plasmídeo molde que está na forma metilada será digerido pela enzima. Já os produtos de PCR obtidos *in vitro* contendo a mutação desejada não estão metilados e nada sofrem pela ação da *DpnI*, permanecendo, conseqüentemente, na mistura reacional.

As condições usadas no PCR para a fusão dos fragmentos gerados foram similares às utilizadas para gerar os fragmentos separadamente, exceto pelo fato de que nessa reação não são mais adicionados iniciadores mutagênicos e sim iniciadores que se anelam nas extremidades da seqüência (MdL1-5N e MdL1-3C; em esquema, denominados I₁ e I₄), bem como 2 ng de cada fragmento de DNA previamente obtido. O fragmento mutado ($\approx$ 369 pb) foi purificado (ver item 3.3.6) e

Figura 4. Diagrama esquemático da mutagênese sítio-dirigida pelo método da sobreposição na região mutada. A primeira etapa envolve a geração independente dos fragmentos de DNA (PCR1 e PCR2), que apresentando extremidades mutagênicas sobreponíveis, são fundidos por uma subsequente reação de PCR (PCR3). Os iniciadores estão representados por linhas com setas indicando a orientação 5'→3' e denotados por I_1 , I_2 , I_3 e I_4 . O sítio de mutagênese é indicado por círculo ovalado (●). Adaptado de McPherson & Moller (2006).

em seguida, ligado enzimaticamente no vetor pGEM-T. O produto da ligação foi transformado na bactéria *E. coli* XL1-Blue (ver item 3.1.3), seguida da seleção com carbenicilina 50 µg/mL e as colônias transformantes obtidas utilizadas na minipreparação de plasmídeos (ver item 3.3.7). Esses plasmídeos foram então submetidos a um seqüenciamento de DNA (ver item 3.3.8) para verificar a incorporação da mutação desejada no fragmento de DNA que codifica para a MdL1.

Essa nova construção foi então utilizada como molde para a introdução de nova mutação pelo mesmo método da sobreposição na região mutada, de modo a gerar no final um mutante sêxtuplo na seqüência da MdL1 (Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R). Subseqüentemente, esse fragmento de DNA foi subclonado no vetor de expressão pPIC9.

A estratégia de transferência do fragmento de DNA que codifica para o mutante sêxtuplo da MdL1 donado no pGEM-T para o pPIC9 envolve a amplificação desse cDNA por PCR (ver item 3.3.4), bem como sua purificação em gel de agarose (ver item 3.3.6). Posteriormente, cerca de 4 µg do vetor pPIC9 e 10 µL do DNA mutante purificado são separadamente tratados com as enzimas de restrição *Xho*I e *Nof*I e então ligados enzimaticamente com a T4 DNA ligase. Células XL1-Blue competentes foram transformadas com todo o produto da ligação e a partir de células transformantes, selecionadas em meio de LB-ágar com 50 µg/mL de carbenicilina ou 50 µg/mL de ampicilina, a construção pPIC9-MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R foi extraída. Esse plasmídeo foi então submetido a um seqüenciamento de DNA (ver item 3.3.8) para confirmar a presença das mutações, bem como verificar se a seqüência de DNA estava em fase de leitura aberta com a seqüência de DNA que codifica para o α-fator, responsável pela secreção da proteína na levedura *Pichia pastoris*. Por fim, o plasmídeo fechado foi linearizado

com a enzima de restrição *SacI* e eletroporado em células competentes de *Pichia pastoris* (ver item 3.2.3).

3.3.3.2. Reações de mutagênese sítio-dirigida na sequência da MdL2

Os experimentos de mutação sítio-dirigida na sequência da MdL2 (N₄₆D, S₁₀₆V, T₁₀₇A e N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A) foram realizados seguindo as instruções do “*kit QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis*” (Stratagene). A construção pGEMT-MdL2 foi utilizada como molde e obtida a partir de uma subclonagem da sequência da MdL2, que havia sido previamente clonada no vetor pPIC9 (pPIC9-MdL2) pelo Dr. Pedro Chimoy em seu pós-doutoramento (2003).

A reação consiste na amplificação em termociclador de toda a extensão do vetor, utilizando dois iniciadores mutagênicos (detalhados no item 3.3.2) que durante a amplificação são incorporados nos produtos da reação (fitas filhas), resultando em vetores linearizados contendo a mutação desejada, seguida da destruição do DNA molde parental por uma endonuclease de restrição dependente de metilação (Figura 5).

Inicialmente o material a ser amplificado sofreu desnaturação por 1 minuto a 94°C. Seguiu-se uma sequência de 18 ciclos, sendo que as condições de cada ciclo eram de 94°C para desnaturação da fita dupla de DNA por 50 segundos, 60°C para pareamento iniciador-molde (anelamento dos iniciadores mutagênicos) por 50 segundos e 68°C para o passo de alongamento (extensão das fitas filhas) por 7 minutos. Por fim, a solução permaneceu por 7 minutos a 68°C.

Posteriormente, os 50 µL da reação de mutagênese sítio-dirigida foram incubados com a enzima *DpnI* (10 U), necessária na digestão do plasmídeo molde metilado que originou os plasmídeos mutantes e que ainda não se encontravam metilados. Todo conteúdo do produto da digestão foi então utilizado para transformar

Figura 5. Diagrama esquemático da mutagênese sítio-dirigida utilizando o “kit QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene). A introdução da mutação caracteriza-se pela amplificação completa do vetor utilizando os iniciadores mutagênicos, seguida da destruição do DNA parental metilado pela DpnI. Os iniciadores estão representados por linhas com setas indicando a orientação 5'→3' e o sítio de mutagênese é indicado por círculo ovalado (●). Adaptado de McPherson & Moller (2006).

células XL1-Blue competentes (ver item 3.1.3) e colônias selecionadas pelo antibiótico utilizadas na extração de plasmídeos (ver item 3.3.7). Esses plasmídeos foram então submetidos a um sequenciamento de DNA para verificar a incorporação da mutação desejada no fragmento de DNA que codifica os mutantes da MdL2 (ver

item 3.3.8). Em seguida, os cDNAs dos mutantes da MdL2 foram subclonados no pPIC9, de forma similar ao previamente descrito para aqueles cDNAs mutantes da MdL1 e em seguida seqüenciados, linearizados e eletroporados em células de *Pichia pastoris*.

3.3.4. PCR em termociclador

Para amplificação das seqüências codificadoras da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies) em reações de 50 µL contendo os iniciadores a 1 µM, dNTPs 0,2 mM (para cada nucleotídeo), tampão da Taq DNA polimerase, cloreto de magnésio 1,5 mM e DNA molde em concentração variável (100 a 200 ng).

As reações foram realizadas em termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene) com desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C. Seguiu-se uma seqüência de 35 ciclos, sendo que as condições de cada ciclo eram de 94°C para desnaturação da fita dupla de DNA por 30 segundos, 55°C para pareamento iniciador-molde (anelamento) por 30 segundos e 72°C para o passo de alongamento (extensão) por um minuto. Por fim, a solução permaneceu por 7 minutos a 72°C.

Como molde nessas reações de PCR foram utilizadas as construções da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes no vetor de clonagem pGEM-T ou no vetor de expressão pPIC9.

Os produtos de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (ver item 3.3.5), e em alguns casos donados em vetores apropriados e posteriormente seqüenciados (ver item 3.3.8).

3.3.5. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado na concentração de 2% (m/v) em tampão TAE [Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0] e a eletroforese foi realizada nesse mesmo tampão com cerca de 80 V e 180 mA. O material amplificado a ser analisado foi misturado com 0,1 volumes de tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,25% (m/v) e glicerol 30% (v/v). Esse corante monitorou a movimentação da amostra e determinou o encerramento da eletroforese. A corrida foi interrompida quando o corante percorreu aproximadamente 4/5 da distância entre o local de aplicação e o limite inferior do gel. Posteriormente, o DNA foi corado utilizando-se solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em transluminador de luz UV a 312 nm (Transilluminator 2020E da Stratagene). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA conhecidos.

3.3.6. Purificação do produto de PCR a partir do gel de agarose

Após eletroforese, o fragmento de DNA proveniente do PCR foi recuperado diretamente do gel de agarose usando o protocolo do produto *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), o qual se baseia na dissolução da agarose em tampão de alta força iônica e ligação do DNA em resina de troca iônica. O procedimento foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

3.3.7. Extração de plasmídeos

Uma vez obtidas colônias transformantes no processo de transformação utilizando células XL1-Blue competentes, essas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com antibiótico e incubadas a 160 rpm, 37°C, por 16h, conforme descrito no item 3.1.3. Essa suspensão de células foi então utilizada para a extração de plasmídeos

(“minipreps”). As “minipreps” foram realizadas com reagentes do kit Wizard[®] Plus SV Minipreps - DNA purification system (Promega) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

A determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida de absorbância a 260 nm, onde $Abs_{260} = 1$ equivale a 50 µg de DNA fita dupla/mL.

3.3.8. Seqüenciamento automatizado de DNA

O seqüenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM[™] (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 2 µL da mistura da reação Big Dye terminator V3.0 (Applied Biosystems), 100 ng de DNA, 9,6 pmol de iniciador, tris-HCl 200 mM pH 9,0, contendo MgCl₂ 5 mM em volume final de 15 µL. A reação foi incubada por 2 minutos a 95°C, seguindo-se 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C em termociclador Applied Biosystems GeneAmp[®] 9700.

Uma vez encerrada a amplificação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio 1 mg/mL, lavadas com etanol 70%, suspensas em formamida, desnaturadas e aplicadas no seqüenciador automatizado. Os três últimos procedimentos foram sempre realizados pela profissional Luci Deise Navarro do Serviço de seqüenciamento desse Departamento. Para a determinação da seqüência do gene da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes foram utilizados iniciadores do vetor de clonagem pGEM-T (T7) e do vetor de expressão pPIC9 (5AOX e 3AOX), conforme previamente descritos (item 3.3.2).

A análise das seqüências geradas foi feita utilizando os programas Chromas Lite versão 2.01 e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.4. Procedimentos para manipulação de proteínas

3.4.1. Expressão da MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes em *Pichia pastoris*

Foram utilizadas colônias de leveduras *Pichia pastoris* previamente transformadas com o vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para MdL1 e MdL2 selvagens e mutantes (MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R, MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V, MdL2-T₁₀₇A e MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A).

As células transformadas foram cultivadas em meio rico YPD, sob agitação contínua de 160 rpm a 28°C, durante 18 h. Em seguida, a suspensão de células foi submetida a uma centrifugação a 2.500 xg, a 4°C, por 5 minutos e o sedimento obtido lavado 3 vezes com água Milli-Q previamente autoclavada. A cada lavagem, o “*pellet*” contendo as células era ressuspenso em água e a suspensão então submetida ao mesmo processo de centrifugação. Posteriormente, o sedimento, isento de YPD, foi transferido para um novo meio denominado BMM [YNB 1,34% (v/v), biotina 4 X 10⁻⁵% (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6] contendo metanol 1% como indutor. A suspensão foi novamente incubada a 28°C, sob agitação de 160 rpm por aproximadamente 24 horas. Foi retirada então uma alíquota de 300 µL, volume suficiente para a realização do ensaio enzimático, usando *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL ou MUQ3 0,10 mM como substrato (ver item 3.4.4). O restante do material foi novamente incubado, após nova adição de metanol (100µL/10mL de meio). Esse procedimento foi repetido após cerca de 48 horas e 72 horas (em alguns casos 96-120 horas), quando a indução foi finalmente encerrada. As condições de crescimento e indução foram baseadas nas instruções do manual “*Pichia expression kit*” publicado pela Invitrogen.

Como nesse sistema de expressão as proteínas recombinantes são secretadas para o meio de cultura, cada suspensão de células induzidas foi

centrifugada a 2.500 xg, a 4°C, por 5 minutos e os meios de cultura (sobrenadante), contendo as proteínas recombinantes, foram recolhidos e armazenados a -20°C até serem submetidos ao processo de purificação.

3.4.2. Purificação das lisozimas recombinantes

Todas as lisozimas recombinantes foram purificadas a partir de uma etapa de precipitação com sulfato de amônio, seguida de uma ou mais cromatografias de troca iônica em sistema FPLC.

3.4.2.1. Precipitação com sulfato de amônio – “Salting-out”

Aos meios de cultura contendo as proteínas recombinantes selvagens, MdL1 e MdL2, foi adicionado sulfato de amônio para concentração final de 0,50 g/mL e 0,65 g/mL respectivamente e a mistura incubada a temperatura ambiente durante 18 horas. Já naqueles contendo os mutantes da MdL1 e MdL2, sulfato de amônio foi adicionado para concentração final de 0,56 g/mL e incubação a 4°C por 4 horas realizada.

Posteriormente a solução foi centrifugada a 10.000 xg, por 1 hora, a 4°C a fim de coletarmos o precipitado que contém as lisozimas em estudo (GSA SORVALL).

O sedimento que contém a MdL1, bem como seu mutante sêxtuplo foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 e em seguida submetido a uma diálise contra esse mesmo tampão, por 18 h, sob agitação, a 4°C. No processo de diálise, três trocas eram realizadas, sendo que em cada troca o material era dialisado contra 100 volumes de tampão.

Já o sedimento contendo a MdL2 e os mutantes MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A foi ressuspenso em tampão citrato-fosfato de sódio (CP) 100 mM pH 3,5. Em seguida, a solução foi submetida a uma diálise contra tampão trietanolamina

20 mM pH 8,0 para o meio contendo a MdL2 e em pH 8,5 para aqueles com os mutantes simples, seguindo as mesmas condições de diálise previamente descritas. O sedimento proveniente da precipitação com sulfato de amônio contendo o mutante triplo da MdL2 (MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A) foi ressuspenso também em tampão CP 100 mM pH 3,5, no entanto, a diálise foi realizada em tampão tris-HCl 20 mM pH 8,5.

3.4.2.2. Cromatografia de troca iônica na Mono-S HR 5/5 em sistema FPLC

Foram utilizados dois tipos de tampões para esse procedimento:

- Tampão A: acetato de sódio 20 mM pH 4,5;
- Tampão B: acetato de sódio 20 mM pH 4,5 contendo NaCl 1M.

O material dialisado contendo a MdL1 e seu mutante foi aplicado na coluna Mono-S HR5/5 previamente equilibrada com o tampão A. Foram feitas injeções de 1 mL, sob um fluxo de 1 mL/min. As proteínas não-retidas foram lavadas com o tampão A, enquanto as retidas foram eluídas utilizando um gradiente de NaCl com 25 mL variando linearmente de 0 a 1 M. A solução de NaCl também foi preparada em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5, conforme mencionado acima (tampão B).

Durante essa cromatografia foram coletadas frações de 1 mL e realizados ensaios de atividade para detectar a presença da lisozima (item 3.4.4), sendo que as frações ativas foram reunidas. Posteriormente o “pool” recolhido foi submetido a uma diálise em tampão A e utilizado no processo de caracterização.

3.4.2.3. Cromatografia de troca iônica na High-Q em sistema FPLC

Foram utilizados dois tipos de tampões para esse procedimento:

- Tampão A: trietanolamina 20 mM pH 8,0;
- Tampão B: trietanolamina 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 1M.

O material dialisado contendo a MdL2 foi aplicado na coluna High-Q previamente equilibrada com o tampão A. Foram feitas injeções de 2 mL, sob um fluxo de 5 mL/min. As proteínas não-retidas foram lavadas com o tampão A, enquanto as retidas foram eluídas utilizando um gradiente de NaCl com 100 mL variando linearmente de 0 a 1 M. A solução de NaCl também foi preparada em tampão trietanolamina 20 mM pH 8,0, conforme mencionado acima (tampão B).

Durante essa cromatografia foram coletadas frações de 3 mL e realizados ensaios de atividade para detectar a presença da lisozima (item 3.4.4) e as frações ativas foram reunidas.

3.4.2.4. Cromatografia de troca iônica na Mono-Q HR 5/5 em sistema FPLC

Nesse procedimento foram utilizados os seguintes tampões:

- Tampão A: trietanolamina ou tris-HCl 20 mM pH 8,5;
- Tampão B: trietanolamina ou tris-HCl 20 mM pH 8,5 contendo NaCl 1M.

O conjunto de frações contendo a MdL2 coletada na cromatografia com a coluna High-Q foi dialisado contra 2 L do tampão A, sendo realizadas duas trocas (1 L para cada troca), por 18 h, sob agitação, a 4°C e a seguir, injetado na coluna Mono-Q HR 5/5 previamente equilibrada com o tampão A acima citado. O sedimento dialisado da precipitação com sulfato de amônio contendo separadamente os mutantes N₄₆D, S₁₀₆V, T₁₀₇A e N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A foi igualmente aplicado na coluna Mono-Q HR 5/5 equilibrada com o tampão A.

Foram feitas injeções de 0,5 mL e 1 mL, sob um fluxo de 1 mL/min para a MdL2 selvagem e mutantes respectivamente. As proteínas não-retidas foram lavadas com o tampão A, enquanto as retidas foram eluídas utilizando um gradiente de NaCl com 25 mL variando linearmente de 0 a 1 M. Essa solução de NaCl foi preparada em tampão trietanolamina ou tris-HCl 20 mM pH 8,5. Durante a

cromatografia foram coletadas frações de 0,5 mL ou 1 mL, sendo que todas as frações contendo atividade de lisozima foram reunidas. Posteriormente o “pool” recolhido foi então submetido a uma diálise em tampão A e utilizado no processo de caracterização.

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

Amostras contendo aproximadamente 4 µg de proteína foram diluídas com o tampão de amostra contendo tris-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 5% (m/v), β-mercaptoetanol 1,3 mM, EDTA 1,0 mM, glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v). As amostras foram aquecidas por 5 minutos em banho de água fervente antes de serem aplicadas em gel de poliacrilamida 14% contendo SDS 1% (m/v) (Laemmli, 1970). A eletroforese ocorreu sob voltagem constante de 200 V e a coloração das proteínas foi feita com nitrato de prata (Blum *et al*, 1987).

Os valores de Mr foram calculados de acordo com Shapiro *et al.* (1967) usando os seguintes padrões de massa molecular em daltons: lisozima de galinha (Mr 14.400), inibidor de tripsina (Mr 21.500), anidrase carbônica (Mr 31.000), ovoalbumina (Mr 45.000), albumina sérica bovina (Mr 66.200) e fosforilase b (Mr 97.400).

3.4.4. Determinação da concentração de proteína e ensaio de atividade enzimática

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) usando ovoalbumina como padrão.

A atividade de lisozima foi determinada medindo o decréscimo de turbidez da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL contendo ou não NaCl 150 mM em tampão CP 100 mM pH 3,5, totalizando um volume de reação de 250 µL. A

reação foi interrompida adicionando 500 μ L de carbonato de sódio 0,5 M e a absorbância foi medida a 650 nm. Uma unidade de atividade de lisozima é a quantidade de enzima que causa mudança na absorbância do meio de 0,01 U/minuto (Lemos *et al.*, 1993).

Utilizando o 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3), a velocidade de hidrólise foi determinada incubando a enzima com o substrato fluorogênico em concentração inicial de 0,10 mM ou 0,15 mM (previamente ressuspenso em água) em tampão CP 100 mM pH 3,5. A reação foi interrompida adicionando 1 mL de solução de glicina 100 mM/NH₄OH pH 10,5 e a metilumbeliferona (Me-U), convertida à sua forma aniônica, detectada fluorimetricamente em comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 450 nm (Yang & Hamaguchi, 1980). Curva padrão da Me-U foi realizada, o que nos permitiu correlacionar o valor de emissão de fluorescência com a quantidade de produto formado nos ensaios de atividade. Uma unidade de atividade enzimática (1 U) é definida como a quantidade de enzima capaz de clivar 1 μ mol de ligações por minuto. Como a razão de MUQ3 clivado/Me-U formado é igual a 1, uma unidade de enzima pode ser, nesse caso, definida como aquela quantidade que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto de reação.

Em cada determinação da atividade enzimática, incubações da mistura, substrato e do material contendo a enzima, foram realizados a 30°C para quatro diferentes períodos de tempo.

3.4.5. Caracterização cinética das lisozimas recombinantes

3.4.5.1. Efeito do pH e da força iônica na atividade catalítica das lisozimas recombinantes frente ao substrato *Micrococcus lysodeikticus* e MUQ3

Frente ao *Micrococcus lysodeikticus*, o efeito de pH e força iônica do meio na atividade das lisozimas recombinantes puras foram determinados usando os seguintes tampões: glicina-HCl (pH 2-3,5), acetato de sódio (4,0-5,5), fosfato de sódio (6,0-7,5), preparados com forças iônicas de 0,02, 0,07, 0,1 e 0,2 (Miller & Golder, 1950). Para avaliação do efeito do pH na atividade catalítica da HEWL foram utilizados ainda os tampões: trietanolamina (pH 7,5 – 8,5) e ácido bórico (pH 9 – 9,5), preparados na força iônica de 0,1. Frente ao substrato sintético (MUQ3), os tampões CP 100 mM com pHs variando de 3 a 7 (Gomori, 1955) (cerca de 0,2 unidades de pH entre um tampão e outro, totalizando 19 tampões) e forças iônicas iguais a 0,25 e 0,071 foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática das lisozimas digestivas selvagens em função do pH e da força iônica.

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.4.4. Para cada pH com força iônica definida foi feito um ensaio de 4 tempos.

Com o objetivo de corrigir as mudanças de pH decorrentes da diferença de temperatura entre a preparação do tampão e o ensaio de atividade, o pH do meio foi medido a 30°C.

3.4.5.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito de concentração do *Micrococcus lysodeikticus* na atividade da MdL1 e MdL2 foi medido no pH ótimo em diferentes forças iônicas (0,02; 0,07; 0,1 e 0,2). Os parâmetros cinéticos ($K_{m \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$) foram determinados usando-se 10 diferentes concentrações de substrato (0,1 a 2 mg/mL).

O efeito de concentração de MUQ3 na atividade da MdL1, MdL2, mutantes da MdL2 e da HEWL foi medido em toda faixa de pH, de 2,6 a 7 (Gomori, 1955). Os parâmetros cinéticos isolados ($K_{m \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$) ou $V_{\text{max app}}/K_{m \text{ app}}$ foram determinados usando-se 7 diferentes concentrações de substrato para a HEWL (0,7

μM , 1,3 μM , 2,6 μM , 3,9 μM , 5,3 μM , 6,6 μM e 7,9 μM), 9 diferentes concentrações de substrato para a MdL1 (0,5 μM , 1,3 μM , 2,6 μM , 5,3 μM , 10,5 μM , 15,8 μM , 21 μM , 26,3 μM e 31,5 μM) e 13 diferentes concentrações de substrato para a MdL2 selvagem e mutantes (3,1 μM , 6,3 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM , 175 μM , 200 μM , 225 μM , e 250 μM).

Os parâmetros cinéticos isolados foram ajustados na equação de Michaelis-Menten, usando-se o programa Enzfitter (Elsevier – Biosoft, Cambridge – UK).

3.4.5.3. Determinação das constantes de ionização (pK_a) dos resíduos catalíticos das lisozimas recombinantes e da HEWL

As constantes de ionização dos resíduos catalíticos da forma livre das lisozimas (pK_e) e da enzima ligada ao substrato (complexo ES) (pK_{es}) foram determinadas mediante ajuste dos valores de $V_{\text{max app}}/K_{\text{m app}}$ e $V_{\text{max app}}$ obtidos em diferentes pHs nas equações abaixo descritas, usando o programa Enzfitter (Elsevier – Biosoft, Cambridge – UK):

$$V_{\text{max app}}/K_{\text{m app}} = V_{\text{max}}/K_{\text{m}}/(1+([\text{H}^+]/K_{e1})+(K_{e2}/[\text{H}^+]))$$

$$V_{\text{max app}} = V_{\text{max}}/(1+([\text{H}^+]/K_{es1})+(K_{es2}/[\text{H}^+]))$$

$V_{\text{max app}}/K_{\text{m app}}$ e $V_{\text{max app}}$ correspondem a $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ e V_{max} relativos em determinado pH.

Os valores de $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ou V_{max} independente do pH e os valores das constantes de ionização dos resíduos catalíticos livres (K_{e1} e K_{e2}) ou ligados ao substrato (K_{es1} e K_{es2}) precisam ser inicialmente estimados para que o programa realize o ajuste dos dados experimentais na equação.

3.4.5.4. Efeito do pH na estabilidade da MdL1 e MdL2 recombinantes

A estabilidade da MdL1 e da MdL2 recombinantes em diferentes valores de pH variando de 3 a 7 foi verificada incubando a 30°C amostras de enzima em tampões CP 100 mM, por período de tempo igual àquele usado no ensaio da atividade enzimática. Posteriormente, a atividade remanescente da enzima foi determinada em tampão CP 200 mM pH 4, usando *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL como substrato. A reação lítica foi interrompida utilizando uma solução de Na₂CO₃ 0,5 M e o decréscimo de turbidez foi lido no espectrofotômetro a 650 nm.

3.4.6. Caracterização estrutural das lisozimas recombinantes

3.4.6.1. Procedimentos prévios aos ensaios de cristalização da MdL2

Para os experimentos cristalográficos, a expressão da MdL2 foi feita em larga escala (a partir de 2L de meio de cultura) e a purificação realizada utilizando além da precipitação com sulfato de amônio, apenas uma etapa de cromatografia de troca iônica na coluna High-Q. Posteriormente, iniciou-se o processo de concentração da amostra utilizando o sistema Amicon (modelo 3 do “*kit Centriplus Concentrators*®” da Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, o material concentrado foi submetido a diálise contra 3 L de tampão MES 10 mM pH 5,5, sendo realizadas três trocas (1 L para cada troca), por 18 horas, sob agitação, a 4°C.

Após a diálise, a determinação da concentração de MdL2 recombinante purificada foi feita por espectrofotometria (absorbância a 280 nm), utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 37.890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ calculado para a MdL2 pelo Programa ExPASy - ProtParam tool (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). À cubeta de quartzo de 500 µL, foram adicionados 5 µL da solução protéica em 495 µL

de uma solução contendo cloreto de guanidina 6 M em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 6,5. Essa solução foi utilizada como branco.

3.4.6.2. Ensaios de cristalização

Amostras de MdL2 recombinante (9,8 mg/mL) foram submetidas a testes de cristalização usando o método de difusão de vapor “*sitting-drop*” (gota sentada) a 291K. A triagem inicial foi realizada utilizando os “*kits*” comerciais “*Crystal Screen*” e “*Crystal Screen II*” da Hampton Research[®]. À placa Cryschem[™] foram adicionados 1 µL da proteína e 1 µL das soluções dos referidos “*kits*” previamente adicionadas (300 µL) no reservatório da placa. As condições que mostraram o aparecimento de estruturas cristalinas foram refinadas. O refinamento consistiu na variação do pH dos tampões, da concentração de agentes precipitantes, do volume da gota e na adição de aditivos.

A estrutura cristalina da MdL2 foi proveniente da variação da condição 40 do “*kit Crystal Screen*” da Hampton Research[®] [isopropanol 20% (v/v), PEG 4000 20% (m/v), citrato de sódio 0,1 M pH 5,6]. A gota continha volume final de 3 µL, composto de 1,5 µL da solução protéica, 1,3 µL da solução do reservatório, a qual era composta de 28% de isopropanol, 21% de PEG 4000, citrato de sódio 0,115 M pH 4,2 e 0,2 µL da solução de número 26 do *kit “Crystal Screen”* [acetato de amônio 0,2 M, 2-metil-2,4-pentanediol 30% (v/v), citrato de sódio 0,1 M pH 5,6] como aditivo.

3.4.6.3. Coleta e processamento de dados da difração de raios-X de um cristal de MdL2 recombinante e “faseamento”

Dados cristalográficos foram coletados na linha de luz D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP. Essa linha de luz

é equipada com um detector MARCCD, que possui uma superfície circular sensível aos raios-X de 165 mm de diâmetro associado a um goniômetro MarDTB.

O cristal de MdL2 foi capturado diretamente da placa CryschemTM com o auxílio de um “loop” (Hampton Research) e transferido para uma solução crioprotetora composta de 20% de glicerol, 9% de PEG 4000, 12% de isopropanol e citrato de sódio 0,05 M pH 4,2. O cristal ficou imerso nessa solução por 5 a 10 segundos. Posteriormente, ele foi colocado em contato com nitrogênio líquido a 100K. O nitrogênio líquido fica estocado em reservatório e existe um condutor que joga um fluxo dessa substância no cristal durante toda a aquisição de dados de modo a minimizar lesões no cristal devido à exposição aos raios-X.

A coleta de dados foi realizada usando o método da oscilação com variação de 1° por imagem por 2 minutos de exposição. Foram coletadas 127 imagens. O comprimento de onda da radiação foi de aproximadamente 1,43 Å.

O processamento de dados, incluindo indexação, integração e escalonamento, foi feito usando o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) e o CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). O modelo inicial da MdL2 (faseamento) foi obtido por substituição molecular usando o programa MOLREP (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Vagin & Teplyakov, 1997), sendo tal modelo construído pelo programa “O” (Jones *et al.*, 1991). Foram utilizadas para a construção desse modelo coordenadas atômicas de uma molécula de MdL1 recombinante sem moléculas de água e ligantes.

3.4.6.4. Refinamento e determinação da estrutura terciária da MdL1 e MdL2

Ensaio de cristalização da MdL1 e dados de difração de raios-X foram previamente realizados e coletados pelo Prof. Sandro Marana (Marana *et al.*, 2006). A coleta dos dados, de forma semelhante àquela da MdL2, foi feita na linha de luz

D03B-MX1 no LNLS a uma resolução máxima de 1,9 Å. Os cristais apresentaram parâmetros de célula unitária de $a=36,52$ Å, $b=79,44$ Å, $c=45,20$ Å, $\alpha=\gamma=90^\circ$ e $\beta=102,97^\circ$ e grupo espacial $P2_1$ (Marana *et al.*, 2006). Ademais, o problema das fases foi resolvido também por substituição molecular usando, nesse caso, a estrutura da HEWL (PDB com o código 1hew) (Cheetham *et al.*, 1992) como modelo.

Inicialmente foi realizado para a MdL1 e MdL2 um ciclo de refinamento “*simulated annealing*” utilizando o programa CNS versão 1.1 (Brunger *et al.*, 1998). Em seguida, foram realizados vários ciclos de refinamento utilizando o programa REFMAC5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Murshudov *et al.*, 1997) e as modificações manuais introduzidas no modelo atômico durante os ciclos de refinamento foram feitas pelo programa *O* (Jones *et al.*, 1991), de acordo com os mapas de densidade eletrônica $2F_o-F_c$ e F_o-F_c (com contornos de aproximadamente 1 e 3 σ respectivamente) que guiaram o posicionamento dos átomos. A qualidade do processo foi assegurada pelo uso do R_{free} para 5% das reflexões. Foi feito o refinamento da estrutura de 2 monômeros (tanto para a MdL1, quanto para a MdL2) que estavam na unidade assimétrica.

Moléculas de água foram adicionadas pelo Programa ARP/WARP (Lamzin & Wilson, 1997) dentro do REFMAC5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Murshudov *et al.*, 1997). Posteriormente à adição automática de moléculas de água, adição manual também foi realizada durante análise visual das estruturas.

O modelo final foi validado pelo PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) e com as ferramentas viáveis no Programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

3.4.6.5. Análise estrutural da MdL1 e MdL2

As imagens foram criadas usando o PyMOL (DeLano, 2002) e o programa DeepView/Swiss PdbViewer (versão 3.7) (Guex & Peitsch, 1997) para complementar

a análise estrutural realizada previamente pelos programas gráficos O (Jones *et al.*, 1991) e COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

HEWL, MdL1 e MdL2 foram superpostas e estruturalmente alinhadas usando o COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

Áreas de superfície de aminoácidos acessíveis ao solvente foram calculadas usando o programa GETAREA 1.1 (http://www.utmb.edu/getarea/area_form.html).

Cálculos da área de interface entre macromoléculas e predição de prováveis estruturas quaternárias foram realizados pelo programa PISA no http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html (Krissinel & Henrick, 2005; 2007).

3.4.7. Caracterização das lisozimas recombinantes por outros métodos analíticos

3.4.7.1. Cromatografia da MdL1 e MdL2 em coluna de filtração em gel

Com a finalidade de determinar a massa molecular e o estado de agregação da MdL1 e da MdL2, cromatografia de filtração em gel foi realizada usando a coluna Tricorn Superose 12 (Amersham Biosciences) em sistema FPLC. A coluna com dimensões de 10 mm X 300 mm foi equilibrada com 72 mL de tampão tris-HCl 0,2 mol/L pH 7,5, previamente filtrado e deaerado, a um fluxo de 0,5 mL/min.

Curva de calibração foi feita usando 6 proteínas com massas moleculares conhecidas, presentes na mistura A ou B. Mistura A contendo ferritina (0,3 mg/mL), ovalbumina (4 mg/mL) e ribonuclease A (3 mg/mL) e mistura B contendo aldolase (4 mg/mL), anidrase carbônica (3 mg/mL) e aprotinina (3 mg/mL) foram injetadas (100 µL para cada mistura) na coluna sob fluxo de 0,5 mL/min, sendo que as proteínas contidas em cada mistura foram eluídas em 36 mL do referido tampão. Para determinação do volume morto da coluna, 100 µL de Blue Dextran a 1 mg/mL foram

injetados na coluna. O volume de eluição desse corante, correspondente ao volume morto da coluna, foi monitorado (como nas proteínas) pelo surgimento de um pico a 280nm. A curva de calibração foi feita plotando K_{av} *versus* o log da massa molecular das proteínas conhecidas, de modo que $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$ (V_e =volume de eluição; V_o =volume morto da coluna e V_c =volume da coluna).

As lisozimas digestivas 1 e 2 (100 μ L) foram injetadas na coluna e eluídas no mesmo tampão. Durante a cromatografia, frações de 0,5 mL foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 72 minutos. Ensaios de atividade para detectar a presença da lisozima nas frações recolhidas foram realizados (ver item 3.4.4) e as frações ativas reunidas. Como forma de controle também foram injetados 100 μ L de HEWL (1mg/mL).

3.4.7.2. Experimentos de Dicroísmo Circular (CD) da MdL2 e de seus mutantes

Visando avaliar uma possível alteração na estrutura tridimensional da MdL2 devido à substituição individual e conjunta dos resíduos N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ por D, V e A respectivamente, tal enzima selvagem e os mutantes MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V, MdL2-T₁₀₇A e MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A foram analisados por CD utilizando um espectropolarímetro J-720 (Jasco, Inc; Central Analítica do Instituto de Química da USP). As amostras de proteínas puras (cerca de 1 mL de material) foram dialisadas em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9 por 18 h, sob agitação, a 4°C. No processo de diálise, três trocas foram realizadas, sendo que em cada troca os materiais foram dialisados contra 2L de tampão. Duas amostras de MdL2 (4,75 μ M e 5 μ M) e uma amostra de cada mutante (5 μ M) foram utilizadas. A concentração das amostras foi determinada mediante leitura de absorbância a 280 nm, conforme item 3.4.6.1.

Os espectros de CD foram obtidos como a média de cinco leituras com varreduras de 190-260 nm, utilizando cubetas de quartzo de 0,01cm de caminho óptico. Os dados foram expressos como valores de elipticidade molar residual $[\theta]$ ($\text{grau} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$), calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{[\text{elipticidade } \theta \text{ (mgrau)} \times \text{massa molecular da proteína (D)}]}{[10 \times \text{caminho da cubeta (cm)} \times \text{concentração da proteína (mg/mL)} \times (\text{n}^\circ \text{ aminoácidos} - 1)]}$$

Todos os espectros de CD foram corrigidos pela contribuição do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9.

3.4.7.3. Fluorescência intrínseca da MdL1, MdL2 e de seus mutantes

O experimento de fluorescência intrínseca para as enzimas recombinantes purificadas foi também utilizado para avaliar possíveis alterações conformacionais, bem como perda da estrutura tridimensional após substituição de aminoácidos na sequência das lisozimas digestivas.

O espectro de emissão de fluorescência foi obtido como a média de cinco leituras, na faixa de comprimento de onda de 291,4 a 448,6 nm e comprimento de onda de excitação de 280 nm, utilizando o Espectrofluorímetro Hitachi F4500 termostatizado a 30°C. Todas as proteínas, em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9, estavam a 2 μM , exceto o mutante sêxtuplo da MdL1 que se encontrava a 0,9 μM . Todos os espectros de emissão de fluorescência foram corrigidos pela contribuição do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9.

Como forma de controle, foi coletado também o espectro de emissão da MdL1 tratada com β -mercaptoetanol 284 mM e aquecida por cinco minutos em banho de água fervente. Esse espectro de emissão foi corrigido pela contribuição do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9 com β -mercaptoetanol 284 mM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação da MdL1 e da MdL2 recombinantes

Colônias de *Pichia pastoris* que expressam a MdL1 e a MdL2 foram separadamente cultivadas em meio rico e em seguida induzidas em meio contendo metanol 1% por aproximadamente 72 horas. Como nesse sistema de expressão a proteína recombinante é secretada, o meio de cultura das leveduras induzidas foi utilizado como material inicial para a purificação dessas lisozimas recombinantes.

Assim, a partir do meio de cultura contendo a MdL1 foi realizada inicialmente precipitação de proteínas com sulfato de amônio na concentração final de 0,5 g/mL. O sedimento proveniente dessa precipitação foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 e submetido a diálise contra esse mesmo tampão. A diálise foi realizada com o objetivo de remover principalmente íons sulfato e amônio, uma vez que na etapa de precipitação foi utilizada concentração extremamente alta de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, próxima à sua concentração de saturação a 25°C (0,767 g/mL) (The Merck Index, 1989) e esse poderia interferir na cromatografia seguinte. Além disso, a presença de sulfato de amônio pode afetar outros experimentos como, por exemplo, a determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford, a qual é profundamente modificada para valores mais altos na presença desse sal.

Em seguida, o sedimento ressuspenso e dialisado contendo a MdL1 foi aplicado na coluna Mono-S para cromatografia de troca catiônica em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5. A figura 6A mostra que a MdL1 foi eluída em uma concentração de NaCl de aproximadamente 0,5 M. Em todas as frações coletadas durante a cromatografia foi feito o rastreamento da presença de lisozima por meio de ensaio de atividade, usando *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL como substrato, por

30 minutos. As frações contendo a MdL1 foram reunidas e dialisadas em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 e rendimento de cerca de 4,5 mg de proteína pura a partir de 1 L de meio de cultura foi obtido.

Para a MdL2, foi também utilizada como etapa inicial do processo de purificação uma precipitação de proteínas com sulfato de amônio (0,652 g/mL), de modo similar ao realizado para a MdL1. No entanto, nesse caso o sedimento proveniente do “*salting-out*” foi ressuspenso em tampão CP 100 mM pH 3,5 e submetido a diálise contra tampão trietanolamina 20 mM pH 8,0. Em seguida, o sedimento ressuspenso e dialisado contendo a MdL2 foi aplicado na coluna High-Q para cromatografia de troca aniônica em tampão trietanolamina 20 mM pH 8,0. A figura 6B mostra que a MdL2 foi eluída em uma concentração de NaCl de aproximadamente 0,2 M. As frações contendo atividade de lisozima foram reunidas, dialisadas e submetidas à cromatografia de troca aniônica na coluna Mono-Q. Como pode ser visto na figura 6B, na cromatografia de troca iônica na coluna High-Q a MdL2 foi eluída bem no início do gradiente. Por isso, essa segunda cromatografia em coluna Mono-Q foi realizada em pH 8,5 (Figura 6C), a fim de evitar o risco de que parte da MdL2 fosse eluída antes mesmo do gradiente de NaCl e do início da coleta de frações. Como pode ser visto na figura 6C, a MdL2 foi eluída com cerca de 0,5 M de NaCl e o “*pool*” ativo contendo 1 mg de enzima pura (a partir de 500 mL de meio de cultura) foi recolhido.

A pureza das lisozimas digestivas foi atestada pelo SDS-PAGE (Laemli *et al.*, 1970) e coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987), revelando a presença de uma única banda com valores de 14.200 D e 15.300 D para a MdL1 e MdL2 respectivamente (Figuras 6D e 6E). Esses valores são similares a maioria das lisozimas, incluindo lisozimas do intestino médio de larvas de *M. domestica* (lisozima

1 - Mr 15.000 D - Lemos *et al.*, 1993) e *Drosophila melanogaster* (Mr 13.700 D - Regel *et al.*, 1998) e lisozima de galinha (Mr 14.500 D – Jollès, 1964).

Figura 6. Purificação das lisozimas 1 e 2 de *Musca domestica* expressas em *Pichia pastoris*. Em A, está representada a cromatografia de troca iônica do meio de cultura contendo a lisozima 1. Foi aplicado nessa cromatografia material correspondendo ao meio de cultura precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g/mL), ressuspensão e dialisado em tampão

acetato de sódio 20 mM pH 4,5. Foi usada coluna aniônica Mono-S HR 5/5. Em B e C, estão representadas as cromatografias de troca iônica para a purificação da lisozima 2. Material correspondendo ao meio de cultura precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,652 g/mL), ressuspenso em tampão CP 100 mM pH 3,5 e dialisado em tampão trietanolamina 20 mM pH 8,0 foi aplicado na coluna High-Q (B). O conjunto das frações contendo lisozima 2 eluída da coluna High-Q foi dialisado em trietanolamina 20 mM pH 8,5 e aplicado na coluna Mono-Q (C). A atividade das lisozimas 1 e 2 de Musca domestica (♦) foi detectada usando como substrato Micrococcus lysodeikticus 1 mg/mL em tampão CP 200 mM pH 3,5 e em tampão CP 100 mM contendo NaCl 150 mM pH 3,5 respectivamente e a turbidez lida em 650 nm. O “pool” de frações que foi recolhido está representado pelos losangos vermelhos. A linha azul representa o gradiente de NaCl 1 M preparado em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 para a lisozima 1 e em tampão tritanolamina 20 mM pH 8,0 e 8,5 para a lisozima 2. Em D e E, análise por SDS-PAGE da lisozima 1 e da lisozima 2 purificadas respectivamente. Foi usado gel 14% em poliacrilamida e coloração com nitrato de prata. Nas raias localizadas a direita estão marcadores de massa molecular conhecidos.

4.2. Caracterização do efeito do pH e da força iônica na atividade da MdL1 e MdL2

Uma vez purificadas, iniciou-se o processo de caracterização da MdL1 e MdL2 recombinantes. Inicialmente, foi avaliado o efeito do pH em diferentes forças iônicas ($\mu = 0,2, 0,1, 0,07$ e $0,02$) na atividade catalítica de ambas enzimas. Como pode ser visto na Figura 7, MdL1 e MdL2 são completamente estáveis na faixa de pH que varia de 3,0 a 7,3.

Os gráficos da figura 7, expressos em atividade relativa (%) em função do pH em diferentes forças iônicas, mostram que a MdL1 e MdL2 recombinantes exibem pH ótimo ácido frente ao *Micrococcus lysodeikticus*, mas esse parâmetro altera-se em função da força iônica do meio reacional. Em força iônica mais baixa, $\mu = 0,02$, a

Figura 7. Atividade das lisozimas 1 (A) e 2 (B) em função do pH e da força iônica frente às cápsulas de *Micrococcus lysodeikticus* e efeito do pH na estabilidade das mesmas.

As forças iônicas (μ) usadas foram de 0,2 ($\blacklozenge$), 0,1 ($\blacksquare$), 0,07($\blacktriangle$) e 0,02 ($\times$). Cada ponto da figura representa um ensaio de 4 tempos, em que as lisozimas 1 e 2 puras foram incubadas com o substrato *M. lysodeikticus* 1 mg/mL ressuspendido nos tampões com μ e pH especificados. A estabilidade ao pH foi verificada medindo a atividade remanescente das enzimas ($\bullet$) em tampão CP 200 mM pH 4, após pré-incubação das lisozimas em tampões CP 100 mM com diferentes valores de pH, por 15 minutos, a 30°C.

atividade máxima ocorre em pH 4,8 e 4,7 para MdL1 e MdL2 respectivamente, ou seja, uma unidade de pH a mais que o pH ótimo dessas enzimas na maior força iônica, $\mu = 0,2$ (3,8 e 3,7 respectivamente). Além disso, é importante verificar que a atividade catalítica de ambas lisozimas diminui à medida que a força iônica do meio aumenta (Figura 7). Esse comportamento, pH ótimo ácido que decresce com o aumento da força iônica simultaneamente a uma redução de atividade, já havia sido observado para a MdL1 (Lemos *et al.*, 1993). Isso mostra que a MdL1 recombinante é idêntica àquela purificada diretamente do inseto e também que a MdL2 tem comportamento semelhante à MdL1.

Assim, sabendo que a MdL2 apresenta um resíduo de lisina na posição equivalente à serina 98 na MdL1, esse resultado refuta a hipótese de Regel *et al.* (1998), segundo a qual esse resíduo de serina na posição 98 seria responsável pelo pH ótimo ácido da MdL1 e de outras lisozimas digestivas (Cancado *et al.*, 2008). Na verdade, uma comparação de seqüências de lisozimas revelou que a “S₉₈” está também presente em lisozimas não-digestivas de ovos de aves, incluindo a HEWL, que não apresenta um pH ótimo ácido (Figura 3; em introdução).

Essa alteração da atividade catalítica observada para as lisozimas digestivas parece ser proveniente de um efeito da força iônica no $V_{\max \text{ app}}$ e no $K_m \text{ app}$. Como pode ser visualizado na figura 8A, o aumento da força iônica resulta em uma diminuição similar do $V_{\max \text{ app}}$ para a MdL1 e MdL2, o que sugere que em alta concentração iônica, complexos ES pouco ou não produtivos estejam sendo formados. Esses complexos podem resultar de uma ligação inefetiva entre E e S, já que em em alta concentração iônica, as cargas dessas lisozimas e de seus substratos foram parcialmente “blindadas”, assim enfraquecendo a interação eletrostática entre elas. Em acordo com essa observação, é possível verificar que no

pH ótimo e em alta força iônica, MdL1 e MdL2 apresentam $K_{m\ app}$ mais elevados (Figura 8B) (Cancado *et al.*, 2008), essas enzimas estão carregadas positivamente (pI 7,7 e 6,7 respectivamente) e a cápsula bacteriana carregada negativamente (Price & Pethig, 1986).

Observa-se ainda que a afinidade de ligação da MdL1 ao substrato é maior que aquela estabelecida pela MdL2 independentemente da força iônica (Figura 8B) (Cancado *et al.*, 2008). Alinhamento de seqüência mostra que os aminoácidos que formam os subsítios de ligação ao substrato da MdL1 e da MdL2 são altamente conservados (Figura 3; em introdução). Por isso, diferenças na afinidade dessas lisozimas digestivas com a bactéria não podem ser explicadas baseando-se em alterações dos resíduos que formam o sítio ativo. Diferenças no pI indicam que a MdL2 é menos positivamente carregada que a MdL1, sugerindo que interações eletrostáticas entre a MdL2 e *Micrococcus lysodeikticus* estariam mais enfraquecidas do que aquelas interações com a 1. Assim, é possível que interações eletrostáticas envolvendo resíduos carregados, distribuídos na estrutura das lisozimas digestivas da mosca, tenham algum papel na determinação da afinidade de ligação dessas enzimas com a bactéria.

Assim como parece explicar a diminuição da atividade das enzimas por meio da redução do $V_{max\ app}$ e do aumento do $K_{m\ app}$ (Figura 8), esse efeito de força iônica sobre o substrato e sua interação com a enzima podem também justificar o deslocamento de pH ótimo para valores mais altos em força iônica mais baixa (Figura 7). Segundo Maurel e Douzou (1976), o campo eletrostático exercido pela estrutura polianiónica da parede celular de *Micrococcus sp* influencia as propriedades físico-químicas do microambiente onde a reação catalítica ocorre propiciando, por exemplo, acúmulo de H^+ na superfície da cápsula, com

Figura 8. Efeito da força iônica (μ) nos parâmetros cinéticos $V_{max\ app}$ (A) e $K_{m\ app}$ (B) da lisozima 1 (▲) e da lisozima 2 (◆) de *Musca domestica*. Determinação da atividade foi realizada no pH ótimo para cada força iônica (μ) usando suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (1 mg/mL) como substrato. As mesmas quantidades de enzimas foram usadas em todas determinações.

conseqüente diminuição do pH local. Essa capacidade de atrair eletrostaticamente os prótons (H^+) para a superfície da cápsula é reduzida com o aumento de íons (aumento de μ) no meio devido a um efeito de “blindagem” entre as cargas. Dessa forma, em alta força iônica, o potencial eletrostático é diminuído e o pH local

aproxima-se do pH da solução, ao passo que em baixas forças iônicas (alto potencial eletrostático) o pH local sofre um deslocamento para valores mais baixos na superfície da cápsula bacteriana quando comparado com o pH da solução. Como o pH é expresso em termos de pH da solução, em baixa força iônica, a atividade catalítica máxima é “aparentemente” observada em valores de pH mais altos do que o observado em altas forças iônicas (Figura 7).

Por outro lado, essa modificação de pH ótimo nas diversas forças iônicas pode também ser explicada devido a um efeito de força iônica sobre as constantes de ionização dos resíduos catalíticos. Assim, com o intuito de verificar essas duas possibilidades, o comportamento catalítico das lisozimas digestivas da mosca em função da força iônica e pH foi avaliado com o oligossacarídeo 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3), um substrato não-carregado e pequeno quando comparado com a cápsula de bactéria, que gera pouco ou nenhum potencial eletrostático no meio. Foram utilizados para essa determinação 19 tampões CP 100 mM (Gomori, 1955), nos pHs de 3 a 7, variando cerca de 0,2 unidades de pH entre cada tampão, nas forças iônicas de 0,25 e 0,071.

A atividade relativa (%) em função do pH, nas forças iônicas iguais a 0,25 e 0,071, mostra que as lisozimas recombinantes exibem pH ótimo ácido, no entanto esse parâmetro não é alterado em função da força iônica (Figura 9A e 9B). Além disso, é importante verificar que a atividade catalítica de ambas lisozimas não é reduzida quando a força iônica do meio reacional é aumentada de 0,071 para 0,25. Esses resultados são coerentes com as observações de que a natureza polianiônica da parede celular da bactéria usada como substrato no ensaio enzimático seria a responsável pela mudança de pH ótimo e atividade catalítica das enzimas em estudo

Figura 9. Atividade das lisozimas 1 (A) e 2 (B) de *Musca domestica* e da lisozima da clara de ovo de galinha (C) em função do pH e da força iônica frente ao substrato sintético 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3). As μ usadas foram 0,25 (♦) e 0,071 (▲). Cada ponto da figura representa um ensaio de 4 tempos, em que as lisozimas foram incubadas com o MUQ3 0,15 mM na presença de tampões CP 100 mM com μ e pH especificados.

e que esse efeito não é reflexo da mudança no estado de ionização dos seus resíduos catalíticos.

De qualquer forma, a caracterização das lisozimas digestivas utilizando o oligossacarídeo mostra um pH ótimo mais ácido para a MdL1 e MdL2 (pH 4,72 e 4,94 respectivamente) (Figura 9A e 9B) quando comparado com o pH de lisozimas não-digestivas, tais como HEWL (pH ótimo 5,35) (Figura 9C), indicando ser essa uma propriedade intrínseca das lisozimas digestivas (Cancado *et al.*, 2008).

4.3. Determinação dos pK_a s dos resíduos catalíticos da MdL1 e da MdL2

Sabendo-se que o pH ótimo de uma enzima é função direta dos pK_a s dos resíduos catalíticos (Segel, 1993), torna-se pré-requisito essencial para o estudo da modulação do pH ótimo em lisozimas o conhecimento dos pK_a s dos dois resíduos catalíticos (D e E) das lisozimas digestivas, principalmente porque não existem esses dados disponíveis na literatura para quaisquer lisozimas digestivas de insetos.

Os pK_a s dos resíduos catalíticos da HEWL também foram determinados. Esses estão disponíveis na literatura (Rupley, 1967; Sakakibara & Hamaguchi, 1968; Parsons & Raftery, 1969; Rand-Meier *et al.*, 1969; Parsons & Raftery, 1970; Parsons & Raftery, 1972a; & Raftery, 1972b; Nakae *et al.*, 1975; Yang & Hamaguchi, 1980; McKenzie & White, 1991; Inoue *et al.*, 1992a; Inoue *et al.*, 1992b; Abe *et al.*, 1995), mas achamos conveniente determiná-los, uma vez que ao inserimos as mesmas variáveis experimentais em tais medições (mesmos tampões, mesma temperatura e mesma técnica de determinação), as constantes de ionização dos resíduos catalíticos dessa lisozima de defesa e das lisozimas digestivas poderiam ser comparadas com maior segurança.

Assim, com o objetivo de determinar os valores dos pK_a s dessas enzimas, $V_{\max \text{ app}}$, $K_m \text{ app}$ ou $V_{\max \text{ app}}/K_m \text{ app}$ para hidrólise do substrato sintético MUQ3 foram

determinados em diversos pHs na faixa de 2,68 a 7,33. Esse substrato foi escolhido, pois torna a análise mais simples, uma vez que a força iônica não afeta os dados.

Como pode ser visto na figura 10, os gráficos de velocidade *versus* [S] são lineares, indicando que foram usadas concentrações de substrato abaixo do K_m para a MdL1. Nessas condições a razão $V_{\max \text{ app}}/K_{m \text{ app}}$ pode ser calculada diretamente a partir da inclinação das retas. No entanto, a determinação dos parâmetros cinéticos isolados ($V_{\max \text{ app}}$ e $K_{m \text{ app}}$) tornou-se inviável para tal lisozima digestiva.

Figura 10. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade da lisozima 1 de Musca domestica frente a diferentes pHs. Foram usados tampões CP 100 mM variando o pH de 3,02 a 7,17. Cada ponto representa um ensaio de atividade de 4 tempos em determinada concentração de substrato e pH. Foram utilizadas 9 diferentes concentrações de substrato, nas concentrações de 0,5 μ M a 31,5 μ M.

Com o intuito de aumentar a concentração de MUQ3 no meio reacional, e conseqüentemente obter $V_{\max}$ e K_m isoladamente passamos a sonicar o substrato, o que muito favoreceu sua ressuspensão em água. Assim, foi possível trabalhar com 13 diferentes concentrações de substrato, variando de 3,1 μ M a 250 μ M para a determinação dos gráficos de Michaelis-Menten para a MdL2.

Como pode ser visto na figura 11, com essa nova faixa de concentração de substrato, foi possível determinar $V_{\max \text{ app}}$ e $K_m \text{ app}$ isolados para a clivagem do oligossacarídeo nos diferentes pHs para a MdL2 de modo a perceber claramente que o trecho que segue a cinética de primeira ordem foi superado. Os parâmetros cinéticos isolados nos diversos pHs foram também obtidos para a HEWL.

A partir dos dados de $V_{\max}/K_m$ (no caso das lisozimas digestivas e HEWL) e de $V_{\max}$ isolado (no caso da MdL2 e da HEWL) foram feitas estimativas dos valores das constantes de ionização dos resíduos catalíticos das enzimas livres (pK_e) e dos resíduos catalíticos da enzima quando ligados ao substrato (pK_{es}). As determinações dos pK_e foram feitas a partir do plote $V_{\max \text{ app}}/K_m \text{ app}$ versus pH, enquanto os valores de pK_{es} foram obtidos por meio do plote $V_{\max \text{ app}}$ versus pH (Segel, 1993) (Figura 12). Para a MdL1, foram obtidos para o nucleófilo catalítico (D_{50}) e o doador de prótons catalítico (E_{32}) valores de pK_e de $3,09 \pm 0,05$ e $6,40 \pm 0,03$ respectivamente (Cancado *et al.*, 2007) (Figura 12A). Para a MdL2 foram obtidos para o D_{50} valores

Figura 11. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade da lisozima 2 de *Musca domestica* em pHs que variaram de 2,68 a 7,33. Foram utilizadas 13 diferentes concentrações de substrato, variando de 3,1 μM a 250 μM . As linhas representam os valores de velocidade esperados a partir do ajuste dos dados experimentais na equação de Michaelis – Menten pelo Programa Enzfitter.

de pK_{es} de $3,27 \pm 0,03$ e pK_e de $3,23 \pm 0,05$, enquanto para o E_{32} esses foram de $6,23 \pm 0,03$ e $6,20 \pm 0,05$ respectivamente (Figura 12B).

Figura 12. Efeito do pH na atividade catalítica da lisozima 1 (A) e 2 (B) de *Musca domestica* e da lisozima da clara de ovo de galinha (C) representado pelo plote $V_{max app}/K_{m app}$ versus pH e $V_{max app}$ versus pH. As curvas representadas foram geradas usando os valores de pK_a s deduzidos a partir do ajuste dos dados experimentais nas equações $V_{max app}/K_{m app} = V_{max}/K_m / (1 + ([H^+]/K_{e1}) + (K_{e2}/[H^+]))$ e $V_{max app} = V_{max} / (1 + ([H^+]/K_{es1}) + (K_{es2}/[H^+]))$ empregando o programa Enzfitter. As lisozimas foram incubadas com diferentes concentrações de MUQ3 em tampões CP 100 mM em pHs variando de 2,68 a 7,33.

Comparação direta entre os pK_a s das lisozimas digestivas com os pK_a s obtidos para os resíduos catalíticos da HEWL (pK_{es} $3,6 \pm 0,1$ e $6,7 \pm 0,1$; pK_e $3,85 \pm 0,06$ e $6,61 \pm 0,07$) (Figura 12C) (Cancado *et al.*, 2007) foi feita e nos permitiu observar que o pH ótimo mais ácido das lisozimas digestivas da mosca é reflexo da diminuição dos valores de pK_a s do doador de prótons e do nucleófilo (Tabela 1). É importante ressaltar que a ligação do substrato à MdL2 e à HEWL não alterou a constante de ionização dos seus grupos do sítio ativo, sendo o $pK_{e1} \approx pK_{es1}$ e o $pK_{e2} \approx pK_{es2}$.

Tabela 1. Valores de pK_a s dos resíduos catalíticos das lisozimas 1 e 2 de *Musca domestica* e da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) nas formas livres (pK_{e1} , pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2}).

	$pK_{e1}^{(a)}$	$pK_{e2}^{(b)}$	$pK_{es1}^{(a)}$	$pK_{es2}^{(b)}$	pH ótimo ^(c)	pH ótimo ^(d)
Lisozima 1	$3,09 \pm 0,05$	$6,40 \pm 0,03$	–	–	$4,75 \pm 0,07$	4,72
Lisozima 2	$3,23 \pm 0,05$	$6,20 \pm 0,05$	$3,27 \pm 0,03$	$6,23 \pm 0,03$	$4,85 \pm 0,08$	4,94
HEWL	$3,85 \pm 0,06$	$6,61 \pm 0,07$	$3,6 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,1$	5,35

^(a) Refere-se ao nucleófilo catalítico;

^(b) Refere-se ao doador de prótons catalítico;

^(c) Valores de pH ótimo estimados a partir dos valores de pK_a s;

^(d) Valores de pH ótimo estimados a partir da curva de pH ótimo frente a uma única concentração de MUQ3.

A princípio esperávamos que a diminuição do pH ótimo das lisozimas digestivas fosse proveniente de uma redução na constante de ionização do doador de prótons (e não do nucleófilo). Essa hipótese havia sido levantada porque o doador de prótons nas lisozimas não-digestivas apresenta um pK_a elevado para um grupo carboxila, assim possuindo maior “espaço” de unidades de pH para atingir um pK_a de uma carboxila típica. No entanto, como pode ser observado pelos valores de

pK_a s das lisozimas digestivas da mosca houve redução tanto no valor de pK_a da carboxila do doador de prótons (diminuição de 0,21 e 0,41 unidades de pH no pK_e para a MdL1 e MdL2 respectivamente e de 0,47 no pK_{es} para a MdL2), como do nucleófilo (diminuição de 0,76 e 0,62 no pK_e para a MdL1 e MdL2 respectivamente e de 0,33 no pK_{es} para a MdL2) (Tabela 1).

4.4. Determinação da estrutura cristalográfica da MdL1 e da MdL2

As bases moleculares da redução dessas constantes de ionização do D_{50} e do E_{32} poderiam ser explicadas por comparação das estruturas tridimensionais das enzimas digestivas MdL1 e MdL2 com aquela de defesa da HEWL, uma vez que seria possível uma análise mais minuciosa do microambiente em que se encontram esses aminoácidos. Com esse intuito, iniciou-se um trabalho de refinamento da estrutura da MdL1 a partir de dados de raios-X previamente coletados por outro membro do nosso grupo no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Marana *et al.*, 2006).

A estrutura da MdL1 foi determinada a 1,9 Å (Figura 13), por substituição molecular, usando a estrutura cristalográfica da HEWL (1hew) (Cheetham *et al.*, 1992) como modelo (Cancado *et al.*, 2007). Essa estrutura foi refinada, validada e depositada no PDB com o código 2FBD. O fator R final é de 15,3% e o R_{free} de 19,8% e estão apresentados na tabela 2 juntamente com outros dados de refinamento.

O modelo final da MdL1 inclui dois monômeros (denominados A e B) na unidade assimétrica, de modo que cada monômero contém 122 aminoácidos. Foi feita uma pesquisa sobre a possibilidade desses monômeros, apresentados na forma de dímero no cristal ser a forma biológica da lisozima. Já havíamos determinado previamente a massa molecular relativa da MdL1 ($M_r = 14.200$ D) pelo

Figura 13. Modelo estrutural da lisozima 1 de Musca domestica. A estrutura foi obtida por substituição molecular, usando a lisozima da clara de ovo de galinha como modelo e depositada no PDB com o código 2FBD. Essa figura foi construída usando o Programa PyMOL.

Tabela 2. Dados estatísticos provenientes do refinamento da lisozima 1 de *Musca domestica*.

Parâmetros	2FBD
R_{final}	0,153
R_{free}	0,198
r.m.s.d. dos comprimentos de ligação (Å)	0,012
r.m.s.d. dos ângulos de ligação (°)	1,365
Média fator B (Å ²)	28,33
Estatísticas do Plote de Ramachandran (%)	
Regiões mais favoráveis	93,1
Regiões permitidas	6,9
Regiões generosamente permitidas	0
Regiões não-permitidas	0

$R_{final} = \sum |F_o(h) - F_c(h)| / \sum F_o(h)$, onde $F_o(h)$ e $F_c(h)$ são amplitudes observadas e calculadas para a reflexão h . R_{free} é calculado pela mesma equação usando 5% dos dados, escolhidos randomicamente e omitidos do refinamento.

SDS-PAGE. Entretanto, essa técnica não exclui a possibilidade de estarmos trabalhando com um dímero, uma vez que nesse procedimento as proteínas são completamente desnaturadas. Assim, partimos para a determinação da massa molecular da MdL1 por meio de uma cromatografia de filtração em gel, que separa as macromoléculas de acordo com o tamanho e a forma molecular. Como pode ser visualizado na figura 14, a MdL1, semelhantemente à HEWL, foi eluída quando o K_{av} (proporcional ao volume de eluição) era de aproximadamente 0,7. Baseado na curva de calibração de proteínas com massas moleculares conhecidas, esse K_{av} corresponde a uma proteína com massa molecular de cerca de 6.500 D, valor bem abaixo ao de um monômero de lisozima. Uma vez que é sabido que um monômero de MdL1 apresenta cerca de 13.816 D e 14.200 D, estimado tanto pela seqüência de aminoácidos (Ito *et al.*, 1995), quanto pelo SDS-PAGE (sem sinais de degradação)

respectivamente e que a amostra injetada possui plena atividade enzimática sobre *Micrococcus lysodeikticus*, esse valor de 6.500 D não retrata realmente o tamanho da enzima e deve, portanto, se tratar de uma migração anômala dessa proteína na filtração em gel, provavelmente devido ao seu formato globular e compacto. HEWL, por apresentar estrutura terciária similar à MdL1, também exhibe migração anômala em relação às demais proteínas da curva de calibração (Figura 14). De qualquer forma, esse resultado exclui completamente a possibilidade de ser um dímero a forma biológica da MdL1 e a presença das moléculas A e B na unidade assimétrica trata-se, portanto, da forma como a MdL1 foi empacotada no cristal.

Uma abordagem *in silico* utilizando o Programa PISA no http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver (Krissinel & Henrick, 2005; 2007) também foi utilizada para verificar a possibilidade de existência do dímero de MdL1 em solução. A área de interface do dímero foi calculada e revelou ser pequena (481,7 Å²) correspondendo a menos de 8% da superfície do monômero e valor de complexação de zero, corroborando o fato de que o dímero de MdL1 realmente não deve ocorrer naturalmente.

No modelo, ainda foram incluídos duas moléculas de polietilenoglicol (PEG), três íons sulfato e 311 moléculas de água. O PEG e o sulfato fazem parte dos constituintes da solução utilizada no processo de cristalização (Marana *et al.*, 2006). Um dos sulfatos está localizado na interface de duas moléculas de água na unidade assimétrica e não interage diretamente com a proteína. Os outros dois sulfatos fazem ligações de hidrogênio com a T43-B, T4-B e moléculas de água. Nenhum dos sulfatos está próximo do sítio ativo. As moléculas de PEG foram modeladas como dietilenoglicol e foram localizadas no sítio ativo de cada monômero da lisozima na sua unidade assimétrica.

Figura 14. Cromatografia de filtração em gel da lisozima 1 de *Musca domestica*. A coluna utilizada foi a Superose 12 10/300 GL e a atividade da lisozima 1 (♦) foi detectada usando *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL em tampão CP 100 mM pH 3,5 e a turbidez lida em 650 nm. O “pool” com atividade que foi recolhido está representado pelos losangos vermelhos. Inserto corresponde a curva de calibração de proteínas com massas moleculares conhecidas e é representado pelo log da massa molecular (log MM) versus o K_{av} ($K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$, sendo que V_e = volume de eluição, V_o = volume morto da coluna e V_c = volume total da coluna). Os marcadores de MM (D) usados foram como se segue: (a) aprotinina (6.500), (b) ribonuclease A (13.700), (c) anidrase carbônica (29.000), (d) ovalbumina (43.000), (e) aldolase (158.000) e (f) ferritina (440.000). HEWL (14.400) foi incluída na curva de calibração para mostrar migração anômala (■) em relação às demais proteínas. Migração da lisozima 1 é representada por triângulo verde (▲).

Análise na geometria da cadeia principal com o Plote de Ramachandran mostra que 93,1% de todos os resíduos estão em regiões favoráveis e 6,9% em regiões permitidas. Nenhum resíduo ficou alojado em regiões generosamente permitidas ou não permitidas (Tabela 2) (Figura 15).

Figura 15. Diagrama de Ramachandran do modelo da lisozima 1 de *Musca domestica* obtido usando o programa PROCHECK (Laskowski et al, 1993). O gráfico demonstra a presença de 93,1% dos resíduos em regiões mais favorecidas (A, B, L; regiões em vermelho) e a presença de 6,9% em regiões permitidas (a, b, l; regiões em amarelo). Os resíduos de glicina são mostrados como triângulos.

A estrutura é em geral muito bem definida no mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, no entanto alguns resíduos são modelados com conformações alternativas. São eles: K₁-A, R₅-A, R₃₆-A, N₃₈-A, V₃₉-A, R₆₈-A, S₈₇-A, S₉₈-A, S₁₀₆-A e R₆₈-B.

A estrutura cristalográfica da MdL1 tem essencialmente as mesmas estruturas secundárias observadas no modelo de lisozimas “c”, como a HEWL, e consiste de três α -hélices longas (T₄-L₁₅, E₂₁-S₃₄ e I₈₆-G₁₀₁), uma α -hélice mais curta (T₁₀₇-S₁₁₂), uma folha β antiparalela com duas fitas β (D₅₀-Y₅₁ e I₅₆-N₅₇) e quatro hélices 3₁₀ (P₁₈-S₂₀, S₇₇-T₈₃, W₁₀₂-S₁₀₆ e I₁₁₈-F₁₂₂) (Figura 16). Diferentemente da HEWL que possui três fitas na folha β , a MdL1 possui apenas duas. Essa fita β ausente na MdL1 equivale à região que contém o resíduo de V40. Essa região mostra estrutura estendida, que não atinge os parâmetros usados por Kabsch e Sander (Kabsch & Sander, 1983) para definir uma fita β . As oito cisteínas presentes formam quatro ligações dissulfeto totalmente conservadas (C₆/C₁₂₁, C₂₇/C₁₁₁, C₆₂/C₇₈ e C₇₄/C₉₂).

Figura 16. Alinhamento entre lisozima 1 de *Musca domestica* (2FBD) e lisozima de galinha (1hew). O asterisco indica resíduo totalmente conservado, dois pontos indicam resíduo fortemente conservado e um ponto representa resíduo fracamente conservado. De acordo com o arquivo depositado no banco de dados de proteína, a linha contínua mostra estruturas secundárias para a lisozima 1 (2FBD): as setas em vermelho representam fitas β ; cilindros amarelos, as α -hélices e os cilindros em verde, hélices 3₁₀.

Em paralelo à determinação da estrutura cristalográfica da MdL1, cerca de 12 mg de MdL2 recombinante foram dialisadas em tampão MES 10 mM pH 5,5, concentradas em filtros Amicon 3 para concentração final de 9,8 mg/mL e encaminhadas ao LNLS para os ensaios de cristalização.

Esses ensaios foram realizados pelo método da difusão de vapor “*sitting-drop*” (gota sentada) com os kits “*Crystal Screen*” e “*Crystal Screen II*” a 291K. Foram obtidas estruturas cristalinas em algumas condições do kit “*Crystal Screen*”, sendo que os cristais cresciam em um período de 1 a 2 semanas.

Inicialmente, um cristal de MdL2 recombinante proveniente da condição 40 foi obtido e submetido aos raios-X de uma fonte síncrotron cuja resolução máxima processada foi de 2,7 Å (Figura 17A). No intuito de melhorar esse resultado, iniciamos um trabalho de refinamento da condição 40 com o objetivo de obter cristais maiores em todas as dimensões, de modo que os dados de difração fossem coletados em uma melhor resolução.

De fato esse objetivo foi atingido (Figura 17B), sendo que a melhor condição de cristalização obtida continha uma gota de 3 µL, sendo 1,5 µL da solução protéica, 1,3 µL da solução do reservatório e 0,2 µL da solução de nº 26 do kit “*Crystal Screen*” (acetato de amônio 0,2 M, 30% de 2-metil-2,2-pentanediol, citrato de sódio 0,1 M pH 5,6). A solução do reservatório consistia de PEG 4000 21%, isopropanol 28%, citrato de sódio 0,115M pH 4,2 (Marana *et al.*, 2006).

Os dados de difração foram processados a uma resolução máxima de 1,9 Å (Figura 17B). O cristal tinha as seguintes dimensões na célula unitária $a=73,90$, $b=96,40$ e $c=33,27$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, o grupo espacial foi o $P2_12_12$ e havia duas moléculas monoméricas de MdL2 na unidade assimétrica (Coeficiente de

Figura 17. Cristais de lisozima 2 de Musca domestica e dados de difração de raios-X.

Os dados da difração de raios-X de um cristal único de lisozima 2 foram coletados a 2,7 Å (A) e 1,9 Å (B) e estão indicados à direita.

Mathews = 2,1). O conteúdo de solvente constitui cerca de 40,4% do peso do cristal. A tabela 3 sumariza detalhes da aquisição de dados e estatística do processamento de dados (Marana *et al.*, 2006).

Tabela 3. Coleta de dados da difração de raios-X de um cristal único de lisozima 2 de *Musca domestica* e processamento dos dados. Valores em parênteses correspondem aos dados na maior resolução.

Parâmetros	Lisozima 2 de <i>Musca domestica</i>
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2
Parâmetros da célula unitária	
a (Å)	73,9
b (Å)	96,4
c (Å)	33,27
α , β , γ (°)	90
Mosaicidade (°)	0,8
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1,427
Oscilação (°)	1
Distância do cristal ao detector (mm)	80
Nº de imagens	127
Limite de resolução (Å)	30-1,9 (1,97-1,90)
I/ σ (I)	14,4 (2,1)
Completeza (%)	90,7 (74,1)
Multiplicidade	3,9 (1,8)
R _{sym}	0,089 (0,304)
Nº de reflexões	69179
Nº de reflexões únicas	17698 (1423)

A partir desses dados foi então possível determinar a estrutura terciária da MdL2 (Figura 18), por substituição molecular, usando a estrutura cristalográfica da MdL1 (2FBD) (Cancado *et al.*, 2007) como modelo. Essa estrutura foi refinada, validada e depositada no PDB com o código 3CB7. O fator R final é de 18,4% e o R_{free} de 25,8% e estão apresentados na tabela 4 juntamente com outros dados de refinamento.

Figura 18. Modelo estrutural da lisozima 2 de Musca domestica. A estrutura foi obtida por substituição molecular, usando a lisozima 1 de Musca domestica como modelo e depositada no PDB com o código 3CB7. Essa figura foi construída usando o Programa PyMOL.

Tabela 4. Dados estatísticos provenientes do refinamento da lisozima 2 de *Musca domestica*.

Parâmetros	3CB7
R_{final}	0,184
R_{free}	0,258
r.m.s.d. dos comprimentos de ligação (Å)	0,017
r.m.s.d. dos ângulos de ligação (°)	1,664
Média fator B (Å ²)	23,3
Estatísticas do Plote de Ramachandran (%)	
Regiões mais favoráveis	89,3
Regiões permitidas	10,7
Regiões generosamente permitidas	0
Regiões não-permitidas	0

$R_{\text{final}} = \sum |F_o(h) - F_c(h)| / \sum F_o(h)$, onde $F_o(h)$ e $F_c(h)$ são amplitudes observadas e calculadas para a reflexão h . R_{free} é calculado pela mesma equação usando 5% dos dados, escolhidos randomicamente e omitidos do refinamento.

O modelo final da MdL2, de forma semelhante ao da MdL1, inclui dois monômeros (denominados A e B) na unidade assimétrica. Pesquisa quanto a possibilidade de existência de dímero desse polipeptídeo em solução foi feita por meio de uma cromatografia de filtração em gel, seguindo procedimentos previamente estabelecidos para a MdL1. Como pode ser visualizado na figura 19, a filtração em gel indicou uma M_r de 6.200 D para a MdL2 (correspondendo a um K_{av} próximo de 0,7), similar àquela observada para a MdL1 (6.500 D), possivelmente decorrente do formato globular e compacto das lisozimas da família 22. Ausência de dímero de MdL2 também foi predita pelo programa PISA: área de interface do dímero calculada (821 Å²) corresponde a 12% da área de superfície do monômero e o fator de complexação foi de zero. Portanto, é provável que a MdL2 também ocorra biologicamente e em solução como monômero.

Figura 19. Cromatografia de filtração em gel da lisozima 2 de *Musca domestica*. A coluna utilizada foi a Superose 12 10/300 GL e a atividade da lisozima 2 (♦) foi detectada usando *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL em tampão CP 100 mM pH 3,5 e a turbidez lida em 650 nm. O “pool” com atividade que foi recolhido está representado pelos losangos vermelhos. Inserto corresponde a curva de calibração de proteínas com massas moleculares conhecidas e é representado pelo log da massa molecular (log MM) versus o K_{av} ($K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$, sendo que V_e =volume de eluição, V_o =volume morto da coluna e V_c =volume total da coluna). Os marcadores de MM (D) usados foram como se segue: (a) aprotinina (6.500), (b) ribonuclease A (13.700), (c) anidrase carbônica (29.000), (d) ovalbumina (43.000), (e) aldolase (158.000) e (f) ferritina (440.000). Migração da lisozima 2 é representada por triângulo verde (▲).

Na unidade assimétrica, cada monômero de MdL2 contém 126 aminoácidos. Desses 126 resíduos, 122 correspondem ao número de aminoácidos da MdL2 e os

4 restantes (uma seqüência de EAEA), presentes no N-terminal dos monômeros, correspondem a aminoácidos do peptídeo sinal para secreção (α -fator) em fusão com a MdL2 que não sofreu processamento completo. Esse tipo de problema, previsto no manual do “kit” de expressão em *Pichia* (Invitrogen), parece ser dependente da proteína a ser expressa e já foi também relacionado com quantidade insuficiente de dipeptidil-aminopeptidases em certas linhagens de levedura (Brake *et al.*, 1984). No entanto, pelo fato da MdL2 ser muito similar à MdL1 que, como previamente descrito, teve sua estrutura terciária obtida a partir de cristais da proteína previamente expressa pelo mesmo sistema de expressão em *Pichia pastoris* usando o vetor pPIC9 (Marana *et al.*, 2006; Cançado *et al.*, 2008) pemonecem obscuros os problemas que levaram ao comprometimento da formação do complexo ES e conseqüentemente ao processamento incompleto do α -fator em fase com a MdL2.

No modelo, ainda foram incluídos uma molécula de glicerol, três íons acetatos, duas moléculas de 2-propanol e 297 moléculas de água. O 2-propanol e o acetato fazem parte dos constituintes da solução utilizada no processo de cristalização, enquanto o glicerol faz parte da solução crioprotetora incorporada ao cristal de proteína, durante a coleta de dados da difração de raios-X, para protegê-lo da formação de gelo, já que a coleta é feita a 100K (Marana *et al.*, 2006). A molécula de glicerol encontra-se na superfície do monômero B da proteína e interage com três moléculas de água e com a segunda alanina da extensão EAEA do monômero B.

Uma das moléculas de 2-propanol também está localizada na superfície da proteína e interage apenas com uma molécula de água, não interagindo diretamente com a proteína. Já a outra molécula de 2-propanol encontra-se no sítio ativo do monômero A e interage com uma molécula de água e com o doador de prótons

catalítico. Um dos ânions acetato, voltado para a superfície do monômero A, faz ligação de hidrogênio com duas moléculas de água e com o D₁₂₀-A. Os demais acetatos estão localizados em uma região próxima ao sítio ativo dos monômeros A e B, mas não interagem com os resíduos catalíticos. Um deles faz ligação de hidrogênio com os resíduos Q₅₅-B, N₅₇-B e W₆₁-B, enquanto o outro interage com Q₅₅-A, N₅₇-A e uma molécula de água. A localização desses dois últimos acetatos coincide com a posição do ligante N-acetil-quitotetraosídeo co-cristalizado com a MdL1 (código no PDB - 2H5Z) (Cancado *et al.*, 2007).

Análise na geometria da cadeia principal com o Plote de Ramachandran mostra que 89,3% de todos os resíduos estão em regiões favoráveis e 10,7% em regiões permitidas. Nenhum resíduo ficou alojado em regiões generosamente permitidas ou não permitidas (Tabela 4) (Figura 20).

Figura 20. Diagrama de Ramachandran do modelo da lisozima 2 de *Musca domestica* obtido usando o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). O gráfico demonstra a presença de 89,3% dos resíduos em regiões mais favorecidas (A, B, L; regiões em

vermelho) e a presença de 10,7% em regiões permitidas (a, b, l; regiões em amarelo). Os resíduos de glicina são mostrados como triângulos.

A estrutura é em geral muito bem definida no mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com apenas o resíduo de S₄₉-A modelado com conformações alternativas.

A estrutura cristalográfica da MdL2 tem essencialmente os mesmos elementos de estrutura secundária observados no modelo da MdL1 (Figura 21): três α -hélices longas (T₄-L₁₅, Q₂₁-S₃₄ e I₈₆-G₁₀₁), uma α -hélice mais curta (T₁₀₇-D₁₁₂), uma folha β antiparalela com duas fitas β (D₅₀-Y₅₁ e I₅₆-N₅₇) e quatro hélices 3_{10} (P₁₈-N₂₀, K₇₇-L₈₂, W₁₀₂-S₁₀₆ e I₁₁₈-F₁₂₂). As oito cisteínas presentes formando quatro ligações dissulfeto são também totalmente conservadas na MdL2 (C₆/C₁₂₁, C₂₇/C₁₁₁, C₆₂/C₇₈ e C₇₄/C₉₂) (numeração sem considerar a extensão EAEA).

Figura 21 Superposição das estruturas cristalográficas das lisozimas digestivas de Musca domestica recombinantes expressas em Pichia pastoris. Observa-se na superposição das lisozimas digestivas os mesmos elementos de estruturas secundárias para a lisozima 1 (em verde musgo) e lisozima 2 (em verde mais claro). As seqüências foram superpostas no COOT e a figura construída no PyMOL.

4.5. Identificação de aminoácidos envolvidos na modulação do pH ótimo por meio de comparação das estruturas da MdL1, MdL2 e HEWL

Inspeção das estruturas tridimensionais da MdL1 e MdL2 mostra que os resíduos V₁₀₉ e A₁₁₀ que formam uma cavidade apolar em torno do ácido catalítico na HEWL foram substituídos por aminoácidos polares (S₁₀₆ e T₁₀₇ respectivamente), destacando-se uma ligação de hidrogênio entre o O^γ da treonina e o grupo carboxilato do E₃₂ (Figura 22A).

Em adição, um resíduo de ácido aspártico na vizinhança do nucleófilo catalítico em HEWL (D₄₈) foi substituído por uma asparagina (N₄₆) (Figura 22B). Apesar de não haver aparentemente mudança na rede de interações não-covalentes entre o nucleófilo catalítico (D₅₀) e os resíduos pertencentes ao seu microambiente na MdL1 e MdL2 (quando comparados com esses resíduos na HEWL), a substituição de D₄₈ (na HEWL) por N₄₆ (na MdL1 e MdL2) remove a possibilidade da existência de repulsão eletrostática gerada pela proximidade de dois grupos carboxilatos carregados negativamente, o que poderia estar desfavorecendo a ionização do nucleófilo.

Em tese, um ambiente menos apolar em torno do ácido catalítico (E₃₂) propiciaria uma redução no pK_a desse resíduo, favorecendo a redução do pH ótimo nas lisozimas digestivas. Além disso, a substituição do resíduo negativamente carregado (D₄₈) na vizinhança do nucleófilo catalítico (D₅₀) por um resíduo polar sem

Figura 22. Comparação do microambiente do doador de prótons (A) e do nucleófilo (B) nas lisozimas 1 e 2 de *Musca domestica* (em verde musgo e em verde claro respectivamente) e na HEWL (em branco). Ligações de hidrogênio são representadas pelas linhas tracejadas em amarelo: em A verifica-se a formação de ligação de hidrogênio entre a treonina na posição 107 (T₁₀₇) com o doador de prótons (E₃₂) nas lisozimas 1 e 2 de *Musca domestica*, ausente na HEWL; em B as ligações de hidrogênio no ambiente do nucleófilo são preservadas para as três enzimas. Os resíduos são representados em pares separados por barra, de modo que o primeiro resíduo corresponde a aminoácidos das lisozimas digestivas e o segundo ao da HEWL. Essa figura foi construída no PyMOL.

carga (N_{46}) favoreceria a desprotonação do nucleófilo, assim também concorrendo para a redução do pH ótimo na MdL1 e MdL2.

4.6. Caracterização do papel de aminoácidos envolvidos na modulação do pH ótimo na MdL1 e MdL2

Dessa forma, a fim de verificar a contribuição individual dos resíduos N_{46} , S_{106} e T_{107} na modulação dos pK_a s do D_{50} e E_{32} , esses resíduos foram substituídos por D, V e A respectivamente na seqüência da MdL2 via mutagênese sítio-dirigida. Essas modificações permitirão deixar o microambiente do nucleófilo e do doador de prótons mais semelhante ao da HEWL.

Assim, para realização dos experimentos de mutagênese sítio-dirigida, o fragmento de DNA que codifica para a MdL2 previamente donado no vetor pPIC9 (pPIC9-MdL2) (Figura 23A) foi subclonado no vetor pGEM-T (pGEMT-MdL2) (Figura 23B). Essa transferência para o pGEM-T visa manter o inserto em vetor com um

Figura 23. Esquema da construção do vetor pPIC9 (A) e pGEMT (B) contendo o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 de *Musca domestica*. Tal fragmento é representado pela seta e segmento em vermelho nos respectivos vetores.

menor número de bases, o que aumenta a eficiência dos experimentos de mutação sítio dirigida utilizando o “*kit QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis*” da Stratagene.

Inicialmente, o DNA que codifica a MdL2 foi amplificado por PCR, utilizando-se como molde o plasmídeo pPIC9-MdL2 e dois iniciadores específicos para a região N-terminal e C-terminal da MdL2 (MdL2-5N e MdL2-3C respectivamente). O produto da reação de amplificação (≈ 369 pb) foi resolvido em gel de agarose 2% e em seguida purificado diretamente do gel. Posteriormente, o produto da reação de amplificação e o vetor pGEM-T foram ligados enzimaticamente com a T4 DNA ligase e usados para a transformação de bactérias *E. coli* XL1-Blue competentes, seguida da seleção com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina ou carbenicilina. A partir de colônias resultantes da transformação foi feita uma minipreparação de plasmídeos, os quais para confirmar a presença do inserto, foram usados como moldes em reações de PCR tendo MdL2-5N e MdL2-3C como iniciadores. Foi feito ainda o seqüenciamento completo do inserto presente no plasmídeo pGEMT-MdL2, utilizando o iniciador T7 específico para a vetor pGEM-T. Esse experimento revelou que a seqüência de DNA que codifica para a MdL2 estava intacta e que não houve nenhuma alteração na sua seqüência de bases durante os processos de amplificação por PCR (Figura 24).

A mutagênese sítio-dirigida foi feita utilizando o *kit “QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis”* (Stratagene), conforme detalhado em materiais e métodos (item 3.3.3.2; Figura 5). Os plasmídeos resultantes desse procedimento (pGEMT-MdL2N₄₆D, pGEMT-MdL2S₁₀₆V e pGEMT-MdL2T₁₀₇A) foram submetidos a um seqüenciamento de DNA a fim de verificarmos se as mutações haviam sido corretamente incorporadas. Como pode ser observado na figura 25, a mutagênese

sítio-dirigida foi bem sucedida para esses mutantes, pois os códons 5'GAC3', 5'GTC3', e 5'GCC3' foram incorporados no molde pGEMT-MdL2.

Figura 24. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de Musca domestica. O fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 corresponde a seqüência de nucleotídeos 52 a 420 (seqüência sublinhada).

Figura 25. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de *Musca domestica* mutada nas posições $N_{46}D$ (A), $S_{106}V$ (B) e $T_{107}A$ (C). A caixa preta indica os nucleotídeos mutados.

Posteriormente, foi feita a subclonagem dessas seqüências mutantes para um vetor de expressão em *Pichia pastoris* (pPIC9; Invitrogen). Com esse objetivo, o fragmento de DNA que codifica para MdL2- $N_{46}D$, MdL2- $S_{106}V$ e MdL2- $T_{107}A$ foi amplificado utilizando como iniciadores o MdL2-5N e MdL2-3C que se pareiam

respectivamente com a região amino e carboxi da MdL2 selvagem, bem como da mutante, além de adicionar nessas extremidades sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *NotI*. Esses sítios serão utilizados na estratégia de clonagem ao vetor pPIC9. Os produtos de amplificação (~369 pb) foram resolvidos em gel de agarose 2% e em seguida purificados diretamente do gel. Posteriormente, o produto de PCR purificado e cerca de 4 µg de pPIC9 foram separadamente digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI* e então ligados enzimaticamente com a T4 DNA ligase. O produto da ligação foi usado para transformar bactérias XL1-Blue competentes, seguida da seleção com carbenicilina ou ampicilina 50 µg/mL.

Apartir de colônias resultantes da transformação foi feita uma minipreparação de plasmídeos que foram seqüenciados utilizando iniciadores específicos para o pPIC9 (5AOX e 3AOX). Esse experimento revelou que as seqüências obtidas estavam intactas e que a amplificação por PCR não introduziu nenhuma alteração na sua seqüência de bases (Figura 26). Além disso, pelo seqüenciamento foi possível visualizar que as seqüências de DNA mutantes estavam em fase com a seqüência do vetor pPIC9 que codifica uma seqüência sinal (α -fator), responsável pela secreção da proteína de interesse para o meio de cultura (Figura 26).

Para a obtenção das proteínas recombinantes, optamos por utilizar a cepa GS115 da levedura *Pichia pastoris*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Paulo Lee Ho (Instituto Butantan), e que já havia sido utilizada previamente por nosso grupo na obtenção da MdL1 e MdL2 selvagens recombinantes. As construções pPIC9-MdL2N₄₆D, pPIC9-MdL2S₁₀₆V e pPIC9-MdL2T₁₀₇A foram linearizadas com *SacI* e em seguida, eletroporada na levedura *Pichia pastoris*. Para verificar se tais construções haviam sido integradas no genoma da levedura, partimos para análise

A

atg aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta
 M R F P S I F T A V L F A A S S A L
gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att ccg gct gaa
 A A P V N T T T E D E T A Q I P A E
gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat gtt gct gtt ttg cca
 A V I G Y S D L E G D F D V A V L P
ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt ata aat act act att gcc agc
 F S N S T N N G L L F I N T T I A S
att gct gct aaa gaa gaa ggg gta tct ctc gag aaa aga gag gct gaa gct aag
 I A A K E E G V S L E K R E A E A K
 acc ttc act cgt tgc tcc ctg gcc cgc gaa atg tac aaa ttg ggt gta cca aag
 T F T R C S L A R E M Y K L G V F K
 aat caa ttg gcc cgc tgg acc tgc att gct gaa cac gaa tcg tcc tac aac acc
 N Q L A R W T C I A E H E S S Y N T
 aag gct gtt ggc tcc ttg aac tcc gac ggc tcc ccg gac tat ggc atc ttc caa
 K A V G S L N S D G S R D Y G I F Q
 atc aac aac tac tac tgg tgc tct ccc cca tct ggt gcc ttc tcc tat gat gag
 I N N Y Y W C S F F S G A F S Y D E
 tgc aag atc aag tgc gaa gat ttc ttg gtc gat agc att gaa ccc gct gtc aag
 C K I K C E D F L V D S I E T A V K
 tgc gcc caa ttg gtg ctg aaa caa caa ggc tgg act gcc tgg tcc acc tgg aag
 C A Q L V L K Q Q G W T A W S T W K
 tac tgt gac ggt act ttg ccg tcc atc gat gac tgc ttc taa
 Y C D G T L P S I D D C F *

B

atg aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta
 M R F P S I F T A V L F A A S S A L
gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att ccg gct gaa
 A A P V N T T T E D E T A Q I P A E
gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat gtt gct gtt ttg cca
 A V I G Y S D L E G D F D V A V L P
ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt ata aat act act att gcc agc
 F S N S T N N G L L F I N T T I A S
att gct gct aaa gaa gaa ggg gta tct ctc gag aaa aga gag gct gaa gct aag
 I A A K E E G V S L E K R E A E A K
 acc ttc act cgt tgc tcc ctg gcc cgc gaa atg tac aaa ttg ggt gta cca aag
 T F T R C S L A R E M Y K L G V F K
 aat caa ttg gcc cgc tgg acc tgc att gct gaa cac gaa tcg tcc tac aac acc
 N Q L A R W T C I A E H E S S Y N T
 aag gct gtt ggc tcc ttg aac tcc aat ggc tcc ccg gac tat ggc atc ttc caa
 K A V G S L N S N G S R D Y G I F Q
 atc aac aac tac tac tgg tgc tct ccc cca tct ggt gcc ttc tcc tat gat gag
 I N N Y Y W C S F F S G A F S Y D E
 tgc aag atc aag tgc gaa gat ttc ttg gtc gat agc att gaa ccc gct gtc aag
 C K I K C E D F L V D S I E T A V K
 tgc gcc caa ttg gtg ctg aaa caa caa ggc tgg act gcc tgg gtc acc tgg aag
 C A Q L V L K Q Q G W T A W S T W K
 tac tgt gac ggt act ttg ccg tcc atc gat gac tgc ttc taa
 Y C D G T L P S I D D C F *

Figura 26. Seqüenciamento do vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 de *Musca domestica* mutada nas posições N₄₆D (A), S₁₀₆V (B) e T₁₀₇A (C). A seqüência de nucleotídeos sublinhados codifica um peptídeo sinal (α -fator), responsável pela secreção da proteína recombinante. Essa seqüência encontra-se na mesma fase de leitura da seqüência que codifica para os mutantes MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A, cujos códon mutados na seqüência da lisozima 2 encontram-se duplamente sublinhados: códon 5' GAC 3' codifica para um aspartato; 5' GTC 3' para uma valina e 5' GCC 3' para uma alanina respectivamente. O asterisco indica o códon de terminação da tradução.

da expressão das lisozimas mutantes recombinantes. A partir de dez clones de cada mutante selecionados, foi feita uma indução em pequena escala com metanol 1% em meio mínimo BMM, por 67,5 horas. Para análise do perfil de indução, o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante, livre das células,

utilizado em ensaios de atividade de lisozima com a cápsula de *Micrococcus lysodeikticus*. Foi verificado que dessas dez colônias, atividade era detectada em oito colônias dos mutantes MdL2-N₄₆D e MdL2-T₁₀₇A e em sete colônias do mutante MdL2-S₁₀₆V, no entanto havia uma variação de atividade entre as amostras analisadas (dados não mostrados). Ensaio foi realizado também com o meio de cultura induzido de colônias de *Pichia pastoris* transformadas com o vetor pPIC9 sem inserto, revelando, conforme esperado, ausência de atividade para lisozima.

A partir da colônia com maior atividade enzimática, iniciou-se o processo de produção em larga escala das lisozimas mutantes. Separadamente células transformadas de *Pichia pastoris* foram cultivadas em 500 mL de YPD e em seguida induzidas em BMM contendo metanol 1%. Foi verificado que os polipeptídeos, MdL2 mutada nas posições N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A, são induzidos a partir de cerca de 24 horas e que níveis maiores de indução e de atividade, utilizando o substrato fluorogênico MUQ3, são observados com o aumento do tempo de indução que se estendeu até 90,5 horas (dados não mostrados).

A purificação de todos os mutantes foi baseada em dados previamente obtidos para a MdL2, sendo realizada inicialmente precipitação de proteínas com sulfato de amônio na concentração final de 0,56 g/mL. O sedimento proveniente dessa precipitação foi ressuspenso em tampão CP 100 mM pH 3,5 e submetido a diálise contra tampão trietanolamina 20 mM pH 8,5. Em seguida, o sedimento ressuspenso e dialisado contendo as lisozimas mutantes foi aplicado diretamente em coluna Mono-Q para cromatografia de troca iônica em tampão trietanolamina 20 mM pH 8,5. A figura 27A mostra que os mutantes da lisozima 2 (N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A) foram eluídos em uma concentração de NaCl de aproximadamente 0,275 M, 0,25 M

e 0,3 M respectivamente. As frações contendo atividade foram reunidas e dialisadas em tampão trietanolamina 20 mM pH 8,5.

A partir de 500 mL de meio de cultura foram obtidos rendimentos de 8,8 mg, 1,8 mg e 1,6 mg para os mutantes N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A da MdL2 respectivamente.

A pureza dos mutantes foi atestada por SDS-PAGE (Figura 27B). A partir da análise em SDS-PAGE dos mutantes purificados, foram calculadas as massas moleculares relativas dessas enzimas obtendo-se valores de 14.500 D, 14.900 D e 14.500 D para os mutantes N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A respectivamente. Esses valores são similares àquele obtido para a MdL2 selvagem (15.300 D) em SDS-PAGE e coerentes com aqueles estimados para tais mutantes pelo Programa ProtParam ExPASy (13.891 Da, 13.902, 13.860 D respectivamente).

Visando verificar possível alteração na estrutura tridimensional da MdL2 devido à substituição dos resíduos N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ por D, V e A respectivamente, os mutantes (MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A) em tampão fosfato 10 mM pH 6,9 foram analisados por CD e seus espectros comparados com aqueles obtidos para a MdL2 selvagem.

A figura 28A mostra espectros de CD de duas diferentes amostras de MdL2 e compara os mesmos com aqueles dos mutantes N₄₆D, S₁₀₆V, T₁₀₇A. O perfil no UV distante apresenta duas bandas negativas, uma em ≈ 208 nm e outra em ≈ 222 nm, características de proteínas com caráter helicoidal. Percebe-se que a substituição de tais aminoácidos não teve efeito significativo nos espectros obtidos, indicando que não houve alteração expressiva no tipo de enovelamento da estrutura terciária da MdL2. As diferenças de intensidade observadas para os mutantes MdL2-N₄₆D e MdL2-S₁₀₆V provavelmente estão relacionadas a erros experimentais na determinação da concentração de proteína (absorbância a 280nm).

Figura 27. Purificação dos três mutantes simples da lisozima 2 de *Musca domestica* expressos em *Pichia pastoris*. Em A, está representada a cromatografia de troca iônica do meio de cultura contendo MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A. Nessa cromatografia, material correspondendo ao meio de cultura precipitado com (NH₄)₂SO₄ (0,56 g/mL), ressuspenso em tampão CP 100 mM pH 3,5 e dialisado em trietanolamina 20 mM pH 8,5 foi

aplicado na coluna Mono-Q HR 5/5. A atividade dos mutantes (♦) foi detectada usando como substrato *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL em tampão CP 100 mM pH 3,5 e a turbidez lida em 650 nm. O conjunto de frações que foi recolhido está representado pelos losangos vermelhos. A linha azul representa o gradiente de NaCl 1 M preparado em tampão trietanolamina 20 mM pH 8,5. Em B, análise por SDS-PAGE dos mutantes simples da lisozima 2 purificados. Foi usado gel 14% em poliacrilamida e coloração com nitrato de prata. MM representa marcadores de proteína com massas moleculares conhecidas.

Espectros de fluorescência dos mutantes simples e da MdL2 selvagem foram também obtidos na faixa de comprimento de onda de 291,4 a 448,6 nm, majoritariamente detectados pela contribuição dos resíduos de triptofanos (Creighton, 1997), e comprimento de onda de excitação de 280 nm. Pode-se verificar que as mutações não promoveram alteração drástica no ambiente em que se encontram os triptofanos, já que os espectros obtidos foram muito similares aos obtidos para a MdL2, com um máximo de emissão em torno de um comprimento de onda médio de 336,6 nm (variando de 334,4 a 340 nm) (Figura 28B). Percebe-se então, a partir desses dois métodos (CD e fluorescência intrínseca), que as estruturas terciárias de MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A não se desestruturaram com as mutações; ademais é provável que elas tenham mantido o mesmo tipo de enovelamento da MdL2 selvagem.

Com essa informação, partimos para o processo de caracterização que consistiu em determinar os valores de pK_a s do D₅₀ e E₃₂ nos três mutantes simples. Conforme previamente mencionado, para que esses parâmetros sejam determinados é necessário buscarmos valores de $V_{\max \text{ app}}$, $K_m \text{ app}$ e $V_{\max \text{ app}}/K_m \text{ app}$ para as enzimas mutantes em uma faixa de pH previamente estabelecida (Segel,

Figura 28. Espectros de dicroísmo circular (A) e fluorescência intrínseca (B) da lisozima 2 de *Musca domestica* (MdL2) e dos mutantes MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A. Em A, as proteínas selvagem (4,75 μM e 5 μM para as amostras a e b respectivamente) e mutantes (5 μM) foram preparadas em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9. Parâmetros utilizados: espectro obtido como média de cinco leituras subtraído do espectro do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9 no Espectropolarímetro J-720; varredura de 190-260 nm e cubetas de quartzo de 0,01 cm de caminho óptico. Em B, as proteínas selvagem e mutantes (2 μM) foram preparadas em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9. Parâmetros utilizados: comprimento de onda de excitação de 280 nm; espectro de emissão coletado na faixa de 291,4 a 448,6 nm; banho termostatzado a 30°C acoplado ao Espectrofluorímetro Hitachi F4500; espectro obtido como média de cinco leituras subtraído do espectro do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9.

1993). Foram preparados 23 tampões CP 200 mM (Gomori, 1955) com pHs de 2,68 a 7,33, variando cerca de 0,2 unidades de pH entre cada tampão. Como anteriormente, foi utilizado o substrato sintético MUQ3.

A figura 29 retrata o efeito da concentração do substrato MUQ3 na atividade dos mutantes MdL2-N₄₆D (A), MdL2-S₁₀₆V (B) e MdL2-T₁₀₇A (C) em toda faixa de pH estudada. Cada ponto nos gráficos representa uma média de dois ensaios da velocidade de hidrólise do MUQ3, sendo composta pela formação de produto em um único tempo.

Os parâmetros cinéticos determinados para os mutantes simples foram inicialmente comparados com aqueles da MdL2 selvagem. Tabela 5 mostra que a introdução das mutações não altera a velocidade máxima de hidrólise, nem a afinidade de ligação ao MUQ3. Um K_m de $0,12 \pm 0,01$ mM determinado para a MdL2 é estatisticamente igual àquele obtido para a MdL2-N₄₆D (K_m de $0,10 \pm 0,01$), MdL2-S₁₀₆V (K_m de $0,15 \pm 0,02$) e MdL2-T₁₀₇A (K_m de $0,17 \pm 0,04$ mM).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos ($V_{max\ app}$ e $K_{m\ app}$) da lisozima 2 de *Musca domestica* e dos mutantes MdL2-N₄₆D, MdL2-S₁₀₆V e MdL2-T₁₀₇A.

	$K_{m\ app}$ médio (mM) ^(b)	$V_{max\ app}$ (mU/ μ g) ^(c)
N₄₆D ^(a)	$0,10 \pm 0,01$	$4,6E-11 \pm 0,2E-11$
S₁₀₆V ^(a)	$0,15 \pm 0,02$	$6,8E-11 \pm 0,3E-11$
T₁₀₇A ^(a)	$0,17 \pm 0,04$	$5,4E-11 \pm 0,2E-11$
Lisozima 2	$0,12 \pm 0,01$	$10,0E-11 \pm 0,1E-11$

^(a) Mutações produzidas na estrutura primária da lisozima 2 de *Musca domestica*;

^(b) Refere-se a uma média entre os $K_{m\ app}$ determinados em 23 diferentes pHs;

^(c) $V_{max\ app}$ no pH 4,96 obtido para 1 μ g de enzima adicionada.

Figura 29. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade dos mutantes $N_{46}D$ (A), $S_{106}V$ (B) e $T_{107}A$ (C) da lisozima 2 de *Musca domestica* expressos em *Pichia pastoris* em pHs que variaram de 2,68 a 7,33. Foram utilizadas 13 diferentes concentrações de substrato, variando de 3,1 μM a 250 μM . As linhas representam os valores de velocidade esperados a partir do ajuste dos dados experimentais na equação de Michaelis – Menten pelo Programa Enzfitter.

A análise dos parâmetros cinéticos ($V_{\max \text{ app}}$ e $K_m \text{ app}$) da enzima selvagem e de seus mutantes traz ainda uma interessante conclusão: o pH não influencia o K_m .

Isso quer dizer que todas as combinações de estados de ionização dos resíduos catalíticos que geram enzimas produtivas e improdutivas possuem a mesma afinidade de ligação pelo oligossacarídeo (Figura 30). Além disso, não deve haver no sítio ativo dessas lisozimas grupos envolvidos na ligação do substrato que se ionizam nessa faixa de pH.

Figura 30. Efeito do pH na afinidade ($K_{m\text{ app}}$) da lisozima 2 de *Musca domestica* (MdL2) e dos mutantes N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A pelo substrato 4-metilumbeliferil-N-acetilglucosamídeo. Valores de $K_{m\text{ app}}$ foram determinados pelo programa Enzfitter.

O fato dessas lisozimas manterem a mesma atividade catalítica e afinidade de ligação ao substrato confirma a hipótese de que as enzimas mutantes têm a mesma estrutura da selvagem e indica que o sítio ativo dos mutantes não deve ter sido drasticamente modificado.

A partir dos dados de $V_{\max}$ isolados e de $V_{\max}/K_m$ foram feitas estimativas dos valores das constantes de ionização dos resíduos catalíticos das enzimas livres (pK_e) e dos resíduos catalíticos da enzima quando ligados ao substrato (pK_{es}). As determinações dos pK_{es} foram feitas a partir do plote $V_{\max app}$ *versus* pH, enquanto os valores de pK_e foram obtidos por meio do plote $V_{\max app}/K_{m app}$ *versus* pH (Figura 31), utilizando o “Software” Enzfitter.

No processo de ajuste dos dados experimentais na equação $V_{\max app} = V_{\max}/(1+([H^+]/K_{es1})+(K_{es2}/[H^+]))$ e $V_{\max app}/K_{m app} = V_{\max}/K_m/(1+([H^+]/K_{e1})+(K_{e2}/[H^+]))$, esse programa gera valores de constantes de ionização com um erro para aquele conjunto de dados. Portanto, esse erro corresponde à faixa de constantes de ionização que se encaixam perfeitamente no conjunto de dados utilizados para a confecção da curva de $V_{\max app}$ *versus* pH e $V_{\max app}/K_{m app}$ *versus* pH.

Substituição da N₄₆ por D na vizinhança do nucleófilo catalítico da MdL2 revela um pK_{es} de 3,30 e um pK_e de 3,39 para o D₅₀, o que corresponde a um aumento de apenas 0,03 e 0,16 unidades de pH no pK_{es} e pK_e do nucleófilo na MdL2 selvagem (Tabela 6). Esse resultado mostra que a N₄₆ individualmente não é responsável pela redução de 0,33 e 0,62 unidades de pH no valor do pK_{es} e do pK_e do nucleófilo na MdL2 quando comparado com aqueles da HEWL (pK_a s de 3,27 para 3,6 e de 3,23 para 3,85 respectivamente) (Tabela 7). Portanto, nossa hipótese sobre o aumento de pK_a observado para o nucleófilo ser decorrente da repulsão estabelecida entre o nucleófilo e o aspartato que substituiu a N₄₆ foi refutada. A

Figura 31. Efeito do pH na atividade catalítica dos mutantes da lisozima 2 de *Musca domestica* ($N_{46}D$, $S_{106}V$ e $T_{107}A$) representado pelo plote $V_{max\ app}$ versus pH (A) e $V_{max\ app}/K_{m\ app}$ versus pH (B). As curvas representadas foram geradas usando os valores de pK_a s deduzidos a partir do ajuste dos dados experimentais nas equações $V_{max\ app} = V_{max}/(1+([H^+]/K_{es1})+(K_{es2}/[H^+]))$ e $V_{max\ app}/K_{m\ app} = V_{max}/K_m/(1+([H^+]/K_{e1})+(K_{e2}/[H^+]))$ empregando o programa Enzfitter. As lisozimas foram incubadas com diferentes concentrações de MUQ3 em tampões CP 200 mM em pHs variando de 2,68 a 7,33.

mutação $N_{46}D$ também não devolve o pK_a mais alto do doador de prótons observado na HEWL. A partir de uma diferença de 0,47 e 0,41 unidades de pH no pK_{es} e pK_e do E_{35} na HEWL para o E_{32} na MdL2 (Tabela 7), recuperação de apenas 0,18 e 0,11 unidades de pH foi observada para os pK_{es} e pK_e do E_{32} no mutante MdL2- $N_{46}D$ (Tabela 6).

No mutante MdL2-S₁₀₆V, é verificado um aumento de 0,10 e 0,26 unidades de pH para o pK_{es} e pK_e do D₅₀ (Tabela 6). Já no doador de prótons catalítico, os valores dessas constantes de ionização foram 0,24 e 0,22 unidades de pH respectivamente maiores do que aquelas no E₃₂ da MdL2. Também nesse mutante, o aumento nos valores dos pK_a s dos resíduos catalíticos não representa na sua totalidade a diferença de pK_a s existente entre a lisozima digestiva da mosca com a não-digestiva da galinha (Tabela 7).

No mutante T₁₀₇A, a substituição da T₁₀₇, que estabelece uma ligação de hidrogênio com E₃₂, por A muda o pK_{es} e o pK_e do D₅₀ de 3,27 e 3,23 para 3,36 e 3,38 respectivamente (ΔpK_{es} e ΔpK_e de 0,09 e 0,15 respectivamente) e do E₃₂ de 6,23 e 6,20 para 6,42 e 6,36 respectivamente (ΔpK_{es} e ΔpK_e de 0,19 e 0,16 respectivamente) (Tabela 6). Nesse caso, também vale conclusão semelhante àquela acima.

Por fim, é importante ressaltar que as diferenças de pK_a s do E₃₂ e D₅₀ nos mutantes em relação à MdL2, ainda que existente, são muito pequenas se enquadrando no limite de erro. Logo, os resultados apresentados sugerem que os aminoácidos N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ individualmente não são responsáveis pela redução do pH ótimo na MdL2 de mosca, uma vez que nenhum mutante restabelece o pH ótimo de 5,2 (calculado a partir dos valores de pK_a s) observado para a HEWL (Tabela 7).

De qualquer forma, nossa hipótese sobre a participação dos resíduos N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ na modulação da ionização das carboxilas do E₃₂ e do D₅₀ não foi completamente refutada. Se consideramos que na HEWL, os resíduos D₄₈, V₁₀₉ e A₁₁₀ estão em conjunto relacionados com os valores de pK_a s mais altos observados para D₅₂ e E₃₅, é de se esperar que ao transferimos todos esses resíduos para a MdL2, os pK_a s dos seus resíduos catalíticos também aumentem para valores

Tabela 6. Valores de pK_a s dos resíduos catalíticos da lisozima 2 de Musca domestica e dos três mutantes simples ($N_{46}D$, $S_{106}V$ e $T_{107}A$) nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2}).

	$pK_{es1}^{(a)}$	$pK_{es2}^{(b)}$	$pK_{e1}^{(a)}$	$pK_{e2}^{(b)}$	$\Delta pK_{es1}^{(*)}$	$\Delta pK_{es2}^{(*)}$	$\Delta pK_{e1}^{(*)}$	$\Delta pK_{e2}^{(*)}$
Lisozima 2	$3,27 \pm 0,03$	$6,23 \pm 0,03$	$3,23 \pm 0,05$	$6,20 \pm 0,05$	–	–	–	–
N46D	$3,30 \pm 0,05$	$6,41 \pm 0,05$	$3,39 \pm 0,05$	$6,31 \pm 0,05$	0,03	0,18	0,16	0,11
S107V	$3,37 \pm 0,04$	$6,47 \pm 0,04$	$3,49 \pm 0,06$	$6,42 \pm 0,06$	0,1	0,24	0,26	0,22
T107A	$3,36 \pm 0,04$	$6,42 \pm 0,04$	$3,38 \pm 0,08$	$6,36 \pm 0,08$	0,09	0,19	0,15	0,16

^(a) Refere-se ao nucleófilo catalítico;

^(b) Refere-se ao doador de prótons catalítico;

^(*) Δ refere-se à diferença no valor de pK_a do mutante com aquele da lisozima 2 de Musca domestica.

Tabela 7. Comparação dos valores dos pK_a s dos resíduos catalíticos da lisozima 2 de Musca domestica e da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2}).

	$pK_{es1}^{(a)}$	$pK_{es2}^{(b)}$	$pK_{e1}^{(a)}$	$pK_{e2}^{(b)}$	$\Delta pK_{es1}^{(*)}$	$\Delta pK_{es2}^{(*)}$	$\Delta pK_{e1}^{(*)}$	$\Delta pK_{e2}^{(*)}$
Lisozima 2	$3,27 \pm 0,03$	$6,23 \pm 0,03$	$3,23 \pm 0,05$	$6,20 \pm 0,05$	–	–	–	–
HEWL	$3,6 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1$	$3,85 \pm 0,06$	$6,61 \pm 0,07$	0,33	0,47	0,62	0,41

^(a) Refere-se ao nucleófilo catalítico;

^(b) Refere-se ao doador de prótons catalítico;

^(*) Δ refere-se à diferença no valor de pK_a da HEWL com aquele da lisozima 2 de Musca domestica.

análogos.

Assim, a produção e caracterização de um mutante triplo nessas mesmas posições (MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A) seria uma maneira de esclarecer de forma conclusiva a participação ou não dos resíduos N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ na modulação das constantes de ionização dos resíduos catalíticos da MdL2 e, conseqüentemente, no pH ótimo mais ácido das lisozimas digestivas de inseto.

Para a produção do mutante triplo, pGEMT codificando para a MdL2-N₄₆D foi submetido à mutagênese sítio-dirigida utilizando iniciadores com mutações nas posições S₁₀₆V e T₁₀₇A simultaneamente. Não foi possível utilizar os iniciadores previamente adquiridos para essas mutações individuais, pois a reação de PCR para uma mutação seria automaticamente removida na reação seguinte, já que os códons mutados estão localizados no meio do iniciador, com cerca de 10 a 15 bases de seqüência correta em ambos os lados (seqüências mostradas no item 3.3.2).

A reação de mutagênese sítio-dirigida foi feita utilizando o kit “*QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis*” (Stratagene). O plasmídeo resultante foi submetido a um seqüenciamento de DNA a fim de verificar se as três mutações haviam sido corretamente incorporadas. A figura 32 mostra que a mutagênese sítio-dirigida foi bem sucedida, já que os três códons 5’GAC3’, 5’GTC3’ e 5’GCC3’ codificando para D, V e A respectivamente foram incorporados em conjunto na seqüência de DNA que codifica para a MdL2.

Posteriormente, foi feita a subclonagem dessa seqüência para o pPIC9, seguindo os procedimentos previamente descritos para as construções contendo os mutantes simples da MdL2. O plasmídeo resultante desse procedimento (pPIC9-MdL2N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A) foi também submetido a um seqüenciamento, revelando que a seqüência obtida estava intacta, sem nenhuma alteração na sua seqüência de

Figura 32. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de *Musca domestica* mutada simultaneamente nas posições N₄₆D (A), S₁₀₆V e T₁₀₇A (B). A caixa preta indica os nucleotídeos mutados.

bases e que a seqüência de DNA mutante estava em fase de leitura com a seqüência do vetor pPIC9 que codifica o α -fator (Figura 33). O plasmídeo mutante foi então linearizado com *SacI* e em seguida eletroporado na levedura *Pichia pastoris*.

Células transformadas de *Pichia pastoris* foram cultivadas em YPD e em seguida induzidas em BMM contendo 1% de metanol. O polipeptídeo é induzido a partir de 21 horas e níveis maiores de indução e atividade são observados com o aumento do tempo de indução que se estendeu até 92,5 horas (dados não mostrados).

```

atg aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta
M  R  F  P  S  I  F  T  A  V  L  F  A  A  S  S  A  L
gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att ccg gct gaa
A  A  P  V  N  T  T  T  E  D  E  T  A  Q  I  P  A  E
gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat gtt gct gtt ttg cca
A  V  I  G  Y  S  D  L  E  G  D  F  D  V  A  V  L  P
ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt ata aat act act att gcc agc
F  S  N  S  T  N  N  G  L  L  F  I  N  T  T  I  A  S
att gct gct aaa gaa gaa ggg gta tct ctc gag aaa aga gag gct gaa gct aag
I  A  A  K  E  E  G  V  S  L  E  K  R  E  A  E  A  K
acc ttc act cgt tgc tcc ctg gcc cgc gaa atg tac aaa ttg ggt gta cca aag
T  F  T  R  C  S  L  A  R  E  M  Y  K  L  G  V  F  K
aat caa ttg gcc cgc tgg acc tgc att gct gaa cac gaa tcg tcc tac aac acc
N  Q  L  A  R  W  T  C  I  A  E  H  E  S  S  Y  N  T
aag gct gtt ggc tcc ttg aac tcc gac ggc tcc ccg gac tat ggc atc ttc caa
K  A  V  G  S  L  N  S  D  G  S  R  D  Y  G  I  F  Q
atc aac aac tac tac tgg tgc tct ccc cca tct ggt gcc ttc tcc tat gat gag
I  N  N  Y  Y  W  C  S  F  F  S  G  A  F  S  Y  D  E
tgc aag atc aag tgc gaa gat ttc ttg gtc gat agc att gaa ccc gct gtc aag
C  K  I  K  C  E  D  F  L  V  D  S  I  E  T  A  V  K
tgc gcc caa ttg gtg ctg aaa caa caa ggc tgg act gcc tgg gtc gcc tgg aag
C  A  Q  L  V  L  K  Q  Q  G  W  T  A  W  V  A  W  K
tac tgt gac ggt act ttg ccg tcc atc gat gac tgc ttc taa
Y  C  D  G  T  L  P  S  I  D  D  C  F  *

```

Figura 33. Seqüenciamento do vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 2 de *Musca domestica* mutada simultaneamente nas posições N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A. A seqüência de nucleotídeos sublinhados codifica um peptídeo sinal (α -fator), responsável pela secreção da proteína recombinante. Essa seqüência encontra-se na mesma fase de leitura da seqüência que codifica para o mutante triplo MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A, cujos códon mutados na seqüência da lisozima 2 encontram-se duplamente sublinhados. O asterisco indica o códon de terminação da tradução.

A purificação do mutante triplo foi baseada em dados previamente obtidos para a MdL2 selvagem e para os mutantes simples. Assim, para a purificação desse mutante triplo, foi realizada inicialmente precipitação de proteínas com sulfato de amônio na concentração final de 0,56 g/mL. O sedimento proveniente dessa precipitação foi ressuspensão em tampão CP 100 mM pH 3,5 e submetido a uma diálise contra tampão tris-HCl 20 mM pH 8,5. A remoção dos íons sulfato e amônio

no processo de diálise foi crucial para que apenas a proteína mutante carregada negativamente no pH 8,5 interagisse com a coluna catiônica Mono-Q, utilizada na etapa seguinte de purificação.

Em seguida, o sedimento ressuspenso e dialisado contendo a lisozima mutante foi aplicado em coluna Mono-Q para cromatografia de troca iônica em tampão tris-HCl 20 mM pH 8,5. A figura 34A mostra que MdL2N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A foi eluída em uma concentração de NaCl de aproximadamente 0,325 M. As frações contendo atividade foram reunidas e dialisadas em tampão tris-HCl 20 mM pH 8,5. Foram obtidos 3,5 mg de proteína a partir de 500 mL de meio de cultura.

A pureza do mutante triplo foi atestada por SDS-PAGE (Figura 34B), com massa molecular relativa de 13.600 D obtida a partir da relação estabelecida entre o log da massa molecular dos padrões de proteína *versus* a migração eletroforética dos mesmos em gel de poliacrilamida 14% na presença de SDS (Shapiro *et al.*, 1967). Esse valor é similar àquele obtido para a MdL2 selvagem (15.300 D), para os mutantes simples N₄₆D, S₁₀₆V e T₁₀₇A (14.500 D, 14.900 D e 14.500 D respectivamente) e para aquele previsto a partir da sua seqüência primária (13.873 D).

Figura 34. Purificação do mutante triplo da lisozima 2 de *Musca domestica* expresso em *Pichia pastoris*. Em A, está representada a cromatografia de troca iônica do meio de cultura contendo MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A. Nessa cromatografia, material correspondendo ao meio de cultura precipitado com (NH₄)₂SO₄ (0,56 g/mL), ressuspenso em tampão CP 100 mM pH 3,5 e dialisado em tris-HCl 20 mM pH 8,5 foi aplicado na coluna Mono-Q HR 5/5. A atividade do mutante (♦) foi detectada usando como substrato *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL em tampão CP 100 mM pH 3,5 e a turbidez lida em 650 nm. O conjunto de frações que foi recolhido está representado pelos losangos vermelhos. A linha azul representa o gradiente de NaCl 1 M preparado em tampão tris-HCl 20 mM pH 8,5. Em B, análise por SDS-PAGE do mutante triplo da lisozima 2 purificado. Foi usado gel 14% em poliacrilamida e coloração com nitrato de prata. Na raia localizada a esquerda estão marcadores de massa molecular conhecidos.

É importante ressaltar que a mutação tripla no sítio ativo da MdL2 não teve efeito significativo nos espectros de CD e fluorescência, indicando alta probabilidade de manutenção do mesmo tipo de enovelamento de estrutura terciária apresentado para a enzima selvagem e ausência de desestruturação tridimensional (Figura 35).

Uma vez purificado, partimos então para o processo de caracterização que consistiu em determinar os valores de pK_{es} e pK_e do D₅₀ e do E₃₂ do mutante triplo, a partir do plote de $V_{max\ app}$ e $V_{max\ app}/K_{m\ app}$ em função do pH respectivamente, seguindo condições pré-estabelecidas para a MdL2 selvagem e mutantes simples. A figura 36 retrata o efeito da concentração do substrato MUQ3 na atividade do mutante MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A em toda faixa de pH estudada. Cada ponto no gráfico representa uma média de quatro ensaios da velocidade de hidrólise do MUQ3, sendo composta pela formação de produto em um único tempo.

Figura 35. Espectros de dicróismo circular (A) e fluorescência intrínseca (B) da lisozima 2 de *Musca domestica* (MdL2) e do mutante MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A. Em A, as proteínas, selvagem (4,75 μ M e 5 μ M para as amostras a e b respectivamente) e mutante triplo (5 μ M), foram preparadas em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9. Parâmetros utilizados: espectro obtido como média de cinco leituras subtraído do espectro do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9 no Espectropolarímetro J-720; varredura de 190-260 nm e cubetas de quartzo de 0,01 cm de caminho óptico. Em B, as proteínas selvagem e mutante (2 μ M) foram preparadas em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9. Parâmetros utilizados: comprimento de onda de excitação de 280 nm; espectro de emissão coletado na faixa de 291,4 a 448,6 nm; banho termostatzado a 30°C acoplado ao Espectrofluorímetro Hitachi F4500; espectro obtido como média de cinco leituras subtraído do espectro do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9.

Figura 36. Efeito da concentração do 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo (MUQ3) na atividade do mutante $N_{46}D-S_{106}V-T_{107}A$ da lisozima 2 de Musca domestica expresso em Pichia pastoris em pHs que variaram de 2,68 a 7,33. Foram utilizadas 13 diferentes concentrações de substrato, variando de 3,1 μM a 250 μM . As linhas representam os valores de velocidade esperados a partir do ajuste dos dados experimentais na equação de Michaelis – Menten pelo Programa Enzfitter.

A comparação dos parâmetros cinéticos revela que a introdução dos aminoácidos D_{46} , V_{106} e A_{107} na sequência da MdL2 não altera a velocidade de hidrólise do MUQ3 e que a afinidade de ligação ao substrato é muito pouco afetada (Tabela 8). O K_m de $0,19 \pm 0,02$ é muito similar àqueles já previamente obtidos para os mutantes simples $S_{106}V$ e $T_{107}A$ (K_m médio de $0,15 \pm 0,02$ mM e $0,17 \pm 0,04$ mM respectivamente) e apenas 1,5 vezes maior que o da enzima selvagem (K_m médio de $0,12 \pm 0,01$ mM) (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros cinéticos ($V_{max\ app}$ e $K_m\ app$) da lisozima 2 de Musca domestica, dos mutantes simples ($N_{46}D$, $S_{106}V$ e $T_{107}A$) e triplo ($N_{46}D-S_{106}V-T_{107}A$).

	$K_m\ app$ médio (mM) ^(b)	$V_{max\ app}$ (mU/ μg) ^(c)
$N_{46}D$ ^(a)	$0,10 \pm 0,01$	$4,6E-11 \pm 0,2E-11$
$S_{107}V$ ^(a)	$0,15 \pm 0,02$	$6,8E-11 \pm 0,3E-11$
$T_{107}A$ ^(a)	$0,17 \pm 0,04$	$5,4E-11 \pm 0,2E-11$
$N_{46}D-S_{106}V-T_{107}A$ ^(a)	$0,19 \pm 0,02$	$7,1E-11 \pm 0,4E-11$
Lisozima 2	$0,12 \pm 0,01$	$10,0E-11 \pm 0,1E-11$

^(a) Mutações produzidas na estrutura primária da lisozima 2 de Musca domestica;

^(b) Refere-se a uma média entre os $K_m\ app$ determinados em 23 diferentes pHs;

^(c) $V_{max\ app}$ no pH 4,96 obtido para 1 μg de enzima adicionada.

Além disso, a análise dos parâmetros cinéticos mostra ainda que o pH não influencia a afinidade de ligação do mutante triplo pelo oligossacarídeo sintético, propriedade essa já previamente observada para a MdL2 e mutantes simples (Figura 37).

Figura 37. Efeito do pH na afinidade ($K_{m \text{ app}}$) do mutante $N_{46}D-S_{106}V-T_{107}A$ pelo substrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-quitotriosídeo. Valores de $K_{m \text{ app}}$ foram determinados pelo programa Enzfitter.

A partir dos dados de $V_{\text{max app}}$ isolados e de $V_{\text{max app}}/K_{m \text{ app}}$ em função do pH foram feitas estimativas dos valores das constantes de ionização dos resíduos catalíticos da enzima quando ligados ao substrato (pK_{es}) (Figura 38A) e dos resíduos catalíticos da enzima livre (pK_{e}) (Figura 38B) respectivamente.

Como pode ser observado na tabela 9, os efeitos combinados da substituição simultânea da N_{46} , S_{106} e T_{107} por D, V e A respectivamente na sequência da MdL2 aumentam os pK_{es} dos resíduos catalíticos para valores próximos daqueles previamente determinados para a HEWL. Foram obtidos valores de pK_{es} de 3,51 e 6,58 e de pK_{e} de 3,57 e 6,64 para o D_{50} e E_{32} respectivamente, o que corresponde a um aumento de 0,24 e 0,35 unidades de pH no pK_{es} (ΔpK_{es}) e de 0,34 e 0,44 unidades de pH no pK_{e} (ΔpK_{e}) do nucleófilo e do doador de prótons respectivamente em relação à MdL2 selvagem (Tabela 9). Essa variação aproxima-se bastante da

Figura 38. Efeito do pH na atividade catalítica do mutante triplo da lisozima 2 de *Musca domestica* ($N_{46}D-S_{106}V-T_{107}A$) representado pelo plote $V_{max\ app}$ versus pH (A) e $V_{max\ app}/K_{m\ app}$ versus pH (B). As curvas representadas foram geradas usando os valores de pK_a s deduzidos a partir do ajuste dos dados experimentais nas equações $V_{max\ app} = V_{max}/(1+([H^+]/K_{es1})+(K_{es2}/[H^+]))$ e $V_{max\ app}/K_{m\ app} = V_{max}/K_m/(1+([H^+]/K_{e1})+(K_{e2}/[H^+]))$ empregando o programa Enzfitter. As lisozimas foram incubadas com diferentes concentrações de MUQ3 em tampões CP 200 mM em pHs variando de 2,68 a 7,33.

diferença entre os pK_a s dos resíduos catalíticos da HEWL em relação àqueles da MdL2 selvagem: ΔpK_{es} de 0,33 e 0,47 e ΔpK_e de 0,62 e 0,41 para o nucleófilo e doador de prótons respectivamente (Tabela 9). Assim, a tripla mutação responde por 74% da diferença do pK_{es} do nucleófilo e do doador de prótons entre a MdL2 e HEWL, por 100% da diferença do pK_e do doador de prótons e por 55% da diferença

Tabela 9. Comparação dos valores de pK_a s dos resíduos catalíticos do mutante MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A e da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) com aqueles da lisozima 2 de Musca domestica nas formas livres (pK_{e1} e pK_{e2}) e no complexo ES (pK_{es1} e pK_{es2}).

	$pK_{es1}^{(b)}$	$pK_{es2}^{(c)}$	$pK_{e1}^{(b)}$	$pK_{e2}^{(c)}$	$\Delta pK_{es1}^{(*)}$	$\Delta pK_{es2}^{(*)}$	$\Delta pK_{e1}^{(*)}$	$\Delta pK_{e2}^{(*)}$
Lisozima 2	3,27 ± 0,03	6,23 ± 0,03	3,23 ± 0,05	6,20 ± 0,05	–	–	–	–
N46D-S106V-T107A^(a)	3,51 ± 0,05	6,58 ± 0,05	3,57 ± 0,06	6,64 ± 0,06	0,24	0,35	0,34	0,44
HEWL	3,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1	3,85 ± 0,06	6,61 ± 0,07	0,33	0,47	0,62	0,41

^(a) Mutações produzidas na estrutura primária da lisozima 2 de Musca domestica;

^(b) Refere-se ao nucleófilo catalítico;

^(c) Refere-se ao doador de prótons catalítico;

^(*) Δ refere-se à diferença no valor de pK_a do mutante triplo e HEWL com aquele da lisozima 2.

do pK_e do nucleófilo. Portanto, a presença conjunta de N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ responde majoritariamente pela redução dos pK_a s dos resíduos catalíticos da MdL2 e, conseqüentemente, por seu pH ótimo ácido frente ao substrato sintético MUQ3.

Esse resultado confirma a nossa hipótese sobre a participação dos resíduos apolares V e A no aumento dos valores de pK_a s do ácido catalítico das lisozimas não-digestivas, como é o caso da HEWL, uma vez que ao transferimos esses dois resíduos para o ambiente do E₃₂ na lisozima digestiva de mosca, o valor de pK_{es} aumenta significativamente e o pK_e iguala-se àquele do E₃₅ na HEWL. Além disso, como previamente mostrado, a mutação simples N₄₆D não eleva o pK_a do nucleófilo, o que é observado apenas quando a essa substituição se combinam mutações no ambiente do doador de prótons (S₁₀₆V-T₁₀₇A). Dessa forma, nota-se que a presença do microambiente mais apolar ao redor do doador de prótons é também imprescindível para que o grupo carboxilato do D₅₀ diminua sua acidez, resultando assim em um aumento no valor da sua constante de ionização.

A redução das constantes de ionização dos resíduos catalíticos da MdL2, proveniente da modificação no conjunto de aminoácidos do microambiente de D₅₀ e E₃₂, parece contribuir principalmente por aumentar a forma ionizada do D₅₀ no intestino médio da mosca (pH 3,1) (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). Como pode ser calculado pela equação de Henderson-Hasselbach ($pH = pK_a + \log[\text{forma desprotonada}]/[\text{forma protonada}]$), a população da forma ionizada do nucleófilo, a qual é necessária na catálise, aumenta de 18% na HEWL para 68% na MdL2, forma iônica essa necessária no processo de catálise. A porcentagem da forma não-ionizada para o doador de prótons, também necessária na catálise, não sofre redução significativa (cerca de 0,07%) com a diminuição na constante de ionização

do E₃₂ na MdL1 e MdL2, quando comparada ao E₃₅ na HEWL, ficando ambos glutamatos quase que na sua totalidade na forma protonada (99,9%).

Naturalmente a porcentagem da forma desprotonada e protonada do nucleófilo e do doador de prótons, respectivamente, no interior do intestino médio da larva de mosca está diretamente relacionada à porcentagem de complexos ES produtivos formados e conseqüentemente, à eficiência de digestão das bactérias presentes na matéria orgânica em decomposição. Contudo, como as conclusões até aqui levantadas foram baseadas no uso do substrato sintético (MUQ3), faz-se necessário nesse estudo saber se esses resíduos do microambiente dos resíduos catalíticos (N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇) estariam também relacionados ao pH ótimo mais ácido da atividade das lisozimas digestivas frente à cápsula de bactérias.

Assim, com o intuito de responder essa questão, o efeito do pH em diferentes forças iônicas (μ 0,2, 0,1, 0,07 e 0,02) foi avaliado para o mutante N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A da MdL2. Vários estudos demonstram que frente à cápsula de bactéria, as lisozimas “c” digestivas e não-digestivas apresentam atividade lítica e pH ótimo que são afetados pela força iônica (Davies *et al.*, 1969; Saint-Blancard *et al.*, 1970; Maurel & Douzou, 1976; Lemos *et al.*, 1993; Dobson *et al.*, 1984; Ito *et al.*, 1995; Regel *et al.*, 1998; Cançado *et al.*, 2007). No entanto, nas lisozimas digestivas, o pH ótimo permanece dentro de uma região estreita e ácida para quaisquer forças iônicas, ao passo que nas não-digestivas, a curva de pH ótimo se alarga, chegando a valores básicos de pH com a redução da força iônica. A lisozima HEWL, por exemplo, apresenta pH ótimo ácido de 5,4 na força iônica de 0,2, que se eleva para 7,5 na força iônica de 0,1 (Figura 39A) (Park *et al.*, 1997; Cançado *et al.*, 2007), podendo chegar a valores de 8,6 na força iônica de 0,025, como demonstrado por Saint-Blancard *et al.* (1970).

Os gráficos da figura 39B, expressos em atividade relativa (%) em função do pH em diferentes forças iônicas, mostram que o mutante triplo da MdL2 continua exibindo um pH ótimo ácido e que esse parâmetro também é alterado em função da

Figura 39. Atividade da HEWL (A) e do mutante MdL2-N₄₆D-S₁₀₆V-T₁₀₇A (B) em função do pH e da força iônica. As forças iônicas (μ) usadas foram de 0,2 (♦), 0,1 (■), 0,07 (▲) e 0,02 (x). Cada ponto da figura representa um ensaio de 4 tempos, em que as lisozimas foram incubadas com o substrato *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL ressuspenso nos tampões com μ e pH especificados.

força iônica do meio reacional. Em força iônica mais baixa, $\mu=0,02$, a atividade máxima ocorre em pH de 5,0, ou seja, uma unidade de pH a mais que o pH ótimo (4,0) na maior força iônica ($\mu=0,2$). Esses valores são iguais àqueles previamente obtidos para a MdL2: pH ótimo de 4,8 e 3,8 nas μ de 0,02 e 0,2, respectivamente (Figura 7B). Assim, o mutante triplo da MdL2 continua apresentando atividade máxima em uma estreita faixa de pH ácido, característica das lisozimas digestivas. Portanto, apesar dos resíduos N₄₆, S₁₀₆ e T₁₀₇ contribuírem para o pH ótimo mais ácido na MdL2 frente ao substrato sintético mediante a redução dos valores de pK_a s dos resíduos catalíticos, esses aminoácidos não são, por si só, responsáveis pelo pH ótimo ácido da MdL2 frente ao *Micrococcus lysodeikticus*.

É evidente, como previamente mencionado, que os valores mais baixos de pK_a s dos resíduos catalíticos são importantes para a atividade das lisozimas digestivas no tubo digestivo ácido da mosca, mas é provável que a combinação de outros fatores, provavelmente externos ao sítio ativo, concorram para a modulação do pH ótimo na atividade das lisozimas digestivas sobre seu substrato natural.

Assim, com o objetivo de localizar tais fatores, análise estrutural da distribuição de aminoácidos carregados na superfície da MdL1, MdL2 e HEWL foi realizada utilizando o Programa DeepView (Guex & Peitsch, 1997). Superfícies eletrostáticas da MdL1 e da MdL2 revelam a presença de número similar de resíduos básicos: 10 (K₁, R₅, R₁₀, K₁₉, R₃₆, R₆₈, R₉₄, K₉₅, K₉₇ e K₁₀₉) e 12 (K₁, R₅, R₁₀, K₁₄, K₁₉, R₂₄, K₃₈, R₄₉, K₇₅, K₇₇, K₉₁, K₉₈ e K₁₀₉) respectivamente. Além disso, foi possível observar durante análise estrutural a presença de 7 aminoácidos ácidos (E₁₁, E₂₁, E₃₀, E₇₃, D₇₉, D₈₄ e D₁₂₀) e 11 (E₁₁, E₃₀, D₇₂, E₇₃, E₇₉, D₈₀, D₈₄, E₈₇, D₁₁₂, D₁₁₉ e D₁₂₀) na superfície da MdL1 e MdL2 respectivamente (Figura 40). Esse maior

Figura 40. Superfície eletrostática da lisozima 1 (A) e da lisozima 2 (B) de *Musca domestica*. Resíduos básicos representados em azul, resíduos ácidos em vermelho e neutros em branco. O padrão de cores usado para mapear o potencial eletrostático nas superfícies das proteínas foi: vermelho (-1,8 J/C), branco (0,0 J/C) e azul (5,0 J/C). Constante dielétrica da água de 80. Essas figuras foram construídas no Programa Deep View.

Figura 41. Superfície eletrostática da lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL). Resíduos básicos representados em azul, resíduos ácidos em vermelho e neutros em branco. O padrão de cores usado para mapear o potencial eletrostático na superfície da HEWL foi: vermelho (-1,8 J/C), branco (0,0 J/C) e azul (5,0 J/C). Constante dielétrica da água de 80. Essa figura foi construída no Programa Deep View.

(Jollès *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1995; Prager, 1996; Regel *et al.*, 1998). Alguns grupos até associam o pH ótimo com essa propriedade (Jollès *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1995; Regel *et al.*, 1998), no entanto essa interdependência não foi ainda efetivamente demonstrada.

Considerando que a cápsula da bactéria é negativa e que a presença de uma superfície positivamente carregada seja importante para a ocorrência da interação eletrostática entre a lisozima e o substrato, frente às cápsulas de bactéria, o pH será ótimo não apenas quando o nucleófilo e o doador de prótons estiverem na porcentagem máxima de suas formas cataliticamente adequadas (como o é frente ao MUQ3), mas também quando, em associação a esse fator, o número de cargas positivas na superfície da proteína estabelecer melhor interação eletrostática com o *Micrococcus lysodeikticus*. Inclusive as cargas negativas presentes na superfície das lisozimas digestivas e não-digestivas podem ser fator de repulsão eletrostática entre a enzima e o substrato polianiónico. Em suma, resíduos eletricamente carregados da superfície das lisozimas podem influenciar o pH ótimo.

Por homologia, é possível observar uma série de resíduos positivos na HEWL que estão ausentes na MdL1 (Figura 3; alinhamento de seqüências em introdução). São eles: Y₁₃K, A₁₄R, E₂₁R, E₃₀K, T₄₃R, Y₅₉R, N₆₆R, Y₇₁R, Y₁₁₀R, S₁₁₂K, N₁₁₉R e F₁₂₂R, sendo que o primeiro resíduo equivale ao aminoácido presente na MdL1 e o segundo ao resíduo encontrado na HEWL (numeração da MdL1). Análise estrutural

sugere que todos esses resíduos básicos encontram-se na superfície da HEWL. No entanto, utilizando o programa GETAREA 1.1 foi possível perceber que alguns deles encontram-se mais expostos na superfície (sublinhados) do que outros. Assim, com o objetivo de verificar a influência dos resíduos de aminoácidos carregados sobre o pH ótimo das lisozimas digestivas, dos oito aminoácidos carregados positivamente mais expostos na superfície da HEWL, seis deles foram substituídos na sequência de aminoácidos da MdL1, por mutagênese sítio dirigida, gerando o mutante sêxtuplo MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R (Figura 42). Tais mutações devem aumentar a carga positiva da superfície da lisozima digestiva, sendo que a razão entre aminoácidos básicos e ácidos na superfície variou de 1,4 para 2,6, alcançando aquela verificada para a HEWL (2,4).

Figura 42. Superfície eletrostática da lisozima 1 de Musca domestica (A) e da HEWL (B). Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam possíveis substituições de resíduos ácidos e neutros na superfície da lisozima 1 por aminoácidos básicos da HEWL: Y₁₃K, A₁₄R, E₃₀K, T₄₃R, Y₇₁R e Y₁₁₀R. Resíduos básicos representados em azul, resíduos ácidos em vermelho, neutros em branco e substrato no sítio ativo em amarelo. O padrão de cores usado para mapear o potencial eletrostático nas superfícies das proteínas foi: vermelho (-1,8 J/C), branco (0,0 J/C) e azul (5,0 J/C). Constante dielétrica da água de 80. Essas figuras foram estruturalmente alinhadas e construídas no Programa Deep View.

Os experimentos de mutagênese sítio-dirigida foram realizados na sequência da MdL1 previamente clonada no pGEMT seguindo o método da sobreposição, conforme detalhado em materiais e métodos (ver item 3.3.3.1; figura 4), seguidos de seqüenciamento de DNA a cada mutação introduzida. Conforme pode ser visualizado na figura 43, todos os seis códons codificando para a Y₁₃, A₁₄, E₃₀, T₄₃, Y₇₁ e Y₁₁₀ foram devidamente substituídos por 5'AAA3', 5'CGC3', 5'AAG3', 5'CGC3', 5'CGC3' e 5'CGC3' codificando respectivamente os resíduos K, R, K, R, R e R.

Posteriormente, mutante sêxtuplo foi donado em pPIC9, linearizado e transformado em *Pichia pastoris* por eletroporação, seguindo procedimentos previamente detalhados. A figura 44 revela que todos os seis códons foram devidamente mutados e que a sequência de nucleotídeos que codifica para o mutante sêxtuplo estava em fase de leitura com a sequência de DNA que codifica para o peptídeo sinal para secreção.

A partir da seleção de 28 clones transformantes, apenas três apresentaram atividade de lisozima detectável em pequena escala de indução por 72,5 horas (dados não mostrados). Partimos então para o processo de produção em larga escala (2 L de meio de cultura) do mutante sêxtuplo, seguida de sua purificação.

Figura 43. Eletroferograma da reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T codificando para a lisozima 2 de *Musca domestica* mutada simultaneamente nas posições Y₁₃K-A₁₄R (A), E₃₀K (B), T₄₃R (C), Y₇₁R (D) e Y₁₁₀R (E). A caixa preta indica os nucleotídeos mutados.

```

atg aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta
M  R  F  P  S  I  F  T  A  V  L  F  A  A  S  S  A  L
gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att ccg gct gaa
A  A  P  V  N  T  T  T  E  D  E  T  A  Q  I  P  A  E
gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat gtt gct gtt ttg cca
A  V  I  G  Y  S  D  L  E  G  D  F  D  V  A  V  L  P
ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt ata aat act act att gcc agc
F  S  N  S  T  N  N  G  L  L  F  I  N  T  T  I  A  S
att gct gct aaa gaa gaa ggg gta tct ctc gag aaa aga gag gct gaa gct aag
I  A  A  K  E  E  G  V  S  L  E  K  R  E  A  E  A  K
acc ttc act cgc tgc tgc ttg gcc cgt gaa atg aaa cgc ttg ggt gta cct aaa
T  F  T  R  C  S  L  A  R  E  M  K  R  L  G  V  P  K
tcc gaa ttg ccc caa tgg acc tgc att gct aag cac gaa tcc tcc tac cgc acc
S  E  L  P  Q  W  T  C  I  A  K  H  E  S  S  Y  R  T
aac gtt gtt ggt ccc cgc aac tcc aac ggt tcc aac gat tac ggt atc ttc cag
N  V  V  G  P  R  N  S  N  G  S  N  D  Y  G  I  F  Q
atc aac aac tac tac tgg tgt caa cca tcc aac ggc cgt ttc tcc cgc aac gaa
I  N  N  Y  Y  W  C  Q  P  S  N  G  R  F  S  R  N  E
tgc cac ttg tcc tgt gac gct ttg ttg acc gac aac atc tcc aac tct gtg acc
C  H  L  S  C  D  A  L  L  T  D  N  I  S  N  S  V  T
tgt gcc cgc aag atc aag tcc caa caa ggc tgg act gcc tgg tcc acc tgg aag
C  A  R  K  I  K  S  Q  Q  G  W  T  A  W  S  T  W  K
cgc tgc agc ggt tcc ttg ccc agc atc aac gac tgt ttt taa
R  C  S  G  S  L  P  S  I  N  D  C  F  *

```

Figura 44. Seqüenciamento do vetor pPIC9 contendo como inserto o fragmento de DNA que codifica para a lisozima 1 de *Musca domestica* mutada simultaneamente nas posições Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R. A seqüência de nucleotídeos sublinhados codifica um peptídeo sinal (α -fator), responsável pela secreção da proteína recombinante. Essa seqüência encontra-se na mesma fase de leitura da seqüência que codifica para o mutante sêxtuplo, cujos códon mutados na seqüência da lisozima 1 encontram-se duplamente sublinhados. O asterisco indica o códon de terminação da tradução.

Essa consistiu de precipitação de proteínas com sulfato de amônio (0,56 g/mL), suspensão em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5, diálise contra o mesmo tampão e finalmente de cromatografia de troca catiônica utilizando a coluna aniônica Mono-S. A figura 45A mostra que o mutante sêxtuplo da MdL1 foi eluído em uma concentração de NaCl de aproximadamente 0,6 M, concentração essa superior àquela de eluição da MdL1 selvagem (eluição em 0,4-0,5 M). Como esperado, o

aumento da magnitude do número de carga positiva da proteína mutante promove aumento da afinidade de interação com a resina negativamente carregada.

Em todas as frações coletadas durante a cromatografia foi feito o rastreamento da presença de lisozima por meio de ensaio de atividade, usando *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL como substrato, por 30 minutos.

As frações contendo atividade de lisozima foram reunidas e dialisadas em tampão acetato 20 mM pH 4,5. A partir de 2 L de meio de cultura, foi obtido um rendimento de apenas 110 µg de proteína. Esse baixo rendimento, quando comparado às demais proteínas recombinantes produzidas, provavelmente está ligado à estabilidade do mutante.

De qualquer forma, apesar do baixo rendimento, o mutante sêxtuplo da MdL1 apresentava-se puro quando analisado por SDS-PAGE, revelando-se uma banda de 15.300 D (Figura 45B), e em quantidade suficiente para a caracterização quanto ao efeito do pH frente ao *Micrococcus lysodeikticus*. No entanto, a quantidade não foi suficiente para obtenção de espectros de CD. Devido a maior sensibilidade, só foi possível realizar experimento de fluorescência intrínseca do mutante sêxtuplo.

Figura 45. Purificação do mutante sêxtuplo da lisozima 1 de Musca domestica expresso em Pichia pastoris. Em A, está representada a cromatografia de troca iônica do meio de cultura contendo MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R. Nessa cromatografia, material correspondendo ao meio de cultura precipitado com (NH₄)₂SO₄ (0,56 g/mL), ressuspenso e dialisado em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 foi aplicado na coluna Mono-S HR 5/5. A atividade do mutante (♦) foi detectada usando como substrato Micrococcus lysodeikticus 1 mg/mL em tampão CP 100 mM pH 3,5 e a turbidez lida em 650 nm. O conjunto de frações que foi recolhido está representado pelos losangos vermelhos. A linha azul representa o gradiente de NaCl 1 M preparado em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5. Em B, análise por SDS-PAGE do mutante sêxtuplo da lisozima 1 purificado. Foi usado gel 14% em poliacrilamida e coloração com nitrato de prata. MM representa marcadores de proteína com massas moleculares conhecidas.

Comparação entre os espectros de fluorescência do mutante sêxtuplo e da MdL1 selvagem em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9, obtidos em comprimentos de onda de emissão de 291,4 a 448,6 nm e comprimento de onda de excitação a 280 nm, revelou diferenças no “segundo ramo” da curva, as quais podem estar relacionadas a alterações no ambiente dos triptofanos sensivelmente detectadas pela fluorescência. A passagem de algum dos triptofanos da MdL1 para posições mais expostas ao solvente aquoso justificaria a elevação do “segundo ramo” da curva (Figura 46). De qualquer forma, o mutante sêxtuplo não deve estar desenovelado, pois o seu espectro de emissão foi bem diferente daquele obtido para a MdL1 tratada com o agente desnaturante β-mercaptoetanol e aquecimento por 5 minutos em água fervente (Figura 46), que exibiu aumento significativo na porcentagem de emissão de fluorescência em valores de comprimento de onda mais altos. Corroborando o fato de que o mutante sêxtuplo não sofreu desenovelamento,

atividades específicas determinadas no pH ótimo da MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R (55,5 U/μg na μ=0,2 e 78,9 U/μg na μ=0,1) mostraram ser semelhantes às obtidas para a MdL1 selvagem (40,4 U/μg na μ=0,2 e 110,9 U/μg na μ=0,1), indicando que se trata de uma enzima tão ativa quanto a enzima nativa.

Figura 46. Espectros de fluorescência intrínseca da lisozima 1 de *Musca domestica* (MdL1) e do mutante MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R. A proteína selvagem (2 μM) (em cinza) e o mutante sêxtuplo (0,9 μM) (em preto) foram preparados em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9. Em vermelho é observado o padrão de espectro obtido para a lisozima 1 selvagem na presença de β-mercaptoetanol 284 mM. Parâmetros utilizados: comprimento de onda de excitação de 280 nm; espectro de emissão coletado na faixa de 291,4 a 448,6 nm; banho termostatzado a 30°C acoplado ao Espectrofluorímetro Hitachi F4500; espectros da lisozima selvagem e mutante obtidos como média de cinco leituras subtraídos do espectro do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9; espectro da lisozima 1 com β-mercaptoetanol obtido como média de cinco leituras subtraído do espectro do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,9 com β-mercaptoetanol 284 mM.

Iniciou-se então o processo de caracterização do mutante MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R por meio da investigação do efeito do pH na atividade catalítica dessa enzima sobre o substrato bacteriano. A figura 47 revela que o aumento dos resíduos carregados positivamente, a redução daqueles negativos, bem como o aumento da razão entre eles (resíduos básicos/resíduos ácidos)

Figura 47. Atividade da lisozima 1 de *Musca domestica* (■) e do mutante MdL1-Y₁₃K-A₁₄R-E₃₀K-T₄₃R-Y₇₁R-Y₁₁₀R (◆) em função do pH nas forças iônicas 0,2 (A) e 0,1 (B). Cada ponto da figura representa um ensaio de 4 tempos, em que as lisozimas foram incubadas com o substrato *Micrococcus lysodeikticus* 1 mg/mL ressuspensionado nos tampões com μ e pH especificados.

aumentaram o pH ótimo da MdL1 frente à cápsula polianiónica da bactéria. Nas forças iônicas de 0,2 (Figura 47A) e 0,1 (Figura 47B), o pH ótimo da MdL1 foi de pH 3,7 para 4,6, e de pH 4,3 para 5,2 respectivamente, ou seja, houve um aumento de 0,9 unidades de pH após a substituição dos cinco resíduos neutros (Y₁₃, A₁₄, T₄₃, Y₇₁ e Y₁₁₀) e de um ácido (E₃₀) por resíduos básicos (lisina ou arginina).

Essas alterações ainda não foram suficientes para tornar o pH ótimo da MdL1 igual ao da HEWL nas forças iônicas 0,2 e 0,1 (pH 5,4 e 7,5 respectivamente) (Figura 39A). De qualquer forma, foi suficiente para relacionarmos a composição dos aminoácidos eletricamente carregados na superfície das lisozimas com a modulação do pH ótimo da atividade dessas enzimas sobre a parede bacteriana. É provável que as lisozimas não-digestivas, como a HEWL, por exemplo, por possuírem um número elevado de aminoácidos básicos e um reduzido número de aminoácidos ácidos apresentem carga líquida de superfície positiva e alta na faixa de pH compreendida entre 2 a 10. Já nas lisozimas digestivas, entre pH 4 e 4,5, já é verificada uma redução significativa da carga líquida positiva, devido à presença de menor número de aminoácidos básicos e de maior número de aminoácidos ácidos. Acima desses valores, as lisozimas digestivas provavelmente ligam-se ineficientemente ao substrato devido a redução de sua carga líquida positiva. Desse modo, são pouco ativas em pH maior que 5.

Em suma, propomos que o pH ótimo da atividade das lisozimas “c” sobre cápsulas de *Micrococcus lysodeikticus* depende da quantidade de aminoácidos básicos e ácidos presentes na superfície dessas proteínas, não sendo resultante apenas da média dos valores de pK_a s dos resíduos catalíticos.

5. CONCLUSÕES

MdL1 e MdL2, expressas como proteína recombinante em *Pichia pastoris*, foram purificadas e caracterizadas quanto ao efeito do pH na atividade catalítica em diferentes forças iônicas utilizando o substrato sintético 4-metilumbeliferil-N-acetilquitotriosídeo (MUQ3) e o substrato natural (cápsulas de *Micrococcus lysodeikticus*).

Frente ao MUQ3, foi verificado um pH ótimo mais ácido, independente da força iônica, para MdL1 e MdL2 (pH 4,75 e pH 4,85 respectivamente) que aquele de HEWL (pH 5,2). Esse pH ótimo mais ácido é resultante da redução dos pK_a s do nucleófilo (de pK_e 3,85 e pK_{es} 3,6 em HEWL para pK_e 3,09 em MdL1 e pK_e 3,23 e pK_{es} 3,27 em MdL2) e do doador de prótons (de pK_e 6,61 e pK_{es} 6,7 em HEWL para pK_e 6,4 em MdL1 e pK_e 6,20 e pK_{es} 6,23 em MdL2).

Três mutantes simples ($N_{46}D$, $S_{106}V$ e $T_{107}A$) e um triplo ($N_{46}D$ - $S_{106}V$ - $T_{107}A$) foram produzidos por mutagênese sítio-dirigida, expressos em *Pichia pastoris* e purificados. Os efeitos do pH no $V_{max\ app}$ e no $V_{max\ app}/K_{m\ app}$ para os mutantes simples $N_{46}D$, $S_{106}V$ e $T_{107}A$ não revelaram modificação significativa nos valores de pK_{es} e pK_e . Por outro lado, a mutação tripla foi capaz de aumentar os valores de pK_{es} (3,51 e 6,58) e pK_e (3,57 e 6,64) para valores análogos aos previamente obtidos para os resíduos catalíticos da HEWL. Com base nas estruturas tridimensionais da MdL1 e MdL2 determinadas a 1,9 Å foi proposto que a presença conjunta de N_{46} , S_{106} e T_{107} no interior do sítio ativo é determinante para modulação do pH ótimo das lisozimas digestivas sobre o substrato sintético MUQ3.

Frente à cápsula de *Micrococcus lysodeikticus*, foi observado um deslocamento de pH ótimo para valores mais ácidos à medida que a força iônica do meio aumenta. Em força iônica mais baixa ($\mu=0,02$), a atividade máxima ocorre em pH 4,7 e 4,8 para a MdL1 e MdL2 respectivamente, ao passo que na força iônica

mais alta ($\mu=0,2$), a atividade máxima ocorre em pH 3,7 e 3,8 respectivamente. Esses valores também são menores que aqueles da HEWL (pH 5,4 e pH 7,5 em $\mu=0,2$ e 0,1 respectivamente).

A substituição de cinco aminoácidos neutros e um ácido por resíduos básicos na superfície da MdL1 resultou em aumento significativo nos valores de pH ótimo (pH 4,6 e pH 5,1 em $\mu=0,2$ e 0,1 respectivamente). Assim, foi proposto que, nesse caso, o pH ótimo ácido das lisozimas digestivas frente ao substrato bacteriano está diretamente ligado a uma redução do número de resíduos básicos e a um aumento do número de aminoácidos ácidos na superfície da proteína, não tendo, diferentemente do pH ótimo frente ao MUQ3, relação exclusiva com aminoácidos do sítio ativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abe, Y., T. Ueda, *et al.* Effect of salt concentration on the pK_a of acidic residues in lysozyme. J Biochem, v.118, n.5, Nov, p.946-52. 1995.
- Araújo, C. A., P. J. Waniek, *et al.* Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. Insect Biochem Mol Biol, v.36, n.7, Jul, p.547-60. 2006.
- Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. J Mol Biol, v.112, n.3, May 25, p.535-42. 1977.
- Blake, C. C., D. F. Koenig, *et al.* Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. Nature, v.206, n.986, May 22, p.757-61. 1965.
- Blum, H., H. Beir, *et al.* Improved silver staining of plant - proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis, v.8, p.93-99. 1987.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, *et al.* Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.15, Aug, p.4642-6. 1984.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.54, n.Pt 5, Sep 1, p.905-21. 1998.
- Cançado, F. C., A. A. Valério, *et al.* The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. J Struct Biol, v.160, n.1, Oct, p.83-92. 2007.
- Cançado, F. C., E. Chimoy, *et al.* Comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Submetido 2008.
- Cheetham, J. C., P. J. Artymiuk, *et al.* Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution. J Mol Biol, v.224, n.3, Apr 5, p.613-28. 1992.
- Chipman, D. M. e N. Sharon. Mechanism of lysozyme action. Science, v.165, n.892, Aug 1, p.454-65. 1969.

Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.50, n.Pt 5, Sep 1, p.760-3. 1994.

Coutinho, P.M. e B. Henrissat. Carbohydrate active enzymes server. 1999. Disponível em <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>>

Creighton, T.E. Protein structure – A practical approach. 2nd ed. Oxford: IRL Press. 1997.

Davies, R. C., A. Neuberger, *et al.* The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. Biochim Biophys Acta, v.178, n.2, Apr 22, p.294-305. 1969.

Davies, G. J., K. S. Wilson, *et al.* Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. Biochem J, v.321 (Pt 2), Jan 15, p.557-9. 1997.

Delano, W. L. The PyMOL molecular graphics system DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. 2002.

Dobson, D. E., E. M. Prager, *et al.* Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. J Biol Chem, v.259, n.18, Sep 25, p.11607-16. 1984.

Emsley, P. e K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.60, n.Pt 12 Pt 1, Dec, p.2126-32. 2004.

Espinoza-Fuentes, F. P. e W. R. Terra. Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. Insect Biochem., v. 17, n.6, p.809-817. 1987.

Fastrez, J. Phage lysozymes. EXS, v.75, p.35-64. 1996.

Fukamizo, T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. Curr Protein Pept Sci, v.1, n.1, Jul, p.105-24. 2000.

Garvey, K. J., M. S. Saedi, *et al.* Nucleotide sequence of Bacillus phage phi 29 genes 14 and 15: homology of gene 15 with other phage lysozymes. Nucleic Acids Res, v.14, n.24, Dec 22, p.10001-8. 1986.

Gomori, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods in Enzymology, v.1, p.138-146. 1955.

Grajal, A., S. D. Strahl, *et al.* Foregut Fermentation in the Hoatzin, a Neotropical Leaf-Eating Bird. Science, v.245, n.4923, Sep 15, p.1236-1238. 1989.

Grunclová, L., H. Fouquier, *et al.* Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. Dev Comp Immunol, v.27, n.8, Sep, p.651-60. 2003.

Grütter, M. G., L. H. Weaver, *et al.* Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? Nature, v.303, n.5920, Jun 30, p.828-31. 1983.

Guex, N. e M. C. Peitsch. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis, v.18, n.15, Dec, p.2714-23. 1997.

Hammer, M. F., J. W. Schilling, *et al.* Recruitment of lysozyme as a major enzyme in the mouse gut: duplication, divergence, and regulatory evolution. J Mol Evol, v.24, n.3, p.272-9. 1987.

Hardy, L. W. e A. R. Poteete. Reexamination of the role of Asp20 in catalysis by bacteriophage T4 lysozyme. Biochemistry, v.30, n.39, Oct 1, p.9457-63. 1991.

Hermoso, J. A., B. Monterroso, *et al.* Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. Structure, v.11, n.10, Oct, p.1239-49. 2003.

Higuchi, R., B. Krummel, *et al.* A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res, v.16, n.15, Aug 11, p.7351-67. 1988.

Ho, S. N., H. D. Hunt, *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, v.77, n.1, Apr 15, p.51-9. 1989.

Hultmark, D. Insect lysozymes. EXS, v.75, p.87-102. 1996.

Inoue, M., H. Yamada, *et al.* Multiple role of hydrophobicity of tryptophan-108 in chicken lysozyme: structural stability, saccharide binding ability, and abnormal pK_a of glutamic acid-35. Biochemistry, v.31, n.24, Jun 23, p.5545-53. 1992a.

Inoue, M., H. Yamada, *et al.* Stabilization of a protein by removal of unfavorable abnormal pK_a : substitution of undissociable residue for glutamic acid-35 in chicken lysozyme. Biochemistry, v.31, n.37, Sep 22, p.8816-21. 1992b.

Inoue, M., H. Yamada, *et al.* Left-sided substrate binding of lysozyme: evidence for the involvement of asparagine-46 in the initial binding of substrate to chicken lysozyme. Biochemistry, v.31, n.42, Oct 27, p.10322-30. 1992c.

Irwin, D. M. e A. C. Wilson. Multiple cDNA sequences and the evolution of bovine stomach lysozyme. J Biol Chem, v.264, n.19, Jul 5, p.11387-93. 1989.

Irwin, D. M. Molecular evolution of ruminant lysozymes. EXS, v.75, p.347-61. 1996.

Ito, Y., M. Hirashima, *et al.* Colonic lysozymes of rabbit (Japanese white): recent divergence and functional conversion. J Biochem, v.116, n.6, Dec, p.1346-53. 1994.

Ito, Y., M. Nakamura, *et al.* Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. J Biochem, v.118, n.3, Sep, p.546-51. 1995.

Jollès, P. Recent Developments in the Study of Lysozymes. Angew Chem Int Ed Engl, v.3, Jan, p.28-36. 1964.

Jollès, P., F. Schoentgen, *et al.* Stomach lysozymes of ruminants. II. Amino acid sequence of cow lysozyme 2 and immunological comparisons with other lysozymes. J Biol Chem, v.259, n.18, Sep 25, p.11617-25. 1984.

Jollès, J., P. Jollès, *et al.* Episodic evolution in the stomach lysozymes of ruminants. J Mol Evol, v.28, n.6, Jun, p.528-35. 1989.

Jones, T. A., J. Y. Zou, *et al.* Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Crystallogr A, v.47 (Pt 2), Mar 1, p.110-9. 1991.

Kabsch, W. e C. Sander. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers, v.22, n.12, Dec, p.2577-637. 1983.

Kempton, J. B. e S. G. Withers. Mechanism of *Agrobacterium* beta-glucosidase: kinetic studies. Biochemistry, v.31, n.41, Oct 20, p.9961-9. 1992.

Kopáček, P., R. Vogt, *et al.* Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem Mol Biol, v.29, n.11, Nov, p.989-97. 1999.

Kornegay, J. R., J. W. Schilling, *et al.* Molecular adaptation of a leaf-eating bird: stomach lysozyme of the hoatzin. Mol Biol Evol, v.11, n.6, Nov, p.921-8. 1994.

Kornegay, J. R. Molecular genetics and evolution of stomach and nonstomach lysozymes in the hoatzin. J Mol Evol, v.42, n.6, Jun, p.676-84. 1996.

Koshland, D. E. Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., v.28, p.416-436. 1953.

Krissinel, E. e K. Henrick. Detection of protein assemblies in crystals, in Berthold *et al.* (Ed), M.R. CompLife 2005, LNBI 3695. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.163-174. 2005.

Krissinel, E. e K. Henrick. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J Mol Biol, v.372, n.3, Sep 21, p.774-97. 2007.

Kuroki, R., L. H. Weaver, *et al.* A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 lysozyme. Science, v.262, n.5142, Dec 24, p.2030-3. 1993.

Kylsten, P., D. A. Kimbrell, *et al.* The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. Mol Gen Genet, v.232, n.3, Apr, p.335-43. 1992.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Lamzin, V. S. e K. S. Wilson. Automated refinement for protein crystallography. Methods Enzymol, v.277, p.269-305. 1997.

Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst., v.26, p.283-291. 1993.

Lemos, F. J. e W. R. Terra. Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. Comp Biochem Physiol B, v.100, n.2, p.265-8. 1991.

Lemos, F. J., A. F. Ribeiro, *et al.* A bacteria-digesting midgut lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. Insect Biochem. Molec. Biol., v.23, n.4, p.533-541. 1993.

Marana, S. R., F. C. Cançado, *et al.* Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, v.62, n.Pt 8, Aug 1, p.750-2. 2006.

Matsuura, A., M. Yao, *et al.* Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. Biochemistry, v.41, n.40, Oct 8, p.12086-92. 2002.

Matthews, B. W. e S. J. Remington. The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. Proc Natl Acad Sci U S A, v.71, n.10, Oct, p.4178-82. 1974.

Matthews, B. W., S. J. Remington, *et al.* Relation between hen egg white lysozyme and bacteriophage T4 lysozyme: evolutionary implications. J Mol Biol, v.147, n.4, Apr 25, p.545-58. 1981.

Maurel, P. e P. Douzou. Catalytic implications of electrostatic potentials: the lytic activity of lysozymes as a model. J Mol Biol, v.102, n.2, Apr 5, p.253-64. 1976.

Mckenzie, H. A. e F. H. White, Jr. Lysozyme and alpha-lactalbumin: structure, function, and interrelationships. Adv Protein Chem, v.41, p.173-315. 1991.

McPherson, M. J. e S. G. Moller. PCR. 2nd ed. 2006

Miller, G. L. e R. H. Golder. Buffers of pH 2 to 12 for use in electrophoresis. Arch Biochem, v.29, n.2, Dec, p.420-3. 1950.

Monzingo, A. F., E. M. Marcotte, *et al.* Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. Nat Struct Biol, v.3, n.2, Feb, p.133-40. 1996.

Murshudov, G. N., A. A. Vagin, *et al.* Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.53, n.Pt 3, May 1, p.240-55. 1997.

Nakae, Y., E. Ryo, *et al.* pH dependence of the binding constants of N-acetylglucosamine monomers to hen and turkey egg-white lysozymes. J Biochem, v.78, n.3, Sep, p.589-97. 1975.

Otwinowski, Z. e W. Minor. Macromolecular Crystallography, Part A, in C. W. Carter Jr., R. M. Sweet (Eds). New York: Academic Press, Methods Enzymol., v.276, p.307-326. 1997.

Pacheco, M. A., J. L. Concepcion, *et al.* Stomach lysozymes of the three-toed sloth (*Bradypus variegatus*), an arboreal folivore from the Neotropics. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.147, n.3, Jul, p.808-19. 2007.

Park, H. Y., S. S. Park, *et al.* Protein purification and nucleotide sequence of a lysozyme from the bacteria-induced larvae of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. Arch Insect Biochem Physiol, v.35, n.3, p.335-45. 1997.

Parsons, S. M. e M. A. Raftery. The identification of aspartic acid residue 52 as being critical to lysozyme activity. Biochemistry, v.8, n.10, Oct, p.4199-205. 1969.

Parsons, S. M. e M. A. Raftery. Ionization behavior of the catalytic carboxyls of lysozyme. Biochem Biophys Res Commun, v.41, n.1, Oct 9, p.45-9. 1970.

Parsons, S. M. e M. A. Raftery. Ionization behavior of the catalytic carboxyls of lysozyme. Effects of ionic strength. Biochemistry, v.11, n.9, Apr 25, p.1623-9. 1972a.

Parsons, S. M. e M. A. Raftery. Ionization behavior of the catalytic carboxyls of lysozyme. Effects of temperature. Biochemistry, v.11, n.9, Apr 25, p.1630-3. 1972b.

Paskewitz, S. M., B. Li, *et al.* Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol, v.17, n.3, Jun, p.217-25. 2008.

Phillips, D. C. The hen egg-white lysozyme molecule. PNAS USA, v.57, p.484-495. 1967.

Pooart, J., T. Torikata, *et al.* The primary structure of a novel goose-type lysozyme from rhea egg white. Biosci Biotechnol Biochem, v.68, n.1, Jan, p.159-69. 2004.

Prager, E. M. Adaptive evolution of lysozyme: changes in amino acid sequence, regulation of expression and gene number. EXS, v.75, p.323-45. 1996.

Price, J. A. e R. Pethig. Surface charge measurements on *Micrococcus lysodeikticus* and the catalytic implications for lysozyme. Biochim Biophys Acta, v.889, n.2, Nov 28, p.128-35. 1986.

Qasba, P. K. e S. Kumar. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. Crit Rev Biochem Mol Biol, v.32, n.4, p.255-306. 1997.

Rand-Meir, T., F. W. Dahlquist, *et al.* Use of synthetic substrates to study binding and catalysis by lysozyme. Biochemistry, v.8, n.10, Oct, p.4206-14. 1969.

- Rau, A., T. Hogg, *et al.* A new lysozyme fold. Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution. J Biol Chem, v.276, n.34, Aug 24, p.31994-9. 2001.
- Regel, R., S. R. Mantioli, *et al.* Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. Insect Biochem Mol Biol, v.28, n.5-6, May-Jun, p.309-19. 1998.
- Rennell, D., S. E. Bouvier, *et al.* Systematic mutation of bacteriophage T4 lysozyme. J Mol Biol, v.222, n.1, Nov 5, p.67-88. 1991.
- Roxby, R. e C. Tanford. Hydrogen ion titration curve of lysozyme in 6 M guanidine hydrochloride. Biochemistry, v.10, n.18, Aug 31, p.3348-52. 1971.
- Ruiz, M.C., M.G. Domínguez-Bello, *et al.* Gastric lysozyme in the hoatzin (*Opisthocomus hoazin*), an avian folivore. Experimentia, v.50, p.499-501. 1994.
- Rupley, J. A. The binding and cleavage by lysozyme of N-acetylglucosamine oligosaccharides. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.167, n.9, Apr 18, p.416-28. 1967.
- Saint-Blancard, J., P. Chuzel, *et al.* Influence of pH and ionic strength of the lysis of *Micrococcus lysodeikticus* cells by six human and four avian lysozymes. Biochim Biophys Acta, v.220, n.2, Nov 11, p.300-6. 1970.
- Sakakibara, R. e K. Hamaguchi. Structure of lysozyme. XIV. Acid-base titration of lysozyme. J Biochem, v.64, n.5, Nov, p.613-8. 1968.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- Segel, I. H. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley & Sons. 1993.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, *et al.* Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun, v.28, n.5, Sep 7, p.815-20. 1967.
- Sinnott, M. L. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. Chem. Rev., v.90, p. 1171-1202. 1990.
- Stewart, C. B., J. W. Schilling, *et al.* Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. Nature, v.330, n.6146, Nov 26-Dec 2, p.401-4. 1987.
- Strynadka, N. C. e M. N. James. Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. J Mol Biol, v.220, n.2, Jul 20, p.401-24. 1991.
- The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological, in Budavari, S., M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman (Ed.). 11th ed. New Jersey: Merck & CO., Inc. 1989.

Ursic-Bedoya, R. J., H. Nazzari, *et al.* Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. J Insect Physiol, v.54, n.3, Mar, p.593-603. 2008.

Vagin, A. A. e A. Teplyakov. MOLREP: an automated program for molecular replacement. J. Appl. Cryst., v.30, p.1022-1025. 1997.

Van Asselt, E. J., A. J. Dijkstra, *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. Structure, v.7, n.10, Oct 15, p.1167-80. 1999a.

Van Asselt, E. J., A. M. Thunnissen, *et al.* High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. J Mol Biol, v.291, n.4, Aug 27, p.877-98. 1999b.

Vocadlo, D. J., G. J. Davies, *et al.* Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. Nature, v.412, n.6849, Aug 23, p.835-8. 2001.

Weaver, L. H. e B. W. Matthews. Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7 Å resolution. J Mol Biol, v.193, n.1, Jan 5, p.189-99. 1987.

Weaver, L. H., M. G. Grütter, *et al.* The refined structures of goose lysozyme and its complex with a bound trisaccharide show that the "goose-type" lysozymes lack a catalytic aspartate residue. J Mol Biol, v.245, n.1, Jan 6, p.54-68. 1995.

Yang, Y. e K. Hamaguchi. Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl N-acetyl-chitotrioside catalyzed by hen and turkey lysozymes. pH dependence of the kinetics constants. J Biochem, v.87, n.4, Apr, p.1003-14. 1980.

* De acordo com:

7. LISTA DE ANEXOS

ANEXO A

- Súmula Curricular

ANEXO B

- Artigo 1:

Marana, S. R.*; Cançado, F. C.*; Valério, A. A.; Ferreira, C.; Terra, W. R.; Barbosa, J. A. R. G. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. Acta Crystallographica Series F, v.62, p.750-752. 2006.

(* ambos autores contribuíram igualmente para o trabalho).

ANEXO C

- Artigo 2:

Cançado, F. C.; Valério, A. A.; Marana, S. R.*; Barbosa, J. A. R. G*. The crystal structure of a digestive c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. Journal of Structural Biology, v.160, p.83-92. 2007.

(* autores para correspondência).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Fabiane Chaves Cançado.

Local e data de nascimento: Belo Horizonte, 20 de dezembro de 1975.

EDUCAÇÃO

- **Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Belo Horizonte, MG.**

Ensino médio com título profissionalizante de técnico em química. Período: 1991-1994, incluindo 1 ano de estágio curricular na Mannesmann LTDA, em Belo Horizonte.

- **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.**

Bacharel em Farmácia, em 29/07/2000 e habilitação em Análises Clínicas – Bioquímica, em 27/07/2001. Período: 1996-2001.

- **Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.**

Doutoranda em Bioquímica na área de enzimologia, no Instituto de Química, sob a orientação do Prof. Dr. Sandro Roberto Marana. Período: 02/2004 até o presente momento.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, pela FAPESP, no período de 01/07/2004 a 31/12/2008.

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS

- Marana, S. R.^{*}; Cançado, F. C.^{*}; Valério, A. A.; Ferreira, C.; Terra, W. R.; Barbosa, J. A. R. G. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. Acta Crystallographica Series F, v.62, p.750-752. 2006.

*Ambos são considerados primeiro-autor, pois contribuíram igualmente em termos de resultados apresentados nesse artigo.

- Cançado, F. C.; Valério, A. A.; Marana, S. R.^{*}; Barbosa, J. A. R. G.^{*}. The crystal structure of a digestive c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. Journal of Structural Biology, v.160, p.83-92. 2007.

* Autores para correspondência.

- Cançado, F. C.; Effio, P. C.; Terra, W. R.; Marana, S. R. Comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Submetido 2008.

RESUMOS EM CONGRESSOS

- Cançado, F. C.; Marana, S. R. "Purification and characterization of two recombinant digestive lysozymes from *Musca domestica*". XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2005, Águas de Lindóia/SP.
- Cançado, F. C.; Marana, S. R. "pH effect on the catalytic activity of a digestive lysozyme from *Musca domestica*". XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia/SP.
- Cançado, F. C.; Barbosa, J. A. R. G.; Marana, S. R. "Kinetic and structural characterization of a digestive lysozyme from *Musca domestica*". XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 2007, Salvador/BA.
- Cançado, F. C.; Marana, S. R. "Molecular basis of the pH optimum modulation in lysozymes". XXXVII Reunião Anual da SBBq, 2008, Águas de Lindóia/SP.
- Gonçalves, L. M.; Cançado, F. C.; Mendonça, L.M.F.; Cuccovia, I. M.; Chaimovich, H.; Marana, S. R. "Chimeric proteins containing phosphatases and carbohydrate binding domains". XXXVII Reunião Anual da SBBq, 2008, Águas de Lindóia/SP.

PRÊMIOS

- Medalha de mérito acadêmico entregue pela Congregação da Escola de Farmácia – UFMG de melhor aluno do curso de Farmácia em uma turma de sessenta alunos (2001).
- Melhor pôster da área de “Enzimas” apresentado durante a XXXVI Annual Meeting of the Society for Biochemistry and Molecular Biology and 10th the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), pela SBBq e IUBMB (2007).

MONITORIAS

- Participação do Estágio Supervisionado em docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto à disciplina de Bioquímica Experimental (QBQ-216), ministrada aos alunos da Farmácia (noturno) no 2º semestre de 2004.
- Participação do PAE junto à disciplina de Bioquímica Experimental (QBQ-216), ministrada aos alunos da Farmácia (diurno) no 2º semestre de 2005.
- Participação do PAE junto à disciplina de Biologia Molecular (QBQ-2456), ministrada aos alunos da Química (diurno) no 2º semestre de 2006.
- Participação do PAE junto à disciplina de Biologia Molecular do gene (QBQ-126), ministrada aos alunos da Veterinária (diurno), no 2º semestre de 2007.

S. R. Marana,^{a,‡} F. C. Cançado,^{a,‡}
A. A. Valério,^{b,c} C. Ferreira,^a
W. R. Terra^a and
J. A. R. G. Barbosa^{b,c,d*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ^bCentro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiMe), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), CP 6192, Campinas, SP 13084-971, Brazil, ^cDepartamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, and ^dDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

‡ These authors contributed equally to this work.

Correspondence e-mail: joao@lnls.br

Received 4 April 2006
Accepted 23 June 2006

© 2006 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*

Lysozymes are mostly known for their defensive role against bacteria, but in several animals lysozymes have a digestive function. Here, the initial crystallographic characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica* are presented. The proteins were crystallized using the sitting-drop vapour-diffusion method in the presence of ammonium sulfate or PEG/2-propanol as the precipitant. X-ray diffraction data were collected to a maximum resolution of 1.9 Å using synchrotron radiation. The lysozyme 1 and 2 crystals belong to the monoclinic space group $P2_1$ (unit-cell parameters $a = 36.52$, $b = 79.44$, $c = 45.20$ Å, $\beta = 102.97^\circ$) and the orthorhombic space group $P2_12_12$ (unit-cell parameters $a = 73.90$, $b = 96.40$, $c = 33.27$ Å), respectively. The crystal structures were solved by molecular replacement and structure refinement is in progress.

1. Introduction

Lysozymes (EC 3.2.1.17) catalyze the hydrolysis of 1,4- β -linkages between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine residues in the peptidoglycan of the bacteria cell wall. Based on sequence and structure similarities, these enzymes are classified into families 22, 23, 24, 25 and 73 of the glycoside hydrolases (Coutinho & Henrissat, 1999).

Family 22 contains 219 type C lysozymes from vertebrates (amphibians, fishes, birds and mammals), invertebrates (crustaceans, arachnids and insects) and fungi (Coutinho & Henrissat, 1999). Hen egg-white lysozyme (HEWL) is probably the best characterized member of this family.

Lysozymes from family 22 are usually part of the defence system against bacteria (Jollès & Jollès, 1984). However, some of these lysozymes are also involved in the digestion of bacteria in vertebrates that have a fermentation chamber in their foregut (for example, ruminants such as *Bos taurus* and primates such as *Presbytis entellus*) and in insects that feed on decomposing organic material (for example, the housefly *Musca domestica*; Lemos & Terra, 1991; Prager, 1996). These lysozymes present several adaptations to digestive function: a high expression level in the gut, a resistance to proteinase hydrolysis and bacteriolytic activity with an acidic pH optimum (Dobson *et al.*, 1984). Sequence alignments have been used to propose the molecular basis of these adaptations (Prager, 1996; Regel *et al.*, 1998), but these hypotheses still remain to be tested.

The tertiary structure of digestive lysozymes is not known, although 15 different lysozymes from family 22 have already been crystallized, corresponding to 452 structures in the PDB. Despite the fact that all lysozymes from family 22 share the same fold, slight differences in their structures may be correlated to adaptations of lysozyme to the digestive function.

Two digestive lysozymes are found in the *M. domestica* midgut (lysozyme 1, AAQ20048; lysozyme 2, AAQ20047). Lysozyme 1 (122 amino acids, 13 816 Da) has previously been submitted to biochemical characterization, showing that the lytic activity of this lysozyme has a pH optimum of 4.5 and its affinity for bacterial cell walls decreases as the ionic strength of the medium becomes higher (Lemos *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1995). Lysozyme 2 (122 amino acids; 13 890 Da) is very similar to lysozyme 1 (81% similarity; 70% identity), but still remains to be characterized.

In this paper, the crystallization of lysozymes 1 and 2 is reported. The tertiary structure of these digestive lysozymes may contribute to the comprehension of the molecular basis of the adaptation of these lysozymes to digestive function.

2. Methods

2.1. Crystallization

Both lysozymes were expressed as recombinant protein in *Pichia pastoris*. An initial step of purification was ammonium sulfate precipitation followed by ion-exchange chromatography (Cançado *et al.*, 2006). Samples of purified lysozyme 1 (9.6 mg ml^{-1}) and lysozyme 2 (9.8 mg ml^{-1}) from *M. domestica* were submitted to crystallization trials using the sitting-drop vapour-diffusion method. Both samples were in 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) pH 5.5 buffer. The experiment was set up by mixing equal volumes ($1 \mu\text{l}$) of protein and reservoir solution in Cryschem plates. Initial screening was performed using the commercial kits Crystal Screen and Crystal Screen II from Hampton Research according to the manufacturer's instructions. Conditions showing crystalline structures were refined by varying the pH of the buffers, the concentrations of precipitants and the drop volumes to yield suitable crystals for X-ray data collection. In the case of lysozyme 2, the condition was further refined with additive solutions in two ways: (i) by using the Additive Screen from Hampton Research according to the manufacturer's instructions and (ii) by mixing the solutions of the Crystal Screen from Hampton Research with the crystallization drop (Birtley & Curry, 2005). In the latter case, $0.2 \mu\text{l}$ of the Crystal Screen was mixed with $1.5 \mu\text{l}$ of protein solution and $1.3 \mu\text{l}$ of the reservoir solution, leading to a total drop volume of $3 \mu\text{l}$. All experiments were carried out at 291 K .

2.2. Data collection, processing and phasing

Crystallographic data were collected at the protein crystallography beamline D03B-MX1 at Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brazil. This beamline is equipped with a MAR CCD detector with a circular X-ray-sensitive surface of 165 mm in diameter combined with a MAR DTB goniostat. Crystals were

scooped straight from the drop and cooled directly in a nitrogen-gas stream to 100 K in order to minimize radiation damage to the crystals. Data collection was carried out using the oscillation method with a 1.0° oscillation per frame and radiation of wavelength around $1.43 \text{ \AA}$. D03B-MX1 is a monochromatic beamline and operates at this wavelength as a compromise between flux and absorption. The solution in which the crystals were grown provided partial protection against ice formation for lysozyme 1. A solution containing 20% glycerol, 9% polyethyleneglycol (PEG) 4000, 12% 2-propanol and 0.05 M sodium citrate pH 4.2 was used as a cryoprotectant in the case of lysozyme 2. The crystals were soaked for 5–10 s in this solution prior to flash-cooling in nitrogen gas. The data set was processed using *HKL-2000* (Otwinowski & Minor, 1997) and the *CCP4* package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Molecular replacement was performed with the *MOLREP* program (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Vagin & Teplyakov, 1997) using one monomer of the lysozyme structure from hen egg white deposited in the PDB with code 1hew (Cheatham *et al.*, 1992) depleted of its waters and ligand as a search model. The identity of the 1hew sequence with lysozymes 1 and 2 is 38.5 and 36.2%, while the similarity is 55.4 and 53.8%, respectively. In the case of lysozyme 2, molecular replacement was performed with the partially refined lysozyme 1 as a search model.

3. Results and discussion

Initial crystallization trials with lysozyme 1 and lysozyme 2 resulted in microcrystals in some conditions. In order to improve the quality of these crystals, refinement of these conditions was performed. Crystals grew in one to two weeks, leading to crystals of between 50 and $1000 \mu\text{m}$ in the longest dimension. Crystals usually formed clusters of plates, especially for lysozyme 2. To minimize this clustering in the crystallization of lysozyme 2, additives were tested.

The best condition found for lysozyme 1 was 1.4 M ammonium sulfate, 0.1 M 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt (sodium HEPES) pH 7.5 and 1% PEG 400 (Fig. 1). The best condition for crystals of lysozyme 2 was the drop mixture described in §2, where the reservoir solution consisted of 28%

Figure 1
(a) Crystals of lysozyme 1 measuring approximately $1000 \mu\text{m}$ in the longest dimension.

Figure 2
(a) Crystals of lysozyme 2 measuring approximately $200 \mu\text{m}$ in the longest dimension.

Table 1

Data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	Lysozyme 1	Lysozyme 2
Space group	$P2_1$	$P2_12_12$
Unit-cell parameters ($\text{\AA}$, $^\circ$)	$a = 36.52$, $b = 79.44$, $c = 45.20$, $\alpha = \gamma = 90.00$, $\beta = 102.97$	$a = 73.90$, $b = 96.40$, $c = 33.27$, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00$
Mosaicity ($^\circ$)	0.7	0.8
Temperature (K)	100	100
Wavelength ($\text{\AA}$)	1.431	1.427
Oscillation ($^\circ$)	1.0	1.0
Crystal-to-detector distance (mm)	80.0	80.0
No. of frames	171	127
Resolution limits ($\text{\AA}$)	40.00–1.9 (1.97–1.90)	30.00–1.9 (1.97–1.90)
$I/\sigma(I)$ after merging	23.8 (5.6)	14.4 (2.1)
Completeness (%)	100.0 (99.8)	90.7 (74.1)
Multiplicity	3.5 (3.4)	3.9 (1.8)
R_{sym}	0.052 (0.222)	0.089 (0.304)
No. of reflections	70004	69179
No. of unique reflections	19857 (1953)	17698 (1423)
B factor (Wilson plot) ($\text{\AA}^2$)	20.0	23.3

2-propanol, 0.115 *M* sodium citrate pH 4.2 and 21% PEG 4000 and the additive solution was No. 26 of Hampton Research Crystal Screen (0.2 *M* ammonium acetate, 0.1 *M* sodium citrate pH 5.6 and 30% 2-methyl-2,4-pentanediol) (Fig. 2). The cluster shown in Fig. 2 is not a single crystal. In order to avoid multiple diffraction patterns, we needed to break the cluster by touching its vertex, thus separating the plates, which could be used as single crystals.

The crystals of both lysozymes 1 and 2 yielded diffraction data that were processed to a maximum resolution of 1.9 $\text{\AA}$. The rotation method was used for data collection and no prediction of the best strategy (starting angle) was made for the data collection. Space group $P2_1$ was assigned for lysozyme 1, while the crystal of lysozyme 2 showed the symmetry and systematic absences of the orthorhombic space group $P2_12_12$. Table 1 summarizes the data-collection statistics.

The Matthews coefficient (Matthews, 1968) for two molecules of lysozyme 1 in the asymmetric unit was calculated to be $2.3 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, giving a solvent content of 45.7%. For two molecules of lysozyme 2 in the asymmetric unit, the coefficient was $2.1 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, with a solvent content of 40.4%. Clear peaks in the rotation and translation func-

tions were observed for the molecular-replacement solutions of lysozyme 1. The initial electron-density maps of the proteins clearly showed the expected differences in the side chains between lysozyme 1 and lysozyme 2. After a few cycles of refinement, the model of lysozyme 1 was used as a search model for lysozyme 2. Once again, clear peaks in the rotation and translation functions were found and the electron-density maps showed the differences between lysozyme 1 and 2. The crystallographic models of these proteins are being built and refined.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 04/02017-9, 04/02225-0, 02/10634-2, 01/08198-7, 01/07531-4 and 00/10266-8; SMolBNet), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS). We also thankfully acknowledge the support from Dr Rogério Meneghini and the technical assistance of Andréia N. Meza.

References

- Birtley, J. R. & Curry, S. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 646–650.
- Cançado, F. C., Effio, P. C., Terra, W. R. & Marana, S. R. (2006). Submitted.
- Cheetham, J. C., Artymiuk, P. J. & Phillips, D. C. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**, 613–628.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (1999). *Carbohydrate-Active Enzymes Server*. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- Dobson, D. E., Prager, E. M. & Wilson, A. C. (1984). *J. Biol. Chem.* **18**, 11607–11616.
- Ito, Y., Nakamura, M., Hotani, T. & Imoto, T. (1995). *J. Biochem. (Tokyo)*, **118**, 546–551.
- Jollès, P. & Jollès, J. (1984). *Mol. Cell. Biochem.* **63**, 165–189.
- Lemos, F. J. A., Ribeiro, A. F. & Terra, W. R. (1993). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 533–541.
- Lemos, F. J. A. & Terra, W. R. (1991). *Comput. Biochem. Physiol. B*, **100**, 265–268.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Prager, E. M. (1996). *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*, edited by P. Jollès, pp. 323–345. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Regel, R., Matioli, S. R. & Terra, W. R. (1998). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 309–319.
- Vagin, A. A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.

The crystal structure of a lysozyme *c* from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme

Fabiane Chaves Cançado^a, Amanda Abdalla Valério^{b,c}, Sandro Roberto Marana^{a,*},
João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa^{b,c,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, São Paulo, SP 05513-970, Brazil

^b Center for Structural Molecular Biology (CeBiME), Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), CP 6192, Campinas, SP 13084-971, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

Received 21 March 2007; received in revised form 11 June 2007; accepted 11 July 2007

Available online 28 July 2007

Abstract

Lysozymes from family 22 of glycoside hydrolases are usually part of the defense system against bacteria. However in ruminant artiodactyls and saprophagous insects, lysozymes are involved in the digestion of bacteria. Here, we report the first crystallographic structure of a digestive lysozyme in its native and complexed forms, the structure of lysozyme 1 from *Musca domestica* larvae midgut (MdL1). Structural and biochemical data presented for MdL1 are analyzed in light of digestive lysozymes' traits. The structural core is similar, but a careful analysis of a structural alignment generated with other lysozymes *c* reveals that significant differences occur in coil regions. The loop from MdL1 defined by residues 98–100 has one deletion previous to residue Gln100, which leads to a less exposed conformation and might justify the resistance to proteolysis observed for MdL1. In addition, Gln100 is directly involved in a few hydrogen bonds to the ligand in a yet unobserved substrate binding mode. The pK_as of the MdL1 catalytic residues (Glu32 and Asp50) are lower (6.40 and 3.09, respectively) than those from *Gallus gallus* egg lysozyme (GgL, hen egg white lysozyme-HEWL) (6.61 and 3.85, respectively). A unique feature of MdL1 is a hydrogen bond between Thr107 O γ and Glu32 carboxylate group, which combined with the presence of Ser106 contributes to decrease the pK_a of Glu32. Furthermore, in MdL1 the presence of Asn46 preventing the occurrence of an electrostatic repulsion with Asp50 and the increment in the solvent exposition of Asp50 due to Pro42 insertion contribute to reduce the pK_a of Asp50. These structural elements affecting the pK_as of the catalytic residues should contribute to the acidic pH optimum presented by MdL1.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Digestive lysozyme 1; *Musca domestica*; X-ray crystal structure; Tetra-*N*-acetylchitotetraose; pH optimum

1. Introduction

Lysozymes (EC 3.2.1.17) catalyze the hydrolysis of 1,4- β -linkages between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine (NAG) residues in the peptidoglycan of the bacterial cell wall. Based on sequence and structure

similarity, these enzymes are classified in the glycoside hydrolase families 22, 23, 24, 25 and 73 (Coutinho and Henrissat, 1999). Lysozymes *c* are found in the family 22, for which the *Gallus gallus* lysozyme (GgL, hen egg white lysozyme-HEWL) is the best characterized member. GgL was the first enzyme structure to be solved by X-ray methods (Blake et al., 1965). The crystallographic structure of the cocrystallized complex with tri-*N*-acetylchitotriose (NAG)₃ led immediately to proposals for the catalytic mechanism with the indication of the two catalytic residues and of the six substrate binding subsites labeled –4 to +2 (originally named A to F), one per monosaccharide (Philips, 1967; Blake et al., 1967; Davies et al., 1997). Besides

* Corresponding authors. Address: Center for Structural Molecular Biology (CeBiME), Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), CP 6192, Campinas, SP 13084-971, Brazil (J.A.R.G. Barbosa). Fax: +55 11 3815 5579 (S.R. Marana); +55 19 3512 1004 (J.A.R.G. Barbosa).

E-mail addresses: srmarana@iq.usp.br (S.R. Marana), joao@lnls.br (J.A.R.G. Barbosa).

that, it was proposed that the Glu35 acted as a general acid protonating the glycosidic oxygen while the other residue, Asp52, acted as an electrostatic stabilizing group to promote and stabilize the carbonium ion intermediate (Phillips, 1967). Recently, this mechanism has been revisited and catalysis via a covalent intermediate formed with the catalytic aspartate residue has been proposed (Vocadlo et al., 2001).

Family 22 lysozymes are usually part of a defense system against bacteria (Jollès and Jollès, 1984), although in some animals these enzymes are also involved in digestion. For instance, ruminant artiodactyls present a high concentration of lysozyme in the contents of their stomach, where this enzyme cleaves the walls of bacteria releasing their nutrients (Dobson et al., 1984). Besides those vertebrates, insects that feed on bacteria growing in decomposing material (for instance housefly *Musca domestica* and fruitfly *Drosophila melanogaster*) also exhibit a high activity of lysozyme in an acidic compartment of their midgut, where it disrupts the bacteria present in the insect diet (Espinoza-Fuentes and Terra, 1987; Lemos and Terra, 1991; Hultmark, 1996; Prager, 1996). The comparison of several digestive lysozymes revealed some common properties, which seems to be convergent adaptations to function as digestive enzymes in an environment that combines acidic pH and high proteolytic activity. Thus, digestive lysozymes have high activity in an acidic compartment of the digestive tract, they are resistant to hydrolysis by proteinases that co-locate with them in the digestive tract, their bacteriolytic activity exhibits an acidic pH optimum, increments of ionic strength reduce their activity and they have low isoelectric points (Dobson et al., 1984; Prager, 1996). Sequence alignments have been used to propose the molecular basis of these adaptations (Prager, 1996), but these hypotheses still remain to be tested.

The tertiary structures of two lysozymes *c* from the insect immune system are known. For instance, the core structure of the antibacterial protein from Tasar silkworm *Antheraea mylitta* (AmL) (Jain et al., 2001) and the lysozyme from the silkworm *Bombix mori* (BmL) (Matsuura et al., 2002) are similar to that of GgL, although differences in the amino acid residues forming the active site and in some external loops had been observed. Nevertheless, the tertiary structure of digestive lysozymes from insects has not been previously reported.

Lysozyme 1 (MdL1; GenBank Accession No. AY344589) is found in an acidic compartment of the *M. domestica* larvae midgut, which is the richest source of lysozyme (77 U/mg) from that insect (Lemos and Terra, 1991). MdL1 has 122 amino acids (13816 Da; pI = 7.6) and its sequence shares 55.4% similarity and 38.5% identity with the GgL. It exhibits a pH optimum of 4.5 upon *Micrococcus lysodeikticus* at an ionic strength of 0.1, is resistant to the cathepsin D (an acidic proteinase from *M. domestica* midgut) and its activity is affected by the ionic strength (Lemos et al., 1993; Ito et al., 1995). Thus, MdL1 have typical properties of a digestive lysozyme.

The tertiary structure of *M. domestica* lysozyme 1 (MdL1) reported here is the first obtained for a digestive lysozyme. The comparison of this structure with digestive and non-digestive lysozymes was used in the attempt to elucidate the molecular basis of the properties of insects' digestive lysozymes.

2. Materials and methods

2.1. Protein production, purification and crystallization

A single colony of *Pichia pastoris* transformed with pPic9kf1 coding for MdL1 was grown in YPD medium (160 rpm, 28 °C, 18 h). Following that, the cells were harvested by centrifugation (2500g, 4 °C, 5 min), washed three times with autoclaved water, resuspended in BMM medium containing 1% methanol (v/v) and cultivated at 160 rpm and 28 °C for 72 h. Aliquots of methanol (final concentration 1%) were periodically (each 24 h) added to the culture. Finally, the cells were discarded and supernatant containing recombinant MdL1 was stored at –20 °C.

Ammonium sulfate (0.652 g/mL) was added to the culture supernatant containing MdL1 and incubated at 25 °C for 18 h. Following that, the mixture was centrifuged (10,000g, 1 h, 4 °C) and the pellet was resuspended in 20 mM sodium acetate, pH 5.5. This sample was dialyzed against the same buffer for 18 h at 4 °C. After that, this sample was loaded onto a Mono S HR5/5 column (GE) previously equilibrated with 20 mM sodium acetate pH 5.5 and proteins were eluted with a linear NaCl gradient (0–1 M; 20 mL; flow rate: 1 mL/min). Eluted fractions (1.0 mL) containing lysozyme activity were pooled and dialyzed against 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) pH 5.5. The purification of MdL1 was checked by SDS–PAGE.

The purified MdL1 at a concentration of 9.6 mg mL^{–1} and in 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) pH 5.5 buffer, was crystallized by vapour-diffusion sitting-drop, using a solution of 1.4 M ammonium sulfate, 0.1 M 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt (sodium Hepes) pH 7.5 and 1% polyethyleneglycol (PEG) 400 at 18 °C (Marana et al., 2006). The crystals of the complex between MdL1 and tetra-*N*-acetylchitotetraose ((NAG)₄) were obtained by soaking the sugar into native crystals. (NAG)₄ was dissolved in water to prepare a 1 mM solution and 1 µL of this solution was added to the solution containing a crystal of MdL1, where the protein concentration was 0.7 mM prior to crystallization. After this procedure, the crystals were stored for one week at 18 °C.

2.2. Data collection and structure solution

Crystallographic data were collected at the D03B-MX1 beam line of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS). This beamline is equipped with a MAR CCD detector combined with a MAR DTB goniostat. Crystals were cooled directly in a nitrogen-gas stream to 100 K. Data collection was carried out using the rotation method

with 1.0° oscillation per frame and radiation wavelength 1.431 Å for the native dataset and 1.427 for the complex one. Data processing was performed with the HKL2000 package (Otwinowski and Minor, 1997) and CCP4 package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Initial phases for the native structure were obtained by molecular replacement using the GgL structure deposited in the PDB with code 1HEW (Cheetham et al., 1992) as a search model (Marana et al., 2006). For the complex, one monomer of the MdL1 native structure deposited in PDB with code 2FBD without waters was used as a search model. In both cases, the MOLREP program (Vagin and Teplyakov, 1997) was used.

2.3. Crystallographic refinement and validation

In the first cycle of structure refinement, a simulated annealing procedure was used to reduce any bias towards the template structures. This was accomplished with the program CNS (Brunger et al., 1998). All further cycles were carried out with the REFMAC5 program (Murshudov et al., 1997) from the CCP4 suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Visualization and model building was performed with the O (Jones et al., 1991) and COOT programs (Emsley and Cowtan, 2004), where $3F_o - 2F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps were used to guide the positioning of the atoms. Water molecules were added with the automatic procedure of ARP/WARP (Lamzin and Wilson, 1997) and by visual inspection. The tri-*N*-acetylchitotriose (CTO or (NAG)₃) coordinates and topology parameters were obtained at the Hic-Up data base (Kleywegt and Jones, 1998). The refined structure was validated with the PROCHECK program (Laskowski et al., 1993) and the tools available in COOT.

2.4. Structure analysis

Besides the graphics programs O and COOT used above, the program PYMOL (DeLano, 2002) was employed to analyze the structure of the molecule. Another five crystallographic structures and their sequences were used in this analysis: IJSF from *Homo sapiens* (HsL) placenta (Harata et al., 1998), 1LMN from *Oncorhynchus mykiss* (OmL) kidney (Karlsen et al., 1995), 1HEW from *Gallus gallus* (GgL) egg white (Cheetham et al., 1992), 1GD6 from *Bombyx mori* (BmL) (Matsuura et al., 2002) and 1IIZ from *Antheraea mylitta* (AmL) (Jain et al., 2001). All the structures were superimposed and structurally aligned using the program COOT. Position of insertions or deletions were checked visually. Solvent accessible surface areas (SASA) were calculated using the software GETAREA 1.1.

2.5. DLS measurement

Dynamic light scattering (DLS) measurements of the purified lysozyme were performed in a DynaProTM DLS

system from Wyatt Technology Corp. The sample, at 1.0 mg/mL concentration in 10 mM MES pH 5.5, was centrifuged to 7000g for 7 min and the supernatant was submitted to 100 measurements.

2.6. Gel filtration chromatography

Gel filtration chromatography of the purified MdL1 was performed using a Superose 12 HR 10/300 GL column (GE HealthCare) in Tris–HCl pH 7.0 (flow rate: 0.5 mL/min) at 25 °C. Blue dextran, aprotinin, ribonuclease A, carbonic anhydrase, ovalbumin, aldolase, ferritin and GgL were used as molecular weight standards. The MdL1 activity was detected in the eluted fractions (0.5 mL) using *M. lysodeikticus* as substrate.

2.7. pH effect on the MdL1 and GgL activities

The pH effect on MdL1 and GgL activities upon *M. lysodeikticus* was determined using the buffers glycine–HCl (pH 2–3.5), sodium acetate (pH 4.0–5.5) and sodium phosphate (pH 6.0–7.5) at ionic strength 0.1 (Miller and Golder, 1950). MdL1 and GgL (Sigma—L7651) were incubated for different periods of time at 30 °C with a *M. lysodeikticus* concentration of 1 mg/mL. This reaction was interrupted by adding 0.5 M Na₂CO₃. Following that, the reaction rate was determined by measuring the decrease of OD_{650 nm} versus time of incubation.

The pH effect on MdL1 and GgL activities upon methylumbelliferyl *N*-acetyl chitotrioside (MUCH3) was determined at pH ranging from 3.0 to 7.0 at ionic strength 0.25 using sodium phosphate–citric acid buffers (Gomori, 1955). MdL1 and GgL were incubated for different periods of time at 30 °C using 7.8 μM MUCH3 and this reaction was interrupted by adding 100 mM glycine–NH₄OH buffer pH 10.5. The amount of methylumbelliferone produced was determined by fluorescence (Ex 360 nm, Em 450 nm). The reaction rate was calculated by measuring the increment of methylumbelliferone concentration versus time of incubation.

2.8. Determination of pK_a for the MdL1 and GgL catalytic residues

The effect of the MUCH3 concentration on the MdL1 and GgL activity was determined at pH ranging from 3.0 to 7.0 at ionic strength 0.25. The apparent $V_{\max}/K_m$ was calculated for each pH and following that they were fitted to the Eq. (1) (Segel, 1993).

$$V_{\max}/K_{m \text{ app}} = V_{\max}/K_m / (1 + ([H^+]/K_{E1}) + (K_{E2}/[H^+])) \quad (1)$$

$V_{\max}/K_{m \text{ app}}$ is the second order rate constant of MUCH3 hydrolysis at each pH, $[H^+]$ is the proton concentration and K_{E1} and K_{E2} are the deprotonation constants of the two catalytically essential groups in the free enzyme.

The fitting processes were performed with the ENZFITTER software (Elsevier—Biosoft).

3. Results and discussion

3.1. Overall structure

Both crystallographic structures of the MdL1, with and without (NAG)₃, present a dimer in the asymmetric unit. These structures have been refined, validated and deposited in the PDB, where they received the codes 2H5Z and 2FBD, respectively. The final $R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ were 0.175/0.242 and 0.153/0.198, respectively, and they are presented in Table 1 together with other refinement statistic data. The dimer was scrutinized about its possible existence in solution and biological significance in four different ways. The first approach was *in silico* via the program PISA (Krissinel and Henrick, 2005) at http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html. The calculated dimer interface area is 490.9 Å² (less than 8% of the monomer surface), presenting seven hydrogen bonds and a complexation significance score of zero, indicating that the interface of the dimer does not occur naturally and is probably a result of crystal packing. We also measured the dynamic light scattering of the sample which had a monodisperse pattern with particles of 13 kDa of estimated mass. In addition to that, gel filtration chromatography also indicated a relative molecular mass of 6500 for an active and intact MdL1. Finally, non-denaturing electrophoresis revealed a relative molecular mass of 14,000 for MdL1 (Lemos

et al., 1993). Thus, all methods used are in accordance and imply that the dimer present in the crystal is not the biological form of the enzyme.

The monomers respect the lysozyme *c* fold, consisting of a central core of three long and one short α-helices (Thr4–Leu15, Glu21–Ser34, Ile86–Gly101 and Thr107–Ser112), an antiparallel β-sheet with two β-strands (Asp50–Tyr51 and Ile56–Asn57) and four ₁₀-helices (Fig. 1). The eight cysteines form four conserved disulfide bonds. The two stranded β-sheet differs from that of other lysozymes where it usually has three β-strands. A careful inspection of the region corresponding to the absent first β-strand, in the region of residue Val40, shows an extended structure that barely misses the Kabsch and Sander parameters (Kabsch and Sander, 1983) used to define a β-strand.

Three sulfate ions, two polyethyleneglycol (PEG) molecules and 311 waters are the final components of the 2FBD structure. One of the sulfates is in the interface of the two molecules in the asymmetric unit and does not present contacts with the protein, only with solvent molecules. The other two sulfates are involved in hydrogen bonds to Thr43B and Thr4B and solvent molecules. None of the sulfates are close to the active site. Each PEG molecule was modeled as a diethyleneglycol and it was located in the active site of each lysozyme monomer in the asymmetric unit. In 2H5Z, there are 173 waters and the soaked ligand, tetra-*N*-acetylchitotetraoside ((NAG)₄), modeled as a trisaccharide in subsites –4 to –2. The interactions of these molecules will be discussed in a following section.

Table 1
Data collection and refinement statistics

Data collection	Native (2FBD)	Complex (2H5Z)
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Unit cell (Å; °)	<i>a</i> = 36.52, <i>b</i> = 79.44, <i>c</i> = 45.20; α = γ = 90.0, β = 103.0	<i>a</i> = 35.95, <i>b</i> = 78.81, <i>c</i> = 44.79; α = γ = 90.0, β = 102.2
Mosaicity (°)	0.7	1.0
Resolution range (Å)	30.00–1.90 (1.97–1.90)	30.00–1.92 (1.99–1.92)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>) after merging	23.8 (5.6)	16.2 (2.4)
Completeness (%)	100.0 (99.8)	88.1 (82.0)
Multiplicity	3.5 (3.4)	3.8 (2.8)
<i>R</i> _{sym}	0.052 (0.222)	0.078 (0.307)
No. of reflections	70004	62924
No. of unique reflections	19857 (1953)	16455 (1521)
Refinement		
<i>R</i> _{cryst} ^a	0.153	0.175
<i>R</i> _{free} ^a	0.198	0.242
r.m.s.d. bond lengths (Å)	0.012	0.018
r.m.s.d. bond angles (°)	1.4	1.7
Average B-factors (Å ²)	28.33	36.12
Ramachandran plot statistics by region ^b (%)		
Most favored	93.1	91.2
Allowed	6.9	8.8

Numbers in parenthesis refer to the highest resolution shell.
^a $R_{\text{cryst}} = \sum |F_o(h) - F_c(h)| / \sum F_o(h)$, where $F_o(h)$ and $F_c(h)$ are observed and calculated amplitudes for reflection *h*. R_{free} is calculated by the same equation using 5% of the data, chosen randomly and omitted from the refinement.
^b Generously allowed and disallowed regions of the Ramachandran plot had 0% population.

Fig. 1. (a) Stereoview of the overall fold of lysozyme *c* shown by the superposed C α -traces of all animal classes represented in the PDB: 2H5Z-*Musca domestica*-MdL1 (housefly, MdL1), yellow; 2FBD-*Musca domestica* (housefly), gray; 1IIZ-*Antheraea mylitta* (tasar silkworm, AmL), magenta; 1GD6-*Bombyx mori* (silkworm, BmL), cyan; 1HEW-*Gallus gallus* (hen, GgL) egg white, blue; 1JSF-*Homo sapiens* (human, HsL) placenta, orange; 1LMN-*Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout, OmL) kidney, green. The circles illustrate regions presenting differences between the structures, where the numbers indicate an amino acid residue within the region. (b) Multiple alignment of representative structures of lysozymes *c*: HsL, OmL, GgL, BmL, AmL and MdL1. Residues involved directly in catalysis are marked in color and residues which are not structurally aligned are in boxes. The numbering refers to the MdL1 structure. This is a modified version of an alignment produced with ClustalX (Thompson et al., 1997). Asterisks (*) represent strictly conserved residues, while colon (:) and dot (.) represent conserved residues in decreasing degrees of conservation. The bottom line shows the secondary structure of MdL1 with arrows for β -strands and yellow cylinders for α -helices and green ones for 3_{10} -helices.

3.2. Comparison with other lysozymes *c*

Although lysozymes *c* are one of the most abundant molecules in the PDB, there are only four classes of animals represented: mammals, birds, fishes and insects. Furthermore, all of these are representatives of lysozymes associated with the immune function, so far there are no digestive lysozymes deposited in the PDB. We have selected one example of each of these classes, 1JSF from *Homo sapiens* placenta (Harata et al., 1998), 1LMN from *Oncorhynchus mykiss* kidney (Karlsen et al., 1995), 1HEW from *Gallus gallus* egg white (Cheetham et al., 1992), 1GD6 from

Bombyx mori (Matsuura et al., 2002) and 1IIZ from *Antheraea mylitta* (Jain et al., 2001), to carry out a comparison to the structure presented in this study in order to find possible reasons for the characteristics found in the digestive lysozymes. The two structures available from insects (1GD6 and 1IIZ) were included since they are closer related to the one presented here and thus may provide more information.

The RMSD between the superposed structures (Table 2) shows that MdL1 is just slightly closer to the other insect structures (mean RMSD of 1.09 Å) than to the lysozymes representing birds, mammals and fishes (mean RMSD of

1.19 Å). This contrasts with the greater similarity between the structures of the other insects (RMSD of 0.66 Å) and indicates that divergence towards a digestive function required more adaptations of the structure. Another interesting feature is that the mean RMSD between birds, mammals and fishes (0.56 Å) is smaller than that between silkworms mentioned above.

A structural alignment shows nine regions of insertions or deletions, with five of them at the C-terminal region of the molecule containing residue 110 (Fig. 1). The deletion of three amino acids in the region of residue Ser20, where the residues adopt a short 3₁₀-helix configuration, seems to be a trait of the insect lysozymes irrespective of its defensive or digestive function. In a second region containing gaps in the alignment of primary sequences of the structures analyzed, between Val40 and the catalytic Asp50, it is shown different ways to accommodate and maintain residues Asn44, Asn/Asp46 and Ser48, which together with Asn57, are responsible for the placement of the Asp50 side chain (Figs. 1 and 2a). The biggest unaligned region, around residue 70, includes a unique feature of MdL1: the increment of the conserved hydrophobic cluster containing Tyr60 and Trp61 by residues Tyr59, Phe69 and Tyr71 (Fig. 2a). The deletion next to residue Gln100 is another characteristic of insect lysozymes and renders the fifth helix with three extra residues when compared with other lysozymes. Another feature of the insect structures is the addition of a Trp/Phe102, usually an isoleucine or methionine, to the aromatic cluster formed by Trp25, Phe54, Trp108 and Trp105. The differences in the main chain in the region of residues 40–50, around 70 and 100, have been noticed before even in the closely related structures, such as turkey and hen egg lysozymes, which are only seven residues different (Harata, 1993).

3.3. Ligand binding

The electron density found for the ligand showed a triose corresponding to (NAG)₃ in sites –4 (A) to –2 (C) of asymmetric unit's molecule B in a similar configuration as that of the 1HEW structure (Cheetham et al., 1992) (Fig. 1S). Sites –2 and –3 present good densities, while site –4 is poor either due to low occupancy or disorder. The low occupancy of site –4 has been associated with the hydrolysis of the ligand to shorter tri-, di- and monosaccharides (Cheetham et al., 1992). Disorder may also contribute to the weak density in site –4 since the sugar unit in this site does not present interactions with the protein or water molecules. The same reasoning of low occupancy due to hydrolysis and disorder can be used to explain the fact that we could only find a trisaccharide instead of the tetrasaccharide that was soaked (NAG)₄.

Molecule A of the asymmetric unit is not occupied by the sugar, even though its active site is exposed to the same region of solvent as molecule B's occupied active site. One possible reason is that if the trisaccharide was present in molecule A in the same configuration as in molecule B, the saccharide in site –4 of molecule A would be in steric clash with Gln100 of molecule B. The only other difference between the ligand sites of molecules A and B is a different rotamer for the side chain of Gln100. The unbound molecule A rotamer is similar to the rotamers found in both molecules of the unsoaked structure.

Contrasting to the absence of interactions with the saccharide in site –4, there are six hydrogen bonds between the ligand and sites –3 and –2 of MdL1 (Fig. 1S). Comparing these interactions with those that occur in GgL, it becomes clear that the conservation is higher in site –2 than in –3, correlating with the proximity of the reaction

Table 2
Superposition of lysozyme *c* representatives from insects: *Musca domestica*-MdL1 (PDB code 2FBD) and MdL1I (with ligand, 2H5Z), *Bombyx mori*-BmL (1GD6) and *Anthera mylitta*-AmL (1IIZ); birds: *Gallus gallus*-GgL (1HEW); mammals: *Homo sapien*-HsL (1JSF) and fishes: *Oncorhynchus mykiss*-OmL (1LMN)

	Resolution (Å)	C _α atoms RMSD (Å) / % identity							Mean
		MdL1_B	MdL1_A	MdL1I_B	BmL	AmL	GgL	HsL	
MdL1_A	1.90	0.24							0.27
MdL1I_B	1.92	0.34	0.24						1.09
BmL	2.50	1.12	1.08	1.14/45.5					0.66
AmL	2.40	1.11	1.05	1.06/41.5	0.66/75.8				1.19
GgL	1.75	1.21	1.21	1.22/38.5	1.04/40.8	1.22/37.7			1.02
HsL	1.15	1.17	1.20	1.19/39.2	0.98/38.5	1.20/36.6	0.66/60.0		1.20
OmL	1.80	1.10	1.23	1.18/36.9	1.03/42.3	1.17/41.5	0.56/60.0	0.47/69.2	0.56

The _A and _B at the end of the protein codes denote the monomer. The RMSD was calculated using the structurally aligned C_α atoms. The numbers in the last column represent the mean of the RMSDs which are shaded in the same gray scale. For example, the 0.56 value in the mean column is in darkest gray and correspond to the sum of the three values shaded in darkest gray at the GgL and HsL columns (0.66, 0.56 and 0.47) divided by three. The columns MdL1I_B, BmL, AmL, GgL and HsL have the identity between sequences displayed on the right side of the RMSD values separated by a “/”.

Fig. 2. (a) Stereoview of the stabilization of Asp50 side chain (left) and a unique aromatic cluster in MdL1 (right). Black dashed lines are representing hydrogen bonds. All the structures are represented by the C α -trace from their equivalents of residues Val40 to Cys74. The color scheme is the same as Fig. 1. The (NAG) $_3$ molecule is represented only by its sugar rings. (b) Stereoview of the superposition of MdL1 (gray and waters in green) and GgL (yellow and waters in magenta) showing the differences in ligand binding. The hydrogen bonds are represented by dashed lines.

site. In fact, the hydrogen bonds between the saccharide atoms in site –2 and the protein residues or waters (O1 with W55 and W171; N2 with Ala104; O3 with Trp61; O7 with Asn57) are the same in MdL1 and GgL (where the waters are numbered 74 and 76, respectively) (Fig. 2b). The only exception is a hydrogen bond between O3 and Gln100, which is unique to MdL1. Gln100 shares two other hydrogen bonds with the ligands' O4 and O6 atoms of the saccharides in positions –2 and –3, respectively. In GgL, these interactions are replaced by hydrogen bonds between residues Asp101 and Asn103 (GgL numbering) and the O6 of saccharides in positions –3 and –4, respectively. In other insect structures, this region is similar to MdL1, where there is a deletion and the main chain is accommodated. But neither AmL nor BmL has a Gln at position 100, this is occupied by Thr or His, respectively. Both amino acids are unable to form the same interactions with a substrate like the Gln from MdL1. Thus it is expected that for the lysozymes of these insects, other residues in the neighborhood, possibly Arg99, can compensate for the lack of the Gln100 interactions.

The ligand presents six hydrogen bonds to water molecules. Two of these waters, W55 and W171, together with waters W172 and W18 form a network in the region of saccharide in position –1, as seen in the 1H6 M structure (Vocadlo et al., 2001). This network is present in GgL, except for W18 (Fig. 2b). These structural waters clearly show the space reserved for the saccharide in position –1 and help maintain the side chains of the catalytic residues in position. In the native structure of MdL1 there is a PEG molecule in the active site, partially occupying the position –1 at O6 and –2 at the *N*-acetyl. This molecule changes the disposition of the waters and prevents a comparison of the water positioning prior and after (NAG) $_3$ binding.

3.4. pH optimum

A distinguishing feature of digestive lysozymes is an acidic pH optimum, usually lower than those from non-digestive lysozymes (Dobson et al., 1984; Prager, 1996). Fig. 3a shows that this property is shared by MdL1. At

Fig. 3. (a) Effect of pH on the MdL1 (●) and GgL (○) activities upon *Micrococcus lysodeikticus*. (b) Effect of pH on the MdL1 (△) activity upon MUCH3. The enzymes are stable at this pH range.

ionic strength of 0.1, the lytic activity of MdL1 exhibits a pH optimum of 4.0, which is similar to that of the stomach lysozymes (around 5.0) from ruminants (Dobson et al., 1984). Conversely, at the same conditions GgL presents a pH optimum of 7.5 (Fig. 3a). The acidic pH optimum of MdL1 was confirmed using MUCH3 as substrate (Fig. 3b). It is noteworthy that despite the similarity, MdL1 and GgL present very different pH optimum.

MdL1 pH optimum depends on the carboxylates of Glu32 and Asp50, whose functionalities in catalysis were defined based on comparison with GgL. Glu32 is the catalytic acid/base while Asp50 acts as a nucleophile and forms a covalent intermediate (Vocadlo et al., 2001). In this mechanism, Glu32 starts uncharged and Asp50 is negatively charged. Curves of pH effect on the kinetic parameter k_{cat}/K_m for MUCH3 hydrolysis were used to calculate the pK_a s of these two catalytic residues for MdL1 and GgL (Fig. 4). Table 3 shows that both catalytic groups of MdL1 exhibits lower pK_a than those from GgL. Indeed, a reduction in the pK_a s of the catalytic groups is expected in order to attain a more acidic pH optimum for MdL1.

In order to understand the basis of these pK_a reductions, the MdL1 structure was compared with the AmL, BmL, HsL, OmL and, in particular, GgL structures. The structure of the MdL1 shows a unique hydrogen bond between

Fig. 4. Effect of pH on the V_{max}/K_m of the MUCH3 hydrolysis by MdL1 (a) and GgL (b). The enzymes are stable at this pH range.

Table 3
 pK_a of the MdL1 and GgL catalytic residues

	pK_{E1}^a	pK_{E2}^a
MdL1	3.09 ± 0.05	6.40 ± 0.03
GgL	3.85 ± 0.06	6.61 ± 0.07

^a pK_{E1} and pK_{E2} correspond to the pK_a s of the catalytic nucleophile (Asp) and acid/base (Glu) in the free enzyme, respectively.

Thr107 Oγ and Glu32 carboxylate group (Fig. 2b) when compared to the other structures (Fig. 1b). This threonine is replaced by alanine or glycine in the other lysozyme sequences, which prevents such an interaction from occurring. Indeed, an analysis of the complex between GgL and either (NAM-NAG-NAM) (Strynadka and James, 1991) or (NAG)₃ (Cheetham et al., 1992) revealed that the residue Ala110, which corresponds to Thr107, is part of a hydrophobic pocket that could contribute to increase the pK_a of the catalytic acid/base. This pocket is also formed by Val109, which is replaced by Ser106 in MdL1. Further analysis of 98 sequences deposited in the databank shows that the pair threonine and serine is conserved in the digestive lysozymes from *M. domestica* (AY344588 and AY344589) and *D. melanogaster* (LysD; AE003807), while it is not found in all other lysozymes (data not shown). Therefore, these two replacements may make the environment around Glu32 more polar, contributing to reduce its pK_a . In addition to that, an increment of about 70% in the exposition of Glu32 side chain to the solvent (SASA = 11.5 Å in GgL; 19.1 and 21.0 Å in MdL1 mono-

mers A and B, respectively) could also contribute to this effect.

Residues Asn44 and Asn57 form hydrogen bonds with Asp50 and are important contributors in the determination of the pK_a of Asp50 (catalytic nucleophile). Since they are conserved in all lysozymes analyzed, the differences in the pK_a have to arise from the environment around Asn44 and Asn57 or other neighboring residues of Asp50. An example of the first possibility is Asn46, which indirectly interacts with Asp50 through a hydrogen bond involving Ser48, in GgL this asparagine is replaced by an aspartic acid (Figs. 1b and Fig. 2a). About 45% of the superficial area of this aspartic acid side chain (Asp48) is exposed to the solvent, suggesting that it might be deprotonated. Thus, in GgL the presence of the negatively charged Asp48 may establish an electrostatic repulsion with the deprotonated Asp52. This is analogous to the electrostatic interaction in GgL between the negatively charged nucleophile (Asp52) and the catalytic acid (Glu35) that, in addition to the placement in a hydrophobic pocket, is responsible for the unusually high pK_a of the latter (Inoue et al., 1992; Hashimoto et al., 1996). On the other hand, in MdL1 the replacement of Asp48 by Asn46 removes the electrostatic repulsion, resulting in a decrease in the pK_a of the Asp50.

As an example for the other neighboring residues of Asp50 contributing to its pK_a lowering, we found the insertion in the region of Pro42 present in MdL1. This insertion breaks up the β -sheet through an opening of the first β -strand. This opening increases the accessible surface area of Asp50, leading to a reduction of its pK_a . The relative contribution of these factors to the pK_a of Asp50 and the presence of other factors is not certain and needs further investigation.

In summary, the presence of Thr107 and Ser106 making a more polar environment around Glu32, the presence of Asn46 preventing the occurrence of an electrostatic repulsion with Asp50 and the increment in the solvent exposition of Asp50 due to Pro42 insertion are combined to concomitantly reduce the pK_a s of Glu32 and Asp50, resulting in an acidic pH optimum for MdL1.

3.5. Stability in the digestive tract environment

Digestive lysozymes are active in an environment that combines acidic pH and high proteolytic activity. Resistance to the inactivation by acidic proteinases was described for cow lysozyme, which is approximately six times more resistant to pepsin than GgL (Dobson et al., 1984). Similarly, MdL1 activity is totally recovered after incubation with an extract containing cathepsin D, a digestive proteinase from the midgut of that insect (Espinoza-Fuentes and Terra, 1987).

This MdL1 property may be related to a reduction in the number of sites recognized by cathepsin D, however this hypothesis can not be further analyzed since the substrate specificity of insect cathepsin D is unknown. A low exposure

to the solvent may also be related to the resistance to proteinases. That might be the case of the region between the fifth and sixth helices of MdL1, specifically residues Q99 through G101, which forms a loop that is shorter and less exposed than in GgL, making this region more protected from an attack by proteinases.

Finally, properties related to stability in acidic medium shared by digestive lysozymes (Prager, 1996) are also present in MdL1, such as a low Arg content (5 in total) and fewer acid-labile Asp, Asn and Gln bonds (20 in total), specially the lack of the most acid-hydrolysis labile Asp99–Pro99A bond (101 and 102 in Prager numbering scheme).

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants: 02/10634–2—SMolBNet, 04/02017–9, 06/56521–5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS). We thank Dr. W.R. Terra for providing the *P. pastoris* colonies expressing MdL1 and Dr. Rogério Meneghini for his support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jsb.2007.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.008).

References

- Blake, C.C., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C., Sarma, V.R., 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* 206, 757–761.
- Blake, C.C., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C., Sarma, V.R., 1967. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 167, 378–388.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* 54, 905–921.
- Cheetham, J.C., Artymiuk, P.J., Phillips, D.C., 1992. Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy: hen egg-white lysozyme and tri-*N*-acetylchitotriose at 175 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 224, 613–628.
- Collaborative Computational Project, Number 4., 1994. The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* 50, 760–763.
- Coutinho, P.M., Henrissat, B., 1999. Carbohydrate-active enzymes an integrated database approach. In: Gilbert, H.G., Davies, G., Henrissat, B., Svensson, B. (Eds.), *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3–12.
- Davies, G.J., Wilson, K.S., Henrissat, B., 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321, 557–559.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Dobson, D.E., Prager, E.M., Wilson, A.C., 1984. Stomach lysozymes of ruminant1—distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 259, 11607–11616.

- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D* 60, 2126–2132.
- Espinoza-Fuentes, F.P., Terra, W.R., 1987. Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* 17, 809–817.
- Gomori, G., 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol.* 1, 138–146.
- Harata, K., 1993. X-ray structure of monoclinic turkey egg lysozyme at 13 Å resolution. *Acta Cryst. D* 49, 497–504.
- Harata, K., Abe, Y., Muraki, M., 1998. Full matrix least squares refinement of lysozymes and analysis of anisotropic thermal motion. *Proteins* 30, 232–243.
- Hashimoto, Y., Yamada, K., Motoshima, H., Omura, T., Yamada, H., Yasukoshi, T., Yasukoshi, M., Ueda, T., Imoto, T., 1996. A mutation study of catalytic residue asp52 in hen egg lysozyme. *J. Biochem.* 119, 145–150.
- Hultmark, D., 1996. Insect lysozymes. In: Jollès, P. (Ed.), *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 87–102.
- Inoue, M., Yamada, H., Yasukochi, T., Kuroki, R., Miki, T., Horiuchi, T., Imoto, T., 1992. Multiple role of hydrophobicity of tryptophan-108 in chicken lysozyme: structural stability, saccharide binding ability, and abnormal pK_a of glutamic acid 35. *Biochemistry* 31, 5545–5553.
- Ito, Y., Nakamura, M., Hotani, T., Imoto, T., 1995. Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. *J. Biochem. Tokyo* 118, 546–551.
- Jain, D., Nair, D.T., Swaminathan, G.J., Abraham, E.G., Nagaraju, J., Salunke, D.M., 2001. Structure of the induced antibacterial protein from tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *J. Biol. Chem.* 44, 41377–41382.
- Jollès, P., Jollès, J., 1984. What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* 63, 165–189.
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M., 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* 47, 110–119.
- Karlsen, S., Eliassen, B.E., Hansen, L.K., Larsen, R.L., Riise, B.W., Smalas, A.O., Hough, E., Grinde, B., 1995. Refined crystal-structure of lysozyme from the rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Cryst. D* 51, 354–367.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- Kleywegt, G.J., Jones, T.A., 1998. Databases in protein crystallography. *Acta Cryst. D* 54, 1119–1131.
- Krissinel, E., Henrick, K., 2005. Detection of protein A assemblies in crystals. In: Berthold et al. (Eds.), *M.R. Comp. Life 2005*, LNBI 3695. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 163–174.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283–291.
- Lamzin, V.S., Wilson, K.S., 1997. Automated refinement for protein crystallography. In: Carter, C., Sweet, B. (Eds.), *Methods Enzymol.* 227, 269–305.
- Lemos, F.J.A., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1993. A bacteria-digesting midgut lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 533–541.
- Lemos, F.J.A., Terra, W.R., 1991. Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 265–268.
- Marana, S.R., Cançado, F.C., Valério, A.A., Ferreira, C., Terra, W.R., Barbosa, J.A.R.G., 2006. Crystallization data collection and phasing of two digestive lysosymes from *Musca domestica*. *Acta Cryst. F* 62, 750–752.
- Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demura, M., Tanaka, I., Kawano, K., Nitta, K., 2002. Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. *Biochemistry* 41, 12086–12092.
- Miller, G.L., Golder, R.H., 1950. Buffers of pH 2 to 12 for use in electrophoresis. *Arch. Biochem.* 29, 420–423.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst. D* 53, 240–255.
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Macromolecular crystallography, part A. In: Carter Jr., C.W., Sweet R.M. (Eds.), *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
- Phillips, D.C., 1967. The hen egg white lysozyme molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 484–495.
- Prager, E.M., 1996. Adaptive evolution of lysozyme: changes in amino acid sequence, regulation of expression and gene number. In: Jollès, P. (Ed.), *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 323–345.
- Segel, I.H., 1993. *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Strynadka, N.C.J., James, M.N.G., 1991. Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an *N*-acetylmuramic acid residue bound in site D. *J. Mol. Biol.* 220, 401–424.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882.
- Vagin, A.A., Teplyakov, A., 1997. *MOLREP*: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 30, 1022–1025.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., Withers, S.G., 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412, 835–838.