UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAIRA ARTISCHEFF FRUTUOSO

Contribuição dos subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ para a
estabilidade e atividade de beta-glicosidases

GH1 com estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

12/07/2019

MAIRA ARTISCHEFF FRUTUOSO

Contribuição dos subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ para a
estabilidade e atividade de beta-glicosidases

GH1 com estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências
(Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F944c	Frutuoso, Maira Artischeff Contribuição dos subdomínios (b/a)4 para a estabilidade e atividade de beta-glicosidases GH1 com estrutura (b/a)8 barril / Maira Artischeff Frutuoso. - São Paulo, 2019. 186 p. Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Marana, Sandro Roberto 1. enzimologia. 2. beta-glucosidases GH1. 3. (b/a)8 barril. 4. subdomínios. I. T. II. Marana, Sandro Roberto, orientador.
-------	--

Dedico...

...aos que são resilientes e não deixam de crer na ciência

Agradecimentos

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

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Marana, pela pronta disponibilidade, pelos conselhos e orientação durante a realização deste trabalho, além das conversas de apoio nas horas difíceis. Que na última década de convivência, muito me ensinou com discussões fundamentais à minha formação tanto na ciência quanto na vida.

Ao suporte técnico da Juliana Raveli por todo auxílio prestado ao nosso grupo de pesquisa e à M. Ivanilde Marcelino e Christiane Cardoso pelo apoio técnico no laboratório anexo do prof. Walter Terra.

À todos os membros do grupo de Enzimologia e colegas de laboratório: Valquíria P. Souza, Vítor Medeiros, Rafael S. Chagas, Felipe, Thabata Vinha e Thais, pelas discussões, amizade e ajuda com dicas e protocolos na realização desse trabalho. Em especial agradeço à Val, ao Vítor e Diorge Pereira pela amizade e conversas científicas. Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Renata, Gilliard, Ignácio, Bárbara, Ticiane Damasceno e Daniela Bataglioli. E aos profs. Clélia Ferreira e Walter Terra que acolheram o nosso grupo de pesquisa no bloco 12.

Ao Márcio Nardelli por toda orientação e dicas e à Central Analítica, por viabilizar o uso do Espectropolarímetro para a coleta de dados de Dicroísmo Circular.

A prof. Carla Columbano, e ao seu grupo, pelo acesso e apoio no uso do PCR real time para a coleta de dados de DSF-ThermoFluor.

Aos funcionários do Instituto de Química pela manutenção da infraestrutura para a realização desse trabalho, apesar de todas as dificuldades políticas e financeiras.

Ao Laboratório de Enzimologia, por colocar à disposição o laboratório e área experimental utilizada para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química, pela oportunidade no curso de pós graduação.

Ao Programa de Excelência Acadêmica da Capes e à FAPESP pela concessão das bolsas e apoio financeiro para a realização desta pesquisa, processo nº 2014/16913-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo(FAPESP).

Ao gato Bruce por me confortar diariamente e por morder alguns artigos.

E ao Daniel Varoni que contribuiu muito em minha carreira e que me apoiou sempre em todas as decisões.

“A ciência é conhecimento organizado.

A sabedoria é vida organizada.”

Immanuel Kant

Resumo

Frutuoso, M. A. **Contribuição dos subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ para a estabilidade e atividade de beta-glicosidases GH1 com estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril.** 2019. 186p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Domínios são definidos como unidades de dobramento independente e estáveis que formam a estrutura das proteínas (Richardson, 1981; Dootlitle, 1995; Porter e Rose, 2012). Interessantemente quando esta definição é aplicada na análise de proteínas com dobramento $(\beta/\alpha)_8$ barril identificam-se 2 domínios, que correspondem as suas metades N- e C-terminais (Porter e Rose, 2012), contrastando com a visão que assume o $(\beta/\alpha)_8$ barril como um domínio único.

Deste modo, considerando então que as metades N-terminal e C-terminal das proteínas $(\beta/\alpha)_8$ barril sejam consideravelmente estáveis e independentes, o objetivo geral desta tese foi avaliar como as propriedades individuais destes “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ” se combinam e definem tanto a estabilidade quanto a atividade catalítica das β -glicosidases GH1, que possuem estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril. As β -glicosidases bglA de *Thermotoga maritima* (uma bactéria termófila), bglA e bglB de *Paenibacillus polymyxa* (uma bactéria mesófila) e proteínas quiméricas originadas da combinação dos “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ” entre duas destas β -glicosidases (N_{bglThm} - C_{bglB} , N_{bglB} - C_{bglThm} , N_{bglThm} - C_{bglA} , N_{bglA} - C_{bglThm} , N_{bglA} - C_{bglB} e N_{bglB} - C_{bglA}) foram os modelos experimentais.

As β -glicosidases bglA, bglB e bglThm foram produzidas como proteínas recombinantes e purificadas. Apenas N_{bglA} - C_{bglThm} pode ser purificada solúvel e ativa. A fluorescência de triptofanos e o dicróismo circular sugerem que as β -glicosidases selvagens e a quimera estão enoveladas. Além disso, N_{bglA} - C_{bglThm} apresenta uma composição de estrutura secundária mais próxima à bglA do que bglThm. Por outro lado, o acesso do supressor acrilamida aos triptofanos de N_{bglA} - C_{bglThm} é igual a bglThm e menor do que bglA.

A T_m e o k_{obs} de inativação a 47°C de N_{bglA} - C_{bglThm} são intermediárias àquelas de bglA e bglThm. Portanto, a termoestabilidade da quimera é uma ponderação daquela das suas proteínas parentais.

N_{bglA} - C_{bglThm} possui atividade enzimática independente do pH, enquanto bglA e bglThm exibem uma curva em sino. Ainda, N_{bglA} - C_{bglThm} mostrou menor atividade enzimática, ilustrada pela queda dos k_{cat} para os substratos estudados. Considerando que funcionamento do sítio ativo das β -glicosidases depende do posicionamento relativo de pelo menos dez resíduos, estas mudanças na quimera não são inesperadas. N_{bglA} - C_{bglThm} possui K_m intermediário para os substratos $pNP\beta$ -Glucose e $pNP\beta$ -Fucose em relação a bglA e bglThm. Adicionalmente, a especificidade pelo substrato de N_{bglA} - C_{bglThm} é uma ponderação daquela de bglA e bglThm, pois

enquanto estas parentais exibiram preferência por um destes substratos, a quimera apresenta o mesmo k_{cat}/K_m para os dois.

Deste modo, a caracterização da atividade enzimática sugere que as metades $(\beta/\alpha)_4$ que compõem a quimera N_{bglA}-C_{bglIThm} provavelmente se dobraram autossuficientemente e se ajustaram formando um sítio ativo funcional. Coerentemente, a estabilidade térmica intermediária da quimera também sugere que as metades $(\beta/\alpha)_4$ das proteínas parentais mantiveram sua termoestabilidade relativamente independente. Em conjunto estas observações implicam em razoável estabilidade e independência termodinâmica no dobramento de cada uma das metades $(\beta/\alpha)_4$, funcionando, portanto, como unidades praticamente independentes, ou seja, como domínios.

Palavras-chave: β -glicosidases GH1; $(\beta/\alpha)_8$ barril; subdomínios

Abstract

Frutuoso, M. A. **Contribution of $(\beta/\alpha)_4$ subdomains to the stability and activity of beta-glycosidases GH1 with $(\beta/\alpha)_8$ barrel structure.** 2019. 186p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Domains are stable and independent folding units that compose the protein structure (Richardson, 1981; Doolittle, 1995; Porter e Rose, 2012). Interestingly, the application of this definition in the analysis of $(\beta/\alpha)_8$ barrel proteins reveals two domains corresponding to the N- and C-terminal halves (Porter and Rose, 2012), a perspective that contrast with the common assumption that those are single domain proteins. Based on that, assuming that the N- and C-terminal halves of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel proteins are stable and independent, the objective of this project was to understand how the individual properties of the $(\beta/\alpha)_4$ subdomains combine and define the stability and catalytic activity of the β -glycosidases GH1, which exhibit $(\beta/\alpha)_8$ structure. The β -glycosidase bglThm from *Thermotoga maritima* (thermophile bacteria), bglA and bglB from *Paenibacillus polymyxa* (mesophile bacteria) and six chimeric proteins combining the $(\beta/\alpha)_4$ subdomains from two of those enzymes (N_{bglThm}-C_{bglB}, N_{bglB}-C_{bglThm}, N_{bglThm}-C_{bglA}, N_{bglA}-C_{bglThm}, N_{bglA}-C_{bglB} e N_{bglB}-C_{bglA}) were used as experimental models.

bglA, bglB and bglThm were produced as recombinant proteins and successfully purified. The chimera N_{bglA}-C_{bglThm} was the only one that was viably produced and purified. Tryptophan fluorescence and circular dichroism spectra indicated that the wild-type and the chimeric β -glycosidases were folded. N_{bglA}-C_{bglThm} has a secondary structure composition similar to bglA. On the other hand, access of the tryptophan residues of N_{bglA}-C_{bglThm} to the quencher acrylamide is comparable to bglThm.

The melting temperature (T_m) and the thermal inactivation rate constant (at 47°C) of the N_{bglA}-C_{bglThm} are intermediary to bglA and bglThm. Hence, the chimera thermostability is a balance of the parental enzymes stabilities.

The catalytic activity of N_{bglA}-C_{bglThm} does not depend on the pH, whereas bglA and bglThm exhibited a typical bell shaped curve. In addition, N_{bglA}-C_{bglThm} activity is lower than the parental enzymes, as showed the k_{cat} for three different substrates. Considering that the active site properties of the β -glycosidases rely on the relative positioning of at least ten residues, such changes are not surprising. The K_m of N_{bglA}-C_{bglThm} for substrates *p*NP β -Gluco and *p*NP β -Fuco are intermediary to bglA and bglThm. Finally, the substrate specificity of the N_{bglA}-C_{bglThm} is a balance of the parental enzymes specificities, because they showed clear preference for one of those substrates, whereas the chimera presented the same k_{cat}/K_m for both.

Hence, the characterization of the chimera activity indicates that the $(\beta/\alpha)_4$ subdomains folded self-sufficiently and adjusted itself to form a functional active site. In agree, the chimera thermostability also indicates that the $(\beta/\alpha)_4$ subdomains kept their individual “thermal-properties”. These observations point to a sufficient thermodynamic stability in the folding and properties of each $(\beta/\alpha)_4$ half, implying that they were virtually self-contained like true domains.

Keywords: β -glycosidases GH1; $(\beta/\alpha)_8$ barrel; subdomains

Lista de abreviaturas e siglas

3C	região que codifica o C-terminal
5N	região que codifica o N-terminal
Abs	absorbância
ABS	<i>“aglicone biding site”</i>
bglB	β -glicosidase de <i>Paenibacillus polymyxa</i>
BLAST	<i>“basic local alignment search”</i>
BSA	albumina de soro bovino
CD	técnica de Dicroísmo Circular
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co.	companhia
CP6	tampão citrato fosfato pH6
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	2’desoxirridonucleotídeo 5’ trifosfato
DSF	técnica de <i>“Differential Scanning Fluorimetry”</i>
EC	<i>“Enzyme Comission Number”</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Ek	enteroquinase
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FT	<i>“Flow-Through”</i> (amostra que não ligou na resina)
GATC	sequência dos nucleotídeos guanina, adenina, tirosina e citosina
GBS	<i>“glicone binding site”</i>
GC	guanina-citosina
GH1	família 1 das glicosídeo-hidrolases
glc	glicose
I/VTENG	sequência Ile-(Val)-Thr-Glu-Asn-Gly conservada em GH1
IDT	<i>“Integrated DNA Technologies”</i>
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobases
kDa	quilodalton

K_m	constante de Michaelis e Menten
K_{sv}	constante de <i>Stern-Volmer</i>
LB	meio de cultura “ <i>Luria-Bertani</i> ”
LIC	clonagem independente de ligação
m/v	massa sobre volume
mA	miliampére
Milli-Q	água filtrada por osmose reversa
Mr	massa molecular relativa
ND	Não determinado
NI	Cultura de células antes da indução por IPTG
Ni^{2+} -NTA	Resina de afinidade de níquel carregado
nm	comprimento de onda em nanômetros
p/v	peso sobre volume
PA	persulfato de amônio
pb	pares de bases
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PDB	“ <i>Protein Data Bank</i> ”
pH	potencial hidrogeniônico
pLATE51	vetor comercial de expressão intracelular em <i>E. coli</i>
PM	peso molecular
pNP	<i>p</i> -nitrofenolato
pNP β -Gluc	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
pNP β -Fuco	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-Fucopiranosídeo
pNP β -Gal	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-Galactopiranosídeo
pT7-7	vetor de expressão controlado pelo promotor T7
q. s. p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAE	tampão tris acetato EDTA
TFNEP	sequência Thr-Phe-Asn-Glu-Pro conservada em GH1
T_m	temperatura de <i>melting</i>
TSA	“ <i>Thermal-shift assay</i> ”

Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
Tris-HCl	tampão tris com ácido clorídrico
U	unidade de atividade enzimática
UV	luz ultravioleta
v/v	volume sobre volume
V_{final}	volume final
V_{max}	velocidade máxima
xg	força em gravidade

Lista de símbolos

TM	marca registrada comercial
Ω	ohms
®	marca registrada

Índice

Introdução Geral.....	27
------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1- β -glicosidases GH1 quiméricas

1. Introdução

1.1 – β -glicosidases da família GH1	32
1.2 – β -glicosidases como modelo experimental	33
1.3 – <i>Paenibacillus polymyxa</i>	35
1.4 – <i>Thermotoga maritima</i>	36

2. Material e Métodos

2.1 – Produção das β -glucosidases selvagens e quiméricas	37
2.2 – Purificação das β -glucosidases recombinantes selvagens e quiméricas	43
2.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	47
2.4 – Determinação da concentração de proteínas totais por Bradford	48
2.5 – Determinação da concentração de proteínas por 280nm abs	49
2.6 – Procedimentos para manipulação e análise de DNA	50

3. Resultados e Discussão

3.1 – Planejamento das proteínas recombinantes quiméricas	61
3.2 – Construção das proteínas recombinantes quiméricas.....	67
3.3 – Produção e purificação das β -glucosidases selvagens	71
3.4 – Expressão das proteínas recombinantes quiméricas	78
3.5 – Purificação das proteínas recombinantes quiméricas	82

4.1 – Conclusões Prévias	86
---------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2- Domínios em β -glucosidases TIM barrel

1. Introdução

1.5 – Clã GH A	87
1.6 – “Folding TIM barrels”	88
1.7 – Domínios em $(\beta/\alpha)_8$ barris ou “TIM barrels”	89
1.8 – Evolução dos domínios em $(\beta/\alpha)_8$ barris ou “TIM barrels”	90
1.9 – Diferentes modelos para identificação de domínios	92

2. Material e Métodos

2.8 – Coleta de espectros de fluorescência intrínseca de proteínas	94
2.9 – Supressão de fluorescência intrínseca de proteínas por acrilamida	94

2.10 – Determinação de espectros de dicroísmo circular	95
3. Resultados e Discussão	
3.5 – Coleta de espectros de fluorescência intrínseca e supressão por acrilamida.....	96
3.6 – Coleta de espectros de dicroísmo circular	102
4.2 – Conclusões Prévias	105

Capítulo 3- Efeitos na estabilidade da Quimera

1. Introdução

1.10 – Estabilidade proteica.....	107
1.11 – Desnaturação proteica	108
1.12 – Mecanismo de dois estados	109
1.13 – Desnaturação Cooperativa	111

2. Material e Métodos

2.11 – Cinética de inativação térmica acompanhada pela atividade enzimática	112
2.12 – Determinação de T_m por “ <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> ”	113
2.13 – Determinação de T_m por dicroísmo circular	114
2.14 – Desnaturação química	115

3. Resultados e Discussão

3.7 – Cinética de inativação térmica acompanhada por atividade enzimática	119
3.8 – Efeito da inativação térmica nas β -glicosidases recombinantes	124
3.9 – Efeito da inativação química nas β -glicosidases recombinantes	132

4.3 – Conclusões Prévias	152
---------------------------------------	------------

CAPÍTULO 4- Efeitos na eficiência catalítica da Quimerica

1. Introdução

1.13 – Glicosídeo- hidrolases.....	155
1.14 – Bases moleculares do sítio ativo e subsítios	156
1.15 – Mecanismo catalítico nas Glicosídeo-hidrolases.....	158

2. Material e Métodos

2.15 – Ensaio de atividade enzimática acompanhando a formação de <i>p</i> -nitrofenol	159
2.16 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática acompanhando a formação de <i>p</i> -nitrofenol ..	160
2.17 – Determinação dos parâmetros cinéticos acompanhando a formação de <i>p</i> -nitrofenol	161

3. Resultados e Discussão

3.10 – Efeitos na eficiência catalítica	162
---	-----

3.11 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática	165
3.12 – Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática	169
4.4 – Conclusões Prévias	176
Conclusões Finais.....	177
Referências bibliográficas	179

Índice de Figuras

Figura 1 – Alinhamento estrutural entre bglA, bglB e bglThm	34
Figura 2 – Bactéria mesófila <i>Paenibacillus polymyxa</i>	35
Figura 3 – Bactéria termófila <i>Thermotoga maritima</i>	37
Figura 4 – Esquema do vetor PUC57 onde os segmentos de DNA que codificam as enzimas quiméricas.....	55
Figura 5 – Visão geral do vetor de expressão pLATE51 “anelado” com o inserto bglA de <i>P. polymyxa</i> amplificado e purificado tratado com T4 DNA polimerase.	59
Figura 6 – Esquema indicando elementos do vetor de expressão pLATE	60
Figura 7 – Esquema da construção das proteínas quiméricas a partir dos “subdomínios (β/α) ₄ ” das enzimas modelo	61
Figura 8 – Mapa de contatos entre metades com distância limite de 5Å dos PDB das enzimas modelo	63
Figura 9 – Número de contatos entre metades N-terminal e C-terminal dos resíduos das enzimas modelo presentes entre as posições 160 e 280	64
Figura 10 – Esquema da região “entre metades” de bglA mostrando os resíduos da estrutura secundária, e sua estrutura terciária	65
Figura 11 – Esquema da região “entre metades” de bglB mostrando os resíduos da estrutura secundária, e sua estrutura terciária	65
Figura 12 – Esquema da região “entre metades” de bglThm mostrando os resíduos da estrutura secundária, e sua estrutura terciária	66
Figura 13 – Representação esquemática das proteínas quiméricas com cada um dos seus “subdomínios (β/α) ₄ ”	67
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR a partir da construção PUC dos insertos que codificam as proteínas quiméricas amplificadas	68
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR a partir da construção pLATE dos insertos que codificam as proteínas quiméricas amplificadas	70
Figura 16 – Análise por SDS-PAGE da produção das enzimas selvagens em NovaBlue(DE3) e BL21(DE3).....	72

Figura 17 – Eletroforese em SDS-PAGE das enzimas recombinantes selvagens em NovaBlue(DE3)	73
Figura 18 – Espectros de fluorescência intrínseca dos triptofanos das fases da cromatografia de “desalting” das proteínas recombinantes purificadas	75
Figura 19 – Eletroforese SDS-PAGE de amostras da lise celular e purificação ..	77
Figura 20 – Ensaio de atividade enzimática das proteínas quiméricas recombinantes	78
Figura 21 – Análise por SDS-PAGE de amostras das bactérias NovaBlue(DE3) expressando a quimera N _{bglA} – C _{bglB}	79
Figura 22 – Análise por SDS-PAGE de amostras das bactérias “ArticsExpress”(DE3) expressando as quimeras recombinantes solúveis	81
Figura 23 – Purificação das proteínas quiméricas N _{bglA} –C _{bglThm} por cromatografia de troca iônica em sistema FPLC.....	84
Figura 24 – Análise por SDS-PAGE de amostras das frações da quimera N _{bglA} –C _{bglThm} com maior atividade enzimática eluídas da cromatografia de troca iônica FPLC	84
Figura 25 – Espectro de fluorescência intrínseca dos triptofanos de amostras de diferentes representando as fases do “desalting”.....	85
Figura 26 – Análise por SDS-PAGE de amostras de purificação da Quimera N _{bglA} – C _{bglThm} expressas em bactéria NovaBlue(DE3).....	86
Figura 27 – Modelo do folding barril (β/α) ₈ encontrado no clã GH A	88
Figura 28 – Classificação da estrutura proteica β -glicosidases domínio único....	89
Figura 29 – Esquema da hipótese de que as proteínas (β/α) ₈ barril são formadas por dois “subdomínios (β/α) ₄ ”	92
Figura 30 – Espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos de bglA na ausência e presença de acrilamida	97
Figura 31 – Espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos de bglB na ausência e presença de acrilamida	98
Figura 32 – Espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos de bglThm na ausência e presença de acrilamida	99
Figura 33 – Espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos da quimera N _{bglA} – C _{bglThm} na ausência e presença de acrilamida	100
Figura 34 – Espectros de dicroísmo circular em função do comprimento de onda coletados a 20°C	102

Figura 35 – Espectros de dicroísmo circular em função do comprimento de onda coletados em espectropolarímetro J-815 das β -glicosidases selvagens recombinantes.....	104
Figura 36 – Predições das estruturas secundárias (à esquerda) a partir dos espectros de dicroísmo circular coletados a 25 °C em função do comprimento de onda	104
Figura 37 – Cinética de inativação térmica de bglA de <i>P. polymyxa</i>	120
Figura 38 – Cinética de inativação térmica de bglB de <i>P. polymyxa</i>	120
Figura 39 – Cinética de inativação térmica de bglThm de <i>T. maritima</i>	121
Figura 40 – Cinética de inativação térmica da quimera N _{bglA} – C _{bglThm}	122
Figura 41 – Esquema da curva de desnaturação térmica	125
Figura 42 – Plotes em fluorescência <i>versus</i> temperatura em experimentos de DSF das enzimas selvagens e quimérica.....	126
Figura 43 – Perfil de desnaturação térmica das β -glicosidases selvagens recombinantes acompanhada por espectros de dicroísmo circular sob um gradiente de temperatura	130
Figura 44 – Valores de T_m das β -glicosidases selvagens recombinantes acompanhada por CD e DSF	131
Figura 45 – Conversão espontânea de ureia em amônia.....	132
Figura 46 – Comprimento de onda de emissão máxima em diferentes concentrações de ureia incubados com enzima bglA por 2 e 24 horas.....	133
Figura 47 – Perfil de desnaturação da bglA em função de ureia.....	135
Figura 48 – Perfil de desnaturação da bglB em função de ureia.....	136
Figura 49 – Perfil de desnaturação da bglThm em função de ureia	137
Figura 50 – Espectros de emissão de fluorescência intrínseca da enzima bglA na ausência e na presença do desnaturante ureia.....	138
Figura 51 – Esquema da curva de desnaturação química com o desnaturante ureia	140
Figura 52 – Perfil de desnaturação da bglA em função de ureia	141
Figura 53 – Espectro de absorção UV de amostra de GndCIH a 6 mol·L ⁻¹	144
Figura 54 – Perfil de desnaturação da bglA em função da concentração de GndCIH	146

Figura 55 – Perfil de desnaturação da bgIB em função da concentração de GndClH	147
Figura 56 – Perfil de desnaturação da bgIThm em função da concentração de GndClH	148
Figura 57 – Perfil de desnaturação química em função da concentração de GndClH	151
Figura 58 – Esquema da reação de hidrólise de uma ligação glicosídica catalisada por uma glicosídeo-hidrolase retentora	156
Figura 59 – Esquema representando os subsítios do sítio ativo de uma β -glicosidase	157
Figura 60 – Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenolato	160
Figura 61 – Ensaio enzimático <i>p</i> NP β -Gluco das amostras das proteínas recombinantes purificadas em tampão CP6.....	163
Figura 62 – Ensaio enzimático <i>p</i> NP β -Fuco das amostras das proteínas recombinantes purificadas em tampão CP6.....	163
Figura 63 – Ensaio enzimático <i>p</i> NP β -Gal das amostras das proteínas recombinantes purificadas em tampão CP6.....	164
Figura 64 – Plote da atividade enzimática relativa <i>versus</i> pH	166
Figura 65 – Estrutura primária e terciária da β -glucosidase quimera N _{bgIA} -C _{bgIThm}	168
Figura 66 – Perfil cinético das β -glucosidases recombinantes em função da concentração de substrato <i>p</i> NP β -Gluco.....	170
Figura 67 – Perfil cinético das β -glucosidases recombinantes em função da concentração de substrato <i>p</i> NP β -Fuco	171
Figura 68 – Perfil cinético das β -glucosidases recombinantes em função da concentração de substrato <i>p</i> NP β -Gal	172
Figura 69 – Valores de k_{cat}/K_m relativo das enzimas selvagens e quimérica	175

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Programa do Termociclador.....	52
Tabela 2 – Características dos iniciadores	57
Tabela 3 – Parâmetros de K_{SV} para as β -glicosidases selvagens e quimérica	101
Tabela 4 – Estrutura secundária predita por $\Delta\epsilon$ no software online “K2D3”	103
Tabela 5 – Parâmetros de cinética de inativação térmica acompanhada pela atividade residual para as β -glicosidases selvagens e quimérica	123
Tabela 6 – Parâmetros de cinética de inativação térmica por DSF para as β -glicosidases selvagens e quimérica	127
Tabela 7 – Valores das constantes que descrevem a desnaturação das β -glicosidases recombinantes por temperatura	129
Tabela 8 – Temperatura de desnaturação (T_m) calculada a partir dos espectros de dicroísmo circular	130
Tabela 9 – Valores das constantes que descrevem a desnaturação química de bglA e bglB por ureia	142
Tabela 10 – Valores das constantes que descrevem a desnaturação química de bglA, bglB e bglThm por cloreto de guanidina.....	150
Tabela 11 – Concentrações finais dos substratos utilizados para a caracterização cinética das enzimas recombinantes.....	161
Tabela 12 – Atividade enzimática das enzimas selvagens bglA e bglThm e da quimera	165
Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para hidrólise dos substratos $pNP\beta$ -Gluco, $pNP\beta$ -Fuco e $pNP\beta$ -Gal pelas β -glicosidases selvagens e quimérica.....	173

Introdução Geral

Nos seres vivos, uma enorme série de reações químicas ocorre constantemente, sem as quais, não haveria vida. Estas reações são catalisadas por enzimas, que formam, modificam ou quebram ligações covalentes dos substratos gerando produtos diferentes. Enfim, as enzimas permitem aos organismos canalizar o fluxo de matéria com alta velocidade, em relação às reações “não-biológicas”, garantindo sua sobrevivência. (Wolfenden e Snider, 2001).

Enzimas apresentam uma vasta diversidade estrutural e funcional, muitas tendo evoluído para funcionar tão eficientemente quanto fisicamente possível, apresentando k_{cat}/K_m próximo à taxa de encontro com o substrato ($\sim 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (Wolfenden e Snider, 2001). Tal eficiência catalítica está relacionada à capacidade das enzimas ligarem e estabilizarem o estado de transição da reação química, propriedade, portanto, ligada à forma ou estrutura das enzimas.

Enzimas são proteínas estruturalmente formadas, de modo simplificado e sucinto, por aminoácidos unidos em sequência por ligações peptídicas formando uma cadeia polipeptídica, chamada de estrutura primária, que se dobra em estruturas secundárias estabilizadas por interações não-covalentes, que por sua vez, adota uma estrutura tridimensional específica, denominada estrutura terciária. Duas ou mais destas cadeias polipeptídicas podem se unir também por interações não-covalentes para formar a estrutura quaternária de uma proteína (Branden e Tooze, 1991). Também relacionado à estrutura proteica estão os conceitos de motivo e domínio. Motivo é um conjunto de elementos de estrutura secundária adjacentes que interagem e formam um arranjo relativo definido frequentemente encontrado em

diferentes proteínas. Assim, motivo seria um nível de organização entre a estrutura secundária e a terciária. Diversos motivos combinados formam uma estrutura compacta, chamada de domínio. Domínio é definido como uma cadeia polipeptídica, ou parte dela, que pode se dobrar em uma estrutura terciária estável. Domínio é também definido como uma unidade funcional. Por fim, uma proteína pode conter um ou mais domínios (Branden e Tooze, 1991). Nota-se que o conceito de domínio em certos momentos se sobrepõe ao conceito de estrutura terciária e até mesmo incorpora a função da proteína.

A estrutura “TIM barrel” ou $(\beta/\alpha)_8$ barril, abordada nesta tese, tem sido amplamente encontrada em enzimas na natureza e tem sido usada para o *design* computacional de enzimas e a construção de proteínas quiméricas. Dos cerca de 200 resíduos necessários no mínimo para formar completamente um “TIM barrel”, cerca de 160 são considerados estruturalmente equivalentes entre diferentes proteínas que compartilham esta estrutura, como por exemplo no clã GHA. Já os resíduos restantes, menos conservados, estão localizados nas regiões de *loop* que ligam as α -hélices e as fitas β (Höcker, *et al.*, 2004).

De fato, os modelos para evolução das proteínas $(\beta/\alpha)_8$ barril sugerem que este dobramento teria se originado a partir da duplicação gênica e fusão de dois “módulos” $(\beta/\alpha)_4$, ou seja, “meio-barris” (Lang *et al.*, 2000; Henn-Sax *et al.*, 2002; Höcker *et al.*, 2004). Nesta linha de estudo a determinação das estruturas cristalográficas de duas enzimas que catalisam reações sucessivas na biossíntese da histidina (HisA e HisF) revelou estruturas barris $(\beta/\alpha)_8$ com dois subdomínios que se sobrepõem, ou seja, o barril $(\beta/\alpha)_8$ pode ser esquematicamente dividido na metade N-terminal e C-terminal, ambos com quatro unidades (β/α) .

Estes dados sugeriram que HisA e HisF teriam evoluído a partir de um ancestral comum composto por um “meio-barril” (Lang *et al.*, 2000). Estudos posteriores sugeriram que embora as duas metades de HisF (HisF-N e HisF-C) fossem estáveis e estivessem enoveladas, elas eram cataliticamente inativas. A coexpressão em bactéria ou a renaturação conjunta de HisF-N e HisF-C resultou num complexo estequiométrico e com atividade catalítica. Estes dados suportam o modelo de que o barril $(\beta/\alpha)_8$ de HisF evoluiu a partir de um meio-barril $(\beta/\alpha)_4$ ancestral (Höcker *et al.*, 2001). Posteriormente, baseado neste modelo e tentando reconstruir a evolução do barril $(\beta/\alpha)_8$ a partir do barril $(\beta/\alpha)_4$, foram gerados barris $(\beta/\alpha)_8$ quiméricos, nos quais a metade N-terminal de HisA foi ligada na metade C-terminal de HisF e *vice versa* (Höcker *et al.*, 2004).

Em 2012 foi desenvolvido um método para identificação de domínios que se baseia na estabilidade termodinâmica relativa de segmentos proteicos *in situ* e incisados (Porter e Rose, 2012). Nesta definição termodinâmica, domínio é um segmento contíguo de uma proteína que possui a mesma estabilidade, avaliada pelo $\Delta\Delta G$ da transferência de água para ureia, quando se encontra isolado ou no interior de sua estrutura, contendo assim todas as interações necessárias para que se dobre independente e estavelmente.

Interessantemente quando aplicado para Triosefosfato Isomerase humana (TIM), uma proteína que adota um dobramento $(\beta/\alpha)_8$ barril, este método localizou 2 domínios que correspondem às metades N e C-terminais (Porter e Rose, 2012). Este resultado contrasta com a visão que assume o $(\beta/\alpha)_8$ barril como um domínio único, como por exemplo ilustrado em Branden e Tooze (1991).

Portanto, com base no critério de estabilidade termodinâmica, o $(\beta/\alpha)_8$ barril seria composto por dois “meio barris”, o que é convergente com o perspectiva evolutiva relatada acima.

Logo em seguida a análise da estrutura de β -glicosidases GH1, que são $(\beta/\alpha)_8$ barris, por um método de localização de domínios baseado em princípios distintos, também revelou a presença de 2 domínios que coincidem com as metades N e C-terminais (Smith *et al.*, 2013). Neste segundo método a estrutura proteica com seus contatos internos é representada como uma rede, sendo evidenciados os conjuntos de resíduos que mantêm preponderantemente interações entre si e assim podem ser isolados dos demais rompendo o menor número possível de contatos entre conjuntos. Por uma via distinta, neste segundo caso, a definição de domínios como subconjuntos de uma rede acaba resultando em porções de uma proteína com potencial para dobramento independente e estável, também como definido no método de Poter e Rose (2012). É importante notar que embora no segundo método os resíduos de um mesmo domínio (subconjunto de uma rede) não sejam obrigatoriamente contíguos, a análise da estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril mostrou ser composto por 2 segmentos contíguos, ou “meio-barris” como no primeiro método, que é exclusivo para domínios formados por segmentos contínuos.

A convergência de resultados entre estes dois métodos junto à convergência com a perspectiva evolutiva reforça a hipótese de que $(\beta/\alpha)_8$ barris seriam formados por 2 domínios $(\beta/\alpha)_4$. Adotando uma posição conservadora, compatível com o teste de uma hipótese, ao longo da tese nos referimos aos domínios $(\beta/\alpha)_4$ como subdomínios.

Deste modo, considerando então que as metades N-terminal e C-terminal das proteínas $(\beta/\alpha)_8$ barril sejam consideravelmente estáveis e independentes, o objetivo geral desta tese foi avaliar como as propriedades individuais destes “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ” se combinam e definem a estabilidade e atividade catalítica das β -glicosidases GH1, que possuem estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril. As β -glicosidases bglA de *Thermotoga maritima* (uma bactéria termófila; Zechel *et al.*, 2003), bglA e bglB de *Paenibacillus polymyxa* (uma bactéria mesófila; Sanz-Aparício *et al.*, 1998 e Isorna *et al.*, 2007) e proteínas quiméricas originadas da combinação dos “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ” entre duas destas β -glicosidases (NbglThm-CbglB, NbglB-CbglThm, NbglThm-CbglA, NbglA-CbglThm, NbglA-CbglB e NbglB-CbglA) foram os modelos experimentais.

Abordar o problema de como as propriedades individuais de cada subdomínio se combinam gerando as propriedades “globais” de uma proteína pode ampliar o conhecimento sobre a relação estrutura-função em proteínas e contribuir para o “*design*” de novas enzimas otimizadas.

Para fins de organização, esta tese foi dividida em capítulos relacionados com etapas distintas do trabalho. Deste modo, no **Capítulo 1** será discutido o planejamento e construção das β -glicosidases quiméricas e também a produção como proteínas recombinantes e purificação das enzimas selvagens e quiméricas. No **Capítulo 2** será analisado se as enzimas recombinantes purificadas estão corretamente enoveladas. No **Capítulo 3** será feita uma análise da estabilidade térmica e química das enzimas recombinantes e a contribuição para estas propriedades de cada “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” presente na enzima quimérica. Por fim, no **Capítulo 4** será analisada a contribuição de cada “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” para as propriedades catalíticas da β -glicosidase quimérica.

CAPÍTULO 1

β -glicosidases GH1 quiméricas

1. Introdução

1.1- β -glicosidases da família GH1

A nomenclatura enzimática proposta pela *Enzyme Commission* da IUBMB para as glicosídeo-hidrolases baseia-se na especificidade do seu substrato e, ocasionalmente, no seu mecanismo molecular. Neste contexto, β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas agindo no resíduo β -D-glucosídico da extremidade não-redutora do substrato e liberando D-glicose (Cairns e Esen, 2010; Lombard *et al.*, 2014). Elas estão presentes tanto em Bactérias, Archaea e Eucariotos, desempenhando diversas funções (Singh *et al.*, 2016). No entanto, apesar dessa variedade de funções, as β -glicosidases pertencentes a família GH1 são bastante conservadas, exibindo semelhança na estrutura espacial com enovelamento do tipo $(\beta/\alpha)_8$ barril, um mecanismo do tipo retentor da configuração do carbono anomérico do substrato com a presença de resíduos catalíticos conservados, dois ácidos glutâmicos que desempenham papel de nucleófilo e de ácido/base (Marana, 2006).

A maior família das glicosídeo-hidrolases (GH1), que é o grupo de enzimas sobre o qual esta tese se baseia, têm sido o principal foco de muitas pesquisas recentes devido as suas funções nos sistemas biológicos, e também devido a interesses na aplicação dessas enzimas em processos biotecnológicos (Henrissat *et al.*, 2005, Cairns e Esen, 2010), pois são estáveis, amplamente encontradas na natureza, e com grande número delas produzidas como proteínas recombinantes (Faije e Planas, 2007; Murata e Usui, 2006).

1.2- β -glucosidases como modelo experimental

As enzimas modelo utilizadas nesta tese foram três β -glucosidases da família GH1, sendo duas da bactéria *Paenibacillus polymyxa*: bglA (P22073; 1bga) e bglB (P22505; 209p) e uma β -glucosidase da bactéria hipertermófila *Thermotoga maritima* bglThm (Q08638; 1oin). Pode-se ver o alinhamento entre as três β -glucosidases na Figura 1. As β -glucosidases bglA e bglB possuem 448 aminoácidos em sua forma madura, enquanto que bglThm possui 446 aminoácidos. Estas enzimas adotam um dobramento do tipo $(\beta/\alpha)_8$ barril, conforme evidenciado em dezenas de estruturas cristalográficas já obtidas. O único sítio ativo destas enzimas já foi estudado quanto aos resíduos essenciais à catálise e à ligação do substrato (Coutinho e Henrissat, 1999; Marana, 2006; Cairns e Esen, 2010; Mendonça e Marana, 2011).

Figura 1: Alinhamento estrutural entre bglA e bglB de *Paenibacillus polymyxa* e bglThm de *Thermotoga maritima*. Os aminoácidos estão marcados em vermelho se formam α -hélices e em azul se formarem folhas β . Fonte: PROMALS3D alignment.

1.3- *Paenibacillus polymyxa*

P. polymyxa é uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete, anaeróbia facultativa que vive na rizosfera, microambiente que circunda a raiz, e forma nódulos (endósporos) nos pelos das raízes tanto no solo quanto nos sedimentos marinhos. Possui relação simbiótica com a planta hospedeira aumentando a absorção de nutrientes pelas plantas por fixar nitrogênio e solubilizar fósforo além de diminuir a sua susceptibilidade a patógenos. Também pode ajudar as plantas dando maior resistência ao dessecamento e melhorar a porosidade do solo. *Paenibacillus* (Figura 2) foi originalmente classificado no gênero *Bacillus* até que se tornou seu próprio gênero em 1993 (Ash *et al.*, 1993)

Figura 2: Bactéria mesófila *Paenibacillus polymyxa*.

Esta bactéria degrada substratos celulósicos e para tal codifica duas beta-glicosidases GH1 homólogas, bglA e bglB, que apresentam diferenças nas especificidades de substrato e estruturas quaternárias. bglA é um octâmero de cerca de 400 kDa, enquanto que bglB é um monômero de cerca de 51 kDa. As sequências primárias de ambas as proteínas têm 448 resíduos e alta identidade (45%), além de

estrutura muito semelhante (RMSD = 0.84 Å considerando os C α de 438 resíduos) e já tiveram sua especificidade pelo substrato caracterizadas (González-Candela *et al.*, 1989; Isorna *et al.*, 2007), sendo que bglA inativa-se em 20 min quando mantida a 48°C e é altamente específica contra a celobiose, especificidade auxiliada pela oligomeração (Lopes-Camacho *et al.*, 1996; Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

1.4- *Thermotoga maritima*

T. maritima é uma bactéria Gram-negativa fermentativa anaeróbia em forma de bastonete que vive em sedimentos marinhos perto de fontes termais ao longo da costa de Vulcano (Itália). É capaz de crescer em águas de 55 a 90°C, sendo o ideal uma temperatura da água de 80°C. Esta é a única bactéria resistente a temperaturas tão altas, pois os organismos conhecidos por viverem em ambientes tão extremos são os membros do domínio Archaea, dos quais compartilha 24% de seu genoma. As características hipertermofílicas de *T. marítima* (Figura 3), juntamente com sua origem precoce na evolução, sugerem que é potencialmente um organismo muito antigo na evolução. Esta bactéria degrada substratos celulósicos, açúcares e polímeros, e produz dióxido de carbono e gás hidrogênio como subprodutos da fermentação anaeróbia (Huber *et al.*, 1986).

Figura 3: Bactéria termófila *Thermotoga maritima*.

Também codifica uma β -glicosidase GH1, a BglA, que nomearemos de bglThm para explanação nesta tese. Especificamente a bglThm foi intensamente estudada quanto à relação de sua estrutura com a afinidade por inibidores e também se mostrou estável por até 4 h a 80°C (Zechel *et al.*, 2003).

2. Material e Métodos

2.1 – Produção das β -glicosidases selvagens e quiméricas

2.1.1 - Manutenção e cultivo de bactérias

Para a preparação das construções plasmidiais foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* cepa XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lacF'* [*proA⁺B⁺ lacq lacZ Δ M15 Tn10(Tetr)*]).

Para a indução da expressão da proteína recombinante foram utilizadas colônias de três cepas da bactéria *Escherichia coli* previamente disponíveis no laboratório, sendo elas: cepa BL21-gold DE3 [F⁻ *ompT hsdS* (rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA Hte*]; cepa Nova Blue(DE3) [*endA1 hsdR17*(rK12⁻ mK12⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* (DE3) F'*[proA⁺ B⁺ lacI^q ZZΔM15::Tn10]* (Tet^R)], (Novagen®) e cepa *ArcticExpress* (DE3) B F⁻[*ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tet^R gal λ (DE3) *endA Hte* [*cpn10 cpn60 Gent^R*]] (Agilent Technologies®). O genótipo de cada um destes organismos, as condições de crescimento, seleção e aplicações podem ser encontrados nos manuais fornecidos pela Stratagene™ Agilent Technologies.

As culturas das bactérias *E. coli* foram mantidas em meio LB (Luria-Bertani) [triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v) pH 7,5] previamente autoclavado (Autoclave vertical AV-18) contendo glicerol 20% (v/v) a -80°C. Alíquotas deste estoque bacteriano foram semeadas em placas de meio LB-ágar [triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v) e ágar 1,5% (m/v) pH 7,5] sem antibiótico e então incubadas a 37°C, por 16 h.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 4 mL de meio LB líquido com antibiótico. Esta suspensão de células foi incubada a 37°C, por 16 h a 160 rpm (Incubator INNOVA 44R). Uma fração desta cultura foi utilizada para obtenção de bactérias competentes.

2.1.2 - Preparo de bactérias competentes para transformação por CaCl₂

Cerca de 2 mL do pré-inóculo com o antibiótico tetraciclina (15 µg·mL⁻¹) ou gentamicina (10 µg·mL⁻¹), como descrito no item anterior, foram transferidos para 400 mL de meio LB líquido previamente autoclavado em erlenmeyer de 2 L. As

células retornaram ao “*shaker*” (Incubator INNOVA 44R) e ficaram crescendo por 2 a 3 h a 160 rpm até atingir uma DO_{600nm} de 0,5.

As células bacterianas foram transferidas para tubos de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação a 4.000 rpm, por 10 min a 4°C (HETTICH rotina 35R). O sedimento proveniente da centrifugação foi ressuspensão, e incubado em gelo por 1 h, em 40 mL de $CaCl_2$ 0,1 mol·L⁻¹ estéril gelado na proporção de 20 mL de solução para quantidade de células correspondente a 50 mL de cultura. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. As bactérias foram então ressuspensas em 1 mL de $CaCl_2$ 0,1 mol·L⁻¹ previamente resfriado para uso imediato e também armazenadas em estoque congelado para uso posterior (item 2.1.6).

2.1.3 - Transformação de *Escherichia coli* Nova Blue(DE3) e “*ArcticExpress*” competentes por choque térmico

Para preparação do estoque de plasmídeos aproximadamente 1,5 µg de DNA plasmidial contendo os insertos das proteínas quiméricas (GenScript® USA INC) foi separadamente adicionada a 100 µL de bactérias *E. coli* XL1-blue competentes (preparadas segundo o item anterior).

Aproximadamente 0,1 µg de DNA plasmidial em 1 µL da solução previamente produzida foi separadamente adicionada a 200 µL de bactérias *E. coli* competentes e a mistura foi mantida em gelo por 30 min.

As células foram então submetidas a um choque térmico a 42°C em banho-maria por 45 s para a cepa NovaBlue(DE3) e por 20 s para a cepa “*ArcticExpress*” sendo imediatamente incubadas em gelo por 3 min. Em seguida, foram adicionados

ao micro tubo contendo as células 500 μL de meio LB previamente autoclavado para NovaBlue(DE3) e 900 μL para “*ArcticExpress*”, e a suspensão bacteriana foi incubada a 37°C por 1 h sob agitação constante de 200 rpm (Incubator INNOVA 44R) para recuperação das bactérias. Este material foi então semeado, 100 μL por placa, em placas de LB-ágar contendo antibiótico ampicilina 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (acrescido de gentamicina 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para manutenção da cepa “*ArcticExpress*”). As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica (Incubator MEMMERT BE 400) a 37°C por um período de 18 h, obtendo dessa forma colônias isoladas com expressão das proteínas envolvidas na resistência ao antibiótico de seleção.

Colônias transformantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e incubadas a 200 rpm, 37°C, por 16 h (Incubator INNOVA 44R). Essa suspensão de células foi utilizada para indução com IPTG, como descrito adiante.

2.1.4 - Produção de proteínas recombinantes em bactérias Nova-Blue(DE3)

A indução da expressão das enzimas selvagens e das quimeras foi feita em células *E. coli* Nova Blue(DE3). Iniciou-se com a preparação do pré-inóculo em duplicata, adicionando 5 mL de meio LB autoclavado com ampicilina 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tubo de polipropileno estéril com uma colônia previamente transformada com o vetor de expressão codificando a enzima de interesse. Este pré-inóculo foi, então, incubado a 37°C por 18 h a 200 rpm (Incubator INNOVA 44R). Após este período o pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de LB com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina, em erlenmeyer de 2 L autoclavado, voltando a ser incubado nas mesmas condições até o crescimento bacteriano do cultivo atingir a densidade óptica que foi medida através da absorbância a 600 nm (Ultrospec 2100 pro - Amerchan Bioscience). Ao atingir

cerca de 10^8 células bacterianas viáveis por mL, com valores de DO_{600nm} entre 0,3 e 0,4 contra água destilada, foi retirada uma alíquota de 50 μ L da cultura bacteriana representante do material não induzido e posteriormente armazenada em microtubo de 1,5 mL a -20°C . Adicionou-se ao meio o indutor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) até atingir a concentração final de $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, a partir de solução estoque de $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ esterilizada por filtração em filtros Millex® 0,22 μ m (Millipore Syringe Filter Units). As células foram incubadas a 20°C por 16 h a 36 h a 200 rpm (Incubator INNOVA 44R). Terminado este período de indução da expressão da proteína recombinante, retirou-se uma segunda alíquota de 50 μ L representante do material induzido, também armazenada a -20°C e as células foram sedimentadas por centrifugação a 4°C por 30 min a $7.000 \times g$ (HETTICH rotina 35R). O sobrenadante contendo o meio de cultivo foi descartado e o sedimento contendo as células foi armazenado a -20°C em tubo de polipropileno para posterior tratamento. As alíquotas de material induzido e não induzido foram utilizadas em um teste eletroforético SDS-PAGE a fim de verificar se houve produção da proteína recombinante.

2.1.5 - Produção de proteínas recombinantes em bactérias *ArcticExpress* (DE3)

A indução da expressão das enzimas quiméricas foi feita em células *E. coli* “*ArcticExpress*” (DE3). Iniciou-se com a preparação do pré-inóculo em duplicata, adicionando 5 mL de meio LB autoclavado com ampicilina $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e gentamicina $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tubo de polipropileno estéril com uma colônia previamente transformada com o vetor de expressão codificando a enzima quimérica. Este pré-inóculo foi, então, incubado a 37°C por 18 h a 220 rpm (Incubator INNOVA 44R). Após este período o pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de LB com $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de

gentamicina, em erlenmeyer de 2 L autoclavado, voltando a ser incubado a 30°C por 3 h a 220 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado até atingir DO_{590nm} entre 0,3 e 0,4 (Ultrospec 2100 pro - Amerchan Bioscience) contra água destilada. Ao atingir valores neste intervalo foi retirada uma alíquota de 50 μ L da cultura bacteriana representante do material não induzido e posteriormente armazenada em microtubo de 1,5 mL a -20°C. Adicionou-se ao meio o indutor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) até atingir a concentração final de 1,0 $mmol \cdot L^{-1}$, a partir de solução estoque de 0,2 $mol \cdot L^{-1}$ esterilizada por filtração em filtros Millex 0,22 μ m. As células foram incubadas a 12°C por 24 h a 220 rpm. Terminado este período de indução da expressão da proteína recombinante, retirou-se uma segunda alíquota de 50 μ L representante do material induzido, também armazenada a -20°C e as células foram sedimentadas por centrifugação a 4°C por 30 min a 7.000 xg. O sobrenadante contendo o meio de cultivo foi descartado e o sedimento contendo as células foi armazenado a -20°C em tubo de polipropileno para posterior tratamento.

As alíquotas de material induzido e não induzido foram utilizadas em um teste eletroforético SDS-PAGE a fim de verificar se houve produção da proteína recombinante.

2.1.6 – Estoque de bactéria em glicerol a -80°C

Adicionou-se 200 μ L de glicerol-LB 30% autoclavado (concentração final de 15% v/v) a 200 μ L de cultura de bactérias em LB líquido, em microtubo de 1,5 mL estéril identificado, obtendo o volume final de 0,4 mL. Depois de homogeneizadas as alíquotas foram congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas no freezer -80°C.

2.2- Purificação das β -glicosidases recombinantes selvagens e quiméricas

As β -glicosidases selvagens superexpressas em *E. coli* NovaBlue(DE3) foram purificadas usando cromatografia de afinidade com resina Ni^{+2} -NTA agarose (QIAGEN), sendo submetidas posteriormente a “*desalting*” em coluna PD MiniTrap™ G-25 (GE Healthcare Life Sciences) com tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.

Já as β -glicosidases quiméricas superexpressas em *E. coli* NovaBlue(DE3) e em “*ArcticExpress*” (DE3) foram filtradas a $0,22 \mu\text{m}$ em “*Millex® Syringe filter*” (Merck Millipore) e purificadas com uma combinação de etapas. Inicialmente uma cromatografia de troca iônica em FPLC™ System (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTApure (GE Healthcare Life Sciences). A seguir as frações com maior atividade enzimática foram reunidas em um “*pool*” submetido ao “*fast-desalting*” para a troca de tampão, sendo posteriormente submetidas à cromatografia de afinidade com resina Ni^{+2} -NTA agarose (QIAGEN), e posteriormente uma cromatografia de “*desalting*” em coluna PD MiniTrap™ G-25 (GE Healthcare Life Sciences) com tampão citrato-fosfato (CP) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.

Todos os tampões utilizados foram preparados com água Milli-Q®, filtrados em “*Millex® Disc filter*” $0,45 \mu\text{m}$ (Merck Millipore) e desareados com auxílio de bomba de vácuo.

2.2.1 – Lise das bactérias Nova Blue(DE3) induzidas

Para lise as bactérias induzidas contendo as proteínas selvagens e quiméricas recombinantes o “*pellet*” congelado (sedimento da indução) foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise [fosfato de sódio $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4

com NaCl 0,5 mol·L⁻¹ e imidazol 20 mmol·L⁻¹], na proporção de 1,0 mL de tampão de lise para cada 16,7 mL de cultivo antes da centrifugação.

Após esse período homogenizou-se o precipitado e as células ressuspensas passaram por cinco ciclos de sonicação a 5°C, sendo cada ciclo composto por um pulso de 15 s a 10% de potência no sonicador *Branson Sonifier 250* (Sonitech) com *microtip* (nas condições: *Constant cycle, time: hold e output: 3,5*), seguido de banho de gelo por 2 min. Para remover os restos celulares, a amostra sonicada foi distribuída equitativamente em tubos de polipropileno e centrifugada a 14000 rpm (7000 *xg*), 4°C por 30 min, sendo o sedimento descartado e o sobrenadante contendo a enzima coletado em tubo de polipropileno. O sobrenadante foi armazenado a 5°C quando necessário para posterior purificação da proteína recombinante, tomando o cuidado de não o congelar, para não inativar a enzima.

O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de tampão de lise e uma alíquota de 5 µL desse material e do material solúvel (sobrenadante recolhido) foram misturadas com 15 µL de tampão de amostra de SDS-PAGE para serem posteriormente analisadas.

2.2.2 - Cromatografia de troca iônica FPLC™ system ÄKTApure

O sobrenadante do lisado das β-glicosidases quiméricas foi filtrado a 0,22 µm em “Millex® Syringe filter” (Merck- Millipore) e submetido à cromatografia de troca iônica em FPLC™ system ÄKTApure (GE Healthcare Life Sciences).

Cerca de 3 mL das amostras foram injetadas em coluna Source 15Q (Resource™ Q, GE Healthcare Life Sciences) sob fluxo de 0,5 mL a 1,0 mL/min. Previamente a coluna foi lavada com 5 volumes de água destilada e a seguir

equilibrada com 5 a 10 volumes de tampão de lavagem [HEPES 20 mmol·L⁻¹ pH 7]. As proteínas que não ficaram retidas pela coluna foram lavadas com 9 mL de tampão de lavagem. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 0 a 100% de sal em 20 mL de tampão [HEPES 20 mmol·L⁻¹ pH 7 com NaCl 1 mol·L⁻¹], seguido de 5 mL de eluição exclusiva com este tampão.

Durante todo o processo cromatográfico foram coletadas, em placas *Deepwell™* 96, 0,5 mL de amostra em 68 a 70 frações, logo armazenadas a 5°C em banho de gelo e posteriormente em geladeira, até serem utilizadas para a detecção da proteína recombinante. Todos os tampões utilizados foram preparados com água Milli-Q® e filtrados a vácuo em filtros Millex 0,45 µm (Merk-Millipore).

2.2.3 - Cromatografia de afinidade com resina Ni⁺²-NTA agarose

Foi usada cromatografia de afinidade em resina de níquel-agarose, pois o vetor pLATE 51 codifica as β-glicosidades recombinantes como proteínas de fusão contendo uma “cauda de histidinas” (His₆-tagged) em seu N-terminal.

A resina Ni⁺²-NTA agarose (QIAGEN) dentro da “*Flex-columns®*” (KIMBLE - DWK Life Sciences) foi incubada a 4°C por 1 h com o sobrenadante do lisado na proporção de 1 mL do lisado para 200 µL de resina previamente equilibrada com 2,5 mL de tampão de lise [fosfato de sódio 20 mmol·L⁻¹ pH 7,4 com NaCl 0,5 mol·L⁻¹ e imidazol 20 mmol·L⁻¹], sob agitação de rotor vertical (Rocking Shaker, COLE PARMER) em baixa velocidade. Após isso, o “*flow through*” foi coletado para ser analisado por SDS-PAGE junto às outras etapas da purificação. A resina foi lavada por gravidade 10 vezes com 7 mL de tampão de lise, para retirar as proteínas que não ficaram retidas pela coluna. As proteínas recombinantes foram eluídas com 1,5 mL de tampão de eluição [fosfato de sódio 20 mmol·L⁻¹ pH 7,4 com NaCl 0,5 mol·L⁻¹

e imidazol $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. O tampão de eluição foi adicionado na coluna seguindo-se uma incubação por 10 min em gelo e então a coleta por gravidade do sobrenadante em tubo de polipropileno. Foram testadas três eluições com a mesma resina. Todos os tampões utilizados foram preparados com água Milli-Q® e filtrados a vácuo em filtros Millex $0,45 \mu\text{m}$ (Merk-Millipore).

2.2.4 - Cromatografia em coluna "*fast-desalting*" PD MiniTrap

As amostras eluídas da cromatografia de afinidade foram submetidas à cromatografia em coluna "*fast-desalting*" de 5 mL (PD MiniTrap™ G25 – GE Healthcare Life Sciences) equilibrada com tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0. Nas amostras de proteína para a coleta de espectros de dicroísmo circular foi usado tampão fosfato de potássio $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Já para as amostras eluídas da cromatografia de troca iônica e destinadas à cromatografia de afinidade foi usado tampão de lise [fosfato de sódio $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4 com NaCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e imidazol $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]. As cromatografias de "*desalting*" foram feitas seguindo as instruções do fabricante.

A pureza das enzimas recombinantes pode ser verificada através de um teste eletroforético SDS-PAGE (ver item 2.3).

2.2.5 - Detecção das β -glicosidases recombinantes após a cromatografia

Para a detecção das β -glicosidases recombinantes selvagens após cromatografia em coluna "*fast-desalting*" e das β -glicosidases recombinantes quiméricas após cromatografia de troca iônica em FPLC™ system foi realizado teste de atividade enzimática com substrato cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-

glucopiranosídeo ($pNP\beta$ -Gluco) $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparado em tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.

Para esse ensaio utilizou-se $50 \text{ }\mu\text{L}$ de substrato com $50 \text{ }\mu\text{L}$ das frações eluídas das cromatografias. As misturas de reação foram incubadas a 30°C por intervalos de tempo e em seguida a hidrólise do substrato foi interrompida com solução de carbonato de sódio $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 11. Neste procedimento o p -nitrofenolato (pNP) liberado durante a hidrólise do substrato é detectado por espectrofotometria utilizando-se o comprimento de onda 415 nm (Terra, 1979).

As frações da cromatografia de troca iônica com maior atividade foram reunidas em um “*pool*” submetido ao “*fast-desalting*”, segundo item 2.2.4, seguido de uma segunda cromatografia, mas agora de afinidade (ver item 2.2.3).

A pureza das enzimas recombinantes pode ser verificada através de um teste eletroforético SDS-PAGE.

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

As amostras foram diluídas com tampão de amostra [tris-HCl $120 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,8, SDS 5% (m/v), β -mercaptoetanol $1,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)] usando um volume igual ou superior ao da alíquota da amostra. Esta mistura foi então aquecida a 95°C por 5 min antes de aplicação na eletroforese.

Para o padrão de pesos moleculares foi preparada solução com 3 μL de padrão SDS-PAGE *Low Range* (BIO-RAD Laboratories) em 17 μL de tampão de amostra. Estas amostras foram desnaturadas a 5 min em banho seco (AccuBlock™ *digital dry bath*-LABNET) a 95°C antes de serem aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% contendo SDS 1% (m/v), preparado segundo Laemmli, 1970. A eletroforese foi feita em uma cuba (BIO-RAD Laboratories) preenchida com solução-tampão de corrida [TRIS 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, glicina 0,25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e SDS 0,1%], em corrente de 0,2 $\text{mA}\cdot\text{cm}^3$ de gel, sob uma voltagem constante de 160 V e em temperatura ambiente por 60 min. Para a visualização das proteínas, ao final da eletroforese os géis foram corados por 30 min com comassie blue R-250 0,1% (m/v), preparado em uma solução de etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), e depois foram descorado por 1 a 3 horas em solução de etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

Os pesos moleculares relativos foram estimados mediante comparação com a mobilidade das proteínas do padrão: lisozima (20,011 kDa); inibidor de tripsina (29,228 kDa); anidrase carbônica (37,554 kDa); ovalbumina (54,051 kDa); albumina sérica bovina (97,320 kDa) e fosforilase B (100,886 kDa).

2.4- Determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), acrescentando 1 mL do reagente de Bradford [10 mg de “*comassie brilliant blue*” G-250 dissolvido em 5 mL de metanol e 10 mL de ácido fosfórico 85%] a cada 100 μL de amostra e homogeneizando no agitador de tubos vórtex. A absorbância foi lida após 5 min a 595 nm (Ultrospec 2100 pro - Amerchan Bioscience). A concentração proteica foi obtida por comparação do valor de

absorbância da amostra com valores da curva padrão, feita a partir de solução de ovalbumina com concentração conhecida.

2.6- Determinação da concentração de proteínas pelo método de abs a 280 nm

A concentração de proteínas nos materiais contendo enzimas purificadas foi determinada através da absorbância a 280 nm. Primeiramente foi calculado o coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar (ϵ) para as enzimas selvagens e quiméricas através da ferramenta computacional *online* “*ProtParam tool*” (ExPASy) a partir da sequência de aminoácidos. Em seguida, alíquotas das amostras de enzimas foram misturadas com excesso de uma solução desnaturante [tampão fosfato de sódio 20 mmol·L⁻¹, pH 6,5 com cloreto de guanidina 6 mol·L⁻¹] na proporção 1:10 e foi mensurada a absorbância a 280 nm em espectrofotômetro de UV-visível (Ultrospec 2100 pro - Amershan Bioscience) utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

Finalmente a concentração foi estimada pela equação 2, um rearranjo da lei de Beer-Lambert, expressa pela equação 1, na qual A é a absorbância, ϵ é a absorvidade molar (coeficiente de extinção molar), b é o caminho óptico em cm, e c é a concentração do material na cubeta.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

$$\text{Concentração (mg/mL)} = \frac{0,5 \cdot A}{\epsilon} \cdot \frac{1}{0,05} \quad (2)$$

Considerando os seguintes coeficientes de extinção molar:

$$\text{bglA } P. \text{ polymyxa} = 2,266 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1};$$

$$\text{bglThm } T. \text{ maritima} = 2,352 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1};$$

$$\text{quimera N}_{\text{bglA}}\text{-C}_{\text{bglThm}} = 2,137 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2.7- Procedimentos para manipulação e análise de DNA

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

2.7.1 - Construção das proteínas recombinantes quiméricas

No planejamento destas quimeras, bglB e bglA foram usadas como “base” recebendo “subdomínios (β/α)₄” de bglThm, bglA ou bglB, gerando deste modo um par de quimeras, N_{bglA}-C_{bglB} e N_{bglB}-C_{bglA}, que combina “subdomínios” de proteínas semelhantes e outros dois pares, N_{bglThm}-C_{bglB} e N_{bglB}-C_{bglThm}; N_{bglThm}-C_{bglA} e N_{bglA}-C_{bglThm}, com combinação de “subdomínios” de enzimas ancestrais diferentes. As sequências de DNA que codificam estas proteínas quiméricas foram sintetizadas pela empresa GenScript® (USA) e clonadas no vetor PUC57.

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

Iniciou-se com a preparação do pré-inóculo em duplicata, adicionando 5 mL de meio LB autoclavado com ampicilina 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tubo de polipropileno estéril inoculado com uma colônia de *E. coli* XL1-Blue competente transformada com plasmídeo pUC57 contendo os insertos da proteína quimérica. Este pré-inóculo foi, então, incubado a 37°C por 18 h a 200 rpm (Incubator INNOVA 44R). Esta suspensão de células contendo colônias em fase exponencial foi utilizada para a extração e purificação do DNA plasmidial realizada seguindo o protocolo de

purificação do kit Wizard® *Plus SV Minipreps - DNA purification system* (Promega Corporation), sugerido pelo fabricante.

Basicamente as bactérias eram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹ pH 7,5, contendo EDTA 10 mmol·L⁻¹ e RNase A 100 µg·mL⁻¹. Em seguida realizava-se uma lise alcalina utilizando solução de NaOH 0,2 mol·L⁻¹ e SDS 1% (p/v) e neutralizando com acetato de potássio 1,32 mol·L⁻¹ pH 4,8. O sobrenadante da mistura centrifugada era aplicado em mini-coluna, lavada com tampão acetato de potássio 80 mmol·L⁻¹, EDTA 40 µmol·L⁻¹ e etanol 55% (v/v) para retirada do material não ligado. O rendimento e pureza dos plasmídeos purificados foram avaliados através de determinação da quantidade de DNA, feita pela medida de absorbância a 260 nm, descrito no item 2.6.

2.7.3 - PCR em termociclador

Para amplificação das sequências codificadoras das proteínas recombinantes quiméricas foram realizadas reações de PCR utilizando um termociclador “*Robocycler Gradient 96*” (Stratagene™ Agilent Technologies). Em um microtubo de plástico de 200 µL foi preparada a reação descrita abaixo que foi submetida ao programa do termociclador apresentado na Tabela 1.

- 5 µL de tampão 10x “*PfuUltra HFreaction buffer*” (Agilent Technologies)
- 1 µL da mistura de dNTP 10 mM
- 0,5 µL do iniciador “*sense*” 100 µM
- 0,5 µL do iniciador “*antisense*” 100 µM
- 1 µL de DNA (10-100 ng/µL)
- 1,0 µL da enzima “*PfuUltra HotStart DNA Polimerase*” (Agilent Technologies)
- 41 µL de H₂O (*q. s. p.* V_{final} 50 µL)

Tabela 1: Programa do Termociclador.

Etapas	Temperatura	Tempo (minuto)	Nº de ciclos
Desnaturação	95°C	2	1
Desnaturação	96 °C	0,5	20*
Anelamento dos Iniciadores	60 °C	0,5	
Extensão	72 °C	3	
Extensão Final	72 °C	10	1

*foram utilizados menos de 25 ciclos para diminuir a probabilidade de erros, seguindo o manual do “*aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2*” (N-terminal His-tag/EK).

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

2.7.4 - Eletroforese em gel de agarose

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

Para o padrão foi preparada uma mistura contendo 2 µL de tampão de amostra 6x “*Orange DNA Loading dye*” (Thermo Fisher Scientific Inc.), 5 µL de água deionizada e autoclavada e 5 µL de padrão de tamanho molecular “*O’Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*” 0,5 µg/µL (Fermentas®). O material amplificado a ser analisado foi

preparado com 1 μL de tampão de amostra 6x “*Orange DNA Loading dye*” (Thermo Fisher Scientific Inc.) e 49 μL do produto de PCR.

A eletroforese foi interrompida quando o corante percorreu aproximadamente 4/5 da distância entre o local de aplicação e o limite inferior do gel. Posteriormente, o DNA foi corado utilizando-se uma solução de brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$ por 10 min e visualizado a 312 nm em transluminador 2020E (Stratagene™ Agilent Technologies) e fotografado para análise e registro dos resultados.

Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR foram estimados mediante comparação com a mobilidade dos fragmentos de DNA conhecidos presentes no padrão.

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

Os produtos da amplificação por PCR dos insertos das proteínas quiméricas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para remover dNTPs não incorporados e *primers* em excesso. Após eletroforese, as bandas de interesse foram extraídas do gel de agarose e o fragmento de DNA linear proveniente do PCR foi recuperado e purificado usando o protocolo do kit “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System*” (Promega Corporation) seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram então estocados em 50 μL de água deionizada autoclavada a -20°C .

2.7.6 - Quantificação de DNA por espectrofotometria

As amostras contendo DNA foram quantificadas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences) utilizando-se cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. As medidas foram realizadas nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A amostra foi diluída em água (DNA plasmidial 1:250) para um volume final de 0,5 mL, utilizando somente água como branco. O valor de absorbância a 260 nm corresponde à quantidade de DNA na amostra e a razão 260/280 indica a sua pureza, sendo que valores próximos de 2,0 evidenciam maior pureza. A concentração da amostra foi calculada utilizando a equação 3:

$$[\text{DNA fita dupla}] \text{ (mg/mL)} = A_{260\text{nm}} \times 0,05 \times \text{diluição} \quad (3)$$

2.7.7 – Clonagem do DNA recombinante no vetor de expressão pLATE51

Conforme mencionado acima, foram construídos segmentos de DNA que codificam as enzimas quiméricas a partir da combinação dos “subdomínios (β/α)₄” C-terminal e N-terminal das enzimas modelo, a saber: N_{bgl}I_{Thm}-C_{bgl}I_B, N_{bgl}I_B-C_{bgl}I_{Thm}, N_{bgl}I_{Thm}-C_{bgl}I_A, N_{bgl}I_A-C_{bgl}I_{Thm}, N_{bgl}I_A-C_{bgl}I_B e N_{bgl}I_B-C_{bgl}I_A, os quais foram sintetizados pela empresa GenScript® e clonados no vetor PUC57 (Figura 4) .

Figura 4: Esquema do vetor PUC57 onde os segmentos de DNA que codificam as enzimas quiméricas foram clonados pela empresa GenScript®. Figura adaptada da *webpage* da empresa GenScript (www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html).

Posteriormente, já em nosso laboratório, os insertos que codificam as enzimas quiméricas clonados no plasmídeo pUC57 foram subclonados para vetores de expressão pLATE51 (Figura 5), segundo as etapas a seguir.

Basicamente os insertos que codificam as proteínas quiméricas foram amplificados em PCR e purificados através de uma eletroforese em gel de agarose empregando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Corporation). Então, estes insertos isolados foram incubados com T4 DNA polimerase em excesso de dATP. Nessas condições as extremidades do inserto são convertidas em fita simples e assim ficam prontas para parear com o vetor linearizado, que também contém extremidades em fita simples.

Essa construção, na qual o inserto ainda não foi ligado covalentemente ao vetor, é então utilizada para transformar bactérias XL1 Blue, de forma que a própria bactéria forma a ligação covalente entre o vetor e o inserto.

2.7.7.1 – Preparação do inserto codificando a proteína quimérica para clonagem em pLATE51

Para gerar pontas coesivas complementares ao vetor de expressão pLATE51, as amostras dos segmentos de DNA que codificam as proteínas quiméricas foram submetidas à amplificação por PCR, utilizando os iniciadores desenhados abaixo (Tabela 2), seguindo o protocolo sugerido pela Thermo Fisher Scientific Inc:

pLATE51bgIA5N 5'- GGTGATGATGATGACAAGACTATTTT - 3'

pLATE51bgIA3C 5'- GGAGATGGGAAGTCATTAGCGTCTAG - 3'

pLATE51bgIB5N 5'- GGTGATGATGATGACAAGAAGAGCGAGAA - 3'

pLATE51bgIB3C 5'- GGAGATGGGAAGTCATTAACCCCGT - 3'

pLATE51bgliThm5N5'- GGTGATGATGATGACAAGAACGTGAAAAA - 3'

pLATE51bgliThm3C5'- GGAGATGGGAAGTCATTATCAGTCTTCC - 3'

Tabela 2: Características dos iniciadores.

Iniciador	T_m (°C)	% GC
pLATE51bgIA5N	63,4	38,5
pLATE51bgIA3C	64,6	50,0
pLATE51bgIB5N	62,4	41,4
pLATE51bgIB3C	65,4	46,2
pLATE51bgIThm5N	61,4	37,9
pLATE51bgIThm3C	61,5	46,4

Todos os iniciadores possuem entre 38% e 50% de GC e temperatura de anelamento maior ou igual a 61°C. As extremidades 5' dos iniciadores incluem sequências específicas do vetor (em negrito) e na extremidade 3' contém de 8 a 11 nucleotídeos idênticos à sequência molde do DNA da proteína quimérica, suficiente sobreposição com o gene de interesse. Estas características são importantes para que haja incorporação com sucesso da cauda de histidina presente no vetor, ao N-terminal do inserto. Como o sistema “*aLICator Ligation Independent Cloning*” é independente de ligação, a fosforilação na região 5' dos iniciadores não é necessária.

Os produtos amplificados no PCR foram submetidos à purificação a partir de eletroforese em gel de agarose. Esta etapa é essencial para remover completamente os dNTPs não incorporados e os iniciadores, além de inativar a DNA polimerase e remover algum DNA contaminante. O material eluído foi utilizado imediatamente na reação descrita abaixo.

2.7.7.2. – Tratamento com enzima T4 DNA polimerase

Após a purificação em gel de agarose dos insertos amplificados por PCR, estes sofreram tratamento com a enzima T4 DNA polimerase para criar pontas coesivas

de fita simples usando o protocolo do *kit* “N-terminal His-tag/EK, *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System*” (Thermo Fisher Scientific). Assim, em um microtubo foi preparada a reação abaixo que foi centrifugada a 13000 xg por 3 a 5 s para garantir que os reagentes se misturassem e então incubada de 20 a 25°C por 5 min. Ao final a enzima T4 DNA polimerase foi inativada adicionando-se 0,6 µL EDTA 0,5 M.

- 0,1 pmol do produto de PCR purificado
- 2 µL de tampão 5x LIC (Thermo Fisher Scientific)
- 1,0 µL da enzima T4 DNA polimerase 1U/µL (Thermo Fisher Scientific)
- 4 µL de H₂O deionizada e autoclavada

2.7.7.3. – “Anelamento” do inserto quimérico no vetor pLATE51

Após o tratamento com a enzima T4 polimerase seguiu-se imediatamente a reação de anelamento do inserto ao vetor pLATE51, seguindo o protocolo sugerido pela Thermo Fisher Scientific. Foi montada em um microtubo a reação descrita abaixo, centrifugando-a a 13000 xg por 3-5 s para garantir que os reagentes entrassem em contato e então incubando-os a 20 a 25°C de 5 min a 2 h.

- 1 µL de “pLATE51 *LIC-ready vector*” (Thermo Fisher Scientific)
- 7,9 µL do produto do tratamento com T4 DNA polimerase

Todo conteúdo da reação de anelamento foi então utilizado para transformar células XL1-Blue competentes, pois para produzir o plasmídeo circular a formação de ligação covalente nas junções de inserção no vetor ocorre dentro da célula (Figura 5).

Figura 5: Visão geral do vetor de expressão pLATE51 “anelado” com o inserto bglA de *P. polymyxa* amplificado e purificado tratado com T4 DNA polimerase. Detalhe da região de clonagem do inserto (“cloned insert”). Figura adaptada do manual do kit *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* disponível na *webpage* do Thermo Scientific (assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013755_aLICator_lic_clon_exp_kit4_NHisWQ_ug.pdf).

As colônias selecionadas pelo antibiótico em placas de LB ágar foram utilizadas na extração e purificação de plasmídeos (ver item 2.2).

2.7.8 –Vetor usado para expressão das β -glicosidases selvagens e quiméricas

Os segmentos de DNA que codificam bglThm, bglA e bglB foram adquiridos junto à empresa GenScript® e subclonados, no laboratório, no vetor de expressão pLATE51 (Thermo Fisher Scientific), mostrado na Figura 6.

O plasmídeo de expressão pLATE51 possui um forte promotor T7//lac e uma sequência que codifica a cauda His₆ na posição N-terminal da proteína

recombinante. Isso facilita a purificação da proteína recombinante por afinidade com resina de níquel em ácido nitrilotriacético (Ni^{+2} -NTA) e ainda pode ser utilizada para detecção e quantificação da proteína por *Western blot*. Este vetor também possui uma sequência que confere resistência ao antibiótico ampicilina, usado para seleção de células bacterianas que tenham sido transformadas pelo plasmídeo de expressão.

Figura 6: A) Esquema indicando os elementos do vetor de expressão pLATE51 (Thermo Fisher Scientific) com destaque da região de clonagem do inserto, mostrada em detalhe em **B)** Detalhe da região de clonagem do inserto ("cloned insert"). Figura adaptada do manual do *kit aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* disponível na *webpage* do Thermo Scientific (assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013755_aLICator_lic_clon_exp_kit4_NHisWQ_ug.pdf).

3. Resultados e Discussão

A literatura indica que as β -glicosidases GH1 com dobramento barril (β/α)₈ podem ser compostas por dois domínios. Uma consequência deste fato seria que domínios seriam, portanto, intercambiáveis entre enzimas. Para tal foram planejados e encomendados na empresa Genscript®, vetores pUC57 que codificam quimeras formadas pela combinação das metades N-terminal e C-terminal de β -glicosidases distintas.

3.1- Planejamento das proteínas recombinantes quiméricas

Para obter as construções das enzimas quiméricas recombinantes foi considerado, como comentado acima, que o barril (β/α)₈ é formado por 2 domínios (Figura 7), ou seja, duas metades formadas cada uma por um “subdomínio (β/α)₄”.

Figura 7: Esquema da construção das proteínas quiméricas a partir dos “subdomínios (β/α)₄” das enzimas modelo. Fonte: adaptado de Smith (2013).

Na construção destas quimeras, bglB e bglA foram usadas como “base” recebendo “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ” de bglThm, bglA ou bglB, gerando deste modo um par de quimeras: quimera N_{bglB}-C_{bglA} e quimera N_{bglA}-C_{bglB}, que combinam proteínas com estabilidades semelhantes, e outros dois pares com combinação de proteínas com estabilidades diferentes: quimera N_{bglThm}-C_{bglB} e quimera N_{bglB}-C_{bglThm} e quimera N_{bglThm}-C_{bglA} e Quimera N_{bglA}-C_{bglThm}.

3.1.1- Estratégia envolvida na determinação dos limites de cada “subdomínio

$(\beta/\alpha)_4$ ”

A fim de minimizar perturbações no *folding* e aumentar a probabilidade da proteína quimérica ser funcional, analisamos a região entre as “metades” N e C-terminal. Um mapa de contato de bglThm, bglA e bglB com distância limite de 5Å (segundo Greene e Higman, 2003) foi elaborado e analisado como uma rede estrutural proteica com seus contatos internos (Figura 8).

Figura 8: Mapa de contatos entre metades com distância limite de 5Å dos PDB das enzimas modelo. **A)** bgIA- PDB 1bgA; **B)** bgIB- PDB 2o9p, e **C)** bgIThm- PDB 1oin. Fonte: Protein Contact Maps, nanoHUB.org.

Em seguida foram calculados o número de contatos entre “subdomínios (β/α)₄” que seriam rompidos com a divisão da proteína entre os resíduos presentes entre as posições 160 e 280, que marcam aproximadamente a metade aritmética do número total de resíduos destas β -glicosidases (Figura 9). Buscava-se localizar o ponto em que os “subdomínios (β/α)₄” seriam isolados no limite “natural” destes, ou seja, rompendo o menor número possível de contatos entre as metades N-terminal e C-terminal.

Figura 9: Número de contatos entre metades N-terminal e C-terminal dos resíduos das enzimas modelo presentes entre as posições 160 e 280 com distância limite de 5Å. **A)** bglA- PDB 1bga; **B)** bglB- PDB 2o9p; e **C)** bglThm- PDB 1oin.

Então analisamos o esquema da estrutura secundária e terciária na região “entre metades” N-terminal e C-terminal das enzimas modelos, buscando garantir que a separação dos “subdomínios” considerados não comprometa nenhuma estrutura secundária.

Com base nesta análise, nota-se que enzima bglA (PDB 1bga) possui 447 resíduos totais, sendo que a metade seria no resíduo 224, presente em uma alça, onde a separação romperia 210 contatos entre metades. Porém, o menor número possível de contatos rompidos entre as metades N-terminal e C-terminal é 190, com uma separação nos resíduos 217, 218 e 219, que fazem parte de uma folha β (destaque cinza na Figura 10). Com estas considerações, o ponto escolhido para o “corte” entre metades da bglA foi o 215 (em vermelho na Figura 10), por estar em uma alça e ser um ponto de separação que romperia 191 contatos entre metades, valor próximo do mínimo possível.

Figura 10: Esquema mostrando os resíduos, a estrutura secundária e a estrutura terciária correspondente, na região “entre metades” N-terminal e C-terminal da enzima bglA (PDB 1bga). Adaptação de *Launch viewer RCSB PDB Protein Workshop 4.2.0*.

A enzima bglB (PDB 2o9p) possui 445 resíduos totais, sendo que a metade seria no resíduo 223, presente em uma folha β , onde o corte romperia 190 contatos entre metades. O menor número possível de contatos rompidos entre as metades é 167, para cortes nos resíduos 214, 215 e 216, que fazem parte de uma alça (destaque cinza na Figura 11). O ponto escolhido para o “corte” entre metades da bglB foi o 215, por estar em uma alça e por romper 167 contatos entre metades.

Figura 11: Esquema mostrando os resíduos, a estrutura secundária e a estrutura terciária correspondente, na região “entre metades” N-terminal e C-terminal da enzima bglB (PDB 2o9p). Adaptação de *Launch viewer RCSB PDB Protein Workshop 4.2.0*.

Já a enzima bglThm (PDB 1oin) possui 468 resíduos totais, sendo que a metade seria no resíduo 234, presente em uma alça, onde um corte romperia 229 contatos entre as metades. O menor número possível de contatos rompidos entre as metades é de 164, assumindo separação entre os resíduos 217 e 218, que fazem parte de uma folha β (destaque cinza na Figura 12). Então, o ponto escolhido para o “corte” entre metades da bglThm foi o 215, por estar em uma alça e romper 165 contatos entre metades, número muito próximo do mínimo possível.

Figura 12: Esquema mostrando os resíduos, a estrutura secundária e a estrutura terciária correspondente, na região “entre metades” N-terminal e C-terminal da enzima bglThm (PDB 1oin). Adaptação de *Launch viewer RCSB PDB Protein Workshop 4.2.0*.

Definidos cada um dos hipotéticos “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ” das β -glicosidases parentais, as quimeras ficaram então assim definidas: **N_{bglB}-C_{bglA}** com resíduos 1 a 215 de bglB e 216 a 447 da bglA, **N_{bglA}-C_{bglB}**, com resíduos 1 a 215 de bglA e 216 a 445 da bglB, **N_{bglThm}-C_{bglB}** com resíduos 1 a 215 de bglThm e 216 a 445 da bglB, **N_{bglB}-C_{bglThm}** com resíduos 1 a 215 de bglB e 216 a 468 da bglThm, **N_{bglThm}-C_{bglA}** com resíduos 1 a 215 de bglThm e 216 a 447 da bglA e finalmente **N_{bglA}-C_{bglThm}** com resíduos 1 a 215 de bglA e 216 a 468 da bglThm (Figura 13).

Figura 13: Representação esquemática das proteínas quiméricas com cada um dos seus “subdomínios (β/α)₄”. As cores se referem à proteína de origem de cada “subdomínio (β/α)₄”: verde à bglA; azul à bglB e vermelho à bglThm. Fonte: Pymol a partir dos PDBs das enzimas parentais.

3.2- Construção das proteínas recombinantes quiméricas

A seguir sabendo as sequências de nucleotídeos que codificam o DNA de cada “subdomínio (β/α)₄” que compõe a quimera planejada foram encomendadas as sínteses e clonagem nos vetores PUC57 junto à empresa GenScript®.

As ORFs dos insertos de todas as construções foram traduzidas e comparadas com a sequência das enzimas selvagens, disponível no banco de dados UniProt, e observou-se o correto posicionamento dos resíduos de aminoácidos que ligam a cauda de histidina a sequência N-terminal, bem como a correta montagem da proteína quimérica planejada.

As construções foram introduzidas em bactérias XL1 Blue e a seguir purificadas através de “miniprep” a partir das colônias transformadas para a

obtenção de um estoque de plasmídeos. Para avaliar se os procedimentos foram satisfatórios, as preparações plasmidiais tiveram a região que codifica a proteína recombinante quimérica amplificada, utilizando iniciadores que pareiam com as regiões que codificam suas porções C-terminal e N-terminal. Após a reação de PCR, os produtos da amplificação foram submetidos à análise em eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio (Figura 14).

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados a partir da construção pUC57 contendo os insertos que codificam as proteínas quiméricas. **Padrão.** Marcador de peso molecular *O'Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* (Fermentas®); **Raia 1.** inserto Quimera 1 ($N_{\text{bglIThm}}\text{-}C_{\text{bglB}}$) ~1350 pb; **Raia 2.** inserto Quimera 2 ($N_{\text{bglIThm}}\text{-}C_{\text{bglA}}$) ~1350 pb; **Raia 3.** inserto Quimera 3 ($N_{\text{bglB}}\text{-}C_{\text{bglThm}}$) ~1350 pb; **Raia 4.** inserto Quimera 4 ($N_{\text{bglB}}\text{-}C_{\text{bglA}}$) ~1350 pb; **Raia 5.** inserto Quimera 5 ($N_{\text{bglA}}\text{-}C_{\text{bglB}}$) ~1350 pb; **Raia 6.** inserto Quimera 6 ($N_{\text{bglA}}\text{-}C_{\text{bglThm}}$) ~1350 pb.

Confirmado que o estoque de plasmídeos pUC57 continham os insertos quiméricos, estes foram, então, subclonados em vetor de expressão pLATE51, seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi feita uma reação de PCR para amplificar a região que codifica para as proteínas recombinantes quiméricas, utilizando os iniciadores descritos no item 2.7.7.1, para obtenção de uma amostra de DNA linear de cada inserto quimérico contendo nas extremidades 5' e 3' uma sequência que se anela às extremidades do vetor pLATE51.

O produto da reação desta segunda PCR foi então submetido a uma eletroforese preparativa em gel de agarose para extração dos contaminantes e purificação das bandas. A partir das bandas, o DNA linear foi purificado com o *kit* “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System” e a concentração de DNA foi mensurada. Todas as amostras continham concentrações de DNA detectáveis por volta de 0,04 µg/µL.

Após a purificação acima, as amostras de inserto purificado sofreram tratamento com a enzima T₄ polimerase, seguido imediatamente pela reação de anelamento dos insertos ao vetor pLATE51, seguindo o protocolo descrito no item 2.7.7.3.

A sequência de inserção, o correto anelamento do inserto com o vetor de expressão e sua correta orientação foram confirmadas pela análise de PCR com o DNA plasmidial extraídos de colônias *E. coli* XL1-Blue transformadas com o produto da reação “LIC cloning” (Raia 3, Raia 6 e Raia 9 da Figura 15).

O PCR foi realizado usando os *primers* descritos no item 2.7.7.1 de acordo com a construção quimérica e os *primers* 5N “LIC reverse sequencing primer” (24-mer- 5'- GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3') e “LIC forward sequencing primer”

(20-mer- 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'). Os produtos de PCR obtidos com os primers 5N “LIC reverse sequencing primer” e “LIC forward sequencing primer” devem ser de 266 pb além do tamanho do inserto.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados a partir da construção pLATE51 com os insertos que codificam as proteínas quiméricas. **Padrão.** Marcador de peso molecular *O'Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* (Fermentas®); **Raia 1.** inserto Quimera 1 ($N_{bglI\text{Thm}}\text{-}C_{bglB}$) ~1350 pb; **Raia 2.** inserto Quimera 2 ($N_{bglI\text{Thm}}\text{-}C_{bglA}$) ~1350 pb; **Raia 3.** inserto Quimera 3 ($N_{bglB}\text{-}C_{bglI\text{Thm}}$) ~1350 pb; **Raia 4.** inserto Quimera 4 ($N_{bglB}\text{-}C_{bglA}$) ~1350 pb; **Raia 5.** inserto Quimera 5 ($N_{bglA}\text{-}C_{bglB}$) ~1350 pb; **Raia 6.** inserto Quimera 6 ($N_{bglA}\text{-}C_{bglI\text{Thm}}$) ~1350 pb.

Posteriormente estes plasmídeos de expressão pLATE51 foram utilizados para expressão das β -glicosidases quiméricas.

3.3- Produção e purificação das β -glicosidases recombinantes selvagens

Para a padronização dos ensaios usados para caracterização das quimeras, as β -glicosidases selvagens bglThm, bglA e bglB foram expressas como proteínas recombinantes utilizando o vetor de expressão pLATE51 e as linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) e NovaBlue(DE3) ambas induzidas com IPTG a 20°C por 24 h a 48 h. A linhagem NovaBlue(DE3) induzida por 24 h produziu uma maior quantidade de proteínas, caracterizada pela presença nítida de banda proteica induzida após a adição de IPTG com tamanho esperado (seta vermelha na Figura 16). Por isso foi escolhida para produzir amostras para a caracterização estrutural e enzimática.

Figura 16: Análise da produção das enzimas recombinantes selvagens pelas bactérias NovaBlue(DE3) e BL21 (DE3) através de SDS- PAGE. **A)** amostra de bactérias contendo o vetor pLATE bglA; **B)** amostra de bactérias contendo o vetor pLATE bglB; **C)** amostra de bactérias contendo o vetor pLATE bglThm. **Raia 1-** amostra bacteriana não induzida; **Raia 2-** amostra bacteriana induzida após a adição de IPTG; **Padrão-** Marcador de Peso Molecular SDS-PAGE *Broad range*.

Para confirmar que houve indução da produção da proteína recombinante foram feitos SDS-PAGE de uma alíquota de cultivo antes e depois da indução com IPTG, além de uma amostra com proteínas do lisado bacteriano que foram retidas pela resina de níquel-agarose (Ni^{+2} -NTA). Como sabido, esta resina liga proteínas com cauda de His_6 , como aquelas produzidas pelo vetor pLATE51. Como pode ser observado, na maior parte dos casos houve expressão de grande quantidade das proteínas recombinantes selvagens (Figura 17).

Figura 17: Eletroforese em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% corado com “comassie blue” R250 0,1% das enzimas recombinantes selvagens pelas bactérias NovaBlue(DE3) através de SDS- PAGE. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima*; **C)** bglB de *P. polymyxa*. **Raia 1-** amostra bacteriana não induzida; **Raia 2-** amostra bacteriana induzida após a adição de IPTG; **Raia 3-** amostra do eluído da resina Ni^{+2} -NTA. **Padrão-** Marcador de Peso Molecular SDS-PAGE *Broad range*.

As análises por SDS-PAGE revelaram que todos os cultivos apresentaram uma banda com peso molecular compatível com o esperado teórico, ou seja, 51,6 kDa para bglA, 51,5 kDa para bglB; 51,5 kDa para bglThm, nas amostras após a indução (Figura 17).

Com esta confirmação, as bactérias induzidas foram lisadas por sonicação e purificadas pelo método de *batch* em gravidade através de cromatografia líquida de afinidade com resina Ni⁺²-NTA. Foram feitos testes verificando o número de “lavagens” e a concentração de imidazol necessária para que o tampão de “lavagem” das proteínas “contaminantes” não eluísse também a proteína recombinante, mas proporcionasse uma boa purificação.

Após a purificação por afinidade, as amostras de proteína passaram por colunas de dessalinização PD MiniTrap™ G25 em cromatografia de “*desalting*” (item 2.4) para troca do tampão por citrato fosfato de sódio 0,1 mmol·L⁻¹ pH 6,0. Para verificar se realmente ocorreu a remoção do imidazol, foi coletado um espectro de fluorescência intrínseca dos triptofanos (Figura 18) das etapas do “*desalting*”: “*flow through*”, lavagem e eluído, além da amostra inicial eluída da cromatografia de afinidade (eluído 1).

Figura 18: Espectros de fluorescência intrínseca dos triptofanos (excitação a 295 nm) das fases da cromatografia de “desalting” das proteínas recombinantes purificadas. **A)** amostras de bglA de *P. polymyxa* selvagem; **B)** amostras de bglB de *P. polymyxa* selvagem; **C)** amostras de bglThm de *T. maritima* selvagem; **D)** controles dos tampões utilizados (CP6 e imidazol 0,3mol) e do detergente utilizado na limpeza das cubetas (Helmanex a 1%).

Acima pode-se ver um pico de emissão próximo de 390 nm referente ao imidazol presente na amostra da lavagem da coluna usada na cromatografia de “desalting”, confirmado pelo espectro de imidazol controle na Figura 18D. Nos espectros das proteínas recombinantes eluídas após a cromatografia de “desalting” pode-se observar apenas um pico próximo de 340 nm, referente à emissão de fluorescência típica de proteínas enoveladas.

Além disso, a concentração das proteínas selvagens recombinantes foi obtida através de sua absorbância a 280 nm revelando um valor médio de $0,45 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para bglA, $0,28 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para bglB e $0,085 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para bglThm.

As amostras coletadas durante a purificação foram novamente analisadas por SDS-PAGE (Figura 19) para avaliar a pureza e homogeneidade do material purificado. Como pode ser observado, as proteínas recombinantes foram purificadas satisfatoriamente com a retirada de outras proteínas, como mostra a banda em destaque (linha pontilhada vermelha) correspondente a uma proteína com tamanho semelhante àquele esperado para as β -glicosidases induzidas.

Figura 19: Eletroforese em SDS-PAGE de amostras da lise celular e purificação através cromatografia líquida de afinidade em coluna de níquel-agarose. **A)** bglA; **B)** bglB; **C)** bglThm. **Raia 1-** sobrenadante da lise celular; **Raia 2-** sedimento da lise celular; **Raia 3-** “flow through” da purificação; **Raia 4-** lavagem da coluna Ni^{+2} -NTA; **Raia 5-** eluído da purificação; **Raia 6-** desalting do eluído da purificação; **Raia 7-** resina da coluna usada na purificação. **Padrão-** marcador de Peso Molecular SDS-PAGE Broad Range (em kDa).

3.4- Expressão das proteínas recombinantes quiméricas

De posse das construções que codificam as enzimas quiméricas recombinantes subclonadas no vetor de expressão pLATE51, os procedimentos de expressão usados para as enzimas selvagens foram adaptados para produção das enzimas quiméricas. Assim foram utilizadas as bactérias NovaBlue(DE3) e testados diferentes tempos de indução com IPTG (52 h, 36 h, 24 h e 12 h), sendo que o último mostrou maior eficiência. Contudo deve ser notado que se obteve apenas expressão de grande quantidade da enzima quimérica $N_{bglA} - C_{bglThm}$, a única a apresentar-se na porção solúvel. Também foi realizado um ensaio enzimático da cultura induzida, incubado-a 1 h a 30°C, para testar a viabilidade da proteína quimérica presente na amostra induzida (Figura 20).

Figura 20: Ensaio de atividade enzimática com p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 8 mmol·L⁻¹ em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6 das proteínas quiméricas recombinantes presentes no sobrenadante do lisado: **1)** Quimera $N_{bglThm} - C_{bglB}$; **2)** Quimera $N_{bglThm} - C_{bglA}$; **3)** Quimera $N_{bglB} - C_{bglThm}$; **4)** Quimera $N_{bglB} - C_{bglA}$; **5)** Quimera $N_{bglA} - C_{bglB}$; **6)** Quimera $N_{bglA} - C_{bglThm}$.

Além disso, não foi possível purificar as demais proteínas quiméricas, pois estas foram expressas como proteínas insolúveis, ou seja, retidas em agregados de proteína inativa conhecidos como corpos de inclusão, como o caso da quimera N_{bglA} – C_{bglB} exemplificado pela seta na Figura 21. Uma das explicações pode ser o fato de que altas taxas de síntese de proteínas recombinantes nas bactérias podem levar a dobramento impróprio, que por sua vez, leva a degradação proteica ou formação de corpos de inclusão. Neste panorama o cultivo a baixa temperatura representaria uma estratégia para tentar aumentar a recuperação das proteínas quiméricas na forma solúvel, testamos a indução a 37°C e a 20°C, contudo, as chaperonas de *E. coli* normalmente perdem atividade a temperaturas reduzidas. Diante deste panorama, a capacidade da cepa de *E. coli* NovaBlue(DE3) para processar adequadamente o “*folding*” de todas as proteínas quiméricas recombinantes planejadas parece ser insuficiente.

Figura 21: SDS-PAGE de amostras das bactérias NovaBlue(DE3) expressando a quimera N_{bglA} – C_{bglB}. **Raia 1-** amostra do sobrenadante do lisado bacteriano; **Raia 2-** amostra do *pellet* do lisado. **Padrão-** arcador de Peso Molecular SDS-PAGE *Broad range*.

A estratégia usada para tentar resolver este problema foi expressar as enzimas quiméricas em bactérias “*ArcticExpress*” que co-expressam as chaperonas adaptadas ao frio Cpn10 e Cpn60 da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica*, semelhante à GroEL e GroES de *E. coli*. Estas chaperonas têm atividade em temperaturas mais baixas, aumentando assim o processamento das proteínas recombinantes e o seu rendimento na forma ativa e solúvel. Então o vetor de expressão pLATE51 codificando as β -glicosidases quiméricas foi introduzido em bactérias “*ArcticExpress*” (DE3), as quais foram induzidas com IPTG a 12°C por 24 h, obtendo-se expressão de proteína recombinante solúvel em grande quantidade de quatro das seis quimeras: N_{bglA} – C_{bglThm}, N_{bglThm} – C_{bglB}, b_{glThm} – C_{bglA} e N_{bglA} – C_{bglB}. (Figura 22).

Figura 22: Análise por SDS-PAGE de amostras das bactérias “ArcticExpress” (DE3) expressando as quimeras recombinantes solúveis, evidenciadas pela linha vermelha tracejada. **A)** quimera $N_{bglA} - C_{bglThm}$; **B)** quimera $N_{bglThm} - C_{bglB}$; **C)** quimera $N_{bglThm} - C_{bglA}$; **D)** quimera $N_{bglA} - C_{bglB}$. **Padrão-** marcador de Peso Molecular SDS-PAGE *Broad range*. **Raia 1-** amostras do sobrenadante do lisado bacteriano; **Raia 2 e 3-** amostras do “flow through” (FT) e lavagem (lav) da cromatografia de “desalting” em tampão HEPES 20 mmol·L⁻¹ pH 7; **Raia 4-** amostras do “pool” formado pelas frações com maior atividade eluídas da cromatografia de troca iônica; **Raia 5-** amostra do eluído da cromatografia de afinidade.

3.4- Purificação das proteínas recombinantes quiméricas

Iniciou-se então uma tentativa de purificação das enzimas recombinantes quiméricas expressas em “*ArcticExpress*” (DE3) usando o mesmo procedimento que para as β -glicosidases selvagens expressas em NovaBlue(DE3) descrito acima.

Notou-se que ao final do procedimento de purificação por afinidade na resina de níquel-agarose que as quimeras estavam cataliticamente ativas, mas com baixa recuperação. Estes materiais finais foram, então, submetidos a uma dosagem de proteína, revelando um valor médio de $0,01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para a quimera N_{bgl}I^{Thm} – C_{bgl}I^B (Figura 22 raia 5); $0,15 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para N_{bgl}I^{Thm} – C_{bgl}I^A; $0,01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para N_{bgl}I^A – C_{bgl}I^B e $3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para a quimera N_{bgl}I^A–C_{bgl}I^{Thm}, todas obtidas a partir de 0,5 L de cultura de bactérias. Entretanto, quando o material inicial foi submetido ao procedimento de purificação por cromatografia de troca iônica em sistema FPLC™ todas as quimeras, exceto N_{bgl}I^A–C_{bgl}I^{Thm}, perdiam completamente a atividade não sendo possível identificar em quais frações cromatográficas estavam as proteínas quiméricas (Figura 22).

Como a quimera N_{bgl}I^A–C_{bgl}I^{Thm} expressa em “*ArcticExpress*” (DE3) assim como quando expressa em Novablue(DE3) manteve sua atividade enzimática inalterada após os procedimentos cromatográficos, optou-se por realizar a expressão em Novablue(DE3). Assim, os mesmos procedimentos de expressão usados para as enzimas selvagens, vetor de expressão pLATE51 em cepa NovaBlue(DE3) induzida com IPTG por 18 h a 20°C, foram novamente empregados para produção da enzima quimérica N_{bgl}I^A–C_{bgl}I^{Thm}. Após vários testes de tempos de indução visando otimizar a quantidade de proteína recombinante expressa.

O lisado bacteriano contendo a β -glicosidase quimérica N_{bglA}-C_{bglThm} foi então submetido à cromatografia líquida de afinidade com resina Ni⁺²-NTA agarose (QIAGEN) por “*batch*” adaptado para fluxo de gravidade, tendo sido feitos testes do número de “lavagens” e da concentração de imidazol necessária para a eluição das proteínas recombinantes. Porém, mesmo com estas tentativas de otimização, houve presença de muitas proteínas contaminantes, com ligação inespecífica com a resina, na amostra eluída.

Foi então utilizada uma estratégia alternativa para purificação de N_{bglA}-C_{bglThm}. Inicialmente o lisado bacteriano foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna Resource 15Q em FPLC™ system ÄKTApure (*Fast Protein Liquid Chromatography*; GE Healthcare Life Sciences). As proteínas retidas na coluna foram eluídas com gradiente de 0 a 1 mol·L⁻¹ de NaCl (Figura 23). Durante todo o processo cromatográfico foram coletadas frações (0,5 mL) em placas “*Deepwell™* 96”, as quais foram utilizadas para a detecção da proteína recombinante quimérica por teste de atividade enzimática com solução do substrato *p*-nitrofenil- β -glucopiranosídeo.

Em seguida, as amostras das frações contendo a enzima quimérica, com pico de absorbância a 280 nm (em verde na Figura 23), coincidindo com maior atividade enzimática, (em azul na Figura 23), e com o tamanho molecular esperado (Figura 24) foram reunidas no “*pool*” mostrado na Figura 26A e passaram por uma nova cromatografia líquida, sendo agora de afinidade com resina Ni⁺²-NTA agarose. Ao final para a retirada de imidazol, a amostra eluída foi submetida à cromatografia de “*desalting*” contra o tampão citrato fosfato 100 mmol·L⁻¹ pH 6.

Figura 23: Purificação da proteína quimérica $N_{bglIA}-C_{bglIThm}$ por cromatografia de troca iônica em sistema FPLCTM. A linha pontilhada em vermelho indica o gradiente da eluição com tampão HEPES 20 mmol·L⁻¹ pH 7 com NaCl 1 mol·L⁻¹. Os triângulos verdes mostram o perfil de absorção em 280nm, indicativo de proteína total. Os lozangos azuis mostram a atividade enzimática das frações. O “pool” de frações foi formado pelos tubos com maior atividade enzimática.

Figura 24: Análise por SDS-PAGE de amostras das frações eluídas da cromatografia de troca iônica da quimera $N_{bglIA}-C_{bglIThm}$ apresentando maior atividade enzimática. A proteína recombinante quimérica está evidenciada pela linha vermelha tracejada. **Padrão**- marcador de Peso Molecular SDS-PAGE *Broad range*. **WT**- enzima recombinante selvagem para referência. *Frações reunidas em “pool” final (C11, C12, D1, D2 e D3).

Assim como para as enzimas selvagens, coletamos um espectro de fluorescência intrínseca dos triptofanos (Figura 25) para verificar se realmente ocorreu a remoção do imidazol. No espectro da proteína quimérica eluída após a cromatografia de “*desalting*” observa-se apenas um pico próximo de 340 nm, referente à emissão de fluorescência típica de proteínas enoveladas.

Figura 25: Espectro de fluorescência intrínseca dos triptofanos de amostras representando as fases do “*desalting*”: “*flow through*” (FT), lavagem (lav) e eluído da cromatografia de “*desalting*”, além da amostra eluída da cromatografia de afinidade (eluído) e lisado inicial da quimera N_{bglA} – C_{bglThm}.

Em análise de SDS-PAGE da amostra final (Figura 26B) pode-se ver uma banda única (em destaque linha pontilhada vermelha) correspondente a uma proteína que apresenta o tamanho semelhante àquele esperado para a β -glicosidase quimérica N_{bglA} – C_{bglThm} (~51,5 KDa). Verifica-se a homogeneidade do material e a retirada de proteínas contaminantes que estavam presentes na amostra da etapa anterior (troca iônica). Este material foi então reservado para a caracterização da proteína quimérica.

Figura 26: Análise por SDS-PAGE de amostras da purificação da quimera $N_{bglA} - C_{bglIThm}$ expressas em bactéria NovaBlue(DE3). **A)** amostra do “pool” após a cromatografia de troca iônica em sistema FPLC; **B)** amostra do “pool” após a cromatografia de afinidade em resina Ni^{+2} -NTA agarose. **Padrão-** marcador de Peso Molecular SDS-PAGE *Broad range*.

4.1- Conclusões Prévias

As β -glicosidases $bglA$, $bglB$ e $bglIThm$ foram produzidas como proteínas recombinantes empregando o vetor pLATE51 em bactérias NovaBlue(DE3) e purificadas por afinidade à resina de níquel-agarose. Dentre as seis proteínas quiméricas planejadas e construídas, apenas $N_{bglA} - C_{bglIThm}$ foi produzida na forma solúvel e ativa também empregando o vetor pLATE51 e bactérias NovaBlue(DE3). Esta quimera foi purificada empregando uma combinação de cromatografia de troca iônica em coluna ResourceQ e afinidade à resina de níquel-agarose.

CAPÍTULO 2

Domínios em β -glicosidases TIM *barrel*

1. Introdução

1.5- Clã GH A

O banco de dados de Enzimas Ativas sobre Carboidratos (CAZy) fornece uma lista continuamente atualizada das famílias de Glicosídeo Hidrolisases e agrupa algumas famílias em clãs pelo fato do seu “*folding*” ser melhor conservado que suas sequências de aminoácidos.

As β -glicosidases GH1 apresentam uma estrutura terciária do tipo $(\beta/\alpha)_8$ barril, um “*folding*” também encontrado em 19 famílias de glucosidases, sendo então agrupadas no clã GHA. Seu sítio ativo encontra-se entre as alças que conectam as fitas- β às α -hélices na porção C-terminal do barril, conforme indicado pela seta na Figura 27 (Henrissat e Davis, 1997).

Esta forma básica, também chamada de TIM *barrel*, é a estrutura mais comum entre as enzimas e promove uma ampla gama de reações, cobrindo cinco das sete classes definidas pela *Enzyme Commission*, sendo elas oxidoredutases, transferases, hidrolases, ligases e isomerases (Stern e Höcker, 2005).

1.6- "Folding TIM barrel"

O dobramento da estrutura em "TIM barrel" consiste em um barril central formado por oito unidades β/α em "tandem", formando um barril de 8 folhas β concêntricas envolto por 8 α -hélices externas. As fitas β são antiparalelas às α -hélices, cujas cadeias laterais apontam para o interior e se interlaçam com cadeias laterais da folha β que apontam para o exterior do barril. Segundo Vijayabaskar e Vishveshwara (2012), o $(\beta/\alpha)_8$ barril possui 4 camadas de esqueleto polipeptídico intercalados por regiões de cadeias laterais hidrofóbicas que formam 3 grandes interfaces de estrutura secundária (Figura 27):

- interface β/β : núcleo do barril central formado por folhas beta paralelas;
- interface α/β : flanqueia o barril e é formado pelo motivo α -X- β mais comum (onde X pode ser qualquer estrutura como alças e dobras β . Dominada exclusivamente por interações de baixa energia entre os resíduos não conservados, contribuindo muito para a diversidade sequencial;
- interface α/α : virada para o exterior é formada pela interação entre as hélices.

Figura 27: Modelo do "folding" barril $(\beta/\alpha)_8$ ou "TIM barrel" encontrado no clã GHA **A)** destacando as três grandes interfaces de estruturas secundárias. Adaptado de Vijayabaskar and Vishveshwara, 2012. **B)** Modelo estrutural de uma β -glicosidase (EC 3.2.1.21). A seta indica a cavidade do sítio ativo. Adaptado de PDB code: 1bgg

1.7- Domínios em $(\beta/\alpha)_8$ barris ou "TIM barrels"

Domínios são definidos como unidades independentes de dobramento estável que formam a estrutura das proteínas (Richardson, 1981; Dootlitle, 1995; Porter e Rose, 2012). Há diversos sistemas de identificação e classificação de domínios, os mais amplamente utilizados são CATH (Figura 28A) e SCOP (Figura 28B), os quais se apoiam em algoritmos computacionais para análise e comparação de estruturas proteicas. Porém, ambos dependem em última instância de uma inspeção visual para determinação final dos limites do domínio, a qual pode ser insuficiente e subjetiva. Numerosos algoritmos de identificação de domínio têm sido propostos e claramente é necessária uma definição de domínio rigorosa.

Figura 28: Classificação da estrutura proteica de β-glicosidases como domínio único. **A)** Sistema CATH; **B)** Sistema SCOP.

1.8- Evolução dos domínios em $(\beta/\alpha)_8$ barril ou “TIM barrels”

Existem duas teorias diferentes sobre a origem destas proteínas: evolução convergente para um dobramento estável ou evolução divergente a partir de um ancestral comum. Como apenas o estudo de sequências não pode detectar duplicações antigas que divergiram além da homologia reconhecível, parece que quase todos os pares de domínios semelhantes são de fato o resultado de duplicações de genes internos (David e Richardson, 2007).

Sua natureza repetitiva levou Gilbert e Glynias (1993) a propor que as estruturas barril TIM foram originalmente codificadas como unidades individuais que foram traduzidas e, posteriormente, formaram complexos ativos em “*trans*”.

De fato, os modelos para evolução das proteínas $(\beta/\alpha)_8$ barril sugerem que este dobramento teria se originado a partir da duplicação gênica e fusão de dois “módulos” $(\beta/\alpha)_4$, ou seja, dois “meio-barris” e que em seguida poderiam ter divergido em várias enzimas, o que pode ter contribuído para a formação do sítio ativo na parte superior do C-terminal do barril (Lang *et al.*, 2000; Henn-Sax *et al.*, 2002; Höcker *et al.*, 2004).

Nesta linha de estudo a determinação das estruturas cristalográficas confirmou que os dois “meio barris” estão relacionados por um eixo de simetria, suportando a hipótese de que os genes que codificam $(\beta/\alpha)_8$ barril são o resultado de duplicação de único gene que codifica para uma “subunidade $(\beta/\alpha)_4$ ” com fusão subsequente seguida de evolução divergente (Gerl e Babbitt, 2001). Evidências experimentais de duas enzimas que catalisam reações sucessivas na biossíntese da histidina (HisA e HisF) revelaram estruturas $(\beta/\alpha)_8$ barril com dois subdomínios que se sobrepõem, ou seja, o $(\beta/\alpha)_8$ barril pode ser esquematicamente dividido na

metade N-terminal e C-terminal, ambos com quatro unidades (β/α). Estes dados sugeriram que HisA e HisF teriam evoluído a partir de um ancestral comum composto por um “meio-barril” (Lang *et al.*, 2000). Estudos posteriores sugeriram que embora as duas metades de HisF (HisF-N e HisF-C) fossem estáveis e estivessem enoveladas, elas eram cataliticamente inativas. A coexpressão em bactéria ou a renaturação conjunta de HisF-N e HisF-C resultou num complexo estequiométrico e com atividade catalítica. Estes dados reunidos suportam o modelo de que (β/α)₈ barril de HisF evoluiu a partir de um (β/α)₄ barril ancestral (Höcker *et al.*, 2001). Posteriormente, baseado neste modelo e tentando reconstruir a evolução do (β/α)₈ barril a partir do (β/α)₄ barril, foram gerados (β/α)₈ barris quiméricos, nos quais a metade N-terminal de HisA foi ligada na metade C-terminal de HisF e vice versa (Höcker *et al.*, 2004).

Diante disso, Beton e Marana (2015) demonstram que “subdomínios (β/α)₄” sofrem um processo de ativação simultâneo com um aumento no tamanho, sugerindo que além do ganho em estabilidade estrutural, o aumento em atividade catalítica pode também ter conduzido a evolução dos (β/α)₈ barris. Em corroboração, a fusão de dois (β/α)₄ meios-barris poderia ter contribuído para a formação do sítio ativo na parte superior do C-terminal do barril, que, em seguida, poderia ter divergido em diferentes enzimas.

Deste modo, os estudos de identificação de domínios, bem como de evolução, sugerem que as proteínas (β/α)₈ barril são formadas por dois domínios que compõem as suas metades N-terminal e C-terminal.

Figura 29: Esquema da hipótese de que as proteínas $(\beta/\alpha)_8$ barril são formadas por dois “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ”. Fonte: baseado em Vikas Nanda (2016).

1.9- Diferentes modelos para identificação de domínios

1.9.1- Domínios como conjuntos de estabilidade termodinâmica relativa

Em 2012 foi desenvolvido um método para identificação de domínios que se baseia na estabilidade termodinâmica relativa de segmentos proteicos *in situ* e incisados (Porter e Rose, 2012). Nesta definição domínio é um segmento contíguo de uma proteína que possui a mesma estabilidade, avaliada pelo $\Delta\Delta G$ da transferência de água para solução de ureia, quando se encontra isolado ou no interior da estrutura proteica, contendo assim todas as interações necessárias para que se dobre independente e estavelmente. Enfim, domínio é um segmento proteico contíguo dobrado para o qual o valor do parâmetro “*m*” no isolamento e no contexto da proteína é essencialmente o mesmo. Definido desta maneira, domínio é uma unidade autocontida, cuja cooperatividade de dobramento depende das interações intra-segmento e não entre segmentos.

Interessantemente quando aplicado para Triose Fosfato Isomerase humana (TIM), uma proteína que adota um dobramento $(\beta/\alpha)_8$ barril, este método localizou 2 domínios que correspondem às metades N-terminal e C-terminal (Porter e Rose, 2012). Este resultado contrasta com a visão dominante de que o $(\beta/\alpha)_8$ barril seja um domínio único, e com base no critério de estabilidade termodinâmica, percebe-se que o $(\beta/\alpha)_8$ barril seria composto por dois domínios ou dois “meio barris”.

1.9.2- Domínios como subconjuntos de uma rede de contatos

Coerentemente, a análise da estrutura de β -glicosidases GH1, que são $(\beta/\alpha)_8$ barris, por um método de localização de domínios baseado em princípios distintos, também revela a presença de 2 domínios que coincidem com as metades N-terminal e C-terminais (Smith *et al.*, 2013). Neste segundo método de localização de domínios, a estrutura proteica com seus contatos internos é representada com uma rede de contatos, sendo evidenciados os conjuntos de resíduos que mantêm preponderantemente interações entre si e assim podem ser isolados dos demais rompendo o menor número possível de contatos entre conjuntos. Por uma via distinta, neste segundo caso, a definição de domínios como subconjuntos de uma rede, acaba resultando em porções de uma proteína com potencial para dobramento independente e estável, também como definido no método de Porter e Rose (2012).

É importante notar que embora no segundo método os resíduos de um mesmo domínio (subconjunto de uma rede) não sejam obrigatoriamente contíguos, a análise da estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril mostrou ser composto por 2 segmentos contíguos, ou “meio-barris” como definido no primeiro método, que é exclusivo para domínios formados por segmentos contínuos. Esta convergência de resultados reforça a hipótese de que $(\beta/\alpha)_8$ barris seriam formados por 2 “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ”.

2. Material e Métodos

2.8 – Coleta de espectros de fluorescência intrínseca de proteínas

Para avaliar se as proteínas recombinantes purificadas se encontravam enoveladas, espectros de fluorescência intrínseca de triptofano foram coletados a 30°C com excitação em 295 nm e emissão em uma faixa de 305 nm até 500 nm, empregando um espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi High-Technologies) ajustado com abertura de fenda (*slit*; ex/em) de 5,0/5,0 nm, velocidade de varredura de 240 nm/min e tempo de integração de 1 s. As amostras foram colocadas em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de absorção de 10 mm com todas as faces transparentes.

2.9 – Supressão de fluorescência intrínseca de proteínas por acrilamida

Espectros de emissão de fluorescência proteica foram coletados, como descrito no item anterior, na presença de concentrações crescentes (0 até 0,4 mol·L⁻¹) de acrilamida a partir de solução estoque a 10 mol·L⁻¹. O efeito supressor foi analisado por meio da razão da intensidade de emissão máxima na ausência de supressor sobre a emissão máxima na presença da acrilamida (F_0/F) plotada em função da concentração de acrilamida (Eftink e Ghiron, 1976). A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi calculada com a equação 3 e indica o grau de acessibilidade dos resíduos de triptofano ao supressor acrilamida.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$

2.10 – Determinação de espectros de dicroísmo circular

Para avaliar a estrutura secundária das β -glicosidases selvagens e quiméricas, espectros de dicroísmo circular foram coletados na faixa de radiação na região do ultravioleta distante e próxima, ou seja, entre 190 nm a 310 nm com velocidade de varredura de 50 nm/min, tempo de resposta de 8 s e abertura de fenda de 1 nm (Kelly *et al.* 2005) em um espectropolarímetro J-715 (JASCO- Central Analítica do IQ). As amostras em tampão fosfato de potássio 20 mmol·L⁻¹ pH 7,0 foram acondicionadas em cubetas circulares ou retangulares com caminho ótico de 10 mm.

Os dados coletados após 8 acumulações, para aumento do sinal e diminuição do ruído, foram tratados para cálculo da média e linha de tendência no software Origin® 8.0. O conteúdo de elementos de estrutura secundária foram previstos com a ferramenta computacional online “K2D3” (Andrade *et al.*, 1993) e “DichroWeb” (Whitmore and Wallace, 2004).

Para o cálculo da elipcidade molar foi utilizada a equação 4, onde $[\theta]$ é a elipcidade molar residual (mDeg.cm².dmol⁻¹), θ é a elipcidade em mDeg, PM é o peso molecular da proteína em Da, l é o caminho ótico da cubeta utilizada em cm, c é a concentração da proteína em mg·mL⁻¹ e NR é o número de resíduos de aminoácido da proteína.

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot PM}{10 \cdot l \cdot c \cdot (NR-1)} \quad (4)$$

3. Resultados e Discussão

3.5- Coleta de espectros de fluorescência intrínseca e supressão por acrilamida

De posse das enzimas, avaliamos se as β -glicosidases recombinantes purificadas se encontravam enoveladas, através de espectros de fluorescência intrínseca de triptofano coletados em triplicata conforme descrito acima. As três β -glicosidases selvagens e a quimérica exibiram um pico entre 330 e 340 nm, característico de proteínas enoveladas (Figuras 30 a 33).

A seguir foi analisado o efeito supressor da acrilamida por meio da razão da intensidade de emissão máxima na ausência de supressor sobre a emissão máxima na presença da acrilamida (F_0/F) plotada em função da concentração de acrilamida. A acrilamida é um eficiente apagador da fluorescência proveniente em grande parte dos aminoácidos triptofano, e que pode ser usado para determinar a exposição desses resíduos em proteínas (Eftink e Ghiron 1976).

O plote de F_0/F versus a concentração de acrilamida ($[Q]$) permitiu o cálculo da constante colisional de apagamento de fluorescência ou constante de Stern-Volmer (K_{sv}) a partir da equação 3, apresentada nos materiais e métodos (Eftink e Ghiron, 1976).

Assim, quanto mais expostos na estrutura proteica estiverem os resíduos de triptofano, maior a probabilidade de colisão e supressão, e consequentemente maior o valor de K_{sv} . Todos os dados experimentais se ajustaram bem a essa equação conforme visto nas Figuras 30 a 33. Para determinar o erro experimental de K_{sv} , o ensaio foi feito em triplicata e o desvio padrão calculado (Tabela 3).

Figura 30: Em **A)** espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos (excitação a 295 nm) de bglA de *P. polymyxa* selvagem na ausência e presença de acrilamida nas concentrações indicadas; **B)** plote de F_0/F versus a concentração de acrilamida (Q) de cada replicata com a linha de tendência calculada sobre os dados experimentais (pontos). As inclinações das retas são o parâmetro K_{sv} (Tabela 3).

Figura 31: Em **A)** espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos (excitação a 295 nm) de bglB de *P. polymyxa* selvagem na ausência e presença de acrilamida nas concentrações indicadas; **B)** plote de F_0/F versus a concentração de acrilamida (Q) de cada replicata com a linha de tendência calculada sobre os dados experimentais (pontos). As inclinações das retas são o parâmetro K_{sv} (Tabela 3)

Figura 32: Em **A)** espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos (excitação a 295 nm) de bglThm de *Thermatoga maritima* selvagem na ausência e presença de acrilamida nas concentrações indicadas; **B)** plote de F_0/F versus a concentração de acrilamida (Q) de cada replicata com a linha de tendência calculada sobre os dados experimentais (pontos). As inclinações das retas são o parâmetro K_{sv} (Tabela 3).

Figura 33: Em **A)** espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos triptofanos (excitação a 295 nm) da quimera $N_{bglA} - C_{bglThm}$ na ausência e presença de acrilamida (Q) nas concentrações indicadas; **B)** plote de F_0/F versus a concentração de acrilamida de cada replicata com a linha de tendência calculada sobre os dados experimentais (pontos). As inclinações das retas são o parâmetro K_{sv} (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros de K_{sv} para as β -glicosidases selvagens e quimérica

	K_{sv}	K_{sv} média	Desvio padrão	Incerteza %
bglA	9,2			
	9,4	9,5	0,3	3
	9,9			
bglB	2,9			
	3,4	3,2	0,2	6
	3,2			
bglThm	3,4			
	4,8	3,8	0,8	20
	3,4			
Quimera N_{bglA} – C_{bglThm}	6,1			
	4,0	5,0	1,0	20

O grau médio de acessibilidade do supressor acrilamida aos resíduos de triptofano (K_{sv}) para bglA de *P. polymyxa* é igual a 9,5 (Figura 30), para bglB de *P. polymyxa* é igual a 3,2 (Figura 30), para bglThm de *T. maritima* é igual a 3,8 (Figura 32) e para a quimera N_{bglA} – C_{bglThm} é igual a 5,0 (Figura 33). Deste modo, a acessibilidade dos triptofanos na proteína quimérica é mais próximo à bglThm, dentre as enzimas parentais que a formam.

3.6 Coleta de espectros de dicroísmo circular

Também verificamos o correto enovelamento das enzimas purificadas através da estrutura secundária das β -glicosidases selvagens e quimérica recombinantes que foram coletados espectros de dicroísmo circular a 20°C no espectropolarímetro J-815 (JASCO- Central Analítica- IQ-USP), onde as três β -glicosidases selvagens (Figura 34A, B e C) e quimera N_{bglA}-C_{bglThm} (Figura 34D) exibiram um espectro típico de proteínas (β/α)₈ barril enoveladas.

Figura 34: Espectros de dicroísmo circular em função do comprimento de onda coletados a 20°C em espectropolarímetro. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglB de *P. polymyxa*; **C)** bglThm de *T. maritima*.; **D)** quimera N_{bglA}-C_{bglThm}. Regiões $[\theta]_{222\text{nm}}$ ou $[\theta]_{208\text{nm}}$ se refere a alfa-hélice e $[\theta]_{215\text{nm}}$ à folha beta (Greenfield 2006).

Através destes espectros e da análise da região entre 190 nm e 240 nm foi possível estimar o conteúdo e a proporção de elementos de estrutura secundária (Tabela 4) utilizando a ferramenta computacional “K2D3” (Andrade *et al.*, 1993; Kelly e Price, 2000), disponível online.

Tabela 4: Estrutura secundária predita por $\Delta\epsilon$ no software online “K2D3”.

	α -hélice (%)	fita- β (%)	estrutura randômica (%)
bglA	47	13	40
bglB	61	2,5	36
bglThm	30	20	49
Quimera N_{bglA} – C_{bglThm}	69	6	24

Como o “K2D3” leva em consideração um pequeno banco de dados de estruturas cristalográficas já determinadas, suas previsões de proporções de estrutura secundária costumam ser imprecisas.

De qualquer modo, utilizando a ferramenta computacional “DichroWeb” (Whitmore e Wallace 2004), disponível *online* (*PCDDDB: the protein circular dichroism data bank, a repository for circular dichroism spectral and metadata*) e as estruturas cristalográficas das próprias enzimas selvagens depositadas no “Protein Data Bank” (PDB) foi possível determinar mais precisamente o conteúdo e a proporção de elementos de estrutura secundária, além de gerar uma predição do espectro de dicroísmo circular na região entre 175 nm e 235 nm. Pudemos então comparar os espectros obtidos a 25°C (Figura 35) com a predição do espectro para cada uma das enzimas recombinantes (Figura 36 A; B;C), confirmando que todas apresentam sua estrutura nativa, e foram expressas adequadamente.

Figura 35: Espectros de dicroísmo circular em função do comprimento de onda coletados em espectropolarímetro J-815 das β -glicosidases selvagens recombinantes: bglA de *P. polymyxa* (♦); bglB de *P. polymyxa* (♦); bglThm de *T. maritima* (♦) e quimera N_{bglA}-C_{bglThm} (♦).

Figura 36: Predições dos espectros de dicroísmo circular em função do comprimento de onda a partir do arquivo de PDB das β glicosidases. **A)** bglA de *P. polymyxa* (PDB 1bga); **B)** bglB de *P. polymyxa* (PDB 2o9p); **C)** bglThm de *T. maritima* (PDB 1oin). Fonte: “DichroWeb” (Whitmore e Wallace 2004)

4.2- Conclusões Prévias

Espectros de fluorescência intrínseca das β -glicosidases selvagens bglA, bglB e bglThm e a quimera N_{bglA}-C_{bglThm} são típicos de proteínas enoveladas, com picos de emissão entre 330 e 340 nm.

Os experimentos de supressão de fluorescência dos triptofanos por acrilamida sugerem que para estas enzimas os resíduos de triptofano são mais acessíveis em bglA do que em bglB e bglThm. Já na quimera N_{bglA}-C_{bglThm} os triptofanos são acessíveis ao supressor semelhantemente à bglThm, enzima que contribuiu com sua porção C-terminal.

Espectros de dicroísmo circular mostraram que a β -glicosidase quimérica N_{bglA}-C_{bglThm} encontra-se enovelada, apresentando uma proporção de elementos de estrutura secundária mais semelhante à bglA do que bglThm.

Em combinação estes experimentos, tanto de fluorescência de triptofanos quanto de dicroísmo circular, sugerem que as três β -glicosidases selvagens e a quimera estão enoveladas como $(\beta/\alpha)_8$ barril.

CAPÍTULO 3

Efeitos na estabilidade da quimera

1. Introdução

1.10- Estabilidade proteica

Os organismos que exibem a capacidade de crescer em ambientes extremos com altas temperaturas e/ou pH muito ácido ou muito básico, só o fazem por produzirem enzimas extremamente estáveis. A estabilidade proteica pode ser entendida como a propriedade da proteína para preservar sua função em determinadas condições ao longo do tempo (Deller *et al.*, 2016). Assim, a compreensão dos princípios físico-químicos básicos envolvidos na estabilidade proteica auxilia necessariamente na compreensão de outros aspectos da relação estrutura-função.

A conformação de proteínas é mantida por um grande número de interações fracas. A estabilidade proteica é o equilíbrio líquido de forças, que determina se uma proteína está em sua conformação dobrada nativa ou em um estado desnaturado, sendo tipicamente pequena, da ordem de 5-10 kcal / mol (Sanz-Aparício, 1997).

Enquanto o estado “nativo” dobrado é estabilizado através de ligações dissulfeto; interações não-covalentes (eletrostáticas, ligação de Hidrogênio e van der Waals) e interações hidrofóbicas, o estado desdobrado é dominado pela contribuição entrópica (Pace, 1990).

Além disso, muitos organismos convergiram para uma estratégia comum na proteção de suas proteínas celulares contra condições ambientais adversas, acumulando altas concentrações de compostos de baixa massa molecular, conhecidos como osmólitos (aminoácidos e derivados e glicerol) que protegem proteínas contra inativação e desnaturação sem perturbar sua atividade funcional (Kremer e Kalbitzer, 2001).

1.11- Desnaturação proteica

A desnaturação envolve o rompimento das forças intramoleculares que estabilizam a estrutura secundária, terciária e quaternária das proteínas, mas não a quebra das ligações covalentes entre os átomos do esqueleto polipeptídico da molécula. Pode ser parcial ou total e também pode ser reversível ou irreversível. Em resumo, desnaturação é o processo no qual uma proteína é transformada de um estado ordenado (“nativo”) para um estado menos ordenado (desnaturado).

Geralmente é classificada de acordo com a condição externa que a induz, como desnaturação térmica por aquecimento ou resfriamento; desnaturação por pressão; desnaturação por pH por ácidos ou bases alcalinas; ou desnaturação química por desnaturantes, tais como ureia ou sais de guanidina (Freire, 1991).

Os osmólitos desnaturantes, como ureia e cloreto de guanidina, quando adicionados a soluções aquosas aumentam a solvatação dos resíduos de aminoácidos na conformação desenovelada, consequentemente gerando o

desdobramento da proteína. A maioria das proteínas desnatura em soluções concentradas destes compostos. Cada molécula de desnaturante interage simultaneamente com vários grupos da proteína, formando múltiplas ligações de hidrogênio (Rösger, 2007).

1.12- Mecanismo de dois estados

A estabilidade da proteína é medida por uma variedade de sondas e experimentos, como dicroísmo circular (CD), *Differential Scanning Calorimetry* (DSC), absorvância (Abs), fluorescência de triptofanos (FI), *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) ou *Thermal Shift Assay* e *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC).

Modelos assumem que a desnaturação de proteínas é um mecanismo de dois estados, o qual se aplica a muitas proteínas globulares de domínio único, na qual a proteína passa por uma única transição do estado “nativo” para o estado “desnaturado”. Os estados intermediários parcialmente dobrados provavelmente ocorrem, mas seriam altamente instáveis e estariam presentes no equilíbrio apenas em níveis muito baixos. De qualquer modo, o modelo mais simples, porém mais utilizado, é o modelo de reação reversível de primeira ordem. Neste modelo, as proteínas são consideradas “nativas” (N) no seu estado estrutural dobrado ou “desnaturadas” (D) no seu estado estrutural desdobrado, conforme descrito pela seguinte equação:

Supondo que as proteínas se desdobrem de acordo com o equilíbrio, a constante de equilíbrio é dada experimentalmente pela equação 6:

$$K = \frac{[y_N - y]}{[y - y_D]} \quad (6)$$

Onde y é uma medida que está sendo observada, y_N e y_D são valores de y para o estado “nativo” e para o estado desnaturado. As leis de ação de massa e conservação resultam nas equações seguintes, onde C (M) a concentração total da proteína:

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (7)$$

sendo a razão da fração desnaturada pela fração nativa igual à constante de equilíbrio

$$C = [N] + [D] \quad (8)$$

e a soma das frações desnaturada e nativa igual a 1.

Podemos isolar assim as frações desnaturada e nativa:

$$\text{fração do estado desnaturado} = [y_N - y / y_N - y_D] \quad (9)$$

$$\text{fração do estado “nativo”} = [y - y_D / y_N - y_D] \quad (10)$$

Por definição, a estabilidade termodinâmica (ΔG) de uma proteína é igual à variação da energia livre entre os seus estados nativos e desdobradas. No geral, depende do balanço entre mudanças entálpicas e entrópicas. Pode ser deduzida da constante de equilíbrio entre os dois estados conformacionais e, portanto, o ΔG entre os estados “nativo” (N) e “desnaturado” (D), é dado por:

$$\Delta G = -RT \ln (K) \quad (11)$$

onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura (K).

1.13- Desnaturação cooperativa

A desnaturação induzida por desnaturante geralmente é considerada como uma transição altamente cooperativa entre os estados N e D. Se assim for, estudos da influência de desnaturantes no equilíbrio de desnaturação de uma proteína podem fornecer informações sobre o ΔG do desdobramento da proteína na ausência do desnaturante, ou seja, sobre a estabilidade da estrutura da proteína nativa. Deste modo, como descrito no item anterior, utilizando qualquer parâmetro y que seja sensível à conformação da proteína, a constante de equilíbrio e o ΔG podem ser estimados em diferentes concentrações do desnaturante. Geralmente, supõe-se que o ΔG entre dois estados conformacionais é uma função linear da concentração de desnaturantes (Pace, 1986; Myers *et al.*, 1995). Logo, acompanhando-se o deslocamento do equilíbrio $N \leftrightarrow D$ em função da concentração de desnaturante, pode ser estimado o parâmetro “ m ”, que reflete o efeito do desnaturante sobre a estabilidade da proteína. Um parâmetro “ m ” elevado indica alta cooperatividade na desnaturação da proteína, gerando uma transição abrupta entre os estados N e D, já que graficamente ele representa a inclinação da transição.

Como já comentado acima, a desnaturação da estrutura de uma proteína pode ser um processo de um ou vários estágios. Sob condições desnaturantes, a estrutura da proteína pode mudar como um todo ou em vários estágios, ou seja, diferentes partes da proteína podem ser rompidas por diferentes condições de desnaturação.

Assim, no primeiro caso, a proteína se desnatura como uma unidade única e observa-se apenas uma transição entre os estados N e D. No segundo mecanismo, algumas porções ou regiões de proteínas grandes se desnaturam separadamente de forma reversível e altamente cooperativa. De forma que estruturas de grandes proteínas globulares são subdivididas em unidades cooperativas, chamadas de domínios estruturais, que se dobram e se desdobram mais ou menos independentemente. Assim quando a proteína tem uma estrutura de múltiplos domínios e a estabilidade dos diferentes domínios difere, observa-se um perfil de desnaturação complexo. No entanto, cabe notar que se os domínios da proteína são semelhantes, eles desnaturam sob as mesmas condições desnaturantes, e todos os parâmetros que especificam o estado conformacional da proteína mudam simultaneamente, dando a impressão de que a proteína se desnatura em um único processo cooperativo, apresentando assim apenas uma transição (Monsellier e Bedouelle, 2005).

2. Material e Métodos

2.11 – Cinética de inativação térmica acompanhada pela atividade enzimática

Para determinação da estabilidade térmica, 3 mL de amostras da β -glicosidases selvagens e quiméricas foram incubadas em banho-maria a 37°C ou 47°C ou 95°C, sendo retiradas alíquotas de 250 μ L após 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 min. Com estas alíquotas realizaram-se ensaios de atividade enzimática a 30°C utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 8 mmol·L⁻¹ em tampão citrato fosfato 0,1 mol·L⁻¹ pH 6. Após intervalos de tempo, a hidrólise do substrato foi

interrompida com solução de carbonato de sódio $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 11, detectando-se a absorbância do produto por espectrofotometria utilizando-se o comprimento de onda 415 nm em leitor de microplacas Elx800 (BioTek™ Instruments). Em seguida foram construídos gráficos de logaritmo da porcentagem de atividade enzimática remanescente em função do tempo de inativação (Segel, 1993), a partir dos quais pode ser avaliada a constante de velocidade de inativação (k_{obs}).

$$k_{\text{obs}} = 2,3 \cdot \text{inclinação} \quad (12)$$

2.12 – Determinação de T_m por "Differential Scanning Fluorimetry"

A temperatura de transição de desnaturação (T_m) foi determinada para as β -glicosidases selvagens e quimeras utilizando "varredura de fluorescência diferencial" (DSF), também chamada de "Thermal Shift Assay" (Pantoliano *et al.*, 2001). Sendo empregada uma faixa de 0,1 μg a 6,0 μg de β -glicosidase e completando-se o volume de reação para 22,5 μL com tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0 em um tubo de PCR óptico, aos quais foi acrescentado 2,5 μL de corante "SyproOrange® Protein Gel Stain" (SIGMA-ALDRICH) previamente diluído (5 x, 50 x ou 500 x). O equipamento de "PCR real time" qRT PCR ABI 7500 (Applied Biosystems™) foi ajustado para o modo de "melting temperature", onde executa uma rampa de aumento temperatura com incremento de 0,5% por etapa e detecta a fluorescência emitida pela amostra com filtro para o corante "Syber Green".

Para determinar a T_m , gráficos de fluorescência *versus* T ($^{\circ}\text{C}$) foram construídos e as curvas obtidas foram ajustadas para a equação sigmoidal (13), utilizando o software de ajustes interativos Origin® 8.0.

$$y = \frac{(B_1 + B_2 \cdot T) + (A - (B_1 + B_2 \cdot T))}{1 + e^{(T-T_m)/dx}} \quad (13)$$

Onde y é a leitura de fluorescência, T é a temperatura, A é a reta que descreve o patamar da região antes da transição, $B_1 + B_2 \cdot T$ é a reta que descreve o patamar da região pós-transição, T_m (temperatura de *melting*) é a temperatura de transição, onde 50% da população de enzimas está no estado “nativo” e 50% está desnaturada e dx é um parâmetro que descreve o formato da curva de transição.

2.13 – Determinação de T_m por espectros de dicroísmo circular

Para determinação da estabilidade da estrutura secundária frente à temperatura, a T_m das β -glicosidases selvagens e quiméricas foi determinada através da coleta de espectros de dicroísmo circular. As medidas de elipcidade a 201 nm, 203 nm, 205 nm, 208 nm, 218 nm e 220 nm foram utilizadas como indicadores da perda de estrutura secundária e, portanto, da desnaturação proteica. Para isso a elipcidade foi medida em função do aumento da temperatura, utilizando uma rampa de temperatura de 20°C a 90°C com aumento de 0,5°C/min após 5 s da temperatura alvo ser atingida. As leituras foram adquiridas em espectropolarímetro J-815 (JASCO- Central Analítica do IQ-USP) com fluxo constante de nitrogênio de alta pureza e termostatização provida por “*peltier*”.

Os valores de elipcidade foram transformados em elipcidade molar utilizando a equação 14. Para determinar a T_m , gráficos de elipcidade molar *versus* T (°C) foram construídos e as curvas obtidas foram ajustadas para a equação sigmoidal (8), utilizando o software de ajustes iterativos Origin® 8.0.

$$y = (A_2 \cdot x + B_2) + \frac{(A_1 \cdot x + B_1) - (A_2 \cdot x + B_2)}{1 + e^{\frac{x - T_m}{dx}}} \quad (14)$$

Onde y é a leitura de elipicidade, x é a temperatura, $A_1 \cdot x + B_1$ é a reta que descreve o patamar da região antes da transição, $A_2 \cdot x + B_2$ é a reta que descreve o patamar da região pós-transição, T_m é a temperatura de transição, onde 50% da população de enzimas está no estado “nativo” e 50% está desnaturada e dx é um parâmetro que descreve o formato da curva de transição.

A fração de proteína desnaturada em cada temperatura da fase de transição (desnaturação) foi calculada utilizando as medidas de $[\theta]_{220\text{nm}}$ ou $[\theta]_{208\text{nm}}$ das linhas de base das regiões de pré-transição e pós-transição segundo descrito por Pace e Scholtz (1997). Medidas de elipicidade do tampão (branco) foram tomadas na menor e maior temperatura para garantir a estabilidade de leitura do equipamento. Além disso, após coleta na maior temperatura a amostra foi resfriada até a temperatura inicial e uma nova medida de $[\theta]_{220\text{nm}}$ ou $[\theta]_{208\text{nm}}$ foi feita, avaliando assim a reversibilidade do processo de desnaturação. Gráficos elipicidade molar *versus* T (°C) foram construídos e ajustados na equação acima utilizando-se o software Origin® 8.0, para cálculo de T_m .

2.14 – Desnaturação química

2.14.1 – Determinação da estabilidade estrutural proteica em ureia acompanhada por fluorescência

Para avaliar a estabilidade estrutural, foi feito um ensaio de desnaturação com ureia (SIGMA ALDRICH®). Foram preparados tubos de ensaio contendo concentrações de ureia entre 0 e 10 mol·L⁻¹, diluída em tampão citrato-fosfato 0,1 mol·L⁻¹ pH 6,0 a partir da solução estoque de ureia 10,5 mol·L⁻¹ preparada no mesmo tampão. Posteriormente amostras das β -glicosidases selvagens e

quiméricas em tampão citrato-fosfato 0,1 mol·L⁻¹ pH 6,0 foram combinadas com as diferentes diluições de ureia. Foram testadas incubações de 2 h e 24 h.

As concentrações de ureia foram normalizadas através do índice de refração, utilizando refratômetro P20-RL1 (Narszawa), segundo a equação 15 (Nozaki, 1972; Pace, 1986).

$$C = 117,66 \cdot (\Delta N) + 29,753 (\Delta N)^2 - 185,56 \cdot (\Delta N)^3 \quad (15)$$

Onde C é a concentração de ureia normalizada e ΔN é a diferença entre o índice de refração da solução estoque e o da água ou tampão citrato-fosfato 0,1 mol·L⁻¹ pH 6,0.

Após isso, foram coletados espectros de fluorescência intrínseca de cada uma das amostras, mantendo-as termostatizadas a 30°C.

O conjunto de dados de relacionados à emissão de fluorescência *versus* a concentração de ureia foi ajustado utilizando-se o software Origin® 8.0 na equação 16:

$$y = A_1 + \frac{(A_3 \cdot x + A_2) - A_1}{1 + e^{\frac{c - c_{50}}{dx}}} \quad (16)$$

Onde y é uma variável ligada à intensidade de emissão de fluorescência, x é a concentração de desnaturante, $A_3 \cdot x + A_2$ é a reta que descreve o patamar da região antes da transição, A_1 é a reta que descreve o patamar da região pós-transição, c_{50} é a concentração de desnaturante onde 50% da população de enzimas está no estado “nativo” e 50% está desnaturada e dx é um parâmetro que descreve o formato da curva de transição.

Também foi feita a determinação do parâmetro “ m ” pelo método de extrapolação linear (Pace e Scholtz, 1997; Pace e Shaw, 2000), com a equação 17.

$$dx = \frac{RT}{m} \quad (17)$$

Onde dx é um parâmetro que descreve o formato da curva na região da transição, R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (em Kelvin).

2.14.2 – Determinação da estabilidade estrutural proteica em cloreto de guanidina acompanhada por fluorescência

Para avaliar a estabilidade estrutural, também foi feito um ensaio de desnaturação com cloreto de guanidina (SIGMA ALDRICH®). Foram preparados tubos de ensaio contendo concentrações de desnaturante entre 0 e $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, diluída em tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0 a partir da solução estoque de cloreto de guanidina $8,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada no mesmo tampão. A pureza deste reagente foi avaliada medindo seu espectro de absorção de 200 a 350 nm (Nozaki, 1972). Posteriormente amostras das β -glicosidases selvagens e quiméricas em tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0 foram incubadas com as diferentes diluições do desnaturante.

As concentrações de cloreto de guanidina foram normalizadas através do índice de refração, utilizando refratômetro P20-RL1 (Narszawa), segundo a equação 18 (Nozaki, 1972; Pace, 1986).

$$C = 57,147 \cdot (\Delta N) + 38,68 \cdot (\Delta N)^2 - 91,60 \cdot (\Delta N)^3 \quad (18)$$

Onde C é a concentração de desnaturante normalizada e ΔN é a diferença entre o índice de refração da solução estoque e o da água ou tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0.

Após isso, foram coletados espectros de fluorescência de cada uma das amostras termostatizadas a 30°C . O conjunto de dados de fluorescência *versus* a concentração de desnaturante foi ajustado à equação 16 (acima) utilizando-se o software Origin® 8.0. Foi também feita a determinação do parâmetro “ m ” (Pace e Scholtz, 1997; Pace e Shaw, 2000) com a equação 17 (acima).

3. Resultados e Discussão

3.7- Cinética de inativação térmica acompanhada por atividade enzimática

A estabilidade estrutural foi avaliada através da inativação térmica das β -glicosidases selvagens e quimérica, sendo acompanhada pela atividade catalítica remanescente, utilizando o tempo de 0 minutos como sendo 100% da atividade. Em seguida foram construídos gráficos (Figuras 37, 38, 39 e 40) de logaritmo da porcentagem de atividade enzimática remanescente em função do tempo de inativação (Segel, 1993), a partir dos quais pode ser avaliada a constante de velocidade de inativação (k_{obs}), a meia-vida ($t_{1/2}$) e consequentemente a cinética do processo de desnaturação nas temperaturas testadas (Tabela 5).

Muitos autores consideram que a inativação térmica das enzimas segue a cinética de primeira ordem, portanto o logaritmo da atividade enzimática remanescente, na temperatura testada, em função do tempo é linear (Toledo, 1999) e nos permite obter a constante de inativação térmica das enzimas em diferentes temperaturas.

Figura 37: Cinética de inativação térmica de bglA de *P. polymyxa*. **A)** plote de atividade enzimática remanescente após incubação a 47°C; **B)** linearização utilizando o log da % da atividade enzimática remanescente após inativação térmica a 47°C; **C)** plote de atividade enzimática remanescente após incubação a 37°C; **D)** linearização utilizando o log da % atividade enzimática remanescente após inativação térmica a 37°C. Dados experimentais (losangos) e ajuste dos dados (linha).

Figura 38: Cinética de inativação térmica de bglB de *P. polymyxa*. **A)** plote de atividade enzimática remanescente após incubação a 47°C; **B)** linearização utilizando o log da % da atividade enzimática remanescente após inativação térmica a 47°C. Dados experimentais (losangos) e ajuste dos dados (linha).

Figura 39: Cinética de inativação térmica de bgIThm de *T. maritima*. **A)** plote de atividade enzimática remanescente após incubação a 47°C; **B)** linearização utilizando o log da % da atividade enzimática remanescente após inativação térmica a 47°C; **C)** linearização da fase rápida (40% das enzimas em 10 min) de inativação térmica a 95°C, levando a formação de intermediário cuja inativação é mostrada no próximo painel; **D)** linearização da fase lenta de inativação térmica a 95°C; **E)** plote de atividade enzimática remanescente após incubação a 120°C em banho seco. Dados experimentais (losangos) e ajuste dos dados (linha).

É interessante notar que apesar da semelhança estrutural entre bglA e bglB, as enzimas provenientes da bactéria mesófila mostraram cinética de desnaturação distintas a 47°C, sendo que bglA inativa-se mais rapidamente que bglB (Tabela 5; Figuras 37B e 38B).

Por outro lado, como esperado, bglThm mostrou-se estável a 47°C, já que o plote da atividade remanescente *versus* tempo (Figura 39A) gerou uma reta paralela ao eixo x, pois as velocidades quase não variaram, indicando que a enzima não perdeu atividade enzimática durante a pré-incubação nesta temperatura. Curiosamente a bglThm inativa-se a 95°C para 45% da atividade enzimática remanescente em 10 min, possivelmente indicando a formação de um intermediário mais “estável”, porém menos ativo, que se desnatura mais lentamente (Figuras 39C e 39D). Este perfil de inativação em duas etapas não foi observado para bglA e bglB. Finalmente, a 120°C a inativação de bglThm é muito mais rápida, não sendo possível nesta temperatura verificar a formação do intermediário.

Figura 40: Cinética de inativação térmica da quimera N_{bglA} – C_{bglThm}. **A)** plote de atividade enzimática remanescente após incubação a 47°C; **B)** linearização utilizando o log da % da atividade enzimática remanescente após inativação térmica a 47°C. Dados experimentais (losangos) e ajuste dos dados (linha).

A β -glicosidase quimérica $N_{bglA} - C_{bglThm}$, composta pelo “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” N-terminal de $bglA$ (enzima parental mesófila) e pelo “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” C-terminal de $bglThm$ (enzima parental termófila), apresenta estabilidade térmica a 47°C intermediária à $bglA$ e $bglThm$, sendo sua constante de desnaturação menor do que de $bglA$ e maior do que $bglThm$ (Figura 40, Tabela 5). De fato, a 47°C metade da atividade de $bglA$ é perdida em 0,6 min (Figura 37), enquanto que metade da atividade da quimera é perdida em cerca de 14 min (Figura 40), um ganho considerável de termo estabilidade em relação à enzima parental $bglA$. Por outro lado, na comparação com $bglThm$, cuja atividade permanece inalterada a 47°C , nota-se que claramente a quimera não é uma proteína termófila.

Tabela 5: Parâmetros de cinética de inativação térmica acompanhada pela atividade residual para as β -glicosidases selvagens e quimérica

	temperatura ($^\circ\text{C}$)	constante de inativação (k_{obs}) (min^{-1})	meia vida ($t_{1/2}$) (min)
bglA	37	0,20	3,4
	47	1,18	0,6
bglB	47	0,07	10
bglThm	47	0	-*
	95**	0,11	6,3
	95***	0,005	139
	120	ND	
Quimera $N_{bglA} - C_{bglThm}$	47	0,05	13,9

*não possui meia-vida, pois é termoestável nesta temperatura

** fase de inativação rápida com formação de intermediário

*** fase de inativação lenta do intermediário

ND: dados a 120°C não foram linearizados, pois há somente dois pontos diferentes de zero

3.8 -Efeito da inativação térmica nas β -glicosidases recombinantes

Para analisar os processos de desnaturação térmica seguindo as transições entre os estados “nativo” (N) e “desenovelado” (D) das β -glicosidases selvagens e quimérica foram utilizadas duas técnicas distintas que avaliam este processo com diferentes indicadores. Primeiro pela fluorescência de uma sonda extrínseca por “*Differential Scanning Fluorimetry*” e segundo pelas leituras de dicroísmo circular.

3.8.1- Determinação da temperatura de melting (T_m) por DSF

Para verificar a estabilidade estrutural das β -glicosidases selvagens foram executados experimentos de “*Differential Scanning Fluorimetry*” (DSF), também chamado de “*ThermoFluor*”, uma técnica descrita por Pantoliano *et al.*, (2001). Como sonda extrínseca fluorescente foi usado o corante *SyproOrange*®. Foram testadas três concentrações diferentes do corante, previamente diluído a 5x, 50x e 500x, sendo que o 50x mostrou resultados mais claros e então foi utilizado na padronização dos ensaios. As emissões de fluorescência foram coletadas em um gradiente de temperatura de 25°C a 95°C com incrementos de 0,5% (0,5°C a cada min totalizando 345 leituras).

O acompanhamento da desnaturação térmica de uma proteína por esse método é possível devido à propriedade de emissão de fluorescência do corante quando ligado a estruturas hidrofóbicas e de baixa fluorescência em ambiente aquoso. Assim, quanto maior a população da proteína desnaturada, mais o corante se acumula nas porções hidrofóbicas expostas da proteína, emitindo um maior sinal de fluorescência, que é captado pelo equipamento de qRT PCR ABI 7500. Através dessa análise pode ser determinada, pelo ajuste das curvas obtidas na equação 13,

a temperatura de *melting* (T_m), temperatura na qual 50% da população da proteína encontra-se no estado enovelado “nativo” (N) e 50% no estado desenovelado (D), ilustrado no esquema abaixo (Figura 41).

Figura 41: Esquema da curva de desnaturação térmica. Adaptado de Pace 2000.

$$y = \frac{(B_1 + B_2 * T) + (A - (B_1 + B_2 * T))}{1 + e^{(T - T_m) / dx}} \quad (13)$$

Após os ensaios, os dados foram plotados como sinal de fluorescência *versus* temperatura para cada uma das enzimas selvagens (Figura 42A, 42B e 42C) e enzima quimérica (Figura 42D). Os dados foram derivados e tratados no software Origin® 8.0 para obter mais precisamente a temperatura de transição (T_m) em cada curva, que foi então calculada através do pico da primeira derivada da curva obtida. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e o erro da T_m foi estimado através do desvio padrão dessa triplicata (Tabela 6).

Nota-se que após a faixa em torno de 50°C o sinal de fluorescência da sonda extrínseca diminui gradualmente, possivelmente devido ao efeito de agregação das proteínas desnaturadas que se desligam da sonda extrínseca fluorescente.

Figura 42: Plotes de fluorescência *versus* temperatura em experimentos de DSF das enzimas selvagens e quimérica. **A)** *bglA*; **B)** *bglB*; **C)** *bglThm*; **D)** enzima quimérica $N_{bglA} - C_{bglThm}$. Amostras diluídas em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6, segundo as concentrações indicadas na legenda, na presença da sonda SyproOrange diluída 50 vezes. Dados experimentais (pontos) e ajuste dos dados (linha).

Como pode ser observado, o perfil de desnaturação de diferentes concentrações das β -glicosidases *bglA* e *bglB* de *P. polymyxa* possuem T_m semelhantes (T_m média de 36°C $\pm$ 2 e 44°C $\pm$ 1, respectivamente).

Não foi possível acompanhar a desnaturação de bglThm (Figura 42C) no intervalo térmico utilizado, confirmando ser uma enzima termoestável. Por fim, a quimera N_{bglA} – C_{bglThm} apresentou uma T_m de $56,3^\circ\text{C} \pm 0,6$, colocando-se entre as suas parentais bglA e bglThm, mesma condição observada na cinética de desnaturação térmica (Tabela 5).

Tabela 6: Parâmetros de cinética de inativação térmica por DSF para as β -glicosidases selvagens e quimérica

Enzima	Concentração (μg)	T_m ($^\circ\text{C}$)	T_m média ($^\circ\text{C}$)	Desvio padrão	Incerteza %
bglA	1,26	38,3			
	1,5	35,6	36	2	5
	1,8	33,8			
bglB	1	45,1			
	1,38	44,1	44	1	3
	1,76	42,2			
bglThm	1,5	ND	-	-	-
Quimera N _{bglA} – C _{bglThm}	0,5	55,8			
	1,0	56,5	56,3	0,3	0,6
	1,5	56,6			

Incertezas foram determinadas através do desvio padrão de 3 experimentos independentes.

ND: como a desnaturação de bglThm ocorre acima das temperaturas testadas, não foi determinada uma T_m .

3.8.2- Determinação da temperatura de *melting* (T_m) por DC

Adicionalmente para acompanhar a desnaturação térmica das enzimas recombinantes foram coletadas leituras de dicroísmo circular em um gradiente de temperatura entre 20°C e 90°C com mensuração de elipsidade molar a 201 nm, 203 nm, 208 nm, 215 nm e 222 nm, pois medidas abaixo de 250 nm dependem apenas das mudanças na estrutura secundária da proteína, permitindo monitorar suas variações e utilizá-las como indicadores da desnaturação proteica e desta forma determinar a temperatura de desnaturação (T_m).

Medidas de elipsidade do tampão (branco) foram tomadas na menor e maior temperatura para garantir a estabilidade de leitura do equipamento (dado não mostrado). Para determinar a T_m mostrada na Tabela 7, os dados obtidos foram tratados no software Origin® 8.0 e os valores dos parâmetros da equação sigmoidal 8 (item 2.3.9) encontrados.

As transições da elipsidade molar a 215 e 222 nm ficaram menos acentuadas, especialmente para bglB, e por isso exibem maior incerteza do que a 208 nm, como pode ser observado na Figura 43 e Tabela 7. Por conta disso, os dados obtidos a partir de leituras em 215 e 222 nm foram desconsiderados e as medições de T_m foram realizadas utilizando apenas o comprimento de onda de 208 nm. Sabendo que alfa-hélices são os motivos estruturais preferencialmente detectados com a elipsidade a 208 nm, os dados analisados refletem principalmente a desnaturação destes elementos.

Adicionalmente nota-se que os parâmetros A_1 , A_2 e A_3 , que descrevem os comportamentos das pré-transição e pós-transição, são particularmente difíceis de estimar, pois as inclinações são tênues e o ruído experimental se sobrepõe a elas.

Contudo, os parâmetros da transição (T_m e dx) apresentam baixa incerteza percentual, especialmente considerando a elipsidade a 208 nm, como já comentado acima.

Em combinação estes experimentos sugerem que bglA tem termo estabilidade um pouco menor do que bglB (Tabelas 7 e 8), como já visto por DSF (Tabela 6). Porém, a T_m medida por CD para bglB é maior do que aquela estimada no DSF. Mais uma vez não foi possível observar a transição do estado “nativo” para desnaturado para a bglThm, demonstrando novamente sua termo estabilidade nas temperaturas utilizadas.

Tabela 7: Valores das constantes que descrevem a desnaturação térmica das β -glicosidases selvagens. Constantes obtidas através do ajuste das curvas com transição na equação 14 a partir das leituras de dicroísmo circular.

Constantes obtidas no ajuste										
Leituras em 208 nm					Leituras em 215 nm			Leituras em 222 nm		
valor desvio padrão incerteza %					valor desvio padrão incerteza %			valor desvio padrão incerteza %		
bglA	A ₁	-8,1	0,2	2,5	-11,6	0,2	1,7	-12,7	0,2	1,6
	A ₂	-1,5	0,6	40	-0,7	1,6	228	1	2	100
	A ₃	0,010	0,008	80	-0,01	0,02	200	-0,04	0,02	50
	T _m	38,5	0,5	1,3	48	1	2	51,5	0,9	1,8
	dx	3,3	0,5	15	7,2	0,7	9,7	7,9	0,6	7,6
bglB	A ₁	-3,5	0,1	2,9	-4,1	0,1	2,4	-3,9	0,1	2,6
	A ₂	-0,1	2,3	2300	6	20	333	1,7	6,6	388
	A ₃	-0,01	0,02	200	-0,1	0,2	200	-0,04	0,07	175
	T _m	60	7	12	86	29	33	74	14	19
	dx	11	2	18	14	2	14	12	2	16

Tabela 8: Temperatura de desnaturação (T_m) calculada a partir das leituras de dicroísmo circular em 208 nm.

	T_m (°C)
bglA	$38,5 \pm 0,5$
bglB	60 ± 7

Figura 43: Perfil de desnaturação térmica das β -glicosidases selvagens recombinantes acompanhada por espectros de dicroísmo circular sob um gradiente de temperaturas entre 20°C e 90°C, coletados em espectropolarímetro J-815. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglB de *P. polymyxa*. Dados experimentais de $[\theta]_{222\text{nm}}$ (♦) ou $[\theta]_{208\text{nm}}$ (♦) se referem às alfa-hélices e $[\theta]_{215\text{nm}}$ (♦) às folhas beta (Greenfield 2006) e ajuste dos dados na equação 8 (linha).

3.8.3- Comparação das temperaturas de *melting*

Como já apresentado acima, a temperatura de desnaturação foi determinada para as β -glicosidases selvagens em diversas concentrações em ensaios de “*Differential Scanning Fluorimetry*” (DSF) e também através de leituras de dicroísmo circular a 208 nm. Os valores de T_m obtidos pelas duas técnicas estão representados na Figura 44. Os valores obtidos com leituras de CD a 215 e 222 nm foram desconsiderados, conforme já explicado acima, e foram incluídos nesta figura apenas para discussão.

Figura 44: Valores de T_m das β -glicosidases selvagens recombinantes acompanhada por duas técnicas: dicroísmo circular (CD) e *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF). O erro experimental foi estimado pelo ajuste no software Origin® 8.0.

Percebe-se que para bglA as T_m obtidas por DSF, $36^\circ\text{C} \pm 1$, e $\text{CD}_{[\theta]208\text{nm}}$, $38,5^\circ\text{C} \pm 0,5$, tiveram concordância, diferentemente do que para bglB, para qual a T_m média de $44^\circ\text{C} \pm 1$ obtidas por DSF e a T_m $60^\circ\text{C} \pm 7$ obtida por $\text{CD}_{[\theta]208\text{nm}}$ foram muito diferentes. A discrepância é ainda maior no caso das T_m calculadas por leituras a 215 e 222 nm para bglB e até mesmo para bglA. Assim, parece razoável considerar apenas os dados de DSF neste momento.

3.9- Efeito da inativação química nas β -glicosidases recombinantes

Como as concentrações do estado desnaturado da proteína são geralmente indetectáveis na ausência de um agente desnaturante. Em seguida a estabilidade estrutural das β -glicosidases foi ainda avaliada em ensaios de desnaturação química em diferentes concentrações de ureia e cloreto de guanidina, acompanhada por espectro de fluorescência dos triptofanos. As concentrações de desnaturante foram normalizadas através do índice de refração, segundo Nozaki (1972). Foram testadas diferentes concentrações da solução estoque de desnaturante, buscando a concentração mais estável a 30°C, para o processo atingir o equilíbrio. Comparamos então a estabilidade $\Delta G_{(H_2O)}$ e o parâmetro “ m ”, coeficiente de cooperatividade para um equilíbrio de dois estados de desdobramento.

3.9.1- Desnaturação química por ureia das β -glicosidases recombinantes

Primeiramente foram testados diferentes tempos de incubação da enzima com ureia, para avaliar se o processo havia atingido o equilíbrio, como descrito na seção de materiais e métodos. Como este desnaturante não é estável em solução aquosa podendo ocorrer hidrólise ou degradação espontânea (Figura 45), tomou-se o cuidado de no momento do uso determinar as concentrações de ureia e normalizá-las calculando a sua molaridade na solução estoque e em cada diluição através do índice de refração, mensurado em refratômetro, como descrito no item 3.9.2.

Figura 45: Conversão espontânea de ureia em amônia

Em seguida foram testados diferentes tempos de incubação da enzima com ureia, para avaliar se o processo havia atingido o equilíbrio, como descrito na seção de materiais e métodos.

Como a incubação da proteína recombinante com ureia por 2 horas não difere nos espectros de fluorescência dos ensaios incubados por 24 horas (Figura 46), utilizou-se o tempo de 2 horas para a padronização dos ensaios, o que também evita a ocorrência de outros processos paralelos em um ensaio muito longo, como por exemplo a agregação das proteínas desnaturadas.

Figura 46: Comprimento de onda de emissão máxima de bglA incubada em diferentes concentrações de ureia por 2 horas (♦) e 24 horas (■).

Para avaliar qual seria a melhor forma de tratar os dados, o processo de desnaturação química das enzimas selvagens bglA, bglB e bglThm foi acompanhado por diferentes parâmetros.

Assim, os resultados foram tratados utilizando:

1 - o deslocamento do comprimento de onda máximo (Figura 47A, 48A e 49A), que é frequentemente utilizado pela literatura (Monsellier; Bedouelle, 2005);

2 - fixando um comprimento de onda para avaliar a mudança na intensidade da emissão. Porém, este parâmetro possui menor sensibilidade, uma vez que a diferença entre a população de proteína “nativa” e de proteína desnaturada pode ser pequena.

Os dados obtidos também foram tratados de uma 3ª forma calculando-se razões entre intensidades de emissão em comprimentos de onda fixos que correspondessem à proteína nativa e desnaturada. Foram então usadas: a razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm (Figura 47B, 48B e 49B); o *parâmetro A* (Figura 47C, 48C e 49C), que é uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm (Turoverov; Kuznetsova, 2003), e a razão das intensidades de emissão no λ_{max} a 0 mol·L⁻¹ (mínimo de desnaturante) pelas intensidades de emissão no λ_{max} a 9,5 mol·L⁻¹ (máximo de desnaturante) de ureia (Figura 47D, 48D e 49D).

Figura 47: Perfil de desnaturação da bglA de *P. polymyxa* em função da concentração de ureia. **A)** parâmetro $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo); **B)** razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm; **C)** “parâmetro A”, uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm; **D)** razão das intensidades de emissão de fluorescência máximas do espectro a 0 molar e 9,5 molar de ureia; **E)** porcentagem da intensidade de emissão no $\lambda_{\text{máx}}$ de 0 molar de ureia; **F)** porcentagem da intensidade de emissão no $\lambda_{\text{máx}}$ de 9 molar de ureia.

Figura 48: Perfil de desnaturação da bgIB de *P. polymyxa* em função da concentração de ureia. **A)** parâmetro $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo); **B)** razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm; **C)** “parâmetro A”, uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm; **D)** razão das intensidades de emissão de fluorescência máximas do espectro a 0 molar e 9,5 molar de ureia; **E)** porcentagem da intensidade de emissão no $\lambda_{\text{máx}}$ de 0 molar de ureia; **F)** porcentagem da intensidade de emissão no $\lambda_{\text{máx}}$ de 9 molar de ureia.

Figura 49: Perfil de desnaturação da bglThm em função da concentração de ureia. **A)** parâmetro $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo); **B)** razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm; **C)** “parâmetro A”, uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm; **D)** razão das intensidades de emissão de fluorescência máximas do espectro a 0 mol·L⁻¹ (~335 nm) e 9,5 mol·L⁻¹ de ureia (~341 nm); **E)** porcentagem da intensidade de emissão no $\lambda_{\text{máx}}$ de 0 mol·L⁻¹ de ureia (~335 nm); **F)** porcentagem da intensidade de emissão no $\lambda_{\text{máx}}$ de 7,7 mol·L⁻¹ de ureia (~340 nm).

Cada uma das formas de tratamento mostrou desvantagens em representar a transição do estado enovelado para desenovelado das β -glicosidasas recombinantes, sendo que de fato não se observou uma transição (Painéis de A a D nas Figuras 47 a 49).

Figura 50: Espectros de emissão de fluorescência intrínseca das enzimas bglA e bglB na ausência (em azul) e na presença do desnaturante ureia na concentração média (em verde) e máxima utilizadas (em vermelho).

A análise da intensidade de fluorescência tem como problema o fato da intensidade da luz de excitação e emissão sofrerem oscilações (inerentes do espectrofluorímetro). Como pode ser observado na Figura 50, além da diferença de intensidades entre os espectros, o formato dos espectros para a mesma enzima em concentrações diferentes de desnaturante não se mantém simétrico, como se ocorresse junto à diminuição das intensidades uma “deformação” no formato. Portanto, conforme aumenta a concentração de desnaturante não há apenas um deslocamento do comprimento de onda máximo em direção a valores maiores que 340 nm (“para a direita”).

Para superar este problema as intensidades de emissão foram normalizadas, calculando-se para cada curva as porcentagens das intensidades em cada comprimento de onda em relação à emissão máxima da curva, sendo a intensidade de emissão máxima considerada como 100%. Desta forma pode-se observar mais claramente a mudança, durante a desnaturação proteica, do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e no formato do espectro. Assim como o deslocamento do λ_{max} do espectro da proteína desnaturada em relação ao da proteína nativa.

Com esta otimização, os dados foram tratados utilizando a leitura da porcentagem da intensidade de emissão no comprimento de onda máximo a 0 mol·L⁻¹ de ureia (Figura 47E, 48E e 49E) e a leitura da porcentagem da intensidade de emissão no comprimento de onda máximo a 9 mol·L⁻¹ de ureia (Figura 47F, 48F e 49F), onde claramente se observa o perfil de transição nos casos de bglA e bglB.

Para avaliar a reprodutibilidade do ensaio e de cada forma de tratar os dados, a desnaturação química foi repetida 3 vezes e o conjunto de dados tratados como descrito acima. Em seguida, as curvas obtidas foram ajustadas na equação 16, descrita no material e métodos, com o software Origin® 8.0.

$$y = A_1 + \frac{((A_2 + A_3 \cdot c) - A_1)}{1 + e^{(c-50)/dx}} \quad (16)$$

Onde Y é o valor do parâmetro a ser analisado em cada concentração de ureia (c); A_1 é o valor de Y no patamar atingido no final da curva quando toda proteína está desenovelada, A_2 é o valor de Y no patamar do início da curva quando a amostra contém apenas proteína enovelada e A_3 é a inclinação deste patamar na fase pré-transição quando a amostra ainda contém apenas proteína enovelada.

c_{50} é a concentração onde 50% da população de enzima encontra-se na forma desnaturada e dx é a constante de “inclinação” da curva na região de transição, correspondente a RT/m .

Figura 51: Esquema da curva de desnaturação química com o desnaturante ureia.

Este ajuste permite assim, a determinação do parâmetro “ m ” pelo método de extrapolação linear (Pace e Scholtz, 1997; Pace e Shaw, 2000), parâmetro este que representa o efeito do desnaturante sobre a estabilidade da proteína.

Dada a reprodutibilidade dos experimentos, as três repetições foram tratadas como um único conjunto de dados para efetuar o ajuste mencionado acima (Figura 52). Todas as constantes determinadas a partir do ajuste são apresentadas na Tabela 9.

Figura 52: Perfil de desnaturação química em função da concentração de ureia. **A)** bglA; **B)** bglB; **C)** bglThm; **D)** perfis reunidos para melhor comparação, mostrando a porcentagem da população de enzimas que estão no estado nativo em função da concentração do desnaturante ureia. Sendo bglA (em verde); bglB (em azul); e bglThm (em vermelho). Baseado na reunião das triplicadas mostradas nas Figuras 47E, 48E e 49E. Dados experimentais (losangos) e ajuste dos dados na equação 19 (linha contínua). Os parâmetros determinados a partir deste ajuste estão na Tabela 9.

Tabela 9: Valores das constantes que descrevem a desnaturação química de bglA e bglB por ureia.

		Constantes no ajuste individual			Constantes da triplicata**	Desvio padrão	Incerteza %
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			
bglA	A_1	86,4	86,8	86,9	86,4	0,01	0,01
	A_2	99,6	99,7	100,0	99,6	0,5	0,5
	A_3	-0,6	-0,5	-0,3	-0,3	0,2	66
	c_{50}	8,3	7,3	7,9	7,9	0,2	2,5
	dx	0,4	0,5	0,6	0,9	0,1	11
	" m "*	1203,4	1203,4	859,6	668,6	0,2	0,03
bglB	A_1	77,3	77,7	73,6	73,9	0,8	1
	A_2	99,6	100,5	100,0	99,7	0,6	0,6
	A_3	-1,5	-1,7	-1,6	-1,5	0,2	13
	c_{50}	6,6	6,9	7,7	7,1	0,2	2,8
	dx	0,4	0,7	0,6	0,7	0,1	14
	" m "*	1504,3	859,6	1002,9	859,6	0,1	0,01
bglThm	ND						

Constantes obtidas através do ajuste das curvas das Figuras 49E, 50E e 51E, em triplicata, acompanhando o percentual de emissão no comprimento de onda máximo a 0 molar de ureia.

*parâmetro " m " expresso em $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$, calculado a partir de dx usando a equação $RT/''m''$.

**constantes calculadas a partir do ajuste simultâneo da triplicata na equação 19 usando software Origin® 8.0

ND: como a desnaturação de bglThm não demonstrou patamar pós transição, não foram determinadas as constantes de desnaturação

Como pode ser observado na tabela 9, o resultado foi reprodutível, e algumas constantes tiveram desvio menor do que outras. De modo geral, as análises indicam que a concentração onde 50% das enzimas encontram-se desnaturadas, o c_{50} , é $7,9 \pm 0,2 \text{ mols}\cdot\text{L}^{-1}$ para bglA e $7,1 \pm 0,2 \text{ mols}\cdot\text{L}^{-1}$ para bglB de *Paenibacillus polymyxa*. Já o parâmetro " m " é igual a $669 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para bglA e $860 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para bglB de *P. polymyxa*.

Já no caso de bglThm, o resultado também foi reprodutível, porém a transição não é visível, mesmo quando os dados experimentais foram reunidos (Figura 52) ou quando foram tratadas como curvas separadas de cada triplicata (Figuras 49). Este resultado provavelmente deve-se ao fato da concentração máxima de desnaturante utilizada não ter sido suficiente para atingir-se o patamar pós-transição desta enzima, tendo assim a bglThm demonstrado maior estabilidade química frente ao desnaturante ureia do que bglA e bglB.

3.9.2- Desnaturação química por cloreto de guanidina das β -glicosidases recombinantes

Ainda para a comparação da estabilidade estrutural das β -glicosidases recombinantes, foram executados ensaios de desnaturação química utilizando cloreto de guanidina (GndCl) como desnaturante. Embora a ureia seja provavelmente apenas um agente desestabilizador, o GndCl tem um papel duplo. Em altas concentrações, o GndCl desestabiliza o estado “nativo” da proteína, mas em baixas concentrações o estabiliza porque, ao contrário da ureia, o GndCl é um sal. Um aumento em sua concentração aumenta sua atividade como um desnaturante e também a força iônica da solução, o que reduz as interações eletrostáticas desestabilizadoras dentro das proteínas.

Como o GndCl é mais estável que a ureia em solução aquosa, mas é altamente higroscópico, o índice de refração da solução também foi determinado como descrito no item material e métodos (acima), e com esse valor foi possível normalizar sua concentração (Nozaki, 1972; Pace, 1986).

Inicialmente, a pureza do GndCl foi avaliada utilizando espectro de absorvância de 200 a 350 nm (Nozaki, 1972), pois é comum a contaminação por impurezas fluorescentes. Foi testado o frasco de reagente da SIGMA ALDRICH® utilizado para a preparação da solução estoque (Figura 53), que por esse critério estava relativamente puro, sem a necessidade de purificação (como por exemplo a recristalização).

Figura 53: Espectro de absorção ultravioleta de amostra de GndCl a $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **A)** espectro de absorção coletado de solução estoque feita a partir do frasco de reagente (SIGMA ALDRICH®); **B)** representação de espectros de absorção de GndCl puro (1) e impuro (2) extraído de Nozaki (1972).

Foram coletados espectros de fluorescência das β -glicosidases selvagens bglA e bglB e bglThm na presença de diversas concentrações do desnaturante cloreto de guanidina, no intervalo de 0 a $5,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Quando incubadas por 2 horas a 30°C o perfil de desnaturação já exibe uma clara transição da forma enovelada para a forma desenovelada, permitindo utilizar este tempo como padrão para os demais ensaios.

O processo de desnaturação química na presença de cloreto de guanidina foi acompanhado por diferentes parâmetros, apesar de cada uma mostrar suas desvantagens, é possível observar mais claramente uma transição do estado enovelado para desenovelado das β -glicosidases.

Da mesma forma que para o ensaio de desnaturação química por ureia, as intensidades foram normalizadas, calculando-se as porcentagens das intensidades em cada comprimento de onda em relação à emissão máxima neste mesmo espectro, sendo a emissão máxima considerada como 100%. Os dados foram tratados utilizando a porcentagem da intensidade de emissão no comprimento de onda máximo a $0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GndCl (Figura 54E, 55E e 56E) e a porcentagem da intensidade de emissão no comprimento de onda máximo a $5,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GndCl (Figura 54F, 55F e 56F), onde se observa o perfil de transição.

Para avaliar a reprodutibilidade do ensaio e de cada forma de tratar os dados, a desnaturação química das β -glicosidases foi repetida 3 vezes e o conjunto de dados da triplicata tratado sob os diversos parâmetros descritos assim como para o ensaio com ureia.

Figura 54: Perfil de desnaturação da bglA de *P. polymyxa* em função da concentração de GdnCl. **A)** parâmetro $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo); **B)** razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm; **C)** “parâmetro A”, uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm; **D)** razão das intensidades de emissão de fluorescência máximas do espectro a 0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\sim 335 \text{ nm}$) e 5,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GdnCl ($\sim 350,5 \text{ nm}$); **E)** porcentagem da intensidade de emissão a 0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GdnCl ($\sim 335 \text{ nm}$); **F)** porcentagem da intensidade de emissão a 5,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GdnCl ($\sim 350,5 \text{ nm}$).

Figura 55: Perfil de desnaturação da bglB de *P. polymyxa* em função da concentração de GdnCl. **A)** parâmetro $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo); **B)** razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm; **C)** “parâmetro A”, uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm; **D)** razão das intensidades de emissão de fluorescência máximas do espectro a 0 mol·L⁻¹ (~331,8 nm) e 5,5 mol·L⁻¹ de GdnCl (~349,6 nm); **E)** porcentagem da intensidade de emissão a 0 mol·L⁻¹ de GdnCl (~331,8 nm); **F)** porcentagem da intensidade de emissão a 5,5 mol·L⁻¹ de GdnCl (~349,6 nm).

Figura 56: Perfil de desnaturação da bglThm de *T. maritima* em função da concentração de GdnCl. **A)** parâmetro $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimento de onda máximo); **B)** razão das intensidades de emissão de fluorescência a 340 nm e 355 nm; **C)** "parâmetro A", uma razão das intensidades de emissão de fluorescência a 320 nm e 365 nm; **D)** razão das intensidades de emissão de fluorescência máximas do espectro a 0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (~331,5 nm) e 5,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GdnCl (~347,5 nm); **E)** porcentagem da intensidade de emissão a 0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GdnCl (~331,5 nm); **F)** porcentagem da intensidade de emissão a 5,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GdnCl (~347,5 nm).

Como pode ser observado nas figuras acima o resultado foi reprodutível. Empregando-se os parâmetros porcentagem da intensidade de emissão a $0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GndCl e porcentagem da intensidade de emissão a $5,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GndCl pode-se visualizar uma transição bem mais acentuada do que no ensaio com ureia, pois com menores concentrações de desnaturante consegue-se atingir o final da transição e mais pontos localizados no patamar pós-transição (Figuras 54, 55 e 56).

Assim, as curvas das 3 replicatas combinadas obtidas com os parâmetros mencionado acima foram conjuntamente ajustadas na equação 16 com o software Origin® 8.0. Este ajuste permite assim, a determinação do parâmetro “ m ” (Pace e Scholtz, 1997; Pace e Shaw, 2000), que representa o efeito do desnaturante sobre a estabilidade da proteína.

Tabela 10: Valores das constantes que descrevem a desnaturação de bglA, bglB e bglThm por GndCl.

		Constantes no ajuste individual			Constantes da triplicata**	Desvio padrão	Incerteza %
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			
bglA	A ₁	82,5	88,3	86,9	75,52	0,01	0,013
	A ₂	99,4	100,1	91,2	99,4	1,0	1
	A ₃	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	1,4	466
	c ₅₀	3,3	3,3	2,6	3,1	0,4	13
	dx	0,5	0,4	-0,3	0,9	0,2	22
	"m"	1160,1	1630,0	-1815,6	670,9	0,2	0,03
bglB	A ₁	79,1	80,1	82,5	80,4	0,6	0,7
	A ₂	99,6	99,2	99,3	98,8	1,1	1
	A ₃	1,4	3,2	0,6	2,7	2,6	96
	c ₅₀	2,5	2,8	3,1	2,6	0,4	15
	dx	0,7	0,8	0,6	0,8	0,1	12
	"m"	861,2	741,7	992,4	798,3	0,1	0,01
bglThm	A ₁	80,5	82,5	76,3	79,5	1,1	1,4
	A ₂	99,5	99,9	99,5	99,5	0,4	0,4
	A ₃	-0,04	-0,2	0,04	0,01	0,2	2000
	c ₅₀	5,4	5,2	5,4	5,34	0,06	1
	dx	0,4	0,2	0,4	0,36	0,05	14
	"m"	1580,4	3045,0	1498,1	1690,6	0,5	0,03

Constantes obtidas através do ajuste das curvas das Figuras 57E, 58E e 59E, em triplicata, acompanhando o percentual de emissão no comprimento de onda máximo a 0 molar de ureia.

*parâmetro "m" expresso em $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$, calculado a partir de dx usando a equação $RT/''m''$.

**constantes calculadas a partir do ajuste simultâneo da triplicata na equação 19 usando software Origin® 8.0

ND: como a desnaturação de bglThm não demonstrou patamar pós transição, não foram determinadas as constantes de desnaturação

Figura 57: Perfil de desnaturação química em função da concentração de GndCl. **A)** bglA; **B)** bglB; **C)** bglThm. **D)** Perfis reunidos para melhor comparação, mostrando a porcentagem da população de enzimas que estão no estado nativo em função da concentração do desnaturante. Sendo bglA (em verde); bglB (em azul); e bglThm (em vermelho). Baseado na reunião das triplicadas mostradas nas Figuras 56E, 57E e 58E. Dados experimentais (losangos) e ajuste dos dados na equação 16 (linha contínua). Os parâmetros determinados a partir deste ajuste estão na Tabela 10.

Assim, de modo geral, as análises indicam que o c_{50} é $3,1 \pm 0,1$ mols·L⁻¹ para bglA, $2,6 \pm 0,4$ mols·L⁻¹ para bglB e $5,3 \pm 0,1$ mols·L⁻¹ para a bglThm. Já o parâmetro “ m ” é igual a $670,9 \pm 0,2$ cal·mol⁻¹ para bglA, $798,3 \pm 0,1$ cal·mol⁻¹ para bglB e $1690,6 \pm 0,5$ cal·mol⁻¹ para bglThm.

Em suma, a estabilidade de bglA e bglB frente à GndCl são semelhantes, mas menores do que bglThm. Esta é a mesma estabilidade relativa observada no caso da desnaturação com ureia.

4.3- Conclusões Prévias

Aparentemente cada metade, ou “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ”, contribuiu de modo relativamente independente com a propriedade de termo estabilidade proveniente da enzima parental selvagem, gerando uma termo estabilidade intermediária na enzima quimérica. Na falta de um modelo dinâmico e estrutural do processo de inativação térmica, não temos como entender detalhadamente de que forma cada “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” contribuiu para termo estabilidade da quimera. Mas, podemos fazer algumas observações.

Considerando que estabilidade de cada subunidade está, segundo a definição de domínio, inteiramente contida na própria subunidade e que o sítio ativo da quimera é formado por resíduos provenientes dos dois “subdomínios $(\beta/\alpha)_4$ ”, é intrigante que a termo estabilidade, acompanhada pela atividade remanescente, tenha aumentado na quimera em relação à bglA. Afinal, o “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” menos estável (N-terminal de bglA, proveniente de enzima parental mesófila) deveria aparentemente ditar a termo estabilidade geral da proteína quimérica, ou seja, quando a subunidade menos estável se desnaturasse, o sítio ativo seria desfeito e a enzima se inativaria.

Talvez a solução para esta aparente inconsistência esteja em entender a termo estabilidade como uma “capacidade” de acomodar o aumento de temperatura na forma de energia cinética dentro da estrutura sem que esta se desnature. Seguindo nesta linha, o “subdomínio (β/α)₄” C-terminal de bglThm tem muito mais modos para acomodar o aumento de temperatura do que o “subdomínio (β/α)₄” N-terminal de bglA. Sendo que ambos “subdomínios (β/α)₄” formam partes da mesma proteína na quimera, o aumento de temperatura não é acomodado apenas no “subdomínio (β/α)₄” proveniente de bglA, podendo ser distribuído para o “subdomínio (β/α)₄” de bglThm, que tem muito mais “capacidade térmica”. Em suma, a metade C-terminal de bglThm eleva a “capacidade térmica” da enzima quimera além daquela da metade N-terminal de bglA.

Outra observação foi que a estabilidade da bglThm frente à desnaturação química tanto por ureia quanto por cloreto de guanidina é maior se comparada à bglA e bglB, enquanto que bglA e bglB são semelhantes quando comparadas entre si. Já bglThm é a enzima mais estável em ambos os casos. Interessantemente esta é a mesma ordem relativa da estabilidade térmica.

Por fim, segundo Pace (1986) e Myers (1995), baixos valores de parâmetro “*m*”, tanto para desnaturação de uma proteína por ureia quanto por guanidina, podem refletir um desvio do mecanismo desnaturação de dois estados, de “nativo” para “desnaturado”. Assim, os resultados obtidos poderiam ser uma sugestão da presença de dois domínios proteicos nas β -glicosidases selvagens estudadas. Por outro lado, a natureza cooperativa de desnaturação destas proteínas indica dois domínios ainda interdependentes, pois se houvesse falta de acoplamento entre domínios ou regiões estruturadas, não haveria cooperatividade dos processos de desnaturação (Shank *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 4

Efeitos na eficiência catalítica da quimera

1. Introdução

1.13- β -glicosidases GH 1

β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas entre o glicone (grupo glicosil, galactosil, mannosil, fucosil, 6-fosfoglicosil, 6-fosfogalactosil ou um resíduo glucoronídeo) e o aglicone do substrato, o qual pode ser outro monossacarídeo ou não, resultando na liberação do monossacarídeo da extremidade não redutora do substrato. (Henrissat, 1991; Henrissat e Davis, 1997).

As glicosídeo-hidrolases podem catalisar a hidrólise do substrato através de mecanismos que resultam na retenção ou inversão da configuração espacial (α ou β) do carbono anomérico. As retentoras, como as β -glicosidases GH1, utilizam um mecanismo de catálise, com dupla-substituição, dividido em duas etapas: glicosilação, onde forma-se um intermediário covalente (glicosil-enzima), e deglicosilação, onde o intermediário covalente é hidrolisado regenerando a enzima livre (Figura 58). Neste mecanismo há participação de dois grupos carboxila do sítio

ativo da enzima, dois ácidos glutâmicos catalíticos presentes em regiões conservadas da enzima (Kempton e Withers, 1992; Burmeister *et al.*, 1997).

Figura 58: Esquema da reação de hidrólise de uma ligação glicosídica catalisada por uma glicosídeo-hidrolase retentora (β-glicosidase GH1). Fonte: baseado em Hancock, *et al.* (2006).

1.14- Bases moleculares do sítio ativo e subsítios

As β-glicosidase GH1 enzimas possuem um único sítio ativo com atividade relativa modulada e ampla especificidade, sendo registrada atividade sobre dissacarídeos, oligocelodextrinas, aril β-glicosídeos sintéticos, alquil β-glicosídeos sintéticos e glicosídeos vegetais.

Seu sítio ativo é dividido em uma série de subsítios, onde o monossacarídeo que forma a extremidade não redutora do substrato (glicone) liga-se ao subsítio -1 (*GBS-glicone binding site*).

A porção remanescente do substrato, sua extremidade redutora, formada por outro radical glicosil ou um grupo não carboidrato, interage não-covalentemente com uma série de subsítios (+1, +2, +3, etc...) que formam a região de ligação do aglicone (*ABS-aglicone binding site*). Essa região é que frequentemente determina a função fisiológica e preferência da enzima pelo substrato.

A ligação glicosídica a ser clivada está localizada entre o subsítio -1 e +1 (Davies *et al.*, 1997).

Em cada subsítio a cadeia lateral de um aminoácido hidrofóbico forma uma plataforma (plataforma basal), sobre a qual através de interações por empilhamento (*stacking*) posiciona-se o anel do glicone (monossacarídeo do substrato). Cadeias laterais de aminoácidos polares formam ligações de hidrogênio com as hidroxilas do glicone do substrato, atribuindo à enzima sua especificidade quanto ao substrato (Davies *et al.*, 1997; Burmiester *et al.*, 1997, Marana, 2006).

Figura 59: Esquema representando os subsítios do sítio ativo de uma β -glicosidase GH1. A seta indica o ponto de clivagem da ligação glicosídica. Fonte: baseado em Davies, 1997.

O conjunto dos resíduos que formam o subsítio -1 é altamente conservado na família GH1 e na enzima quimérica N_{bgl}A-C_{bgl}Thm foram identificados a partir de alinhamento da sequência primária com β -glicosidase Sf β gly, anteriormente estudada pelo nosso grupo de pesquisa (Marana *et al.*, 2001, Marana *et al.*, 2003; Marana, 2006). No subsítio -1, o resíduo formador da plataforma basal apolar é W398 em N_{bgl}A-C_{bgl}Thm (W444 na Sf β gly), enquanto os resíduos E405 e Q20 da quimera (E451 e Q39 na Sf β gly) são pontos de interação *via* ligação de hidrogênio com a hidroxila 4 do glicone. O resíduo E405 é o principal responsável pela diferenciação entre glicones (glicose ou galactose ou fucose). Os resíduos N165 e H121 da quimera (N186 e H142 na Sf β gly) interagem *via* ligação de hidrogênio com a hidroxila 2 do glicone (Marana *et al.*, 2001).

A região de ligação do aglicone possui três subsítios e com base em comparações estruturais e caracterização cinética do nosso grupo de pesquisa foi evidenciado que E190, E194 e K201 na Sf β gly, que correspondem à C169, L173 e H180 na quimera, atuam na ligação do aglicone no subsítio +1 e M453 Sf β gly, equivalente à A407 na quimera, participa no subsítio +2.

1.15- Mecanismo catalítico nas Glicosídeo Hidrolases

Dentro do grupo amplo de 165 famílias listadas no “*Carbohydrate-Active Enzymes database*” (CAZy), as glicosídeo-hidrolases podem catalisar a hidrólise do substrato através de mecanismos que resultam na retenção ou inversão da configuração espacial (α ou β) do carbono anomérico no ponto de clivagem. As GH retentoras utilizam um mecanismo de catálise com dupla-substituição, dividido em

duas etapas com a participação da cadeia lateral de dois resíduos de aminoácidos catalíticos (ácidos glutâmicos em regiões conservadas) do sítio ativo. Neste mecanismo há participação de dois grupos carboxila do sítio ativo da enzima, dois ácidos glutâmicos catalíticos presentes em regiões conservadas da enzima: a sequência TFNEP, onde se encontra o resíduo que age como ácido/base catalítico (E166 na quimera N_{bglA}-C_{bglThm}) e a sequência I/VTENG, contendo o resíduo que age como nucleófilo catalítico (E351 na quimera N_{bglA}-C_{bglThm}).

Na primeira etapa, chamada glicosilação, a cadeia lateral de E166 deve agir como ácido catalítico (doador de próton) protonando o oxigênio glicosídico, enquanto a carboxila desprotonada de E351 age como nucleófilo catalítico atacando o carbono 1 do glicone do substrato, o que forma o intermediário covalente (glicosil-enzima) e libera o primeiro produto da reação, que corresponde ao aglicone. Na segunda etapa, deglicosilação, uma molécula de água conjugada ao E166, ataca o carbono 1, agora em conformação alfa, hidrolisando o intermediário covalente, gerando açúcar livre (glicone) e regenerando a enzima ao estado de protonação inicial. (Kempton e Withers, 1992; Burmeister *et al.*, 1997).

2. Material e Métodos

2.15- Ensaio de atividade enzimática acompanhando formação de *p*-nitrofenol

Os ensaios de atividade da β -glicosidase foram realizados utilizando 50 μ L de amostra contendo a enzima e 50 μ L do substrato cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP β -Gluco), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosídeo (*p*NP β -Fuco) e *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*p*NP β -Gal) 5 mmol·L⁻¹ preparados em tampão citrato-fosfato 0,1 mol·L⁻¹ pH 6,5. A mistura de reação foi incubada a 30°C por

intervalos de tempo e em seguida interrompida com 100 μL de solução de carbonato de sódio $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 10,5. Nessas condições, o produto formado *p*-nitrofenol é convertido para a forma desprotonada, *p*-nitrofenolato, pois a solução de carbonato torna o meio alcalino. Com isso, o *p*-nitrofenolato foi detectado por meio da absorbância em 415 nm usando um leitor de placas Elx800 (Biotek®). Ao final, as absorbâncias foram convertidas em mols de produto utilizando a curva padrão apresentada na Figura 60.

Figura 60: Curva padrão de *p*-nitrofenolato.

2.16 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática acompanhando formação de *p*-nitrofenol

Os ensaios de atividade frente a diferentes pHs foram realizados utilizando 50 μL de amostra contendo a enzima e 50 μL do substrato *p*NP β -Gluco $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparados numa faixa de pH variando em 0,2 unidades. Foram usados o tampão citrato $0,2 \text{ mM}$ para a faixa de pH entre 4 e 6, o tampão citrato-fosfato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a faixa entre 4 e 7, o tampão fosfato $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a faixa de pH entre 5,7 e 7,8 e o tampão bicina $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a faixa de pH entre 7 e 9. Também foi

adicionado de NaCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentração final) em todos os tampões para manter a força iônica estável. A mistura de reação foi incubada a 30°C por intervalos de tempo e em seguida interrompida com $100 \mu\text{L}$ de solução de carbonato de sódio $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 10,5.

2.17 – Determinação dos parâmetros cinéticos acompanhando formação de *p*-nitrofenol

A partir das amostras de enzimas selvagens e quimérica purificadas foram determinadas as velocidades iniciais de hidrólise em diferentes concentrações do substrato. Para tal foi realizada uma triplicata de ensaio de atividade enzimática em tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,5 utilizando diferentes concentrações de substratos (Tabela 11). Como substrato, foram utilizados *p*NPβ-Gluc variando as concentrações em intervalos entre 0,1 mM e 20 mM, *p*NPβ-Fuco entre 0,1 mM e 8,5 mM e *p*NPβ-Gal entre 0,05 mM e 4,25 mM.

Tabela 11: Concentrações finais (mM) dos substratos utilizados para a caracterização cinética das enzimas recombinantes.

	[S]																						
pNPGlc	13,0	12,0	11,0	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
pNPFuc	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,8	0,7	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
pNPGal	4,25	4,0	3,75	3,5	3,25	3,0	2,75	2,5	2,25	2,0	1,75	1,5	1,25	1,0	0,75	0,5	0,4	0,33	0,23	0,18	0,13	0,08	0,05

O conjunto de dados de velocidade inicial (nmols de produto gerado por minuto) *versus* a concentração de substrato (mM) foi ajustado à equação de Michaelis-Menten (equação 19). Para estes ajustes foi utilizado o programa Origin 2019 (© OriginLab Corporation.), que permitiu a determinação do K_m e $V_{\max}$. O k_{cat} foi calculado através da equação 20.

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{[S] + K_m} \quad (19)$$

$$V_{max} = k_{cat} * [E]_{total} \quad (20)$$

3. Resultados e Discussão

3.10- Efeitos na eficiência catalítica

A determinação dos parâmetros cinéticos para hidrólise de vários substratos pode revelar mudanças de especificidade em uma enzima. Avaliando sua eficiência catalítica e a especificidade pelo substrato, os dados das proteínas quiméricas contendo metades N-terminal e C-terminal de diferentes enzimas parentais quando comparados de fato com as β -glicosidases selvagens poderão revelar informações sobre a arquitetura do sítio ativo desta enzima quimérica. Para isso, foram planejadas e produzidas proteínas quiméricas conforme descrito anteriormente. Como há um resíduo catalítico (ácido glutâmico) presente em cada “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” que provém das β -glicosidases parentais de espécies diferentes, estes resíduos, mesmo que conservados, podem na quimera estar em diferentes posições relativas entre si em comparação às enzimas nativas, o que teoricamente poderia gerar mudanças no sítio ativo e consequentemente na eficiência catalítica destas enzimas quiméricas.

Considerando que a enzima quimérica $N_{bglA}-C_{bglThm}$ composta pelo “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” N-terminal $bglA$ e pelo “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ” C-terminal $bglThm$, encontra-se enovelada, foram então feitos testes para verificar se esta apresenta atividade enzimática após a purificação.

Deste modo a quimera junto com as enzimas selvagens foram então caracterizadas através de ensaios cinéticos usando os substratos *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP β -Gluco Figura 61C), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosídeo (*p*NP β -Fuco Figura 62C), e *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*p*NP β -Gal Figura 63C). Nas figuras abaixo estão também os gráficos que relacionam a atividade das β -glicosidases selvagens bglA de *P. polymyxa* (Figuras 61A; 62A; 63A) e bglThm de *T. maritima* (Figuras 61B; 62B; 63B).

Figura 61: Ensaio enzimático das amostras das proteínas recombinantes purificadas em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima*; e **C)** Quimera N_{bglA}-C_{bglThm}. O substrato usado foi *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 13 mmol·L⁻¹ em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6.

Figura 62: Ensaio enzimático das amostras purificadas em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6 das proteínas recombinantes. O substrato usado foi *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosídeo 7 mmol·L⁻¹ em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima*; e **C)** Quimera N_{bglA}-C_{bglThm}.

Figura 63: Ensaio enzimático das amostras purificadas em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6 das proteínas recombinantes. O substrato usado foi *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo 3,75 mmol·L⁻¹ em tampão CP 0,1 mol·L⁻¹ pH 6. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima*; e **C)** Quimera N_{bglA}-C_{bglThm}.

Nota-se que para o substrato *pNPβ*-Gluc, a atividade enzimática da quimera N_{bglA}-C_{bglThm}, apresentou igual (um aumento de cerca de 9% da atividade enzimática) com relação às enzimas selvagens, bglA e bglThm (Tabela 12). Para o substrato *pNPβ*-Fuco a atividade enzimática da quimera N_{bglA}-C_{bglThm}, apresentou uma diminuição para cerca de 22% a 33% da atividade enzimática com relação às enzimas selvagens, bglThm e bglA respectivamente. Já para o substrato *pNPβ*-Gal a atividade enzimática da quimera N_{bglA}-C_{bglThm}, apresentou uma diminuição para cerca de 21% a 23% da atividade enzimática com relação às enzimas selvagens, bglThm e bglA respectivamente.

Tabela 12 – Atividade enzimática das enzimas selvagens bglA e bglThm e da Quimera N_{bglA}-C_{bglThm}

substrato	Atividade (mU)		
	bglA	bglThm	Quimera N _{bglA} -C _{bglThm}
pNPβ-Gluco	0,512	0,513	0,559
pNPβ-Fuco	0,674	0,994	0,219
pNPβ-Gal	0,659	0,716	0,151

Em suma, a enzima quimérica apresenta atividade enzimática semelhante às duas enzimas selvagens para o substrato pNPβ-Gluco, porém para o substrato pNPβ-Fuco apresenta atividade cerca de 3 vezes menor que bglA e cerca de 5 vezes menor que bglThm. Já frente ao substrato pNPβ-Gal apresenta atividade enzimática cerca de 5 vezes menor que bglA e bglThm.

Diante desta variação, ponderou-se que o dobramento na região do sítio ativo da enzima quimérica poderia estar alterado. Contudo, deve ser destacado que a observação de atividade enzimática nesta β-glicosidase quimérica é muito interessante e até surpreendente, uma vez que ela é constituída de “metades” de enzimas distintas, tendo assim, seu sítio ativo formado com contribuições de duas β-glicosidases de espécies diferentes (Figura 65).

3.11- Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade da quimera N_{bglA}-C_{bglThm}, e das enzimas selvagens bglA, bglB e bglThm foi determinado usando o substrato pNPβ-Gluc 40 mM (Figura 64). Este ensaio tem o objetivo de indicar o pH mais adequado para que a caracterização cinética fosse feita para as enzimas analisadas. Além disso, ensaios de pH ótimo sobre a atividade podem revelar diferenças nos pK_as dos resíduos catalíticos, os quais são sensíveis ao ambiente químico de inserção dos resíduos catalíticos.

Figura 64: Plote da atividade enzimática relativa versus pH. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima*; e **C)** quimera N_{bglA}-C_{bglThm}.

Como pode ser observado na Figura 64, as duas enzimas selvagens exibem uma curva em formato de sino, a qual é deformada no caso bglThm, indicador de catálise dependente de dois resíduos ionizáveis. Este mecanismo é dependente de dois ácidos glutâmicos (destacados em amarelo na Figura 65C), um ácido catalítico com pK_a em torno de 7 e um nucleófilo com pK_a em torno de 5 é comum às β-glicosidases GH1.

Já o gráfico para enzima quimérica não exhibe este formato, sendo a atividade enzimática aparentemente independente do pH nesta faixa medida. Este resultado sugere uma possível alteração no efeito do pH sobre a ionização dos resíduos catalíticos da quimera. Cabe notar que na construção da quimera cada um dos ácidos glutâmicos catalíticos veio de uma das enzimas parentais, sendo o ácido catalítico E166 de bglA e o nucleófilo E351 de bglThm. Além disso, em β -glicosidases GH1 há dois outros resíduos (destacados em rosa na Figura 65C), arginina (R77) e tirosina (Y295), responsáveis por modular os pK_a s dos ácidos glutâmicos catalíticos (Marana *et al.*, 2003), sendo que estes também são originários de cada uma das metades que compõem a quimera (R77 proveniente de bglA e Y295 proveniente de bglThm). Deste modo, imprecisões nos posicionamentos relativos de todos estes resíduos (dois glutâmicos catalíticos mais a dupla arginina - tirosina) podem ser a explicação para a “curva de efeito do pH na atividade” atípica da quimera N_{bglA}-C_{bglThm}. Adicionalmente, os ensaios de atividade mencionados acima também sugerem modificações na arquitetura do sítio ativo da quimera N_{bglA}-C_{bglThm}.

Finalmente, considerando que o pH ótimo de bglA e bglThm foi estimado em aproximadamente 6,5 e a quimera também exhibe alta atividade neste pH (Figura 64), optou-se por realizar os ensaios da caracterização cinética em tampão CP pH 6,5.

Figura 65: Estrutura primária e terciária (suposta) da β -glicosidase quimera $N_{bgIA}-C_{bgIThm}$. **A)** estrutura primária com alinhamento de sequência entre β -glicosidase $bgIA$ (acima) e $bgIThm$ (abaixo). A quimera $N_{bgIA}-C_{bgIThm}$ é composta pelos aminoácidos de 1 a 215 de $bgIA$ e de 216 a 445 de $bgIThm$. **B)** Esquema representando o alinhamento estrutural de $bgIA$ e $bgIThm$. Destacados os segmentos de meio-barril provenientes destas duas proteínas parentais na construção da quimera $N_{bgIA}-C_{bgIThm}$, sendo N-terminal $bgIA$ em verde e C-terminal $bgIThm$ em vermelho. No sítio ativo mostra-se as posições do glutamato catalítico de cada metade em amarelo. **C)** Estrutura terciária com destaque no sítio ativo da quimera. Os resíduos em amarelo (GLU 166 e GLU 351) participam da catálise, os resíduos em rosa (ARG 77 e TYR 295) modulam o pK_a dos resíduos catalíticos. Os resíduos em laranja (CYS 169, LEU 173, HIS 180, TRP 398 e ALA 407) interagem com a porção aglicone do substrato, enquanto os resíduos azuis (GLY 20, ARN 165, HIS 121 e GLU 405) interagem com a porção glicone do substrato.

3.12- Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática

Após determinado o pH ótimo de cada enzima, foram feitos ensaios de atividade enzimática em triplicata para hidrólise de 22 diferentes concentrações de três substratos diferentes: *pNPβ-Gluco*, *pNPβ-Fuco* e *pNPβ-Gal*. Os dados obtidos foram ajustados segundo o modelo de Michaelis-Menten no programa Origin 2019, exceto no caso de *pNPβ-Gal* para a quimera (Figuras 66, 67 e 68, respectivamente).

Figura 66: Perfil cinético das β -glicosidasas recombinantes em função da concentração de substrato pNP β -Gluco. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima* e **C)** quimera N_{bglA}-C_{bglThm}. A linha azul representa o ajuste dos dados experimentais na equação de Michaelis Menten. Os losangos são os dados de dois experimentos independentes.

Figura 67: Perfil cinético das β -glicosidases recombinantes em função da concentração de substrato pNP β -Fuco. **A)** bglA de *P. polymyxa*; **B)** bglThm de *T. maritima* e **C)** quimera N_{bglA}-C_{bglThm}. A linha azul representa o ajuste dos dados experimentais na equação de Michaelis Menten. Os losangos são os dados de dois experimentos independentes

Figura 68: Perfil cinético das β -glicosidasas recombinantes em função da concentração de substrato pNP β -Gal. **A)** $bglA$ de *P. polymyxa*; **B)** $bglThm$ de *T. maritima* e **C)** quimera $N_{bglA}-C_{bglThm}$. A linha azul representa o ajuste dos dados experimentais na equação de Michaelis Menten e a linha vermelha representa o ajuste por regressão linear. Os losangos são os dados de dois experimentos independentes.

A partir destes dados foram determinados os parâmetros cinéticos para cada uma das enzimas que estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 13: Parâmetros cinéticos para hidrólise dos substratos *p*NPβ-Gluco, *p*NPβ-Fuco e *p*NPβ-Gal pelas β-glicosidases selvagens e quimera N_{bglA}-C_{bglThm}.

substrato	parâmetros	bglA *	bglThm **	Quimera ***
<i>p</i> NPβ-Gluco	K_m (mmol·L ⁻¹)	3,7	0,37	1,7
	erro	0,3	0,03	0,3
	V_{max} (mU)	1,39	1,08	1,23
	erro	0,05	0,01	0,06
	k_{cat} (s ⁻¹)	13,7	3,3	2,6
	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	3,7	8,9	1,5
<i>p</i> NPβ-Fuco	K_m (mM)	1,35	0,56	0,8
	erro	0,07	0,03	0,2
	V_{max} (mU)	1,5	2,14	0,99
	erro	0,2	0,02	0,05
	k_{cat} (s ⁻¹)	14,9	3,2	1,1
	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	11,1	5,8	1,3
<i>p</i> NPβ-Gal	K_m (mM)	3,3	3,2	
	erro	0,3	0,3	
	V_{max} (mU)	1,88	2,7	
	erro	0,09	0,1	
	k_{cat} (s ⁻¹)	9,3	4,1	
	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	2,8	1,3	0,14 [#]

*bglA foi usada na concentração final de 0,0017 µg/µl no ensaio com *p*NPβ-Gal e 0,0009 µg/µl nos demais ensaios.

**bglThm foi usada na concentração 0,0028 µg/µl no ensaio com *p*NPβ-Gluco e 0,0057 µg/µl nos demais ensaios.

***quimera N_{bglA}-C_{bglThm} foi usada na concentração 0,0041 µg/µl no ensaio com *p*NPβ-Gluco e 0,0082 µg/µl nos demais ensaios.

parâmetro obtido no ajuste por regressão linear

Considerando o K_m , a quimera N_{bglA}-C_{bglThm} mostrou uma afinidade intermediária para os substratos *pNPβ*-Gluco e *pNPβ*-Fuco em relação a *bglA* e *bglThm*. Já a afinidade da quimera N_{bglA}-C_{bglThm} pelo substrato *pNPβ*-Gal deve ter sido muito reduzida, o que é indicado pela relação praticamente linear entre velocidade e concentração deste substrato na Figura 68C. Neste caso as maiores concentrações de substrato usadas não foram suficientes para saturar completamente a enzima, ou seja, o K_m é muito alto.

Assumindo que todas as enzimas estavam ativas e que não sofrem inibição, o k_{cat} da quimera N_{bglA}-C_{bglThm} é o menor para todos os substratos, estando cerca de 5 vezes e 13 vezes abaixo dos k_{cat} de *bglA* para *pNPβ*-Gluco e *pNPβ*-Fuco, respectivamente. E cerca de 1,2 vezes e 3 vezes abaixo de *bglThm* para *pNPβ*-Gluco e *pNPβ*-Fuco, respectivamente.

Finalmente, foi calculada a “eficiência catalítica”, uma razão entre os parâmetros descritos acima, k_{cat}/K_m , que reflete a especificidade da enzima considerando a sua afinidade pelo substrato e a velocidade da catálise gerando uma estabilização do estado de transição. Esse parâmetro para cada uma das enzimas está representado na Tabela 13.

Observa-se que *bglA* tem maior especificidade pelo substrato *pNPβ*-Fuco (caracterizado por maior k_{cat}/K_m dentre os três substratos desta enzima), enquanto que *bglThm* tem maior especificidade por *pNPβ*-Gluco. De fato, no que tange a estes dois substratos, *bglA* e *bglThm* tem especificidades opostas. Interessantemente, a quimera N_{bglA}-C_{bglThm} tem igual preferência por *pNPβ*-Fuco e *pNPβ*-Gluco.

Normalizando a “eficiência catalítica” para valores de k_{cat}/K_m relativos em cada enzima, ou seja, dividindo-se o k_{cat}/K_m para cada substrato de uma mesma enzima pelo

k_{cat}/K_m mais alto encontrado em seus substratos, podemos comparar as enzimas entre si (Figura 69). Desconsideramos assim as mudanças de k_{cat}/K_m que atingem igualmente todos os substratos.

Figura 69: Valores de k_{cat}/K_m relativo das enzimas selvagens e quiméricas.

Em β -glicosidases GH1 a especificidade pelo glicone do substrato, por exemplo Fuco *versus* Gluco, é determinada pela interação entre as hidroxilas 4 (OH4) e 6 (OH6) do glicone e dois resíduos do subsítio -1, uma Glutamina (Q20 na quimera N_{bgIA}-N_{bglThm}) e um Glutamato (E405 na quimera N_{bgIA}-N_{bglThm}). A Glutamina faz parte da metade N-terminal, já o Glutamato da C-terminal. A hidroxila 4 na posição equatorial (como em Gluco) forma ligações de hidrogênio com estes dois resíduos, as quais tem sua energia alterada quando a hidroxila 4 está na orientação axial (como em Fuco). A hidroxila 6, ausente em Fuco, mas presente em Gluco, também interage com o Glutamato (Marana *et al.*, 2001). A especificidade das β -glicosidases emerge do balanço entre as energias destas interações. Deste modo,

na quimera N_{bglA}-C_{bglThm} o subsítio -1 é uma combinação da arquitetura das duas parentais (Figura 65C) e coerentemente a especificidade é uma ponderação das preferências pelo substrato de cada uma delas.

4.4- Conclusões Prévias

Em conclusão a caracterização da quimera N_{bglA}-C_{bglThm} mostrou uma redução na atividade enzimática, ilustrada pela queda dos k_{cat} para os três substratos, uma especificidade resultante da combinação das enzimas parentais, quantificada pelo k_{cat}/K_m relativo, e ausência de efeito do pH sobre a atividade enzimática.

Deve ser destacado que a observação de atividade enzimática nesta glicosidase quimérica é muito interessante e surpreendente, uma vez que é constituída de “metades” de enzimas distintas, tendo assim, seu sítio ativo formado com contribuições de duas β -glicosidases distintas. Adicionalmente, considerando que as metades provêm de enzimas com especificidade distintas e que o funcionamento do sítio ativo depende diretamente do posicionamento relativo de pelo menos uma dezena de resíduos, a redução dos k_{cat} e a mudança no efeito do pH na atividade não são inesperados.

Deste modo, as metades (β/α)₄ que compõem a quimera provavelmente se dobraram auto suficientemente e se ajustaram formando o sítio ativo mesmo sem adicionais mutações para garantir uma maior complementaridade entre elas. Isso sugere razoável estabilidade e independência termodinâmica no dobramento de cada uma delas, funcionando, portanto, como unidades praticamente independentes, ou seja, cada uma como um domínio.

Conclusões Finais

As β -glicosidases GH1 bglA, bglB e bglThm foram produzidas como proteínas recombinantes e purificadas. Dentre as seis proteínas quiméricas planejadas e construídas, apenas N_{bglA}-C_{bglThm} foi produzida na forma solúvel e purificada ativa. Em combinação experimentos de fluorescência de triptofanos e de dicroísmo circular sugerem que as três β -glicosidases selvagens e a quimera estão enoveladas, possivelmente como $(\beta/\alpha)_8$ barril. Os espectros de dicroísmo circular mostraram que N_{bglA}-C_{bglThm} apresenta uma proporção de elementos de estrutura secundária mais próxima à bglA do que bglThm. Por outro lado, o acesso do supressor acrilamida aos triptofanos de N_{bglA}-C_{bglThm} é igual a bglThm e menor do que bglA.

A T_m e a constante de velocidade de inativação a 47°C da quimera N_{bglA}-C_{bglThm} são intermediárias àquelas de bglA e bglThm. Portanto, aparentemente cada “subdomínio $(\beta/\alpha)_4$ ”, contribuiu de modo relativamente independente com a termo estabilidade proveniente da enzima parental selvagem, gerando uma termo estabilidade intermediária na enzima quimérica, uma combinação das capacidades das enzimas parentais.

A quimera N_{bglA}-C_{bglThm} possui atividade enzimática independente do pH na faixa testada (5 a 8), enquanto bglA e bglThm exibem uma típica curva em sino com pH ótimo em torno de 6,5. Além disso, N_{bglA}-C_{bglThm} mostrou uma redução na atividade enzimática, ilustrada pela queda dos k_{cat} para os três substratos estudados.

Considerando que as propriedades funcionais do sítio ativo das β -glicosidases GH1 dependem diretamente do posicionamento relativo de pelo menos uma dezena

de resíduos, a redução dos k_{cat} e a mudança no efeito do pH na atividade em uma quimera composta por partes de enzimas distintas não são inesperados.

$N_{bglA-C_{bglThm}}$ possui K_m intermediário para os substratos $pNP\beta$ -Gluco e $pNP\beta$ -Fuco em relação a $bglA$ e $bglThm$. Além disso, a especificidade pelo substrato de $N_{bglA-C_{bglThm}}$ é uma ponderação daquela de $bglA$ e $bglThm$, pois enquanto estas parentais exibiram uma preferência por $pNP\beta$ -Gluco ou $pNP\beta$ -Fuco, a quimera apresenta o mesmo k_{cat}/K_m para estes dois substratos.

Deste modo, a caracterização da atividade enzimática sugere que as metades $(\beta/\alpha)_4$ que compõem a quimera $N_{bglA-C_{bglThm}}$ provavelmente se dobraram auto suficientemente e se ajustaram formando um sítio ativo funcional mesmo sem mutações adicionais para garantir uma maior complementaridade entre elas. Coerentemente, a estabilidade térmica intermediária também sugere que as metades $(\beta/\alpha)_4$ das proteínas parentais carregaram sua termo estabilidade relativamente independente para a quimera. Em conjunto estas observações implicam em razoável estabilidade e independência termodinâmica no dobramento de cada uma das metades $(\beta/\alpha)_4$, funcionando, portanto, como unidades praticamente independentes, ou seja, cada uma como um domínio.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, M. A.; CHACON, P.; MERELO, J. J.; MORAN, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 6, n. 4, p. 383-90.
- ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 64, n. 3-4, p. 253-260.
- BETON, D.; Marana, S. R. (2015). Half-Barrels Derived from a $(\beta/\alpha)_8$ Barrel β -Glycosidase Undergo an Activation Process. **Plos One**, v. 10, p. e0139673.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. (1991). Introduction to protein structure. Garland Publishing
- BURMEISTER W. P.; COTTAZ S.; DRIGUEZ H.; IORI R.; PALMIERI S.; HENRISSAT B. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. **Structure**, v. 5, p. 663-675.
- CAIRNS J. R. K; ESEN A. (2010). β -glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 37, p. 3389–3405.
- COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson B, (editors), **Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering** Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- DAVIES, G.; WILSON K. S.; HENRISSAT, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemistry Journal**, v. 321, p. 557–559.

- DELLER, M. C.; KONG, L.; RUPP, B. (2016). Protein stability: a crystallographer's perspective. **Acta Crystallographica section F**, v. 72, p. 72-95.
- DOOLITTLE, R. F. (1995). The multiplicity of domains in proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 287-314.
- EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, p. 672 – 680.
- EGOROVA, K.; ANTRANIKIAN, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 649–55.
- FAIJES, M.; PLANAS, A. (2007). *In vitro* synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1581–1594.
- FREIRE, E.; MURPHY, K. P. (1991). Molecular basis of co-operativity in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 222, p. 687–698.
- GERLT, J. A.; BABBITT, P. C. (2001). Barrels in pieces? **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 1, p. 5-7.
- GILBERT, W; GLYNIAS, M. (1993). On the ancient nature of introns. **Gene**, v. 135, n. 1-2, p. 137-144.
- GONZÁLEZ-CANDELAS L.; ARISTOY M. C.; POLAINA J.; FLORES A. (1989). Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 3173-3177.
- GREENE L. H.; HIGMAN V. A. (2003). Uncovering network systems within protein structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 334, n. 4, p. 781-791.

- GROMIHA, M. M.; NAGARAJAN, R.; SELVARAJ, S.. (2019). Protein Structural Bioinformatics: An Overview. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 2, p. 445-459.
- HANCOCK, S. M.; VAUGHAN, M. D.; WITHERS, S. G. (2006). Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.509–519.
- HENN-SAX, M.; THOMA, R.; SCHMIDT, S.; HENNIG, M.; KIRSCHNER, K.; STERNER, R. (2002). Two $(\beta/\alpha)_8$ -barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. **Biochemistry**, v. 41, p. 12032 – 12042.
- HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**, v. 280; p. 309-316.
- HENRISSAT, B.; DAVIES, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 637-644.
- HÖCKER, B.; BEISMANN-DRIEMEYER, S.; HETTWER, S.; LUSTIG, A.; STERNER, R. (2001). Dissection of a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel enzyme into two folded halves. **Nature Structural Biology**, v. 8, p. 32-36.
- HÖCKER, B.; CLAREN, J.; STERNER, R. (2004). Mimicking enzyme evolution by generating new $(\beta/\alpha)_8$ -barrels from $(\beta/\alpha)_4$ -half-barrels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 16448-16453.
- HÖCKER, B.; CLAREN, J.; STERNER, R. (2004). Mimicking enzyme evolution by generating new $(\beta\alpha)_8$ -barrels from $(\beta\alpha)_4$ -half-barrels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 101, n. 47, p. 16448–16453.
- HUBER, R.; LANGWORTHY, T. A.; KÖNIG, H.; THOMM, M.; WOESE, C. R.; SLEYTR, U. B.; STETTER, K. O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique

- extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. **Archives of Microbiology**, v. 144, n. 4, p. 324–333.
- ISORNA, P.; POLAINA, J.; LATORRE-GARCÍA, L.; CAÑADA, F.J.; GONZÁLEZ, B.; SANZ-APARÍCIO, J. (2007). Crystal structure of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insight into the catalytic machinery of family 1 glycosidases. **Journal of Molecular Biology**, v. 371, p. 1204 – 1218.
- KELLY, S. M.; N. C. PRICE (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 4, p. 349-384.
- KELLY, S.M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139.
- KEMPTON, J. B.; WITHERS, S. G. (1992). Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic studies. **Biochemistry**, v. 31, p. 9961 – 9969.
- KREMER, W; KALBITZER, H. R.. (2001). Physiological Conditions and Practicality for Protein Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Experimental Methodologies and Theoretical Background. **Methods in Enzymology**, v. 339, p. 3-19.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *bacteriophage T4*. **Nature**, v. 227, p. 680-685.
- LANG, D.; THOMA, R.; HENN-SAX, M.; STERNER, R.; WILMANN, M. (2000). Structural evidence for evolution of the β/α barrel scaffold by gene duplication and fusion. **Science**, v. 289, p. 1546-1550.
- LOMBARD, V; GOLACONDA RAMULU, H; DRULA, E; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, doi: 10.1093/nar/gkt1178.

- LOPEZ-CAMACHO C.; SALGADO J.; LEQUERICA J.L.; MADARRO A.; BALLESTAR E.; FRANCO L.; POLAINA J. (1996). Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa* β -glucosidase A. **Biochemical Journal**, v. 314, p. 833-838.
- MARANA S. R.; ANDRADE E. H. P.; MENDONÇA L. M. F.; FERREIRA C.; TERRA W. R. (2003). The role of amino acid residues R97 and Y331 in the modulation of the pH optimum in a β -glycosidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4866 – 4875.
- MARANA, S. R. (2006). Molecular Basis of Substrate Specificity in Family 1 Glycoside Hydrolases. **IUBMB Life**, v. 58, p. 63 – 73.
- MARANA, S. R.; JACOBS-LORENA, M.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. (2001) Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. **Biochemical et Biophysical Acta**, v.1545, p. 41 – 52.
- MCPHERSON, M. J., MOLLER, S.G. (2006). **PCR**. Second Edition. Taylor & Francis Group, New York.
- MENDONÇA L. M. F.; MARANA S. R. (2011). Single mutations outside the active site affect the substrate specificity in a β -glycosidase. **Biochemical et Biophysical Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 12, p. 1616-1623.
- MONSELLIER, E.; BEDOUELLE, H. (2005). Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 18, n. 9, p. 445-56.
- MURATA, T.; USUI, T. (2006). Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1049-1059.

- MYERS, J. K.; PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. **Protein Science**, v. 4, p. 2138-2148.
- NANDA, V. (2016). Protein Design: Getting to the bottom of the TIM barrel. **Nature Chemical Biology**, v. 12, p. 2–3.
- NOZAKI, Y. (1972). The preparation of guanidine hydrochloride. **Methods in Enzymology**, v. 26, p. 43-50.
- PACE, N. C.; OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, v. 45, n. 3, p. 325-326.
- PACE, N. C.; SCHOLTZ, J.M. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein Structure – A Practical Approach**. Editado por Creighton T.E. IRL Press, New York.
- PACE, N. C.; SHAW, K. L. (2000). Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, Suppl 4, p. 1-7.
- PANTOLIANO, M. W.; PETRELLA, E. C.; KWASNOSKI, J. D.; LOBANOV, V. S.; MYSLIK, J.; GRAF, E.; CARVER, T.; ASEL, E.; SPRINGER, B. A.; LANE, P.; SALAMME, F. R. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, p. 429-40.
- PORTER, L. L.; ROSE, G. D. (2012). A thermodynamic definition of protein domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, p. 9420-9425.
- RAFFERTY, B. *et al.* (2014). **Protein Contact Maps** Version 1.2. in <https://nanohub.org/resources/contactmaps>.

- RICHARDSON, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. **Advances in Protein Chemistry**, v. 34, p. 167-339.
- RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S. (2007). Web version The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. Originally published in **Advances in Protein Chemistry**, v. 34, 1981 by Academic Press, Inc.
- RÖSGEN J. (2007). Molecular Basis of Osmolyte Effects on Protein and Metabolites. **Methods in Enzymology**, v. 428, p. 459-486.
- SADEGHI, M.; NADERI-MANESH, H.; ZARRABI, M.; RANJBAR, B. (2006). Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. **Biophysical Chemistry**, v. 119, p. 256-270.
- SAMBROOK J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: NY – USA, 1989.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. (1997): The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from concanavalin A. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118.
- SEGEL, I. H. (1993). **Enzyme kinetics**. Wiley, New York.
- SMITH M. A.; ROMERO, P. A.; WU, T.; BRUSTAD, E. M.; ARNOLD, F. H. (2013). Chimeragenesis of distantly-related proteins by noncontiguous recombination. **Protein Science**, v. 22, p. 231 – 238.
- STEIPE, B. (2004). Consensus-Based Engineering of Protein Stability: From Intrabodies to Thermostable Enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 388, p. 176-186.
- STERN, R.; ASARI, A. A.; SUGAHARA, K. N. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, p. 699–715.

- STERNER, R.; HÖCKER, B. (2005). Catalytic versatility, stability, and evolution of the (beta/alpha)₈-barrel enzyme fold. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 11, p. 4038 – 4055.
- TERRA, W. R.; TERRA, I. C. M.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. (1979). Carbodiimide-reactive carboxyl groups at the active site of an insect midgut trehalase. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 571, p. 79 – 85.
- TOLEDO, R. T. (1999). Thermal process calculations. In: Toledo, R. T. **Fundamentals of food process engineering**, 2ed., New York: Chapman & Hall, p.315-3197.
- TUROVEROV; K. K.; KUZNETSOVA, I. M. (2003) Intrinsic fluorescence of actin. **Journal of Fluorescence**, v. 13, n. 1, p. 41-57.
- VIJAYABASKAR, M. S.; VISHVESHWARA, S. (2012). Insights into the Fold Organization of TIM Barrel from Interaction Energy Based Structure Networks. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 5.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. (2004). DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 668-673.
- WOLFENDEN, R.; SNIDER M.J (2001). The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Accounts Chemical Research**, v. 34, p. 938-945.
- ZECHEL, D. L.; BORASTON A. B.; GLOSTER T.; BORASTON C. M.; MACDONALD J. M.; TILBROOK M. G.; STICK R. V.; DAVIES G. J. (2003). Iminosugar glycosidases inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to β -glucosidases. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 14313-14323.