Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via
simulação molecular”.

Davi Serradella Vieira

Orientador: Léo Degrève

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Davi Serradella

Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via simulação molecular.

Ribeirão Preto, 2007.

147 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Degrève, Léo.

1. Xilanases. 2. Termoestabilidade. 3. Ligações de hidrogênio. 4. dinâmica molecular.

Conteúdo

Resumo	6
Abstract	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	14
Abreviaturas	16
 Capítulo 1 – Estrutura de proteínas e catálise	 18
1.1 – Estrutura e função de proteínas	18
1.2 – Catálise enzimática	21
 Capítulo 2 - Enzimas termoestáveis	 25
2.1 - Xilanases	25
 Objetivos	 31
 Capítulo 3 - Metodologia	 32
3.1 - Introdução	32
3.2 – Modelos de proteínas	33
3.3 – Modelos de solvente	36
3.4 - Dinâmica Molecular	37
3.5 – Condições das simulações	38
3.6 – Estrutura das enzimas simuladas	39
3.7 – Ferramentas de análises	40
3.7.1 – Raiz do desvio quadrático médio	40
3.7.2 – Distribuição de distâncias	41
3.7.3 – Dinâmica essencial de proteínas	41
3.7.4 – Ligações de hidrogênio intramoleculares	42
3.7.5 – Ligações de hidrogênio intermoleculares	42

3.7.6 – Áreas acessíveis ao solvente	45
3.7.7 – Raio de giração.....	45
3.7.8 – Energias de interação.....	45
3.8 – Alinhamento das estruturas	46
 Capítulo 4 – Propriedades dinâmicas do par mesofílico-termofílico de xilanases	48
4.1 - Resultados e discussões	48
4.1.1 – A xilanase XBC	48
4.1.2 – A xilanase XTL	54
4.1.3 - Conclusões	61
 Capítulo 5 – Energias de interação e áreas acessíveis ao solvente	63
5.1 - Resultados e discussões	63
5.2 - Conclusões	66
 Capítulo 6 – Ligações de Hidrogênio	67
6.1 – Histórico.....	67
6.2 – Ligações de hidrogênio intramoleculares	70
6.2.1 – Resultados e discussões	70
6.2.1.1 – Xilanase XBC.....	70
6.2.1.2 – Xilanase XTL.....	81
6.2.2 – Conclusões.....	97
6.3 – Ligações de hidrogênio intermoleculares	99
6.3.1 – Resultados e discussões	99
6.3.2 – Conclusões.....	124
 Capítulo 7 – Xilanases XBC e XTL na presença do substrato	127
7.1 – Di-xilopirranose em solução aquosa	127
7.1.1 – Resultados e discussões	127
7.1.2 – Conclusões.....	130

7.2 – Xilanases na presença de substrato	130
7.2.1 – Sistema XBC + DIX: Resultados e discussões	130
7.2.2 – Sistema XTL + DIX: Resultados e discussões	138
7.2.3 – Conclusões.....	146
Conclusões gerais	148

Resumo

As xilanases (EC 3.2.1.8), enzimas produzidas por diversos organismos, são capazes de hidrolisar as ligações β -1,4 da cadeia principal da xilana, o mais abundante polissacarídeo hemicelulósico da natureza. O grande potencial biotecnológico das xilanases consiste na sua aplicação nas etapas de branqueamento do papel, nas quais a xilana é hidrolisada sob condição de temperatura elevada para facilitar a remoção da lignina (substância responsável pela coloração), diminuindo a quantidade de compostos clorados utilizados nestas etapas. A termoestabilidade e a especificidade pela xilana são as propriedades responsáveis pelo grande interesse biotecnológico e comercial que as xilanases têm atraído. As xilanases mesofílica, XBC, de temperatura ótima 55°C (produzida pela bactéria *Bacillus circulans*) e termofílica, XTL, de temperatura ótima 70°C (produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*) foram estudadas comparativamente por simulação de dinâmica. Os sistemas foram modelados pelo campo de força GROMOS-96(43A1) e as simulações realizadas pelo programa GROMACS 3.2. O objetivo do trabalho é relacionar as diferenças estruturais, energéticas e dinâmicas com as diferentes termostabilidades exibidas por estas enzimas. Os estudos por simulação sugerem claramente a existência de dois grandes tipos de regiões nas enzimas xilanases XBC e XTL: uma conservada e de grande estabilidade, que é o domínio palma, e a outra que pode sofrer grande movimentação, no caso o domínio polegar. Uma movimentação do tipo “abre-fecha” de dobradiça foi identificada. O monitoramento das ligações de hidrogênio inter/intramoleculares e pontes salinas ao longo do tempo e em função da temperatura permitem explicar clara e detalhadamente as diferentes termoestabilidades exibidas por duas proteínas da mesma família que compartilham de uma estrutura tridimensional altamente semelhante. Foi possível identificar 14 resíduos carregados que estão presentes na XTL e ausentes na XBC, tais resíduos devem ser considerados sítios potenciais de mutação na XBC. De uma maneira geral, tanto na XBC quanto na XTL, a presença do substrato não altera as características de cada domínio/região mas confere estabilidade para o domínio polegar. Nenhuma diferença clara na afinidade pelo substrato foi detectada pelas interações intermoleculares proteína-substrato.

Abstract

The enzymes xylanases (EC 3.2.1.8) are produced by several microorganisms and used to hydrolyze the β -1,4 bonds of the xylan main chain, the most abundant hemicellulose in nature. The great biotechnological potential of the xylanases is due to its application in the pulp-bleaching processes when the xylan is hydrolyzed under high temperature condition to optimize the lignin removal. This procedure presents the advantage to reduce the amount of chlorine chemicals used in the pulp-bleaching process. The required properties of a biotechnologically useful xylanase include thermostability and high affinity for xylan. The mesophilic, XBC, (from *Bacillus circulans*) and thermophilic, XTL, (from *Thermomyces lanuginosus*) xylanases were studied by molecular dynamics simulations. The primary structures of these enzymes are almost completely different while the tertiary structures are identical. The objective of the study is to get some insight on the factors that are responsible for the xylanase thermostability. The systems were modeled by the GROMOS96-(43A1) force field and the molecular dynamic simulations were performed by the GROMACS 3.2 package in the temperature range from 25 to 80°C. The results obtained with both xylanases were compared. The existence of two kinds of regions was identified in XBC and XTL: the first one conserved and highly stable is formed by the so-called palm and fingers domains. The second region exhibits large movements: this is the thumb domain. A kind of “open-close” motion was identified that maybe can facilitate the access of the xylane to the active center. The inter/intramolecular hydrogen bonds and salt bridges allow to explain at great length the thermostability differences between the two enzymes. It was possible to identify 14 charged residues present in the XTL with no similar in the XBC: such residues must be considered outstanding mutation sites in XBC. In the presence of the substrate, the characteristics of each domain/region are not modified but the stability of the thumb domain is increased. No difference in the affinity for the substrate was detected between the xylanases and it can be suggested that the activation energies are similar. Two water molecules were found in the active site supporting the hydrolysis mechanisms proposed in the literature.

Lista de figuras

Figura 1.1: Águas ligadas na hemoglobina. Estrutura cristalina da hemoglobina mostrada (a) com as moléculas de água ligadas (esferas vermelhas) e (b) sem as moléculas de água.

Figura 1.2: Ligação de um substrato no sítio ativo de uma enzima, a xilanase, o substrato ligado está em azul. Os resíduos do sítio ativo da enzima estão especificados pela cor vermelha.

Figura 1.3: Energia livre do sistema em função do percurso da reação não catalisada (preto) e catalisada (azul).

Figura 2.1: Ligações β -1,4 da cadeia principal da xilana.

Figura 2.2: Sobreposição das estruturas tridimensionais das xilanases XTL (cinza) e XBC (amarelo).

Figura 2.3: Composição em aminoácidos na XBC: 54.1%(apolares), 29.2%(polares) e 16.7% (carregados). Total de 185 resíduos.

Figura 2.4: Composição em aminoácidos na XTL: 61.9%(apolares), 21.6%(polares) e 16.5% (carregados). Total de 194 resíduos.

Figura 2.5: Resíduos catalíticos de Glu na XBC. As posições dos resíduos catalíticos de Glu na XTL estão nas mesmas posições na XBC.

Figura 3.1: Estruturas tridimensionais das xilanases XBC e XTL juntamente com a analogia da mão direita.

Figura 3.2: Funções de distribuição radial $g_{AW}(r)$.

Figura 3.3: Distribuição de energia de pares, $F(E)$, correspondente aos mesmos átomos exemplificados na figura 3.2.

Figura 4.1: RMSD(t) para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 4.2: RMSD médio por resíduo para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 4.3: Estrutura em fitas da xilanase XBC, as posições dos resíduos de Gly estão destacadas em amarelo.

Figura 4.4: $D_{abre-fecha}(t)$ para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 4.5: Estruturas tridimensionais do esqueleto da xilanase XBC nas diferentes temperaturas. Duas diferentes visões são apresentadas em cada temperatura.

Figura 4.6: RMSD(t) para a xilanase XTL a 80°C.

Figura 4.7: RMSD(t) para a xilanase XTL nas diferentes temperaturas.

Figura 4.8: RMSD(t) para a xilanase XTL nas diversas temperaturas, tomando como estrutura de referência, para cada simulação, a estrutura cristalográfica.

Figura 4.9: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XTL nas diferentes temperaturas.

Figura 4.10: RMSD médio por resíduo para a xilanase XTL nas diferentes temperaturas.

Figura 4.11: Estruturas tridimensionais do esqueleto da xilanase XTL nas diferentes temperaturas. Duas diferentes visões são apresentadas em cada temperatura.

Figura 5.1: AAS para as xilanases XTL e XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 5.2: Energia da proteína para as xilanases XTL e XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 5.3: Energia proteína-solvente para as xilanases XTL e XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 6.1: Número de LH BB na XBC.

Figura 6.2: Número de LH BS na XBC.

Figura 6.3: Número de LH SS na XBC.

Figura 6.4: Energia média das LH BB na XBC.

Figura 6.5: Energia média das LH BS na XBC.

Figura 6.6: Energia média das LH SS na XBC.

Figura 6.7: Energia total das LH BB na XBC.

Figura 6.8: Energia total das LH BS na XBC.

Figura 6.9: Energia total das LH SS na XBC.

Figura 6.10: Visão lateral da estrutura tridimensional da XBC mostrando os resíduos que formam o sítio catalítico. Os resíduos em vermelhos são os Glu78 e 172, em azul são os Trp9, 71 e 129, em amarelo as Tyr65, 69, 79, 80, 166 e 174.

Figura 6.11: Visão frontal da estrutura tridimensional da XBC mostrando os resíduos que formam o sítio catalítico. Os resíduos em vermelhos são os Glu78 e 172, em azul são os Trp9, 71 e 129, em amarelo as Tyr65, 69, 79, 80, 166 e 174.

Figura 6.12: Número de LH BB na XTL.

Figura 6.13: Número de LH BS na XTL.

Figura 6.14: Número de LH SS na XTL.

Figura 6.15: Energia média das LH BB na XTL.

Figura 6.16: Energia média das LH BS na XTL.

Figura 6.17: Energia média das LH SS na XTL.

Figura 6.18: Localização da ponte salina Asp97-Arg116.

Figura 6.19: Energia total das LH SS por domínio na XTL.

Figura 6.20: Disposição espacial das pontes salinas de maior estabilidade nas xilanases XBC e XTL. As pontes salinas marcadas são conservadas nestas xilanases.

Figura 6.21: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, aminas secundárias e cadeias laterais da XBC.

Figura 6.22: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, aminas secundárias e cadeias laterais da XTL.

Figura 6.23: Número total de LH_{inter} realizadas pelos grupos carbonilas, aminas secundárias e cadeias laterais da XBC.

Figura 6.24: Número total de LH_{inter} realizadas pelos grupos carbonilas, aminas secundárias e cadeias laterais da XTL.

Figura 6.24: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.25: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, por região/domínio, da XTL.

Figura 6.26: Energia total das LH_{inter} para os grupos aminas secundárias, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.27: Energia total das LH_{inter} para os grupos aminas secundárias, por região/domínio, da XTL.

Figura 6.28: Energia total das LH_{inter} para as cadeias laterais, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.29: Energia total das LH_{inter} para as cadeias laterais, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.30: Número total de LH_{inter} realizadas pelas cadeias laterais, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.31: Número total de LH_{inter} realizadas pelas cadeias laterais, por região/domínio, da XTL.

Figura 6.32: Disposição espacial dos resíduos, da XBC, formadores de LH_{inter} com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} , em quatro diferentes ângulos. As diferentes colorações são para destacar os domínios/regiões.

Figura 6.33: Disposição espacial dos resíduos, da XTL, formadores de LH_{inter} com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} , em quatro diferentes ângulos. As diferentes colorações são para destacar os domínios/regiões.

Figura 6.34: LH intramoleculares, na XBC.

Figura 6.35: LH intramoleculares, na XTL.

Figura 6.36: Resíduos Asp41, Asp97, Asp157, Asp135, Asp192, Glu7, Glu31, Glu36, Glu63, Glu91, Glu109, Arg116, Arg187 e Arg161. Os resíduos de Asp estão na cor azul, os de Glu na cor vermelha e os de Arg em verde.

Figura 6.37: Resíduos Glu109 e suas primeiras 4 moléculas de água de solvatação.

Figura 6.38: Resíduos Glu31(esquerda), Asp41(direita) e suas primeiras 4 moléculas de água de solvatação.

Figura 6.39: Resíduos Glu36(esquerda), Glu63 (direita) e Arg187 (centro) e suas primeiras 4 moléculas de água de solvatação.

Figura 6.40: Função de distribuição radial, $g_{Aw}(r)$ para $A=OE$ (Glu) e $w=H$ (água).

Figura 6.41: Função de distribuição radial, $g_{Aw}(r)$ para $A=OD$ (Asp) e $w=H$ (água).

Figura 6.42: Função de distribuição radial, $g_{Aw}(r)$ para $A=HH$ (Arg) e $w=O$ (água).

Figura 6.43: Configuração equilibrada dos resíduos Glu91(vermelho), Arg141(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.44: Configuração equilibrada dos resíduos Glu7(vermelho), Tyr14 e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.45: Configuração equilibrada dos resíduos Asp135(vermelho), Lys119(azul), Thr121 e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As

moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.46: Configuração equilibrada dos resíduos Asp192(vermelho), Arg58(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.47: Configuração equilibrada dos resíduos Asp157(vermelho), Arg161(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.48: Configuração equilibrada dos resíduos Asp97(vermelho), Arg116(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 7.1: RMSD calculado para os átomos de carbono da DIX.

Figura 7.2: Diferentes conformações geradas pela rotação da ligação β -1,4.

Figura 7.3: Raio de giração da DIX em função do tempo.

Figura 7.4: Diferentes visões da xilanase XBC na presença do substrato DIX.

Figura 7.5: RMSD da XBC, na presença de DIX, em função do tempo.

Figura 7.6: RMSD por resíduo da XBC, na presença de DIX.

Figura 7.7: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XBC à 55°C na presença e ausência de DIX.

Figura 7.8: Identificação dos átomos de hidrogênio e oxigênio do substrato DIX.

Figura 7.9: Resíduos Asn35 e Gln7 em azul e Pro116 em vermelho.

Figura 7.10: Na direita; resíduos Glu78 e Glu172, em vermelho, Arg112 em azul e Tyr69 em verde. Na esquerda; ampliação da região assinala com a presença do substrato em laranja e as distâncias interatômicas em Å. As moléculas de água mostradas apresentam tempo de residência de aproximadamente 50% do tempo total de simulação da XBC à 55°C, nessa configuração.

Figura 7.11: RMSD da DIX, no ambiente do sítio ativo, em função do tempo.

Figura 7.12: RMSD da XTL, na presença de DIX, em função do tempo.

Figura 7.13: RMSD por resíduo da XTL, na presença de DIX.

Figura 7.14: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XTL à 45°C na presença e ausência de DIX.

Figura 7.15: Resíduos Glu86 e Glu178, em vermelho, Arg122 em azul e Tyr77 em verde, o substrato em laranja e as distâncias interatômicas em Å. As moléculas de água mostradas apresentam tempo de residência de aproximadamente 40% do tempo total de simulação da XTL a 70°C, nessa configuração.

Figura 7.16: Mecanismo de hidrólise nos quais os resíduos Glu78/Glu86 são responsáveis pelo ataque nucleófilo.

Figura 7.17: Mecanismo de hidrólise na qual a molécula de água promove o ataque nucleofílico sem dissociação.

Lista de tabelas

Tabela 3.1: Detalhes sobre os sistemas simulados. Código PDB é o código da proteína no banco de dados de proteína, PDB, N⁺/N⁻ são os números de Na⁺ e Cl⁻ adicionados ao sistema e T_o é a temperatura ótima de cada enzima.

Tabela 3.2: Definição das regiões/domínios do par mesofílico-termofílico de xilanases.

Tabela 6.1: Diferentes tipos de LH e suas características.

Tabela 6.2: Fr (%) das LH BB dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XBC.

Tabela 6.3: Fr (%) das LH SS dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XBC.

Tabela 6.4 : Energias médias em kcal mol⁻¹ e as Fr (%) das pontes salinas detectadas.

Tabela 6.5: Fr (%) das LH BB dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XTL.

Tabela 6.6: Fr (%) das LH BS dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XTL.

Tabela 6.7: Fr (%) das LH SS dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XTL.

Tabela 6.8: Fr (%) das LH BB interdomínios da xilanase XBC. As LH cruzadas apresentam duas ocorrências separadas por (/).

Tabela 6.9: Fr (%) das LH BB interdomínios da xilanase XTL. As LH cruzadas apresentam duas ocorrências separadas por (/).

Tabela 6.10: Fr (%) das LH BS interdomínios da xilanase XBC.

Tabela 6.11: Fr (%) das LH BS interdomínios da xilanase XTL.

Tabela 6.12: Fr (%) das LH SS interdomínios da xilanase XBC.

Tabela 6.13: Fr (%) das LH SS interdomínios da xilanase XTL.

Tabela 6.14: LH_{inter} dos resíduos da região catalítica da XBC. N_{LH} é o número de LH calculadas e E_M a energia média das LH_{inter} em kcal.mol⁻¹.

Tabela 6.15: LH_{inter} dos resíduos da região catalítica da XTL. N_{LH} é o número de LH calculadas e E_M a energia média das LH_{inter} em kcal.mol⁻¹.

Tabela 6.16: LH_{inter} da XBC que apresentam energia média menor que -9.0kcal.mol⁻¹. As E_M são dadas em kcal.mol⁻¹.

Tabela 6.17: LH_{inter} da XTL que apresentam energia média menor que -9.0kcal.mol⁻¹. As E_M são dadas em kcal.mol⁻¹.

Tabela 6.18: Porcentagem de cada resíduo detectado com energia menor que -9.0kcal.mol⁻¹.

Tabela 7.1: Fr, em %, das LH entre a XBC e o substrato DIX. Os átomos de oxigênio e hidrogênio do substrato DIX, entre parêntesis, estão identificados na figura 7.8.

Tabela 7.2: Fr, em %, das LH entre a XTL e o substrato DIX. Os átomos de oxigênio e hidrogênio do substrato DIX, entre parêntesis, estão identificados na figura 7.8. A nomenclatura OE1 e OE2 é usada para diferenciar os dois oxigênios do grupo carboxila dos resíduos Glu7 e 86.

Abreviaturas

AAS – Área acessível ao solvente

D_{abre-fecha} – Distância entre o centro de massa do domínio polegar e o centro de massa do domínio dedos.

D_{i,j} – Distância interatômica

DIX – Di-xilopirranose

DM – Dinâmica molecular

E – Energia

E_M – Energia média das ligações de hidrogênio intermoleculares realizadas pelos átomos da cadeia lateral do resíduo em questão.

E_T – Energia total das ligações de hidrogênio intermoleculares.

F(E) – Histograma da energia de interação entre pares de átomos.

Fr – Fração de ocorrência das ligações de hidrogênio intramoleculares.

g(r) – Função de distribuição radial.

LH – Ligações de hidrogênio (geral).

LH_{inter} – Ligações de hidrogênio intermoleculares (geral).

LH_{intra} – Ligações de hidrogênio intramoleculares (geral).

LH_{interdomínios} – Ligações de hidrogênio interdomínios.

LH BB – Ligações de hidrogênio intramoleculares cadeia principal-cadeia principal.

LH BS – Ligações de hidrogênio intramoleculares cadeia principal-cadeia lateral.

LH SS – Ligações de hidrogênio intramoleculares cadeia lateral-cadeia lateral.

N_{LH} – Número de ligações de hidrogênio intermoleculares realizadas pelos átomos das cadeias laterais dos resíduos em questão.

NLH(inter)_{tot} – Número total de ligações de hidrogênio intermoleculares.

PME – Particle-Mesh-Ewald

R_g – Raio de giração.

RMSD – Root mean square deviation (desvio da raiz quadrática média).

XBC – Xilanase mesofílica produzida pela bactéria *Bacillus circulans*.

XTL – Xilanase termofílica produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*.

Estrutura de proteínas e Catálise

1.1 Estrutura e função de proteínas

A função de uma proteína depende da sua estrutura tridimensional entre os átomos que a compõem. As estruturas protéicas têm sido tradicionalmente descrita em termos de quatro níveis de organizações [1-3] chamados de estruturas primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos que compõem a cadeia peptídica, sem considerar o arranjo espacial. A estrutura secundária é o arranjo espacial local dos átomos da cadeia principal sem considerar a conformação de suas cadeias laterais ou a sua relação com os outros segmentos. Os principais tipos de estruturas secundárias são as estruturas α -hélices, β -folhas e dobras. A estrutura terciária refere-se à estrutura tridimensional do polipeptídeo inteiro, ou seja, o empacotamento e enovelamento das cadeias polipeptídicas, sem considerar a relação com moléculas vizinhas ou com as subunidades. Muitas proteínas são compostas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, chamadas de subunidades, às quais são associadas por interações não covalentes. A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial das subunidades das proteínas.

A estrutura secundária é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e aminas secundárias separadas por cerca de três aminoácidos, no caso das α -hélices, ou entre segmentos afastados de uma mesma cadeia nas β -folhas. As estruturas terciárias e quaternárias são estabilizadas por interações iônicas e não covalentes [1-3] como, por exemplo, forças entre dipolos. Um exemplo típico é dado pelas ligações de hidrogênio. Outros tipos de interações na manutenção e estabilização das estruturas tridimensionais são as interações de van der Waals. Ligações químicas entre os átomos de enxofre de cisteínas contribuem para a definição da estrutura terciária.

As interações intramoleculares em uma proteína sofrem uma forte influência do meio dispersante [4]. Moléculas de água podem ser retidas no meio de proteínas, estabilizando certas regiões, ou mais frequentemente se adsorvem na superfície da proteína ajudando também na manutenção da estrutura [5]. A estrutura da proteína é um elemento fundamental no seu funcionamento, uma vez que uma proteína desnaturada perde completamente a sua atividade biológica [5,6].

A desnaturação de uma proteína pode ocorrer devido a vários fatores como, por exemplo, a temperatura, pH e adição de alguns solventes orgânicos miscíveis em água como o etanol e a acetona [1,2]. Os solventes orgânicos agem primariamente pela ruptura das interações hidrofóbicas responsáveis pela estabilidade do núcleo de proteínas globulares; valores extremos de pH alteram a carga líquida da proteína provocando repulsão eletrostática e rompimento de algumas ligações de hidrogênio.

O mecanismo de desnaturação e renaturação de proteínas é uma das questões mais fundamentais da biofísica que ainda permanecem obscuras. As estruturas ativas de proteínas são mantidas por um delicado balanço de forças não covalentes intra e intermoleculares, como por exemplo, eletrostáticas, hidrofóbicas, van der Waals e ligações de hidrogênio [2,5]. Em temperaturas elevadas, as interações não covalentes podem ser rompidas desnaturando a proteína. A desnaturação de uma proteína em solução aquosa por meio do aumento da temperatura conduz às estruturas colapsadas de cadeia estendida (estruturas denominadas "random coil"), como experimentos e simulações mostram claramente [7,8]. No entanto, organismos como alguns fungos e bactérias que sobrevivem sob condições extremas de temperatura, chamados termófilos, produzem proteínas que exibem uma estabilidade térmica intrínseca [9,10]. As proteínas termoestáveis têm sido alvos de muitos estudos experimentais e teóricos com o objetivo de elucidar os mecanismos de estabilização estrutural, desnaturação/renaturação e enovelamento de proteínas, contribuindo para o desenvolvimento de novos biocatalisadores altamente estáveis. Os estudos já realizados sugerem que a simulação molecular pode fornecer informações sobre como as enzimas começam a se desnaturar e quais os fatores responsáveis pela desestabilização [11,12]. A comparação entre

simulações de dinâmica molecular reproduzindo o comportamento de proteínas a temperatura ambiente e a temperaturas elevadas (induzindo a desnaturação), permite distinguir os processos relacionados com a catálise daqueles relacionados com a desnaturação, possibilitando identificar as regiões que podem sustentar a estabilidade sem afetar a atividade [11]. Entre outros fatores investigados, o solvente tem recebido considerável atenção [13-15].

O único solvente com importância biológica é a água, substância mais abundante nos sistemas vivos. A água permeia todas as porções de todas as células [3], por isso todas as estruturas da célula, e consequentemente as suas funções, dependem das propriedades físicas e químicas da água, entre elas a sua alta polaridade, baixa tendência de ionização, pequena massa e volume reduzido [16-27]. Além disso a alta polaridade é responsável pela formação das muito importantes ligações de hidrogênio entre as próprias moléculas de água [2,3]. Estes fatores são essenciais no funcionamento das proteínas e de toda a maquinaria biológica. As moléculas de água interagem fortemente com grupos polares e carregados eletricamente podendo formar ligações de hidrogênio que são fundamentais na manutenção das estruturas protéicas [28] (figura 1.1). Portanto as moléculas de água estão entre as grandes responsáveis pela estabilização das estruturas terciária e quaternária das proteínas [28].

Figura 1.1: Águas ligadas na hemoglobina. Estrutura cristalina da hemoglobina mostrada (a) com as moléculas de água ligadas (esferas vermelhas) e (b) sem as moléculas de água. Créditos à [3].

1.2 Catálise enzimática

Existem duas condições fundamentais para vida: (i) auto-replicação (o organismo deve ser capaz de se auto-replicar) e (ii) catálise (o organismo deve ser capaz de catalisar reações químicas de maneira eficiente e seletiva). A catálise é essencial no processo de obtenção de energia de todo ser vivo. Sem a catálise, as reações químicas necessárias para sustentação da vida não ocorrem numa escala de tempo útil. Os catalisadores dos processos que ocorrem nos sistemas biológicos são as enzimas. As enzimas apresentam uma alta eficiência catalítica, em geral, muito maior que as dos catalisadores sintéticos e inorgânicos [3]. A alta especificidade por seu substrato é responsável pela maneira pelas quais as enzimas aceleram suas reações [1-3].

As enzimas são essenciais para qualquer processo bioquímico, pois estas agem de forma organizada, catalisando centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, a energia é conservada e transformada e as macromoléculas biológicas são formadas a partir de moléculas precursoras simples [1-3]. Como conseqüências da ação enzimática reguladora, as vias metabólicas são altamente coordenadas de forma a proporcionar uma atuação harmoniosa das atividades necessárias para a manutenção da vida.

As enzimas têm uma grande importância prática, por exemplo, em doenças especialmente nas genéticas herdadas pode haver deficiência ou ausência de uma ou mais enzimas, pode haver também condições enzimáticas anormais (excesso de atividade). Muitas drogas exercem seu efeito biológico por meio de interações com as enzimas. As enzimas tornaram-se ferramentas importantes não apenas na medicina, mas também na indústria química, alimentícia e na agricultura [5].

Todas as enzimas são proteínas, exceto um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, logo sua atividade depende da integridade da sua estrutura protéica nativa. Assim, todos os níveis de estruturação protéica são essenciais para a ação enzimática. Algumas enzimas requerem outros grupos químicos além dos seus resíduos de aminoácidos para desempenhar sua função, como por exemplo, um co-fator (íons inorgânicos) ou uma coenzima (molécula orgânica).

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que elas catalisam, com base num acordo internacional que permite descrever as propriedades das enzimas, considerando sua classe, subclasse e outras características. Por exemplo, as endo-1,4- β -xilanases, ou simplesmente xilanases, são designadas por E.C.3.2.1.8, grupo das glicosil hidrolases, onde 3 é a classe das hidrolases, 2 a sub-classe das glicosilases, 1 se refere as enzimas glicosidases que hidrolisam compostos O- e S-glicosílicos e 8 é a designação para a endo-1,4- β -xilanases.

Sem catálise as reações necessárias para digerir alimentos, contrair um músculo ou mandar sinais através dos nervos, não ocorreriam em velocidade útil. As enzimas superam estes problemas fornecendo um ambiente específico onde uma determinada reação é energeticamente mais favorável. Esse ambiente é denominado sítio ativo, figura 1.2. A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a ação enzimática é chamada substrato.

Figura 1.2: Ligação de um substrato no sítio ativo de uma enzima, a xilanase, o substrato ligado está em azul. Os resíduos do sítio ativo da enzima estão especificados pela cor vermelha.

Figura 1.3: Energia livre do sistema em função do percurso da reação não catalisada (preto) e catalisada (azul).

A superfície do sítio ativo é constituída por resíduos de aminoácidos cujas cadeias laterais se ligam ao substrato e catalisam a sua transformação. A existência do complexo enzima-substrato foi inicialmente proposta por Adolphe Wurtz em 1880 [5], sendo também ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem a cinética das reações enzimáticas, assim como os mecanismos de ação.

A figura 1.3 mostra esquematicamente o caminho de uma reação não-catalisada e o de uma reação catalisada, que considera a reação enzimática simples, $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$. As enzimas, como quaisquer catalisadores, não afetam o equilíbrio da reação. A enzima não é gasta no processo e muito menos afeta o ponto de equilíbrio da reação. As enzimas fornecem caminhos alternativos para aumentar a velocidade da reação e isto é feito diminuindo a energia de ativação ΔG^{**} , pela estabilização do estado de transição. A diferença entre os níveis de energia do estado fundamental e do estado de transição é chamada de energia de ativação. A velocidade de uma reação reflete a energia de ativação, ou seja, uma energia de ativação alta corresponde a uma reação lenta. As velocidades das reações podem ser aumentadas pela elevação da temperatura, que aumenta o número de moléculas com energia suficiente para superar a barreira energética (energia de ativação).

Referências

- [1] L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, (1995).
- [2] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, John Wiley and Sons, New York, (1995).
- [3] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo, (1995).
- [4] O. Tapia, R. Daudel, A. Pullman, L. Salem, A. Veillard, D. Reidel, *Quantum Theory of Chemical Reactions*, D. Pub. Cy, vol. II.

- [5] T. E. Creighton, *Proteins - Structures and Molecular Principles*, W. E. Freeman and Company, New York, (1983).
- [6] J. S. Richardson, *Adv. Prot. Chem.*, **34**, 167, (1981).
- [7] R. Day, B. J. Bennion, S. Ham, V. Daggett, *J. Mol. Biol*, **322**, 189, (2002).
- [8] A. M. Tsai, T. J. Udovic, D. A. Neumann, *Biophys. J.*, **81**, 2339, (2001).
- [9] C. Vieille, G. J. Zeikus, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1, (2001).
- [10] G. W. Harris, R. W. Pickersgill, I. Connerton, P. Debeire, J. Touzel, C. Breton, S. Pérez, *Proteins: Structure, Functions and Genetics*, **29**, 77, (1997).
- [11] L. D. Creveld, A. Amadei, R. C. van Schaik, H. A. Pepermans, J. de Vlieg, H. J. Berendsen, *Proteins*, **33**, 253, (1998).
- [12] T. Lazaridis, I. Lee, M. Karplus, *Protein. Sci.*, **6**, 2589, (1997).
- [13] V. Réat, R. Dunn, M. Ferrand, J. L. Finney, R. M. Daniel, J. C. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 9961, (2000).
- [14] C. L. Brooks, M. Karplus, *J. Mol. Biol.*, **208**, 159, (1989).
- [15] J. C. Smith, S. Cusack, B. Tidor, M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, **93**, 2974, (1990).
- [16] F. M. Richards, in *Protein Folding*, T. E. Creighton (Ed), W. E. Freeman and Company, New York, (1992).
- [17] L. Degrève, C. Quintale Jr., *Electrochimica Acta*, **38**, 1405, (1993).
- [18] L. Degrève, C. Quintale Jr., *Chem. Phys. Lett.*, **208**, 530, (1993).
- [19] L. Degrève, C. Quintale Jr., *J. Chem. Phys.*, **101**, 2319, (1994).
- [20] D. S. Vieira, L. Degrève, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **580**, 127, (2002).
- [21] L. Blum, L. Degrève, *Mol. Phys.*, **88**, 585, (1996).
- [22] L. Degrève, L. Blum, *Physica A*, **224**, 550, (1996).
- [23] L. Degrève, V. M. de Pauli, M. A. Duarte, *J. Chem. Phys.*, **106(2)**, 655, (1997).
- [24] J. O. Bockris, A. K. N. Reddy, in *Modern Electrochemistry*, Plenum, New York, (1970).
- [25] A. Ben-Naim, *Ionic Solutions*, Plenum, New York, (1980).
- [26] Y. Marcus, *Ion Solvation*, J. Wiley and Sons, New York, (1985).
- [27] Solvation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **85**, (1988).
- [28] G. A. Jeffrey, W. Saenger, in *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, (1994).

Enzimas termoestáveis

2.1 Xilanases

Depois da celulose, a xilana é o polissacarídeo mais abundante da natureza. A cadeia principal da xilana é formada por resíduos de β -D-xilopirranose unidos por ligações β -(1-4) [1,2], como mostra a figura 2.1. A xilana é um dos componentes do material hemicelulósico das células vegetais (material formado por polímeros de polissacarídeos ramificados, como por exemplo; xiloglucano, arabinoxilano, xilana, etc).

Figura 2.1: Ligações β -1,4 da cadeia principal da xilana.

A xilana localiza-se principalmente na parede celular secundária, formando uma interface entre a lignina, polímero complexo de unidades de fenilpropano, e outros polissacarídeos, por exemplo, a celulose [2]. Existem evidências de que a xilana e os resíduos fenólicos de lignina estejam unidos por ligações covalentes e de que ligações de hidrogênio e forças de van der Waals unem este polissacarídeo à cadeia de celulose [3]. Enzimas hemicelulolíticas são necessárias para

hidrolisar completamente a xilana. As enzimas que atuam na cadeia principal das xilanas são as $\text{exo-1,4-}\beta\text{-xilosidases}$ e as $\text{endo-1,4-}\beta\text{-xilanases}$ ou simplesmente xilanases. Xilanases são produzidas por vários organismos como bactérias, fungos, algas, protozoários e artrópodes e são capazes de hidrolisar as ligações $1,4\text{-}\beta$ da cadeia principal da xilana, produzindo vários xilo-oligômeros de comprimentos variados [4,5]. Muitas bactérias e fungos secretam xilanases que atuam no material hemicelulósico para liberar a xilose como um produto final diretamente assimilável, permitindo que o organismo cresça heterotroficamente na xilana [5].

As xilanases podem ser classificadas em duas principais famílias de glicosil hidrolases: a família F (também conhecida como 10) e G (também conhecida como 11). As xilanases da família 10 são maiores, mais complexas e apresentam estruturas diversas enquanto que as xilanases da família 11 são menores, mais consistentes estruturalmente, e mais específicas para a xilana [5,6]. Portanto, as características apresentadas pelas xilanases da família 11 são responsáveis pela ampla aplicabilidade biotecnológica destas enzimas, motivo pelo grande interesse mostrado nos últimos anos em estudá-las [7-12]. Tais estudos estão direcionados na aplicação das xilanases nos processos industriais de branqueamento de papel. As xilanases hidrolisam a cadeia glicosídica da xilana contida na superfície da polpa, facilitando a extração da lignina (principal componente da polpa que contém os grupos cromóforos responsáveis pela coloração) sem danificar a celulose [6]. O intuito do uso de xilanases é de substituir, ou ao menos diminuir, a quantidade de cloro usado nestes processos, uma vez que leis ambientais têm colocado restrições para o uso de cloro nos processos de branqueamento na indústria de papel, principalmente nos países da Europa Ocidental e na América do Norte, devido à formação de compostos agressivos ao meio ambiente como os organoclorados e dioxinas [13]. Estudos comprovaram que o uso de xilanases nos processos de branqueamento conduziu a uma redução de 20-30% no consumo de cloro e conseqüentemente uma diminuição de 15-20% na taxa de halogênios orgânicos adsorvidos nos efluentes [9-12]. O uso de xilanases nos processos de delignificação é chamado de biobranqueamento [11].

A potencialidade biotecnológica das xilanases se deve principalmente à dois fatores: alta especificidade pela xilana e em especial à termoestabilidade,

pois os processos de delignificação ocorrem mais rapidamente em temperaturas elevadas (50-100°C) [5,14]. As proteínas que apresentam termoestabilidade são classificadas como termofílicas ou mesofílicas [15,16]. Excluindo as variações filogenéticas, as termofílicas são similares às mesofílicas nos seguintes aspectos:

- (i) seus resíduos de aminoácidos são de 30-85% similares às das mesofílicas;
- (ii) suas estruturas tri-dimensionais são superponíveis;
- (iii) compartilham o mesmo mecanismo catalítico, porém diferem na estabilidade térmica;

As proteínas termofílicas são aquelas que, mantêm as suas estruturas nativas sob condições mais elevadas de temperatura do que as mesofílicas homólogas. Devido ao fato das proteínas termofílicas e mesofílicas apresentarem seqüências e estruturas tridimensionais muito similares, os fatores responsáveis pelas diferentes termoestabilidades permanecem obscuros [17].

Dentro da família 11, foram escolhidas as xilanases produzidas pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* (XTL) e pela bactéria *Bacillus circulans* (XBC), termofílica e mesofílica respectivamente.

A figura 2.2 apresenta a sobreposição das estruturas tridimensionais da XTL e XBC.

Figura 2.2: Sobreposição das estruturas tridimensionais das xilanases XTL (cinza) e XBC (amarelo).

As composições de acordo com as características dos resíduos de aminoácidos estão mostradas nas figuras 2.3 e 2.4, onde a cor cinza representa os resíduos apolares, amarelo os resíduos polares, vermelho os resíduos carregados negativamente e azul os carregados positivamente. Informações mais específicas sobre as xilanases escolhidas estão contidas no **capítulo III**.

Figura 2.3: Composição em aminoácidos na XBC: 54.1%(apolares), 29.2%(polares) e 16.7% (carregados). Total de 185 resíduos.

Figura 2.4: Composição em aminoácidos na XTL: 61.9%(apolares), 21.6%(polares) e 16.5% (carregados). Total de 194 resíduos.

O sítio catalítico proposto [18,19] é formado pelos resíduos Glu86 e Glu178 na XTL e Glu78 e Glu172 na XBC e também um cluster formado por resíduos de Gln, Arg e Tyr ao redor destes resíduos. A figura 2.5 apresenta o posicionamento dos resíduos catalíticos, Glu78 e Glu172 da XBC.

As xilanases da família 11 geralmente apresentam um mecanismo SN1 de duplo deslocamento, no qual os resíduos catalíticos Glu devem atuar como nucleófilos [18,19]. Uma variedade de propriedades e interações envolvendo estes resíduos tem sido examinada por mutagênese [20-22], mas pouco se sabe sobre o papel destas interações dentro do processo global de estabilização estrutural. Dessa forma, um estudo comparativo a nível molecular entre uma proteína

termofílica e uma mesofílica da mesma família, assim como um estudo das suas interações com um polímero de xilopirranose, é fundamental para compreender as bases moleculares da termoestabilidade e da atividade destas enzimas. Como consequência, informações sobre os mecanismos de ação destas enzimas podem ser obtidas, assim como novos mutantes podem ser propostos. O interesse deste estudo é que o entendimento das origens, a nível molecular, da termoestabilidade de proteínas representa um problema crucial por razões práticas e fundamentais. Do ponto de vista prático, enzimas termofílicas apresentam aplicações na catálise de reações que ocorrem em elevadas temperaturas, como por exemplo, nos processos de branqueamento de papel. Do ponto de vista fundamental, a comparação entre enzimas termofílicas e mesofílicas da mesma família pode nos fornecer informações importantes para o entendimento da base molecular da termoestabilidade tão bem como a relação estrutura-atividade destas enzimas. Desse modo, tal estudo a nível molecular é de grande importância para uma descrição teórica dos princípios físico-químicos da termoestabilidade, no enovelamento de proteínas e na caracterização estrutural dos sítios catalíticos das xilanases, fazendo-se necessário na engenharia de proteínas, cuja finalidade é o desenvolvimento de enzimas com características adequadas para uma aplicação particular.

Figura 2.5: Resíduos catalíticos de Glu na XBC. As posições dos resíduos catalíticos de Glu na XTL estão nas mesmas posições na XBC.

Referências

- [1] G. O. Aspinall, *The polysaccharides, vol I, II e III*, Academic Press, Inc., London, (1985).
- [2] P. Biely, *Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases*. In *Hemicellulose and hemicellulases*, ed. Coughlan, Portland Press, London, (1993).
- [3] E. X. Ferreira Filho, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **27**, 1093, (1994).
- [4] R. F. H. Dekker, G. N. Richards, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **32**, 277, (1977).
- [5] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, *FEMS Microbiol. Reviews*, **23**, 411, (1999).
- [6] T. K. Kirk, T. W. Jeffries, *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, American Chemical Society, (1996).
- [7] R. A Prade, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **13**, 101, (1995).
- [8] H. J. Gilbert, G. P. Hazlewood, *J. Chem. Microbiol.*, **139**, 187, (1993).
- [9] M. G. Paice, R. Jr. Bernier, L. Jurasek, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 235, (1988).
- [10] L. Viikari, M. Ranua., A. Kantelinen, J. Sundquist, M. Linko, *Proc. 3rd Int. Conf. Biotechnology Pulp and Paper Industry*, Stockholm, June, **16**, 67, (1986).
- [11] T. A. Clark, A. G. McDonnald, D. J. Senior, P. R. Mayers, *Mannase and xylanase treatment of softwood chemical pulps: effect on pulps properties and beachability*. In *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*, **153**, Butterworth-Heinenmann, Boston, MA.
- [12] J. R. du Manoir, J. Hamilton, D. J. Senior, R. L. Bernier, J. E. Grant, L. E. Mooser, *Proc. Int. Pulp Bleaching Conf.*, Stockholm, **123**, (1991).
- [13] J. M. Chauvt, J. Comtat, P. Noe, *Assistance in bleaching of never-dried pulps by the use of xylanases consequences on pulps properties*. *Proceedings of 4th International Congress on Wood and Pulping Industry*, Paris, **27**, 325, (1987).
- [14] K. Li, P. Azadi, R. Collins, J. Tolan, J. S. Kim, K. L. Eriksson, *Enzym. Microb. Technol.*, **27**, 89, (2000).
- [15] E. X. Ferreira Filho, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **27**, 1093, (1994).
- [16] A. Szilágyi, p. Závodsky, *Structure*, **8**, 493, (2000).
- [17] R. Jaenicke, G. Bohm, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 738, (1998).
- [18] S. L. Lawson, W. W. Wakarchuk, S. G. W. Withers, *Biochemistry*, **35**, 10110, (1996).
- [19] S. L. Lawson, W. W. Wakarchuk, S. G. W. Withers, *Biochemistry*, **36**, 2257, (1997).
- [20] R. Jaenicke, *FEMS Microbiol. Rev*, **18**, 215, (1996).
- [21] M. Aoshima, T. Oshima, *Protein Eng.*, **10**, 249, (1997).
- [22] S. Kimura, H. Nakamura, T. Hashimoto, M. Oobatake, S. Kanaya, *J. Biol. Chem.*, 267, **21535**, (1992).

Objetivos

Estudar de uma maneira comparativa, via simulação molecular, as mudanças conformacionais e as propriedades estruturais e dinâmicas, em função da temperatura, de um par termofílico-mesofílico de xilanases da mesma família, com o intuito de estabelecer as bases moleculares da termoestabilidade destas xilanases.

Metodologia

3.1 Introdução

O principal ingrediente de uma simulação é o modelo físico, isto significa escolher um potencial, uma função $U(r)$ das posições atômicas, que representa a energia potencial do sistema quando os átomos estão arranjados numa configuração específica. No caso de sistemas moleculares, deve ser levado em conta tanto as interações inter como as intramoleculares. É necessário considerar também os estiramentos, vibrações angulares (para moléculas não-lineares) e as vibrações torsionais (para moléculas de cadeias longas). Estas movimentações torsionais são tipicamente de frequência muito menor que a do estiramento, sendo de grande importância no processo de mudança conformacional. Estes efeitos devem ser tratados apropriadamente em dinâmica molecular, dentro da aproximação clássica. Em simulação molecular usa-se um campo de força conservativo que é uma função apenas das posições atômicas. Isto significa que as movimentações eletrônicas não são consideradas: considera-se, de acordo com a aproximação de Born-Oppenheimer, que a dinâmica eletrônica se ajusta instantaneamente, quando as posições atômicas mudam, permanecendo no seu estado fundamental.

3.2 Modelos de proteínas

Em simulação molecular, as proteínas são descritas por modelos que consideram a existência dos vários graus de liberdade internos, assim como as interações intra e intermoleculares. Isto resulta em energias, numa classificação simples, de vibração (estiramento, vibração angular e torsão), de atração-repulsão e interações puramente eletrostáticas. O campo de força GROMOS96(43A1) [1], é um exemplo de campo de força disponível. Este é adequado para simulação de biomoléculas em solução aquosa, pois foi parametrizado exatamente para esta finalidade [2]. O potencial efetivo de interação é desmembrado de acordo com vários graus de liberdade generalizados. Isso resulta nos seguintes componentes da energia de interação:

1. Estiramento de Ligação

$$V_1(r_{i,j}) = \frac{1}{4} K_{vib} [r_{ij}^2 - r_0^2]^2$$

onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j ; K_{vib} é uma constante ajustada para descrever a vibração específica que tem r_0 como distância de equilíbrio.

2. Vibração angular

$$V_2(\theta) = \frac{1}{2} K_{\theta} [\cos(\theta) - \cos(\theta^0)]^2$$

onde K_{θ} é uma constante a ser ajustada para descrever a vibração angular específica que tem θ^0 como ângulo de equilíbrio.

3. Vibração diedral imprópria

$$V_3(\xi) = \frac{1}{2} K_\xi [\xi - \xi^0]^2$$

onde K_ξ é uma constante a ser ajustada para descrever a vibração diedral imprópria específica que tem ξ^0 como ângulo de equilíbrio. Se esta ocorrer entre átomos 1-2-3-4, tem-se que:

$$\vec{R}_{\alpha,2} = \vec{r}_{1,2} \times \vec{r}_{3,2}$$

e

$$\vec{R}_{\alpha,3} = \vec{r}_{3,2} \times \vec{r}_{3,4}$$

logo:

$$\xi_n = \text{sign}(\xi_n) \arccos \left(\frac{\vec{R}_{\alpha,2} \cdot \vec{R}_{\alpha,3}}{R_{\alpha,2} \cdot R_{\alpha,3}} \right)$$

onde $\text{sign}(\xi_n) = \text{sign}(\vec{r}_{1,2} \cdot \vec{R}_{\alpha,3})$ é o sinal de $\vec{r}_{1,2} \cdot \vec{R}_{\alpha,3}$.

4. Vibração diedral

$$V_4(\varphi) = \frac{1}{2} K_\varphi [1 + \cos(\delta) \cos(m\varphi)]$$

onde K_φ e δ são constantes que devem ser ajustadas para descrever a vibração diedral específica. Se a vibração diedral ocorrer entre os átomos 1-2-3-4, tem-se que:

$$\vec{R}_{1,\alpha} = \vec{r}_{1,2} - \frac{(\vec{r}_{1,2} \cdot \vec{r}_{3,2}) \vec{r}_{3,2}}{r_{3,2}^2} \text{ e } \cos \varphi = \pm \frac{\vec{R}_{1,\alpha} \cdot \vec{R}_{4,\alpha}}{R_{1,\alpha} \cdot R_{4,\alpha}}$$

onde φ é o ângulo de equilíbrio.

5. Interações de van der Waals ou de curto alcance

$$V_{6-12}(r_{i,j}) = \frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6}$$

onde $C_{12}(i,j)$ e $C_6(i,j)$ são os coeficientes dos termos de repulsão e de atração, respectivamente, que dependem dos tipos de átomos i e j que interagem e que se pertencerem à mesma molécula não podem ser primeiros, segundos ou terceiros vizinhos.

6. Interações de longo alcance: interações coulombianas

A interação entre duas cargas q_i e q_j separadas por uma distância r_{ij} é dada pela lei de Coulomb:

$$V_{Coul}(r_{i,j}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

onde ϵ_0 é a permissividade do vácuo.

As interações coulombianas são interações de longo alcance por serem funções inversamente proporcionais à distância entre as cargas. Em simulação molecular, o tamanho finito e pequeno dos sistemas em estudo não permite considerar as interações coulombianas até distâncias que poderiam ser consideradas suficientes para desprezar os componentes remanescentes destas interações. De uma maneira geral, as interações são consideradas explicitamente até uma distância, o raio de corte, tal que os cálculos possam ser realizados em tempos factíveis. Correções devem ser portanto introduzidas para se complementar as energias de interação com as contribuições das cargas presentes além do raio de corte até a maior distância possível. Os métodos citados abaixo têm como função corrigir as interações de longo alcance das falhas provocadas pelo truncamento das interações no raio de corte. Dois métodos, que podem ser usados para trabalhar com as forças de longo alcance são geralmente usados. Eles são baseados na soma de Ewald [3,4] e no campo de reação [5]. Na soma de Ewald, as interações entre as cargas, incluindo as imagens, são calculadas. Este método tira vantagem da periodicidade do sistema simulado. O método do campo de reação assume que as interações entre as moléculas presentes além da distância de corte podem ser tratadas pela contribuição média devida às cargas presentes além da distância de corte.

3.3 Modelos de solvente

O solvente, a água, pode ser descrito por vários modelos, em particular pelos modelos SPC [6] e SPC/E [7] que são modelos rígidos a três centros. Ao usar modelos moleculares rígidos, as geometrias devem ser preservadas. Isto pode ser realizado, por exemplo, pelos algoritmos SHAKE [8], SETTLE [9] e LINCS [10], que são apropriados também para tratar os componentes de energia potencial que correspondem às frequências elevadas, tais como as vibrações de estiramento envolvendo átomos de hidrogênio.

3.4 Dinâmica Molecular

Propriedades macroscópicas são sempre médias sobre um ensemble estatístico representativo (equilíbrio ou não-equilíbrio) de sistemas moleculares. Para a geração de um ensemble representativo de equilíbrio dois métodos estão disponíveis: Monte Carlo e dinâmica molecular (DM). Para geração de ensembles de não-equilíbrio e análise de eventos dinâmicos apenas a DM é apropriada. A DM é uma técnica de simulação molecular que, partindo das equações de movimento clássicas, gera as trajetórias atômicas que relacionam estas informações com as propriedades macroscópicas para estudar o comportamento dinâmico e estrutural de sistemas a nível molecular [11,12]. As equações de movimento a serem resolvidas para um sistema de N átomos interagindo são:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = - \frac{\partial U[(\vec{r})^N]}{\partial \vec{r}_i} = \vec{F}_i, i=1, \dots, N$$

onde m_i é a massa do átomo i, $\vec{r}_i(t)$ são as coordenadas de posições do átomo i, $U[(\vec{r})^N]$ é a energia potencial total e $\vec{F}_i$ é a força atuante no átomo i.

Para determinar as trajetórias atômicas ao longo do tempo emprega-se um algoritmo para integrar as equações de movimento de Newton, por exemplo os algoritmos leap-frog [13] e Verlet [14]. O algoritmo de leap-frog usa as posições $\vec{r}_i$

no tempo t e as velocidades $\vec{v}_i$ no tempo $t - \frac{\delta t}{2}$, onde δt é o tempo de integração.

$$\vec{v}_i \left(t + \frac{\delta t}{2} \right) = \vec{v}_i \left(t - \frac{\delta t}{2} \right) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \delta t$$

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i \left(t + \frac{\delta t}{2} \right) \delta t$$

O algoritmo de Verlet é dado por:

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = 2\vec{r}_i - \vec{r}_i(t - \delta t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \delta t^2$$

Os algoritmos leap-frog e Verlet são equivalentes. Tais algoritmos possibilitam a obtenção de propriedades estruturais, temporais e termodinâmicas.

3.5 Condições das simulações

Os sistemas foram simulados usando o programa de dinâmica molecular GROMACS 3.2 [15] e modelados pelo campo de força GROMOS96 (43a1) [1], sendo que o modelo SPC [6] foi usado para descrever as moléculas de água. Os sistemas, constituídos por uma enzima xilanase, moléculas de água e contra-íons para garantir a eletroneutralidade do sistema, apresentam dimensões de 85Å (caixa cúbica), ver tabela 3.1. As simulações foram realizadas no ensemble isotérmico-isobárico, NpT, em pH fisiológico usando condições periódicas e convenção de imagem mínima [16,17]. A temperatura e pressão foram mantidas constantes pelo uso do termostato e barostato de Berendsen [18] com constante de acoplamento temporal de $\tau = 0.1ps$ e compressibilidade da água $\beta_T = 4.5 \times 10^{-15} bar^{-1}$. O acoplamento de pressão foi aplicado isotropicamente sob o sistema. As equações de movimento foram integradas usando o algoritmo leap-frog [13], com um tempo de integração $dt = 2.0fs$. Os tempos totais de simulação variam dependendo do caso. As velocidades iniciais foram obtidas da distribuição de Maxwell na temperatura desejada. Os comprimentos das ligações envolvendo átomos de hidrogênio nas moléculas da proteína foram controlados pelo algoritmo LINCS [10] e no caso das moléculas de água pelo algoritmo SETTLE [9]. As interações de van der Waals foram calculadas dentro de um raio de corte de 1.5nm. As forças de longo alcance foram tratadas pela soma de Ewald, método PME [3,4] com raio de corte fixado em 1.5nm. A faixa de temperatura estudada foi de 25 a 65°C para XBC e de 25 a 80°C para a XTL, em intervalos de 10°C. As simulações foram equilibradas durante 100ps por uma DM de restrição de posições para permitir a relaxação das moléculas do solvente e para evitar que as interações iniciais não-otimizadas proteínas-água possam distorcer a estrutura protéica. A tabela 3.1 apresenta alguns detalhes sobre os sistemas estudados.

Tabela 3.1: Detalhes sobre os sistemas simulados. Código PDB é o código da proteína no banco de dados de proteína, PDB, N+/N- são os números de Na⁺ e Cl⁻ adicionados ao sistema e T_o é a temperatura ótima de cada enzima.

Xilanase	Código PDB	T_o(°C)	Nº águas	Nº íons	Nº total de átomos
XTL (termofílica)	1YNA	65-70	19430	21+/11-	60302
XBC (mesofílica)	1XNB	55	19440	10+/13-	60274

3.6 Estrutura das enzimas simuladas

As estruturais iniciais das simulações foram determinadas por difração de raios-X e obtidas no banco de dados de proteínas, PDB [19]. A xilanase XBC contém 185 resíduos enquanto a que XTL contém 194. As temperaturas ótimas são 55 e 65-70°C [20] para XBC e XTL respectivamente. Temperatura ótima é a temperatura ou faixa de temperatura na qual a enzima apresentou maior atividade. As xilanases estudadas apresentam uma estrutura tridimensional dividida por regiões/domínios, tabela 3.2, que são denominados, de acordo com uma analogia com a mão direita (*dedos*, *polegar* e *palma*). As estruturas tridimensionais das xilanases XBC e XTL estão mostradas na figura 3.1. O sitio ativo das xilanases da família 11 está localizado numa região chamada “cleft”, região formada pela superfície dos domínios *palma* e *dedos*.

Tabela 3.2 Definição das regiões/domínios do par mesofílico-termofílico de xilanases.

Regiões/domínios	Resíduos – XBC	Resíduos – XTL
<i>Dedos</i>	1-40;50-65;169-185	1-50;60-75;178-194
<i>Polegar</i>	93-133	113-143
<i>Palmas</i>	41-43;66-86;162-168	51-53;76-96;168-174
<i>Hélice</i>	141-161	147-167
<i>Corda</i>	87-92	97-102

OBS: (1) *Dedos*, *polegar* e *palma* são os domínios estruturais presentes nas xilanases. (2) A região hélice contém os resíduos formadores de hélice- α e também alguns resíduos presentes nas estruturas das voltas anteriores e posteriores a região de hélice propriamente dita.

Figura 3.1: Estruturas tridimensionais das xilanases XBC e XTL juntamente com a analogia da mão direita.

3.7 Ferramentas de análise

3.7.1 Raiz do desvio quadrático médio.

A estabilidade estrutural é avaliada pelo desvio quadrático médio, RMSD, que é definido como:

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |\vec{R}_i - \vec{r}_i(t)|^2}{n}}$$

onde n é o número de átomos usados no cálculo (usa-se os átomos de carbono e nitrogênio da cadeia principal), $\vec{r}_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t e $\vec{R}_i$ é a posição do átomo i na estrutura de referência. A definição é aplicada após a sobreposição das estruturas. As estruturas de referências usadas são aquelas determinadas por raios-X, obtidas do banco de dados PDB [19]. O RMSD também pode ser calculado por resíduo, levando em consideração a média durante o tempo simulado.

3.7.2 Distribuição de distâncias.

As distâncias interatômicas, $D_{i,j}(t) = |\vec{r}_i(t) - \vec{r}_j(t)|$, podem fornecer informações úteis no estudo dinâmico de proteínas, como por exemplo detectar desnaturação ou rigidez e ligações de hidrogênio.

3.7.3 Dinâmica Essencial de Proteínas

Proteínas são polímeros especiais, construídos de tal maneira que permite que ele se dobre, enovele, em estruturas específicas necessárias para uma particular função. As proteínas são flexíveis de uma maneira funcional, pois certos tipos de movimentações são importantes para a atividade biológica. Tais movimentações devem permitir a ligação de um substrato ou coenzima, a adaptação para diferentes ambientes ou condições, agregações específicas, ajustes conformacionais em efeitos alostéricos e etc. Estas movimentações são chamadas de movimentações funcionais. As movimentações funcionais envolvem complexas correlações entre as movimentações atômicas que são determinadas pelas interações interatômicas. O desafio é derivar tais movimentações das interações entre os átomos da proteína, com o intuito de identificar a sua funcionalidade e reduzir a dinâmica complexa da proteína para seus graus essenciais de liberdade [21,22].

Foram investigadas as correlações entre as flutuações médias das posições atômicas na proteína, como derivada de simulações de dinâmica molecular em solução aquosa em diversas temperaturas. Pela diagonalização da matriz de covariância dos deslocamentos atômicos, observa-se que as maiores flutuações estão concentradas em movimentações correlacionadas em um subespaço de apenas poucos (não mais que 1%) graus de liberdade, o subespaço essencial, enquanto todos os outros graus de liberdade são basicamente independentes. A movimentação fora do subespaço essencial pode ser considerada como semi-restrita. Isto oferece a possibilidade de representar a dinâmica da proteína apenas no subespaço essencial [21,22]. Um conjunto de estruturas das xilanases XBC e XTL, coletadas por este método, são apresentados no capítulo 4.

3.7.4 Ligações de hidrogênio intramoleculares e pontes salinas: critérios utilizados.

Foram utilizados os critérios geométricos [23] para detecção das ligações de hidrogênio intramoleculares, LH_{intra} , e também foram calculadas as energias de interação entre os pares de átomos capazes de formar LH_{intra} . Os parâmetros usados para o critério geométrico foram:

- 1- distância $R_{HB} < 0.24nm$
- 2- ângulo $A-H\cdots B > 110^\circ$
- 3- Fração de ocorrência, $Fr > 20\%$

As pontes salinas foram detectadas usando como critério uma distância entre os centros de massa dos grupos carregados de 0.35nm.

3.7.5 Ligações de hidrogênio intermoleculares: critérios utilizados.

Informações sobre as estruturas locais de cada átomo são obtidas a partir das posições atômicas e denominadas funções de distribuição. A mais simples das quais é a função de distribuição de pares de átomos, $g_2(\vec{r}_i, \vec{r}_j)$ ou $g_2(r_{ij})$ ou simplesmente $g(r)$, também chamada de função de distribuição radial, FDR [24,25]. A FDR é a concentração reduzida a uma distância r de um átomo central, ou seja, ela é definida como a razão entre a densidade local das partículas w a uma distância r de uma partícula central A , e a densidade de w no seio da solução. Em simulação, a FDR $g_{Aw}(r)$ pode ser calculada da seguinte maneira:

$$g_{Aw}(r) = \frac{n_w(r)}{4\pi r^2 \Delta r} \frac{V}{N_w}$$

onde A é o átomo de referência da proteína, w representa os átomos de oxigênio ou hidrogênio das moléculas de água, a distância entre A e w é r , $n_w(r)$ é o número de átomos w encontrados a uma distância entre r e $r + \Delta r$ do

átomo A , V é o volume total do sistema e N_w é o número de átomos w no sistema.

O número de vizinhos w a uma distância r do átomo central A é dado por:

$$N_h(r) = 4\pi \frac{N_w}{V} \int_0^r g_{Aw}(r) r^2 dr$$

As LH intermoleculares, LH_{inter} , são identificadas pelas funções de distribuição radial, $g_{AW}(r)$, onde A é o átomo da proteína e w é o átomo da água (H ou O), e pelas energias de interação de pares de átomos da proteína com as moléculas de água, $F(E)$ vs E [26,27]. Quando $g_{AW}(r)$, apresenta máximos e mínimos bem definidos sugere-se a existência de LH, confirmada ou não pela energia de interação de pares dos átomos correspondentes. Das energias de interação de pares de átomos é possível detectar a formação de LH_{inter} quando se observa a presença de um pico (ou ombro) na região de energia atrativa, energia negativa. Esta técnica é um dos critérios usados para detectar LH_{inter} [27]. A partir dos perfis $F(E)$ vs E também se pode calcular a energia molar média das LH_{inter} (E_M), assim como o número médio por átomo da proteína (N_{LH}).

No caso de indefinição do mínimo na $F(E)$ que é necessário para calcular E_M e N_{LH} , será assumido o limite de $-5.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ [27].

Alguns exemplos de $g_{AW}(r)$ e $F(E)$ estão mostrados nas figuras 3.5 e 3.6 respectivamente. As figuras 3.2 e 3.3 mostram exemplos de diferentes átomos de O e H da proteína, pouco e muito solvatados. Das figuras 3.2 e 3.3, pode-se ver claramente que o oxigênio da carbonila é fracamente solvatado, enquanto que os oxigênios dos grupos carboxilatos, hidroxila e hidrogênios terminais são exemplos de átomos fortemente solvatados. O hidrogênio da amina secundária é um exemplo de átomo moderadamente solvatado.

No capítulo 6, destinado às LH, não serão mostrados os perfis de $g_{AW}(r)$ e $F(E)$, apenas os resultados extraídos de ambos, devido a grande quantidade informações.

Figura 3.2: Funções de distribuição radial $g_{AW}(r)$.

Figura 3.3: Distribuição de energia de pares, $F(E)$, correspondente aos mesmos átomos exemplificados na figura 3.2.

3.7.6 Áreas acessíveis ao solvente.

As áreas dos resíduos hidrofóbicos, hidrofílicos e área total (hidrofóbicos + hidrofílicos) expostas ao solvente foram computadas por átomos, por resíduos e em função do tempo baseadas no método descrito em [28] usando $r_{\min} = 0.14nm$ que corresponde ao raio da molécula de água.

3.7.7 Raio de giração.

O raio de giração, R_g , é uma medida da compactação da estrutura, sendo calculada como se segue:

$$R_g(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N |\vec{r}_i(t)|^2}{\sum_{i=1}^N m_i}}$$

onde m_i é a massa do átomo i e $\vec{r}_i$ é a posição do átomo i com relação ao centro de massa da molécula.

3.7.8 Energias de interação.

As energias de interação foram calculadas como se segue:

$$E_{ij} = \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^{N-1} V_{ij}$$

onde N é o número de átomos da proteína, i e j são átomos da proteína e V_{ij} é a energia potencial de interação entre os átomos i e j .

3.8 Alinhamento das estruturas

O alinhamento das estruturas das xilanases XBC e XTL foi feito pelo programa Swiss-PDB Viewer 3.7 [29].

```
XBC  1  ASTDYWQNWT DGGGIVNAVN GSGGNYSVNW SNTGNFVVGK GWTTGSPFRT
XTL  2  XTPNSEGWH DGYYSWWSG GGAQATYTNL EGGTYEISWG DGGNLVGGKG

XBC 51  INYNAGVWAP NGNGYLTLYG WTRSPLEIYY VVDSWGTYRP TGTYKGTVKS
XTL 51  WNPGLNARAI HFEGVYQPNG NSYLAVYGTW RNPLVEYYIV ENFGTYDPSS

XBC 101 DGGTYDIYTT TRYNAPSIDG DRTTFTQYWS VRQSKRPTGS NATITFTNHV
XTL 101 GATDLGTVEC DGSYRLGKT TRVNAPSIDG TQTFDQYWSV RQDKRTSGTV

XBC 151 NAWKSHGMNL GSNWAYQVMA TEGYQSSGSS NVTWVW ---- ----
XTL 151 QTGCHFDAWA RAGLVNNGDH YYQIVATEGY FSSGYARITV ADVG
```

Referências

- [1] W.F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, Biomos, Groningen, (1996).
- [2] U. Stocker, W. F. van Gunsteren, *Proteins*, **40**, 145, (2000).
- [3] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089, (1993).
- [4] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, **103**, 8577, (1995).
- [5] I. G. Tironi, R. Sperb, P. E. Smith, W. F. van Gunsteren, *J. Chem. Phys.*, **102**, 5451, (1995).
- [6] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, J. Hermans, *Interactions models for water in relation to protein hydration. In: Intermolecular Forces*. Pullman, B. ed. Reidel Publishing Company Dordrecht, **331**, (1981).
- [7] H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, T. P. Straatsma, *J. Phys. Chem.*, **91**, 6269, (1987).

- [8] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.*, **23**, 327, (1977).
- [9] S. Miyamoto, P. A. Kollman, *J. Comp. Chem.*, **13**, 952, (1992).
- [10] B. Hess, H. Becker, H. J. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comp. Chem.*, **18**, 1463, (1997).
- [11] M. P. Allen, D. J. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids*, Claredon Press, Oxford, (1987).
- [12] D. Frenkel. B. Smit, *Understanding Molecular Simulation*, Academic Press, (1996).
- [13] R. W. Hockney, S. P. Goel, *J. Comp. Phys.*, **14**: 148, (1974).
- [14] L. Verlet, *Phys. Rev.*, **159**, 98, (1967).
- [15] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model*, **7**, 306, (2001).
- [16] M. P. Allen, D. J. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids*, Claredon Press, Oxford, (1987).
- [17] Leach, A. R., *Molecular Modelling, Principles and Applications*, 2nd editon, Prentice Hall.
- [18] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, a. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684, (1984).
- [19] www.rcsb.org/pdb
- [20] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, *FEMS Microbiol. Reviews*, **23**, 411, (1999).
- [21] A. Amadei, A. B. M. Linsen, B. L. de Groot, D. M. F. van Aalten, J. H. C. Berendsen, *J. Struc. Dyn*, **13**, 615, (1996).
- [22] A. Amadei, A. B. M. Linsen, J. H. C. Berendsen, Essential dynamics of proteins. *Proteins Struc. Funct. Genet.* **17**, 412, (1993).
- [23] G. A. Jeffrey, W. Saenger, in *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, (1994).
- [24] D. A McQuarrie, *Statistical Mechanics*, Harper&Row, (1976).
- [25] J. P. Hansen, I. R. McDonald, *Theory of Simple Liquids*, Academic Press, London, (1986).
- [26] F. H. Stilingier, A. Rahman, *J. Chem. Phys.*, **57**, 1281, (1972).
- [27] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, W. R. Impey, M. L. Kein, *J. Chem. Phys.*, **79**, 926 (1923).
- [28] F. Eisenhaber, P. Lijnzaad, P. Argos, C. Sander, M. Scharf, *J. Comp. Chem.*, **16**, 273, (1995).
- [29] <http://www.expasy.org/spdv/>.

Propriedades dinâmicas do par mesofílico-termofílico de xilanases

4.1 Resultados e discussão

4.1.1 A xilanase XBC

A estabilidade das estruturas geradas nas simulações é avaliada pelo RMSD, calculado para os átomos da cadeia principal. A figura 4.1 mostra os RMSD(t) para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas que foram calculadas usando como estrutura de referência a estrutura inicial de cada simulação. Os valores médios dos RMSD e seus respectivos desvios padrões são: $0.130 \pm 0.016\text{nm}$ (25°C), $0.139 \pm 0.022\text{nm}$ (35°C), $0.127 \pm 0.014\text{nm}$ (45°C), $0.142 \pm 0.021\text{nm}$ (55°C) e $0.161 \pm 0.019\text{nm}$ (65°C). Os baixos desvios padrões são característicos de estruturas equilibradas.

A flexibilidade/rigidez de uma proteína é apropriadamente medida pelo RMSD por resíduo, figura 4.2. Medindo a flexibilidade da cadeia principal da proteína pode-se obter informações sobre a estabilidade de determinados domínios e regiões da proteína. Pequenos desvios traduzem manutenção estrutural. Os maiores desvios observados são referentes aos resíduos de glicina (Gly). A ausência de um grupo lateral no aminoácido Gly confere um baixo impedimento estérico facilitando sua movimentação, resultando em uma alta flexibilidade da região onde ele se encontra. As regiões/domínios de maior flexibilidade são, portanto, as regiões/domínios *polegar* e *dedos*. Deve-se ressaltar aqui, que as posições de maior flexibilidade são pertencentes aos resíduos de glicina, presentes nas voltas que conectam duas fitas- β , figura 4.3. A região de maior rigidez, detectada pelo RMSD por resíduo, é o domínio *palma*.

Figura 4.1: RMSD(t) para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 4.2: RMSD médio por resíduo para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 4.3: Estrutura em fitas da xilanase XBC. As posições dos resíduos de Gly estão destacadas em amarelo.

O domínio *dedos* em geral, excluindo as regiões das voltas- β , é rígido devido às fitas- β . Sugere-se que a flexibilidade do *polegar* e de certas regiões do domínio *dedos* seja importante para a captura do substrato, uma vez que os domínios *polegar* e *dedos* atuam realizando movimentos do tipo abre-fecha, tal como a ação de uma dobradiça, característico das xilanases da família 11 [1-3]. Esse movimento abre-fecha pode ser identificado pela distância entre o centro de massa dos resíduos dos *dedos* e os dos resíduos do *polegar*, figura 4.4.

Figura 4.4: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XBC nas diferentes temperaturas.

Da figura 4.4 pode-se observar, exceto a 55°C onde a estrutura encontra-se mais aberta, que a movimentação abre-fecha da XBC parece apresentar amplitudes semelhantes. Deve-se notar que, a 25°C, após 1.5ns a estrutura se equilibra e o movimento abre-fecha cessa com uma distância entre os centros de massa de aproximadamente 1.30nm. Esta distância permanece constante até o final da simulação. O mesmo valor é também observado em 35 e 45°C. A 55°C, a amplitude do movimento abre-fecha se torna maior alcançando a média de $1.65 \pm 0.21 \text{ nm}$, ou seja, a 55°C a xilanase XBC encontra-se 0.3nm mais aberta do que nas temperaturas inferiores. A 65°C a estrutura encontra-se menos aberta do que a 55°C, porém mais aberta do que nas temperaturas inferiores a 55°C, com valor médio de $1.53 \pm 0.10 \text{ nm}$. Este resultado permite sugerir, uma vez que 55°C é a temperatura ótima desta enzima [4], que uma maior abertura da estrutura possibilita ao substrato alcançar o sítio ativo da enzima mais facilmente. Conseqüentemente a enzima exibiria uma maior atividade nesta temperatura.

A figura 4.5 mostra um conjunto de estruturas coletadas a cada 200ps, por dinâmica essencial, em cada temperatura durante as simulações. Tais estruturas estão todas sobrepostas tomando a estrutura inicial como referência. A figura 4.5 é na verdade, uma visualização dos resultados sobre a movimentação abre-fecha, obtida de uma análise de dinâmica essencial, na qual se observa que a movimentação funcional da xilanase XBC é essencialmente o abre-fecha realizado pelo *polegar e dedos*.

Figura 4.5: Estruturas tridimensionais do esqueleto da xilanase XBC nas diferentes temperaturas. Duas diferentes visões são apresentadas em cada temperatura.

45°C 1

2

55°C 1

2

65°C 1

2

Figura 4.5: Continuação.

As estruturas apresentadas na figura 4.5 mostram claramente a flexibilidade dos domínios *polegar* e de certos pontos do domínio *dedos*, assim como a alta rigidez do domínio *palma* que abriga grande parte do sítio ativo.

A região do sítio ativo deve ser suficientemente rígida para que as suas características estruturais, necessárias para catálise, sejam conservadas mesmo em temperaturas elevadas. Serão discutidas detalhadamente no capítulo 6, as forças intramoleculares que mantêm rígidas certas regiões da molécula.

4.1.2 A xilanase XTL

Os valores médios dos RMSD para a xilanase XTL e os desvios padrão são: $0.134 \pm 0.017 \text{ nm}$ (25°C), $0.144 \pm 0.022 \text{ nm}$ (35°C), $0.171 \pm 0.025 \text{ nm}$ (45°C), $0.193 \pm 0.038 \text{ nm}$ (55°C), $0.163 \pm 0.024 \text{ nm}$ (65°C), $0.166 \pm 0.026 \text{ nm}$ (70°C) e $0.191 \pm 0.052 \text{ nm}$ (80°C). A 80°C a XTL não se equilibrou nem após 7.0ns quando o maior RMSD atingiu 0.35nm, figura 4.6.

Figura 4.6: RMSD(t) para a xilanase XTL a 80°C .

Pode-se considerar que nessas condições a enzima começa um processo de desnaturação e de desativação térmica. Os RMSD(t) para cada temperatura estão apresentados na figura 4.7. A evolução das mudanças na estrutura em função da temperatura é bem representada pelo RMSD(t), figura 4.8, que usa a estrutura cristalográfica como estrutura de referência.

Figura 4.7: RMSD(t) para a xilanase XTL nas diferentes temperaturas.

Figura 4.8: RMSD(t) para a xilanase XTL nas diversas temperaturas, tomando como estrutura de referência, para cada simulação, a estrutura cristalográfica.

A figura 4.9 apresenta as distâncias entre o centro de massa dos resíduos dos *dedos* e o dos resíduos do *polegar* em função do tempo. Observa-se uma grande semelhança nas curvas das figuras 4.8 e 4.9, ou seja, o comportamento do RMSD é muito parecido com o das distâncias entre os centros de massa dos domínios *dedos* e *polegar*. O RMSD reflete a movimentação global da proteína, logo a semelhança do RMSD e da $D_{\text{abre-fecha}}$ indica que a movimentação global da proteína apresenta como componente mais importante, ou de maior peso, o movimento abre-fecha da enzima.

Figura 4.9: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XTL nas diferentes temperaturas.

Quanto à flexibilidade da xilanase XTL, os RMSD's por resíduo, apresentados na figura 4.10, mostram que as regiões mais flexíveis são as extremidades N e C, o domínio *dedos* e *polegar*. A flexibilidade destes domínios aumenta, como deve ser, com a temperatura. Assim como na XBC, os resíduos de maiores flexibilidades são aqueles presentes nas voltas entre duas fitas- β , regiões estas que são ricas em glicina. De um modo geral, a xilanase termofílica XTL é mais rígida do que a mesofílica XBC, como pode ser verificado das figuras 4.2 e 4.10. As regiões de maior flexibilidade são mais flexíveis na XBC do que na XTL e as regiões mais rígidas, como por exemplo o domínio palma e as fitas- β do domínio *dedos*, são equivalentemente pouco flexíveis. Deve-se lembrar que mesmo sendo menos flexível do que a XBC, a xilanase XTL apresenta uma maior capacidade de abertura, detectada pela $D_{\text{abre-fecha}}$.

Figura 4.10: RMSD médio por resíduo para a xilanase XTL nas diferentes temperaturas.

Pela dinâmica essencial pode-se observar a intensidade da movimentação e as regiões mais flexíveis. A figura 4.11 mostra um conjunto de estruturas coletadas a cada 200ps em cada temperatura, tais estruturas estão todas sobrepostas tomando a estrutura inicial como referência.

É interessante notar na figura 4.11 que a 80°C todas as regiões da proteína sofrem grandes perturbações na sua estrutura o que é um forte indicativo de um princípio de desnaturação. A maior movimentação do domínio *polegar* ocorre a 70°C, porém a enzima alcança sua maior abertura a 45°C.

25°C 1

2

35°C 1

2

45°C 1

2

Figura 4.11: Estruturas tridimensionais do esqueleto da xilanase XTL nas diferentes temperaturas. Duas diferentes visões são apresentadas em cada temperatura.

55°C 1

2

65°C 1

2

70°C 1

2

Figura 4.11: Continuação.

Referências

- [1] G. Klintschar, Ph.D *Thesis*, Department of Structural Biology, Institute of Physical Chemistry, Karl Franzens Universität, Graz, Austria.
- [2] K. Gruber, G. Klintschar, M. Hayn, A. Schlacher, W. Steiner, and C. Kratky, *Biochemistry*, **37**, 13475, (1998).
- [3] J. Muilu, A. Törrönen, J. Peräkylä, and J. Rouvinen, *Proteins*, **31**, 434, (1998).
- [4] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, *FEMS Microbiol. Reviews*, **23**, 411, (1999).

Energias de interação e áreas acessíveis ao solvente.

Uma das formas de medir a influência e a participação do solvente, de uma forma geral, no processo de estabilização protéica é através das áreas moleculares acessíveis ao solvente, AAS. O monitoramento das AAS dos resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos e AAS total são importantes ferramentas no estudo de desnaturação de proteínas [1], uma vez que uma redução da área exposta (aumento do empacotamento hidrofóbico) ou uma maior exposição dos resíduos hidrofílicos podem direcionar os estudos sobre os processos de termoestabilização de proteínas [2].

As energias de interação calculadas são: energia da proteína, que é energia de interação entre os átomos da proteína e a energia proteína-solvente.

5.1 Resultados e discussão

A figura 5.1 apresenta as AAS, em função da temperatura, para o par mesofílico-termofílico de xilanases. As AAS dos resíduos hidrofóbicos, calculadas para XBC e XTL são muito próximas em todas as temperaturas, em torno de 44nm^2 . Porém, as áreas referentes aos resíduos hidrofílicos não compartilham desta semelhança. A XTL apresenta um maior grau de exposição dos resíduos hidrofílicos com relação à XBC, cerca de 4nm^2 a mais. Pode se ver claramente que na XTL tanto os resíduos hidrofóbicos como os hidrofílicos apresentam uma exposição semelhante ao solvente, diferentemente da XBC, cujos resíduos hidrofóbicos apresentam um maior grau de exposição. Dessa forma, a área total exposta ao solvente, em função da temperatura, é maior na termofílica XTL do

que na mesofílica XBC, como mostra a figura 5.1. Esta maior exposição da termofílica é um indicativo da importância do solvente para a termoestabilização.

Figura 5.1: AAS para as xilanases XTL e XBC nas diferentes temperaturas.

As energias totais das interações intra (energia da proteína) e intermoleculares (energia proteína-água) foram calculadas e estão apresentadas nas figuras 5.2 e 5.3. As interações entre proteína e moléculas de água foram calculadas dentro de um raio de 0.7nm, de modo a ser considerado apenas as águas de solvatação, as águas mais próximas da proteína e conseqüentemente as mais importantes, excluindo assim do cálculo, as águas do seio da solução.

Pode-se ver claramente que a XTL apresenta energias mais atrativas que a XBC nos dois casos. De acordo com a energia de interação entre os átomos da proteína, a XTL é aproximadamente -350kcal.mol^{-1} mais estável do que a mesofílica XBC, e considerando as interações proteína-água, essa diferença está ao redor de -250kcal.mol^{-1} praticamente em todas as temperaturas. Somando tais diferenças, a xilanase XTL alcança uma estabilidade de -600kcal.mol^{-1} com relação a XBC.

Figura 5.2: Energia da proteína para as xilanases XTL e XBC nas diferentes temperaturas.

Figura 5.3: Energia proteína-solvente para as xilanases XTL e XBC nas diferentes temperaturas.

5.2 Conclusões

A importância da água para a estabilidade das estruturas protéicas é visualizada, de uma maneira geral, pelas áreas acessíveis ao solvente. A xilanase XTL apresenta claramente uma maior exposição dos resíduos hidrofílicos com relação à XBC, exposição essa da mesma ordem de grandeza da exposição da área hidrofóbica. A energia total de interação da proteína aliada às análises das AAS nos permite concluir que os resíduos hidrofílicos contribuirão mais fortemente para a estabilidade da XTL, muito possivelmente devido as LH e pontes salinas, como será discutido no próximo capítulo, e também possuem uma maior acessibilidade ao solvente no caso da XTL. Claramente, essa maior exposição dos resíduos hidrofílicos no caso da XTL deve ser tratada como um fator que pode ter considerável importância para a termoestabilização, porém um estudo mais específico das interações proteína-água deve ser realizado, investigando as LH_{inter} . As energias de interação proteína-água confirmam esta necessidade.

Referências

- [1] T. P. Creamer, R. Srinivasan, G. D. Rose, *Biochemistry*, **36**, 2832, (1997).
- [2] G. Colombo, K. M. Merz Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6895, (1999).

Ligações de hidrogênio

6.1 Histórico

Fracas interações entre moléculas contendo grupo hidroxila foram notadas em 1892 por Nernst [1]. Dez anos depois, Werner incluiu estas interações no seu conceito denominado “valência secundária” [2], que foi de fato a própria descrição do fenômeno da ligação de hidrogênio. Em 1912 Moore e Winmill [3] estudaram as propriedades de aminas em solução aquosa e usaram o termo “fraca união” para descrever as interações intermoleculares e explicar as propriedades destas soluções. Sugestões de que o átomo de hidrogênio era o centro desta fraca interação foram primeiramente feitas, em 1920, por Huggins, Latimer e Rodebush, através de seus estudos em líquidos polares e apolares [4-6]. Até então, este fenômeno de associação entre determinadas moléculas não apresentava nenhuma denominação consistente e definida, termos vagos como associação e quelação eram usados. Foi em 1931 que Linus Pauling, diante do seu premiado trabalho “A Natureza das Ligações Químicas” introduziu o termo ligação de hidrogênio ou ponte de hidrogênio¹ [7].

A partir daí, como decorrência do conhecimento da funcionalidade das LH, muitos trabalhos importantes vieram, como a explicação das “anormalidades” apresentadas pelos líquidos associados [8], o estudo das estruturas protéicas com a proposta de modelos consistentes para as estruturas secundárias (folhas- β e hélices- α) [9] e a elucidação da estrutura em dupla hélice do DNA [10]. Destaque deve ser dado ao período de 1950 a 1970, na qual houve um pico na

¹ Os termos “ponte de hidrogênio” e “ligação de hidrogênio” são corretos. O termo “ligação de hidrogênio” tornou-se mais usual a partir da década de 40. Atualmente há muitas discussões sobre esse tema, na qual, propõe-se que o uso do termo “ponte de hidrogênio” é quimicamente mais correto para descrever uma interação entre 2 átomos mediada por outro átomo, no caso o hidrogênio.

produção científica, na área de bioquímica, principalmente devido às pesquisas de Pauling e Corey envolvendo os conceitos de LH na determinação de estruturas de proteínas, como as fibras [11], colágeno [12], hemoglobina [13], queratina [14] e etc. Ficou entendido então, que embora conceitualmente as LH sejam decorrentes de interações fracas, tais como interações entre multipolos, estas são as mais importantes interações em química e especialmente em bioquímica, pois atuam no enovelamento que define a estrutura terciária das proteínas. Quando várias LH atuam juntas, cada uma torna-se mais forte do que se atuasse individualmente. Este fenômeno é conhecido como cooperatividade, ou seja,

$|\Delta G_{n-LH}| \gg \sum_{i=1}^n |\Delta G_{LH}|$. Este fenômeno é indiscutivelmente a mais importante consequência da existência das LH.

As LH têm sido exaustivamente investigadas pelas mais diversas técnicas teóricas e experimentais. Dentre elas destacam-se a mecânica quântica [15], a difração de raios-X [16], a ressonância magnética nuclear [17] e a simulação molecular [18]. Estas técnicas têm sido empregadas com o intuito de desvendar a natureza destas interações, tão bem como a sua importância e funcionalidade dentro da química/bioquímica. A pesquisa dos diferentes tipos de LH é essencial para o entendimento de sua origem, funcionalidade e natureza.

Uma LH conecta átomos A e B que apresentam eletronegatividade maior que a do átomo de hidrogênio. O átomo A é geralmente referido como doador de próton, pois está ligado a um átomo de H, enquanto B, que deve possuir pares de elétrons livres para interagir com o grupo A-H, é referido como o receptor de próton. Estas características por si só não bastam para definir precisamente uma LH, parâmetros geométricos como distâncias A...B ou H...B e o ângulo A-H...B são necessários para a caracterização de uma LH. Além dos parâmetros geométricos citados, a energia também pode ser usada para caracterizar estas interações. A tabela 6.1 apresenta as características dos diferentes tipos de LH.

Tabela 6.1: Diferentes tipos de LH e suas características.

Propriedades	Forte	Intermediária	Fraca
$R_{HB} \text{ (nm)}$	<0.16	0.16-0.22	>0.22
$\text{Ângulo A-H}\cdots\text{B (graus)}$	170-180	130-170	90-130
<i>Direcionalidade</i>	Forte	Moderada	Fraca
<i>Energia (kcal mol⁻¹)</i>	15-40	4-15	<4

Não há uma fronteira precisa entre os três tipos de LH, na literatura podem-se encontrar as mais variadas fronteiras dos diferentes tipos de LH. As LH do tipo intermediária e fraca são típicas de proteínas, por exemplo, aquelas entre grupos carbonila e amina secundária da cadeia principal $\text{C=O}\cdots\text{H-N}$.

O acesso às informações energéticas das LH vem sendo obtido por mecânica quântica, que fornece grande precisão nos resultados, porém é limitada ao tamanho do sistema. Sistemas grandes contendo macromoléculas e solvente são inacessíveis à mecânica quântica. Estes sistemas devem, então, serem estudados por simulação molecular. A vantagem da simulação molecular é a acessibilidade às propriedades macroscópicas do sistema via mecânica estatística, devido ao conjunto representativo de configurações em uma dada temperatura que pode ser obtido. As LH são modeladas, mesmo que indiretamente, pelo campo de força, entre os quais um muito utilizado é o GROMOS96 A1 [19]. As análises mais comumente usadas incluem apenas os critérios geométricos, de distâncias e ângulos, para identificação das LH. As LH_{intra} serão discutidas utilizando geométrico. Da seleção feita pelo critério geométrico calcula-se a energia de interação entre os átomos envolvidos na LH_{intra} .

6.2 Ligações de hidrogênio intramoleculares

As análises das LH_{intra} foram realizadas separadamente por regiões e domínios, para facilitar e especificar a importância das LH_{intra} locais. Os domínios e regiões são aqueles apresentados no capítulo 3. As LH_{intra} foram separadas em 3 tipos: cadeia principal-cadeia principal (BB), cadeia principal-cadeia lateral (BS) e cadeia lateral-cadeia lateral (SS). As interações entre cadeias laterais carregadas são tratadas como pontes salinas, mesmo havendo formação de LH_{intra} entre esses grupos, por exemplo, interação ($-COO \cdots H_3N^+$).

Não foram computadas as LH_{intra} na temperatura de 80°C pois a estrutura protéica não alcançou o equilíbrio (capítulo 4) durante o intervalo de tempo simulado.

6.2.1 Resultados e discussão

6.2.1.1 Xilanase XBC

As figuras 6.1, 6.2 e 6.3 apresentam o número de LH BB, BS e SS respectivamente, detectados de acordo com o critério estabelecido. O domínio *dedos* é o que apresenta maior número de LH_{intra} , cerca de 55 para BB e entre 10 e 15 para BS e SS. O número de LH BB permanece praticamente inalterado com o aumento da temperatura, enquanto que as LH BS e SS oscilam entre 10 e 15, alcançando o valor máximo à 55°C. Os domínios *palma* e *polegar* apresentam números de LH BB, BS e SS muito semelhantes. No geral a quantidade de LH BS e SS apresentam maiores variações com a temperatura do que às LH BB. Este é um fenômeno geral das LH, porém mais pronunciado nas LH envolvendo átomos da cadeia lateral. As LH BS e SS são muito sensíveis à energia térmica, ou seja, a movimentação das cadeias laterais devido à temperatura faz com que tais LH_{intra} sejam muito lábeis. As regiões *hélice* e *corda* são as que apresentam menor número de LH_{intra} . A região *hélice* apresenta por volta de 15 LH BB, mesmo em temperaturas elevadas, enquanto que para as LH BS foram computadas 10

ligações a 25°C, diminuindo gradativamente até 65°C. O número de LH SS é baixo, menos de 3 em todas as temperaturas. A região *corda* não apresenta mais do que 4 LH_{intra} em todos os casos (BB, BS e SS) dentro da faixa de temperatura estudada.

As energias médias das LH_{intra} detectadas em todos os domínios, em cada temperatura, estão apresentadas nas figuras 6.4, 6.5 e 6.6 para BB, BS e SS, respectivamente. Considerando-se os desvios, pode-se observar que as LH_{intra} presentes em todos os domínios, em cada tipo (BB, BS e SS), apresentam valores médios semelhantes; $\cong -2.4\text{kcal.mol}^{-1}$ para as LH BB, $\cong -3.0\text{kcal.mol}^{-1}$ para BS e $\cong -3.3\text{kcal.mol}^{-1}$ para SS. Na região *corda* as LH_{intra} são menos atrativas do que nos outros domínios. As LH BS e SS costumam ter energias mais negativas, pois alguns resíduos (por exemplo, Glu e Asp) apresentam cadeia lateral carregada, tornando a interação mais atrativa.

Figura 6.1: Número de LH BB na XBC.

Figura 6.2: Número de LH BS na XBC.

Figura 6.3: Número de LH SS na XBC.

Figura 6.4: Energia média das LH BB na XBC.

Figura 6.5: Energia média das LH BS na XBC.

Figura 6.6: Energia média das LH SS na XBC.

As energias totais foram calculadas somando as energias das LH_{intra} detectadas dentro de cada domínio, figuras 6.7, 6.8 e 6.9 para BB, BS e SS respectivamente. Analisando as LH BB, constata-se que o domínio *dedos* é o que exibe maior estabilidade, apresentando uma energia total de aproximadamente $-130.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, duas vezes mais atrativa do que a energia total obtida das LH_{intra} dos domínios *palma* e *polegar*. As regiões hélice e *corda* são as menos estabilizadas pelas LH BB, apresentando energias $\geq -40.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. As energias totais das LH BS e SS são menos atrativas que das LH BB. Como já foi visto, as LH BS e SS são individualmente mais fortes devido à presença de grupos carregados, porém estão em menor número que as LH BB. No balanço total, as LH BB são as mais importantes para a estabilidade da estrutura da proteína, pois contribuem com a maior parcela para a estabilidade da proteína.

Figura 6.7: Energia total das LH BB na XBC.

Figura 6.8: Energia total das LH BS na XBC.

Figura 6.9: Energia total das LH SS na XBC.

Outro importante domínio para atividade e termoestabilidade das xilanases é a *palma*, pois este domínio juntamente com o domínio *dedos* abrigam o sítio catalítico da enzima. No capítulo 4 observou-se que este domínio apresenta uma alta conservação estrutural. A região do sítio catalítico deve ser suficientemente rígida para que as suas características estruturais, necessárias para a catálise, sejam conservadas mesmo em temperaturas elevadas. O domínio *dedos* também é altamente conservado, porém este possui estruturas do tipo voltas que ligam uma fita em outra, e estas são muito flexíveis. A rigidez/flexibilidade pode ser medida pelo RMSD por resíduo. O desvio quadrático médio calculado por resíduo está intimamente relacionado com as interações que cada resíduo experimenta localmente e tais interações padronizam cada tipo de estrutura secundária, estas interações são as LH_{intra} . Baixos desvios para os resíduos do domínio *palma* e *dedos*, implicam em fortes LH_{intra} .

Os resíduos de importância catalítica, descritos na literatura [20], são: os resíduos Glu78 e Glu172 que atuam como nucleófilo e catalisador ácido/base respectivamente, o resíduo Arg112, um conjunto de seis tirosinas Tyr65, Tyr69,

Tyr79, Tyr80, Tyr166 e Tyr174 e outros 3(três) triptofanos Trp9, Trp71 e Trp129. As figuras 6.10 e 6.11 apresentam duas visões da região catalítica, destacando em diferentes colorações os resíduos citados. Estes resíduos foram monitorados e as LH_{intra} foram detectadas e computadas em cada temperatura. As tabelas 6.2 e 6.3 apresentam as frações de ocorrência em %, Fr, dos pares formadores de LH BB e SS respectivamente. As LH BS também foram monitoradas, mas apenas uma ligação foi detectada na faixa de 25 a 55°C e nenhuma a 65°C. A LH BS detectada foi Tyr80-Ser130 com Fr < 50%.

Figura 6.10: Visão lateral da estrutura tridimensional da XBC mostrando os resíduos que formam o sítio catalítico. Os resíduos em vermelhos são os Glu78 e 172, em azul são os Trp9, 71 e 129, em amarelo as Tyr65, 69, 79, 80, 166 e 174.

Figura 6.11: Visão frontal da estrutura tridimensional da XBC mostrando os resíduos que formam o sítio catalítico. Os resíduos em vermelhos são os Glu78 e 172, em azul são os Trp9, 71 e 129, em amarelo as Tyr65, 69, 79, 80, 166 e 174.

Tabela 6.2: Fr (%) das LH BB dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XBC.

PARES BB N-H·····O=C	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
<i>Tyr65-Glu172</i>	96.3	97.8	98.1	97.9	97.5
<i>Glu78-Thr126</i>	82.3	95.3	94.3	82.2	82.0
<i>Tyr128-Glu78</i>	95.7	95.8	94.6	91.1	95.6
<i>Glu172-Tyr65</i>	96.3	96.9	97.1	95.6	96.8
<i>Tyr69-Val168</i>	96.9	94.8	90.0	94.2	92.5
<i>Val168-Tyr69</i>	97.9	98.1	96.9	97.9	98.1
<i>Tyr80-Tyr128</i>	98.0	98.3	98.0	97.1	97.2
<i>Ser130-Tyr80</i>	90.5	92.1	89.3	88.2	88.8
<i>Tyr166-Thr43</i>	71.8	90.2	88.4	73.6	77.2
<i>Arg112-Phe125</i>	94.8	94.5	95.9	94.4	94.6
<i>Phe125-Arg112</i>	82.1	84.2	84.2	77.2	78.2
<i>Gly70-Tyr79</i>	93.9	89.4	82.6	92.0	89.8
<i>Tyr79-Gly70</i>	98.0	90.6	98.1	98.1	98.3
<i>Trp9-Val37</i>	93.3	92.8	96.1	93.6	93.2
<i>Val37-Trp9</i>	97.1	96.8	97.4	96.8	95.9
<i>Trp71-Ala165</i>	78.9	88.2	83.2	87.5	90.4
<i>Tyr108-Trp129</i>	92.3	93.4	93.2	94.1	94.0
<i>Tyr129-Tyr108</i>	97.4	96.2	96.0	94.3	93.9
<i>Ala165-Trp71</i>	79.7	84.8	87.7	85.9	85.3

Tabela 6.3: Fr (%) das LH SS dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XBC.

PARES SS	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
<i>Tyr65-Glu172</i>	80.5	98.0	97.1	96.9	93.9
<i>Tyr69-Glu78</i>	62.2	80.8	57.5	42.3	57.2
<i>Trp71-Glu78</i>	21.4	31.5	-	-	-
<i>Tyr80-Glu172</i>	87.6	86.1	86.6	87.0	-
<i>Tyr69-Tyr166</i>	22.77	-	-	30.9	56.9
<i>Tyr166-Asp119</i>	-	55.1	-	-	-
<i>Tyr166-Glu78</i>	-	-	-	21.9	-
<i>Glu78-Ser117</i>	-	-	-	-	30.2
<i>Glu78-Tyr80</i>	-	-	-	-	59.3
<i>Trp129-Gln127</i>	-	68.9	63.4	64.6	42.0

O que torna essas LH_{intra} importantes são as suas ocorrências, Fr. Todas as LH BB apresentam Fr>72%, sendo que a maioria ocorre em mais de 90% do tempo em todas as temperaturas. Os resultados estão mostrando que as LH BB são de fundamental importância para rigidez da cadeia principal, mantendo a integridade da estrutura secundária. A preservação da estrutura secundária, como já foi discutida, é importante tanto para termoestabilidade quanto para a atividade da proteína. Nesse caso o sítio ativo se mostra altamente conservado devido a uma forte rede de LH BB que é preservada mesmo em altas temperaturas.

Os resíduos citados na literatura como sendo de importância catalítica são todos formadores de LH BB estáveis, podendo formar uma ou duas ligações. O resíduo Tyr174 é o que forma LH BB com menores ocorrências, entre 40 e 60%. Esta menor ocorrência, com relação às demais LH_{intra}, se deve ao posicionamento do resíduo Tyr174. A Tyr174 encontra-se no domínio *dedos*, justamente nas proximidades das voltas (regiões de maior flexibilidade), conectando duas fitas- β . O resíduo Arg112 está localizado no *polegar*, portanto as LH BB formadas por este resíduo não contribuem para a manutenção da rigidez dos domínios *palma* e *dedos*. Nenhuma LH SS foi detectada para esse resíduo. Logo a afirmação de que este resíduo tem importância catalítica não é fundamentada pela formação de

LH_{intra}, mas outros fatores podem estar envolvidos no papel da Arg112 na atividade enzimática da xilanases XBC. Comprovou-se experimentalmente, por estudos de mutação sítio dirigida [20], queda de 68% na atividade biológica específica devido à mutação da Arg112 para Asn, e nenhuma alteração na atividade quando a Arg112 é convertida a Lys. Ou seja, a cadeia lateral carregada positivamente é fundamental para a atividade catalítica, porém este resíduo deve ter importância na especificidade do substrato, pois nenhuma ponte salina foi detectada.

As LH SS são menos freqüentes que as LH BB. O papel das LH SS é manter as cadeias laterais com certa rigidez que possibilite o reconhecimento molecular do substrato pelo sítio ativo. As LH SS mais importantes são aquelas que envolvem os resíduos Tyr65, Glu172, Tyr69, Glu78, Tyr80 e Trp129. Os resíduos Tyr65, Tyr69 e Tyr80 formam LH SS com os resíduos catalíticos Glu78 e Glu172. Possivelmente mantendo as cadeias laterais desses resíduos numa orientação adequada para a captação e adaptação do substrato no sítio catalítico [20]. Esta possibilidade pode ser confirmada mediante um estudo envolvendo o complexo enzima-substrato, fazendo-se medidas das energias de interações intermoleculares. As LH_{intra} mostram claramente que os resíduos de Tyr têm uma importância ainda maior, pois são peças indispensáveis para formação e manutenção de uma rede de LH BB e SS que mantém a rigidez da região do sítio catalítico.

6.2.1.2 Xilanase XTL

Os resultados obtidos para a xilanase XTL serão apresentados e discutidos sempre de forma comparativa aos da XBC.

As figuras 6.12, 6.13 e 6.14 apresentam o número de LH BB, BS e SS respectivamente para a xilanase termofílica XTL. Assim como na xilanase XBC, o domínio *dedos* é que apresenta maior número de LH BB, BS e SS.

Pode-se observar que a quantidade de LH_{intra} detectadas no domínio *dedos* é maior na XTL do que na XBC nos três casos (BB, BS e SS) porém de forma mais pronunciada para as LH BS e SS. Foram detectadas cerca de 60 ligações BB em cada uma das temperaturas usadas, apenas cinco a mais que na análoga mesofílica. Os números de LH BS e SS variam mais com a temperatura do que as LH BB: é o mesmo comportamento que aquele exibido pela XBC. Aproximadamente duas vezes mais LH BS foram detectadas em relação à XBC, sendo que o máximo, cerca de 35, detectado a 55°C. Em relação às ligações SS, foram detectadas por volta de 10 ligações a mais na xilanase XTL do que na XBC.

Comparando os demais domínios entre as xilanases, pode-se observar que no caso das LH BB tais domínios apresentam números de ligações muito próximos, por exemplo, o domínio *palma* apresenta um número de LH BB de aproximadamente 30 em ambas xilanases, em todas as temperaturas. Nesses domínios o número de LH BS e SS são relativamente maiores na xilanase XTL, com exceção do domínio *palma* onde o número de LH BS é maior para xilanase XBC.

Figura 6.12: Número de LH BB na XTL.

Figura 6.13: Número de LH BS na XTL.

Figura 6.14: Número de LH SS na XTL.

As energias médias das LH_{intra} detectadas em todos os domínios e regiões da xilanase XTL, para cada temperatura, estão apresentadas nas figuras 6.15, 6.16 e 6.17 para BB, BS e SS, respectivamente. Considerando os desvios, as energias médias das LH BB em todos os domínios e regiões são semelhantes àsquelas ocorridas para a análoga mesofílica. No caso das LH BS e SS, observa-se que as energias médias obtidas para a xilanase XTL estão na mesma faixa de energia daquelas obtidas para a XBC, porém deve-se destacar que no caso das LH BS, a região *corda* apresenta uma energia média mais atrativa do que nos demais domínios em cerca de - 3.3 kcal.mol⁻¹ e também em relação à XBC.

Figura 6.15: Energia média das LH BB na XTL.

Figura 6.16: Energia média das LH BS na XTL.

Figura 6.17: Energia média das LH SS na XTL.

Na xilanase XTL a região *corda* é formada por resíduos polares que conseqüentemente são capazes de formar LH BS e SS. Os maiores responsáveis por essas LH_{intra} são os resíduos Asp97, Ser99, e Ser100, que devido às suas proximidade formam também LH BS e SS entre si. O resíduo Asp97 forma uma LH SS com a Arg116 que está situada no domínio *polegar* que é, na verdade, uma ponte salina. A ponte salina formada entre esses resíduos, figura 6.18, está presente em cerca de 50% do tempo na faixa de temperatura de 25 a 65°C mas a 70°C, temperatura ótima da XTL, essa ponte salina não foi detectada. Uma vez que o resíduo Arg116 encontra-se no domínio *polegar* essa ponte salina é um importante fator que contribui para um aumento da rigidez nessas regiões em condições abaixo da temperatura ótima. Portanto, a existência de uma ponte salina explica a maior rigidez apresentada pelo domínio *polegar* da XTL em relação à XBC. A ausência da ponte salina nas condições ótimas permite o ganho de flexibilidade necessário e característico dessas enzimas em tais condições.

Figura 6.18: Localização da ponte salina Asp97-Arg116.

As energias totais das LH BB, BS e SS de cada domínio/região foram calculadas para a XTL. Assim como ocorre para a XBC, o domínio *dedos* é que exibe maior estabilidade, apresentando uma energia total de aproximadamente $-140.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (10 kcal.mol^{-1} mais atrativa do que a XBC). Essa energia é o dobro da energia total de estabilização por LH_{intra} exibida pelos domínios *palma* e *polegar*. As regiões hélice e *corda* são as menos estabilizadas pelas LH BB, apresentando energias $\geq -40.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Nas energias totais das LH BS e SS estão as maiores diferenças energéticas entre o par mesofílico-termofílico de xilanases. Como comentado, acima um número consideravelmente maior de ligações BS e SS foi detectado para a XTL. No caso das LH BS os domínios *dedos* e *corda* são cerca de $-60 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-12 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente, mais estáveis na XTL do que na XBC. Os demais domínios e regiões não apresentam energias significativamente diferentes. Todos os domínios e regiões, com exceção da região hélice, apresentam energias mais atrativas na xilanase XTL. A figura 6.19 mostra a energia total das LH SS por domínios/regiões da xilanase XTL. Da comparação das duas xilanases, figura 6.9 e figura 6.19, constata-se que as maiores diferenças ocorrem nos domínios/regiões *dedos*, *polegar* e *corda* na faixa de 35 a 65°C. Como discutido anteriormente, as LH SS são mais lábeis do que as LH BB devido à maior liberdade de movimentação dos grupos laterais, portanto, tanto o número quanto a energia das LH SS sofrem grandes flutuações ao longo

do tempo como também com o aumento da temperatura. As menores diferenças são observadas no domínio *palma*, onde a energia varia de -5 a -30 kcal. mol⁻¹ em função da temperatura, enquanto que a região hélice apresenta praticamente a mesma energia em ambas as xilanases. Dentre as mais de 30 e 45 LH SS detectadas nos casos das xilanases XBC e XTL, respectivamente, ocorrem também as pontes salinas. As pontes salinas detectadas estão relacionadas na tabela 6.4.

Figura 6.19: Energia total das LH SS por domínio na XTL.

Tabela 6.4 : Energias médias em kcal mol⁻¹ e as Fr (%) das pontes salinas detectadas.

XBC						
Ponte salina	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
Arg73-Asp119	-18.4 (26.0)	-	-9.4 (22.8)	-17.1 (38.0)	-	-
Arg132-Asp83	-15.9 (33.0)	-2.9 (39.0)	-17.4 (37.0)	-5.4 (32.3)	-8.6 (23.2)	-
Arg89-Asp106	-2.4 (27.0)	-	-2.7 (23.0)	-	-	-
Arg136-Asp83	-5.2 (53.1)	-	-2.9 (37.1)	-	-	-
XTL						
Arg58-Asp192	-2.7 (58.3)	-	-	-	-	-
Arg81-Asp129	-13.8 (86.5)	-	-	-	-	-
Arg145-Glu91	-19.2 (95.8)	-	-	-	-	-
Arg116-Asp97	-7.8 (75.0)	-12.5 (63.3)	-22.3 (44.0)	-18.6 (50.5)	-21.2 (43.2)	-
Arg145-Asp111	-5.2 (32.3)	-	-	-	-	-
Arg141-Glu91	-16.0 (60.1)	-16.3 (52.2)	-18.5 (78.1)	-15.9 (66.0)	-16.5 (60.1)	-16.6 (50.5)
Arg161-Asp157	-	-	-	-	-9.2 (20.3)	-

De um modo geral, as pontes salinas ocorrem na xilanase termofílica XTL tanto com ocorrências superiores às da mesofílica XBC quanto com energias mais negativas, denotando maior estabilidade. Algumas pontes salinas estão localizadas numa mesma região, caracterizando um agregado iônico. Os agregados iônicos são formados pelos resíduos Asp83/Arg136/Arg132 no caso da XBC e pelos resíduos Glu91/Arg145/Asp143/Arg141 na XTL. A 25°C estes agregados estão muito bem formados e definidos, porém perdem a estabilidade com o aumento da temperatura. Este é um comportamento geral não apenas dos agregados iônicos, mas também das pontes salinas individuais. As exceções ficam por conta das pontes salinas Arg132-Asp83 e Arg73-Asp119 na XBC e, Arg141-Glu91 e Arg116-Asp97 na XTL. Pela análise da disposição espacial dessas pontes salinas em ambas as xilanases, observa-se que as pontes salinas Arg132-Asp83 (XBC) e Arg141-Glu91 (XTL) estão exatamente na mesma posição. Dessa forma a

ponte salina nesta região é conservada em ambas xilanases (figura 6.20). A conservação de um fator que estabiliza a estrutura da proteína, como uma ponte salina, é uma forte indicação de que este fator deve ser essencial para a manutenção estrutural e conseqüentemente para a termoestabilidade/atividade da proteína. As frações de ocorrências e as energias médias destas pontes salinas reforçam esta idéia. Da tabela 6.4 pode-se ver que a ponte salina conservada é muito mais estável na XTL do que na XBC. Isto significa que esta ponte salina está presente durante a maior parte do tempo (maior Fr) interagindo mais atrativamente na XTL do que na XBC. As outras duas pontes salinas se encontram em diferentes regiões da XBC e XTL. A ponte salina detectada na XBC, Arg73-Asp119 apresenta baixa fração de ocorrência em todas as temperaturas, alcançando um máximo de 38% de ocorrência a 55°C, enquanto que a ponte salina Arg116-Asp97 na XTL alcança um mínimo de 43%(65°C) e um máximo de 75%(25°C) de ocorrência. Na XTL as pontes salinas Arg141-Glu91 e Arg116-Asp97 estão próximas, contribuindo ainda mais para a rigidez dessa região, que engloba parte dos domínios *dedos*, *polegar* (parte inferior, próxima ao domínio *dedos*) e *corda*.

Figura 6.20: Disposição espacial das pontes salinas de maior estabilidade nas xilanases XBC e XTL. As pontes salinas marcadas são conservadas nestas xilanases.

A região catalítica da XTL também foi investigada. Os resíduos de importância catalítica, descritos na literatura [21] são: os resíduos Glu86 e Glu178 que atuam como nucleófilo e catalisador ácido/base respectivamente, o resíduo Arg122, um conjunto de cinco tirosinas Tyr73, Tyr77, Tyr88, Tyr172 e Tyr180, um triptofano, Trp18, e uma glutamina Gln136. As tabelas 6.5, 6.6 e 6.7 apresentam as Fr(%) dos pares formadores de LH BB, BS e SS respectivamente.

Tabela 6.5: Fr (%) das LH BB dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XTL.

PARES BB N-H·····O=C	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
<i>Glu178-Tyr73</i>	97.9	96.4	84.1	54.5	82.8	63.6
<i>Tyr137-Glu86</i>	93.8	90.2	94.2	95.9	95.5	90.8
<i>Tyr73-Glu178</i>	96.9	91.1	95.8	95.4	92.1	88.7
<i>Glu86-Asp135</i>	98.7	94.9	92.6	94.1	96.3	52.3
<i>Trp18-Val46</i>	78.1	95.7	91.5	71.9	86.3	63.4
<i>Val46-Trp18</i>	100.0	95.9	86.9	82.4	80.2	80.0
<i>Tyr77-Ile174</i>	91.7	93.3	93.0	93.5	91.5	89.9
<i>Ile174-Tyr77</i>	90.6	98.6	97.5	97.7	95.0	95.0
<i>Tyr88-Tyr137</i>	95.8	98.1	98.5	98.2	97.7	97.4
<i>Ser139-Tyr88</i>	93.8	97.4	95.4	97.2	94.7	95.6
<i>Trp79-Tyr172</i>	97.9	74.4	66.6	51.3	37.7	50.0
<i>Tyr180-Asn71</i>	82.3	51.2	50.0	48.2	40.0	38.1
<i>Thr120-Gln136</i>	98.7	98.2	97.1	97.3	92.5	95.7
<i>Arg122-Phe134</i>	100.0	88.6	73.5	68.6	85.7	88.9
<i>Phe134-Arg122</i>	95.8	87.7	67.5	63.6	75.6	84.1
<i>Gln136-Thr120</i>	97.9	93.2	94.6	90.1	90.6	89.8

Tabela 6.6: Fr (%) das LH BS dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XTL.

PARES BS	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
<i>Ser72-Glu178</i>	50	-	-	-	-	-
<i>Ser19-Trp18</i>	-	29	-	-	-	-
<i>Glu179-Glu178</i>	-	-	28.2	-	-	-
<i>Tyr88-Ser139</i>	-	-	30.3	-	-	-
<i>Tyr180-Asn71</i>	-	-	74.7	-	-	-
<i>Leu45-Glu178</i>	-	-	-	62.6	96.6	-
<i>Asn52-Tyr172</i>	-	-	-	67.6	-	43.6
<i>Asn71-Tyr180</i>	-	-	-	54.6	-	-
<i>Val46-Glu178</i>	-	-	-	25.1	70.8	-

Tabela 6.7: Fr (%) das LH SS dos resíduos presentes no sítio ativo da xilanase XTL.

PARES SS	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
<i>Tyr73-Glu178</i>	95.1	96.0	96.3	80.1	74.8	94.2
<i>Tyr77-Glu86</i>	94.8	88.4	75.9	77.7	83.0	61.3
<i>Tyr77-Tyr172</i>	-	76.5	52.4	41.1	-	-
<i>Tyr88-Glu86</i>	95.8	91.2	80.1	77.4	94.3	-
<i>Tyr88-Glu178</i>	30.0	28.0	-	-	-	65.9
<i>Ser127-Glu86</i>	-	-	-	35.9	-	37.9
<i>Ser16-Trp18</i>	-	77.4	70.5	31.3	33.3	30.0
<i>Tyr172-Glu7</i>	-	-	-	55.3	60.6	-
<i>Tyr96-Tyr80</i>	-	-	-	23.1	-	-
<i>Trp79-Glu86</i>	44.8	-	-	-	-	-
<i>Tyr77-Trp79</i>	64.6	-	-	-	23.5	-
<i>Arg122-Gln136</i>	32.3	-	-	-	-	-
<i>Thr120-Gln136</i>	96.9	-	22.7	-	-	-

Os resíduos catalíticos do par mesofílico-termofílico de xilanases estudado são altamente conservados, preservando a característica anfipática desta região como, por exemplo, os resíduos de ácido glutâmico que são carregados negativamente e o conjunto de tirosinas que rodeiam estes resíduos. Como já foi discutido para xilanase XBC, o diferencial desta região é a forte rede de LH_{intra} formada pelos resíduos de importância catalítica. As LH BB que apresentam $Fr \approx 90$ são as maiores responsáveis pela estabilidade da estrutura secundária da região. No caso da termofílica XTL, um número maior de LH BS e SS foram detectados nessa região, em relação à XBC. Tanto nas LH BS e SS, os resíduos Glu86, Glu178, Tyr73, Tyr77, Tyr88 e Tyr172 possuem papel de destaque por participarem constantemente dessas LH_{intra}, principalmente nas SS. As LH SS ocorrem em maior número e com frações de ocorrência consideravelmente maiores na XTL do que na XBC, como, por exemplo, as ligações entre os pares Tyr73-Glu178 e Tyr77-Glu86. Pode-se dizer que as LH SS entre Tyr73-Glu178 e Tyr77-Glu86 são altamente estáveis durante a simulação e resistentes ao aumento da temperatura. Na xilanase XBC, fato semelhante ocorre para os resíduos Tyr65 e Glu172.

A relação entre os domínios/regiões também foi investigada pelas LH_{intra} entre eles, ou seja, as LH interdomínios. As tabelas 6.8 a 6.13 apresentam as LH interdomínios detectadas, os domínios envolvidos nessas LH_{intra} e as respectivas Fr em cada temperatura. O caráter (x) nas tabelas 6.9 e 6.10 identifica a formação de LH_{intra} cruzadas, ou seja, a carbonila do resíduo i forma LH_{intra} com a amina secundária do resíduo j e a carbonila do resíduo j forma LH_{intra} com a amina secundária do resíduo i .

Tabela 6.8: Fr (%) das LH BB interdomínios da xilanase XBC. As LH cruzadas apresentam duas ocorrências separadas por (/).

XBC						
<i>Domínios ou regiões</i>	<i>Pares</i>	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
<i>BB</i>						
<i>Dedos-Palma</i>	5-41(x)	86.2/98.1	88.2/97.4	68.8/98.1	42.3/48.5	63.4/96.9
	66-84	95.4	94.7	94.1	95.3	95.5
	83-66	79.3	85.3	75.2	79.2	73.3
	46-164	46.8	65.5	62.3	51.4	45.2
<i>Dedos-Hélice</i>	51-144(x)	94.2/91.4	90.3/91.1	90.9/93.5	92.5/91.8	91.1/91.2
	53-142(x)	97.1/92.9	96.3/89.7	95.2/81.1	95.2/87.7	94.9/83.6
	49-146	71.2	42.8	39.2	-	-
<i>Dedos-Corda</i>	87-62	74.3	72.5	64.5	69.6	63.8
	88-62	74.2	50.2	71.8	63.2	42.1
<i>Palma-Polegar</i>	78-126	95.7	95.3	94.3	82.3	82.0
	80-128	90.5	98.2	97.9	97.1	97.3
	82-130	99.3	92.4	90.9	84.4	81.2
	76-126	44.8	79.9	73.1	36.5	82.1
	78-128	95.7	95.8	94.6	91.1	95.7
	80-130	90.5	92.1	89.2	88.2	88.8
	82-132	99.3	99.4	98.9	98.1	95.6

Tabela 6.9: Fr (%) das LH BB interdomínios da xilanase XTL. As LH cruzadas apresentam duas ocorrências separadas por (/).

XTL							
<i>Domínios ou regiões</i>	<i>Pares</i>	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
<i>BB</i>							
<i>Dedos-Hélice</i>	60-150(x)	95.8	90.7/94.8	92.3/93.3	89.1	92.4	73.2
	62-148(x)	92.7/97.9	97.1/73.1	97.2/84.9	97.7	96.9	91.4
	58-152	85.4	87.2	70.4	57.1	76.2	-
<i>Palma-Dedos</i>	74-92(x)	96.8/93.75	87.6/59.6	86.5/50.8	32.5/84.2	88.0	79.8
	74-91	43.8	60.1	58.6	41.8	55.3	53.9
	70-95	53.1	45.5	58.5	34.5	56.5	56.1
	94-72	92.7	93.9	88.2	57.8	66.5	50.5
	86-135	98.9	94.9	92.6	94.1	96.3	52.3
	88-137	95.8	98.1	98.4	98.2	97.7	97.4
	90-139	91.7	90.9	92.3	90.8	92.3	91.4
	84-135	60.4	92.0	66.0	40.7	-	-
	86-137	93.7	90.2	94.2	95.9	95.5	92.6
	88-139	93.7	97.4	95.4	97.2	94.7	94.6
	90-141	98.9	98.1	99.1	98.9	98.7	91.8

Tabela 6.10: Fr (%) das LH BS interdomínios da xilanase XBC.

XBC						
<i>Domínios ou regiões</i>	<i>Pares</i>	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
<i>BS</i>						
<i>Palma-Dedos</i>	2-42	46.1	-	41.1	35.1	34.6
	4-43	68.2	62.5	59.7	54.5	47.8
	67-81	45.7	40.8	39.4	21.5	20.5
<i>Palma-Hélice</i>	72-161	61.6	78.8	82.9	85.0	77.6
<i>Palma-Polegar</i>	80-130	38.6	45.3	60.6	25.3	-
<i>Polegar-Corda</i>	89-132	95.6	96.6	87.5	88.8	74.4
	89-131	55.7	58.9	51.6	54.5	55.7
<i>Polegar-Hélice</i>	101-145	65.7	-	-	-	-
	128-159	76.3	79.2	59.1	29.1	23.3
	129-153	30.9	-	-	-	-

Tabela 6.11: Fr (%) das LH BS interdomínios da xilanase XTL.

XTL							
<i>Domínios ou regiões</i>	<i>Pares</i>	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
<i>BS</i>							
<i>Dedos-Hélice</i>	58-152	98.9	85.6	63.6	40.7	46.2	44.9
	64-147	-	42.7	34.8	54.1	48.6	27.7
	56-152	88.5	38.8	57.4	40.7	41.2	-
<i>Palma-Hélice</i>	80-166	-	36.8	29.3	23.3	29.4	-
<i>Palma-Dedos</i>	55-173	93.8	60.8	44.1	48.3	46.4	40.6
	92-145	35.4	-	-	-	-	-
<i>Polegar-Hélice</i>	137-165	97.9	76.5	60.2	54.7	45.7	38.1
	138-159	94.8	58.8	35.4	48.2	27.7	27.1

Tabela 6.12: Fr (%) das LH SS interdomínios da xilanase XBC.

XBC						
<i>Domínios ou regiões</i>	<i>Pares</i>	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
<i>SS</i>						
<i>Dedos-Palma</i>	4-43	65.5	93.5	85.8	72.7	66.7
	63-83	82.1	96.2	98.2	89.6	55.5
	58-84	45.4	32.2	30.9	-	-
	80-172	87.6	86.1	84.7	86.9	-
<i>Palma-Polegar</i>	83-105	79.7	61.1	75.2	51.9	49.8
<i>Polegar-Hélice</i>	109-145	77.2	22.4	-	-	-

Tabela 6.13: Fr (%) das LH SS interdomínios da xilanase XTL.

XTL							
<i>Domínios ou regiões</i>	<i>Pares</i>	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C	70°C
<i>SS</i>							
<i>Dedos-Palma</i>	7-171	94.8	-	-	-	-	-
	58-173	94.8	31.4	27.4	24.9	-	-
	88-178	34.9	28.06	-	-	-	-
<i>Dedos-Hélice</i>	63-147	-	37.3	27.6	33.5	21.6	20.4
<i>Palma-Polegar</i>	91-115	60.4	73.2	83.3	65.4	54.0	52.7

Das tabelas de 6.8 a 6.13 pode-se constatar que as quantidades de LH interdomínios são semelhantes para ambas as xilanases (considerando a comparação entre os mesmos domínios). O que realmente as distingue são os domínios e regiões envolvidas nessas LH interdomínios. Considerando as LH BB interdomínios, a XBC apresenta 7 LH_{intra} entre os domínios *palma* e *polegar*, sendo que a XTL não apresenta nenhuma LH BB entre esses domínios. As LH BS também estão presentes entre esses domínios na XBC e ausentes na XTL, e no caso das LH SS tanto a XTL como a XBC apresentam apenas 1 LH_{intra} entre esses domínios. A XTL apresenta um número significativamente maior de LH BB entre os domínios *palma* e *dedos* do que a XBC, reforçando assim a rigidez desta região (cleft), como já foi destacado anteriormente. As LH BS e SS entre os domínios *dedos* e *palma*, de ambas as xilanases, são menos freqüentes do que as LH BB e são mais sensíveis à temperatura. A xilanase XBC apresenta uma LH SS entre os resíduos Asp4(*dedos*) e Thr43(*palma*) que estabiliza a sua região N-terminal. Na XTL a LH SS equivalente (na mesma posição espacial) é a Glu7(*dedos*) com Tyr171(*palma*), que apresenta menor ocorrência do que a LH SS da mesofílica. Nenhuma LH_{intra} entre os domínios *dedos* e *polegar* foi detectada. As LH_{intra} envolvendo as regiões *corda* e hélice são as que se apresentam em menor número e com menores ocorrências.

De uma maneira geral, os domínios *dedos*, *palma* e *polegar* são os que mais interagem por LH_{intra}, sendo que esta relação acontece de diferentes maneiras nas duas xilanases. No caso das LH_{intra} entre os domínios *dedos* e *palma*, ambas as xilanases apresentam semelhantes energias de estabilização (soma das energias das LH BB, BS e SS entre esses domínios) que variam de -35 a -45kcal mol⁻¹ dependendo da temperatura. Na xilanase XBC, a parte superior do domínio *polegar* está interagindo mais fortemente com o domínio *palma* do que na XTL, onde apenas uma LH_{intra} *polegar-palma* foi detectada. Como foi visto no capítulo 4, a XTC é menos flexível do que a XBC, porém apresenta uma maior capacidade de abertura (o movimento “abre-fecha” alcança dimensões maiores). A presença das LH_{intra} entre os domínios *polegar* (parte superior) e *palma* na XBC explica o fato dessa enzima exibir uma menor abertura comparada com sua análoga termofílica.

É importante ressaltar aqui, até para evitar confusões, que o domínio *polegar* da XTL experimenta muitas outras forças, mais atuantes do que na XBC, que restringem a frequência da movimentação “abre-fecha” tais como, as pontes salinas (já discutidas). Na XTL a menor quantidade de LH entre a parte superior do domínio *polegar* com o domínio *palma*, em comparação com a XBC, confere uma maior liberdade apenas para a parte superior do *polegar*, justificando a possibilidade de uma maior abertura por parte desta.

6.2.2 Conclusões

As LH_{intra}, juntamente com as pontes salinas, podem ser consideradas como gerando as principais forças atrativas de manutenção da estrutura protéica secundária. O monitoramento destas interações ao longo do tempo e em função da temperatura permite explicar clara e detalhadamente as diferentes termoestabilidades exibidas por duas proteínas da mesma família que compartilham de uma estrutura tridimensional altamente semelhante e conseqüentemente de uma mesma atividade biológica. Proteínas termoestáveis são aquelas que conseguem, de alguma maneira, exibir atividade sob condições de elevadas temperaturas, ou seja, conseguem manter a sua estrutura, ou pelo menos as características estruturais necessárias para sua atividade, em altas temperaturas. Nesse contexto, as termofílicas são mais tolerantes, enquanto que as chamadas mesofílicas são menos tolerantes ao calor. Foi possível estabelecer, de acordo com a investigação das LH_{intra}, que existem grandes diferenças entre o par mesofílico-termofílico estudado. As LH BB estão em números semelhantes no par de xilanases e são fortemente ligadas em todas as temperaturas, principalmente nos domínios *dedos* e *palma*, que juntos formam o “cleft”, a região catalítica. Porém, nas LH BS e SS e nas pontes salinas pôde-se identificar as principais diferenças entre as xilanases. Um número consideravelmente maior destas LH_{intra} assim como das pontes salinas foram detectadas para a xilanase termofílica. Na termofílica, a maior quantidade de pontes salinas está aliada também à maior ocorrência destas interações quando comparadas com a mesofílica, tornando-a mais rígida. A maior rigidez da termofílica ocorre mesmo quando comparamos a região catalítica, que é altamente rígida em ambas

xilanases, porém na termofílica as LH SS presentes nessa região são capazes de direcionar e manter mais firmemente as cadeias laterais dos resíduos catalíticos.

As pontes salinas são bem menos comuns e mais atrativas que as LH_{intra} , e até por isso a sua ocorrência deve ser decisiva para determinar quão mais rígida ou termoestável é uma determinada proteína. Dessa forma a existência de pontes salinas mais estáveis na termofílica, principalmente nos domínios *dedos* e *polegar* é suficiente para reduzir a mobilidade do domínio *polegar*. As presenças destas pontes salinas nestas regiões devem ser importantes para o ganho de termoestabilidade, visto que a termofílica apresenta uma ponte salina nessa região que é conservada na mesofílica, mas com uma maior ocorrência e também uma ponte salina extra e estável nessa mesma região, porém ausente na mesofílica. Não se pode desconsiderar a existência de uma ponte dissulfeto na termofílica que está ausente na mesofílica, como importante fator termoestabilizante. Esta mantém duas regiões ligadas covalentemente e por isso confere uma rigidez muito grande a estas regiões, no caso, a ponte dissulfeto conecta a região hélice ao domínio *polegar* (parte inferior), ou seja, o domínio *polegar* está sob influências de muitas forças que diminuem a sua mobilidade. Fica claro então, que quanto mais atuantes são as forças que restringem a movimentação do *polegar* e quanto mais rígida é a estrutura, de uma maneira geral, maior é a tolerância à temperatura [24].

É importante ressaltar que, tão importante quanto às interações intramoleculares da proteína são as interações intermoleculares (proteína-água), visto que o solvente também tem a capacidade de estabilizar a superfície da proteína.

6.3 Ligações de hidrogênio intermoleculares

Na investigação das LH_{inter} , foram considerados apenas os átomos presentes em grupos polares, pois estes são os únicos capazes de formar LH_{inter} com as águas. Grupos apolares também são importantes para o processo global de solvatação (efeito hidrofóbico), porém não são capazes de formar LH_{inter} e por isso não serão contabilizados nas presentes análises. Suas contribuições estão computadas no cálculo das interações proteína-água já apresentados.

As LH_{inter} foram separadas em 2 tipos: cadeia principal e cadeia lateral. Na cadeia principal consideramos os grupos carbonila e amina secundária e nas cadeias laterais todos os grupos hidroxilas, carboxilatos, guanidinos e aminos.

6.3.1 Resultados e discussão

As figuras de 6.21 a 6.24, apresentam a energia total e o número total de LH_{inter} realizadas pela cadeia principal e lateral de cada xilanase. Pode-se constatar a grande similaridade na solvatação da cadeia principal para ambas as xilanases. Quanto as cadeias laterais, a energia das LH_{inter} é cerca de $-50 \text{ kcal.mol}^{-1}$ mais atrativa na XTL que forma aproximadamente 30 LH_{inter} a mais do que a XBC. A energia total e o número total de LH_{inter} sofrem pequenas oscilações com a mudança de temperatura.

Figura 6.21: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, aminos secundárias e cadeias laterais da XBC.

Figura 6.22: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, aminos secundárias e cadeias laterais da XTL.

Figura 6.23: Número total de LH_{inter} realizadas pelos grupos carbonilas, aminos secundárias e cadeias laterais da XBC.

Figura 6.24: Número total de LH_{inter} realizadas pelos grupos carbonilas, aminos secundárias e cadeias laterais da XTL.

Com o intuito de analisar localmente a solvatação destas enzimas, as diferentes regiões/domínios foram investigadas separada e comparativamente, ou seja, comparando os mesmos domínios/regiões entre as diferentes xilanases.

Considerando primeiramente a cadeia de cada região, figuras de 6.24 a 6.27, pode-se observar, que com exceção do domínio *dedos* onde a energia total das LH_{inter} é consideravelmente mais atrativa na XTL do que na XBC, um diferença de cerca de -30kcal.mol^{-1} para as carbonilas e -20kcal.mol^{-1} para as aminas secundárias. Os demais domínios apresentam energias semelhantes em ambas xilanases.

Figura 6.24: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.25: Energia total das LH_{inter} para os grupos carbonilas, por região/domínio, da XTL.

Figura 6.26: Energia total das LH_{inter} para os grupos aminas secundárias, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.27: Energia total das LH_{inter} para os grupos aminas secundárias, por região/domínio, da XTL.

A energia total das LH_{inter} para as cadeias laterais, em cada região, esta mostrada nas figuras 6.28 e 6.29. Nas cadeias laterais mais uma vez é possível ver claramente as maiores diferenças na solvatação dos domínios/regiões dessas xilanases. Apenas os domínios *corda* apresentam energias muito semelhantes, cerca de $-20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em todas as temperaturas para as duas xilanases. Os demais domínios/regiões apresentam energias mais atrativas para a XTL com relação à XBC, a maior diferença é de $-20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para os domínios *dedos* e *polegar*. É interessante notar que a 80°C , temperatura na qual pudemos observar um começo de desnaturação, que afetou principalmente o domínios *dedos*, a energia total das LH_{inter} do domínios *dedos* atingiu um mínimo (maior atração) em 80°C . As figuras 6.30 e 6.31 apresentam os números de LH_{inter} detectados nas cadeias laterais para cada domínio/região. A maior diferença oriunda da comparação entre os domínios das diferentes xilanases fica por conta do domínio *dedos*. No domínio *dedos* a XTL apresentou um número de LH_{inter} ao redor de 85,

enquanto a XBC alcançou no máximo 60 LH_{inter}. Os demais domínios/regiões apresentam números de LH_{inter} muito parecidos em ambas as xilanases.

Figura 6.28: Energia total das LH_{inter} para as cadeias laterais, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.29: Energia total das LH_{inter} para as cadeias laterais, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.30: Número total de LH_{inter} realizadas pelas cadeias laterais, por região/domínio, da XBC.

Figura 6.31: Número total de LH_{inter} realizadas pelas cadeias laterais, por região/domínio, da XTL.

Destas análises, deve-se destacar que os dois domínios que formam a região catalítica, *dedos* e *palma*, apresentam relações distintas com o solvente. A *palma* é um domínio de baixa exposição ao solvente, enquanto que o domínio *dedos*, maior domínio da proteína, é o que exibe maior exposição, conferindo maior acessibilidade às moléculas de água. Os dados de solvatação para as cadeias laterais dos resíduos indicados pela literatura [20,21] como sendo os de importância catalítica estão apresentados nas tabelas 6.14 e 6.15 para as xilanases XBC e XTL, respectivamente.

Tabela 6.14: LH_{inter} dos resíduos da região catalítica da XBC. N_{LH} é o número de LH calculadas e E_M a energia média das LH_{inter} em kcal.mol⁻¹.

XBC	25°C		35°C		45°C		55°C		65°C	
	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M
<i>Glu78</i>	1.3	-11.7	1.5	-9.0	1.4	-11.0	2.2	-12.2	1.2	-11.5
<i>Glu172</i>	2.8	-10.5	2.9	-9.8	2.6	-10.5	2.2	-12.0	3.2	-11.0
<i>Arg112</i>	2.0	-12.3	1.9	-12.6	1.9	-12.8	1.6	-12.6	1.4	-12.6
<i>Tyr65</i>	1.2	-3.2	1.2	-3.5	1.4	-2.8	1.2	-3.0	1.1	-3.0
<i>Tyr69</i>	0.9	-3.0	0.9	-3.8	0.8	-3.2	0.9	-3.5	0.4	-3.5
<i>Tyr79</i>	1.0	-1.8	1.0	-1.8	1.0	-1.2	1.0	-1.5	1.0	-1.2
<i>Tyr80</i>	0.2	-4.0	-	-	0.3	-3.5	0.7	-3.5	1.0	-3.5
<i>Tyr166</i>	2.0	-3.2	1.7	-3.2	2.1	-3.0	1.5	-3.2	1.1	-3.0
<i>Tyr174</i>	2.2	-3.2	2.1	-3.2	2.1	-3.2	2.0	-3.2	1.9	-3.5
<i>Trp9</i>	0.5	-2.2	0.6	-2.2	0.6	-2.2	0.6	-2.2	0.5	-2.2
<i>Trp71</i>	0.2	-2.2	0.2	-2.2	0.2	-2.2	-	-	0.4	-2.2

Tabela 6.15: LH_{inter} dos resíduos da região catalítica da XTL. N_{LH} é o número de LH calculadas e E_M a energia média das LH_{inter} em kcal.mol⁻¹.

XTL	25°C		35°C		45°C		55°C		65°C		70°C		80°C	
	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M	N_{LH}	E_M
<i>Glu86</i>	1.8	-10.0	2.7	-11.0	2.6	-9.3	1.8	-11.0	1.6	-11.0	2.5	-10.	2.5	-10.0
<i>Glu178</i>	3.0	-10.0	2.9	-10.0	3.0	-10.	1.6	-10.0	1.9	-10.0	2.3	-11.	2.3	-11.0
<i>Arg122</i>	1.8	-12.0	1.7	-12.0	1.8	-12.	1.9	-12.0	1.3	-13.0	1.4	-13.	1.4	-13.0
<i>Tyr73</i>	0.5	-4.8	1.0	-3.8	1.1	-3.2	1.0	-2.8	1.0	-3.0	1.0	-3.5	1.0	-3.5
<i>Tyr77</i>	0.5	-4.0	0.6	-3.8	0.6	-3.8	0.9	-3.0	0.9	-3.0	1.0	-3.5	1.0	-3.5
<i>Tyr88</i>	1.2	-2.8	1.2	-3.5	1.3	-3.0	1.1	-3.0	1.1	-3.2	0.9	-3.5	0.9	-3.5
<i>Tyr172</i>	1.1	-3.5	1.0	-3.2	1.1	-3.0	1.2	-3.8	1.1	-3.5	1.1	-3.5	1.1	-3.5
<i>Tyr180</i>	2.2	-3.2	2.0	-3.2	1.8	-3.2	1.5	-3.5	1.9	-3.5	2.1	-3.2	2.1	-3.2
<i>Trp18</i>	0.5	-2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gln136</i>	1.0	-6.4	1.0	-6.0	1.0	-6.0	0.9	-6.2	0.7	-6.4	0.7	-6.4	0.7	-7.0

Da comparação das tabelas 6.14 e 6.15, pode-se observar a grande similaridade na solvatação dos resíduos catalíticos de Glu 78 e 172 da XBC e 86 e 178 da XTL. Em ambas as xilanases esses resíduos são altamente solvatados, solvatação esta que se intensifica conforme a abertura da estrutura. As cadeias laterais destes resíduos participam de uma a duas LH_{intra} estáveis, alta ocorrência, em cada temperatura e também são altamente solvatados em todas as temperaturas. Devido aos seus pares de elétrons livres, o grupo carboxilato é capaz de formar LH_{intra} mobilizando ao mesmo tempo moléculas de água formando fortes camadas de solvatação.

Outro resíduo que exhibe o mesmo padrão de solvatação dos resíduos de Glu é a Arg 112 da XBC e 122 da XTL. Como discutido anteriormente, estes resíduos não participam de LH_{intra} em nenhuma das xilanases, e aqui podemos ver que tais resíduos se encontram completamente envolvidos em LH_{inter} em todas as temperaturas. Os resíduos de Arg apresentam um número médio de solvatação ao redor de 2 e uma energia média por ligação de aproximadamente $-12.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nas duas xilanases. De acordo com estes resultados, pode-se dizer que estes resíduos de Arg são uns dos que apresentam energias de solvatação mais atrativas em toda proteína.

O conjunto de tirosinas presentes na região catalítica também apresenta solvatação similar comparando as duas xilanases. Com exceção da Tyr80 da XBC que não possui uma Tyr correspondente na XTL, todas as outras tirosinas apresentam posições correspondentes; Tyr65(XBC)-Tyr73(XTL), Tyr69(XBC)-Tyr77(XTL), Tyr79(XBC)-Tyr88(XTL), Tyr165(XBC)-Tyr172(XTL) e Tyr174(XBC)-Tyr180(XTL). Os três primeiros pares de tirosinas correspondentes estão situados no centro da região catalítica, enquanto os dois últimos estão mais deslocados para a superfície, sendo assim melhor solvatados.

Os triptofanos apresentam o mesmo padrão de solvatação entre eles, são pouco solvatados com $N_{LH} \leq 0.6$ e $E_M \cong -2.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

A maior diferença na solvatação destes resíduos da região catalítica é devido à presença do resíduo de Gln136 na termofílica. Na XBC não há resíduo correspondente que se solvate tão bem quanto o Gln136 da XTL. O resíduo Gln136 apresenta LH_{inter} com energia média $E_M \leq -6.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em todas as

temperaturas, com 1 molécula de água bem coordenada pelo oxigênio da cadeia lateral.

Em linhas gerais, a investigação sobre a solvatação destas xilanases mostrou que as cadeias laterais contribuem muito mais para a solvatação do que a cadeia principal da proteína, o que é característico de proteínas globulares. Da comparação entre as xilanases XTL e XBC, pôde-se constatar que no domínio *dedos* encontra-se a maior diferença entre elas, apresentando energias e número de LH_{inter} mais favoráveis à xilanase XTL do que na XBC.

Há considerável ocorrência de LH_{inter} com energias altamente atrativas, como por exemplo no caso das Arg112 e 122 comentadas acima. A análise destas LH_{inter} é ponto fundamental para entender o mecanismo da termoestabilidade que deve ser devida parcialmente a estas LH_{inter} . Elas foram selecionadas com base em um critério arbitrário mas consistente com atrações intensas, critério que consiste em selecionar as LH_{inter} que apresentam energias médias inferiores a -9.0kcal.mol^{-1} . Nenhuma das LH_{inter} da cadeia principal obedeceu a este critério uma vez que apresentam energias maiores que -5.5kcal.mol^{-1} .

Nas cadeias laterais detectaram-se LH_{inter} com energias que variam do limite de cerca de -9.0 até -13kcal.mol^{-1} , ver tabelas 6.16 e 6.17. O símbolo “ * “ para a Arg116 é usado na tabela 6.17 para indicar que este resíduo forma uma ponte salina em temperaturas até 65°C .

Das tabelas 6.16 e 6.17 pode-ver que poucas das LH_{inter} selecionadas deixam de apresentar energias maiores que -9.0kcal.mol^{-1} , em ambas xilanases. Pode-se afirmar que, essencialmente, estas LH_{inter} estão atuando constantemente em todas as temperaturas com energias entre -13.0 e -9.0kcal.mol^{-1} . A 65°C no caso da XBC e a 80°C na XTL, pode-se observar que todas as LH_{inter} estão presentes com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} .

Tabela 6.16: LH_{inter} da XBC que apresentam energia média menor que -9.0kcal.mol^{-1} . As E_M são dadas em kcal.mol^{-1} .

Resíduo	E_M (25°C)	E_M (35°C)	E_M(45°C)	E_M(55°C)	E_M(65°C)
Asp4	-10.7	-10.5	-10.2	-10.2	-10.5
Gln7	-10.2	-9.0	-10.0	-10.4	-10.0
Asn8	-10.2	-9.2	-10.0	-9.0	-10.4
Asp11	-10.2	-10.2	-10.2	-10.4	-11.0
Asn17	-10.0	-9.8	-10.0	-10.4	-9.6
Asn20	-8.5	-9.5	-8.9	-9.9	-10.2
Asn29	-10.2	-10.7	-10.2	-10.0	-10.6
Asn32	-9.8	-9.8	-9.6	-10.0	-10.2
Asn35	-9.8	-9.4	-9.2	-10.0	-9.5
Arg49	-12.1	-12.0	-12.2	-11.8	-12.2
Asn52	-10.3	-9.5	-10.1	-10.0	-9.8
Asn54	-9.9	-8.0	-10.4	-10.5	-10.0
Asn61	-10.0	-9.7	-10.4	-10.2	-10.6
Asn63	-9.1	-10.3	-10.5	-9.8	-10.0
Arg73	-12.3	-12.0	-12.5	-12.5	-12.6
Arg78	-11.8	-10.2	-10.4	-11.8	-11.5
Asp83	-7.0	-9.2	-7.0	-8.8	-11.4
Asp101	-10.3	-11.0	-10.8	-10.7	-10.4
Asp106	-11.0	-10.6	-10.8	-11.0	-10.7
Arg112	-12.3	-12.6	-12.8	-12.6	-12.6
Asn114	-9.8	-9.2	-9.5	-9.7	-9.2
Asp119	-10.0	-10.5	-10.2	-10.3	-10.4
Asp121	-10.2	-10.5	-10.9	-10.5	-11.0
Arg122	-12.3	-12.4	-12.7	-12.6	-12.6
Gln133	-8.6	-10.9	-10.7	-10.4	-10.8
Asp136	-12.8	-11.9	-12.2	-12.4	-12.8
Asn141	-9.2	-10.5	-10.2	-9.0	-10.0
Asn148	-8.0	-10.8	-10.5	-9.0	-10.2
Asn151	-10.1	-9.7	-10.1	-11.2	-10.4
Asn159	-8.9	-10.4	-10.0	-9.7	-9.8
Asn163	-10.2	-10.0	-10.4	-10.5	-10.7
Glu172	-10.5	-10.0	-10.5	-11.5	-11.0
Gln175	-10.2	-10.5	-9.8	-9.0	-10.5

Arg181	-11.0	-10.2	-9.9	-10.0	-10.0
--------	-------	-------	------	-------	-------

Continuação da tabela 6.16: LH_{inter} da XBC que apresentam energia média menor que -9.0kcal.mol^{-1} . As E_M são dadas em kcal.mol^{-1} .

Tabela 6.17: LH_{inter} da XTL que apresentam energia média menor que -9.0kcal.mol^{-1} . As E_M são dadas em kcal.mol^{-1} .

Resíduo	$E_M(25^\circ\text{C})$	$E_M(35^\circ\text{C})$	$E_M(45^\circ\text{C})$	$E_M(55^\circ\text{C})$	$E_M(65^\circ\text{C})$	$E_M(70^\circ\text{C})$	$E_M(80^\circ\text{C})$
Asn5	-8.6	-8.0	-8.9	-10.2	-10.0	-10.2	-10.2
Glu7	-11.0	-11.3	-11.5	-12.0	-11.8	-11.8	-11.5
Asp11	-11.0	-10.7	-10.7	-10.2	-10.0	-10.8	-11.0
Asp20	-10.2	-10.0	-10.8	-10.2	-10.4	-10.4	-10.5
Gln24	-10.2	-10.7	-10.1	-8.9	-10.0	-9.9	-10.5
Glu31	-10.7	-11.0	-10.6	-10.0	-10.7	-10.4	-10.4
Glu36	-11.4	-11.8	-10.7	-10.5	-10.5	-11.2	-11.3
Asp41	-11.3	-10.8	-10.5	-10.4	-11.0	-10.7	-10.7
Asn44	-8.6	-9.3	-10.3	-8.7	-10.9	10.7	-10.4
Asn52	-8.0	-8.3	-8.6	-10.3	-10.5	-9.7	-9.0
Asn56	-10.8	-8.9	-10.9	-10.0	-10.2	-10.0	-9.8
Arg58	-11.4	-12.0	-12.3	-12.1	-11.8	-12.3	-12.8
Glu63	-10.4	-10.7	-10.7	-10.7	-11.5	-10.9	-10.7
Gln67	-10.3	-11.0	-10.2	-9.9	-10.0	-9.8	-10.9
Asn69	-11.3	-11.8	-9.1	-10.7	-9.5	-9.5	-9.8
Asn71	-10.7	-10.5	-9.0	-9.7	-9.4	-9.5	-11.2
Arg81	-12.1	-12.6	-12.6	-12.8	-12.3	-12.6	-12.8
Asn82	-9.4	-10.8	-10.6	-9.7	-10.2	-10.2	-9.7
Glu86	-10.2	-10.8	-10.4	-11.4	-11.0	-10.4	-9.5
Glu91	-9.4	-9.5	-11.3	-10.5	-10.6	-11.0	-11.7
Asp97	-11.0	-11.5	-10.7	-10.0	-10.0	-10.5	-11.8
Asp104	-10.7	-10.5	-10.2	-10.2	-10.4	-10.5	-10.2
Glu109	-10.5	-10.7	-10.7	-11.0	-10.7	-11.0	-10.7
Asp111	-10.7	-10.6	-10.4	-10.4	-10.7	-10.2	-10.7

Arg116*	-	-	-	-	-	-12.1	-12.6
Arg122	-12.3	-12.6	-12.0	-12.0	-13.0	-12.8	-12.6
Asn124	-9.5	-10.7	-10.2	-10.0	-10.2	-10.0	-10.5
Asp129	-10.7	-11.0	-10.6	-10.7	-10.2	-10.4	-10.7
Gln132	-10.3	-10.1	-9.7	-9.5	-10.0	-10.0	-10.4
Asp135	-10.8	-10.4	-10.5	-10.7	-11.0	-10.2	-10.5
Gln142	-7.6	-10.5	-10.4	-9.7	-10.7	-10.4	-10.0
Asp143	-10.0	-10.8	-10.5	-10.7	-10.2	-10.0	-10.5
Arg145	-12.6	-12.6	-13.0	-12.6	-13.0	-11.5	-10.6
Gln151	-9.2	-9.5	-9.2	-9.5	-9.2	-9.2	-9.9
Asp157	-10.5	-10.2	-10.2	-10.7	-10.4	-10.7	-10.2
Arg161	-12.6	-12.3	-12.3	-12.8	-12.8	-12.6	-13.6
Asn165	-9.6	-9.0	-9.9	-10.3	-10.9	-10.4	-10.9
Asn167	-10.3	-9.0	-10.2	-11.0	-10.4	-10.5	-9.7
Asp169	-10.1	-11.0	-10.5	-10.0	-10.5	-11.0	-11.0
Glu178	-10.2	-10.7	-10.4	-10.7	-10.5	-11.8	-11.2
Arg187	-12.1	-12.0	-12.6	-12.6	-12.6	-12.3	-12.0
Asp192	-10.4	-10.0	-10.9	-11.3	-11.0	-11.0	-11.0

Continuação da tabela 6.17: LH_{inter} da XTL que apresentam energia média menor que -9.0kcal.mol^{-1} .

A XTL apresenta 42 LH_{inter} contra 34 da XBC. As figuras 6.32 e 6.33 mostram a disposição espacial destes resíduos, para XBC e XTL respectivamente, em quatro diferentes ângulos.

Figura 6.32: Disposição espacial dos resíduos, da XBC, formadores de LH_{inter} com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} , em quatro diferentes ângulos. As diferentes colorações são para destacar os domínios/regiões.

Figura 6.33: Disposição espacial dos resíduos, da XTL, formadores de LH_{inter} com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} , em quatro diferentes ângulos. As diferentes colorações são para destacar os domínios/regiões.

Das figuras 6.32 e 6.33 pode-se observar que os resíduos detectados como sendo os maiores formadores de LH_{inter} envolvem completamente toda a estrutura da molécula, principalmente nos domínios *dedos*, ou seja, a superfície destas enzimas são altamente solvatadas e de maneira extremamente estável. Uma superfície altamente solvatada aliada a um esqueleto rígido, mantido por fortes

redes de LH_{intra} , figuras 6.34 e 6.35, é claramente, uma combinação que conduz as proteínas aos níveis de estabilidade necessários para sua atividade biológica.

No caso de proteínas termoestáveis estes efeitos são mais pronunciados, levando estas proteínas a um nível de estabilidade superior aos das proteínas não-termoestáveis. Estas fortes interações são refletidas na flexibilidade da proteína, tornando-as mais rígidas e consequentemente mais tolerantes às condições extremas.

Figura 6.34: LH intramoleculares, na XBC.

Figura 6.35: LH intramoleculares, na XTL.

Como se pode ver das tabelas 6.16 e 6.17, a XTL exibe um número maior destas LH_{inter} altamente atrativas, em comparação à XBC. Em média estas LH_{inter} apresentam uma energia de $-10.9 \pm 0.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ na XTL e $-10.7 \pm 1.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ na XBC, valores estes iguais. Somando as energias destas LH_{inter} tem-se aproximadamente $-455.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-342.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para XTL e XBC, respectivamente, em cada temperatura. Dessa forma, estas LH_{inter} na XTL são responsáveis por uma diferença na energia de $-113.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ com relação à XBC.

De acordo com as tabelas 6.16 e 6.17, sabe-se a porcentagem, composição de cada resíduo formador de LH_{inter} com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} , tabela 6.18.

Tabela 6.18: Porcentagem de cada resíduo detectado com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} .

Resíduos	XBC(%)	XTL(%)
Asn	47.1	23.8
Gln	8.8	11.9
Asp	20.6	28.6
Glu	5.9	19.0
Arg	17.6	16.7

É interessante notar que os resíduos de Asn estão presentes na XBC numa porcentagem que é o dobro da sua ocorrência na XTL. Os resíduos de Gln e Arg apresentam aproximadamente a mesma porcentagem nas duas xilanases, mas em compensação os resíduos carregados negativamente, Asp e Glu, estão presentes em maior porcentagem na XTL. Assim como a maioria destes resíduos de Asn da XBC são encontrados no domínio *dedos*, a grande maioria dos resíduos Asp e Glu da XTL também estão localizados no domínio *dedos*. Investigando as posições dos resíduos carregados, Glu, Asp e Arg, nas duas xilanaes, constata-se que alguns destes resíduos são conservados nas mesmas posições nas duas xilanases, porém outros não. A XTL possui resíduos de Arg, Asp e Glu que não apresentam correspondentes na XBC, figura 6.36.

Na figura 6.36 pode-se observar todos os resíduos de Arg, Asp e Glu, que formam LH_{inter} com energia menor que -9.0kcal.mol^{-1} , que estão presentes na XTL e que não apresentam correspondência na XBC.

Os resíduos de Asp estão na cor azul, os de Glu na cor vermelha e os de Arg em verde.

Figura 6.36: Resíduos Asp14, Asp79, Asp175, Asp130, Asp120, Glu5, Glu13, Glu60, Glu36, Glu19, Glu101, Arg106, Arg117 e Arg121. Os resíduos de Asp estão na cor azul, os de Glu na cor vermelha e os de Arg em verde.

Destes resíduos, 7 estão localizados no domínio *dedos* Asp14, Asp120, Glu7, Glu13, Glu60, Glu36, e Arg106, sendo que a Arg106 é o resíduo cuja cadeia lateral forma LH_{inter} com a menor energia detectada, $-13.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Dessa forma, uma boa estratégia para o aumento da termoestabilidade da XBC seria promover mutações, principalmente no domínio *dedos*, substituindo os resíduos das posições comentadas acima pelos correspondentes encontrados na XTL. Portanto através da simulação e pela investigação das LH_{inter} , é possível propor 14 mutações que devem ser testadas primeiramente por simulação e, eventualmente, experimentalmente também para comprovar a validade desta hipótese fundamentada em LH_{inter} .

Analisando individualmente cada um destes 14 resíduos com relação às moléculas de água que os solvavam, observa-se que estes estão divididos em dois grupos que se distinguem pelo tipo de solvatação: (i) aqueles cuja a vizinhança permite fácil acesso das moléculas de água à cadeia lateral e (ii) aqueles que possuem resíduos carregados e/ou polares tão próximos que apresentam moléculas de água de solvatação comuns entre eles. No primeiro caso têm-se os

resíduos Glu13, Glu60, Glu36, Glu19, Asp 14 e Arg117, como mostram as figuras 6.37 a 6.39. As figuras 6.37 a 6.39 mostram as 4 moléculas de águas mais próximas de cada cadeia lateral.

Figura 6.37: Resíduos Glu19 e suas primeiras 4 moléculas de água de solvatação.

Figura 6.38: Resíduos Glu13(esquerda), Asp14(direita) e suas primeiras 4 moléculas de água de solvatação.

Figura 6.39: Resíduos Glu60(esquerda), Glu36 (direita) e Arg117 (centro) e suas primeiras 4 moléculas de água de solvatação.

A figura 6.39 mostra os resíduos Glu60, Glu36 e Arg117 distanciados de tal maneira que não existem moléculas de água comuns entre eles, ou seja, não existem moléculas de água que pertencem à camada de solvatação de dois diferentes átomos da proteína.

As funções $g_{AW}(r)$ para os átomos de oxigênio e hidrogênio destes resíduos estão apresentadas nas figuras 6.40 a 6.42, onde OE são os átomos de oxigênio, equivalentes, da cadeia lateral dos resíduos de Glu, OD são os átomos de oxigênio, equivalentes, da cadeia lateral dos resíduos de Asp e HH são os átomos de hidrogênio da cadeia lateral dos resíduos de Arg. Das figuras 6.40 a 6.42 pode-se observar que os resíduos Glu13, Glu60, Glu36, Glu119, Asp 14 e Arg117 são os que apresentam curvas melhor definidas e com picos de maior intensidade, comparados com os demais resíduos, indicando a presença de uma forte camada de solvatação, característico de átomos que são altamente acessíveis pelo solvente.

Figura 6.40: Função de distribuição radial, $g_{Aw}(r)$ para $A=OE$ (Glu) e $w=H$ (água).

Figura 6.41: Função de distribuição radial, $g_{Aw}(r)$ para $A=OD$ (Asp) e $w=H$ (água).

Figura 6.42: Função de distribuição radial, $g_{Aw}(r)$ para A=HH (Arg) e w= O (água).

Os demais resíduos apresentam alterações nas posições e intensidades dos picos referentes à primeira camada de solvatação. A diminuição da intensidade do primeiro pico e o seu deslocamento para distâncias maiores são características de átomos da proteína, cuja camada de solvatação sofre influencia de outros átomos da proteína, devido à proximidade entre eles. As figuras 6.43 a 6.48 apresentam os resíduos que se solvatam de acordo com a segunda classe de solvatação, como comentado acima. As figuras 6.43 a 6.48 foram obtidas de uma configuração equilibrada a 25°C, visto que não foi detectada nenhuma molécula de água estrutural ou com tempo de residência considerável (> 10%). Esse tipo de configuração se repete nas demais temperaturas, porém, com constante troca das moléculas de água. A constante presença de moléculas de água entre resíduos próximos e carregados com cargas opostas, tem efeito semelhante ao de uma ponte salina, tanto energeticamente quanto dinamicamente, referindo-se ao posicionamento travado destes resíduos. Alguns resíduos polares, que

apresentam grupos hidroxila, como Tyr e Thr, também conseguem influenciar e compartilhar moléculas de água de solvatação de resíduos carregados.

Figura 6.43: Configuração equilibrada dos resíduos Glu91(vermelho),Arg141(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.44: Configuração equilibrada dos resíduos Glu7(vermelho), Tyr14 e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.45: Configuração equilibrada dos resíduos Asp135(vermelho), Lys119(azul), Thr121 e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.46: Configuração equilibrada dos resíduos Asp192(vermelho), Arg58(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.47: Configuração equilibrada dos resíduos Asp157(vermelho), Arg161(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Figura 6.48: Configuração equilibrada dos resíduos Asp97(vermelho), Arg116(azul) e suas primeiras moléculas de água de solvatação. As moléculas de solvatação comuns entre os resíduos estão assinaladas pelas distâncias, em Å, entre os resíduos.

Dentre as moléculas de água mais próximas detectadas, algumas delas estão a no máximo 2.5Å distantes das cadeias laterais que compartilham estas moléculas nas suas camadas de solvatação. Este valor esta de acordo com o mínimo da função $g_{AW}(r)$ apresentada acima, que define a primeira camada de solvatação. Apenas no caso da Asp135, no qual as moléculas de água comuns estão distantes a mais de 3 Å da sua cadeia lateral. Neste caso o deslocamento do mínimo da função $g_{AW}(r)$ para valores maiores que 3 Å se deve a influência de 2 resíduos, Lys119 e Thr121.

Ainda neste capítulo, foram investigadas as LH_{intra} , o que levou a identificar os resíduos formadores de pontes salinas na XTL que estão ausentes na XBC. Estes resíduos também devem ser considerados como candidatos a mutações para aumentar a rigidez da proteína. Eles são Arg141-Glu91 e Arg116-Asp97 na XTL. Na XBC a ponte salina Arg132-Asp83 é a correspondente da Arg141-Glu91 da XTL, porém com uma menor ocorrência em todas as temperaturas. Neste caso, o mais importante seria propor a criação de uma nova ponte salina na XBC que corresponderia às Arg116-Asp97 na XTL.

6.3.2 Conclusões

A investigação da solvatação das xilanases XBC e XTL mostrou que as cadeias laterais contribuem muito mais para a solvatação do que a cadeia principal da proteína, o que é característico de proteínas globulares [18,24].

A solvatação dos resíduos de importância catalítica apresenta o mesmo comportamento nas duas xilanases, ou seja, nenhuma diferença significativa na solvatação de um determinado resíduo da região catalítica da XBC com relação ao seu correspondente na XTL foi detectada. A exceção fica por conta do resíduo Gln136 presente na XTL consideravelmente bem solvatado e para o qual não há correspondente na XBC.

O domínio *dedos* é o domínio/região da proteína que apresenta o maior número de LH_{inter} e também as energias mais atrativas para essas LH_{inter} . O domínio *polegar* é o segundo domínio mais solvatado. Considerando apenas a solvatação das cadeias laterais, tem-se que o domínio *dedos* é cerca de -100kcal.mol^{-1} mais estabilizado pelas águas do que o *polegar*, em ambas as xilanases. O domínio *palma*, caracterizado por uma rede de muitas LH_{intra} , é protegido do solvente pelo *polegar* e pelos *dedos*. A maior exposição ao solvente do domínio *palma* ocorre nas condições de temperatura nas quais as estruturas protéicas estão mais abertas. Da comparação entre as xilanases XTL e XBC, pôde-se constatar que o domínio *dedos* abriga as mais importantes diferenças entre elas. O domínio *dedos* abriga as regiões N e C-terminais. A XTL apresenta um prolongamento de 9 resíduos na região N-terminal, em comparação com a XBC, o que aumenta a capacidade desta região em realizar LH_{intra} com as fitas- β vizinhas e também intermoleculares. Das análises comparativas constatou-se que o domínio *dedos* sempre apresentou uma diferença “positiva” para a XTL com relação à XBC, ou seja, na XTL as interações investigadas estão presentes em maior número e interagindo mais atrativamente, assim sendo podemos destacá-lo como um funcional domínio destas enzimas. Portanto determinadas modificações neste domínio, como por exemplo, uma mutação, deve ter efeitos consideráveis para a termoestabilidade e a atividade enzimática, como foi demonstrado experimentalmente [25].

Considerando as LH_{inter} mais estáveis com energia menor que $-9.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, foi possível identificar 14 resíduos carregados, dentre Glu, Asp e Arg, que estão presentes na XTL e ausentes na XBC, podendo ser considerados os sítios que devem ser preferidos para testar mutações na XBC com o intuito de aumentar a termoestabilidade da xilanase mesofílica. Destes 14 resíduos, 7 estão localizados no domínio *dedos*, o que é mais uma forte evidência da importância do domínio *dedos* para a termoestabilidade desta família de enzimas. O mecanismo de solvatação destes resíduos nos fornece importantes informações sobre a energia altamente atrativa alcançada por estes resíduos com relação às moléculas de água. A vizinhança destes resíduos tem importância fundamental para que energias desta magnitude ocorram. Quando a vizinhança não oferece impedimento estérico para a aproximação das moléculas de água, caso dos resíduos Glu31, Glu36, Glu63, Glu109, Asp41 e Arg187, observa-se que as moléculas de água conseguem se orientar sem ou com baixa influência das cadeias laterais vizinhas, conseqüentemente, uma forte estrutura de solvatação é obtida. Quando a vizinhança é próxima o suficiente e apresenta caráter polar/carregada, ela afeta a camada de solvatação do resíduo em questão de modo que as moléculas de água tornam-se comuns às camadas de solvatação de diferentes átomos da proteína (em diferentes resíduos). Neste caso, dois resíduos passam a interagir indiretamente via molécula de água, tomando os mesmos moldes de uma ponte salina ou LH forte, proporcionando rigidez local e estabilidade.

Referências

- [1] W. Nernst, *Z. Phys. Chem*, **8**, 110, (1892).
- [2] A. Werner, *Liebigs. Ann. Chem*, **322**, 261, (1902).
- [3] T. S. Moore, T. F. Winmill, *J. Chem. Soc*, **101**, 1635, (1912).
- [4] M. Huggins., *Phys. Rev.*, **19**, 436, (1922).
- [5] W. M. Latimer, W. H. Rodebush, *J. Chem. Soc.*, **42**, 1419, (1920).
- [6] W. H. Rodesbush, *Trans. Far. Soc.*, **30**, 778, (1934).
- [7] L. Pauling, *The nature of the chemical bond*, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, (1939).
- [8] L. Pauling, *J. Chem. Soc.*, **57**, 2680, (1935).
- [9] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 235, (1951).
- [10] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 737, (1953).
- [11] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 262, (1951).
- [12] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 272, (1951).
- [13] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 282, (1951).
- [14] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 256, (1951).
- [15] N. Kobko, J. J. Dannenberg, *J. Phys. Chem.*, **107**, 10389, (2003).
- [16] G. R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.*, **35**, 565, (2002).
- [17] R. Konrat, M. Tollinger, G. Kontaxis, B. Kräutler, *Monatsh. Chem.*, **130**, 961, (1999).
- [18] G. Brancaleoni, M. R. Lourenzoni, L. Degreève, *Genet. Mol. Res*, **5(2)**, 350, (2006).
- [19] W. F. van Gunsterem, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi, in *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, Biomos, Groningen, (1996).
- [20] W. W. Wakarchuk, R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi, M. Yaguchi, *Protein Science*, **3**, 467, (1994).
- [21] K. Gruber, G. Klintschar, M. Hayn, A. Schlacher, W. Steiner, C. Kratky, *Biochemistry*, **37**, 13475, (1998).
- [24] M. T. Murakami, R. K. Arni, D. S. Vieira, L. Degreève, R. Ruller, R. J. Ward, *FEBS Lett*, **579**, 6505, (2005).
- [25] Wing L. Sung *et al.*, Modification of xylanase to improve thermophilicity, alkophilicity and thermostability, National Research Council of Canada, Patent number: 5866408, (1998).

Xilanases XBC e XTL na presença do substrato

7.1 Di-xilopirranose em solução aquosa

A di-xilopirranose (DIX), molécula formada por dois resíduos de β -D-xilopirranose, foi usada na simulação com as xilanases para a investigação das interações enzima-substrato. Porém, antes da sua utilização no estudo do complexo enzima-substrato, tal açúcar deve ser simulado em solução aquosa com o intuito de elucidar o seu comportamento e estabilidade de modo a fornecer um padrão de comparação ao seu comportamento quando este se encontrar nos domínios da região catalítica da enzima.

7.1.1 Resultados e discussão

A estrutura inicial da DIX foi obtida do banco de dados de proteínas [1] código 1BCX.pdb. O código referido contém a estrutura do complexo xilanase (mutante da XBC)+DIX em solução aquosa, resolvida por raios-X. Essa estrutura da DIX foi usada como ponto de partida da simulação. O RMSD, figura 7.1, foi calculado usando como referência os átomos de carbono dos anéis. A figura 7.1 mostra claramente duas regiões distintas, que denotam duas conformações diferentes devidas a uma rotação em torno da ligação β -1,4 (ligação entre os dois resíduos de xilopirranose). A rotação ocorre algumas vezes durante o primeiro 1ns, porém voltando à mesma configuração inicial, figura 7.2.a, até que, por volta de 2.5ns, a estrutura se estabiliza na configuração da figura 7.2.b. A rotação que resulta nesta mudança conformacional vai de cerca de 2.15 até 2.4ns, figura 7.1. Na segunda metade da simulação, a estrutura do açúcar permaneceu na nova conformação até o final, sendo que algumas rotações não completas foram

observadas nessa etapa. Uma pequena diminuição, de cerca de 0.01nm, do raio de giração, figura 7.3, é observada. Isto se deve a uma compressão, em aproximadamente 9°, do ângulo entre os carbonos 1 e 4, mostrados na figura 7.2, como consequência da rotação livre da ligação.

Nenhuma LH_{intra} foi detectada ao longo da simulação. Nenhum fator estabilizante, que favoreça a conformação mais compactada foi detectado, provavelmente a rotação da ligação $\beta-1,4$ deve acontecer periodicamente, visto que esta pode rotacionar livremente. O tempo simulado pode não ter sido suficiente para detectar outra rotação completa da ligação. A tensão angular entre os átomos 1 e 4 é de aproximadamente 1kcal.mol^{-1} , um pouco maior que a energia térmica, permitindo assim uma rotação livre em torno da ligação $\beta-1,4$.

Figura 7.1: RMSD calculado para os átomos de carbono da DIX.

Figura 7.2: Diferentes conformações geradas pela rotação da ligação β -1,4.

Figura 7.3: Raio de giração da DIX em função do tempo.

7.1.2 Conclusões

A simulação da DIX em solução aquosa é importante no sentido de servir como um modelo de comparação quando esta se encontrar no ambiente catalítico da xilanase. No sítio catalítico, a rotação deve ser improvável devido à presença de resíduos carregados e polares, como por exemplo, as tirosinas comentadas no capítulo 6, que são potenciais formadores de LH com os grupos hidroxilas da DIX. Tal fato deve ser confirmado e explicado pelo estudo do sistema completo (xilanase+DIX), da qual se pretende caracterizar o papel dos resíduos de tirosina na captação e fixação do substrato no sítio catalítico.

7.2 Xilanases na presença de substrato

7.2.1 Sistema XBC+DIX — Resultados e discussões

A figura 7.4 apresenta duas visões da estrutura do complexo XBC+DIX.

A estabilidade das estruturas geradas nas simulações é avaliada também pelo RMSD, calculado para os átomos da cadeia principal. O RMSD da XBC e os RMSD's por resíduo são apresentados nas figuras 7.5 e 7.6, respectivamente. Os valores médios dos RMSD's e seus respectivos desvios padrões são: $0.122 \pm 0.014 \text{ nm}$ (25°C), $0.128 \pm 0.012 \text{ nm}$ (45°C), $0.142 \pm 0.021 \text{ nm}$ (55°C) e $0.150 \pm 0.017 \text{ nm}$ (65°C). Estes valores podem ser comparados com aqueles obtidos para a XBC na ausência de substrato observando-se que a proteína encontra-se mais estável na presença de substrato do que quando este estava ausente. Analisando localmente as mudanças estruturais, conclui-se que as regiões que são caracteristicamente travadas, ou de maior movimentação na ausência do substrato, também o são na presença de substrato, porém com algumas diferenças. O domínio *polegar*, domínio de maior movimentação da proteína na ausência do substrato tem sua movimentação reduzida pela presença do mesmo.

A movimentação de parte do domínio *dedos*, as voltas- β , é maior na presença do substrato. O domínio *palma* é igualmente rígido em ambos os casos.

Figura 7.4: Diferentes visões da xilanase XBC na presença do substrato DIX.

Figura 7.5: RMSD da XBC, na presença de DIX, em função do tempo.

A redução da movimentação do domínio *polegar* pode ser visualizada claramente pelo monitoramento da distância “abre-fecha” discutida no capítulo 4, onde se definiu a movimentação “abre-fecha” como sendo a movimentação de parte dos domínios *polegar* e *dedos*, identificada pela distância entre os centros de massas destes domínios. Mostrou-se que a 55°C, temperatura ótima, a estrutura alcançava sua maior abertura. A figura 7.7 apresenta a $D_{\text{abre-fecha}}$ à 55°C para a xilanase XBC na presença e na ausência de substrato. Pode-se observar da figura 7.7 que a presença do substrato DIX é um fator que restringe consideravelmente a movimentação “abre-fecha” da proteína.

Figura 7.6: RMSD por resíduo da XBC, na presença de DIX.

Figura 7.7: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XBC à 55°C na presença e ausência de DIX.

As LH_{inter} proteína-DIX foram computadas: elas são listadas na tabela 7.1. Os átomos de oxigênio e os átomos de hidrogênio, envolvidos em LH_{inter} proteína-DIX, são identificados na figura 7.8.

Todas as hidroxilas do substrato DIX são envolvidas em LH_{inter} proteína-DIX. Os átomos de oxigênio O52 e O5 não participam de nenhuma LH. Dos resíduos listados na tabela 7.1, apenas o Gln7, Asn35 e Pro116 não fazem parte dos resíduos considerados com importantes cataliticamente pela literatura [2]. O resíduo de Pro116 está localizado na ponta do domínio *polegar*, enquanto que os resíduos Gln7 e Asn35 estão no domínio *dedos*, figura 7.9. Pela localização destes resíduos e pela alta ocorrência das LH_{inter} proteína-DIX formadas principalmente pela Asn35 e Pro116, pode-se dizer que estes resíduos influenciam na manutenção de uma estrutura mais fechada na presença de substrato.

Tabela 7.1: Fr, em %, das LH entre a XBC e o substrato DIX. Os átomos de oxigênio e hidrogênio do substrato DIX, entre parêntesis, estão identificados na figura 7.8. Os resíduos assinalados com * são aqueles considerados catalicamente importantes pela literatura.

LH	25°C(%)	45°C(%)	55°C(%)	65°C(%)
<i>Gln7-DIX(O2)</i>	21.8	19.3	25.2	-
<i>Gln7-DIX(O3)</i>	51.5	71.7	38.5	11.9
<i>Asn35-DIX(O12)</i>	73.3	78.5	78.9	77.2
<i>Trp71-DIX(O42)*</i>	73.0	62.3	40.0	-
<i>Arg112-DIX(O22)*</i>	78.2	71.9	72.0	70.0
<i>Arg112-DIX(O12)*</i>	24.8	12.1	11.9	10.4
<i>Tyr69-DIX(H2)*</i>	99.0	99.3	99.0	99.3
<i>Tyr166-DIX(H3)*</i>	99.0	53.0	51.9	50.3
<i>Glu78-DIX(H22)*</i>	99.0	99.3	99.0	97.0
<i>Glu172-DIX(H12)*</i>	62.0	55.4	50.0	37.8
<i>Pro116-DIX(O4)</i>	99.0	98.5	98.0	79.3

Figura 7.8: Identificação dos átomos de hidrogênio e oxigênio do substrato DIX.

Figura 7.9: Resíduos Asn35 e Gln7 em azul e Pro116 em vermelho.

Os resíduos de importância catalítica que realizam LH_{inter} proteína-DIX com ocorrência de até 99% são: Arg112, Tyr69, Tyr166, Glu78 e Glu172.

A Arg112 está localizada muito próxima ao resíduo Pro116, no topo do domínio *polegar*. Como foi visto no capítulo 6, a Arg112 não forma LH SS nem ponte salina com nenhum outro resíduo vizinho, portanto a sua importância como resíduo catalítico se deve às LH_{inter} proteína-DIX estáveis que resíduo é capaz de formar. Devido à presença de uma carga líquida positiva na cadeia lateral da Arg, tal resíduo tem uma maior capacidade de interação com o substrato do que os resíduos Gln7, Asn35 e Pro116. Assim sendo, o resíduo Arg112 deve ter um papel importante também na manutenção da estrutura fechada da enzima durante o processo enzimático de hidrólise da xilana.

Os resíduos Glu78 e 172, e Tyr69 e 166, formam LH_{inter} proteína-DIX com as duas extremidades da molécula do substrato neste caso, pois simulou-se um complexo de xilanase com um trecho de apenas 2 resíduos de xilopiranosose(DIX). As LH_{inter} proteína-DIX destes resíduos são as mais fortes detectadas, presentes com alta ocorrência em todas as temperaturas. As Tyr's se ligam fortemente aos hidrogênios H2 e H3 enquanto que os Glu's se ligam com a mesma intensidade

aos hidrogênios H22 e H12. Estas LH mantêm a estrutura do DIX estável e presa ao ambiente do sítio ativo.

Mostrou-se aqui, que, das Tyr's apontadas pela literatura [2] como importantes cataliticamente, somente as Tyr69 e Tyr166 estão diretamente envolvidas com o substrato. As demais tirosinas formam LH BB e SS importantes para manutenção da estrutura secundária e tridimensional do sítio ativo.

Investigando as moléculas de água na região do cleft, na temperatura ótima, detectou-se que os átomos de oxigênio do grupo carboxilato da Glu78 estão sempre fortemente solvatados por moléculas de água: os tempos de residência vão de 32 a 54% do tempo total enquanto que as energias das LH correspondentes apresentam energias médias de -10.3 até -5.2kcal.mol⁻¹. São três as águas de solvatação: a primeira solvata um dos átomos de oxigênio durante 54% do tempo (energia -9.0kcal.mol⁻¹) e para o outro tem-se 38% (-10.3 kcal.mol⁻¹), para a segunda água tem-se 52% (-10.7kcal.mol⁻¹) e 32% (-5.2kcal.mol⁻¹) enquanto que a terceira molécula de água solvata somente o segundo oxigênio com 37% (-6.3 kcal/mol).

Figura 7.10: Os resíduos Glu78 e Glu172 estão representados em vermelho, a Arg112 em azul e a Tyr69 em verde.

De fato, os dois átomos de oxigênio do grupo carboxilato da Glu78 estão solvatados permanentemente por moléculas de água. Estas águas de solvatação são compartilhadas pelas camadas de solvatação dos resíduos Glu172, Arg112 e Tyr69, figura 7.10. Nenhuma outra molécula de água foi detectada na região do cleft com tempo de residência superior a 5%.

Como comentado anteriormente, os resíduos Glu78 e 172 e Tyr69 e 166 formam LH_{inter} proteína-DIX com as duas extremidades da molécula do substrato. Destes resíduos apenas a Tyr166 não participa de LH com as duas moléculas de água detectadas, ou seja, os resíduos Glu78, Glu172 e Tyr69 são de fundamental importância para a catálise enzimática, pois são diretamente envolvidos na fixação do substrato e de moléculas de água que devem ser necessárias para a hidrólise.

Dois mecanismos para a hidrólise envolvendo xilanases da família 11 estão atualmente propostos [9]. Em ambos os casos, há necessidade da presença de uma molécula de água nas proximidades do resíduo Glu78 na XBC. O posicionamento dessa molécula de água, como obtido por simulação, está claramente dando suporte a estes mecanismos. Porém informações mais completas sobre o mecanismo de ação da xilanase XBC se fazem necessárias. Essas informações podem ser obtidas via técnicas de mecânica quântica, QM/MM.

O RMSD da DIX está apresentado na figura 7.11. Pode-se concluir da figura 7.11 que não há rotação em torno da ligação β -1,4, como ocorreu para o DIX livre em solução aquosa. Este comportamento é observado em todas as temperaturas como consequência das freqüentes LH_{inter} proteína-DIX. Enquanto que a molécula de DIX livre em solução aquosa alcançou um RMSD de aproximadamente 0.14nm, no ambiente catalítico a molécula se estabiliza por volta de 0.08nm.

Figura 7.11: RMSD da DIX, no ambiente do sítio ativo, em função do tempo.

7.2.2 Sistema XTL+ DIX — Resultados e discussão

Os RMSD's do XTL, em função do tempo e por resíduos, foram computados em diferentes temperaturas. Eles são apresentados nas figuras 7.12 e 7.13, respectivamente. Os seus valores médios são $0.10 \pm 0.01 \text{ nm}$ (25°C), $0.11 \pm 0.012 \text{ nm}$ (45°C), $0.17 \pm 0.03 \text{ nm}$ (55°C) e $0.16 \pm 0.02 \text{ nm}$ (70°C). Comparando estes valores com os obtidos na ausência de substrato ($0.13 \pm 0.02 \text{ nm}$ a 25°C , $0.17 \pm 0.03 \text{ nm}$ a 45°C , $0.19 \pm 0.04 \text{ nm}$ a 55°C e $0.17 \pm 0.03 \text{ nm}$ a 70°C), observa-se que na presença do mesmo os valores médios do RMSD são menores indicando que a estrutura da enzima é mais estabilidade na presença do substrato. O mesmo ocorreu no caso da XBC. A 55°C , o tempo de simulação é mais longo, devido à maior movimentação da região N-terminal. Não se encontrou ainda explicação para este comportamento anormal a 55°C . Deve-se lembrar que a estrutura de partida de

cada simulação é a última estrutura obtida na temperatura anterior. No caso da simulação a 25°C, a estrutura de partida foi a estrutura experimental [1].

Da figura 7.13 observa-se que o domínio *polegar* e *palma* continuam sendo os domínios mais flexíveis e rígidos, respectivamente, da proteína. Os principais pontos de flexibilidades do domínio *dedos* se devem aos resíduos de Gly presentes nas regiões que conectam as fitas- β . Na XTL, diferentemente do observado na ausência de substrato, a presença do substrato gera uma estabilidade ao domínio *polegar* nas temperaturas inferiores à temperatura ótima, 70°C. Na temperatura ótima, o domínio *polegar* apresenta os maiores desvios. De uma maneira geral, tanto na XBC quanto na XTL, a presença do substrato não altera as características de cada domínio/região, mas confere maior estabilidade para o domínio *polegar*, o que pode ser visto claramente pelas distâncias $D_{abre-fecha}$ monitoradas na condição onde se observou maior abertura da estrutura, isto é a 45°C.

Figura 7.12: RMSD da XTL, na presença de DIX, em função do tempo.

Figura 7.13: RMSD por resíduo da XTL, na presença de DIX.

Figura 7.14: $D_{\text{abre-fecha}}(t)$ para a xilanase XTL à 45°C na presença e ausência de DIX.

A figura 7.14 apresenta a $D_{\text{abre-fecha}}$ à 45°C para a xilanase XTL na presença e na ausência de substrato. Pode-se observar que, assim como ocorreu para a XBC, a presença do substrato DIX é um fator que restringe consideravelmente a movimentação “abre-fecha” da proteína.

A estabilidade adicional alcançada por enzimas na presença do seu substrato tem sido discutida em muitos trabalhos [4-8], principalmente em relação à cristalização de proteínas, onde a presença do substrato, em alguns casos, é considerada fundamental para o sucesso da cristalização e determinação da estrutura tridimensional [4-8].

As energias de interação intermolecular proteína-DIX calculadas para os sistemas XBC+DIX e XTL+DIX em cada temperatura são ambos iguais a $\cong -85.0 \pm 4.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para ambas xilanases. Este dado demonstra que a afinidade pelo substrato é a mesma para as duas xilanases, visto que as posições e naturezas dos resíduos de importância catalítica são conservadas neste par mesofílico-termofílico de xilanases [2-3]. Em condições iguais, abaixo das temperaturas ótimas, as atividades de ambas as enzimas são idênticas o que implica também que as energias de ativação são iguais. Convém lembrar que as seqüências primárias dos centros ativos são diferentes para a maioria dos resíduos.

As LH_{inter} proteína-DIX computadas são listadas na tabela 7.2. Os átomos de oxigênio e hidrogênio envolvidos em LH_{inter} proteína-DIX são identificados na figura 7.8.

Os resíduos que formam LH_{inter} proteína-DIX com elevadas Fr são: Glu7, Arg122, Tyr77, Tyr172, Glu86 e Glu178. Comparando com a XBC, observa-se que estes resíduos estão localizados nas mesmas posições dos resíduos Gln7, Arg112, Tyr69, Tyr166, Glu78 e Glu172 da XBC. Rigorosamente, os resíduos Glu7(XTL) e Gln7(XBC) não se encontram exatamente na mesma posição devido ao fato da XTL apresentar uma região N-terminal diferente tanto em natureza quanto em extensão, porém ambos estão na primeira fita- β do domínio *dedos*. A cadeia lateral do resíduo Glu7 é carregada negativamente de modo que as interações intermoleculares proteína-DIX são mais atrativas que as do Gln7 da XBC. No capítulo 6, destacaram-se 14 resíduos da XTL que apresentavam energias médias das LH_{inter} (com as águas) mais atrativas que $-9.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ sem

correspondentes na XBC. Entre estes 14 resíduos, encontra-se o Glu7. Da tabela 7.2, pode-se ver que, em função da temperatura, o resíduo Glu7 forma LH_{inter} proteína-DIX com Fr de no mínimo 84%, ou seja, ele praticamente desfaz suas LH_{inter} com as águas para formar LH estáveis com o substrato.

Tabela 7.2: Fr, em %, das LH entre a XTL e o substrato DIX. Os átomos de oxigênio e hidrogênio do substrato DIX, entre parêntesis, são identificados na figura 7.8. A nomenclatura OE1 e OE2 é usada para diferenciar os dois oxigênios do grupo carboxila dos resíduos Glu7 e 86.

LH	25°C(%)	45°C(%)	55°C(%)	70°C(%)
<i>Glu7(OE1)-DIX(H4)</i>	98.3	99.2	90.6	84.1
<i>Glu7(OE2)-DIX(H3)</i>	99.0	97.5	97.0	97.2
<i>Asn44-DIX(O12)</i>	38.7	27.0	-	-
<i>Arg122-DIX(O22)</i>	69.8	60.0	52.3	42.6
<i>Arg122-DIX(O12)</i>	30.0	21.4	14.1	-
<i>Tyr77-DIX(H2)</i>	99.8	99.2	99.0	99.3
<i>Tyr172-DIX(H3)</i>	99.0	99.5	82.7	63.0
<i>Glu86(OE1)-DIX(H32)</i>	81.0	82.0	71.9	58.1
<i>Glu86(OE2)-DIX(H32)</i>	53.3	52.0	50.6	50.0
<i>Glu178-DIX(H22)</i>	58.0	60.3	55.5	47.3

Os demais resíduos Arg122, Tyr77, Tyr172, Glu86 e Glu178 apresentam Fr das LH_{inter} com o substrato semelhantes aos dos seus análogos da XBC. Estas informações explicam grande parte da semelhança das energias totais das interações intermoleculares XBC–DIX e XTL–DIX.

Pode-se completar estas informações com a identificação das moléculas de água que se encontram na região do cleft, assim como foi feito para a XBC. Detecta-se uma configuração muito semelhante àquela obtida para a XBC, ver figura 7.15. No caso da XTL, como mostra a figura 7.15, também foi encontrado moléculas de água com consideráveis tempos de residência. São duas moléculas sendo que a primeira solvata um dos oxigênios do grupo carboxilato durante 43% do tempo (energia média -8.9kcal.mol⁻¹) e o segundo oxigênio durante 37% do tempo (-10.3kcal.mol⁻¹). Para a segunda água estes números são de 36%

(-6.3kcal.mol⁻¹) e 45% (-10.5kcal.mol⁻¹). Porém nenhuma dessas duas moléculas de água está próxima do resíduo Glu178, de fato estão nas proximidades dos resíduos Glu86 e Arg122. Outras moléculas de água estão presentes no cleft da XTL, assim como na XBC, mas com tempos de residência menores que 5%.

Figura 7.15: Resíduos Glu86 e Glu178, em vermelho, Arg122 em azul e Tyr77 em verde, o substrato em laranja e as distâncias interatômicas em Å. As moléculas de água mostradas apresentam tempo de residência de aproximadamente 40% do tempo total de simulação da XTL a 70°C, nessa configuração.

A presença de uma molécula de água estabilizada nas proximidades dos resíduos Glu78(XBC) e Glu86(XTL) é mais uma grande semelhança entre as xilanases XBC e XTL. Nos mecanismos propostos para a hidrólise da ligação β -1,4 da DIX, estes resíduos atuam como nucleófilos [3], uma vez que todos os mecanismos propostos requerem que os resíduos Glu78(XBC) e Glu86(XTL) não sejam protonados. No caso das xilanases da família 11, o mecanismo mais citado é aquele pelo qual o resíduo de ação nucleofílica promove a dissociação de uma molécula de água nos seus íons OH⁻ e H⁺. A figura 7.16 apresenta um esquema desse mecanismo de hidrólise pelas xilanases XBC e XTL. A molécula de água estabilizada nas proximidades dos resíduos Glu78 da XBC e Glu86 da XTL é considerada como funcional.

Figura 7.16: Mecanismo de hidrólise nos quais os resíduos Glu78/Glu86 são responsáveis pelo ataque nucleofílico.

No mecanismo apresentando na figura 7.16, o ataque nucleofílico é realizado pelo resíduo Glu78 na XBC ou Glu86 na XTL, porém outro mecanismo tem sido proposto para estas enzimas, neste caso o ataque nucleofílico é realizado pela molécula de água que não necessita ser dissociada em OH^- e H^+ , os pares de elétrons livres do oxigênio na molécula de água conferem à molécula de água uma capacidade nucleófila [9,10], figura 7.17.

De uma forma geral, de acordo com a literatura [9-11], as xilanases da família 11 exibem principalmente um mecanismo de ação onde o ataque nucleofílico ocorre pelo resíduo Glu ou Asp desprotonado, com subsequente estabilização do íon oxocarbenium, como estado de transição, por interações eletrostáticas com o mesmo resíduo de Glu ou Asp desprotonado. Os resíduos

Glu ou Asp protonados são sempre responsáveis pela função catalisadora ácido-base em ambos os casos.

Com os dados de simulação aqui apresentados, não é possível indicar um mecanismo preferencial para estas xilanases, pois se tem acesso apenas à etapa inicial do mecanismo, que é a identificação das moléculas de água no sítio ativo. Pode-se afirmar que as LH_{inter} proteína-DIX juntamente com a identificação de moléculas de água presentes no sítio ativo nas proximidades dos resíduos Glu78 na XBC e Glu86 na XTL denotam uma configuração característica de um ambiente catalítico. Tem-se estabilidade enzimática local (rigidez da região do cleft), estabilidade e especificidade ao substrato (interações intermoleculares, LH) e a presença de moléculas de água com alto grau de estabilidade na região.

Figura 7.17: Mecanismo de hidrólise na qual a molécula de água promove o ataque nucleofílico sem dissociação.

7.2.3 Conclusões

De uma maneira geral, tanto na XBC quanto na XTL, a presença do substrato não altera as características dos domínios ou regiões, mas confere estabilidade ao domínio *polegar*. Pela investigação das interações intermoleculares proteína-substrato, constatou-se que há uma grande similaridade entre o par mesofílico-termofílico de xilanases. Alguns resíduos apontados, por estudos de difração de raios-X, como importantes cataliticamente não formaram LH_{inter} proteína-DIX. Os resíduos detectados como importantes para formação de LH_{inter} proteína-DIX são conservados e são da mesma natureza nas duas xilanases, são eles: Glu7, Arg122, Tyr77, Tyr172, Glu86 e Glu178 na XTL e Gln7, Arg112, Tyr69, Tyr166, Glu78 e Glu172 na XBC. Devido às freqüentes LH que estes resíduos formam com o substrato, pode-se afirmar que eles são os grandes responsáveis pela fixação do substrato no sítio ativo e consequentemente para manter o substrato numa posição favorável para que a hidrólise ocorra. Moléculas de água com elevado tempo de residência foram detectadas na região do cleft. Duas destas moléculas de água são localizadas nas proximidades dos grupos carboxilatos dos resíduos catalíticos Glu78 na XBC e Glu86 na XTL por LH com energia da ordem de -10Kcal.mol^{-1} . Estas duas moléculas de água solvatam alternadamente os dois átomos de oxigênio dos carboxilatos. Tais moléculas de água são provavelmente preferenciais para participarem da hidrólise, visto que os mecanismos, propostos experimentalmente, apontam como primeiro passo a quebra da molécula de água como consequência do ataque do nucleofílico ou a molécula de água promovendo ataque nucleofílico sem que ocorra a dissociação. A presença de águas tão fortemente ligadas aos resíduos catalíticos de ação nucleofílica fornece suporte aos mecanismos de hidrólise enzimática propostos para essa classe de enzimas.

Referências

- [1] www.rscb.org/pdb
- [2] W. W. Wakarchuk, R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi, M. Yaguchi, *Protein Science*, **3**, 467, (1994).
- [3] K. Gruber, G. Klintschar, M. Hayn, A. Schlacher, W. Steiner, C. Kratky, *Biochemistry*, **37**, 13475, (1998).
- [4] C. Hising-Mao, A. H. J. Wang, *Proteins*, **66**, 996, (2007).
- [5] J. Zuegg, K. Gruber, M. Gugganig, U.G. Wagner, C. Kratky, *Protein Science*, **8**, 1990, (1990).
- [6] M. A. OLIVEIRA, B. G. GUIMARAES, J. R. R. CUSSIOL, F. J. MEDRANO, F. C. GOZZO, L. E. S. NETTO, *J. Mol. Biol.*, **359(2)**, 433, (2006).
- [7] J. F. Sorensen, O. Sibbesen, *PEDS*, **19(5)**, 205, (2006).
- [8] L. L. Leggio, S. Kalogiannis, K. Eckert, S. C. Teixeira, M. K. Bhat, C. Andrei, R. W. Pickersgill, S. Larsen, *FEBS Lett*, **509(2)**, 303, (2001).
- [9] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, *FEMS Microbiol. Reviews*, **23**, 411, (1999).
- [10] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.*, **90**, 1171, (1990).
- [11] D. Tull, S. G. Withers, N. R. Gilkes, D. G. Kilburn, R. Antony, J. Warren, R. Aerbersold, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1561, (1991).

Conclusões gerais

A termoestabilidade das xilanases estudadas tem sua base molecular fundamentada em dois pontos:

- (i) na rigidez de grande parte da estrutura protéica em particular do centro ativo;
- (ii) na alta solvatação da superfície;

A rigidez é uma consequência das redes de interações intra e intermoleculares atrativas. As interações intramoleculares ocorrem em maior número e com maior frequência na XTL que na XBC. Quanto à solvatação, a XTL apresenta 14 resíduos carregados, sem correspondentes na XBC, cujas cadeias laterais formam LH intermoleculares com energias altamente atrativas.

O domínio *dedos* abriga as mais importantes diferenças entre estas xilanases, diferenças que contribuem para explicar as diferentes termoestabilidades. Assim sendo, pode-se dizer que o domínio *dedos*, nesta classe de enzimas, é a região que deve ser a preferida como alvo de mutações nas tentativas de promoção do aumento da termoestabilidade destas proteínas.

As características dos resíduos das regiões catalíticas são semelhantes, proporcionando aos sítios ativos estruturas semelhantes e consequentemente interações com o substrato também muito semelhantes. Isso resulta em atividades e energias de ativação similares. Outra consequência, é que as moléculas de água presentes no sítio ativo se posicionam também em configurações semelhantes em posições próximas aos resíduos de ação nucleofílica que são ativos na hidrólise da ligação β -1,4. Estes resultados corroboram os mecanismos de ação propostos para estas enzimas.