Gustavo Avelar Molina

Caracterização biofísica da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Ribeirão Preto

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Molina, Gustavo Avelar
Caracterização biofísica da dinâmica catalítica de uma xilanase
GH11. Ribeirão Preto, 2016.
205 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Ward, Richard John.

1. Xilanase GH11. 2. Catálise enzimática. 3. Dinâmica
molecular. 4. Biofísica.

Nome: MOLINA, Gustavo Avelar

Título: Caracterização biofísica da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À Humanidade.

Combinação da radiação de raios-X, óptica e infravermelha dos restos da Supernova de Kepler.

NASA/ESA/JHU/R.Sankrit & W.Blair

“Science is much more than a body of knowledge. It is a way of thinking. This is central to its success. Science invites us to let the facts in, even when they don’t conform to our preconceptions. It counsels us to carry alternative hypotheses in our heads and see which ones best match the facts. It urges on us a fine balance between no-holds-barred openness to new ideas, however heretical, and the most rigorous skeptical scrutiny of everything — new ideas and established wisdom. We need wide appreciation of this kind of thinking. It works. It’s an essential tool for a democracy in an age of change. Our task is not just to train more scientists but also to deepen public understanding of science.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Nós, humanos, como parte integral da Natureza e sujeitos e controlados pelas mesmas Leis Físicas que governam a mesma, somos inexorável e inevitavelmente conectados uns aos outros, assim como a todas as outras formas de vida que compõem o Planeta de maneira simbiótica e interdependente. Não importa o quanto nos esforcemos para negar essa realidade: Ou nós nos adaptamos, ou nós sofremos. A nossa falha em compreender esse simples fato tem, gradualmente, nos aproximado do fracasso máximo e absoluto como espécie. Os sintomas dessa iminente terra devastada se manifestam hoje em diversas escalas na forma de conflitos geopolíticos, guerras, crises econômicas, problemas sociais, e a devastação incessável e sistemática do meio ambiente, dos recursos naturais e dos ecossistemas que nos possibilitam viver satisfatoriamente. Isso sem contar o crescente índice de doenças físicas e mentais em nível de saúde pública causadas por certos padrões culturais e sociais cada vez mais disseminados no mundo globalizado.

Pelos motivos descritos acima, se faz necessário compreender e admitir que o meu trabalho, assim como o de qualquer outra pessoa, é produto não apenas de meu esforço pessoal e das instituições que financiaram o meu projeto, mas também, e principalmente, da Humanidade, através de seu esforço coletivo combinado e iterativo na realização de trabalho e produção de técnicas e conhecimentos cada vez mais refinados, no intuito de nos aproximar da Verdade e de elevar nosso padrão de vida. Por exemplo, meu trabalho jamais poderia ter sido realizado sem o esforço anterior de milhares de cientistas através do globo e das décadas, que fundamentaram as bases teóricas e técnicas dos procedimentos experimentais empregados nessa pesquisa, assim como de equipamentos de laboratório que foram construídos graças a muitas “pequenas” descobertas distantes no tempo e no espaço. Esse raciocínio pode ser expandido ao ponto de se compreender a relevância desde dos trabalhadores que extraem, refinam e distribuem as matérias fundamentais que compõem as partes eletrônicas de equipamentos de laboratório ou de uso pessoal, até dos funcionários de limpeza que nos permitem trabalhar num ambiente apropriado e agradável. Se continuarmos considerando cada contribuição infinitesimal das pessoas envolvidas em tudo aquilo com que interagimos e recebemos do meio externo às nossas mentes, veremos que a Humanidade é, na verdade, um organismo, e que nós fazemos parte dele, quer queiramos, quer não.

Assim sendo, eu primeiramente agradeço e dedico este trabalho à **Humanidade**, da qual eu absolutamente dependo, e a qual se sacrifica diariamente para permitir os avanços aqui descritos. É a Humanidade que deve deter a propriedade desse trabalho e de seus produtos,

assim como o produto material e intelectual de todo e qualquer esforço humano e os recursos naturais e produtivos deveriam ser propriedade comum à Humanidade, ao invés de ficarem retidos nas mãos de poucos grupos e indivíduos que detêm o poder de produzir e distribuir as riquezas ao seu bel-prazer, insensíveis aos prejuízos que isso causa às nossas vidas e ao nosso desenvolvimento.

Sou grato ao professor **Richard John Ward**, que conheço desde 2010, ano em que ingressei na graduação. No final desse ano, o professor Richard me deu uma oportunidade e me admitiu como aluno de estágio em seu laboratório, onde comecei a trabalhar no início do ano posterior. Essa oportunidade basicamente direcionou meus interesses, minha linha de pesquisa, e teve o papel majoritário na construção de meu conhecimento científico e desenvolvimento profissional até o presente momento. Meu estágio evoluiu para uma iniciação científica no final de 2011, e no início de 2014 iniciei meu projeto de mestrado, também sob orientação do professor Richard. Mas, não apenas suas oportunidades foram relevantes. Ele também forneceu importantes ideias para a proposição dos projetos, assim como também acompanhou o seu desenvolvimento com grande interesse – o que foi fundamental para o êxito de minha pesquisa nesse período. Pode parecer algo irrelevante, mas a simples escolha do professor Richard me aceitar como seu aluno lá em 2010 foi um evento fundamental que determinou grande parte de quem eu sou profissionalmente hoje.

Agradeço ao nosso técnico de laboratório **André Justino**, que está lá desde o início de meu trabalho, e que conheço desde o começo do meu curso de Bacharelado em Química, das aulas de Química Experimental. O André sempre esteve lá nos auxiliando com sua camaradagem, servindo de referência técnica para variadas questões e solucionando diversos problemas que não conseguiríamos solucionar sozinhos, ou que não conseguiríamos de uma maneira tão eficiente.

Eu agradeço aos antigos alunos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBBP), a começar pela **Raquel Fonseca Maldonado**, que no início de meu estágio foi quem mais se dispôs a me ensinar os procedimentos de Biologia Molecular, com grande calma e didática, sem nunca duvidar de meu potencial, mesmo quando eu cometia algum erro. Além disso, ela também foi quem mais contribuiu com ideias e soluções na primeira metade de minha iniciação científica.

Eu agradeço ao **Lucas Ferreira Ribeiro**, que sempre contribuiu com ideias e soluções para o meu projeto de iniciação científica, principalmente na segunda metade do mesmo, onde ele passou a ser minha principal referência.

Agradeço ao **Gilvan Pessoa Furtado**, que também sempre se mostrou interessado em meu trabalho e contribuiu intelectualmente para os desafios da minha iniciação científica.

Agradeço à **Juliana Sanchez Alponi**, que também contribuiu muito para o meu aprendizado durante a primeira metade de minha iniciação científica e foi muito amigável durante esse tempo.

Agradeço à **Carla Botelho Machado**, que também no início de minha iniciação científica, quando eu estava um pouco deslocado, se preocupava com o meu aprendizado e em me fazer sentir parte do grupo.

Agradeço à nossa ex-técnica de laboratório, **Sthéfani Peria**, que embora tenha saído antes de eu iniciar meu mestrado, por vários anos prestou um serviço essencial com uma eficiência sem precedentes, melhorando consideravelmente nossa produtividade no trabalho.

Agradeço à **Maria Eugênia Guazzaroni**, que com seu vasto conhecimento científico, sabedoria, e humildade, sempre ajudou com prazer a todos do laboratório em diversas questões científicas e do mundo acadêmico.

Das pessoas que estavam lá desde o começo, tem ainda a **Letícia Magalhães Arruda**, que foi embora há menos tempo, e à qual também sou grato. Ela também foi uma das pessoas que mais me ajudaram durante todos esses anos, nas mais diversas questões, sempre disposta e perguntando se estávamos com alguma dúvida ou precisando de alguma coisa, e se esforçando ao máximo para dar dicas e ideias. Ela também sempre se preocupou em me integrar no grupo durante todo esse tempo – o que foi muito importante, dada a minha própria natureza introvertida.

Agradeço aos alunos mais recentes do LBBP – **Lara Aparecida Buffoni de Campos Carneiro**, **Luana de Fátima Alves** e **Matheus Pinto Pinheiro** –, por estarem sempre

extremamente dispostos a ajudar no que fosse necessário, pelas discussões científicas de alto nível e por serem todas ótimas pessoas que mantiveram o equilíbrio do ambiente de trabalho.

Agradeço ao nosso outro técnico de laboratório, o **Leonardo L. Araújo**, cujo trabalho tem salvado nossas vidas durante o último ano.

Também sou muito grato aos alunos de outros laboratórios, a começar pelo **Luis Felipe Mendes** (Laboratório de Biofísica Molecular do Departamento de Física da FFCLRP/USP) que conheço desde a minha iniciação científica e que me ajudou muito, principalmente durante o mestrado. Sua disposição e interesse em ajudar e de se envolver com o meu trabalho, seu grande interesse por questões científicas complexas e de alto nível, e seu senso colaborativo, foram muito construtivos durante esse tempo.

Agradeço ao **Fernando Massayuki Tsutae** (Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do IFSC/USP), que também sempre se dispôs com muito interesse em auxiliar e se envolver na parte de microscopia confocal de fluorescência do meu projeto, mesmo com todas as dificuldades encontradas durante o último ano.

Sou grato ao **Wallance Moreira Pazin** e à **Marina Berardi Barioni** (Laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física da FFCLRP/USP), que me auxiliaram e tiraram minhas dúvidas no que foi necessário para a manipulação do microscópio confocal de fluorescência com resolução temporal.

Devo agradecimentos a vários professores de dentro e de fora do Departamento de Química. Começo pelo professor **Luis Gustavo Dias** (Departamento de Química da FFCLRP/USP), que embora não trabalhemos diretamente, sempre teve um incomparável interesse e disposição em ensinar e ajudar em questões teóricas e computacionais dos diversos âmbitos da Química, até mesmo fora do horário de trabalho e através de redes sociais.

Agradeço ao professor **Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira** (Departamento de Química da FFCLRP/USP), por ser um excelente professor e pesquisador, sempre ajudando quando necessário e interagindo de maneira bastante construtiva com o pessoal de nosso laboratório.

Agradeço ao professor **Amando Siuiti Ito** (Laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física da FFCLRP/USP), que sempre se dispôs a discutir e ajudar em diversas questões sobre espectroscopia e microscopia de fluorescência, além de ceder a infraestrutura de seu laboratório para a realização de importantes experimentos de meu projeto, o que foi essencial para o desenvolvimento do mesmo.

Agradeço ao professor **Antônio José da Costa Filho** (Laboratório de Biofísica Molecular do Departamento de Física da FFCLRP/USP), que foi um dos melhores professores que eu já tive, que sempre interagiu conosco de maneira agradável, e por ceder a infraestrutura de seu laboratório para a realização de importantes experimentos de meu projeto, envolvendo espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.

Agradeço ao professor **Francisco Eduardo Gontijo Guimarães** (Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do IFSC/USP), por ceder seus microscópios confocais de fluorescência com resolução temporal, e por ajudar e acompanhar com grande interesse os nossos experimentos.

Sou grato ao professor **Pietro Cincaglini** (Departamento de Química da FFCLRP/USP), que desde quando eu era aluno de graduação sempre foi muito atencioso e simpático, e se envolveu em diversas questões políticas favoráveis à formação dos alunos e ao desenvolvimento de pesquisa dentro do Departamento de Química e da FFCLRP.

Agradeço ao **Departamento de Química, à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, e à Universidade de São Paulo**, por cederem seu espaço, infraestrutura e serviços básicos para o desenvolvimento da pesquisa, assim como pelos seus ótimos professores e pesquisadores que tanto me ensinaram e auxiliaram durante esse período.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por ser a principal financiadora desse projeto e da infraestrutura e recursos do laboratório, e garantir a renda básica necessária para me manter durante esses dois anos de estudo e trabalho. Essa pesquisa foi financiada através do processo nº 2014/06319-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço aos meus pais, **Devanir Molina** e **Maria Regina Avelar Molina**, que têm me dado suporte contínuo durante todos esses anos. Seu apoio me garantiu muitos benefícios que contribuíram inegavelmente para o meu desempenho e êxito nesse trabalho.

Finalmente, agradeço à **Bruna Marques dos Santos**, minha companheira que tem me dado todo tipo de suporte, desde científico a emocional, desde muito tempo antes de tudo isso começar. Sua presença ao meu lado e dedicação me permitiram viver melhor, organizar minha vida, tomar melhores decisões, evoluir como ser humano, e suportar e solucionar todos os problemas e desafios durante esses anos. Meu êxito é inextricável à sua existência.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	22
LISTA DE EQUAÇÕES	23
LISTA DE ABREVIATURAS	24
1. INTRODUÇÃO	30
1.1. As xilanases da família GH11	31
1.1.1. Visão geral	31
1.1.2. Aplicações biotecnológicas das xilanases GH11	32
1.1.3. Estrutura do domínio catalítico das xilanases GH11	33
1.1.4. Mecanismo catalítico das xilanases GH11	34
1.1.5. Substratos das xilanases GH11	37
1.1.6. Inibição das xilanases GH11 pelos produtos da reação	38
1.2. Espectroscopia e microscopia de fluorescência resolvidas no tempo	39
1.2.1. Espectroscopia de correlação de fluorescência (<i>FCS</i>)	39
1.2.2. Transferência eletrônica fotoinduzida (<i>PET</i>) combinada com <i>FCS</i>	41
1.2.3. Contagem de fóton único correlacionado no tempo (<i>TCSPC</i>)	44
1.2.4. Microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência (<i>FLIM</i>) por <i>TCSPC</i>	45
1.3. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (<i>EPR</i>) aplicada no estudo da dinâmica proteica	46
2. OBJETIVOS	49
2.1. Objetivo geral	50
2.2. Objetivos específicos	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1. Química computacional	53
3.1.1. Planejamento de mutantes simples de cisteína da endo-1,4-beta-xilanase de <i>Bacillus subtilis</i> 168	53
3.1.2. Modelagem molecular de um oligômero de xilose e das sondas <i>Acrylodan</i> , <i>AttoOxa11</i> e <i>MTSSL</i> conjugadas com cisteína	54
3.1.3. Simulação de dinâmica molecular da XynA tipo selvagem por mecânica molecular	55
3.2. Mutagênese sítio-dirigida	56

3.3. Expressão das xilanases tipo selvagem e mutantes	62
3.4. Purificação das xilanases.....	64
3.5. Quantificação das xilanases	67
3.6. Análise de estrutura secundária das xilanases por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) ..	68
3.7. Marcação das xilanases com sondas fluorescentes	69
3.7.1. Marcação da xilanase tipo selvagem no N-terminal com a sonda fluorescente <i>Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester</i>	69
3.7.2. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol <i>Acrylodan</i> ...	71
3.7.3. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol <i>AttoOxa11</i> ..	74
3.8. Marcação das xilanases mutantes com a sonda de spin <i>MTSSL</i>	75
3.9. Ensaio padrão de atividade.....	76
3.10. Atividade relativa das xilanases marcadas e não marcadas.....	77
3.11. Análise da interação das xilanases mutantes marcadas com <i>Acrylodan</i> por espectroscopia de fluorescência	77
3.12. Análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinosilano por <i>FCS</i>	79
3.13. Análise da difusão e interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinosilano por <i>FCS/PET-FCS</i>	82
3.14. Análise da difusão e interação das xilanases mutantes marcadas com <i>AttoOxa11</i> em arabinosilano por <i>FCS/PET-FCS</i>	84
3.15. Produção de filmes de arabinosilano	85
3.16. Análise topológica de filmes de arabinosilano por microscopia confocal de fluorescência....	86
3.17. Imobilização de carboidratos e de fibras de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado	86
3.18. Análise por <i>FLIM</i> da afinidade da XynA-N151C-AttoOxa11 por frações sólidas obtidas no processo de deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar.....	87
3.19. Análise da dinâmica local dos mutantes marcados com <i>MTSSL</i> na presença de substratos e produto da reação por <i>EPR</i>	89
3.20. Caracterização cinética da XynA tipo selvagem a 25 °C	91
3.20.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática.....	91
3.20.2. Termoestabilidade	92
3.20.3. Determinação de parâmetros cinéticos	92
4. RESULTADOS	94
4.1. Química computacional.....	95
4.1.1. Planejamento de mutantes simples de cisteína da endo-1,4-beta-xilanase de <i>Bacillus subtilis</i> 168	95
4.1.2. Modelagem molecular de um oligômero de xilose e das sondas <i>Acrylodan</i> , <i>AttoOxa11</i> e <i>MTSSL</i> conjugadas com cisteína	97
4.1.3. Simulação de dinâmica molecular da XynA por mecânica molecular	98
4.2. Mutagênese sítio-dirigida.....	102

4.3. Expressão das xilanases tipo selvagem e mutantes	105
4.4. Purificação das xilanases.....	107
4.5. Análise de estrutura secundária das xilanases por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	111
4.6. Marcação das xilanases com sondas fluorescentes	114
4.6.1. Marcação da xilanase tipo selvagem no N-terminal com a sonda fluorescente <i>Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester</i>	114
4.6.2. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol <i>Acrylodan</i>	116
4.6.3. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol <i>AttoOxa11</i>	119
4.7. Marcação das xilanases mutantes com a sonda de spin <i>MTSSL</i>	119
4.8. Atividade relativa das xilanases marcadas e não marcadas.....	119
4.9. Análise da interação das xilanases mutantes marcadas com <i>Acrylodan</i> por espectroscopia de fluorescência	124
4.10. Análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinoxilano por <i>FCS</i>	128
4.11. Análise da difusão e interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinoxilano por <i>FCS</i>	132
4.12. Análise da difusão e interação das xilanases mutantes marcadas com <i>AttoOxa11</i> em arabinoxilano por <i>FCS/PET-FCS</i>	133
4.13. Produção de filmes de arabinoxilano	142
4.14. Análise topológica de filmes de arabinoxilano por microscopia confocal de fluorescência..	144
4.15. Análise da afinidade da XynA-N151C-AttoOxa11 por frações sólidas obtidas no processo de deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar por <i>FLIM</i>	146
4.16. Análise da dinâmica local dos mutantes marcados com <i>MTSSL</i> na presença de substratos e produto da reação por <i>EPR</i>	151
4.17. Caracterização cinética da XynA tipo selvagem a 25 °C	158
4.17.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática.....	158
4.17.2. Termoestabilidade	159
4.17.3. Determinação de parâmetros cinéticos	160
5. DISCUSSÃO	162
6. CONCLUSÕES	170
7. DIREÇÕES FUTURAS	173
7.1. Simulação de dinâmica molecular da interação xilanase-xilano e efeito das sondas	174
7.2. Estudo da difusão da XynA em filmes de arabinoxilano e em frações de bagaço de cana-de-açúcar por <i>FRAP</i>	174
7.3. Estudo da dinâmica catalítica da XynA por <i>PET-FCS</i>	174
7.4. Estudo da dinâmica catalítica da XynA por <i>SPT</i>	175
7.5. Medida da largura da fenda catalítica da XynA nos estados ligado e livre por <i>EPR</i>	175
REFERÊNCIAS	176
APÊNDICES	187

RESUMO

MOLINA, G. A. **Caracterização biofísica da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11**. 2016. 204 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A dinâmica estrutural fundamentando a função das xilanases GH11 ainda não está clara. Novo conhecimento sobre a dinâmica catalítica dessas enzimas é crucial para a engenharia de novas enzimas melhoradas – beneficiando, assim, diversas indústrias biotecnológicas e de química verde. Com base nesse fato, esse trabalho teve por objetivo obter novas informações acerca da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11, através do uso de um conjunto de diversas técnicas avançadas de biofísica molecular em nível *bulk* e em nível de molécula única (inglês *single molecule* ou *sm*). Para isso, foram projetadas xilanases GH11 de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 168 (XynA) com mutações únicas de cisteína para a marcação dos resíduos D119 e R122 no domínio polegar, do resíduo N54 no domínio dedos, e do resíduo N151 na alfa-hélice, seguidas pela sua construção e produção por métodos de biologia molecular. Esses mutantes foram marcados em seus respectivos grupos tióis com a sonda fluorescente sensível à polaridade *Acrylodan*, com a sonda de spin *MTSSL*, e com a sonda fluorescente fotoestável *AttoOxa11*. A xilanase tipo selvagem foi marcada em seu N-terminal com a sonda fotoestável *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester*. Foram utilizados ensaios de espectrofotometria de fluorescência em nível *bulk* e de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica para investigar como a dinâmica do domínio polegar da xilanase GH11, temperatura, e ligação ao substrato se correlacionam um com o outro. Os resultados atestaram que um estado do domínio polegar controlado por temperatura, aberto, dinâmico e flexível tem mais chances de se ligar efetivamente ao substrato de uma maneira produtiva, o que está em completo acordo com estudos anteriores de simulação de dinâmica molecular, cristalografia, desnaturação térmica, e análise funcional por desenho racional de mutantes de domínio polegar de xilanases GH11. Com base nas evidências adquiridas e em estudos anteriores, nós propomos um conjunto de hipóteses e modelos para a dinâmica catalítica da xilanase, focando no papel do domínio polegar nesse processo. No intuito de determinar a constante de afinidade da xilanase por seu substrato e os tempos de relaxamento e constantes de velocidade dos movimentos do domínio polegar, foram feitas medidas de espectroscopia de correlação de fluorescência simples e

combinada com transferência eletrônica fotoinduzida, usando as xilanases marcadas com as sondas fluorescentes fotoestáveis, na presença e na ausência de substrato. Os resultados mostraram tempos de difusão muito maiores para as xilanases na presença de substrato, como efeito da afinidade da enzima pelo mesmo. Entretanto, não foi verificada nenhuma curva de decaimento como efeito de supressão dinâmica da sonda por *PET*. Esses mesmos conjugados foram aplicados com sucesso em microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência, no intuito de analisar sistematicamente a afinidade da xilanase por partículas insolúveis e filmes de substrato, e por fragmentos insolúveis de frações de processos de deslignificação e desestruturação de bagaço de cana-de-açúcar, assim como para a análise da composição, estrutura e topologia desses materiais. Foi possível verificar a presença de xilano na maioria das frações desse bagaço tratado, mas em quantidades variáveis.

Palavras-chave: Xilanase GH11. Catálise enzimática. Dinâmica molecular. Biofísica.

ABSTRACT

MOLINA, G. A. **Biophysical characterization of the catalytic dynamics of a GH11 xylanase**. 2016. 204 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The structural dynamics underlying the function of GH11 xylanases is still unclear. New insights into the catalytic dynamics of these enzymes are crucial for engineering novel improved enzymes – benefiting biotechnological and green chemistry industries. The objective of this work was to obtain new information concerning the catalytic dynamics of a GH11 xylanase, by using a combination of advanced molecular biophysics techniques, both at the bulk level and at the single molecule level (sm). Mutant GH11 xylanases from *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 168 (XynA) were designed with single point cysteine mutations for labeling the residues D119 and R122 on the thumb domain, N54 on the fingers domain, and N151 on the alpha helix, followed by their construction and production by molecular biology methods. These mutants were labeled at their respective thiol groups by the polarity sensitive fluorescent probe *Acrylodan*, by the electron spin probe *MTSSL*, and by the photostable fluorescent probe *AttoOxa11*. The wild-type xylanase was labeled at its N-terminus by the photostable fluorescent probe *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester*. Bulk fluorescence spectrophotometry and electron paramagnetic resonance assays were used to investigate how the thumb domain dynamics of the GH11 xylanase, temperature and substrate binding were correlated. These results demonstrated that a temperature controlled, open, dynamical and flexible thumb domain state is more likely to effectively bind the substrate in a productive way, which is in complete agreement with previous studies from molecular dynamics simulations, crystallography, thermal denaturation, and function analysis by the rational design of thumb mutants for GH11 xylanases. Based on this evidence and previous studies, we proposed a hypothesis for the xylanase catalytic dynamics, focusing on the role of the thumb domain. In order to determine the xylanase affinity constant for its substrate and the relaxation times and rate constants of the thumb domain movements, fluorescence correlation spectroscopy measurements were performed. Both simple and combined measurements with photoinduced electron transfer were performed, using the xylanases labeled with photostable fluorescent probes, in the presence and absence of substrate. The results have shown longer diffusion times for the xylanases in the

presence of substrate, as an effect of the enzyme affinity for it. However, it was not verified any decay curve as an effect of the dynamic suppression of the probe *via* PET. The same conjugates were successfully applied to fluorescence-lifetime imaging microscopy, aiming to systematically analyze the affinity for xylanase of substrates in the form of insoluble particles and films, and for water insoluble fractions from sugarcane bagasse delignification processes. In addition, the composition, structure and topology of these materials was examined. It was possible to verify the presence of xylan in most fractions of this treated bagasse, although in variable quantities.

Keywords: GH11 xylanase. Enzyme catalysis. Molecular dynamics. Biophysics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A estrutura do xilano e as enzimas xilanolíticas envolvidas em sua degradação	31
Figura 2: Representação em cartoon da Endo-1,4-beta-xilanase de <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> 168..	33
Figura 3: Mecanismo catalítico das xilanases GH11	34
Figura 4: Subsítios de ligação das xilanases GH11	36
Figura 5: Desenho esquemático de um sistema de <i>FCS</i>	40
Figura 6: Princípio da <i>FCS</i>	41
Figura 7: Esquema de orbitais moleculares para a transferência eletrônica fotoinduzida	42
Figura 8: Princípio da medida de dinâmica proteica usando <i>PET-FCS</i>	43
Figura 9: Princípio da <i>TCSPC</i>	44
Figura 10: Representação intuitiva do conceito de microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência	46
Figura 11: Variações na forma da linha espectral	47
Figura 12: Princípios da medida do espectro de emissão de fluorescência do <i>Acrylodan</i>	79
Figura 13: Estrutura tridimensional teórica da XynA-D119C destacando as distâncias dos principais supressores de <i>PET</i> em relação a um resíduo de cisteína na posição 119 da proteína	82
Figura 14: Princípios da <i>PET</i> utilizando a sonda fluorescente <i>AttoOxa11</i> e a cadeia lateral do triptofano como supressora	83
Figura 15: Comparação entre a função de autocorrelação esperada para a difusão simples de uma proteína, e para a difusão combinada com a dinâmica de supressão de, por exemplo, <i>AttoOxa11</i> pelo triptofano	83
Figura 16: Esquema do sistema de <i>EPR</i> para uma XynA marcada no domínio polegar com a sonda de spin <i>MTSSL</i>	91
Figura 17: Estrutura tridimensional dos mutantes de XynA D119C (A), R122C (B), N151C (C) e N54C (D)	95
Figura 18: Estrutura tridimensional otimizada no vácuo de um oligômero de xilose (A), do conjugado <i>AttoOxa11</i> -cisteína (B), do conjugado <i>Acrylodan</i> -cisteína (C), e do conjugado <i>MTSSL</i> -cisteína (D)	96
Figura 19: Principais parâmetros de minimização de energia e equilíbrio do sistema de XynA solvatada e neutralizada em função do tempo de minimização/equilíbrio	98
Figura 20: Parâmetros de estabilidade do sistema durante a simulação de dinâmica molecular da XynA	99
Figura 21: <i>RMSF</i> por resíduo da XynA considerando todo o tempo de simulação	100
Figura 22: Estrutura média da XynA a 20 °C e em pH 6.0 com 100 mM de NaCl	100
Figura 23: Géis de agarose nativo 1.0% dos produtos das reações de mutagênese sítio-dirigida digeridos com <i>DpnI</i> e purificados com kit	101
Figura 24: Gel de agarose nativo 1.0% das PCRs das colônias transformadas com os produtos das PCRs mutagênicas	102
Figura 25: DO_{600} da cultura induzida para expressão da xilanase tipo selvagem (A) e mutante D119C (B) em função do tempo de expressão em horas	104
Figura 26: A, <i>SDS-PAGE</i> em gel de poliacrilamida 12.5% para a expressão da xilanase tipo selvagem em função do tempo de indução; B, <i>SDS-PAGE</i> em gel de poliacrilamida 15% para a expressão da xilanase mutante D119C em função do tempo de indução	105
Figura 27: A, <i>SDS-PAGE</i> em gel de poliacrilamida 14.0% para (A) as principais etapas de purificação em resina de níquel de <i>Sepharose</i> e (B) para a eluição da proteína tipo selvagem	106
Figura 28: Concentração de XynA tipo selvagem eluída em $mg \cdot mL^{-1}$ em função do número da alíquota coletada	107
Figura 29: Cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da xilanase tipo selvagem (23 kDa), da anidrase carbônica (29 kDa) e do <i>Blue Dextran</i> (2000 kDa) em uma coluna <i>Superdex 75</i> em um sistema de purificação de proteínas <i>ÄKTA</i>	108
Figura 30: A, <i>SDS-PAGE</i> em gel de poliacrilamida 15.0% para (A) as principais etapas de purificação em resina de níquel de <i>Sepharose</i> e (B) para a eluição da proteína mutante D119C	109

Figura 31: Concentração de proteína mutante D119C eluída em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em função do número da alíquota coletada	110
Figura 32: SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15.0% para as principais etapas de purificação das proteínas mutantes XynA-N54C (A), XynA-R122C (B), e XynA-N151C (C) em resina de níquel de Sepharose	110
Figura 33: Espectros de CD suavizados de 190 a 250 nm das proteínas purificadas	111
Figura 34: Espectros de CD de 190 a 240 nm ajustados com o programa DichroWeb	112
Figura 35: Cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da XynA-N-AF488 (23 kDa) em uma coluna Superdex 75	114
Figura 36: Espectros de absorção molecular e de emissão de fluorescência sobrepostos do conjugado xilanase-N-AF488 e das correspondentes moléculas individuais	115
Figura 37: Gel de PAGE nativo modificado de diferentes proteínas, marcadas e não marcadas	116
Figura 38: Cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da xilanase mutante D119C-Acrylodan (23 kDa) em uma coluna Superdex 75	117
Figura 39: Atividades relativas para a XynA tipo selvagem e o mutante XynA-D119C marcado e não marcado em diferentes passos de purificação	119
Figura 40: Atividades relativas da xilanase mutante D119C marcada e não marcada, em diferentes etapas de purificação	120
Figura 41: Atividades relativas para o mutante XynA-N54C marcado e não marcado	121
Figura 42: Atividades relativas para o mutante XynA-D119C marcado e não marcado	121
Figura 43: Atividades relativas para o mutante XynA-R122C marcado e não marcado	122
Figura 44: Atividades relativas para o mutante XynA-N151C marcado e não marcado	122
Figura 45: Espectros de emissão de fluorescência corrigidos da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C	123
Figura 46: Espectros de emissão de fluorescência médios corrigidos da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinosilano em % (m/v) a 55 °C	124
Figura 47: Gráfico da variação do comprimento de onda de emissão máxima (nm) em função da concentração de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C (A) e a 55 °C (B)	125
Figura 48: Gráfico da variação da intensidade de emissão máxima (UA) em função da concentração de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C (A) e a 55 °C (B)	125
Figura 49: Gráfico da variação da anisotropia de fluorescência em função da concentração de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C (A) e a 55 °C (B)	126
Figura 50: Curvas de autocorrelação do fluoróforo livre em tampão e em 1.0% de arabinosilano (m/v), pH 6.0 e 19 °C	127
Figura 51: Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 (Xilanase na legenda) e do fluoróforo livre em tampão, pH 6.0 e 19 °C	128
Figura 52: Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 em tampão e em 1.0% de arabinosilano (m/v), pH 6.0 e 19 °C	129
Figura 53: Sobreposição das curvas de autocorrelação ajustadas das figuras 50 à 52	130
Figura 54: Curvas de autocorrelação de fluorescência para a XynA-D119C-AttoOxa11 (XynA na legenda) e o Atto655-carboxy em arabinosilano	131
Figura 55: Calibração do volume confocal através do ajuste da curva de autocorrelação de fluorescência com um modelo de difusão pura de uma espécie	133
Figura 56: Curvas de autocorrelação de fluorescência da XynA-N151C-AttoOxa11 em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C)	134
Figura 57: Curvas de autocorrelação de fluorescência do Atto655-carboxy com 0.5% de arabinosilano (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C)	135
Figura 58: Curvas de autocorrelação de fluorescência do Atto655-carboxy com 1.0% de arabinosilano (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C)	136
Figura 59: Curvas de autocorrelação de fluorescência de soluções 0.5% (A) e 1.0% (B) de arabinosilano de trigo (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C)	137
Figura 60: Curvas de autocorrelação de fluorescência do Atto655-carboxy em uma solução 12.5% de glicerol (m/v) contendo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C) ..	139
Figura 61: Curva de autocorrelação de fluorescência da XynA-N54C-AttoOxa11 em solução 12.5% de glicerol (m/v) contendo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C) ..	140

Figura 62: Filme de arabinoxilano	141
Figura 63: Filme de arabinoxilano tratado com uma gota de água em seu centro	142
Figura 65: Imagem de um filme de xilano excitado com um laser de 405 nm e seu respectivo espectro de emissão de fluorescência, obtidos em um sistema de microscopia confocal de fluorescência ZEISS LSM 780	143
Figura 66: Imagem de um filme de xilano excitado com um laser de 488 nm e seu respectivo espectro de emissão de fluorescência, obtidos em um sistema de microscopia confocal de fluorescência ZEISS LSM 780	143
Figura 67: Imagem tridimensional de um filme de xilano umedecido com uma solução de XynA-N-AF488 excitado com um laser de 488 nm	144
Figura 68: Imagens de FLIM com resolução normal usando XynA-N151C-AttoOxa11	146
Figura 69: Imagens de FLIM com resolução normal usando XynA-N151C-AttoOxa11	147
Figura 70: Imagens de FLIM com ampliação usando XynA-N151C-AttoOxa11	148
Figura 71: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada à ponta do domínio polegar da XynA (XynA-D119C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) e a 45 °C	151
Figura 72: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada à ponta do domínio polegar da XynA (XynA-D119C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C)	152
Figura 73: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada aos quatro mutantes da XynA em tampão a temperatura ambiente	153
Figura 74: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada ao domínio dedos da XynA (XynA-N54C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (A) e a 45 °C (B)	154
Figura 75: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada à alfa-hélice da XynA (XynA-N151C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (A) e a 45 °C (B)	154
Figura 76: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada ao domínio polegar da XynA (XynA-R122C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (A) e a 45 °C (B)	155
Figura 77: Espectros de EPR experimentais para a sonda de spin MTSSL conjugada a três diferentes domínios da XynA em tampão a temperatura ambiente e a 45 °C	156
Figura 78: Gráfico da atividade relativa da xilanase tipo selvagem a 55 °C (%) versus pH do meio reacional	157
Figura 79: Gráfico da atividade relativa da xilanase tipo selvagem (%) versus tempo de incubação da proteína a 25°C (min)	158
Figura 80: Gráfico da velocidade inicial ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$) de hidrólise do xilano de madeira de faia por 0.1 pmol de xilanase tipo selvagem versus concentração do substrato ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	159
Figura 81: Representação de Hanes-Woolf para a hidrólise do xilano de madeira de faia por 0.1 pmol de xilanase tipo selvagem	160
Figura 82: A, hipótese para o deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ do <i>Acrylodan</i> localizado na ponta do polegar da xilanase GH11	165
Figura 83: O ciclo catalítico da xilanase GH11 (modelo de dobradiça) e o efeito da temperatura	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes da PCR de colônia	57
Tabela 2: Programa da PCR de colônia em termociclador	57
Tabela 3: Quantidades dos componentes da reação de sequenciamento	58
Tabela 4: Programa da PCR para reação de sequenciamento de DNA em termociclador	58
Tabela 5: Primers oligonucleotídicos, seus tamanhos, T_M s teóricos e sequências	59
Tabela 6: Programa da mutagênese sítio-dirigida em termociclador	59
Tabela 7: Componentes da digestão com <i>DpnI</i> para os mutantes	60
Tabela 8: Componentes da PCR de colônia para todos os mutantes	61
Tabela 9: Programa da PCR de colônia em termociclador para todos os mutantes	61
Tabela 10: Quantidades dos componentes da reação de sequenciamento para todos os mutantes	62
Tabela 11: Principais resultados do <i>SWISS-MODEL</i> para as proteínas tipo selvagem e mutantes	95
Tabela 12: Mutações encontradas para cada colônia testada das PCRs mutagênicas transformadas	103
Tabela 13: Estruturas secundárias calculadas pelo <i>DichroWeb</i> de acordo com os dados de <i>CD</i> para todas as proteínas não marcadas	113
Tabela 14: Parâmetros de emissão de fluorescência da xilanase mutante D119C marcada com <i>Acrylodan</i> na presença e ausência de arabinoxilano em duas temperaturas diferentes	126
Tabela 15: Brilhos de fluorescência e tempos de vida da XynA-N151C-AttoOxa11 ligada em diversos substratos e bagaço de cana deslignificado	149

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Absorção corrigida da proteína marcada	70
Equação 2: Grau de marcação de uma proteína	71
Equação 3: Determinação do fator de correção F	78
Equação 4: Determinação da fluorescência corrigida	78
Equação 5: Determinação da anisotropia	79
Equação 6: Equação de Stokes-Einstein	80
Equação 7: Relação entre coeficiente de difusão e tempo de difusão	80
Equação 8: Determinação do raio hidrodinâmico de uma proteína	81
Equação 9: Determinação do raio hidrodinâmico de uma proteína utilizando o <i>Alexa Fluor® 488 carboxy</i> como referência	81
Equação 10: Determinação da constante de dissociação do complexo enzima substrato por <i>FCS</i>	81
Equação 11: Determinação do raio hidrodinâmico de uma proteína utilizando o <i>AttoOxal1-carboxy</i> como referência	85
Equação 12: Determinação da viscosidade de um meio	85
Equação 13: Determinação da afinidade da XynA por substratos complexos	88

LISTA DE ABREVIATURAS

α_i	parâmetro de anomalia para a <i>i</i> ésima espécie difusora
ADNS	ácido 3,5-dinitrosalisílico
AF488	<i>Alexa Fluor® 488</i>
A_i	amplitude do tempo de vida <i>i</i>
APD	fotodiodo de avalanche (<i>avalanche photodiode</i>)
A_{obj}	área do objeto
Å	Angstrom (10^{-10} m)
BGCS	Centro de Estoque Genético de <i>Bacillus</i> (<i>Bacillus Genetic Stock Center</i>)
BSA	albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism</i>)
<C>	concentração média de moléculas fluorescentes no volume confocal
D_i	coeficiente de difusão da espécie <i>i</i>
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO ₆₀₀	densidade óptica a 600 nanômetros
DOL	grau de marcação (<i>degree of labeling</i>)
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>enzyme commission</i> (classificação bioquímica das enzimas)
EPR	ressonância paramagnética eletrônica (<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)
FCS	espectroscopia de correlação de fluorescência (<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>)
fL	femtolitro (10^{-15} L)
fs	femtosegundo
FLIM	microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência (<i>Fluorescence Life-Time Imaging Microscopy</i>)
FLCS	espectroscopia de correlação de tempo de vida de fluorescência (<i>Fluorescence Life-Time Correlation Spectroscopy</i>)
FPLC	cromatografia líquida rápida de proteína (<i>Fast Protein liquid chromatography</i>)
FRAP	recuperação de fluorescência após fotobranqueamento (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>)

FRET	transferência de energia de ressonância de Förster (<i>Förster resonance energy transfer</i>)
G	Gauss
GH11	família 11 das glicosil hidrolases (<i>glycoside hydrolase family 11</i>)
HDM	<i>heavy density medium</i>
Hz	hertz
IMAC	cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
J	Joule
κ	parâmetro estrutural, z_0/w_0
K	Kelvin
kb	quilobase (10^3 pb)
k_{cat}	constante de velocidade catalítica ou número de <i>turnover</i>
K_d	constante de dissociação de um complexo
kDa	quilodalton
kg	quilograma
kHz	quilo-hertz
kJ	quilojoule
λ	comprimento de onda
LB	<i>lysogeny broth</i>
LD	diodo de laser (<i>Laser Diode</i>)
LED	diodo emissor de luz (<i>Light Emitting Diode</i>)
LSM	microscopia de varredura por laser (<i>Laser Scanning Microscopy</i>)
M	molar
MCP	placa de microcanal (<i>micro-channel plate</i>)
MHz	mega-hertz (10^6 Hz)
μg	micrograma (10^{-6} g)
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
μs	microsegundos
μW	microwatt
mg	miligrama (10^{-3} g)
mL	mililitro

mm	milímetro
mM	milimolar
mPa	milipascal
ms	milissegundos
mV	milivolts
mW	miliwatt
min	minuto
MTSSL	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate
Ni	níquel (Ni^{2+})
nm	nanômetro (10^{-9} m)
nM	nanomolar
NMR	ressonância magnética nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)
nW	nanowatt
<N>	número médio de moléculas fluorescentes no volume confocal
OP	intensidade óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico
Pa	Pascal
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PET	transferência de elétrons fotoinduzida (<i>photoinduced electron transfer</i>)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PMT	fotomultiplicadora (<i>photomultiplier</i> ou <i>photomultiplier tube</i>)
RMSD	desvio da raiz quadrática média (<i>root-mean-square deviation</i>)
RMSF	flutuação da raiz quadrática média (<i>root-mean-square fluctuation</i>)
ROI	região de interesse (<i>region of interest</i>)
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
sm	molécula única (<i>single-molecule</i>)
SPT	rastreamento de partícula única (<i>Single Particle Tracking</i>)
τ_{amp}	média aritmética do tempo de vida da amplitude
τ_i	tempo de difusão da espécie i
τ_{int}	média aritmética do tempo de vida da intensidade

$\tau_{T,i}$	tempo de vida dos estados escuros (triplete)
t	tempo (nanossegundos, ns; microssegundos, μ s; milissegundos, ms; segundos, s; minutos, min; horas, h)
$T_{1/2}$	tempo de meia vida
TCEP	<i>tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>
T_i	fração de moléculas escuras (triplete)
TCSPC	contagem de fóton único correlacionado no tempo (<i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>)
T_m	temperatura de fusão ou temperatura de desnaturação de 50% das moléculas
UV	ultravioleta
V_{Eff}	volume efetivo (do volume confocal do laser)
W	Watt
w_0	raio lateral do tipo $1/e^2$
χ^2	chi quadrado, parâmetro de otimização no ajuste dos mínimos quadrados
XynA	endo-1,4-beta-xilanase de <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> 168 (BGSC 1A1 código 168)
z_0	raio axial do tipo $1/e^2$

NOMENCLANTURA, CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DOS 20 AMINOÁCIDOS ENCONTRADOS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Não polares

Glicina
Gly
G

Alanina
Ala
A

Valina
Val
V

Leucina
Leu
L

Metionina
Met
M

Isoleucina
Ile
I

Aromáticos

Fenilalanina
Phe
F

Tirosina
Tyr
Y

Triptofano
Trp
W

Polares não carregados

Serina

Ser

S

Treonina

Thr

T

Cisteína

Cys

C

Glutamina

Gln

Q

Prolina

Pro

P

Asparagina

Asn

N

Positivamente carregados

Histidina

His

H

Lisina

Lys

K

Arginina

Arg

R

Negativamente carregados

Aspartato

Asp

D

Glutamato

Glu

E

Introdução

1.1. As xilanases da família GH11

1.1.1. Visão geral

As endo-1,4-beta-xilanases (nome sistemático 1,4- β -D-xilano xilanohidrolase, EC 3.2.1.8) são endoglicosídeos que catalisam a hidrólise do xilano, a hemicelulose mais abundante na natureza (TÖRRÖNEN; ROUVINEN, 1997) e que corresponde a um terço de todo o carbono orgânico renovável disponível na Terra (PRADE, 1996). Uma vez que são membros das O-glicosil hidrolases (EC 3.2.1.x), elas são capazes de hidrolisar a ligação β -1,4-xilosídica que une dois resíduos de D-xilopiranosil (ver **figura 1**), levando à formação de um açúcar hemiacetal e sua aglicona livre correspondente (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). De acordo com o banco de dados de enzimas *ExplorEnz*, a reação catalisada pelas endo-1,4-beta-xilanases é definida como “endoidrólise de ligações (1,4)-beta-D-xilosídicas em xilanos”.

Figura 1: A estrutura do xilano e as enzimas xilanolíticas envolvidas em sua degradação (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Embora a hidrólise de xilano por microrganismos tenha sido descrita desde o final do século XIX, o primeiro artigo publicado acerca da hidrólise enzimática do xilano por uma

xilanase é de 1955 (WHISTLER; MASAK JR.), o qual descreve a hidrólise do xilano de um sabugo de milho à xilobiose por uma preparação enzimática de *Aspergillus foetidus* (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). Em 1961, as xilanases foram reconhecidas pela União de Bioquímica e Biologia Molecular (*IUBMB*), lhes atribuindo o código de enzima *EC* 3.2.1.8 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Mas, foi só em 1983 que ocorreu a primeira publicação sobre a clonagem molecular de uma xilanase de *Bacillus subtilis* (linhagem que se pretende estudar neste projeto), bem como o isolamento e caracterização desta enzima (BERNIER JR. et al.).

1.1.2. Aplicações biotecnológicas das xilanases GH11

As xilanases GH11 possuem importantes papéis em muitos processos biotecnológicos de alimentos baseados em cereais e alimentação animal. O interesse por xilanases microbianas tem aumentado nas últimas décadas para muitas aplicações: biotecnologia de fibras e alimentos, na produção de pães e cerveja, a separação do glúten do amido e estoques de ração animal; aplicações em não alimentos, principalmente na indústria de fibra e papel, e um crescente interesse na produção de biocombustíveis que requerem tais catalisadores (BEG et al., 2001; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999a; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; POLIZELI et al., 2005; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As aplicações potenciais das xilanases incluem: bioconversão de material lignocelulósico e agroresíduos em produtos fermentáveis, a clarificação de sucos, o melhoramento da consistência da cerveja e a digestibilidade de insumos animais. Uma das mais importantes aplicações biotecnológicas da xilanase é o seu uso no branqueamento de polpa de papel. Xilanases também podem ser aplicadas na produção de raíom, celofane e muitos outros compostos, como ésteres de celulose (acetatos, nitratos, propionatos e butiratos) e éteres de celulose (carboximetil celulose e metil e etil celulose), que são todos produtos da dissolução da polpa e purificação de fibras para outros carboidratos (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Outros exemplos de aplicações recentes das xilanases são: degradação de subprodutos do café (MURTHY; NAIDU, 2010), biobranqueamento da polpa de cachos de frutos sem óleo de palma (MARTÍN-SAMPEDRO et al., 2012), processos têxteis (BATTAN et al., 2012) e alimentação de frangos (AHMAD et al., 2013).

1.1.3. Estrutura do domínio catalítico das xilanases GH11

O sítio catalítico das xilanases GH11 apresenta uma arquitetura de β -jelly-roll, composta de duas folhas- β antiparalelas denominadas A e B esculpindo uma fenda longa e profunda. Muitas ligações de hidrogênio entre as fitas- β estabilizam a estrutura. A folha- β A é quase planar, enquanto a folha- β B é parcialmente torcida sobre si mesma, formando um ângulo perpendicular. Uma única α -hélice está empacotada sob a folha- β B. O ponto notável na arquitetura dessas xilanases é a conservação total do domínio β -jelly-roll, como é evidenciado pelos baixos valores de *RMSD* entre todas as xilanases GH11 e pela observação de todas as suas estruturas sobrepostas. Mais de 60% dos resíduos estão incorporados nos numerosos elementos de estrutura secundária, e as dobras que as conectam são curtas, exceto por aquelas que conectam as fitas- β B6-B9 (o “cordão”, de 10 resíduos) e B8-B7 (uma alça de 12 resíduos). As folhas- β A e B mimetizam os dedos e a palma de uma mão direita parcialmente fechada, enquanto a dobra B8-B7 é chamada de “polegar” (ver **figura 2**). Algumas variações dessa arquitetura padrão existem. Mas, o importante é que esse dobramento de β -jelly-roll torna as xilanases GH11 proteínas globulares densas em que o raio de rotação é próximo de 1.7 Å. De modo geral, a análise estrutural dos membros da família GH11 demonstra que as suas arquiteturas, topologias e resíduos da fenda catalítica são amplamente conservados (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Figura 2: Representação em cartoon da Endo-1,4-beta-xilanase de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 168 (PDB ID: 1XXN).

1.1.4. Mecanismo catalítico das xilanases GH11

Os resíduos catalíticos das xilanases GH11 são dois ácidos glutâmicos incorporados na fenda catalítica, envolvidos em um mecanismo catalítico de duplo deslocamento e a existência de um intermediário covalente glicosil-enzima (ver **figura 3**). Na primeira etapa (glicosilação), o resíduo chamado ácido/base atua como um ácido e protona o substrato, enquanto o outro resíduo catalítico, agindo como um nucleófilo, provoca a liberação do grupo de saída e a formação de um intermediário enzima α -glicosil depois da passagem através de um estado de transição do tipo oxocarbênio-íon (carbocátion positivamente carregado que é estabilizado por ressonância, formado após a “ionização” formal de uma ligação glicosídica). Na segunda etapa (deglicosilação), o resíduo ácido/base atua como uma base comum, retirando um próton de uma molécula de água que pode então atacar o carbono anomérico do intermediário enzima α -glicosil (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Figura 3: Mecanismo catalítico das xilanases GH11 (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

O resíduo nucleofílico Glu76 (numeração da xilanase GH11 de *Thermobacillus xylanilyticus*) é rodeado por três resíduos altamente conservados (Tyr67, Tyr78, Tyr124) que podem estabelecer ligações de hidrogênio com Glu76. O papel do resíduo Tyr67 parece ser crucial, uma vez que a sua posição é mantida por outros dois outros resíduos e a sua substituição resulta em uma xilanase completamente inativa. Além disso, uma ligação de hidrogênio de amida aromática entre Trp69 e Ile116 provavelmente ajuda na estabilidade e manutenção da conformação precisa do sítio ativo. O ambiente polar ajuda a manter o pK_a de Glu76 em 4.6 na xilanase GH11 de *Bacillus circulans* e supostamente mantém o estado de ionização. Já o ambiente do resíduo ácido/base é menos conservado, de modo que este pode ser observado em dois estados conformacionais distintos, dependendo se há alteração no pH e ligação do substrato (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Além do sítio ativo, as xilanases GH11 também apresentam alguns subsítios de ligação como outras GHs endoativas (ver **figura 4**). Subsítios são definidos como regiões contíguas da enzima constituídas por resíduos que interagem de uma maneira não covalente com as unidades monoméricas do substrato, para facilitar o reconhecimento estrutural e eletrostático. A afinidade do subsítio é supostamente independente de suas vizinhanças e a soma das energias de interação com os açúcares representa a energia de interação global entre o subsítio e o substrato. As energias de interação do subsítio podem ser obtidas experimentalmente a partir de medidas de eficiência catalítica e frequência de clivagem de ligação. Existem diferentes tipos de interações (ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, forças hidrofóbicas), mas as forças determinantes são as ligações de hidrogênio entre grupos polares e as interações de empilhamento entre os anéis de açúcar e os resíduos aromáticos. Na fenda catalítica das GHs, os subsítios são nomeados (+1), (+2), ... na direção da extremidade redutora (aglicona), (-1), (-2), ... na direção da extremidade não redutora (glicona), com a hidrólise da ligação glicosídica ocorrendo entre os sítios (-1) e (+1). Os resultados experimentais indicam que a maioria das xilanases GH11 possui 5 subsítios de (-2) a (+3), onde os subsítios não redutores são cruciais para a ligação do substrato e orientação correta. Uma consequência da presença desses sítios é que a afinidade das xilanases GH11 por xilo-oligossacarídeos tende a aumentar quanto maior o número de unidades de xilose na cadeia. Mutações nos resíduos do subsítio (+3) da xilanase de *Bacillus subtilis* comprometem a especificidade ao substrato e atividade enzimática (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Figura 4: Subsítios de ligação das xilanases GH11 (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Medidas de relaxação de *NMR* na xilanase GH11 de *Bacillus circulans* demonstraram que o esqueleto das xilanases GH11 são altamente ordenados na escala de tempo de pico até nanossegundos e pequenas modificações acontecem após a formação do intermediário glicosil enzima. É provável que existam movimentos globais das xilanases GH11 na estrutura *jelly-roll*. A largura da fenda na sua região mais estreita diminui com a ligação do substrato, de modo que toda a dobra do polegar torna-se mais próxima ao lado oposto da fenda. O aumento da flexibilidade do polegar por mutações pontuais pode aumentar a eficiência catalítica (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Propõe-se que a enzima deva existir sob três estados conformacionais diferentes que seguem o movimento catalítico. Primeiramente, a conformação constrangida B (onde o ligante pode ancorar na enzima), então a conformação fechada C (a fenda se fecha parcialmente quando o polegar torna-se próximo da fita- β B2, a catálise pode ocorrer), e finalmente a conformação solta L (os produtos são liberados). O ciclo catalítico completo deve ser $B \rightarrow C \rightarrow L \rightarrow B \dots$ (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Simulações de dinâmica molecular indicam que o aumento da temperatura acarreta em mudanças conformacionais no polegar, de modo que a temperatura ótima de atividade enzimática seja consequência da exposição máxima da fenda do sítio catalítico devido a essa mudança conformacional dependente de temperatura (MURAKAMI et al., 2005). Observa-se também que o movimento de abre e fecha do polegar depende não somente da temperatura, como também da presença de substrato (VIEIRA; DEGRÈVE; WARD, 2009). Além disso, a

alta flexibilidade/mobilidade do domínio polegar parece ser independente de sua conformação inicial aberta ou fechada e a transição da conformação aberta para a fechada realizada pelo domínio polegar é totalmente reversível (VIEIRA; WARD, 2012). A transição entre as duas conformações ocorrem em altas temperaturas e é importantíssima para determinar o acesso ao sítio ativo, e portanto influencia a ligação do substrato e a liberação do produto (VIEIRA; WARD, 2012).

1.1.5. Substratos das xilanases GH11

A parede celular de tecidos lenhosos de plantas superiores, particularmente de madeiras duras (de lei) e madeiras macias (de coníferas), é um composto natural com excelentes propriedades materiais. Essas paredes celulares são formadas de lignocelulose, cujos constituintes principais são celulose (45-55%), hemicelulose (25-35%) e lignina (20-30%), um composto aromático. Depois da celulose, a hemicelulose é a próxima mais abundante família de polissacarídeos, compreendendo cerca de 25-35% da maioria dos materiais vegetais, florestas e resíduos agrícolas. As hemiceluloses são compostas de misturas complexas de xilano, xiloglucano, glucomanan, galactoglucomanan, arabinogalactano ou outros heteropolímeros ramificados complexos. Estes são, por sua vez, constituídos de glicose, xilose, manose, galactose, arabinose, fucose, ácido glicurônico, e ácido galacturônico em várias quantidades ou traços, dependendo da fonte natural. Nas espécies de madeiras de lei, gramíneas e subprodutos agroindustriais (palhas de cereais, bagaço da cana de açúcar, palha de milho, serragem de madeira), a maioria das cadeias de hemicelulose são formadas por unidades monoméricas de D-xilopiranosídeo β -(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas e são chamadas de xilanos, que são os polissacarídeos mais abundantes na natureza depois da celulose, compondo cerca de um terço de todo o carbono orgânico renovável da Terra. As unidades de xilose da cadeia principal β -(1 $\rightarrow$ 4)-ligada podem ser substituídas com grupos O-acetil em O-2 e/ou O-3, ramificada (1 à 3 unidades por ramificação) com resíduos de L-arabnofuranosídeo (arabinoxilanos), ou ácido D-glicurônico (glicuroxilanos), que além disso poderão ser O-acetilados ou O-metilados em C-4 (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Os xilanos possuem uma massa molar relativamente alta de 20 000–30 000, um grau de polimerização de 150–200 (SAHA, 2003), e são principalmente encontrados nas camadas

primárias e secundárias da parede celular de plantas. Os xilanos e as outras hemiceluloses estão intimamente associados com as fibrilas da celulose, que dão rigidez ao tecido vegetal, e com a lignina, que atua como um conduto de água, assim como uma argamassa “repelente” de água e micróbios. Aparentemente, as hemiceluloses atuam nessas matrizes como pontes flexíveis e como revestimentos entre e em volta das fibrilas de celulose (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

1.1.6. Inibição das xilanases GH11 pelos produtos da reação

Nas condições reacionais do ambiente industrial, as xilanases GH11 são capazes de hidrolisar material lignocelulósico até elevadas concentrações de produtos finais, chegando a aproximadamente 90% de xilobiose e 15% de xilose em relação à massa inicial de xilano (ZHANG et al., 2011). Entretanto, tem sido relatado na literatura que as xilanases GH11 sofrem inibição pelos seus principais produtos de reação (BENEDETTI et al., 2013; JOMMUENGBOUT et al., 2009; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999b; LUDWICZEK et al., 2007; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012) – um efeito clássico em enzimologia, normalmente atribuído à similaridade desses produtos com seus respectivos substratos. Essa similaridade frequentemente tem como consequência a capacidade do produto se ligar reversivelmente ao sítio catalítico da enzima, impedindo o acesso dos substratos ao mesmo – dando, então, origem a um tipo de inibição conhecida como competitiva.

Sabe-se que tanto a xilobiose como a xilotriose são capazes de inibir as xilanases GH11 (JOMMUENGBOUT et al., 2009; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012), e mais recentemente tem-se verificado que até mesmo a xilose tem essa capacidade (BENEDETTI et al., 2013; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999a; LUDWICZEK et al., 2007). Isso retarda a capacidade das enzimas degradarem todo o material lignocelulósico até os seus respectivos açúcares fermentescíveis – causando prejuízos, portanto, para a produção de bioetanol de segunda geração. No caso da inibição competitiva – que é o principal tipo de inibição para esse caso –, a enzimologia sugere que contornemos esse obstáculo através do aumento da concentração do substrato, já que isso deslocaria o equilíbrio químico para a formação do complexo enzima-substrato. Entretanto, esses trabalhos afirmam que essa solução não é trivial para o caso dos substratos lignocelulósicos, uma vez que os polímeros são grandes, estão no estado sólido, e são insolúveis em soluções aquosas.

As partículas que compõem os materiais lignocelulósicos, por serem grandes e insolúveis, difundem muito mais lentamente no meio reacional – tendo, portanto, menor probabilidade de colisões efetivas com o sítio catalítico da enzima. Por outro lado, inibidores pequenos e solúveis, como a xilose, difundem muito mais rapidamente no meio, ocupando o sítio catalítico muito mais facilmente e dificultando drasticamente a ligação da enzima ao substrato insolúvel (ANDRIĆ et al., 2010). Frente a esse modo de ação, é crucial para a engenharia de enzimas compreender como a inibição pelos produtos pode ser diminuída.

1.2. Espectroscopia e microscopia de fluorescência resolvidas no tempo

1.2.1. Espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS)

A espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) é uma poderosa técnica para medir concentrações, mobilidades, constantes de equilíbrio e de velocidade para interações e dinâmica interna de biomoléculas fluorescentes. Ela pode ser aplicada para vários sistemas biológicos, tal como soluções homogêneas, células, membranas celulares ou artificiais e organismos inteiros (RIES; SCHWILLE, 2012).

As medidas de FCS são baseadas na análise estatística de flutuações de intensidade, surgindo principalmente a partir de uma quantidade de flutuações em *ensembles* muito pequenos, como por exemplo, por moléculas difundindo através de um volume de detecção subfemtolitrico. A análise de correlação do sinal de fluorescência flutuante permite extrair concentrações locais, coeficientes de difusão translacional ou rotacional, constantes de velocidade de reações, constantes de associação e dissociação, e dinâmica estrutural tanto *in vivo* como *in vitro* (RIES; SCHWILLE, 2012).

O sistema de FCS mais comum usa um microscópio confocal para detectar a fluorescência de moléculas marcadas com sondas fluorescentes que passam através de um minúsculo volume de detecção subfemtolitrico (ver **figura 5**). Esse volume de detecção é criado focalizando um laser para um ponto de difração limitado com uma objetiva de alta abertura numérica, e pelo confinamento da detecção na direção axial com um orifício (o *pinhole*) no caminho da emissão. Para a detecção, fotodiodos altamente sensíveis chamados de “avalanche” (APDs) são usados para detectar a fluorescência como tempos de chegada de fótons individuais

– os dados primários na *FCS*. Embora já contenham todas as informações da dinâmica da molécula individual, estes dados brutos precisam ser submetidos a etapas de processamento até que os parâmetros de interesse (por exemplo, concentrações ou coeficientes de difusão) possam ser determinados (RIES; SCHWILLE, 2012).

Figura 5: Desenho esquemático de um sistema de *FCS* (SCHWILLE; HAUSTEIN, 2001).

Primeiramente, os tempos de chegada dos fótons são usados para calcular a intensidade flutuante. Em seguida, a curva de autocorrelação pode ser calculada (ver **figura 6**). A curva de autocorrelação mede a autosimilaridade do sinal, refletindo a probabilidade do sinal em diferentes tempos ainda pertencer ao mesmo evento molecular. A partir da inspeção da função de autocorrelação, é possível aprender muito sobre a dinâmica das moléculas fluorescentes. Uma determinação quantitativa precisa dos parâmetros de interesse, entretanto, requer o ajuste da curva de autocorrelação experimental por uma função modelo, a função de correlação, que descreve as fontes das flutuações de intensidade. A função de correlação depende dos parâmetros de interesse (parâmetros de ajuste), que são variados durante o processo de ajuste para minimizar a diferença entre a curva de correlação experimental e o modelo em cada tempo τ (RIES; SCHWILLE, 2012).

Figura 6: Princípio da FCS. A, a difusão de moléculas fluorescentes através do volume de detecção de um microscópio confocal gera flutuações de intensidade (B); C, a curva de correlação é calculada conforme a autocorrelação das flutuações da intensidade e mede a autossimilaridade do sinal (RIES; SCHWILLE, 2012).

Exemplos recentes do uso de FCS são: medidas de difusão biomolecular em matriz extracelular condensada por fibroblastos (KIHARA; ITO; MIYAKE, 2013), estudo dos efeitos da forma e tamanho de uma proteína difundindo dentro de um ambiente superlotado (BASAK; CHATTOPADHYAY, 2013), agregação induzida por íon de polieletrólitos conjugados (YANG et al., 2013), heterogeneidade em misturas binárias de dimetilsulfóxido e glicerol (CHATTORAJ et al., 2013), quantificação da difusão de lipídeos (HEINEMANN et al., 2012), monitoramento direto da coalescência durante a preparação de nanopartículas (SCHAEFFEL et al., 2012), difusão de corantes orgânicos em um niosômio imobilizado em uma superfície de vidro (GHOSH et al., 2012), movimentos intrínsecos no domínio N-terminal de um receptor de glutamato ionotrópico (JENSEN et al., 2011) e o dobramento em microssegundos e movimentos de domínio do interruptor estrutural de uma proteína de seda de aranha (SAUER; NEUWEILER, 2014).

1.2.2. Transferência eletrônica fotoinduzida (PET) combinada com FCS

A transferência eletrônica fotoinduzida (ou PET) é um dos três principais mecanismos de supressão (*quenching*) de fluorescência (ver **figura 7**). Nesse mecanismo, ocorre a formação de um complexo entre o doador de elétrons D_P e o aceptor de elétrons A_P , dando origem ao

$D_P^+A_P^-$. Esse complexo de transferência de carga é capaz de retornar ao estado fundamental sem a necessidade de emissão de fóton, embora emissão de *exciplex* pode ser observada em alguns casos. Por fim, o elétron extra no aceitador é devolvido ao doador de elétron (LAKOWICZ, 2006).

Figura 7: Esquema de orbitais moleculares para a transferência eletrônica fotoinduzida (LAKOWICZ, 2006).

Na *PET*, o fluoróforo excitado pode ser tanto o doador de elétrons como o aceitador, e a direção da transferência eletrônica no estado excitado é determinada pelo potencial de oxidação e de redução dos estados fundamental e excitado. Desse modo, os termos “doador” e “aceptor” apenas se referem às espécies que doam ou aceitam um elétron, e não identificam qual espécie está inicialmente no estado excitado (LAKOWICZ, 2006).

Nos casos mais comuns de *PET*, o estado excitado de um fluoróforo atua como um aceitador de elétrons. Entretanto, em muitos casos ocorre transferência eletrônica do fluoróforo excitado para o supressor. De todo modo, a transferência eletrônica é sempre favorável quando o doador é uma espécie rica em elétrons e o aceitador é uma espécie deficiente de elétrons (LAKOWICZ, 2006).

A supressão da fluorescência de sondas extrínsecas pelo aminoácido triptofato (Trp) por *PET* ocorre no contato de van der Waals, sendo capaz de detectar mudanças estruturais em torno de um raio de 1 nm da sonda em biomoléculas. Graças à combinação desse mecanismo com a *FCS*, tem sido detectada a cinética de flutuações estruturais de proteínas no nível de moléculas individuais em escalas de tempo de nanossegundos (ns) a milissegundos (ms) (JENSEN et al., 2011; NEUWEILER; BANACHEWICZ; FERSHT, 2010; NEUWEILER; DOOSE; SAUER, 2005; NEUWEILER; JOHNSON; FERSHT, 2009; RIES et al., 2014; SCHWARZE et al., 2013).

Isso é possível porque a função de autocorrelação na *FCS* é capaz de detectar a cinética de virtualmente qualquer processo que dê origem a uma flutuação da intensidade de emissão de fluorescência. Desse modo, não apenas a difusão molecular, mas também qualquer dinâmica que seja mais rápida que a difusão pode ser detectada (ver **figura 8**).

Figura 8: Princípio da medida de dinâmica proteica usando *PET-FCS* (JENSEN et al., 2011).

Para isso, é necessário que fluoróforos extrínsecos sejam introduzidos em sítios específicos em uma proteína, de modo que eles possam relatar mudanças na conformação proteica através da modulação de seus rendimentos quânticos de fluorescência. Essa modulação pode ocorrer, por exemplo, através de mudanças na polaridade do ambiente do cromóforo, ou através de interações de supressão de fluorescência específicas com radicais químicos nas proximidades, como no caso de cadeias laterais de triptofanos projetados (CHATTOPADHYAY et al., 2002; JENSEN et al., 2011; NEUWEILER; DOOSE; SAUER, 2005; NEUWEILER; JOHNSON; FERSHT, 2009).

1.2.3. Contagem de fóton único correlacionado no tempo (*TCSPC*)

Atualmente, a contagem de fóton único correlacionado no tempo (ou *TCSPC*) é a principal técnica para medidas no domínio do tempo. Sua instrumentação faz uso de fontes de luz de laser de picossegundo (ps) ou femtossegundo (fs) de modo bloqueado de alta velocidade de repetição, e de fotomultiplicadoras (*PMTs*) de placa de microcanal (*MCP*) de alta velocidade. Entretanto, esses sistemas caros têm sido rapidamente substituídos por sistemas que fazem uso de diodos de laser pulsado (*LDs*), diodos emissores de luz (*LEDs*), e *PMTs* menores e mais rápidos (LAKOWICZ, 2006).

Na *TCSPC*, a amostra é excitada com um pulso de luz (**figura 9**), de modo que menos de um fóton de emissão seja detectado por pulso de laser (normalmente, apenas 1 fóton é detectado a cada 100 pulsos de excitação). Em seguida, é medido o tempo entre o pulso de excitação e a detecção do fóton de emissão observado, que é então guardado em um histograma onde o eixo *x* representa essa diferença de tempo, e o eixo *y* representa o número de fótons detectados para cada diferença de tempo (painel inferior da **figura 9**). Quando muito menos de um fóton é detectado por pulso de excitação, o histograma representa a forma de onda do decaimento. Se a taxa de contagem é muito alta, o histograma tende para tempos mais curtos, pois na *TCSPC* apenas o primeiro fóton pode ser observado. Isso ocorre porque, infelizmente, a eletrônica atualmente não é rápida o bastante para medir múltiplos fótons por pulso na escala de nanossegundos (LAKOWICZ, 2006).

Figura 9: Princípio da *TCSPC*. Os pulsos no painel do meio representam a saída de um discriminador de fração constante (LAKOWICZ, 2006).

1.2.4. Microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência (*FLIM*) por *TCSPC*

A microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência (ou *FLIM*) é uma técnica utilizada principalmente na análise de sistemas biológicos que permite a obtenção de imagens em escalas micro e nanométricas. A vantagem dessa técnica em relação à microscopia de fluorescência convencional reside no fato de que na *FLIM* as medidas são praticamente independentes da concentração da sonda. Por exemplo, se o tempo de vida de fluorescência de uma sonda muda em resposta ao pH, à polaridade (ou alguma outra mudança) do microambiente, ou à presença de algum outro analito, o valor do tempo de vida poderá ser utilizado para determinar a concentração do analito ou as condições ambientais às quais a sonda responde, em cada pixel individual da imagem, de maneira independente da concentração da sonda. (LAKOWICZ, 2006).

Por exemplo, suponhamos que uma célula é formada por duas regiões contendo concentrações muito distintas de um certo analito – por exemplo, o íon cálcio –, e que o tempo de vida de fluorescência de uma sonda é muito sensível à concentração desse analito. Suponhamos, então, que o rendimento quântico da sonda é pouco ou nada sensível à concentração do analito, e/ou que a concentração da sonda é diferente em cada região da célula devido à exclusão parcial dessa sonda por diversos fatores fisiológicos (por exemplo, maior concentração de material biológico sólido). Pela análise da imagem de intensidade, seria muito difícil ou mesmo impossível detectar essa diferença de ambiente nas duas regiões. Mesmo se a eficiência quântica da sonda fosse bastante sensível à presença do analito no meio, de nada adiantaria se as concentrações da sonda fossem muito distintas nas duas regiões, interferindo na intensidade observada. Entretanto, se os tempos de vida forem medidos nessas regiões, os ambientes distintos poderão ser detectados, pois o contraste de imagem é baseado em tempo de vida, que é um valor independente do rendimento quântico e da concentração da sonda (ver **figura 10**) (LAKOWICZ, 2006).

A *TCSPC* é a principal tecnologia empregada atualmente nas medidas dos tempos de vida de fluorescência na *FLIM*, e normalmente vem combinada com a microscopia de varredura por laser (*LSM*). Através da *LSM*, imagens são criadas através da medida sequencial de todos os pixels em uma imagem, o que é realizado pela varredura da amostra por um feixe de laser focado na mesma, e da medida das intensidades em cada posição. As medidas de *TCSPC* são realizadas enquanto o laser varre a amostra, de modo que em cada ponto da imagem o instrumento mede uma curva de decaimento. Isso só é possível graças ao fato de que a taxa de

repetição do laser é normalmente alta o bastante para que muitos pulsos de excitação cheguem durante o tempo de permanência em cada pixel. Os dados são então armazenados em uma matriz tridimensional, onde os eixos x e y indicam a posição na amostra, e a terceira dimensão representa os tempos de chegada dos fótons associados a cada pixel na imagem (LAKOWICZ, 2006).

Figura 10: Representação intuitiva do conceito de microscopia por imagem de tempo de vida de fluorescência. Assume-se que o objeto possua duas regiões que apresentam a mesma intensidade de fluorescência mas diferentes tempos de decaimento, $\tau_2 > \tau_1$ (LAKOWICZ, 2006).

1.3. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (*EPR*) aplicada no estudo da dinâmica proteica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (ou *EPR*) é uma técnica muito poderosa no estudo de estruturas macromoleculares, pois os sinais dos espectros de *EPR* são gerados apenas por elétrons desemparelhados, que são muito raros em sistemas biológicos. Alguns dos principais motivos para o emprego da *EPR* na investigação de biomoléculas são: (1) possibilidade de estudar o microambiente e a dinâmica locais de um domínio marcado com uma sonda de spin através da inspeção da forma da linha espectral de *EPR*; (2) a facilidade de se marcar com sondas de spin; (3) a ausência de restrições de tamanho para as macromoléculas analisadas; (4) o pequeno volume molecular das sondas de spin, induzindo poucas perturbações de estruturais; (5) a requisição de quantidades de amostras relativamente pequenas (~ 0.1 nmol) (BISWAS et al., 2001).

Quando uma molécula contendo elétrons desemparelhados – como uma molécula orgânica contendo um radical livre –, é exposta a um campo magnético externo, os níveis de energia acessíveis ao spin eletronicamente desemparelhado são divididos. Uma vez que um elétron apresenta um spin de $S = 1/2$, dois níveis de energia são possíveis: $M_S = -1/2$, o estado de baixa energia, e $M_S = +1/2$, o estado de alta energia. Conforme a força do campo aumenta, a diferença de energia entre esses dois estados aumenta linearmente. Na espectroscopia de *EPR*, um composto (sonda de spin) é colocado dentro de um campo magnético e exposto a uma radiação de micro-ondas de frequência constante. Em campos magnéticos correspondentes a uma diferença de energia ressonante com a energia da frequência de micro-ondas aplicada, os elétrons são promovidos do estado de baixa energia para o de alta energia. Essas transições são observadas como a absorção de uma porção da intensidade de micro-ondas. Uma vez que essas absorções são bastante largas, uma medida precisa do espaçamento entre os picos é normalmente obtida pela inspeção da primeira derivada do espectro. Portanto, os espectros de *EPR* são gravados de maneira convencional como a taxa de variação da absorção em função da força do campo (ver **figura 11**) (BISWAS et al., 2001).

Figura 11: Variações na forma da linha espectral. Os espectros de *EPR* de uma sonda de spin de nitróxido em solução aquosa a temperatura ambiente (A), em glicerol a temperatura ambiente (B), e congelada em solução aquosa (C). ΔH_0 é a largura da linha da ressonância central (BISWAS et al., 2001).

A forma da linha do espectro de *EPR* é influenciada pela velocidade de rotação da sonda de spin, de modo que o sinal de *EPR* de uma sonda ligada covalentemente a uma biomolécula pode fornecer uma variedade informações sobre seu ambiente estrutural. Desse modo, é possível sondar a acessibilidade de solventes, geometria e flexibilidade local, assim como mudanças estruturais induzidas por um evento químico ou físico. De uma maneira geral, o alargamento dos picos em um espectro de EPR indica a imobilização da sonda de spin, enquanto o afinamento dos picos apontam para um aumento na mobilidade da sonda. Também é possível empregar as sondas de spin para medir distâncias inter e intramolecular em agrupamentos macromoleculares por métodos de *EPR* dipolar (BISWAS et al., 2001).

Objetivos

2.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve por objetivo geral a obtenção de novas informações acerca da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11 através do uso de técnicas avançadas de biofísica molecular em nível *bulk* e em nível de molécula única. Buscou-se superar as limitações espaciais e temporais das técnicas convencionais, tentando-se determinar parâmetros inacessíveis por outras técnicas espectroscópicas e de simulação de dinâmica molecular. Para isso, empregou-se desde espectroscopia de fluorescência e *EPR* convencionais, até *FCS* e *FLIM*, fazendo-se uso de sondas extrínsecas ligadas em diferentes regiões da enzima durante sua interação com seu substrato e sob diferentes condições ambientais e reacionais.

2.2. Objetivos específicos

1. Planejamento racional de mutações únicas de cisteína na xilanase GH11 de *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 168 (XynA) em posições do domínio polegar e de regiões rígidas;
2. Obter as xilanases mutantes *via* mutagênese sítio-dirigida, expressá-las e purificá-las, e verificar a qualidade da estrutura secundária das enzimas produzidas por *CD*;
3. Marcar as xilanases mutantes com sondas fluorescentes e de *spin*;
4. Determinar a atividade catalítica dos mutantes marcados e não marcados em relação à enzima tipo selvagem;
5. Medir as mudanças no espectro de emissão de fluorescência da sonda fluorescente sensível à polaridade *Acrylodan* conjugada com as enzimas mutantes, em diferentes temperaturas e concentrações de substrato e produto;
6. Medir as mudanças no espectro de *EPR* da sonda de *spin* *MTSSL* conjugada com as enzimas mutantes causadas pela variação de temperatura e de concentração de substrato e produto;

7. Medir a difusão, constante de afinidade e parâmetros cinéticos dos movimentos do domínio polegar da XynA utilizando os mutantes marcados com as sondas fluorescentes fotoestáveis *Alexa Fluor® 488* e *AttoOxa11* por *FCS* e *PET-FCS* na presença de diferentes concentrações de substrato;
8. Utilizar xilanases marcadas com sondas fluorescentes fotoestáveis para caracterizar a topologia, a presença de xilano, e a afinidade da xilanase em diferentes carboidratos, filmes de arabinoxilano, e frações insolúveis de bagaço de cana-de-açúcar tratado utilizando-se *FLIM* e outras técnicas de microscopia de fluorescência.
9. Correlacionar os resultados dos ensaios de fluorescência, *EPR* e *FCS*, e propor um modelo para os determinantes biofísicos que governam a dinâmica catalítica da XynA.

Materiais e Métodos

3.1. Química computacional

3.1.1. Planejamento de mutantes simples de cisteína da endo-1,4-beta-xilanase de *Bacillus subtilis* 168

Para o estudo da dinâmica catalítica da endo-1,4-beta-xilanase de *Bacillus subtilis* linhagem PAP115 (BGSC ID: 1A1 – código 168), foram buscadas posições estratégicas na estrutura tridimensional da proteína para a substituição de resíduos de aminoácidos por resíduos de cisteína, e marcação subsequente com sondas fluorescentes e de spin.

Foram buscadas mutações no domínio polegar, onde o movimento de abre e fecha tem se mostrado fundamental para o acesso do substrato ao sítio catalítico, de acordo com simulações de dinâmica molecular (MURAKAMI et al., 2005; VIEIRA; DEGRÈVE; WARD, 2009; VIEIRA; WARD, 2012). Foram analisados vários resíduos de aminoácidos na ponta do domínio polegar, visando encontrar aqueles em que: 1. Não sejam um resíduo de dobradiça essencial de acordo com achados anteriores na literatura; 2. Não sejam resíduos altamente conservados na família das xilanases GH11, evitando então reduções drásticas de atividade catalítica; 3. Sejam expostos ao solvente para permitir uma reação de marcação eficiente.

Também foram analisados resíduos para serem empregados como referências das diversas medidas biofísicas. Para selecioná-los, foram utilizados os mesmos critérios para selecionar os resíduos no domínio polegar, mas com alguns detalhes adicionais: 1. Os resíduos devem estar distantes do sítio catalítico, para evitar interações com o substrato e as mudanças de microambiente provenientes disso; 2. Os resíduos devem estar em regiões bastante estáveis da proteína, no intuito de evitar que a sonda sofra influência dos processos dinâmicos que se deseja medir. A noção da estabilidade de cada região da proteína foi baseada no tipo e tamanho da estrutura secundária, e na posição dos resíduos de interesse nessas estruturas. Desse modo, deu-se preferência para: 1. Alfa-hélices, seguidas pelas estruturas beta; 2. Estruturas maiores; 3. Resíduos localizados na região central dessas estruturas. Para confirmar essas previsões de estabilidade, simulações de dinâmica molecular foram consultadas, verificando-se então se os resíduos de interesse estavam em regiões com menores valores de *RMSF* e *RMSD* por resíduo (MURAKAMI et al., 2005; VIEIRA; DEGREVE, 2009; VIEIRA; DEGRÈVE; WARD, 2009; VIEIRA; WARD, 2012).

Exemplos de regiões estáveis são: a α -hélice que fica na parte de trás do domínio palma, por se tratar de uma região bastante estável segundo os mesmos estudos de dinâmica molecular, além de ter sido sondada com sucesso por outro grupo de pesquisa (DORNEZ et al., 2011). Embora essa não seja uma região dinâmica, pode servir principalmente como uma referência para medidas de fluorescência e EPR, livre dos possíveis ruídos e flutuações decorrentes de movimentos moleculares; o domínio dedos, por se tratar de uma região bastante dinâmica nas pontas, porém, muito rígida na base, servindo também como referência.

Foi utilizado o programa online *SWISS-MODEL*, para a minimização da energia dos diversos mutantes e obtenção das estruturas com melhor qualidade (ARNOLD et al., 2006; BIASINI et al., 2014; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009; KIEFER et al., 2009). Para realizar estes cálculos, foi utilizada como estrutura inicial da xilanase as coordenadas atômicas do *PDB ID 1XXN*, obtidas por difração de raios-X (MURAKAMI et al., 2005). Foram classificadas para o próximo estágio as estruturas com menores energias totais finais, com as menores energias (*Anolea*, *Qmean* e *Gromos*) para o resíduo de cisteína, maiores *QMEANscore4* e menores *Z-score*, sempre comparando com os resultados para a enzima tipo selvagem (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011; BENKERT; KÜNZLI; SCHWEDE, 2009; VAN GUNSTEREN et al., 1996).

Finalmente, analisou-se o microambiente de cada candidato, no intuito de encontrar interações possíveis usando o programa *PyMOL* (SCHRODINGER LLC, 2010). No intuito de quantificar a força dessas interações, utilizou-se o programa online *PROPKA 2.0* (LI; ROBERTSON; JENSEN, 2005) com o campo de força *PARSE* em pH 6.0 para calcular o pKa das cadeias laterais dos resíduos e então prever seus respectivos estados de protonação.

3.1.2. Modelagem molecular de um oligômero de xilose e das sondas *Acrylodan*, *AttoOxa11* e *MTSSL* conjugadas com cisteína

As estruturas das sondas fluorescentes *Acrylodan* e *AttoOxa11* conjugadas com uma cisteína, da sonda de *spin MTSSL* conjugada com uma cisteína, e de um oligômero de xilose de onze resíduos, foram desenhadas no programa *ACD/ChemSketch 2015 (Freeware Version)* (ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, 2015), o qual forneceu a estrutura tridimensional inicial dessas moléculas. Em seguida, foi feita uma rápida minimização da energia e busca conformacional dessas moléculas no pacote de programas *VEGA ZZ 3.0.5*

(PEDRETTI; VILLA; VISTOLI, 2004), para relaxar as estruturas tridimensionais previamente à minimização de energia principal. Finalmente, foi feita a otimização da geometria das moléculas de interesse no vácuo por um método *ab initio* no pacote de programas *ORCA 3.0.3* (NEESE, 2012).

Para as sondas fluorescentes e para o oligômero de xilose, a carga total das moléculas foi considerada como zero e a multiplicidade como um (sem elétrons desemparelhados, moléculas no estado fundamental). As seguintes palavras-chave foram utilizadas:

```
! PAL4 RI BP86 def2-SVP def2-SVP/J D3BJ TIGHTSCF Opt Grid3 FinalGrid5 KeepDens
```

Para a sonda de *spin*, a carga total da molécula foi considerada como zero e a multiplicidade como dois (um elétron desemparelhado, molécula no estado excitado). As seguintes palavras-chave foram utilizadas:

```
! RI BP86 def2-SVP def2-SVP/J D3BJ TIGHTSCF Opt Grid3 FinalGrid5 KeepDens chelpg
```

Ao final das iterações, que levaram algumas horas, a imagem da estrutura e isosuperfície eletrônica resultante foi gerada no programa *ChemCraft 1.7* (ANDRIENKO, 2015) ou no *PyMOL* (SCHRODINGER LLC, 2010).

3.1.3. Simulação de dinâmica molecular da XynA tipo selvagem por mecânica molecular

As coordenadas atômicas iniciais da XynA foram obtidas a partir do *PDB ID 1XXN* (MURAKAMI et al., 2005). O estado de protonação das cadeias laterais no pH 6.0 foi determinado pelo uso do programa *H++* (ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012). O sistema foi simulado usando o programa de dinâmica molecular *GROMACS* versão 4.6.5 (PRONK et al., 2013) e modelado pelo campo de força *AMBER99SB* (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2013) e modelo de água *SPC* (BERENDSEN et al., 1981). A simulação foi realizada no *ensemble NVT* com uma temperatura de 20 °C usando condições periódicas e convenção de imagem mínima. A temperatura foi controlada pelo uso do termostato *V-rescale*. As equações de movimento foram integradas usando o algoritmo *leap-*

frog com um tempo de integração $dt = 2.0$ fs. O tempo total de simulação foi de 17.5 ns. As interações de van der Waals foram calculadas dentro de um raio de corte de 1.5 nm. As forças de longo alcance foram tratadas pela soma de Ewald com o método *PME* com raio de corte fixado em 1.5 nm.

Primeiramente, o estado de protonação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da proteína foi determinado para o pH 6.0 pelo programa *H++*. Moléculas de água, íons e ligantes foram eliminados da proteína. No *GROMACS*, as cargas das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos foram manualmente atribuídas com base nos resultados do *H++*. Em seguida, foi criada uma caixa dodecaédrica com distância de 2.0 nm da superfície da proteína. Essa caixa foi preenchida com água, seguida pela adição dos íons Na^+ e Cl^- para uma concentração de $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e neutralização do sistema. A energia do sistema foi minimizada, gerando um gráfico de energia potencial. Foi realizada, então, uma equilibrção *NVT* (número constante de partículas, volume e temperatura), para estabilizar a temperatura do sistema e gerar um gráfico de temperatura pelo tempo. A segunda equilibrção foi feita em *ensemble NPT* (número constante de partículas, pressão e temperatura), para equilibrar a pressão do sistema, gerando um gráfico de pressão e densidade pelo tempo. Finalmente, foi realizada a simulação de dinâmica molecular nas condições supracitadas.

Após a realização da simulação, vários tipos de medidas de *RMSD* foram realizadas para avaliar a qualidade da simulação e da estrutura. Também foi avaliada a distância entre as imagens periódicas para verificar se houve algum tipo de interação proteína-proteína com caixas vizinhas. O raio de giro em função do tempo também foi obtido. Finalmente, foi determinado o *RMSF* por resíduo, permitindo uma análise da dinâmica de diversas regiões da XynA.

3.2. Mutagênese sítio-dirigida

Foi obtida uma amostra do DNA recombinante contendo o gene que codifica a proteína de interesse, inserido no vetor de expressão pET-28a(+), previamente utilizado no laboratório (RIBEIRO, 2013; RULLER, 2009; SANCHEZ ALPONTI, 2011). Cem nanogramas deste DNA foram transformados em 50 μL de *E. coli* linhagem DH5 α eletrocompetente por eletroporação em um eletroporador *MicroPulser Electroporator* da *bio-rad*. As células transformadas foram imediatamente acrescidas de meio de cultura SOC para um volume final

de 1 mL para regeneração. Após 1 h de regeneração em incubador orbital a 180 rpm e 37 °C, diluições de 10^0 até 10^3 do regenerado foram plaqueadas em meio de cultura LB-Ágar contendo $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. Essas culturas foram incubadas em estufa a 37 °C até o dia seguinte. Cinco colônias isoladas que cresceram nessas placas foram dissolvidas, separadamente, em 20 μL de H_2O estéril. Cinco microlitros dessa mistura foram empregados na realização de uma PCR de colônia com volume final de 25 μL , para confirmar a presença do gene de interesse nas colônias coletadas. A composição dessa reação é mostrada na **tabela 1**, e o seu programa de PCR correspondente é mostrado na **tabela 2**.

Tabela 1: Componentes da PCR de colônia

Componente	Concentração na reação
H_2O estéril	---
Tampão + KCl	1X
dNTP <i>Mix</i>	0.2 mM cada
MgCl_2	1.5 mM
<i>T7 Promoter</i>	0.400 μM
<i>T7 Terminator</i>	0.400 μM
DNA molde (colônia dissolvida)	---
<i>Taq.</i> DNA polimerase	1 U (ou 0.04 U μL^{-1})
Total	---

Tabela 2: Programa da PCR de colônia em termociclador

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Inicialização	94	3	1
Desnaturação	94	1	25
Anelamento	50	1	
Extensão	72	1	
Finalização	72	5	1
	4	∞	

Após a reação, as amostras foram coletadas, misturadas com igual volume de *GelRed*TM e submetidas à eletroforese em gel de agarose nativo 1.0%, para posterior análise. Confirmada a presença da banda referente ao gene de interesse no gel de agarose, os 15 μL de colônias dissolvidas restantes foram inoculados em 5 mL de meio de cultura LB líquido contendo $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina (o plasmídeo pET-28a(+)) apresenta marca de seleção para este antibiótico). Essa cultura foi incubada em incubador orbital a 37 °C e 180 rpm de agitação até o dia seguinte. O DNA plasmidial foi extraído dessas culturas utilizando-se o *QIAprep*[®] *Spin Miniprep Kit* da

Qiagen. Em seguida, a concentração desses DNAs foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, Waltham, United States*).

Uma das amostras de DNA plasmidial extraído foi submetida à reação de sequenciamento, de acordo com a composição da **tabela 3** e com o programa de PCR da **tabela 4**. Foi feita uma reação utilizando o primer *T7 Promoter*, e outra utilizando o primer *T7 Terminador*.

Tabela 3: Quantidades dos componentes da reação de sequenciamento

Componente	Concentração na reação
<i>Big Dye Terminator</i>	---
Tampão	---
<i>T7 Promoter</i> ou <i>Terminator</i>	0.25 μM
DNA	20.0 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (200 ng)
Total	---

Tabela 4: Programa da PCR para reação de sequenciamento de DNA em termociclador

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo	Ciclos
Inicialização	95	1 min	1
Desnaturação	95	10 seg	25
Anelamento	51	5 seg	
Extensão	60	4 min	
Finalização	4	∞	1

Essa reação foi, então, submetida à análise de sequenciamento de DNA em um equipamento *ABI 3500XL* no *Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB)* do *Hemocentro de Ribeirão Preto*. Uma vez obtidos os resultados do sequenciamento, os mesmos foram analisados utilizando-se os programas *BioEdit*, *ApE* e *Clustal Omega* (GOUJON et al., 2010; HALL, 1999; MCWILLIAM et al., 2013; SIEVERS et al., 2011), no intuito de verificar a identidade do gene a ser trabalhado.

Em posse da sequência exata do gene da xilanase a ser utilizado nos experimentos que se seguiram, foram desenhados pares oligonucleotídicos para a realização da reação de mutagênese sítio-dirigida para obtenção dos mutantes supracitados (D119C, R122C, N151C e N54C) segundo o protocolo desenvolvido por Liu e Naismith (2008). Para os cálculos dos T_M s necessários para tal planejamento, foi empregado o programa online *Oligo Calc* (KIBBE, 2007), considerando a presença de 50 mM de sal de sódio e 50 nM de oligonucleotídeo. As

regiões de sobreposição de primers foram construídas sobrepondo nove nucleotídeos para cada lado de uma mutação inserida. As regiões não sobrepostas dos primers foram construídas com T_M s aproximadamente 5 °C maiores do que os T_M s de suas respectivas regiões sobrepostas. Esses oligonucleotídeos foram, então, sintetizados pela *Exxtend* (ver **tabela 5**).

Tabela 5: Primers oligonucleotídicos, seus tamanhos, T_M s teóricos e sequências

Nome da sequência	Número de bases	T_M teórico (°C)	Sequência 5' – 3'
FwN54C	39	59.5	ATAAACTATTGTGCCGAGTTTGGGCGCCGAATGGCAAT
RvN54C	40	60.5	ACTCCGGCACAATAGTTTATCGTCCTAAATGGCGAACCTG
FwD119C	46	66.2	CCTTCCATTTGTGGCGATCGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTG
RvD119Cv2	52	67.2	CGATCGCCACAAATGGAAGGTGCGTTATAACGTGTAGTTGTATATATGTCGT
FwR122C	40	59.5	GATGGCGATTGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTTC
RvR122C	42	60.9	AAGTAGTGCAATCGCCATCAATGGAAGGTGCGTTATAACGTG
FwN151C	41	61.2	AATCATGTGTGCGCATGGAAGAGCCATGGAATGAATCTGGG
RvN151C	43	62.9	TTCCATGCGCACACATGATTGCTGAAAGTGATTGTAGCGTTGC

Em posse dos primers necessários para a realização da mutagênese sítio dirigida, as PCRs mutagênicas para obtenção dos mutantes propostos foram realizadas em um volume total de reação de 50 μ L, contendo 10 ng do DNA molde, 1 μ M de cada um dos dois oligonucleotídeos do par, 200 μ M de cada um dos dNTPs e 3 unidades de *Pfu* DNA polimerase. Essas reações foram processadas em termociclador de acordo com a seguinte programação: inicialização de 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 1 min (desnaturação), $T_{m\ no}$ (T_m da região não sobreposta) – 5 °C por 1 min (Anelamento) e 72 °C por 15 min (extensão), e finalização de $T_{m\ pp}$ (T_m da região sobreposta) – 5 °C por 1 min, 72 °C por 30 min e 4 °C (ver **tabela 6**).

Tabela 6: Programa da mutagênese sítio-dirigida em termociclador

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Inicialização	95	5	1
Desnaturação	95	1	
Anelamento	$T_{m\ no} - 5$	1	25
Extensão	72	15	
	$T_{m\ pp} - 5$	1	
Finalização	72	30	1
	4	∞	

Os produtos dessas reações foram digeridos com *DpnI* da *FastDigest* a uma concentração de 1X na reação. Essa reação durou 30 min a 37 °C em termociclador. Em seguida, a enzima foi inativada termicamente por aquecimento a 80 °C durante 10 min (ver **tabela 7**).

Tabela 7: Componentes da digestão com *DpnI* para os mutantes

Componente	Concentração na reação
<i>FastDigest DpnI</i>	1X
<i>FastDigest Green Buffer</i>	1X
Produto da PCR	---
Total	---

Dez microlitros de cada produto de PCR digerido com *DpnI* foram misturados com igual volume de *GelRed*TM (exceto para o mutante D119C) e submetidos à eletroforese em gel de agarose nativo 1.0%, no intuito de verificar se houve a formação de um produto com o número de pares de base esperado. O gel para o mutante D119C foi revelado via tratamento com brometo de etídio. O restante do produto, que não foi submetido à eletroforese, foi purificado usando o kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* da *Promega* e quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, Waltham, United States*).

Cem nanogramas de cada um dos produtos de PCR mutagênica digerido com *DpnI* e purificado, assim como do DNA selvagem (controle), foram transformados por eletroporação em 50 µL de células de *Escherichia coli* da linhagem DH5α eletrocompetente, seguido pela sua regeneração com meio de cultura SOC por 1 h a 37 °C, agitação de 180 rpm e volume final de 1 mL. O regenerado foi dividido em quatro alíquotas, que foram plaqueadas separadamente em quatro placas de petri distintas contendo meio de cultura LB-Ágar seletivo com 40 µg mL⁻¹ de canamicina. Essas culturas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 h, para crescimento de colônias isoladas das células transformadas.

Uma colônia de cada cultura (quatro por mutante) foi dissolvida individualmente em 20 µL de H₂O estéril. Quinze microlitros dessa mistura foram inoculados em 5 mL de meio de cultura LB líquido contendo 40 µg mL⁻¹ de canamicina, os quais foram incubados em incubador orbital a 37 °C e rotação de 180 rpm até o dia seguinte, para extração do DNA plasmidial. Os 5 µL restantes de colônia dissolvida foram empregados na realização de uma PCR de colônia de volume final de 25 µL, cujo produto foi posteriormente misturado com igual volume de *GelRed*TM (exceto para o mutante D119, que foi revelado novamente com brometo de etídio) e

submetido à eletroforese em gel de agarose nativo 1.0% para verificar a presença do gene de interesse com a mutação esperada. A composição da PCR de colônia é mostrada na **tabela 8**, e seu respectivo programa de termociclagem pode ser visto na **tabela 9**.

Tabela 8: Componentes da PCR de colônia para todos os mutantes

Componente	Concentração na reação
H ₂ O estéril	---
Tampão + KCl	1X
dNTP Mix	0.2 mM cada
MgCl ₂	1.5 mM
<i>T7 Promoter</i>	0.400 µM
<i>T7 Terminator</i>	0.400 µM
DNA molde (colônia dissolvida)	---
<i>Taq</i> . DNA polimerase	1 U (ou 0.04 U µL ⁻¹)
Total	---

Tabela 9: Programa da PCR de colônia em termociclador para todos os mutantes

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Inicialização	94	3	1
Desnaturação	94	1	25
Anelamento	50	1	
Extensão	72	1	
	72	5	
Finalização	4	∞	1

O DNA plasmidial foi extraído dessas 16 culturas utilizando-se o *QIAprep® Spin Miniprep Kit* da *Qiagen*. Em seguida, a concentração desses DNAs foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, Waltham, United States*).

Uma amostra de cada DNA plasmidial extraído foi submetida à reação de sequenciamento, de acordo com a composição da **tabela 10** e com o programa de PCR da **tabela 4**. Foi feita uma reação utilizando o primer *T7 Promoter*, e outra utilizando o primer *T7 Terminator*.

Tabela 10: Quantidades dos componentes da reação de sequenciamento para todos os mutantes

Componente	Concentração na reação
<i>Big Dye Terminator</i>	---
Tampão	---
<i>T7 Promoter ou Terminator</i>	0.25 μ M
DNA	128 a 200 ng
Total	---

3.3. Expressão das xilanases tipo selvagem e mutantes

O método de expressão das xilanases trabalhadas neste projeto foi baseado nos métodos de expressão da mesma xilanase tipo selvagem por ex-alunos de nosso laboratório (RIBEIRO, 2013; RULLER, 2009; SANCHEZ ALPONTI, 2011).

No intuito de obterem-se células competentes voltadas para expressão proteica, células de *Escherichia coli* da linhagem BL21[DE3]pLysS eletrocompetentes foram preparadas, conforme protocolo padronizado em laboratório com algumas modificações (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 1.119-22). Esta cepa possui o gene 1 do bacteriófago T7, que codifica para a T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*, permitindo, portanto, alto nível de expressão usando o sistema do promotor do bacteriófago T7, induzível por IPTG (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 15.20-1). Além disso, ela também possui o plasmídeo pLysS, que codifica para a lisozima do bacteriófago T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, suprimindo, portanto, a transcrição dos genes alvo em células não induzidas (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 15.21 e 15.24). O plasmídeo pLysS também codifica para resistência a cloranfenicol, permitindo que o mesmo seja mantido pelo uso deste antibiótico (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 15.24).

Cinquenta microlitros dessas células foram transformados com até 50 ng de DNA recombinante plasmidial obtido na etapa anterior (xilanase tipo selvagem ou mutantes, todos ligados no vetor pET-28a(+)) pelo método da eletroporação, conforme protocolo padronizado em laboratório (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 1.121-2). Meio de cultura SOC foi imediatamente adicionado para um volume final de 1 mL, seguido por regeneração das células em incubador orbital durante 1 h a 37 °C, com agitação de 180 rpm. Em seguida, uma alíquota de 50 μ L das células transformadas foi inoculada em meio de cultura LB-Ágar seletivo contendo 34 μ g mL⁻¹ de cloranfenicol (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 15.24), para

seleção da linhagem de células utilizada (através da manutenção do plasmídeo pLysS), e $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de canamicina (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. A2.6), para seleção do plasmídeo pET-28a(+). Esta cultura foi, em seguida, incubada em estufa a 37°C por 16h, para crescimento de colônias isoladas das células transformadas.

Colônias isoladas das células BL21[DE3]pLysS transformadas foram empregadas na expressão das enzimas de interesse pelo método dos promotores induzíveis por IPTG, de acordo com protocolo padronizado em laboratório (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. 15.16-8). Nesse procedimento, as condições ideais de indução da expressão da proteína alvo foram as mesmas utilizadas previamente no laboratório (RIBEIRO, 2013; RULLER, 2009): Um pré inóculo foi preparado inoculando-se uma colônia isolada das células BL21[DE3]pLysS transformadas em 5 mL de meio de cultura seletivo HDM líquido ($15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptona, $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura e $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de magnésio) acrescido de $34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol e $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de canamicina, seguido pela incubação dessa cultura em incubador orbital até o dia seguinte a 37°C e agitação de 180 rpm.

Quatro mililitros do pré-inóculo crescido foram inoculados em 400 mL de meio de cultura seletivo HDM líquido com a mesma composição do meio descrito acima, seguido pela incubação dessa cultura em incubador orbital a 37°C e agitação de 180 rpm. Foi adicionado $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ do indutor IPTG (concentração final) à cultura quando esta alcançou a fase logarítmica de crescimento ($\text{DO}_{600} = 0.6$), deixando a indução ocorrer durante 5 h sem alterar a temperatura (37°C) e agitação (180 rpm).

Alíquotas de 1 mL da cultura foram retiradas a cada uma hora de indução, sendo que 100 μL de cada alíquota foram diluídos para 1 mL com HDM, seguidos pela medição de sua DO_{600} , para verificar o crescimento da cultura no decorrer da indução da expressão. Os 900 μL restantes de cada alíquota foram centrifugados a uma velocidade de rotação de 6000 rpm e 4°C durante 3 min, e os sedimentados celulares foram recuperados e congelados para posterior análise da expressão por *SDS-PAGE*.

Após o término do período de indução da expressão, a cultura foi centrifugada a uma velocidade de rotação de 8000 g e 4°C por 10 min, após o qual o sedimentado celular foi separado do sobrenadante e congelado até o dia seguinte para dar continuidade ao processo de purificação da proteína de interesse.

Os sedimentados celulares das alíquotas retiradas durante a indução da expressão proteica foram acrescidos de um volume de tampão de amostra (sem DTT) inversamente proporcional às DO_{600} de suas respectivas alíquotas. Isso foi feito para anular a contribuição do número total de células na análise do grau de expressão por células individuais.

Subsequentemente, essas misturas foram acrescidas de 2% de β -mercaptoetanol (v/v) e aquecidas a 100 °C durante 20 min. Caso o sedimentado não fosse completamente dissolvido após este tempo, a mistura era agitada com micropipeta e o procedimento de aquecimento era repetido. Após essa etapa de desnaturação as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 12 a 15%, seguido por eletroforese em condições desnaturantes a 200 V em um sistema de eletroforese de gel de poliacrilamida *Mini-PROTEAN Tetra Cell* da *Bio-Rad (Hercules, United States)*. Após o término da eletroforese os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. A8.40-7).

3.4. Purificação das xilanases

A primeira purificação proteica foi realizada pela técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) usando as resinas de Ni^{2+} *GE™ Healthcare Ni Sepharose™ High Performance Media* (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) ou *HisLink™* (Promega, Fitchburg, United States), aproveitando-se das interações de afinidade, por coordenação, entre a cauda de histidina presente nas enzimas recombinantes e os íons de níquel presentes na resina (TADEU et al., 2009). A purificação seguiu conforme protocolo e recomendação do fabricante da resina, mas com algumas modificações propostas por outros trabalhos com a mesma enzima (RIBEIRO, 2013; RULLER, 2009; SANCHEZ ALPONTI, 2011).

O sedimentado celular proveniente da etapa de expressão proteica foi ressuspendido em 20 mL de tampão de lise/ligação (20 mmol·L⁻¹ de imidazol, 50 mmol·L⁻¹ de fosfato de sódio, 500 mmol·L⁻¹ de cloreto de sódio, pH 8.0), após o qual se acrescentou 1% de Triton X-100 (v/v) e de 0.5 a 4 mmol·L⁻¹ do inibidor de protease *PMSF*. Todo o procedimento foi realizado em gelo. A mistura resultante foi sonicada durante 10 min em um tubo de fundo cônico imerso em gelo, com pulsos de 10 s de duração e 10 s de espera (totalizando 20 minutos) e 50% de amplitude de onda.

O sonicado foi submetido à centrifugação a uma velocidade de rotação de 10 000 g e 4 °C durante 30 min para separar o sobrenadante (proteínas solúveis) do precipitado (lisado celular). O sedimentado de restos celulares e proteínas agregadas foi guardado para posterior análise por *SDS-PAGE*, enquanto as proteínas solúveis foram levadas para a próxima etapa da purificação.

Dois mililitros da resina de níquel foram carregados em uma coluna cromatográfica, seguidos pela lavagem da resina com pelo menos quatro volumes da coluna de água deionizada e equilíbrio com quatro volumes da coluna de tampão de lise/ligação, ambos a um fluxo de aproximadamente 90% da velocidade máxima de uma bomba peristáltica. Um excesso de tampão de lise/ligação com volume igual ao da resina foi deixado na coluna. Subsequentemente, todo o conteúdo da coluna foi misturado com as proteínas solúveis provenientes da etapa de centrifugação do sonicado, em um tubo de fundo cônico de 50 mL. Essa mistura foi deixada agitando durante 1 h em agitador orbital em câmara fria a $\sim 4^{\circ}\text{C}$, para melhorar a ligação das proteínas de interesse à resina de níquel.

A mistura de resina e proteínas solúveis foi lentamente transferida para a coluna cromatográfica, a qual foi submetida à pressão da bomba peristáltica para eluição das proteínas não ligadas até quase não restar mais líquido sobre a resina. Esse eluído foi chamado de *flow-through* (FT). Em seguida, a resina foi lavada com quatro volumes de coluna de tampão de lise/ligação, cujo eluído foi chamado de *wash 1* (W1). Para eliminar proteínas mais fortemente ligadas à resina, uma nova lavagem foi realizada com quatro volumes de coluna de tampão de lavagem ($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de imidazol, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio, $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, pH 8.0), cujo eluído foi chamado de *wash 2* (W2). Finalmente, a proteína de interesse foi eluída em alíquotas de 1.5 mL com o tampão de eluição ($300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de imidazol, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio, $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, pH 8.0) até a absorbância em 280 nm diminuir e quase parar de variar, normalmente após as vinte primeiras alíquotas. Por precaução, a proteína continuou a ser eluída com quatro volumes de coluna de tampão de eluição, cujo eluído foi chamado de *flow-through 2* (FT2). Todas as proteínas foram eluídas em tubos imersos em gelo e, após o procedimento, todas foram armazenadas em geladeira a $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

Para reaproveitar a resina futuramente, essa foi lavada com pelo menos cinco volumes de coluna de tampão de eluição para eliminar o excesso de proteínas ligadas, seguida por lavagem com dois volumes de coluna de uma solução $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaOH, pelo menos cinco volumes de coluna de água deionizada e quatro volumes de coluna de etanol 20% (v/v), deixando um excesso de volume igual ao volume da resina, para evitar contaminação. A coluna contendo a resina foi armazenada em geladeira a $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

No intuito de avaliar o perfil de eluição e pureza das proteínas, algumas amostras das etapas de purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em géis de 12% a 15% de poliacrilamida. Pelo menos 10 μL de cada amostra foram acrescidos de 2% de β -mercaptoetanol (v/v) e aquecidos a 100°C durante 20 min. Após essa etapa de desnaturação as amostras foram aplicadas no gel, seguida por

eletroforese em condições desnaturantes a 200 V em um sistema de eletroforese de gel de poli(acrilamida) *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, United States). Após o término da eletroforese os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001, p. A8.40-7).

Após essa etapa de desnaturação as amostras foram aplicadas em gel de poli(acrilamida) de 12 a 15%, seguido por eletroforese em condições desnaturantes a 200 V em um sistema de eletroforese de gel de poli(acrilamida) *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, United States). Após o término da eletroforese os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

A concentração de proteína eluída em cada fração de 1.5 mL foi determinada através de quantificação espectrofotométrica em um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, Waltham, United States).

As amostras mais puras e concentradas, conforme os resultados obtidos por *SDS-PAGE* e quantificação espectrofotométrica, foram combinadas em uma única fração. Para eliminar o excesso de imidazol dessa solução, essa foi submetida à diálise contra um tampão $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio com $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, pH 6.0, utilizando uma membrana de diálise *Spectra/Por* (*SPECTRUM® LABORATORIES, INC, Rancho Domingues, United States*) de corte de 10 kDa, sob agitação magnética em câmara fria a $\sim 4^\circ \text{C}$. O tampão de diálise foi trocado de três a quatro vezes em um período de 24 a 48 horas, sendo a última troca mais demorada (até o dia seguinte). O volume de tampão empregado em cada troca na diálise foi sempre pelo menos cem vezes maior que o volume de amostra. Após a diálise, a proteína foi novamente armazenada em um tubo de fundo cônico na geladeira a $\sim 4^\circ \text{C}$.

Para aumentar a pureza e obter as populações mais homodispersas das proteínas purificadas por *IMAC*, essas foram purificadas uma segunda vez por cromatografia de exclusão molecular, conforme o protocolo a seguir: Quando necessário (se a proteína estivesse em uma concentração inferior a 1 mg mL^{-1} , por exemplo), a proteína tipo selvagem dialisada foi concentrada até $\sim 8 \text{ mg mL}^{-1}$ em concentradores *Vivaspin* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) com membrana de corte de 10 kDa, conforme recomendações do fabricante e a 4°C . Em seguida, uma alíquota de até 1 mL dessa solução dialisada e concentrada foi submetida à purificação por cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna *Superdex 75* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) equilibrada com o tampão de diálise/eluição (desareado) e um sistema de purificação de proteínas *ÄKTA* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*). As proteínas foram eluídas a temperatura ambiente com o mesmo tampão de diálise e a eluição foi acompanhada através da medida constante da

absorbância a 220 e 280 nm. As proteínas eluídas foram imediatamente armazenadas em geladeira a $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

A etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular foi realizada apenas para a proteína tipo selvagem, pois o mutante D119C apresentou afinidade incomum à coluna cromatográfica *Superdex 75* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*), o que impossibilitou a sua eluição de maneira efetiva. Para evitar perda de amostra pela possível afinidade com a coluna, os outros mutantes também não foram purificados por esse método, exceto para a eliminação de sondas livres em etapas posteriores.

Todos os tampões empregados durante as purificações e diálises foram filtrados através de membranas de celulose de 0.22 μm previamente às suas respectivas aplicações, para evitar contaminação das proteínas e entupimento das colunas cromatográficas. Os tampões foram previamente desareados quando utilizados em cromatografia de exclusão molecular, visando evitar que bolhas entrassem na coluna.

3.5. Quantificação das xilanases

Os parâmetros biofísicos mais fundamentais das xilanases tipo selvagem e mutantes, como massa molecular, coeficiente de absortividade molar e ponto isoelétrico, foram estimados através do programa online *ProtParam* (GASTEIGER et al., 2005), uma vez fornecidas suas sequências de aminoácidos, incluindo as caudas de histidina.

Tendo conhecimento da massa molecular e coeficiente de absortividade molar teórico das proteínas de interesse, suas concentrações foram determinadas espectrofotometricamente em um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, Waltham, United States*). Este método foi empregado na maior parte das quantificações proteicas no decorrer do projeto.

Para determinar o grau de marcação das proteínas com os fluoróforos trabalhados, empregou-se um espectrofotômetro UV-Vis *Cary® 50* (*Varian, Palo Alto, United States*), ao invés do *NanoDrop*. As medidas foram feitas a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

3.6. Análise de estrutura secundária das xilanases por espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Com o principal intuito de verificar se as mutações inseridas na xilanase causaram mudanças drásticas em sua estrutura secundária, essa foi determinada para todas as proteínas não marcadas através de espectrometria de dicroísmo circular (CD).

Um mililitro de proteína purificada (0.5 a $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 10 mmol L^{-1} pH 6.0, utilizando uma membrana de diálise *Spectra/Por* (*SPECTRUM® LABORATORIES, INC, Rancho Domingues, United States*) de corte de 10 kDa, sob agitação magnética em câmara fria a $\sim 4^\circ\text{C}$. O tampão de diálise foi trocado de três a quatro vezes em um período de 24 a 48 horas, sendo a última troca mais demorada (até o dia seguinte). O volume de tampão empregado em cada troca na diálise foi sempre pelo menos cem vezes maior que o volume de amostra. Após a diálise, a proteína foi novamente armazenada na geladeira a $\sim 4^\circ\text{C}$.

A xilanase tipo selvagem empregada nas medidas de CD foi aquela purificada pelos dois métodos de purificação (*IMAC* e exclusão molecular), enquanto os mutantes empregados nas medidas de CD foram purificados apenas pelo primeiro método (*IMAC*). A proteína dialisada foi diluída para uma concentração de $0.10\text{--}0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ com o mesmo tampão empregado na diálise. O tampão empregado nas diálises e diluições foi filtrado através de membrana de celulose de $0.22 \mu\text{m}$ previamente à sua aplicação, para evitar contaminação das proteínas. O espectro de CD de 190 a 250 nm (*UVCD* distante) dessa proteína diluída foi obtido em uma cubeta de quartzo de 1 mm a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$), utilizando-se um espectropolarímetro *Jasco 810* (*JASCO Inc., Tokyo, Japan*). O tampão empregado na diálise foi utilizado como branco, cujo espectro foi subtraído da média final das medidas de CD da proteína. O espectro final de cada amostra foi uma média de outras quatro ou cinco medidas de espectros de CD, a uma velocidade de varredura de 50 nm min^{-1} e com resolução de 0.5 nm.

Os espectros de CD resultantes foram analisados utilizando-se o programa online *DichroWeb*, no intuito de estimar a estrutura secundária das proteínas em solução (WHITMORE; WALLACE, 2004, 2008). O programa de análise e o conjunto de referência empregados foram o *CONTIN* e o *SP175* (LEES et al., 2006) (otimizado para uma faixa de 190 a 240 nm), respectivamente.

Para efeito de comparação e avaliação da qualidade da deconvolução do espectro de CD, a estrutura secundária da proteína tipo selvagem foi determinada por meio dos programas *DSSP* e *STRIDE* (FRISHMAN; ARGOS, 1995; KABSCH; SANDER, 1983), utilizando as

coordenadas atômicas do *PDB ID 1XXN*, obtidas por difração de raios-X, para os respectivos cálculos.

3.7. Marcação das xilanases com sondas fluorescentes

3.7.1. Marcação da xilanase tipo selvagem no N-terminal com a sonda fluorescente *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester*

Para medidas de difusão e interação da xilanase tipo selvagem por *FCS* e outras técnicas de microscopia confocal de fluorescência, essa proteína foi marcada em seu N-terminal com a sonda fluorescente reativa com amina *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester* (*Molecular Probes™*, (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States*), conforme protocolo do fabricante, com algumas modificações.

Uma solução de xilanase tipo selvagem contendo pelo menos 1 mg da proteína submetida às duas etapas de purificação proteica, ou apenas à primeira mais a etapa de diálise para retirar o excesso de imidazol, foi dialisada contra tampão 100 mmol·L⁻¹ de bicarbonato de sódio pH 7.0, utilizando uma membrana de diálise *Spectra/Por* (*SPECTRUM® LABORATORIES, INC, Rancho Domingues, United States*) de corte de 10 kDa, sob agitação magnética em câmara fria a ~4 °C. O tampão de diálise foi trocado de três a quatro vezes em um período de 24 a 48 horas, sendo a última troca mais demorada (até o dia seguinte). O volume de tampão empregado em cada troca na diálise foi sempre pelo menos cem vezes maior que o volume de amostra. Após a diálise, a proteína foi novamente armazenada na geladeira a ~4 °C.

A proteína em tampão bicarbonato de sódio foi concentrada até ~8 mg·mL⁻¹ em concentrador *Vivaspin* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) com membrana de corte de 10 kDa, conforme recomendações do fabricante e a 4°C.

Foi preparada uma solução estoque de pelo menos 10 mg mL⁻¹ da sonda fluorescente reativa com amina *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester* em DMSO, em um volume final de até 30 µL. Uma alíquota de 1 µL dessa solução foi diluída em H₂O deionizada e sua absorbância em 495 nm foi medida a temperatura ambiente em um espectrofotômetro UV-Vis *Cary® 50* (*Varian, Palo Alto, United States*), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, para estimar a concentração exata do fluoróforo na solução estoque, com base no fator de

diluição, em seu coeficiente de absorvidade molar no comprimento de onda utilizado ($\epsilon = 71\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e em sua massa molecular ($MM = 825.46\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

A proteína concentrada foi acrescida da solução estoque de sonda fluorescente para uma concentração final de 0.5 ou $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dessa. Em seguida, a reação foi incubada por $1\text{--}2\text{ h}$ a temperatura ambiente sob constante agitação em *vortex*, ou até o dia seguinte a $\sim 4^\circ\text{C}$ em câmara fria sob agitação constante em agitador orbital.

Para eliminar o excesso de sondas fluorescentes não reagidas, todo o volume da reação foi submetido à purificação por cromatografia de exclusão molecular, utilizando um sistema de purificação de proteínas *ÄKTA* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) e uma coluna *Superdex 75* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) equilibrada com o tampão de armazenamento, onde a proteína estava antes da marcação ($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio com $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, pH 6.0). A proteína foi eluída a temperatura ambiente com esse mesmo tampão e a eluição foi acompanhada através da medida constante da absorbância a 220, 280 e 495 nm. As proteínas eluídas foram imediatamente armazenadas em geladeira a $\sim 4^\circ\text{C}$.

O grau de marcação da proteína foi determinado através da obtenção de seu espectro de absorção molecular de 250 a 600 nm a temperatura ambiente em um espectrofotômetro UV-Vis *Cary® 50* (*Varian, Palo Alto, United States*), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm. A partir desse espectro obtiveram-se a absorbância da proteína e da sonda conjugada a ela em seus comprimentos de onda de absorção máxima, a 280 e 495 nm, respectivamente. Sabendo-se o fator de correção para a sonda fluorescente ($CF = 0.11$), calculou-se a absorção corrigida da proteína marcada a 280 nm através da seguinte equação:

$$A_{\text{proteína}} = A_{280} - A_{495}(CF) \quad \text{Equação 1}$$

onde $A_{\text{proteína}}$ é a absorção corrigida da proteína marcada a 280 nm, A_{280} é a absorção da proteína marcada em 280 nm sem correção, A_{495} é a absorção da proteína marcada em 495 nm e CF é o fator de correção para o fluoróforo ($CF = \text{Absorção do fluoróforo livre em } 280\text{ nm} / \text{Absorção do fluoróforo livre em seu comprimento de onda de absorção máxima}$).

Tendo em mãos essa absorbância corrigida, calculou-se a concentração da proteína marcada na solução, em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, com base na lei de Lambert-Beer, uma vez conhecidos sua massa molecular ($MM = 22\,675.6\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e seu coeficiente de absorvidade molar teórico ($\epsilon = 82\,850\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Finalmente, calculou-se o grau de marcação da proteína através da seguinte equação:

$$DOL = \frac{A_{495} \times MM}{[proteína] \times \epsilon_{AF488}} \quad \text{Equação 2}$$

onde *DOL* é o grau de marcação, *MM* é a massa molecular da proteína e ϵ_{AF488} é o coeficiente de absortividade molar da sonda fluorescente no comprimento de onda de absorção máxima.

3.7.2. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol *Acrylodan*

Para o estudo da interação enzima-substrato utilizando espectroscopia de fluorescência comum e anisotropia de fluorescência, as xilanases mutantes foram marcadas estrategicamente através de seus grupos tióis com a sonda reativa com tiol *Acrylodan*. Essa sonda possui diversas vantagens para espectroscopia de fluorescência comum: Ela é sensível à polaridade, propriedade que é capaz de conferir informações adicionais em medidas de biofísica; possui alto rendimento quântico em ambientes apolares e baixo rendimento quântico em ambientes polares; possui grande deslocamento de Stokes (>100 nm); dependendo do sistema, pode alcançar deslocamentos crômicos de dezenas de nanômetros na presença de ligantes (até ~30 nm); é leve e pequena em relação às sondas empregadas em *FCS*, tendo 1% da massa da xilanase, enquanto a sonda *Alexa Fluor® 488* possui 3.6% e a sonda *AttoOxa11* possui 3.2% (G. PRENDERGAST et al., 1983; HIBBS; TALLEY; TAYLOR, 2004b).

Dez mililitros de xilanase mutante purificada a uma concentração entre 0.4 e 2 mg·mL⁻¹, foram dialisados contra tampão 100 mmol·L⁻¹ de fosfato de sódio pH 7.0 contendo 100 mmol·L⁻¹ de NaCl, utilizando uma membrana de diálise *Spectra/Por (SPECTRUM® LABORATORIES, INC, Rancho Domingues, United States)* de corte de 10 kDa, sob agitação magnética em câmara fria a ~4 °C. O tampão empregado na diálise foi trocado de três a quatro vezes em um período de 24 a 48 horas, sendo a última troca mais demorada (até o dia seguinte). O volume de tampão empregado em cada troca na diálise foi sempre pelo menos cem vezes maior que o volume de amostra (~1 L). Após a diálise, a proteína foi novamente armazenada na geladeira a ~4 °C.

Foi preparada uma solução estoque do agente redutor *TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine)* em tampão 100 mmol·L⁻¹ de fosfato de sódio pH 7.0, a uma concentração da ordem de 0.1 a 1 mol·L⁻¹. Para reduzir possíveis pontes dissulfeto formadas

entre os grupos tiol alvos das proteínas, adicionou-se um excesso molar de dez vezes de *TCEP* a partir de seu estoque à proteína recém dialisada, sendo que essa estava a uma concentração de, no mínimo, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0.23 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Agitou-se a mistura reacional em *vortex* e deixou-se a reação ocorrer de 15 a 30 min a $\sim 4^\circ\text{C}$, tendo em vista sua rápida cinética.

Preparou-se uma solução estoque de *Acrylodan* em DMSO, a uma concentração de, pelo menos, $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Um microlitro desse estoque foi diluído mil vezes em H_2O deionizada e o espectro de absorção molecular dessa nova solução foi obtido a temperatura ambiente em um espectrofotômetro UV-Vis *Cary® 50* (*Varian, Palo Alto, United States*), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm. Com isso, calculou-se a concentração do fluoróforo no estoque e o fator de correção *CF* para o *Acrylodan* em água, com base em sua absorbância em 280 nm e na absorbância no comprimento de onda de absorção máximo (360-390 nm).

Um excesso molar de cinco vezes de *Acrylodan* a partir de seu estoque foi adicionado à enzima reduzida com *TCEP*. Esse último não foi eliminado do meio reacional antes da reação de marcação porque é pouco reativo com sondas reativas com tiol, uma vez que não possui enxofre em sua estrutura. Permitiu-se que a reação de marcação prosseguisse até o dia seguinte em câmara fria a $\sim 4^\circ\text{C}$, sob agitação constante em agitador orbital.

Para eliminar o excesso de *Acrylodan* não reagido e trocar o tampão da proteína marcada para um mais adequado, essa foi submetida à diálise contra tampão de armazenamento ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio com $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, pH 6.0), de acordo com o mesmo procedimento de diálise supracitado.

Para (1) confirmar a marcação da proteína com *Acrylodan* e (2) verificar se a proteína mutante D119C (o primeiro mutante expresso) não marcada estava formando dímeros pela formação de ponte de dissulfeto, amostras dessas proteínas, em conjunto com a proteína tipo selvagem marcada e não marcada com *Alexa Fluor® 488* (como referências), foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes modificado, um método híbrido entre o de gel nativo e o de gel desnaturante. Nesse método, o *SDS* é mantido para que as proteínas sejam carregadas negativamente e possam migrar em direção ao ânodo, enquanto a adição de agentes redutores e aquecimento são evitados para impedir a redução das pontes dissulfeto entre duas xilanases D119C ou a ligação entre uma xilanase D119C e o *Acrylodan*.

O gel de empacotamento foi composto de tampão Tris-HCl $0.131 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.8, 0.1% de *SDS*, $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de persulfato de amônio, 0.25% de *TEMED* e 4% de poliacrilamida; o gel de separação foi composto de tampão Tris-HCl $0.375 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.9, 0.1% de *SDS*, $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de persulfato de amônio, 0.25% de *TEMED* e 8.75% de poliacrilamida; o tampão de

corrida foi composto de Tris-HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, glicina $0.077 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SDS 0.1%, pH 8.3. As proteínas foram tratadas com tampão de amostra sem agente redutor e não foram aquecidas previamente à sua aplicação no gel, para evitar a redução das pontes dissulfeto ou das ligações entre proteína e fluoróforo. Após cerca de 1 h de eletroforese a 200 V, a posição das proteínas fluorescentes no gel foi determinada através de análise em um transiluminador de luz UV. Só então o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (DAVIS, 1964; SAMBROOK; W. RUSSEL, 2001).

Os resultados experimentais obtidos no experimento acima sugeriram que nem todo fluoróforo livre havia sido eliminado por diálise da proteína marcada. Por esse motivo, essa foi submetida à purificação por cromatografia de exclusão molecular conforme o procedimento a seguir.

Seis mililitros da proteína marcada dialisada ($\sim 0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram concentrados em concentrador *Vivaspin 6* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) com membrana de corte de 10 kDa, até um volume entre 500 e 1000 μL , conforme recomendações do fabricante e a 4°C . Essa proteína concentrada foi submetida à purificação por cromatografia de exclusão molecular, utilizando um sistema de purificação de proteínas *ÄKTA* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) e uma coluna *Superdex 75* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) equilibrada com o tampão de armazenamento, onde a proteína estava antes da marcação (100 mmol L^{-1} de fosfato de sódio com $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, pH 6.0). A proteína foi eluída a temperatura ambiente com esse mesmo tampão e a eluição foi acompanhada através da medida constante da absorbância a 220, 280 e 385 nm. As proteínas eluídas foram imediatamente armazenadas em geladeira a $\sim 4^\circ\text{C}$. Uma vez que esse método foi eficiente na separação das sondas livres, ele também foi aplicado para todos os outros mutantes (N54C, R122C e N151C), sem a necessidade de diálise antes da purificação por *FPLC*.

O grau de marcação das proteínas foi determinado através do mesmo método empregado para a marcação da proteína tipo selvagem com *Alexa Fluor® 488* (equações 1 e 2) e utilizando o coeficiente de absortividade molar do *Acrylodan* em água a 360 nm ($\epsilon = 12\,900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), a massa molar dos mutantes, e o fator de correção calculado através da obtenção do espectro do fluoróforo livre.

3.7.3. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol

AttoOxa11

Para medidas de difusão, interação e imagem das xilanases mutantes por *FCS*, *PET-FCS* e *FLIM*, essas proteínas foram marcadas em seus respectivos grupos tióis com a sonda fluorescente reativa com tiol *AttoOxa11* (*ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany*), conforme protocolo do fabricante, com algumas modificações.

Uma solução de xilanase mutante contendo pelo menos 1 mg de proteína purificada foi dialisada contra tampão $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio pH 7.25, utilizando uma membrana de diálise *Spectra/Por* (*SPECTRUM® LABORATORIES, INC, Rancho Domingues, United States*) de corte de 10 kDa, sob agitação magnética em câmara fria a $\sim 4^\circ \text{C}$. O tampão de diálise foi trocado de três a quatro vezes em um período de 24 a 48 horas, sendo a última troca mais demorada (até o dia seguinte). O volume de tampão empregado em cada troca na diálise foi sempre pelo menos cem vezes maior que o volume de amostra. Após a diálise, a proteína foi novamente armazenada na geladeira a $\sim 4^\circ \text{C}$.

A proteína em tampão bicarbonato de sódio foi concentrada o máximo possível ($2\text{--}8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em concentrador *Vivaspin* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) com membrana de corte de 10 kDa, conforme recomendações do fabricante e a 4°C .

Foi preparada uma solução estoque de $\sim 7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ da sonda fluorescente reativa com tiol *AttoOxa11* em DMSO, em um volume final de $\sim 200 \mu\text{L}$. Uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ dessa solução foi diluída em H_2O deionizada e sua absorbância em 658 nm foi medida a temperatura ambiente em um espectrofotômetro UV-Vis *Cary® 50* (*Varian, Palo Alto, United States*), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, para estimar a concentração exata do fluoróforo na solução estoque, com base no fator de diluição, em seu coeficiente de absorvidade molar no comprimento de onda utilizado ($\epsilon = 125\,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e em sua massa molecular ($\text{MM} = 720 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

A proteína concentrada foi centrifugada por 10 min a 4°C para eliminar proteína precipitada, e então adicionou-se um excesso molar de 3–5 vezes de *TCEP* a partir de uma solução estoque de $0.1\text{--}1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para reduzir qualquer ligação envolvendo os grupos tióis. Em seguida, adicionou-se um excesso molar da sonda fluorescente de 5–10 vezes. A reação foi incubada até o dia seguinte a $\sim 4^\circ \text{C}$ em câmara fria sob agitação constante em agitador orbital.

Para eliminar o excesso de sondas fluorescentes não reagidas, as proteínas foram purificadas por *IMAC*, tal como no processo de purificação descrito na seção 3.4. Para eliminar

o excesso de imidazol, as proteínas foram dialisadas em tampão de diálise/armazenamento, tal como descrito na mesma seção.

O grau de marcação da proteína foi determinado através da obtenção de seu espectro de absorção molecular de 250 a 900 nm a temperatura ambiente em um espectrofotômetro UV-Vis Cary® 50 (*Varian, Palo Alto, United States*), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, e através do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific, Waltham, United States*). A partir desse espectro, obtiveram-se a absorbância da proteína e da sonda conjugada a ela em seus comprimentos de onda de absorção máxima, a 280 e 658 nm, respectivamente. Sabendo-se o fator de correção para a sonda fluorescente ($CF = 0.09$), calculou-se a absorção corrigida da proteína marcada a 280 nm através da **equação 1**.

Tendo em mãos essa absorbância corrigida, calculou-se a concentração da proteína marcada na solução, em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, com base na lei de Lambert-Beer, uma vez conhecidos sua massa molecular e seu coeficiente de absortividade molar teórico. Finalmente, calculou-se o grau de marcação da proteína através da **equação 2**.

3.8. Marcação das xilanases mutantes com a sonda de spin MTSSL

Os mutantes de XynA purificados por IMAC foram concentrados para uma concentração entre $1\text{--}8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em um filtro de centrífuga com membrana de corte de 10 kDa, nas mesmas condições descritas anteriormente. No intuito de eliminar possíveis agregados de proteína, as amostras foram centrifugadas como descrito, antes e após o passo de concentração.

Para reduzir possíveis pontes dissulfeto entre as proteínas, ou qualquer outra ligação entre os grupos tióis e algum contaminante, DTT foi adicionado às amostras para uma concentração final de $3\text{--}5 \text{ mM}$, e a redução foi permitida ocorrer por pelo menos 2 horas a 4°C , sob agitação suave e contínua. No intuito de eliminar o excesso de DTT, o tampão das proteínas foi trocado com uma coluna de dessalinização de 5 mL *HiTrap Desalting Column* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) pré-equilibrada com o tampão de armazenamento e acoplado no mesmo sistema ÄKTA descrito anteriormente.

Imediatamente após a eluição das proteínas, a sonda de spin reativa com tiol MTSSL ((*1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl*) methanethiosulfonate) foi adicionada com um excesso molar de 3 vezes a concentração das proteínas. A reação de marcação levou $4\text{--}5$ horas a 4°C com agitação suave e contínua. Após a reação, as proteínas – agora marcadas – foram

novamente concentradas e centrifugadas como descrito anteriormente, visando um volume final de até 1 mL e maior concentração possível (normalmente um máximo de $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). No intuito de remover o excesso de sonda que não reagiu e qualquer imidazol remanescente, as proteínas marcadas foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna *Superdex 200* (ou 75) (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*) pré-equilibrada com tampão de armazenamento e acoplada ao sistema *ÄKTA* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*), pelo qual a eluição da proteína no mesmo tampão foi monitorada de acordo com a absorção em 280 nm. O tampão de armazenamento empregado na eluição da proteína na etapa cromatográfica foi esterilizado contra um filtro de $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ e desareado antes de seu uso.

3.9. Ensaio padrão de atividade

A atividade xilanásica foi determinada pela dosagem de açúcares redutores totais através do método do reagente de ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) segundo Miller (1959). Ensaios de atividade enzimática foram realizados a fim de determinar as condições ótimas de reação, para que seja possível trabalhar no intervalo de velocidade inicial (PURICH; ALLISON, 2000, p. 248). Para isso, foi empregado meio reacional contendo 1% de xilano de madeira de faia (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) em tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.0. Noventa e cinco microlitros do meio reacional sem enzima foi pré incubado por 3 min a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para atingir o equilíbrio térmico. A reação foi incubada a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por diferentes tempos (de 2.5 min a 20 min) e quantidades de enzima tipo selvagem ($5 \text{ } \mu\text{L}$ no volume da reação), fixando-se uma variável, e variando-se a outra. A reação foi interrompida pela adição de $100 \text{ } \mu\text{L}$ de reagente de ADNS (possui pH 10 e por isso desnatura a proteína), incubando-se a mistura a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 min logo em seguida. Após resfriamento em gelo por 5 min, a mistura reacional foi acrescida de 1 mL de H_2O deionizada, agitada em *vortex* e centrifugada a uma velocidade de rotação de 13200 rpm por 5 min. Em seguida, foi feita a leitura das absorbâncias em 540 nm em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm em um espectrofotômetro UV-Vis *Cary® 50* (*Varian, Palo Alto, United States*). Através da curva analítica da xilose, as medidas de absorbância foram convertidas em atividade. Para os testes com arabinoxilano, substituiu-se o xilano por 0.5% de arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*) (m/v).

Em alguns experimentos, o meio reacional foi acrescido de $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA e 0.05% do detergente *TWEEN® 20* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) (v/v), para testar condições que mimetizam as condições de algumas medidas de *FCS* descritas na literatura, tendo em vista que evitam deposição da proteína na superfície da lamínula e reduzem a interação do meio com o vidro. A temperatura de 25°C foi escolhida por ser a temperatura de trabalho nos ensaios de microscopia, fluorescência e *EPR*. Algumas medidas foram feitas a 55°C (temperatura de atividade ótima da xilanase tipo selvagem) ao invés de 25°C .

3.10. Atividade relativa das xilanases marcadas e não marcadas

Um mutante que apresenta atividade diferente da tipo selvagem numa mesma temperatura e/ou pH de reação sugere que a mudança estrutural introduzida pela mutação causou variações consideráveis na dinâmica catalítica da enzima. Por esse motivo, foram feitas medidas de atividade enzimática, conforme descritas na **seção 3.9**, de todas proteínas expressas, marcadas ou não, a fim de verificar se as enzimas mutantes apresentaram os mesmos padrões de atividade que a enzima tipo selvagem. Foi utilizada uma concentração final de enzima de $20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ para os primeiros ensaios de atividade enzimática (1% de xilano de madeira de faia (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) (m/v)), e de $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ para os ensaios mais recentes (0.5% de arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*) (m/v)).

3.11. Análise da interação das xilanases mutantes marcadas com *Acrylodan* por espectroscopia de fluorescência

Foram obtidos os espectros de emissão de fluorescência para todos os mutantes marcados com *Acrylodan*, em diferentes temperaturas e concentrações de arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*) em tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.0, fazendo-se uso de um fluorímetro estático *F7000* (*Hitachi, Tokyo, Japan*). As medidas de absorbância das amostras para correção de fluorescência foram feitas em um espectrofotômetro *Ultrospec 2100 pro* (*GE Healthcare, Little Chalfont, United*

Kingdom). Foram feitas medidas de anisotropia de fluorescência apenas a XynA-D119C-Acrylodan, pois verificou-se que essa abordagem foi pouco efetiva.

As medidas foram feitas a 20 e 55 °C em uma cubeta de volume reduzido com caminho óptico de 1 cm na direção da excitação e 0.5 cm na direção da emissão, utilizando uma excitação a ~390 nm (comprimento de onda de absorção máxima do *Acrylodan* conjugado com essas proteínas). A concentração de substrato variou de $1.0 \cdot 10^{-4} \%$ até 1.0% (m/v). Mais de 480 µL do substrato eram adicionados à cubeta, que era resfriada ou aquecida durante pelo menos 3 min por um sistema de banho circulatório já equilibrado na temperatura desejada. Em seguida, eram feitas cinco varreduras da emissão de fluorescência de 430 a 600 nm (e três varreduras de anisotropia de 480 a 530 nm para a XynA-D119C-Acrylodan). A solução era acrescida de até 20 µL da proteína marcada, dando uma concentração final de $0.3\text{--}1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dessa. Após misturar bem, as mesmas medidas de espectro de emissão e anisotropia eram feitas imediatamente, seguidas por uma medida da absorção da amostra no espectrofotômetro através das duas direções da cubeta.

Para corrigir o espectro de emissão de fluorescência da proteína marcada, foi feita inicialmente a média dos espectros dessa e de seus respectivos brancos (emissão de *background* do solvente e substrato). Em seguida, esses foram corrigidos para a intensidade incidente reduzida no comprimento de onda de excitação através da multiplicação pelo fator de correção F , que é dado pela equação

$$F = (1 - 10^{-A_{ex}})/2.303A_{ex} \quad \text{Equação 3}$$

onde A_{ex} é a absorbância da amostra no mesmo meio no comprimento de onda de excitação (SUGUNAN, 2012). Esse espectro de *background* corrigido foi então subtraído do espectro de emissão da amostra, obtendo-se então o espectro F_0 . Para corrigir para os efeitos de filtro interno primário e secundário, esse espectro foi multiplicado pelo fator de correção F_{corr} , que é dado pela seguinte equação

$$F_{corr} = 10^{(0.5A_{ex} + 0.5A_{em})} \quad \text{Equação 4}$$

Para corrigir a anisotropia de fluorescência, primeiramente foram identificados os comprimentos de onda de emissão máxima de cada amostra. Em seguida, tirou-se a média da intensidade de fluorescência paralela e perpendicular ao plano de excitação tanto para o branco como para a amostra com proteína marcada, no comprimento de onda de emissão máxima. As

intensidades médias em cada direção do branco foram subtraídas daquelas do substrato. Em seguida, calculou-se a anisotropia de fluorescência A através da seguinte equação:

$$A = \frac{(F_{\parallel} - F_{\perp})}{(F_{\parallel} + 2F_{\perp})} \quad \text{Equação 5}$$

onde $F_{\parallel}$ é a intensidade de fluorescência paralela ao plano de excitação e $F_{\perp}$ é a intensidade de fluorescência perpendicular ao plano de excitação.

Figura 12: Princípios da medida do espectro de emissão de fluorescência do *Acrylodan*.

3.12. Análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinosilano por FCS

A XynA tipo selvagem marcada no amino terminal com a sonda fluorescente *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester* (XynA-N-AF488) teve sua difusão determinada em diversas concentrações de arabinosilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*) em tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ pH 6.0, através do uso de um microscópio confocal de fluorescência com resolução temporal *ZEISS LSM 780* (*Carl Zeiss AG, Jena, Germany*). A aquisição inicial dos dados de FCS foi feita no programa *ZEN*, os dados resultantes foram processados e analisados no programa *PyCorrFit 0.8.6* (MÜLLER; SCHWILLE; WEIDEMANN, 2014) e as imagens finais foram geradas no programa *OriginPro 9.0*.

O fluoróforo em uma gota de solução de ~30 µL sobre uma lamínula de vidro foi excitado com um feixe de laser de 488 nm, 10 µm acima da superfície da lamínula. Foram utilizados uma objetiva do tipo ar-água com aumento de 40X e uma abertura de 32 nm. Espelho

dicroico e filtro de emissão adequados foram empregados para barrar os fótons do comprimento de onda de excitação e coletar somente aqueles provenientes da emissão. As medidas de *FCS* foram feitas a uma concentração de proteína marcada de $\sim 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As concentrações de arabinosilano empregadas variaram de $4.0 \cdot 10^{-4} \%$ até 1.0% (m/v). As medidas foram feitas em triplicatas de 60 ou 120 segundos, a temperatura ambiente ($\sim 19^\circ\text{C}$). Além da difusão da proteína, também foi medida a difusão do fluoróforo livre (ácido carboxílico do fluoróforo) por *FCS* em todas as concentrações de substrato empregadas, para posterior correção do efeito da viscosidade do meio sobre a difusão da proteína. Para tal, foi empregada uma concentração de fluoróforo livre de $\sim 0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As médias das curvas de *FCS* e suas respectivas normalizações foram medidas através do programa *PyCorrFit*.

Previamente à realização das medidas, determinou-se a potência ideal do laser medindo-se a variação do número de contagens de fótons em função da potência do laser, para uma solução de proteína marcada na concentração máxima de substrato. A potência ideal foi determinada para manter a intensidade de emissão alta dentro do regime linear, mas sem exceder a taxa de contagem máxima recomendada de 5 mil contagens por segundo (aproximadamente 8% da potência máxima do laser). Essa solução foi escolhida como ideal por ser, supostamente, aquela em que o fluoróforo fica mais tempo dentro do volume focal e, portanto, está mais sujeito a sofrer fotobranqueamento. Garantindo que esse artefato seja evitado, garantiu-se automaticamente que isso não ocorreria no uso de concentrações menores de substrato (menores viscosidades) e com o fluoróforo livre (maior coeficiente de difusão).

Para o cálculo de raio hidrodinâmico da proteína, utilizou-se a equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad \text{Equação 6}$$

onde D é coeficiente/constante de difusão de uma partícula apresentando movimento Browniano, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade dinâmica do meio, e r_H é o raio da partícula esférica ou raio hidrodinâmico.

Também foi utilizada a relação entre coeficiente de difusão e tempo de difusão:

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D} \quad \text{Equação 7}$$

onde ω_{xy} é o raio axial do volume confocal e τ_D é o tempo de difusão.

Fazendo-se a razão do coeficiente de difusão para duas partículas de raio hidrodinâmico distinto, mas em meio idêntico, podemos obter o raio hidrodinâmico de uma molécula por *FCS* de duas maneiras diferentes, sabendo-se o raio hidrodinâmico e o coeficiente de difusão ou tempo de difusão de uma sonda no mesmo meio:

$$r_{H1} = \frac{D_2}{D_1} r_{H2} = \frac{\tau_{D1}}{\tau_{D2}} r_{H2} \quad \text{Equação 8}$$

onde r_{H1} é o raio hidrodinâmico da partícula 1, r_{H2} é o raio hidrodinâmico da partícula 2, D_1 é o coeficiente de difusão da partícula 1, D_2 é o coeficiente de difusão da partícula 2, τ_{D1} é o tempo de difusão da partícula 1, e τ_{D2} é o tempo de difusão da partícula 2. Utilizando-se o *Alexa Fluor®* em solução aquosa a 19 °C como referência, temos que:

$$r_{H1} = \frac{292 \mu m^2 s^{-1}}{D_1} 0.826 nm \quad \text{Equação 9}$$

O volume confocal, parâmetro estrutural, e raio do volume confocal foram determinados através da calibração deste volume com uma medida de *FCS* de uma solução 0.1 nmol·L⁻¹ do fluoróforo livre em água deionizada nas mesmas condições das medidas anteriores. Para isso, foi utilizado o coeficiente de difusão deste fluoróforo em água na temperatura de trabalho (2.92 10⁻¹⁰·m²·s⁻¹ a 19°C).

Para determinar a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, ajustou-se os tempos de difusão experimentais das proteínas marcadas em diferentes concentrações de substrato através do uso da equação deduzida:

$$\overline{\tau_{DS_0}^E} = \tau_E + \frac{19,2 \tau_{D_0}^{AF488} [S]_0}{K_D + [S]_0} \quad \text{Equação 10}$$

em que $\overline{\tau_{DS_0}^E}$ é o tempo de difusão médio da proteína marcada em uma certa concentração de substrato, τ_E é o tempo de difusão da proteína livre (na ausência de substrato), $\tau_{D_0}^{AF488}$ é o tempo de difusão do fluoróforo livre na mesma concentração de substrato, K_D é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato e $[S]_0$ é a concentração de substrato.

3.13. Análise da difusão e interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinoxilano por FCS/PET-FCS

A técnica de *PET-FCS* é capaz de fornecer inúmeras informações relevantes acerca da dinâmica proteica em nível de molécula única. De acordo com as coordenadas atômicas do mutante D119C, calculadas pelo *SWISS MODEL*, (ver **figura 13**), a cisteína da posição 119 se encontra em uma região rica em supressores para *PET*, composta de dois triptofanos (um em torno de 0.8 nm e outro em torno de 1.2 nm de distância) e uma tirosina (em torno de 1.2 nm de distância).

Figura 13: Estrutura tridimensional teórica da XynA-D119C destacando as distâncias dos principais supressores de *PET* em relação a um resíduo de cisteína na posição 119 da proteína. Estrutura gerada pelo *SWISS MODEL* e imagem gerada pelo *PyMOL*.

A sonda utilizada no sistema de *PET* foi a *AttoOxa11*, que tem sido empregada nos principais trabalhos de NEUWEILER *et al* com essa técnica. Para tal, foi adquirida a versão maleimida dessa sonda, que é reativa com tiol, e foi empregada para marcar as xilanases mutantes. Essa sonda sofre supressão por triptofano através de *PET*, dispensando a necessidade de marcação com outras sondas, como no caso do *FRET*. A XynA é rica em triptofanos, dispensando a necessidade de projetar mutantes de triptofano para esse fim (ver **figura 14**).

Figura 14: Princípios da *PET* utilizando a sonda fluorescente *AttoOxa11* e a cadeia lateral do triptofano como supressora.

O mesmo método de *FCS* aplicado na seção anterior foi empregado para analisar a difusão e a interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinosilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*). Entretanto, se tratando de um sistema de *PET-FCS*, esperava observar flutuações na função de autocorrelação decorrentes da dinâmica do domínio polegar (ver **figura 15**). A mesma instrumentação que foi utilizada na seção anterior também foi empregada. Para a calibração do volume confocal e controle de viscosidade, utilizou-se a sonda fluorescente *Atto655-carboxy* (*ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany*). Um feixe de laser de 637 nm foi utilizado para excitar as amostras, ao invés de um feixe de 488 nm.

Figura 15: Comparação entre a função de autocorrelação esperada para a difusão simples de uma proteína, e para a difusão combinada com a dinâmica de supressão de, por exemplo, *AttoOxa11* pelo triptofano.

3.14. Análise da difusão e interação das xilanases mutantes marcadas com *AttoOxa11* em arabinosilano por *FCS/PET-FCS*

Os ensaios de *PET-FCS* foram repetidos para todos os mutantes marcados com *AttoOxa11* em outras condições experimentais. Tais proteínas tiveram suas difusões determinadas em tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.0, em 0.5% de arabinosilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*) (m/v), e em 12.5% de glicerol (m/v), todos contendo a mesma quantidade de tampão. O carboxil correspondente dessa sonda, *Atto655-carboxy* (*ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany*), foi empregado nas mesmas soluções para calibração do volume confocal e para controle de viscosidade dos meios. As medidas foram feitas em um microscópio confocal de fluorescência resolvido no tempo com sensibilidade de molécula única *MicroTime 200* (*PicoQuant, Berlin, Germany*). As aquisições fizeram uso de dois detectores, para que o modo *cross-correlation* fosse empregado para corrigir os efeitos de *afterpulsing*, entre outros artefatos experimentais. As curvas foram, em sua maioria, ajustadas com um modelo de difusão pura de uma espécie no software *SymPhoTime 32*.

Aproximadamente $30 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra foram aplicados sobre uma lamínula de vidro montada sobre uma objetiva de imersão de água com aumento de 60x e abertura numérica (NA) de 1.2. A amostra foi excitada com um feixe de laser contínuo de 640 nm, cujo foco foi ajustado para dentro da amostra, $20 \text{ } \mu\text{m}$ acima da superfície da lamínula. O filtro de emissão *z636/10x* e o espelho dicróico *z638rdc* foram empregados para barrar os fótons do comprimento de onda de excitação e coletar somente aqueles provenientes da emissão. A potência de saída do laser foi ajustada em 100%, mas reduzida na unidade combinada de laser, de modo que a potência óptica foi de $\sim 33 \text{ } \mu\text{W}$ após passar pelo espelho dicróico. O *pinhole* utilizado foi de $50 \text{ } \mu\text{m}$.

As medidas de *FCS* foram feitas a uma concentração de proteína marcada de $\sim 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. As medidas de calibração do volume focal ou para controle da viscosidade com sondas livres duraram 5 min. As medidas de proteínas livres, em tampão, duraram 10 min, devido ao menor rendimento quântico da sonda ligada à proteína. As medidas das proteínas em glicerol e, principalmente, em arabinosilano, foram feitas pelo menos em triplicatas de aproximadamente 3 min cada, devido ao aparecimento de artefatos na curva de autocorrelação em tempos muito longos. A temperatura durante as análises foi a ambiente ($\sim 25 \text{ } ^\circ\text{C}$). A potência óptica do laser foi configurada em $\sim 33 \text{ } \mu\text{W}$ por ser a mais alta possível sem promover a formação de estados tripleto no *Atto655/AttoOxa11*, além de não exceder o limite recomendado da taxa de

contagem (menor que cem mil contagens por segundo). Para a determinação do volume confocal, foi utilizado o coeficiente de difusão da literatura do *Atto655-carboxy* (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany) em solução aquosa a 25 °C ($425 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Com base na **equação 8**, formulou-se a **equação 11**, e então foi determinado o raio hidrodinâmico das proteínas trabalhadas, no intuito de avaliar, principalmente, se elas estavam devidamente marcadas. Utilizou-se o *Atto655-carboxy* em solução aquosa a 25 °C como referência:

$$r_{H1} = \frac{425 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}}{D_1} 0.576 \text{ nm} \quad \text{Equação 11}$$

Através do mesmo raciocínio, podemos determinar a viscosidade de um meio com glicerol ou com arabinosilano a 25 °C, uma vez que meçamos a difusão do fluoróforo livre nessas soluções:

$$\eta_1 = \frac{425 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}}{D_1} 0.89 \text{ mPa} \cdot \text{s} \quad \text{Equação 12}$$

3.15. Produção de filmes de arabinosilano

Foram empregados dois métodos modificados de preparo de filmes de polissacarídeos na tentativa de obterem-se filmes de xilano de madeira de faia (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) e arabinosilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*). O primeiro método foi baseado no preparo de filmes comestíveis baseados em arabinosilano por Péroval et al. (2002). O segundo método foi baseado no preparo de biofilmes de xilano por Gonçalves (2011). Ambos os métodos foram empregados para os dois polissacarídeos estudados (xilano e arabinosilano).

Antes da aplicação de cada método, o arabinosilano foi dissolvido em etanol a uma concentração de aproximadamente $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O xilano não recebeu tratamento adicional. No primeiro método foi preparada uma mistura de $0.16 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ do polissacarídeo em água deionizada. Essa mistura foi aquecida em um béquer durante 40 min a 75 °C com agitação magnética constante. Durante o aquecimento, acrescentou-se glicerol como agente plastificante

para uma concentração final de 15% (m/m) em relação à massa seca de polissacarídeo. No segundo método preparou-se uma mistura de $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de polissacarídeo em água deionizada. Essa mistura foi aquecida durante 15 min a 70°C com agitação magnética constante.

Para o arabinoxilano, pequenas quantidades de etanol eram adicionadas durante o aquecimento caso houvesse dificuldade de solubilização do polissacarídeo. Para ambos os polissacarídeos adicionaram-se pequenas quantidades de água durante o aquecimento para compensar o líquido evaporado. A mistura pastosa resultante foi aplicada em várias superfícies, como lamínulas de vidro, placas de petri de plástico e placas de petri de plástico cobertas com filme plástico. Em seguida, esses recipientes foram incubados em estufa a 37°C até o dia seguinte para evaporar o excesso de água e completar o processo de formação do filme.

3.16. Análise topológica de filmes de arabinoxilano por microscopia confocal de fluorescência

O equipamento empregado nessa parte foi o mesmo dos experimentos de *FCS* para a XynA-N-AF488. Uma objetiva ar-ar com aumento de 200X foi empregada. A aquisição dos dados foi feita através do uso do programa *ZEN*. Um filme de arabinoxilano foi preso entre uma lamínula e uma lâmina de vidro. Esse filme foi excitado com feixes de lasers de 405 e 488 nm e varrido em seu interior para obtenção de imagens e espectro de emissão, no intuito de verificar a presença de autofluorescência. O mesmo filme foi acrescido de $5 \mu\text{L}$ de xilanase-N-AF488 ($\sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e então foi novamente preso entre uma lâmina e uma lamínula. O filme foi excitado com o laser de 488 nm e foi obtida uma imagem tridimensional do mesmo na região exposta à proteína, para analisar a disposição dessa sobre a sua superfície.

3.17. Imobilização de carboidratos e de fibras de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado

Para analisar a afinidade da xylanase por fragmentos e fibras sólidas de substratos e de bagaço de cana desestruturado, esses materiais devem ser primeiramente imobilizados em superfícies de vidro para imagem, tal como lamínulas. A seguir se encontra uma breve descrição

de uma das maneiras mais simples de se imobilizar carboidratos em superfícies de vidro, e que foi utilizada nesse trabalho. Esse método é baseado nas interações intermoleculares entre as superfícies de vidro e os carboidratos, e tem sido utilizado para imobilizar fibrilas de celulose (JUNG et al., 2013).

Uma suspensão de carboidrato (arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*), xilano de madeira de faia (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) ou frações de bagaço de cana tratado) foi adicionada em uma lamínula de vidro, que foi colocada dentro de placas de petri e então incubada até o dia seguinte em uma estufa a 37 °C, para facilitar a secagem do material. Desse modo, os clusters de substrato ou fibrilas foram depositados por gravidade nas lamínulas, e aderiram às mesmas através de interações não covalentes. A superfície foi lavada extensivamente com água para remover carboidratos não ligados, e então incubada para secar novamente. Esse processo de lavagem e secagem foi repetido por 3–5 vezes, no intuito de que ficassem presas às lamínulas somente as partículas fortemente ligadas, evitando assim que elas se desprendessem durante os experimentos de microscopia.

Nesse tipo de procedimento, é recomendável que as superfícies também sejam tratadas com soluções de BSA durante alguns minutos (por exemplo, 1 mg·mL⁻¹ durante 15 min), no intuito de reduzir interações não específicas (não covalentes) entre a enzima estudada e a superfície de vidro. Entretanto, como não foram realizados experimentos de *sm* – que são muito mais sensíveis – com esses carboidratos imobilizados, essa etapa não foi realizada.

As frações de bagaço de cana foram extraídas utilizando dois métodos diferentes (DE SOUZA et al., 2013; ROWLEY et al., 2013), e foram disponibilizadas pela aluna Luana de Fátima Alves.

3.18. Análise por *FLIM* da afinidade da XynA-N151C-AttoOxa11 por frações sólidas obtidas no processo de deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar

Lamínulas de vidro contendo carboidratos do bagaço da cana-de-açúcar tratado imobilizados foram montadas sobre uma objetiva de imersão de água com aumento de 60x e abertura numérica (*NA*) de 1.2. Aproximadamente 30 µL de uma solução contendo 1 µmol·L⁻¹ de XynA-N151-AttoOxa11 em 100 mmol·L⁻¹ de tampão fosfato e sódio pH 6.0 contendo até 500 mmol·L⁻¹ de NaCl foram aplicados sobre a lamínula. As partículas de interesse foram

encontradas utilizando-se, inicialmente, o microscópio óptico convencional. Em seguida, a amostra foi excitada com um feixe de laser pulsado de 640 nm, cujo foco foi ajustado inicialmente em 0 μm da superfície da lamínula. O filtro de emissão $\lambda 636/10x$ e o espelho dicróico $\lambda 638rdc$ foram empregados para barrar os fótons do comprimento de onda de excitação e coletar somente aqueles provenientes da emissão. A potência de saída do laser foi ajustada em 100%, mas reduzida na unidade combinada de laser, de modo que a potência óptica foi de 0.04–0.2 μW após passar pelo espelho dicróico. A frequência de pulsação do laser foi de 25 MHz. Um *pinhole* de 50 μm foi utilizado.

Diversas medidas de *FLIM* foram realizadas nas diversas amostras disponíveis, variando gradualmente a altura das medidas até algumas dezenas de micrômetros acima da superfície vidro-fragmento. Foram obtidas imagens de *FLIM* de um xilano de madeira de faia comercial (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*), de um arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade comercial (*Megazyme, Wicklow, Ireland*), de um filme de arabinoxilano, e de frações de bagaço de cana tratado pelos métodos: Air (DE SOUZA et al., 2013), fração insolúvel em oxalato (DE SOUZA et al., 2013), bagaço deslignificado com NaClO_2 (DE SOUZA et al., 2013), bagaço extraído com H_2O e etanol (ROWLEY et al., 2013) e bagaço depois da extração com DMSO (ROWLEY et al., 2013).

As medidas foram feitas em um microscópio confocal de fluorescência resolvido no tempo com sensibilidade de molécula única *MicroTime 200 (PicoQuant, Berlin, Germany)* utilizando o modo *FLIM/TCSPC*. A maioria das aquisições foram imagens de 80 μm x 80 μm , 256 pixel x 256 pixels (densidade de 3.2 pixels por μm), com tempo por pixel de 0.60 ms, padrão bidirecional, e aceleração de 6%.

As imagens foram tratadas e corrigidas utilizando as ferramentas do software *SymPhoTime 32*, e os tempos de vida médios foram ajustados por uma, duas ou três exponenciais. Os tempos de vida resultantes de cada exponencial foram então fixados para todos os pixels da imagem, e as amplitudes de cada pixel individual para cada tempo de vida foram obtidos. As imagens foram coloridas conforme o tempo de vida de fluorescência médio em cada pixel, e a intensidade das cores foi determinada com base na imagem de intensidade. Em alguns casos, a imagem foi decomposta atribuindo cores para cada tempo de vida específico.

Para comparar a afinidade da xilanase nas diversas amostras, empregou-se a seguinte relação:

$$Afinidade \propto C_f \propto B_f = \frac{\sum A_f}{A_{obj} \times OP}$$

onde C_f é a concentração de fluoróforos ligados nas enzimas em uma área, B_f é o brilho dos fluoróforos ligados nas enzimas nessa área, A_f é a amplitude de um tempo de vida do fluoróforo, A_{obj} é a área do objeto de onde se mede a intensidade/tempo de vida, e OP é a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico.

As áreas dos objetos sobre os quais foi calculado o brilho foram determinadas manualmente usando-se o programa *ImageJ* (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Para comparar os objetos adequadamente, foram utilizados apenas aqueles cuja imagem original possuía 80 μm x 80 μm e 256 pixels x 256 pixels, pois a ampliação da imagem pareceu aumentar o brilho consideravelmente, tornando essas medidas inadequadas para comparação.

O tempo de vida do fluoróforo (*AttoOxa11*) é de 1.8 ns, e o tempo de vida proveniente de artefatos do equipamento tende a ocorrer em torno de 0.75 ns. Portanto, foi considerado no cálculo da somatória de amplitudes do fluoróforo apenas tempos de vida maiores que ~1.3 ns, para excluir tais artefatos.

Para a verificação da qualidade do sistema, em cada dia a potência óptica do laser foi ajustada em ~33 μW e foram feitas medidas de difusão e decaimento de fluorescência do *Atto655-carboxy* ou *AttoOxa11* (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany), que possuem um tempo de vida de 1.8 ns.

3.19. Análise da dinâmica local dos mutantes marcados com *MTSSL* na presença de substratos e produto da reação por *EPR*

Medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram realizadas com um espectrômetro *JOEL FA-200 X-band* (JOEL Ltd., Tokyo, Japan) para a sonda de spin *MTSSL* ligada nas posições dos grupos tióis de cada mutante, em diferentes temperaturas e substratos em tampão 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio (acetato de sódio para beta-glucano) pH 6.0, com concentrações de NaCl variando entre 125 e 250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. As condições de aquisição foram: frequência de modulação de campo, 100 kHz; amplitude de modulação de campo, de 1 a 2 G; largura de varredura, 100 G; potência de microonda, 5 mW.

As medidas foram realizadas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e a 45 °C em capilares de vidro com diâmetro interno de 1 mm. As amostras foram compostas de três

quartos de volume de tampão gelado misturado com um quarto de volume de solução de enzima, ou de 50% de volume de tampão misturado com 50% de volume de enzima. Visou-se utilizar a quantidade máxima possível de substrato, para garantir a saturação da enzima, mas mantendo a mesma com uma concentração ideal para as medidas de *EPR*, com qualidade e tempo de aquisição viável ($>50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Desse modo, para a primeira realização desse experimento utilizando o conjugado XynA-D119C-MTSSL, as concentrações foram: $83.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de enzima para cada mistura, 7.5% de xilano de madeira de faia (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) (m/v), 0.75% de arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (*Megazyme, Wicklow, Ireland*) (m/v), 7.5% de xilose (m/v), e 2.25% de beta-glucano de cevada (m/v). A maioria dos substratos foi dissolvida em tampão fosfato de sódio, exceto pelo beta-glucano, que foi dissolvido em tampão acetato de sódio. A segunda realização desse experimento foi feita apenas a temperatura ambiente e fez uso de todos os mutantes a aproximadamente $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada, utilizando as seguintes concentrações de substrato/produto: 0.75% de xilano de madeira de faia (m/v), 0.75% de arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (m/v), e 0.75% de xilose. Já para a terceira realização desse experimento, foram empregadas as seguintes concentrações: de 50 a $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de mutantes marcados com *MTSSL* (exceto da XynA-D119C, que não participou desse experimento), 0.5% de xilano de madeira de faia (m/v), 0.5% de arabinoxilano de farinha de trigo de baixa viscosidade (m/v), e 0.5% de xilose.

As concentrações dos substratos foram limitadas pelas suas solubilidades características. As medidas na presença de xilose foram realizadas no intuito de verificar uma possível interação entre o produto e a enzima. O beta-glucano foi extraído de cevada (TEMELLI, 1997) e usado como um controle de viscosidade e de ligação ao domínio polegar. Após a mistura, as amostras foram imediatamente submetidas à análise em espectrômetro de *EPR*. Para cada ensaio, de 10 a 15 espectros de 1 minuto foram coletados e acumulados, exceto por alguns experimentos onde o sinal estava muito satisfatório e os espectros foram coletados separadamente. Quando as medidas foram realizadas a 45°C , a temperatura do sistema foi previamente equilibrada com um sistema de banho circulatório durante 5 min.

Para normalizar os espectros de *EPR*, foi utilizado o método de integração de espectro. Para isso, cada espectro foi integrado duas vezes e, então, o maior valor encontrado na plotagem final foi utilizado para dividir cada ponto de seu respectivo espectro original.

Figura 16: Esquema do sistema de *EPR* para uma XynA marcada no domínio polegar com a sonda de spin *MTSSL*.

3.20. Caracterização cinética da XynA tipo selvagem a 25 °C

Um mutante que apresenta atividade diferente da tipo selvagem numa mesma temperatura e/ou pH de reação sugere que a mudança estrutural introduzida pela mutação causou variações na dinâmica catalítica da enzima. O mesmo pode ser dito sobre alterações nos parâmetros cinéticos k_{cat} e K_M , que estão diretamente relacionados com a dinâmica e o mecanismo da catálise enzimática. Por este motivo, tais parâmetros foram determinados para a proteína tipo selvagem, assim como a atividade em função do pH e termotolerância, a fim de verificar se as enzimas mutantes estarão apresentando os mesmos padrões de atividade que a enzima tipo selvagem.

3.20.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Foi empregado o mesmo procedimento descrito na **seção 3.9**, mas mantendo-se a temperatura em 55 °C e variando-se o pH do meio reacional. Para isso, foi empregado tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ com pH entre 6.0 e 8.0. Os meios reacionais em meio de experimentos de *FCS* sem enzima (0.3 mg·mL⁻¹ de BSA e 0.05% de *TWEEN*® 20 (*Sigma*-

Aldrich, St. Louis, United States) (m/v)) foram pré incubados por 3 min a 55 °C para atingirem o equilíbrio térmico.

3.20.2. Termoestabilidade

A enzima foi incubada a 25 °C e a cada intervalo de tempo (de 20 a 100 min) uma alíquota foi retirada e submetida à ensaio de atividade enzimática como descrito anteriormente na seção 3.12. Os meios reacionais sem enzima foram pré incubados por 3 min a 25 °C para atingirem o equilíbrio térmico. A temperatura de reação foi mantida em 25 °C e o pH em 6.0. Foi utilizado tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ em condições de experimentos de *FCS* (0.3 mg·mL⁻¹ de BSA e 0.05% de *TWEEN*® 20 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*) (m/v)) e 20 nmol·L⁻¹ de enzima, previamente determinada no ensaio padrão de atividade.

3.20.3. Determinação de parâmetros cinéticos

O mesmo procedimento adotado anteriormente foi empregado. A temperatura foi mantida em 25 °C e o pH em 6.0. Foi usado tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ em condições de experimentos de *FCS* (0.3 mg mL⁻¹ de BSA e 0.05%_{m/v} de *TWEEN*® 20 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, United States*)) e 20 nmol·L⁻¹ de enzima, previamente determinada no ensaio padrão de atividade. Os meios reacionais sem enzima foram pré incubados por 3 min a 25 °C para atingirem o equilíbrio térmico. A concentração de substrato foi variada entre 0.1% e 0.7% (m/v). A partir desses dados, foi feita uma representação de Hanes-Woolf (gráfico de concentração de substrato/velocidade inicial da reação de catálise enzimática versus concentração de substrato), o que permitiu a determinação de k_{cat} , K_M e $V_{m\acute{a}x}$ usando o tratamento matemático apropriado. Nessa representação, a inclinação da reta é igual a $1/V_{m\acute{a}x}$ (de modo que $V_{m\acute{a}x} = 1/\text{coeficiente angular}$), o intercepto no eixo x é igual a $-K_M$ (de modo $K_M = -(\text{coeficiente linear}/\text{coeficiente angular})$) e o intercepto no eixo y é igual a $K_M/V_{m\acute{a}x}$. A obtenção de k_{cat} é feita através da divisão de $V_{m\acute{a}x}$ pela quantidade total de enzima no meio reacional (0.1 pmol).

Resultados

4.1. Química computacional

4.1.1. Planejamento de mutantes simples de cisteína da endo-1,4-beta-xilanase de *Bacillus subtilis* 168

Como resultado da análise descrita na **seção 3.1.1**, foram escolhidos os mutantes D119C, R122C, N151C e N54C. O mutante D119C (ver **figura 17 A**) foi escolhido porque, apesar da exposição do enxofre ser baixa na provável estrutura, experimentos preliminares (RULLER, 2009) utilizando a sonda fluorescente *Acrylodan* foram bem sucedidos. Além disso, essa mutação está presente no domínio polegar. O mutante R122C (ver **figura 17 B**) foi escolhido devido a mutação estar presente no domínio polegar, o grupo tiol ter uma exposição ótima, e a estrutura possuir uma alta qualidade segundo os resultados gerados pelo *SWISS-MODEL*. O mutante N151C (ver **figura 17 C**) foi escolhido devido a sua posição na α -hélice e a exposição do tiol ser considerada muito boa, embora a qualidade da estrutura tenha ficado abaixo da tipo selvagem. O mutante N54C (ver **figura 17 D**) foi selecionado devido a essa mutação se encontrar em uma região de alta estabilidade no domínio dedos e a exposição do tiol ser mediana, embora a qualidade da estrutura, segundo os resultados do *SWISS-MODEL*, seja inferior à qualidade da estrutura da proteína tipo selvagem. Os principais resultados do *SWISS-MODEL* são mostrados para todos os mutantes e para a enzima tipo selvagem na **tabela 11**. Quanto menores os valores de *QMEAN Z-Score* e energia total final, e quanto maior o valor de *QMEANscore4*, maior é a qualidade teórica do mutante.

Tabela 11: Principais resultados do *SWISS-MODEL* para as proteínas tipo selvagem e mutantes

Proteína	<i>QMEAN Z-Score</i>	<i>QMEANscore4</i>	Energia Total Final (kJ·mol ⁻¹)
XynA tipo selvagem	-1.096	0.708	-11 373.385
XynA-N54C	-1.156	0.703	-11 229.156
XynA-D119C	-1.276	0.694	-11 373.574
XynA-R122C	-1.040	0.713	-11 113.247
XynA-N151C	-1.179	0.702	-11 224.589

Figura 17: Estrutura tridimensional dos mutantes de XynA D119C (A), R122C (B), N151C (C) e N54C (D). Os átomos destacados em amarelo representam o enxofre do grupo tiol das cisteínas. Coordenadas atômicas fornecidas pelo cálculo de minimização de energia do *SWISS-MODEL* e imagem gerada no *PyMOL*.

As análises feitas pelo programa *PROPKA 2.0* indicaram que apenas o mutante D119C poderia romper com uma importante interação eletrostática no pH 6.0. Nesse pH, a cadeia lateral do resíduo Asp119 (pK_a 2.45) está negativamente carregada, enquanto a do resíduo Arg73 (pK_a 13.97) está positivamente carregada, permitindo uma interação do tipo íon-íon entre essas duas espécies. Ao substituir o resíduo de Asp119 por uma Cys119, essa interação é perdida. Os outros mutantes não tiveram nenhuma interação eletrostática relevante perdida.

4.1.2. Modelagem molecular de um oligômero de xilose e das sondas *Acrylodan*, *AttoOxa11* e *MTSSL* conjugadas com cisteína

As geometrias otimizadas no vácuo de um oligômero de 11 resíduos de xilose e das sondas *Acrylodan*, *AttoOxa11* e *MTSSL* conjugadas com cisteína foram obtidas por meio da minimização da energia dessas moléculas por um método *ab initio* no pacote de programas *ORCA 3.0.3*. As imagens das estruturas resultantes e suas respectivas isosuperfícies eletrônicas foram geradas no programa *ChemCraft 1.7/PyMOL* (**figura 18**). Os cálculos realizados foram bem sucedidos e as estruturas resultantes podem ser empregadas em novos cálculos, como na parametrização do oligossacarídeo e simulações de dinâmica molecular.

Figura 18: Estrutura tridimensional otimizada no vácuo de um oligômero de xilose (A), do conjugado AttoOxa11-cisteína (B), do conjugado Acrylodan-cisteína (C), e do conjugado MTSSL-cisteína (D). Os cálculos *ab initio* de minimização de energia foram realizados no pacote de programas *ORCA 3.0.3* e as imagens foram geradas nos programas *ChemCraft 1.7/PyMOL*.

Pode-se observar que para o oligômero de xilose a estrutura resultante é bastante assimétrica, com tendência a formar torções. Acredita-se que a assimetria é devida à presença

de múltiplas conformações acessíveis para o oligômero com diferenças de energia muito sutis entre uma e outra. Se a diferença de energia é inferior à capacidade de resolução do método empregado e/ou as estruturas selecionadas em cada passo só diminuem em direção a um mínimo local, de modo a negligenciar mínimos globais, isso poderia explicar a estrutura assimétrica. Já a tendência de formar torções pode refletir uma tendência observada em xilanos naturais de formar hélices únicas e triplas (HALEEM; QAMRUDDIN, 1985).

4.1.3. Simulação de dinâmica molecular da XynA por mecânica molecular

Na simulação de dinâmica molecular da XynA, a etapa de minimização de energia do sistema solvatado e neutralizado foi bem sucedida em um intervalo de tempo de 1000 ps, atingindo um patamar de energia de aproximadamente $-7.5 \cdot 10^5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (ver **figura 19 A**). Após a minimização da energia do sistema, a temperatura do mesmo foi equilibrada com sucesso em torno de 292 K (19 °C) através de uma equilibrção *NVT* de 200 ps (ver **figura 19 B**). Em seguida, uma etapa de equilibrção *NPT* de 200 ps para a equilibrção da pressão do sistema foi realizada com sucesso, resultando em pressão em torno de zero (ver **figura 19 C**). A densidade durante essa equilibrção também se manteve basicamente constante, em torno de 1.0175 g mL^{-1} (ver **figura 19 D**).

Após as duas etapas de equilibrção, foi dado incício à simulação de dinâmica molecular da XynA. Essa simulação levou 17.5 ns, uma escala de tempo onde os principais movimentos moleculares dos domínios da enzima podem ser observados. A partir dos dados da simulação, foi gerado um gráfico de *RMSD* dos átomos da cadeia principal da XynA em função do tempo de simulação em relação ao cristal (ver **figura 20 A**). Pôde-se verificar que a *RMSD* flutuou durante a maior parte do tempo em torno de 0.125 nm. Entretanto, também observaram-se algumas transições abruptas em torno de 5.5 ns e 14.5 ns, que podem ser devidas a mudanças conformacionais. Apesar disso, o *RMSD* dos átomos da cadeia principal da XynA em relação à estrutura média flutuou em torno de 0.06 nm durante a simulação, demonstrando que as variações observadas são pouco significativas (**figura 20 B**).

Figura 19: Principais parâmetros de minimização de energia e equilíbrio do sistema de XynA solvatada e neutralizada em função do tempo de minimização/equilíbrio. A, energia potencial do sistema durante a minimização de energia; B, temperatura do sistema durante a equilibração *NVT*; C, pressão do sistema durante a equilibração *NPT*. D, densidade do sistema durante a equilibração *NPT*.

O raio de giro também ficou praticamente constante durante a simulação, em torno de 1.53 nm no início e 1.525 nm no final (ver **figura 20 C**). A distância periódica mínima no decorrer do tempo também sofreu pouca variação, ficando em uma média de 4.2 nm e alcançando mínimos de até 3.8 nm (ver **figura 20 D**). Uma vez que esses valores são muito maiores que o dobro do raio de corte das interações estipuladas na simulação (1.5 nm), a influência de interações proteína-proteína na simulação pode ser descartada.

Mais importante que as medidas de *RMSD* são as medidas de *RMSF* por resíduo (ver **gráfico 21**). Esse tipo de representação mostra com bastante clareza e de maneira quantitativa a dinâmica de cada resíduo de aminoácido na estrutura proteica.

Figura 20: Parâmetros de estabilidade do sistema durante a simulação de dinâmica molecular da XynA. A, *RMSD* dos átomos da cadeia principal da XynA em relação ao cristal em função do tempo de simulação; B, *RMSD* dos átomos da cadeia principal da XynA em relação à estrutura média durante a simulação; C, raio de giro da XynA em função do tempo de simulação; D, distância periódica mínima em função do tempo de simulação.

Através desse gráfico é possível verificar que as mutações escolhidas para a sondagem da dinâmica catalítica da XynA foram bastante precisas, pois as medidas de *RMSF* são uma representação da dinâmica proteica. Os resíduos utilizados como referência (N54 e N151) apresentaram *RMSF* de até 0.08 nm. Enquanto isso, os resíduos do domínio polegar (D119 e R122) possuem uma *RMSF* de até 0.22 nm. Essa representação pode ser simplificada através da conversão desses valores em cores que classificam os resíduos de aminoácido em relação às suas dinâmicas em uma representação tridimensional da proteína (ver figura 22).

Figura 21: *RMSF* por resíduo da XynA considerando todo o tempo de simulação. Os resíduos marcados em vermelho são aqueles que foram mutados nesse trabalho. O resíduo marcado em verde é um resíduo que apresentou alto *RMSF* na simulação, apesar de esse comportamento não ter sido observado em trabalhos de simulação anteriores.

Figura 22: Estrutura média da XynA a 20 °C e em pH 6.0 com 100 mM de NaCl. A cor vermelha representa os resíduos mais dinâmicos, a cor azul representa os resíduos mais estáveis, e a cor verde representa uma dinâmica intermediária entre o vermelho e o azul. As cadeias laterais explícitas indicam os resíduos de aminoácidos que foram mutados nesse trabalho. O resíduo não explícito F48 é um dos mais dinâmicos da proteína nas condições da simulação, embora não tenha sido empregado no trabalho.

4.2. Mutagênese sítio-dirigida

Primeiramente, foi verificada a sequência do gene da xilanase tipo selvagem contido no DNA recombinante em nossa posse, através de análise de sequenciamento de DNA. Uma vez conhecida com exatidão a sequência do gene da xilanase em nossa posse, iniciou-se a realização das mutagêneses sítio-dirigidas utilizando-se o DNA recombinante contendo tal gene como molde, conforme descrito na seção de material e método.

A reação de mutagênese para a obtenção do mutante R122C foi, aparentemente, bem sucedida, como pode ser observado na **figura 23 A**. O DNA recombinante utilizado como molde possui 5924 pb, o que significa que o produto da reação de PCR deveria ter praticamente o mesmo tamanho. Uma forte banda entre 6000 e 5000 pb sugere fortemente que o produto formado se trata daquele que estava sendo buscando.

Figura 23: Géis de agarose nativo 1.0% dos produtos das reações de mutagênese sítio-dirigida digeridos com *DpnI* e purificados com kit. MM: Marcador de peso molecular. A, produto da reação para a obtenção do mutante R122C, DNA tratado com *GelRed*TM; B, produto da reação para a obtenção do mutante N151C, DNA tratado com *GelRed*TM; C, produto da reação para a obtenção do mutante N54C, DNA tratado com *GelRed*TM; D, produto da reação para a obtenção do mutante D119C, gel revelado com brometo de etídio.

A **figura 23 B** mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose para a reação de mutagênese do mutante N151C. Observa-se uma fraca banda pouco abaixo da banda de 5000

pb em relação ao marcador de peso molecular. Embora esse seja um peso bastante menor do que o esperado, é muito comum o *GelRed*TM causar alterações na migração de DNA durante a eletroforese. Observa-se, também, a formação de um subproduto de alto peso molecular, uma banda de forte intensidade muito próxima da canaleta onde a amostra foi aplicada. Isso sugere a amplificação de algum DNA genômico contaminante.

A **figura 23 C** mostra o gel de agarose para o produto da reação de mutagênese do mutante N54C. Um produto com bom rendimento pode ser observado em torno de 5000 pb, sugerindo que a reação foi bem sucedida. No entanto, houve a nítida formação de um subproduto em torno de 1500 pb.

A **figura 23 D** mostra o gel de agarose para o produto da reação de mutagênese D119C. Como pode ser observado, o produto da reação teve aproximadamente 6 kb, que é o tamanho esperado para este procedimento. Nenhum outro subproduto foi formado, o que sugere que a reação foi bem sucedida.

Após digestão com *DpnI* e purificação, os produtos das PCRs mutagênicas foram transformados em *E. coli* linhagem DH5 α e quatro colônias provenientes de cada transformação foram submetidas à PCR de colônia seguida por eletroforese em gel de agarose 1.0% (**figura 24**).

Figura 24: Gel de agarose nativo 1.0% das PCRs das colônias transformadas com os produtos das PCRs mutagênicas. MM: Marcador de peso molecular. A, mutantes R122C, N54C e N151C, DNA tratado com *GelRed*TM; B, mutante D119C, gel revelado com brometo de etídio.

Pode-se observar que a maioria das PCRs de colônia apresentou fragmentos de DNA próximos do tamanho de interesse (873 pb), o que sugere que a reação de mutagênese sítio dirigida foi bem sucedida. A migração dos DNAs tratados com *GelRed*TM, novamente, apresentou algumas anomalias, o que não se observou no gel que foi revelado apenas com brometo de etídio. Isso reforça a ideia de que os fragmentos de DNA não possuíam tamanho fora do esperado, mas sim que o tratamento com *GelRed*TM diretamente na amostra consistiu em uma metodologia que introduz artefatos nos géis de agarose. Além disso, verificou-se que algumas bandas apresentaram baixa intensidade ou mesmo não puderam ser vistas, o que pode ser explicado por perda de grande quantidade das amostras durante a aplicação.

Foram feitas extrações do DNA plasmidial para todas as amostras de mutantes referentes aos géis de agarose da **figura 24**. Esses DNAs foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA. Através da análise dos resultados destes sequenciamentos utilizando-se os programas *BioEdit*, *ApE* e *Clustal Omega*, confirmou-se a presença do gene da xilanase com as mutações de interesse. Obteve-se todos os mutantes desejados, embora em alguns casos apenas 25% das colônias testadas para um mutante tenham efetivamente apresentado a sequência de interesse. Em alguns casos não houve qualquer mutação, enquanto em outros ocorreram mutações indesejadas em posições totalmente inesperadas, distantes das regiões para onde os *primers* empregados foram planejados. As causas mais prováveis para essas anomalias podem ser a não otimização da temperatura de anelamento para cada *PCR* mutagênica ou a baixa qualidade dos *primers* utilizados nessa, tendo em vista que outros colegas do laboratório relataram problemas com *primers* comprados na mesma empresa. As mutações encontradas nos sequenciamentos podem ser vistas na **tabela 12**.

Tabela 12: Mutações encontradas para cada colônia testada das PCRs mutagênicas transformadas

Mutante	Colônia			
	1	2	3	4
D119C	OK	OK	OK	OK
R122C	OK	OK	OK	Selvagem
N54C	H5Q	Selvagem	OK	OK
N151C	Eletroferograma ruim	H6Q	OK	Eletroferograma ruim

4.3. Expressão das xilanases tipo selvagem e mutantes

As proteínas de interesse foram expressas sob as mesmas condições em *E. coli* linhagem BL21[DE3]pLysS utilizando o sistema dos promotores induzíveis por IPTG, conforme o procedimento descrito na **seção 3.3**. A expressão ocorreu em meio de cultura HDM seletivo (com canamicina e cloranfenicol) durante 5 h a 37 °C e com agitação a uma velocidade de rotação de 180 rpm, com indução por 1.0 mmol·L⁻¹ de IPTG. As DO₆₀₀ de alíquotas da cultura induzida diluídas dez vezes em função do tempo de expressão são mostradas na **figura 25**.

Observou-se que nas duas culturas de expressão a concentração celular foi crescente durante todo o período de indução. Embora a multiplicação celular tenha sido claramente desacelerada no decorrer do tempo para os dois casos, a concentração celular nunca alcançou um patamar ou diminuiu. Isso significa que até o término de ambas expressões as células apresentaram um bom estado fisiológico, já que ainda estavam em fase de multiplicação.

A **figura 26** mostra os géis de *SDS-PAGE* para as culturas de expressão da xilanase tipo selvagem e do mutante D119C em função do tempo de indução.

Figura 25: DO₆₀₀ da cultura induzida para expressão da xilanase tipo selvagem (A) e mutante D119C (B) em função do tempo de expressão em horas.

Figura 26: A, *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida 12.5% para a expressão da xilanase tipo selvagem em função do tempo de indução; B, *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida 15% para a expressão da xilanase mutante D119C em função do tempo de indução.

Observou-se que para ambas expressões não havia proteína de interesse observável no tempo zero de indução, mas que essa começou a aparecer a partir de uma hora de indução (~23 kDa). A concentração da proteína tipo selvagem continuou crescendo até atingir um patamar entre 2 e 3 h de indução, mantendo-se constante a partir daí até o final da expressão. Para o mutante D119C demorou mais tempo para se alcançar o patamar de concentração proteica por célula, apenas em torno de 4 e 5 h de indução. Em todos os casos a concentração da proteína de interesse foi muito maior do que o nível de concentração de outras proteínas celulares individuais, principalmente para o mutante D119C, o que significa que a indução foi eficiente e que ambas proteínas apresentaram toxicidade celular semelhante e baixa. Além disso, não houve diminuição da concentração das proteínas de interesse em nenhum momento, o que significa que as mesmas não foram degradadas pelas células. Os mutantes N54C, R122C e N151C foram expressos da mesma maneira que o mutante D119C, mostrando resultados muito similares.

4.4. Purificação das xilanases

A purificação das proteínas de interesse foi realizada através das técnicas de *IMAC* e cromatografia de exclusão molecular, exatamente conforme o procedimento descrito na **seção 3.4**. A proteína tipo selvagem foi purificada através dos dois métodos, mas os mutantes apenas pelo primeiro, devido à sua afinidade incomum pela coluna cromatográfica de exclusão molecular.

A **figura 27** mostra os géis de *SDS-PAGE* para as etapas de purificação por *IMAC* da proteína tipo selvagem com a resina de níquel de *Sepharose*.

Figura 27: A, *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida 14.0% para (A) as principais etapas de purificação em resina de níquel de *Sepharose* e (B) para a eluição da proteína tipo selvagem. Os números da figura B referem-se à sequência de tubos de proteína eluída.

Na **figura 27 A** pode-se observar que uma quantidade muito pequena da proteína de interesse (~23 kDa) fica retida como corpos de inclusão. Durante a purificação por *IMAC*, a maior parte das proteínas celulares é eluída no *flow-through*, onde uma quantidade muito pequena da proteína de interesse também parece ser eluída junto. A proteína de interesse não é observada na primeira lavagem e apenas uma pequena quantidade dela pode ser vista na segunda lavagem. Uma grande quantidade da proteína é eluída com o tampão de eluição, com praticamente nenhum contaminante observável. Esses dados sugerem uma ótima eficiência de

expressão e purificação, tendo em vista que quase nenhuma proteína fica retida nos corpos de inclusão e que uma grande quantidade é purificada com pouca perda durante o processo.

A **figura 27 B** mostra que a proteína começa a ser eluída a partir da terceira alíquota, tendo seu máximo de concentração em torno do tubo 6 ou 7 e começando a diminuir a partir do tubo 8. Observa-se também com mais clareza que na figura anterior a presença de dois contaminantes principais de alto peso molecular. No entanto, levando em conta a largura e intensidade relativa dessas bandas em relação às daquelas da proteína de interesse, pode-se constatar que sua porcentagem é insignificante.

A **figura 28 A** mostra as absorvâncias referentes às alíquotas da proteína de interesse eluída. Observa-se que, de fato, a proteína passa a ser obtida efetivamente a partir do tubo 3, mas que sua concentração cai drasticamente apenas a partir do tubo 12. Desse modo, as alíquotas dos tubos 3 ao 11 foram combinadas para dar continuidade aos experimentos com a proteína.

Figura 28: Concentração de XynA tipo selvagem eluída em mg·mL⁻¹ em função do número da alíquota coletada. A, resina de níquel de *Sephacrose*; B, resina de níquel *HisLink*TM (sílica).

A **figura 28 B** mostra o resultado do mesmo procedimento referente à **figura 52**, mas utilizando a resina de níquel *HisLink*TM, de sílica, ao invés da *Sephacrose*. Pode-se observar que ambas resinas apresentaram essencialmente o mesmo comportamento.

Na **figura 29** encontra-se o cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da xilanase tipo selvagem (23 kDa), assim como da anidrase carbônica (29 kDa) e do *Blue Dextran* (2000 kDa) para comparação.

Figura 29: Cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da xilanase tipo selvagem (23 kDa), da anidrase carbônica (29 kDa) e do *Blue Dextran* (2000 kDa) em uma coluna *Superdex 75* em um sistema de purificação de proteínas *ÄKTA*.

Verificou-se que, embora a xilanase tipo selvagem tenha sido efetivamente separada por esse método, ela eluiu em um volume acima do esperado para a sua massa molecular, como se a proteína tivesse aproximadamente 16 kDa ao invés de 23 kDa. Esse comportamento pode ser atribuído a uma afinidade da enzima pelo material da coluna, já que esse fenômeno não é incomum para outras glicosil hidrolases, principalmente com resinas derivadas de carboidratos.

A **figura 30** mostra os géis de *SDS-PAGE* para as etapas de purificação por *IMAC* da proteína mutante D119C com a resina de níquel de *Sepharose*. Os resultados foram essencialmente os mesmos que foram observados para a proteína tipo selvagem: A proteína de interesse foi efetivamente purificada, em grande quantidade e rendimento. O único detalhe é que, nesse caso, uma quantidade notável da proteína ficou retida como corpos de inclusão. Isso sugere que a mutação inserida reduziu a solubilidade da proteína, talvez devido à formação de dímeros através de pontes dissulfeto. De acordo com a experiência em nosso laboratório, dímeros ou proteínas quiméricas tendem a apresentar solubilidade inferior a das proteínas individuais, formando agregados com mais facilidade.

Figura 30: A, *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida 15.0% para (A) as principais etapas de purificação em resina de níquel de *Sepharose* e (B) para a eluição da proteína mutante D119C. Os números da figura B referem-se à sequência de tubos de proteína eluída.

A **figura 31 A** mostra as absorvâncias referentes às alíquotas da proteína mutante D119C. Observa-se que, de fato, as concentrações de proteína correspondem bem ao gel de poliacrilamida da **figura 30 B**. No entanto, a eluição dessa proteína pareceu ocorrer em quantidades muito inferiores às da proteína tipo selvagem, talvez porque estivesse saindo de maneira muito mais espaçada. Isso sugere que esse mutante possa ter algum tipo de afinidade aumentada por essa resina.

A **figura 31 B** mostra o resultado do mesmo procedimento referente à **figura 31 A**, mas utilizando a resina de níquel *HisLink*TM, de sílica, ao invés da *Sepharose*. Pode-se observar que, embora ainda tenha havido uma tendência da proteína eluir de maneira mais espaçada ao invés da concentração cair drasticamente em torno do tubo 12, ela foi eluída em quantidades maiores do que no primeiro caso. Talvez isso seja devido ao fato da base dessa resina ser de sílica, enquanto a da primeira é derivada de carboidrato.

Uma vez determinada a maneira mais apropriada de se purificar a XynA-D119C, os mutantes N54C, R122C e N151 foram purificados do mesmo modo. Os géis de *SDS-PAGE* mostram que todas as purificações foram bem sucedidas (ver **figura 32**).

Figura 31: Concentração de proteína mutante D119C eluída em mg·mL⁻¹ em função do número da alíquota coletada. A, resina de níquel de *Sepharose*; B, resina de níquel *HisLink*TM (sílica).

Figura 32: SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15.0% para as principais etapas de purificação das proteínas mutantes XynA-N54C (A), XynA-R122C (B), e XynA-N151C (C) em resina de níquel de *Sepharose*.

4.5. Análise de estrutura secundária das xilanases por espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Os espectros de CD das proteínas tipo selvagem, mutante D119C e mutante D119C tratado com TCEP foram obtidos como descrito na seção 3.6 (ver figura 33 A). As mesmas

medidas de *CD* foram, então, realizadas para os mutantes restantes (N54C, R122C e N151C), empregando-se $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de cada proteína ao invés de 0.15 (ver **figura 33 B**).

Figura 33: Espectros de *CD* suavizados de 190 a 250 nm das proteínas purificadas. A medidas foram feitas em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm, a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) em um espectropolarímetro *Jasco 810* (*JASCO Inc., Tokyo, Japan*). A, xilanases tipo selvagem, mutante D119C e mutante D119C tratado com TCEP, a uma concentração de $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. B, todas as xilanases mutantes, a uma concentração de $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Verificou-se, com facilidade, que todas as proteínas apresentaram estruturas secundárias muito semelhantes e bem definidas, com as bandas em torno de 218 e 230 nm deixando clara a presença de estrutura beta. A partir da inspeção dos espectros de *CD* foi fácil notar que todas as proteínas estavam bem estruturadas, apresentando todas o mesmo tipo de estrutura secundária, com praticamente a mesma quantidade.

Para estimar com maior precisão as quantidades de estruturas secundárias nessas proteínas, os espectros obtidos foram ajustados através do programa online *DichroWeb*, utilizando as configurações descritas na **seção 3.6**. Os resultados dessa análise podem ser visualizados na **figura 34** e na **tabela 13**. Verificou-se que os dados reconstruídos não se ajustaram bem aos dados experimentais na região entre 210 e 235 nm. Isso pode ser causado por diversos fatores: a concentração de proteína pode não ter sido corretamente determinada; o caminho óptico da cubeta pode ser muito diferente daquele afirmado pelo fabricante; o equipamento pode estar mal calibrado; o *DichroWeb* pode não conter dados que expliquem o comportamento específico dessa proteína.

Figura 34: Espectros de *CD* de 190 a 240 nm ajustados com o programa *DichroWeb*. A, xilanase tipo selvagem; B, xilanase mutante D119C; C, xilanase mutante D119C tratada com *TCEP*; D, xilanase mutante N54C; E, xilanase mutante N151C; F, xilanase mutante R122C.

De acordo com a análise das coordenadas atômicas da xilanase GH11 tipo selvagem pelos programas *STRIDE* e *DSSP*, calculou-se que essa proteína contém de 4 a 5% de alfa hélice e de 62 a 67% de estrutura beta. Porém, de acordo com os resultados do *DichroWeb*, a proteína contém muito mais alfa hélice e muito menos estrutura beta quando comparados com os dados

experimentais de cristalografia de raios-X (**tabela 13**). Essa discrepância nos resultados apresentados pelos dois métodos pode ser devida ao mal ajuste dos dados reconstruídos aos dados experimentais, espectropolarímetro descalibrado, concentração teórica da proteína muito diferente da concentração real, e/ou a proteína simplesmente possui estrutura em solução consideravelmente distinta daquela no cristal.

Tabela 13: Estruturas secundárias calculadas pelo *DichroWeb* de acordo com os dados de *CD* para todas as proteínas não marcadas.

Proteína	Estrutura (%)				NRMSD
	Alfa hélice	Estrutura beta	Voltas	Desordenado	
Tipo selvagem	16	39	9	36	0.059
D119C	15	40	9	35	0.051
D119C tratado com TCEP	15	40	9	35	0.065
N54C	16	39	9	36	0.074
D119C (2ª expressão)	9	46	6	38	0.084
R122C	15	40	9	36	0.086
N151C	16	40	9	36	0.082

4.6. Marcação das xilanases com sondas fluorescentes

4.6.1. Marcação da xilanase tipo selvagem no N-terminal com a sonda fluorescente *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester*

A xilanase tipo selvagem foi marcada em seu terminal amino com a sonda fluorescente *Alexa Fluor 488® 5-SDP Ester*, purificada por cromatografia de exclusão molecular, e analisada por espectroscopia de absorção, de acordo com o procedimento descrito na **seção 3.7.1**. A **figura 35** mostra o cromatograma da purificação proteína marcada. Verificou-se que a proteína foi eluída no volume esperado (~15 mL) e que foi efetivamente marcada, de acordo com a sobreposição das curvas de eluição geradas pela absorção em 280 nm (detecção de proteína) e 495 nm (*Alexa Fluor 488®*). Observou-se também que o excesso de fluoróforo foi separado como dois aglomerados principais, um em torno de 18 mL, e outro em torno de 20.5 mL.

Figura 35: Cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da XynA-N-AF488 (23 kDa) em uma coluna *Superdex 75*.

A **figura 36** mostra a sobreposição dos espectros de absorção molecular da proteína purificada, do fluoróforo livre, e da proteína e do fluoróforo conjugados, além dos espectros de emissão de fluorescência do fluoróforo livre e de seu conjugado com a proteína. Verificou-se que o espectro de absorção do conjugado foi a exata sobreposição dos espectros individuais da proteína e do fluoróforo, e que o perfil de emissão do fluoróforo conjugado na proteína quase não se alterou em relação ao fluoróforo livre.

A partir do espectro de absorção molecular do conjugado xilanase-N-AF488, calculou-se o grau de marcação da proteína, conforme descrito na parte de material e métodos. Obteve-se que 100% da proteína foi marcada com o fluoróforo, embora não se possa dizer com certeza se todas as ligações foram no N-terminal.

Figura 36: Espectros de absorção molecular e de emissão de fluorescência sobrepostos do conjugado xilanase-N-AF488 e das correspondentes moléculas individuais.

4.6.2. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol

Acrylodan

A xilanase mutante D119C foi marcada na posição 119 com o fluoróforo reativo com tiol *Acrylodan*. A proteína livre e seu conjugado foram analisados por *PAGE* nativo modificado e, posteriormente, o conjugado foi purificado por cromatografia de exclusão molecular. A **figura 37 A** mostra diferentes géis de poliacrilamida de *PAGE* da xilanase tipo selvagem, xilanase-N-AF488, mutante D119C (em diferentes etapas de purificação), e finalmente o conjugado XynA-D119C-Acrylodan. Através da iluminação dos géis com luz UV ($\lambda \sim 390$ nm) e detecção da luz da fluorescência ($\lambda > 430$ nm), pôde-se verificar que o mutante D119C foi efetivamente marcado e que seu tamanho foi equivalente ao do conjugado xilanase-N-AF488. No gel mostrado na **figura 37 B** observou-se a presença de possíveis aglomerados de fluoróforo, que foram confirmados através da coloração com *Coomassie*, já que não foi observada nenhuma banda de proteína na mesma posição. Isso indica que as amostras estavam contaminadas com *Acrylodan* não ligado, que não foi eliminado por diálise.

Figura 37: Gel de *PAGE* nativo modificado de diferentes proteínas, marcadas e não marcadas. A, primeira realização do experimento; B, expressões e marcações mais recentes, gel de poliacrilamida 15.0%. A seta marca a posição de um possível aglomerado de fluoróforo.

A coloração com *Coomassie* confirmou que a banda fluorescente de *Acrylodan* tinha peso molecular equivalente à da xilanase tipo selvagem, e que após a reação de marcação essa proteína estava quase totalmente em sua forma monomérica. Verificou-se também que o mutante D119C estava formando pontes dissulfeto, dando origem a dímeros de xilanase. Também é importante notar que mesmo após tratamento com *TCEP*, as pontes dissulfeto são formadas novamente após algumas horas de incubação em geladeira ($\sim 4^{\circ}\text{C}$). Esses resultados explicam a maior insolubilidade observada para essa proteína e o motivo de a mesma ter maior tendência a formar corpos de inclusão, pois dímeros tendem a ser menos solúveis. Esses resultados também sugerem que a melhor abordagem para marcar a proteína é deixar o fluoróforo reagir na presença de *TCEP*, ao invés de retirar esse previamente à reação de marcação.

A **figura 38** apresenta o cromatograma para a purificação da xilanase D119C-Acrylodan. Pode-se observar que a proteína marcada eluiu em torno de 20 mL, um volume maior ainda que o da proteína tipo selvagem. Isso reforça a ideia de que o mutante D119C, por algum motivo, apresenta interação mais forte com as resinas cromatográficas.

Figura 38: Cromatograma para a cromatografia por exclusão molecular da xilanase mutante D119C-Acrylodan (23 kDa) em uma coluna *Superdex 75*.

O cromatograma apresentado na **figura 38** também mostra a presença de uma menor quantidade de uma proteína não marcada eluindo em volume equivalente ao da xilanase tipo selvagem. A explicação mais provável para esse comportamento é que a reação de marcação foi menor que 100%, de modo que a proteína observada em torno do volume de eluição de 15 mL seja a proteína não marcada. Também se observa que em torno do volume de eluição de 26 mL são eluídos aglomerados de fluoróforo livre, comprovando que o mesmo não tinha sido completamente removido por diálise da proteína marcada.

Através do fator de correção ($CF = 0.688 \pm 10\%$) calculado a partir do espectro de absorção molecular do *Acrylodan* livre em água, determinou-se o grau de marcação da proteína como sendo igual a 94%, supondo que a absorção do fluoróforo não tenha sido alterada devido à conjugação com a proteína. O método de marcação baseado no uso de *FPLC* para separar as sondas fluorescentes livres foi, então, empregado com sucesso para marcar todos os mutantes restantes (N54C, R122C e N151C). Em todos os casos, o grau de marcação foi de aproximadamente 90%.

4.6.3. Marcação das xilanases mutantes com a sonda fluorescente reativa com tiol

AttoOxa11

Todas as xilanases mutantes foram marcadas com a sonda fluorescente *AttoOxa11* e purificadas por *IMAC* usando resina de níquel. Após a diálise, os respectivos graus de marcação foram determinados pela varredura de seus espectros de absorção molecular. O grau de marcação da XynA-N54C foi de 69%; XynA-D119C, 20%; XynA-R122C, 63%; XynA-N151C, 20%.

4.7. Marcação das xilanases mutantes com a sonda de spin *MTSSL*

Todas as xilanases mutantes foram marcadas com a sonda de spin *MTSSL*, e então purificadas por *FPLC* para eliminar as sondas livres. Entretanto, o grau de marcação não foi determinado por não haver método estabelecido para se realizar essa tarefa. Além disso, todas as medidas de *EPR* tiveram sinais excelentes quando a proteína estava em concentrações adequadas, sugerindo que as marcações foram bastante eficientes em todos os mutantes.

4.8. Atividade relativa das xilanases marcadas e não marcadas

Foram realizados ensaios de atividade enzimática simples para as diversas etapas de purificação e marcação das proteínas trabalhadas. As atividades relativas com 1.0% de xilano (m/v) para as proteínas tipo selvagem, xilanase-N-AF488, mutante D119C e D119C-Acrylodan são mostradas na **figura 39**. O gráfico permitiu verificar que a atividade específica das proteínas purificadas tendeu a aumentar quanto maior o número de passos de purificação e diálise. Também verificou-se que o mutante D119 purificado por cromatografia de exclusão molecular apresentou atividade igual à da proteína tipo selvagem purificada por *IMAC*. O conjugado D119C-Acrylodan apresentou atividade 44% menor em relação à proteína tipo selvagem purificada por *IMAC*.

Figura 39: Atividades relativas para a XynA tipo selvagem e o mutante XynA-D119C marcado e não marcado em diferentes passos de purificação. *P*, IMAC; *FPLC*, cromatografia de exclusão por tamanho.

A **figura 40** mostra o experimento repetido para o mutante D119C. Foram testadas as atividades da proteína marcada com *Acrylodan* quando o fluoróforo empregado na reação foi dissolvido DMSO e acetonitrila. Observou-se que o tratamento com TCEP mais contribui para a redução da atividade catalítica do que para o seu aumento. Isso significa que, de alguma maneira, a formação de dímeros da xilanase por ligação via domínio polegar não reduz sua atividade, podendo haver, na verdade, um aumento dela. Também foi verificado que, dessa vez, no máximo 15% da atividade catalítica foi perdida após a marcação. Talvez esse comportamento possa ser explicado pelo uso de menores quantidades de solventes como DMSO e acetonitrila no meio reacional e pela menor temperatura de incubação (~4 °C ao invés de ~25 °C).

Figura 40: Atividades relativas da xilanase mutante D119C marcada e não marcada, em diferentes etapas de purificação. *P*, purificação por *IMAC*; *D*, diálise; *TCEP*, tratamento da proteína com *TCEP*.

Todos os mutantes foram expressos, e suas respectivas atividades foram medidas para cada conjugado produzido (todas reações de marcação a ~4 °C e até o dia seguinte para sondas fluorescentes). Foi utilizado como substrato 0.5% de arabinoxilano (m/v) a 55 °C. É possível visualizar a atividade relativa dos conjugados de cada mutante nas **figuras 41 até 44**. É interessante notar que para o conjugado XynA-D119C-Acrylodan a atividade em relação à enzima não marcada foi menor utilizando arabinoxilano como substrato do que utilizando xilano. É possível que esse efeito seja devido a impedimentos estéricos ou outras alterações dinâmicas introduzidas pela presença da sonda no domínio polegar e dos resíduos de arabinose no substrato.

Figura 41: Atividades relativas para o mutante XynA-N54C marcado e não marcado.

Figura 42: Atividades relativas para o mutante XynA-D119C marcado e não marcado.

Figura 43: Atividades relativas para o mutante XynA-R122C marcado e não marcado.

Figura 44: Atividades relativas para o mutante XynA-N151C marcado e não marcado.

4.9. Análise da interação das xilanases mutantes marcadas com *Acrylodan* por espectroscopia de fluorescência

Foram realizadas medidas de espectroscopia de fluorescência e anisotropia de fluorescência da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinoxilano, a 20 e 55 °C. A **figura 45** mostra os espectros de emissão de fluorescência médios corrigidos da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinoxilano a 20 °C. Verificou-se um nítido deslocamento dos espectros de emissão para a esquerda (comprimentos de onda menores) a partir da concentração de 0.01% de arabinoxilano (m/v), até atingir um patamar (comprimento de onda de emissão máxima em 505 nm) em 0.2% do substrato (m/v). Também verificou-se nessa mesma faixa de concentração um nítido aumento da intensidade de fluorescência, que voltou a cair em concentrações maiores de arabinoxilano.

Figura 45: Espectros de emissão de fluorescência corrigidos da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinoxilano em % (m/v) a 20 °C. As linhas tracejadas correspondem às concentrações de substrato dentro da faixa de transição.

A **figura 46** mostra os espectros de emissão de fluorescência médios corrigidos da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinoxilano a 55 °C. Verificou-se um nítido deslocamento dos espectros de emissão para a esquerda (comprimentos de onda

menores) a partir da concentração de 0.001% de arabinosilano (m/v), até atingir um patamar (comprimento de onda de emissão máxima em 502 nm) em 0.5% do substrato (m/v).

Figura 46: Espectros de emissão de fluorescência médios corrigidos da xilanase D119C-Acrylodan em diferentes concentrações de arabinosilano em % (m/v) a 55 °C. As linhas tracejadas correspondem às concentrações de substrato dentro da faixa de transição.

A **figura 47** mostra a variação do comprimento de onda de emissão máxima em função da concentração de arabinosilano a 20 °C e a 55 °C. De acordo com o gráfico **A** dessa figura, o comprimento de onda de emissão máxima da proteína livre é igual a 518 nm e permanece constante até a concentração 0.01% de substrato (m/v), onde começa a variar até chegar em um patamar de 505 nm em 0.2% de substrato (m/v). Já no gráfico **B** da figura, o comprimento de onda de emissão máxima da proteína livre foi de 512 nm e permaneceu constante até a concentração 0.001% de substrato (m/v), onde começa a variar até chegar em um patamar de 502 nm em 0.5% de substrato (m/v). Isso sugere a existência de dois estados principais da xilanase nas duas temperaturas: um quando ela está livre, e outro quando ela está ligada ao substrato.

Figura 47: Gráfico da variação do comprimento de onda de emissão máxima (nm) em função da concentração de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C (A) e a 55 °C (B).

A **figura 48** mostra a variação da intensidade de emissão máxima em função da concentração de arabinosilano a 20 °C e a 55 °C. Esses resultados também sugerem a transição do fluoróforo entre dois estados principais. Entretanto, a 20 °C, ele parece retornar para o estado inicial em concentrações muito altas de substrato (> 0.2% (m/v)). Já a 55 °C, verificou-se na faixa de transição um pequeno aumento da intensidade de fluorescência, mas sem muita correlação. Essa intensidade voltou a cair drasticamente a partir da concentração de 0.5% (m/v). Ainda não se sabe exatamente como esses resultados (nas duas temperaturas) se correlacionam com o anterior.

Figura 48: Gráfico da variação da intensidade de emissão máxima (UA) em função da concentração de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C (A) e a 55 °C (B).

A **figura 49** mostra a variação da anisotropia de fluorescência em função da concentração de arabinosilano a 20 °C e a 55 °C. A 20 °C foi observada uma tendência no crescimento da anisotropia de fluorescência em função do aumento da concentração de substrato. Isso sugere alterações no microambiente do fluoróforo conforme a concentração de substrato aumenta. No entanto, ocorreu uma queda brusca na anisotropia de fluorescência na concentração mais alta de substrato, comportamento para o qual ainda não temos explicação. Já a 55 °C não foi observada correlação entre a anisotropia de fluorescência e a concentração de substrato, comportamento diferente daquele observado a 20 °C. Apesar disso, verificou-se que na concentração mais alta de substrato houve um grande aumento da anisotropia de fluorescência. Em média, a anisotropia foi menor que a 20 °C, comportamento esperado em temperaturas mais altas. Ainda não se sabe exatamente como esses resultados se correlacionam com os anteriores. A **tabela 14** resume grande parte dos resultados mostrados nessa seção.

Figura 49: Gráfico da variação da anisotropia de fluorescência em função da concentração de arabinosilano em % (m/v) a 20 °C (A) e a 55 °C (B).

Tabela 14: Parâmetros de emissão de fluorescência da xilanase mutante D119C marcada com *Acrylodan* na presença e ausência de arabinosilano em duas temperaturas diferentes

Concentração de arabinosilano (% m/v)	Comprimento de onda de emissão máxima (nm)			Emissão máxima (UA)			Anisotropia de fluorescência		
	25°C	55°C	Variação	25°C	55°C	Variação	25°C	55°C	Variação
0	518	512	-6	1724	914	-47,0%	0,3404	0,3547	+4,2%
1,0	505	502	-3	1743	1060	-39,2%	0,3533	0,4195	+18,7%
Variação	-13	-10		+1,1%	+16,0%		+3,8%	+18,3%	

4.10. Análise da difusão e interação da XynA-N-AF488 em arabinosilano por FCS

Foram realizadas medidas de FCS da xilanase-N-AF488 e do AF488 livre em diversas concentrações de arabinosilano em pH 6.0 e 19 °C em um sistema de microscopia confocal de fluorescência com resolução temporal ZEISS LSM 780 com ajuda do software ZEN, como descrito na seção 3.12. Para correção do coeficiente de difusão das proteínas na presença do substrato foram feitas medidas de difusão do fluoróforo livre nas mesmas soluções empregadas para as proteínas. A figura 50 mostra as curvas de autocorrelação para o fluoróforo livre em tampão e em 1.0% do substrato (m/v), ajustadas com um modelo que leva em conta o estado tripleto, uma difusão tridimensional e uma difusão bidimensional (T+3D+2D). Esse modelo foi escolhido porque foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais das medidas de FCS na presença de substrato.

Figura 50: Curvas de autocorrelação do fluoróforo livre em tampão e em 1.0% de arabinosilano (m/v), pH 6.0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D.

Verificou-se que praticamente não houve variação do tempo de difusão do fluoróforo na maior concentração de substrato em relação à concentração zero. Desse modo, considerou-se que o efeito da variação da viscosidade na difusão da proteína devido ao incremento na concentração de substrato poderia ser ignorado. A partir da inspeção desses dados pode-se

verificar facilmente que o tempo de difusão do fluoróforo livre em ambos meios é de aproximadamente 60 μ s.

A **figura 51** compara as curvas de autocorrelação do fluoróforo livre e da proteína em tampão sem substrato, ajustadas com os mesmos modelos supracitados. As formas das curvas de autocorrelação foram semelhantes, evidenciando a presença de apenas estado tripleto e difusão tridimensional em ambos os casos. A proteína livre apresentou difusão em torno de 200 μ s, de modo que seu raio hidrodinâmico r_H pôde ser calculado com base no raio hidrodinâmico do fluoróforo livre (0.826 nm) e em seu tempo de difusão ($\sim$ 60 μ s) utilizando a razão da equação de Stokes-Einstein para as duas espécies (**equação 9**). O raio hidrodinâmico obtido para a proteína foi, portanto, de 2.75 nm. O raio hidrodinâmico teórico com base na massa molecular e na estrutura tridimensional da proteína, desconsiderando-se a presença do fluoróforo, foi de 2.63 nm. Isso é, o raio hidrodinâmico da proteína determinado por FCS foi 4.6% maior do que o teórico.

Figura 51: Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 (Xilanase na legenda) e do fluoróforo livre em tampão, pH 6.0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D.

A **figura 52** compara as curvas de autocorrelação da proteína livre em tampão e em 1.0% de arabinosilano (m/v). Os dados experimentais foram ajustados com um modelo do tipo T+3D+2D, como nos casos anteriores. A partir dessa curva pôde-se observar duas características importantes do sistema sob estudo. Primeiramente, as medidas para a xilanase-N-AF488 em altas concentrações de substrato apresentaram um nível de ruído muito alto,

principalmente em tempos de correlação menores. A mesma tendência foi observada para o fluoróforo livre em substrato. Esse comportamento pode ser explicado por duas observações experimentais importantes: (1) o forte espalhamento de luz e/ou a autofluorescência do arabinoxilano interferiram com as medidas de *FCS*, aumentando significativamente a contagem de fótons e, com isso, o número de moléculas “falsas” no volume confocal, reduzindo a amplitude de *FCS*, o número de contagens por molécula e introduzindo ruídos; (2) O fluoróforo ligado à proteína apresentou contagens de fótons cerca de dez vezes menores que o fluoróforo livre – talvez devido a algum tipo de supressão de fluorescência –, reduzindo a qualidade do sinal de *FCS* pelo baixo número de contagens por molécula. A combinação desses dois fatores levou a menores amplitudes de *FCS* e alto nível de ruído, principalmente para maiores concentrações de substrato.

Figura 52: Curvas de autocorrelação da xilanase-N-AF488 em tampão e em 1.0% de arabinoxilano (m/v), pH 6.0 e 19 °C. As curvas foram ajustadas com um modelo do tipo T+3D+2D.

O segundo detalhe notável é a mudança na forma da curva de *FCS* em concentrações mais altas de substrato. Esse comportamento é devido não somente ao aumento do tempo de difusão pela formação de complexo enzima-substrato, mas também à difusão ocorrer majoritariamente em duas dimensões quanto maior a concentração de substrato. O programa *PyCorrFit* empregado nos ajustes das curvas aos dados experimentais foi incapaz de separar e/ou calcular eficientemente esses efeitos, de modo que não foi possível obter medidas

confiáveis dos tempos de difusão 3D e 2D. Talvez esse problema tenha sido devido ao alto nível de ruído das medidas realizadas.

Se considerássemos a presença apenas do estado tripleto e da difusão tridimensional da proteína em 1.0% de substrato (m/v), o tempo de difusão calculado seria em torno de 300 μ s apenas, enquanto em teoria o tempo de difusão deveria ser de pelo menos 1 ms (>3X maior) considerando que a proteína estivesse 100% do tempo ligada ao substrato e que esse possui um raio hidrodinâmico teórico de 13.7 nm. Nessa hipótese, o raio hidrodinâmico do complexo enzima-substrato seria pelo menos 6 vezes maior que o raio hidrodinâmico da enzima livre. Como consequência, seu coeficiente de difusão seria 6 vezes menor, e o tempo de difusão 6 vezes maior (~1200 μ s, já que a enzima livre difunde em ~200 μ s). Por esse motivo, é necessária a aplicação de uma metodologia que considere a difusão bidimensional e que consiga calculá-la efetivamente.

Além disso, ainda é possível que, devido à orientação provável do substrato com sua deposição sobre a superfície da lamínula, a fração de enzima ligada seja aquela apresentando difusão bidimensional, enquanto a fração de enzima livre apresenta difusão tridimensional (ou parcialmente bidimensional, já que as restrições físicas impostas pelo substrato orientado podem também favorecer a difusão em um plano) (ver **figura 53**).

Figura 53: Sobreposição das curvas de autocorrelação ajustadas das **figuras 50 à 52**. XynA na legenda se refere à xilanase tipo selvagem marcada.

4.11. Análise da difusão e interação da XynA-D119C-AttoOxa11 em arabinoxilano por FCS

Na presença de arabinoxilano, as medidas de FCS da XynA-D119C-AttoOxa11 mostraram um claro aumento do tempo de difusão da proteína e alterações nos perfis das curvas (ver **figura 54**). Esse efeito foi mais evidente do que no caso anterior, com o conjugado XynA-N-AF488. De acordo com os controles empregados usando uma sonda livre (*Atto655-carboxy*), mudanças de viscosidade não explicariam essa diferença, e isso indica que o efeito observado é devido à formação de complexo de xilanase-arabinoxilano. Além disso, pôde-se observar o aparecimento de um movimento bidimensional para a proteína, o que pode ser atribuído à presença de agregados de substrato (que não é homogêneo) ou à formação de filme/deposição de substrato por gravidade. A altura do volume confocal em relação à superfície de vidro (10–20 μm) se encontra na faixa da espessura de filmes de arabinoxilano ($\sim 20 \mu\text{m}$), o que reforça essa possibilidade.

Figura 54: Curvas de autocorrelação de fluorescência para a XynA-D119C-AttoOxa11 (XynA na legenda) e o *Atto655-carboxy* em arabinoxilano. Todas as curvas foram ajustadas com uma função modelo do tipo T+3D+2D. T, presença de tempo de decaimento referente à estado tripleto; 3D, presença de difusão tridimensional (em todas as direções) de partícula fluorescente; 2D, presença de difusão bidimensional (em um plano) de partícula fluorescente.

A complexidade do meio reacional com substrato, que apresenta muitos agregados dinâmicos e espalhamento de luz, além da própria supressão do fluoróforo por *PET* e sua consequente redução de rendimento quântico, impediram uma medida quantitativa confiável de tempos e coeficientes de difusão para a enzima. A dinâmica não pôde ser observada por *PET* nas medidas realizadas. Isso porque o efeito de *afterpulsing* do laser contínuo empregado interfere em tempos de vida muito curtos, onde se observa o fenômeno de *PET*.

4.12. Análise da difusão e interação das xilanases mutantes marcadas com *AttoOxa11* em arabinoxilano por *FCS/PET-FCS*

Foram realizadas medidas pontuais de *FCS* de todos os mutantes marcados com *AttoOxa11*, em tampão 100 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio pH 6.0, em 12.5% de glicerol (m/v) em tampão, e em 0.5% de arabinoxilano (m/v) de trigo em tampão. As aquisições foram realizadas em um microscópio confocal de fluorescência resolvido no tempo com sensibilidade de molécula única *MicroTime 200* (*PicoQuant, Berlin, Germany*) utilizando o modo *cross-correlation*. A excitação foi feita por um feixe de laser contínuo de 640 nm com potência óptica após passagem pelo espelho dicróico de 33 μ W. A altura do foco foi de +20 μ m para dentro da amostra em relação à superfície do suporte de vidro. A aquisição de dados foi realizada depois de pelo menos um ajuste manual do alinhamento do sistema, seguido pela calibração do volume confocal utilizando a sonda *Atto655-carboxy* livre. Um exemplo de calibração pode ser visualizado na **figura 55**. Através dessa calibração determinou-se, então, o volume confocal como sendo de 1.063 fL fixando-se o coeficiente de difusão da sonda a 25 °C (425 μ m²·s⁻¹).

As medidas de *FCS* ajustadas para o conjugado XynA-N151C-*AttoOxa11* podem ser visualizadas na **figura 56**. A média do tempo de difusão ($\bar{\tau}_1$) e do coeficiente de difusão ($\overline{D}_1$) para a enzima livre em tampão foram 172.0 μ s $\pm$ 5.0% e 118 μ m²·s⁻¹ $\pm$ 18.5%, respectivamente. Usando os coeficientes de difusão obtidos, e o coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico da sonda livre, calculou-se o raio hidrodinâmico da enzima livre em tampão (r_H) com a relação de Stokes-Einstein (**equação 11**), resultando em um valor de 2.16 nm $\pm$ 19%. Esse raio hidrodinâmico é 18% menor que o previsto teórico (2.63 nm), o que indica que a difusão observada nas medidas de *FCS* foram apenas da proteína marcada, embora exista uma chance de ter havido fluoróforo livre.

Figura 55: Calibração do volume confocal através do ajuste da curva de autocorrelação de fluorescência com um modelo de difusão pura de uma espécie. Foi utilizado o fluoróforo *Atto655-carboxy* como padrão em solução aquosa a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). O tempo de aquisição foi de 5 min. V_{Eff} , volume efetivo; τ_1 , tempo de difusão; D_1 , coeficiente de difusão; $\langle C \rangle$, concentração média de moléculas fluorescentes; $\langle N \rangle$, número médio de moléculas fluorescentes dentro do volume confocal; κ , parâmetro estrutural; z_0 , raio axial; w_0 raio radial; χ^2 , parâmetro de otimização no ajuste dos mínimos quadrados.

Em seguida, foram realizadas medidas de *FCS* para a XynA-N151C-AttoOxa11 em 0.5% de arabinosilano (m/v) de trigo. A alta afinidade da enzima pelo substrato e a complexidade da amostra em si, aumentaram drasticamente o tempo de difusão da enzima e tornaram o gráfico muito ruidoso, sendo impossível uma análise. Por esse motivo, esses dados não estão apresentados aqui.

O equipamento foi novamente ajustado, e o volume confocal determinado (ver **APÊNDICE A**). Em seguida, foi feita a medida da difusão do fluoróforo livre na presença de arabinosilano 0.5% (m/v) (ver **figura 57**), no intuito de determinar a viscosidade desse meio e, dessa maneira, descontar o efeito da viscosidade na difusão das enzimas em substrato. O tempo de difusão e o coeficiente de difusão médios do *Atto655-carboxy* em 0.5% de arabinosilano (m/v) de trigo foram $58.5 \mu\text{s} \pm 2.6\%$ e $301.5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \pm 9.10\%$, respectivamente. Sabendo-se o coeficiente de difusão da sonda em água e a viscosidade da água a 25°C , utilizou-se a razão da relação de Stokes-Einstein (**equação 12**) para a sonda em água e em arabinosilano para calcular a viscosidade da solução 0.5% de arabinosilano de trigo (m/v), que teve um valor de $1.27 \text{ mPa} \cdot \text{s} \pm 8.1\%$. Essa é uma viscosidade 43% maior que a da água a 25°C (0.89 mPa

s), o que, de acordo com a relação de Stokes-Einstein, deve reduzir o coeficiente de difusão de uma partícula em 30% em relação à difusão dessa mesma partícula em água.

A

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 171.2 \mu\text{s} \\ D_1 &= 91.0 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 2.79 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 1.43 \\ \kappa &= 9.8272 \\ z_0 &= 2.4529 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.2496 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 0.6994\end{aligned}$$

B

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 161.9 \mu\text{s} \\ D_1 &= 144.5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 1.96 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 1.01 \\ \kappa &= 5.3409 \\ z_0 &= 1.6336 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3059 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 0.9947\end{aligned}$$

C

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 182.8 \mu\text{s} \\ D_1 &= 118.3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 1.43 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.73 \\ \kappa &= 6.0088 \\ z_0 &= 1.7671 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.2941 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 1.3633\end{aligned}$$

Figura 56: Curvas de autocorrelação de fluorescência da XynA-N151C-AttoOxa11 em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). As três curvas foram ajustadas com o modelo de difusão pura de uma espécie. O tempo de aquisição foi de 5–10 min cada.

Figura 57: Curvas de autocorrelação de fluorescência do *Atto655-carboxy* com 0.5% de arabinoxilano (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Todas as curvas foram ajustadas com o modelo de difusão pura de uma espécie. O tempo de aquisição foi de 5 min cada.

Em seguida, uma nova calibração foi realizada (ver **ANEXO B**). A medida da difusão da sonda livre também foi realizada em 1.0% de arabinoxilano de trigo (m/v) (ver **figura 58**). Os parâmetros de difusão do fluoróforo e a viscosidade do meio foram então obtidos. O tempo de difusão, coeficiente de difusão e viscosidade foram, respectivamente, $59.9 \mu\text{s} \pm 3.1\%$, $320.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \pm 4.03\%$ e $\eta_1 = 1.18 \text{ mPa} \cdot \text{s} \pm 3.2\%$. Esse valor de viscosidade é 33% maior que o da água, e similar àquele encontrado para a solução 0.5% de arabinoxilano (m/v) ($1.25 \text{ mPa} \cdot \text{s}$). Isso significa que a solução do arabinoxilano de trigo parece alcançar um patamar de viscosidade com o aumento da concentração desse polissacarídeo. Uma outra possibilidade é que a presença de ruídos provenientes do espalhamento de luz/autofluorescência do substrato tenham gera artefatos na medida.

A

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 61.7 \mu\text{s} \\ D_1 &= 318.4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.975 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.606 \\ \kappa &= 8.4044 \\ z_0 &= 2.3560 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.2803 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 1.6515 \\ \chi^2 &= 0.996\end{aligned}$$

B

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 60.1 \mu\text{s} \\ D_1 &= 309.4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.698 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.433 \\ \kappa &= 9.1255 \\ z_0 &= 2.4889 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.2727 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 2.3091 \\ \chi^2 &= 1.222\end{aligned}$$

C

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 58.0 \mu\text{s} \\ D_1 &= 334.9 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.666 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.414 \\ \kappa &= 8.5508 \\ z_0 &= 2.3833 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.2787 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 2.4178 \\ \chi^2 &= 1.222\end{aligned}$$

Figura 58: Curvas de autocorrelação de fluorescência do *Atto655-carboxy* com 1.0% de arabinosilano (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~25 °C). Todas as curvas foram ajustadas com o modelo de difusão pura de uma espécie. O tempo de aquisição foi de 5–10 min cada.

Para checar a extensão dos artefatos produzidos pelo substrato, foram medidas as curvas de autocorrelação de fluorescência de soluções 0.5 e 1.0% de arabinoxilano (m/v) de trigo, no intuito de verificar como a autofluorescência e espalhamento de luz desse substrato pode afetar as curvas de autocorrelação (ver **figura 59**). Pode-se observar que, além do aumento de ruído introduzido pelo espalhamento de luz e/ou autofluorescência do arabinoxilano, existe uma considerável correlação nessas flutuações de fluorescência, de modo que o polímero tem sua própria curva de decaimento.

Figura 59: Curvas de autocorrelação de fluorescência de soluções 0.5% (A) e 1.0% (B) de arabinoxilano de trigo (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). O tempo de aquisição foi de 5 min.

No intuito deslocar as curvas de *FCS* para tempos maiores e assim conseguir uma curva de autocorrelação menos ruidosa para a medida dos raios hidrodinâmicos das enzimas, mediu-se primeiramente a difusão da sonda livre em uma solução 12.5% de glicerol (m/v) contendo o mesmo tampão fosfato empregado nos ensaios anteriores, para então determinar a viscosidade desse meio a 25 °C (ver **figura 60**). Uma vez ajustadas as curvas de autocorrelação, foram obtidas as medidas dos parâmetros de difusão do fluoróforo e, com isso, foi determinada a viscosidade da solução utilizando a razão da relação de Stokes-Einstein para o meio com e sem glicerol. O tempo de difusão, coeficiente de difusão e viscosidade foram, respectivamente, $88.8 \mu s \pm 2.2\%$, $287.1 \mu m^2 \cdot s^{-1} \pm 8.04\%$ e $1.33 mPa \cdot s \pm 6.9\%$. É interessante notar que essa solução tem uma viscosidade similar àquelas das soluções 0.5 e 1.0% de arabinosilano (m/v), sendo 49% maior que a viscosidade da água na mesma temperatura.

A próxima proteína a ter sua difusão medida por *FCS* foi a XynA-N54C-AttoOxa11. Dessa vez, o meio foi acrescido de 12.5% de glicerol (m/v), para aumento do tempo de difusão (ver **figura 61**). Novamente, com o uso da relação de Stokes-Einstein, do coeficiente de difusão da sonda e da proteína no meio com glicerol, e do raio hidrodinâmico da sonda livre, o raio hidrodinâmico da proteína foi calculado, resultando no valor de 1.77 nm. Esse raio hidrodinâmico foi 33% menor que o teórico. Isso pode indicar a existência de fluoróforos livres na amostra de proteína, ou essa simplesmente é mais compacta do que a previsão teórica (de acordo com a simulação de dinâmica molecular, o raio de giro da proteína no mesmo pH a 20 °C é de ~1.7 nm). Assim como o conjugado XynA-N151C-AttoOxa11, o conjugado XynA-N54C-AttoOxa11 apresentou curvas de autocorrelação muito ruidosas, impedindo uma determinação precisa dos tempos de correlação e coeficientes de difusão. É importante notar também que, para ambos conjugados, o rendimento quântico foi reduzido em relação ao fluoróforo livre, embora não houvessem triptofanos próximos na estrutura da proteína para suprimir a sonda.

Os conjugados XynA-D119C-AttoOxa11 e XynA-R122C-AttoOxa11 apresentaram dois problemas que impediram a determinação precisa de seus parâmetros de difusão e afinidade pelo substrato. O primeiro é que os raios hidrodinâmicos encontrados foram muito inferiores àqueles encontrados para as enzimas de referência, sugerindo que grande parte da sonda empregada estava livre e não ligada à enzima. É possível que o fato de a região onde essas marcações se encontram ser muito dinâmica facilitar a redução da ligação química formada entre o grupo tiol e a maleimida da sonda fluorescente. O segundo problema encontrado foi que o rendimento quântico dos fluoróforos foi altamente reduzido,

provavelmente devido à supressão do tipo *PET* pelos triptofanos vizinhos, e nas duas proteínas existem pelo menos dois triptofanos a uma distância de ~ 1 nm da posição das sondas.

A

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 88.8 \mu\text{s} \\ D_1 &= 260.8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.859 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.534 \\ \kappa &= 6.5667 \\ z_0 &= 1.9987 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3044 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 1.8739 \\ \chi^2 &= 1.238\end{aligned}$$

B

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 86.8 \mu\text{s} \\ D_1 &= 296.8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.63 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.391 \\ \kappa &= 5.5980 \\ z_0 &= 1.7969 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3210 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 2.5593 \\ \chi^2 &= 1.210\end{aligned}$$

C

$$\begin{aligned}\tau_1 &= 90.7 \mu\text{s} \\ D_1 &= 303.8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.705 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.438 \\ \kappa &= 5.0593 \\ z_0 &= 1.6797 \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3320 \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 2.2857 \\ \chi^2 &= 1.198\end{aligned}$$

Figura 60: Curvas de autocorrelação de fluorescência do *Atto655-carboxy* em uma solução 12.5% de glicerol (m/v) contendo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente (~ 25 °C). Todas as curvas foram ajustadas com o modelo de difusão pura de uma espécie. O tempo de aquisição foi de 5–10 min.

Figura 61: Curva de autocorrelação de fluorescência da XynA-N54C-AttoOxa11 em solução 12.5% de glicerol (m/v) contendo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6.0 a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). A curva foi ajustada com o modelo de difusão pura de uma espécie. O tempo de aquisição foi de 10 min.

Além disso, não foi observado nenhum decaimento em tempos curtos referentes à dinâmica proteica dos mutantes do polegar (D119C e R122C) revelada pela dinâmica de supressão por *PET*. Mesmo que esse efeito tivesse sido observado, os ruídos em tempos curtos foram ainda maiores do que aqueles observados para os mutantes de referência (N54C e N151C), e impediriam uma medida precisa desses tempos. Uma possível explicação para isso é que os ruídos das medidas para esses conjugados impedem a visualização de qualquer curva de decaimento adicional nessa escala de tempo. Outra explicação possível é que a sonda mantém uma distância dos supressores triptofano menor que aquela onde a máxima supressão seria alcançada, de modo que flutuações de distância entre esses grupos não causasse flutuações significantes de fluorescência. É possível também que as flutuações de distância entre o fluoróforo e os supressores sejam pequenas demais para causar alguma flutuação de fluorescência relevante. Finalmente, também é possível que os principais movimentos do domínio polegar sejam rápidos demais para que alguma flutuação de fluorescência seja detectada dentro do limite da instrumentação utilizada. Os equipamentos empregados em *PET-FCS* atualmente são capazes de correlacionar tempos tão curtos quanto 10 ns (RIES et al.,

2014). Entretanto, o tempo de correlação mais curto que o equipamento empregado nesse trabalho podia medir era de 100 ns.

4.13. Produção de filmes de arabinosilano

Filmes de arabinosilano foram produzidos através dos dois métodos principais descritos na **seção 3.15**. Todos os filmes apresentaram características físicas e mecânicas muito parecidas: aparência e textura de plástico, alta resistência física e alta absorção de água. Por isso, foi priorizada a produção de filmes através do método mais simples, que usa menos polissacarídeo e é mais rápido. Uma imagem de um dos filmes produzidos pode ser vista na **figura 62**.

Figura 62: Filme de arabinosilano.

Foi testada a absorção de água pelo filme através da aplicação de uma gota de água deionizada sobre o mesmo. Verificou-se que nos filmes que não estavam presos em superfícies a água passou diretamente para a outra superfície, sob ação da gravidade. Isso significa que os filmes formados são altamente porosos, permeáveis e hidrofílicos. A região permaneceu mole e umedecida por várias horas. Se perturbada, o filme naquela região era desfeito, formando um orifício. Imagens dos filmes tratados com água podem ser visualizadas na **figura 63**.

Figura 63: Filme de arabinogalactano tratado com uma gota de água em seu centro. A, filme solto; B, filme sobre um suporte de vidro.

As tentativas de se produzir um filme de xilano não foram bem sucedidas em nenhum método empregado. O polissacarídeo apresentou tendência em formar cristais ao invés de filmes, como pode ser observado na **figura 64**.

Figura 64: Tentativa de se produzir um filme de xilano sobre uma lamínula de vidro.

4.14. Análise topológica de filmes de arabinosilano por microscopia confocal de fluorescência

Foram obtidas imagens do filme de arabinosilano excitado com feixes de laser de 405 e 488 nm em um sistema de microscopia confocal de fluorescência com resolução temporal *ZEISS LSM 780* usando o software *ZEN*. Também foram obtidos os espectros de emissão em áreas desse filme. Os resultados podem ser visualizados nas **figuras 65 e 66**.

Figura 65: Imagem de um filme de xilano excitado com um laser de 405 nm e seu respectivo espectro de emissão de fluorescência, obtidos em um sistema de microscopia confocal de fluorescência *ZEISS LSM 780*.

Figura 66: Imagem de um filme de xilano excitado com um laser de 488 nm e seu respectivo espectro de emissão de fluorescência, obtidos em um sistema de microscopia confocal de fluorescência *ZEISS LSM 780*.

Fica evidente através dessas imagens a autofluorescência do filme de arabinoxilano. Essa descoberta pode ser muito útil para realizar, por exemplo, o monitoramento da degradação do filme pela xilanase ou outra proteína. Também é possível, em teoria, realizar experimentos de *FRET* ou *FRET-FCS* da proteína marcada, por exemplo, na posição 119 com *Alexa Fluor® 488*, de modo que a excitação em 405 nm também excite o fluoróforo durante a interação da proteína com o filme. Isso poderia gerar imagens do filme mais nítidas e monitor apenas a proteína no filme, já que só seriam excitados aqueles fluoróforos ligados nas proteínas realizando efetivamente um contato com o carboidrato.

A **figura 67** mostra a imagem tridimensional de um filme de xilano umedecido com uma solução de XynA-N-AF488 excitado com um laser de 488 nm.

Figura 67: Imagem tridimensional de um filme de xilano umedecido com uma solução de XynA-N-AF488 excitado com um laser de 488 nm. Imagem obtida em um sistema de microscopia confocal de fluorescência ZEISS LSM 780.

Embora não tenha sido possível tirar muitas informações úteis a partir dessa imagem, nós concluímos que é possível monitorar a proteína fluorescente na superfície do filme. Também pôde-se verificar que o filme produzido foi bastante uniforme e com espessura constante de aproximadamente 20 µm. Além disso, o claro delineamento da forma do filme sugere que a proteína foi capaz de penetrá-lo. Esse resultado está de acordo com a porosidade que foi verificada na **seção 4.13**. Também é evidente a granulação na superfície do filme, indicando uma distribuição não homogênea da proteína sobre o mesmo.

4.15. Análise da afinidade da XynA-N151C-AttoOxa11 por frações sólidas obtidas no processo de deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar por *FLIM*

Com o intuito de não apenas analisar a estrutura dos fragmentos gerados em alguns processos de deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar, mas também de determinar a composição relativa de xilanos nessas frações e de outros carboidratos aos quais a xilanases têm afinidade, tais materiais foram analisados por *FLIM* utilizando-se a XynA-N151C-AttoOxa11 como sonda. A excitação das amostras foi feita por um feixe de laser pulsado de 640 nm com pulsos a 25 MHz. A aquisição de dados foi feita em um microscópio confocal de fluorescência resolvido no tempo com sensibilidade de molécula única *MicroTime 200* (*PicoQuant, Berlin, Germany*). No caso das calibrações, utilizou-se o modo de aquisição de *FLCS* e correção por filtro de *TCSPC*, potência óptica do laser após passagem pelo espelho dicróico de 33 μ W, e altura do foco de +20 μ m em relação à superfície vidro-solução.

Primeiramente, o sistema foi ajustado manualmente, e a qualidade desse ajuste foi verificada por meio da calibração utilizando a sonda *Atto655-carboxy/AttoOxa11* livre (ver **APÊNDICES C, D e E**). A seguir são mostradas todas as imagens de *FLIM* adquiridas (**figuras 68 à 70**) e tratadas da maneira descrita na **seção 3.18**. Os cálculos de brilho por área foram realizados para cada *ROI* (região de interesse) e são mostrados ao lado de suas respectivas imagens. Também foram calculados os tempos de vida médios de cada imagem ou *ROI* utilizando os tempos de vida mais prováveis para a sonda e suas respectivas amplitudes como peso. Informações e imagens complementares podem ser encontradas nos **APÊNDICES F ao T**.

Figura 68: Imagens de *FLIM* com resolução normal usando XynA-N151C-AttoOxa11. *A*, filme de arabinóxilano de trigo; *B*, fração de bagaço de cana tratado pelo método Air; *C*, *D* e *E*, fração de bagaço de cana deslignificado com $NaClO_2$; *F*, fração de bagaço de cana insolúvel em oxalato.

Figura 69: Imagens de *FLIM* com resolução normal usando XynA-N151C-AttoOxa11. *A*, fração de bagaço de cana insolúvel em oxalato; *B*, fração de arabinosilano de farinha de trigo; *C*, bagaço de cana após extração com DMSO; *D*, fração de bagaço de cana extraído com H₂O e etanol.

Figura 70: Imagens de *FLIM* com ampliação usando XynA-N151C-AttoOxa11. *A*, fração de bagaço de cana tratado pelo método Air; *B*, fração de bagaço de cana deslignificado com NaClO_2 ; *C*, fração de bagaço de cana tratado pelo método Air; *D*, fração de arabinosilano de farinha de trigo; *E*, fração de xilano de madeira de faia.

Os principais resultados encontrados estão mostrados na **tabela 15**:

Tabela 15: Brilhos de fluorescência e tempos de vida da XynA-N151C-AttoOxa11 ligada em diversos substratos e bagaço de cana deslignificado

Amostra	Figura	mBr ($10^{-3} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{nW}^{-1}$)/ Tempo de vida de fluorescência (ns)		
		Original	ROI brilho médio*	ROI brilho alto*
Resoluções iguais				
Filme de arabinoxilano	68A	4.19/2.355	n/a	n/a
Air	68B	13.2/2.017	n/a	96.2/1.821
Deslign. c/ NaClO ₂	68C	302/2.106	n/a	n/a
Deslign. c/ NaClO ₂	68D	246/2.646	n/a	874/2.394
Deslign. c/ NaClO ₂	68E	285/2.536	n/a	n/a
Insol. em oxalato	68F	37.5/2.163	67.3/1.798	205/1.745
Insol. em oxalato	69A	5.90/2.325	7.33/2.372	n/a
Arabinoxilano de trigo	69B	n/a	43.0/2.039	n/a
Extr. c/ DMSO	69C	185/2.038	107/2.045	505/1.921
Extr. c/ H ₂ O e EtOH	69D	10.8/2.756	18.6/1.968	40.3/2.023
Imagens ampliadas				
Air	70A	4100/1.622	n/a	7240/2.224
Deslign. c/ NaClO ₂	70B	1430/2.173	n/a	4740/2.046
Air	70C	2170/2.146	n/a	4320/2.005
Arabinoxilano de trigo	70D	n/a	n/a	6070/1.596
Xilano de madeira de faia	70E	118/2.208	n/a	566/2.25
Tempo de vida médio (ns)		2.245 ± 13.1%	2.044 ± 9.12%	2.002 ± 11.8%
Diferença percentual em relação ao tempo de vida da sonda livre (%)		+25	+14	+11

*Imagens referentes podem ser encontradas nos **APÊNDICES F ao T**.

É possível verificar que na maioria dos casos o tempo de vida de fluorescência referente à sonda (tempo de vida do espalhamento da luz excluído) foi em torno de 2.0 ± 0.2 ns, o que sugere que as imagens geradas são de fato provenientes da ligação da enzima marcada ao substrato. As únicas exceções foram as aquisições realizadas para o bagaço deslignificado com NaClO₂, onde tempos de vida muito maiores (>3.3 ns) ou muito menores (<1.5 ns) que o da sonda (1.8 ns) foram identificados em várias imagens. Embora não se saiba exatamente a origem desse comportamento, acredita-se que possa ser uma dessas duas possibilidades: ou problemas com o ajuste das curvas de decaimento medidas; ou o ambiente químico nesse material é muito rico em grupos capazes de causar a supressão da sonda, reduzindo e/ou aumentando o tempo de vida da mesma.

Com relação à composição das frações extraídas do bagaço de cana, verificou-se que as amostras de Air, insolúvel em oxalato, e extraída com H₂O e etanol, foram as que apresentaram menor teor de carboidratos aos quais a xilanase pode se ligar. A fração extraída com DMSO apresentou quantidade consideravelmente maior. Já a fração do bagaço deslignificado com NaClO₂ foi a que apresentou maior capacidade de ligação da xilanase, chegando a quase o dobro da fração extraída com DMSO. Não se sabe, entretanto, se esse último caso pode ser devido ao efeito de algum artefato, já que os tempos de vida observados estavam muito deslocados.

A análise da decomposição de diversas imagens de acordo com seus respectivos tempos de vida demonstrou que a maior parte da amplitude proveniente de tempos de vida curtos é devida ao espalhamento da luz por regiões mais densas desses materiais (ver **APÊNDICES F–T**). As imagens dos tempos de vida teoricamente provenientes do marcador mostraram mais nitidez na maioria dos casos, revelando algumas regiões não destacadas pelo espalhamento da luz. Entretanto, as análises de *ROIs* mais brilhantes sugerem que as mesmas regiões onde há maior espalhamento de luz também são aquelas onde as enzimas tendem a se ligar mais. É possível que o espalhamento seja uma função da concentração de hemicelulose, e portanto, as enzimas se ligam mais nessas regiões.

4.16. Análise da dinâmica local dos mutantes marcados com *MTSSL* na presença de substratos e produto da reação por *EPR*

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica experimentais foram adquiridos para a sonda de spin *MTSSL* ligada à ponta do domínio polegar da XynA a temperatura ambiente (~25°C) e a 45°C (10°C abaixo da temperatura de atividade ótima) na ausência e na presença de múltiplos substratos (ver **figura 71**). Altas concentrações de substrato foram escolhidas ao invés de um aumento gradual das concentrações, devido ao fato de que em uma concentração de enzima três ordens de grandeza maior do que em um ensaio de atividade enzimática as medidas poderiam estar muito distantes das condições de velocidade inicial, portanto invalidando qualquer tentativa de promover uma medida quantitativa da ligação da enzima ao substrato.

Figura 71: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada à ponta do domínio polegar da XynA (XynA-D119C-*MTSSL*) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) e a 45 °C.

Os espectros de *EPR* mudaram drasticamente entre as duas temperaturas analisadas. A 45 °C as bandas de todos os espectros de *EPR* ficaram mais finas e apresentaram uma maior amplitude em comparação com as medidas a temperatura ambiente. Esse comportamento clássico sugere que a uma temperatura mais alta a ponta do polegar onde a sonda de spin estava localizada se tornou significativamente mais dinâmica. A temperatura ambiente a adição de beta-glucano de cevada não alterou a forma do espectro de *EPR* em comparação com a proteína livre. A 45 °C o espectro também quase não apresentou diferenças consideráveis em comparação com a proteína livre na mesma temperatura, exceto por uma ligeira redução da amplitude e largura das bandas. Na presença do xilano, arabinoxilano e xilose a temperatura ambiente, os espectros sugeriram que a sonda foi levemente mais restringida em comparação com a medida na presença de beta-glucano. Entretanto, a 45 °C essas mudanças foram consideravelmente mais proeminentes, mostrando que a ligação do substrato à proteína de fato diminuiu a dinâmica do polegar, como pode ser concluído a partir da forma arredondada das bandas do espectro.

A pequena mudança espectral apesar da alta viscosidade do beta-glucano, assim como a considerável mudança espectral na presença da xilose apesar de sua baixa viscosidade,

confirmam que as variações observadas na dinâmica do polegar são produtos da ligação ao substrato e não devidas às diferenças de viscosidade.

A XynA-D119C foi novamente expressa, assim como todos os outros mutantes. Todas essas proteínas foram marcadas com *MTSSL* e submetidas a medidas de *EPR* a temperatura ambiente (~25 °C). As medidas foram realizadas em tampão e na presença de 0.75% de xilose, 0.75% de xilano, e 0.75% de rabinoxilano.

Os resultados para a XynA-D119C-MTSSL são mostrados na **figura 72**. É fácil notar que praticamente não houve mudança na dinâmica do domínio polegar com a presença do xilano. Entretanto, com xilose a dinâmica foi drasticamente reduzida, enquanto com arabinosilano foi aumentada. Esses efeitos não foram observados para as referências, e nem para a XynA-R122C-MTSSL. Os resultados para os outros três conjugados não estão mostrados aqui porque foram muito semelhantes aos da terceira rodada de medidas, que resume melhor os resultados.

A **figura 73** mostra os espectros de todos os conjugados a 25 °C em tampão. É possível verificar por esse gráfico que a dinâmica das duas referências é bastante baixa e semelhante, o que está de acordo com a teoria. O conjugado XynA-R122C-MTSSL apresentou dinâmica muito maior nessas condições, o que está em completo acordo com as previsões teóricas. Entretanto, o conjugado XynA-D119C-MTSSL apresentou dinâmica consideravelmente inferior a das referências, o que está em total desacordo com a teoria.

Figura 72: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada à ponta do domínio polegar da XynA (XynA-D119C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C).

Figura 73: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada aos quatro mutantes da *XynA* em tampão a temperatura ambiente.

Na terceira rodada, todos os mutantes foram novamente expressos e marcados com a sonda de spin. As medidas de *EPR* foram feitas a temperatura ambiente e a 45 °C. As concentrações de xilano, arabinoxilano e xilose foram todas de 0.5% (m/v). Entretanto, devido à baixa concentração do mutante *XynA*-D119C, não foi dada continuidade às suas medidas.

A **figura 74** mostra os espectros de *EPR* da *XynA*-N54C-*MTSSL* a temperatura ambiente e a 45 °C. Pode-se verificar que para o conjugado *XynA*-N54C-*MTSSL* não houve nenhuma variação significativa da dinâmica da sonda, tanto a temperatura ambiente, como a 45 °C. Isso sugere que o aumento da viscosidade introduzido pela adição de substrato não interfere com a dinâmica da sonda, e que os efeitos observados para os mutantes do polegar são de fato devidos à dinâmica do domínio.

Figura 74: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada ao domínio dedos da XynA (XynA-N54C-*MTSSL*) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (A) e a 45 °C (B).

A **figura 75** mostram os mesmos tipos de medidas para o conjugado XynA-N151C-*MTSSL*. Verificou-se que para essa referência também não houve nenhuma mudança significativa na força da linha dos espectros de *EPR*, confirmando a hipótese de que a adição de substratos e produto dessas concentrações não altera significativamente a dinâmica da sonda em si.

Figura 75: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada à alfa-hélice da XynA (XynA-N151C-*MTSSL*) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (A) e a 45 °C (B).

A **figura 76** mostra as medidas para o conjugado XynA-R122C-MTSSL.

Figura 76: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada ao domínio polegar da XynA (XynA-R122C-MTSSL) na presença de vários substratos a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) (A) e a 45 °C (B).

Os espectros de *EPR* também não mudaram drasticamente com a adição de substrato. Entretanto, eles apresentaram maiores variações do que aquelas apresentadas pelas referências. A mudança mais notavelmente é um afinamento na forma da linha do espectro a temperatura ambiente na presença de arabinoxilano, sugerindo um aumento da dinâmica do domínio polegar nessas condições. Outra mudança considerável foi um alargamento da forma da linha do espectro a 45 °C na presença de xilano, indicando uma redução da dinâmica do domínio polegar.

Para verificar o efeito do aumento da temperatura na dinâmica dos marcadores em todos os conjugados, assim como para comparar a dinâmica entre os diversos domínios, foi construído o gráfico da **figura 77**. É interessante notar que na temperatura ambiente as referências N54C e N151C apresentam dinâmica bastante baixa e similar, enquanto o mutante de polegar R122C apresentou dinâmica muito maior nessa mesma temperatura, o que está em total acordo com as previsões teóricas feitas anteriormente.

Figura 77: Espectros de *EPR* experimentais para a sonda de spin *MTSSL* conjugada a três diferentes domínios da XynA em tampão a temperatura ambiente e a 45 °C.

O aumento da temperatura para 45 °C aumentou de maneira significativa a dinâmica do *MTSSL* em todos os domínios. Com relação às referências, esse aumento foi mais significativo na alfa-hélice (N151C), o que pode ser explicado pelo fato dessa estrutura ser muito menor do que as estruturas beta que formam o domínio dedos.

Já para o domínio polegar (R122C), houve um aumento ainda mais significativo de sua dinâmica. O problema, porém, é que a abordagem adotada não consiste em medidas quantitativas da dinâmica, o que dificulta verificar se o efeito observado é realmente uma consequência do aumento da dinâmica do polegar, ou se ele é, na verdade, uma consequência do aumento da energia térmica da própria sonda.

4.17. Caracterização cinética da XynA tipo selvagem a 25 °C

4.17.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

A atividade relativa da xilanase tipo selvagem em função do pH foi determinada conforme a descrição na **seção 3.20.1**. A **figura 78** mostra o gráfico referente a esse experimento.

Figura 78: Gráfico da atividade relativa da xilanase tipo selvagem a 55 °C (%) versus pH do meio reacional.

O experimento confirma os resultados encontrados por outros alunos do laboratório em pesquisas anteriores (RIBEIRO, 2013). O pH ótimo da xilanase tipo selvagem foi encontrado como sendo entre 6.0 e 6.5. Embora a atividade relativa média seja maior no pH 6.5 do que no pH 6.0, o erro dessas medidas impede de assumir o pH 6.5 como ótimo.

4.17.2. Termoestabilidade

A atividade relativa da xilanase tipo selvagem em função do tempo de incubação a 25 °C foi determinada conforme a descrição na **seção 3.20.2**. A **figura 79** mostra o gráfico referente a esse experimento.

Figura 79: Gráfico da atividade relativa da xilanase tipo selvagem (%) versus tempo de incubação da proteína a 25°C (min).

Verifica-se que o tempo de meia vida da proteína a 25 °C é atingido após cerca de 3 h de incubação. Também é possível observar que a desnaturação ocorre mais rapidamente dentro dos primeiros 25 min de incubação (~20%), que provavelmente se trata da superfície mais móvel e mais hidrofílica da proteína.

4.17.3. Determinação de parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da xilanase tipo selvagem a 25 °C em meio contendo 0.3 mg mL⁻¹ de BSA e 0.05%_{v/v} de *TWEEN*® 20, além do tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 6.0, foi medida a atividade da proteína em função de várias concentrações de substrato, conforme descrito na seção 3.20.3. A **figura 80** mostra o gráfico de Michaelis-Menten resultante.

Figura 80: Gráfico da velocidade inicial (nmol·min⁻¹) de hidrólise do xilano de madeira de faia por 0.1 pmol de xilanase tipo selvagem versus concentração do substrato (mg·mL⁻¹). A reação foi realizada a 25 °C em tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ acrescido de 0.3 mg·mL⁻¹ de BSA e 0.05% de *TWEEN*® 20 (v/v).

Pode-se observar que o gráfico foi feito com apenas seis pontos, tendo alguns deles um erro relativamente alto. Isso significa que esse experimento deverá ser repetido. A **figura 81** mostra a representação de Hanes-Woolf para os resultados experimentais obtidos. Esse método permite a obtenção dos parâmetros cinéticos de maneira mais precisa do que através da análise do gráfico de Michaelis-Menten. Pode-se observar que, apesar do erro experimental ser relativamente alto em alguns pontos, a reta gerada pela regressão linear explica bem os resultados, gerando um coeficiente de correlação $R > 0.999$.

Figura 81: Representação de Hanes-Woolf para a hidrólise do xilano de madeira de faia por 0.1 pmol de xilanase tipo selvagem. A reação foi realizada a 25 °C em tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ acrescido de 0.3 mg mL⁻¹ de BSA e 0.05% v/v de TWEEN® 20.

Através dos coeficientes obtidos a partir da regressão linear, calculou-se os parâmetros cinéticos conforme abaixo:

$$K_M = \text{coeficiente linear/coeficiente angular} = 0.0722/0.1143 = \mathbf{0.63 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}}$$

$$V_{M\acute{A}X} = 1/\text{coeficiente angular} = 1/0.1143 = \mathbf{8.7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ (} 3.8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{)}}$$

$$k_{cat} = V_{M\acute{A}X}/n_{\text{proteína}} = 8.7 \text{ nmol min}^{-1}/0.1 \text{ pmol} = 8.7 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} = \mathbf{5.2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}}$$

$$t = 1/k_{cat} = 1/5.2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} = \mathbf{0.19 \text{ } \mu\text{s}}$$

em que **t** é o tempo necessário para ocorrer cada hidrólise enzimática por proteína.

Discussão

A modelagem molecular das sondas *Acrylodan*, *AttoOxa11* e *MTSSL*, e de um oligômero de xilose por um método *ab initio* no programa *ORCA 3.0.3*, foi realizada com sucesso. Do mesmo modo, a simulação de dinâmica molecular da XynA em pH 6.0 a 20 °C também foi bem sucedida. A princípio, pretendia-se também realizar simulações de dinâmica molecular dos mutantes marcados com as sondas trabalhadas nesse projeto, no intuito de verificar seus efeitos na dinâmica da enzima. Entretanto, dado o limite de tempo do projeto, não foi possível realizar essa etapa complementar.

Um método de mutagênese sítio-dirigida de passo único foi aplicado com sucesso para mutar a XynA em posições estratégicas para a sondagem do domínio polegar (mutantes D119C e R122C) e de regiões rígidas e distantes do sítio catalítico para comparação (mutantes N54C e N151C). Todas as xilanases, tipo selvagem e mutantes, foram expressas em *E. coli* linhagem BL21[DE3]pLysS e purificadas com eficiência similar por *IMAC* usando resinas de níquel, e por *FPLC* usando colunas de exclusão por tamanho em alguns casos. Todos os mutantes apresentaram solubilidade inferior à da enzima tipo selvagem. Ensaio de *PAGE* nativo com o mutante XynA-D119C mostraram que esse comportamento é provavelmente devido à dimerização proteica através da formação de pontes dissulfeto entre os grupos tióis dos mutantes. Também é interessante notar que a XynA apresentou afinidade por essas colunas, de modo que ela eluiu em volumes maiores do que o esperado para o seu tamanho.

A análise da estrutura secundária das proteínas tipo selvagem e mutantes por *CD* mostrou que todas proteínas foram obtidas na forma nativa e com diferenças mínimas entre a estrutura de uma e a outra. Os cálculos das porcentagens de estruturas secundárias a partir dos espectros de *CD* das proteínas pelo *DichroWeb* sugeriram que a xilanase possui menos estrutura beta e mais alfa hélice do que a estrutura obtida por difração de raios X, o que é mais provável de ser devido à calibração do espectropolarímetro, a medidas erradas de concentração de proteína e/ou do caminho óptico da cubeta empregada, e menos provavelmente à limitação intrínseca do próprio programa.

A caracterização bioquímica da XynA tipo selvagem em condições de microscopia de fluorescência foi realizada com sucesso, apresentando: pH ótimo em torno de 6.0 e 6.5 a 55 °C; tempo de meia vida a 25°C de aproximadamente 3 h; K_M de 0.63 mg mL⁻¹, k_{cat} = 5.2 10⁶ s⁻¹ e tempo de catálise de 0.69 ms (todos a 25 °C). Todas essas caracterizações foram feitas para o xilano de madeira de faia.

Todos os mutantes foram marcados com as sondas *Acrylodan*, *MTSSL* e *AttoOxa11*. A XynA tipo selvagem foi marcada com *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester*. Os conjugados de *Acrylodan*, *MTSSL* e *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester* foram purificados por *FPLC*. Os

conjugados de *AttoOxa11* foram purificados por *IMAC* e diálise. É importante notar que todos os mutantes marcados com *Acrylodan* apresentaram alta afinidade pelo meio de exclusão por tamanho nas purificações por *FPLC*, ainda mais do que a XynA tipo selvagem apresentava. Não sabemos ao certo a origem desse efeito, mas acredita-se que isso seja devido à algum tipo de interação dessa sonda com a coluna.

Todas as proteínas, marcadas e não marcadas, apresentaram atividade xilanásica tendo o arabinoxilano como substrato. Entretanto, a maioria dos mutantes e seus respectivos conjugados com sondas apresentaram atividade reduzida, chegando a 6.28% de atividade relativa no pior caso (XynA-R122C-Atto). A única exceção foi o mutante XynA-R122C, que apresentou atividade 1.4% maior que a da enzima tipo selvagem. No caso do mutante XynA-D119C, nós atribuímos a diminuição de atividade ao rompimento de uma importante interação íon-dipolo entre as cadeias laterais do ácido aspártico 119 e a arginina 73, além de mudanças no microambiente do sítio catalítico da enzima, principalmente pelo aumento do volume da cadeia lateral. O efeito de redução da atividade dos conjugados do mutante XynA-R122C, mas não do mutante não marcado, é provavelmente devido ao aumento do volume da cadeia lateral do resíduo de cisteína 122. Essa ideia é reforçada por um trabalho recente, que encontrou uma correlação entre o volume da cadeia lateral de um resíduo na ponta do domínio polegar e a habilidade desse domínio assistir na liberação do produto (PAËS et al., 2012). De fato, a atividade do mutante XynA-R122C foi menor quanto maior o tamanho da sonda utilizada. Já para os mutantes N54C e N151C, acredita-se que a redução da atividade dos conjugados seja devida ao próprio processo de marcação, que facilitou a precipitação de proteínas pelo aumento de suas concentrações, e que fez uso de DMSO em concentrações baixas. O DMSO é um solvente muito empregado para dissolver sondas fluorescentes, mas pode atuar como um agente desnaturante, perturbando a estrutura da enzima.

Somando todos esses efeitos, nós pudemos estabelecer as possíveis origens das reduções das atividades enzimáticas dos mutantes e de seus respectivos conjugados. Apesar das perdas em relação à atividade, nós assumimos que isso não iria interferir na mecânica essencial da função enzimática, de modo que as conclusões apresentadas aqui são válidas.

A análise da difusão da proteína por *FCS* forneceu o seu raio hidrodinâmico: 2.75 nm (XynA-N-AF488), 2.16 nm (XynA-N151C-AttoOxa11), e 1.77 nm (XynA-N54C-AttoOxa11), todos diferentes do tamanho teórico (2.63 nm), mas ainda compatíveis. Essas determinações não foram feitas para os mutantes D119C e R122C, pois eles demonstraram que uma fração significativa da conjugação com as sondas foi desfeita.

A proteína na presença de substrato apresentou difusão anômala em todos os casos, sugerindo a introdução de um tipo diferente de difusão que foi melhor explicado através da adição de uma difusão do tipo bidimensional no modelo de ajuste. Esse fenômeno, em combinação com o alto nível de ruído das medidas realizadas, dificultou a realização de medidas quantitativas da difusão da proteína nas diferentes concentrações de substrato. Nesses casos, os resultados experimentais obtidos foram mais qualitativos do que quantitativos. Além disso, o efeito de *PET* dinâmico não foi observado, comportamento que pode se dever à alta supressão do fluoróforo pelos triptofanos da proteína, e/ou à uma dinâmica mais rápida que o limite do equipamento utilizado (100 ns), e/ou à uma variação de distância muito pequena para gerar uma flutuação observável.

Filmes de arabinoxilano com características plásticas de alta resistência e solúveis em água foram produzidos com sucesso através de dois métodos distintos. Tais filmes foram analisados por microscopia confocal de fluorescência, onde se observou a presença do fenômeno de autofluorescência através do uso de feixes de laser de 405 e 488 nm. Também se obteve a imagem tridimensional de um filme de arabinoxilano de 20 μm espessura, através da sondagem da superfície do filme com xilanase-N-AF488 excitada em 488 nm.

Vários substratos extraídos a partir da fracionamento química do bagaço da cana-de-açúcar foram analisados por *FLIM* fazendo-se uso do conjugado XynA-N151C-AttoOxa11 como sonda de xilano e de substratos similares, como o arabinoxilano. Foram calculados os brilhos das *ROIs*, permitindo uma comparação quantitativa do substrato na superfície das partículas sólidas analisadas. Foi possível verificar que as regiões de maior ligação da enzima foram aquelas onde as partículas sólidas mais espalham luz. A maior concentração de substrato por superfície foi encontrada no bagaço deslignificado com NaClO_2 , seguido pela fração de extração com DMSO. A menor concentração foi na fração extraída com H_2O e etanol. A xilanase apresentou afinidade por todas as frações, o que está de acordo com a composição proposta em seus respectivos trabalhos de origem.

As medidas de comprimento de onda de emissão máxima do *Acrylodan* conjugado na ponta do polegar da XynA-D119C apresentaram uma forte correlação com a concentração do substrato, demonstrando que essa abordagem parece sondar eficientemente a polaridade no microambiente do fluoróforo. O *Acrylodan* tem sido usado para desvendar a polaridade do microambiente de regiões específicas de proteínas, analisar mudanças conformacionais, e medir quantitativamente interações de *binding*, já que seu rendimento quântico, assim como seu comprimento de onda de emissão máxima, são altamente sensíveis à dipolaridade ambiental local e à dinâmica de suas redondezas (FLORA et al., 1998; G. PRENDERGAST et al., 1983;

HIBBS; TALLEY; TAYLOR, 2004a; MCCARTY et al., 2008; WARD et al., 1994; YEM et al., 1992). De acordo com esses trabalhos, o *Acrylodan* apresenta deslocamento crômico para comprimentos de onda menores e maiores rendimentos quânticos em ambientes apolares. Uma vez que foi observado esse comportamento na presença de arabinoxilano, propõe-se que a ligação do substrato ao sítio catalítico resulta no domínio polegar adotando uma conformação fechada com o *Acrylodan* para dentro da fenda hidrofóbica, ou com a sonda próxima das regiões hidrofóbicas da cadeia do polissacarídeo (ver **figura 82 A**). A simples exclusão de água pelo substrato ou pelas cadeias laterais dos domínios palma e polegar que estão mais próximas no estado ligado, poderiam explicar o comportamento observado.

Figura 82: A, hipótese para o deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ do *Acrylodan* localizado na ponta do polegar da xilanase GH11. No estado ligado, a ponta do polegar está mais exposta para a água. No estado fechado, ela está mais embebida no sítio catalítico, que é menos polar. Como consequência, o comprimento de onda de emissão máxima e o rendimento quântico são diferentes em cada estado; B, hipótese para o efeito da temperatura na dinâmica do domínio polegar das xilanases GH11 na conformação aberta. O aumento da temperatura torna o domínio polegar consideravelmente mais flexível e dinâmico, e aumenta a largura da fenda do sítio catalítico. O fato de que movimentos na direção da palma e dos dedos são estericamente impedidos também contribui para esse aumento.

Em adição, foi observada uma clara transição com o aumento da concentração de arabinoxilano, em que a enzima passa através de um estado completamente livre para um completamente ligado. A 20 °C essa transição foi muito mais abrupta do que a 55 °C e ocorreu apenas em concentrações mais altas de substrato. Esses resultados sugerem que a afinidade da

enzima pelo substrato é consideravelmente mais alta em temperaturas mais altas do que em temperaturas mais baixas, isso é, o K_d bem como o K_M é menor. Ainda mais interessante, esses resultados sugerem não apenas que a ponta do domínio polegar sofre uma considerável mudança conformacional no estado ligado, mas também que ela possui um papel importante no processo catalítico.

As medidas de *EPR* experimentais do MTSSL conjugado com a ponta do domínio polegar forneceram informações complementares sobre a dinâmica do domínio polegar. Os espectros de *EPR* sob diferentes temperaturas revelaram que, em acordo com as simulações de dinâmica molecular (MURAKAMI et al., 2005; VIEIRA; DEGRÈVE; WARD, 2009), o domínio polegar de fato se torna consideravelmente mais flexível e dinâmico na temperatura ótima da enzima do que em uma temperatura mais baixa. Esse comportamento foi observado mesmo na presença de substratos. Entretanto, nesses casos o efeito foi menos proeminente, o que significa que a ligação da enzima ao substrato torna a ponta do domínio polegar menos dinâmica, o que também está de acordo com previsões anteriores (VIEIRA; DEGRÈVE; WARD, 2009). A temperatura ambiente a diminuição da dinâmica do polegar foi bastante sutil, o que está em completo acordo com as análises de fluorescência anteriores: nessa temperatura, o polegar está menos flexível/mais aberto e então a afinidade da enzima ao substrato é menor, o que significa uma menor diminuição da mobilidade do polegar considerando a média de todas as moléculas na amostra. Interessantemente, a xilose estabilizou a dinâmica da ponta do domínio polegar na mesma extensão que o xilano ou arabinoxilano, o que significa que o produto é capaz de se ligar no sítio catalítico. Esse resultado está de acordo com resultados recentes em nosso laboratório em que a XynA apresentou inibição competitiva por xilose (RIBEIRO, 2013). Aparentemente, a xilose inibe competitivamente a XynA.

Foram repetidos os ensaios de *EPR* para todos os mutantes, exceto para o D119C. Verificou-se que os mutantes de referência apresentaram dinâmicas similares e condizentes com as previsões teóricas. O mesmo pode ser dito sobre o mutante R122C, que apresentou dinâmica mais elevada. A presença de substratos no meio não alterou a dinâmica do MTSSL, mostrando que as mudanças dinâmicas observadas para o mutante D119C são muito provavelmente devidas ao movimento do domínio polegar, e não à viscosidade dos meios.

Somando todas essas evidências, parece que em temperaturas mais altas o domínio polegar é de fato mais flexível e dinâmico, e que essa flexibilidade melhorada torna mais larga a fenda do sítio catalítico. Com base em simulações de dinâmica molecular anteriores, nós acreditamos que os movimentos rápidos do polegar induzidos pela energia térmica são espacialmente limitados nas direções da palma e dos dedos, enquanto esses movimentos são

livres na direção da solução (ver **figura 82 B**). Como consequência, a largura da fenda é maior em temperaturas mais altas. Nessa condição, a entrada do substrato na fenda catalítica é facilitada, melhorando a probabilidade de ligação (k_1). Essa fenda mais larga quase não melhora o processo de dissociação do complexo (k_{-1}) porque, como descrito anteriormente, no estado ligado a enzima adquire uma conformação fechada que é estável, prevenindo a liberação do substrato. Finalmente, se a frequência de estados ligados é alta (isso é, maior concentração do complexo ES), então a atividade também é alta.

É importante notar que simulações de dinâmica molecular anteriores mostraram que a porcentagem de ocorrência de muitas ligações de hidrogênio entre a xylanase GH11 e o seu substrato é menor a 55 °C em relação a 25 °C. Com base nessas sugestões, nós propomos que, em temperaturas mais altas, o rompimento de ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato, assim como das interações intramoleculares da enzima, contribuem para ambas desancoragem do substrato (k_{-1}) e liberação do produto/deglicosilação (k_3). O ultimo é especialmente favorecido porque a ausência de uma ligação glicosídica entre os produtos os torna mais flexíveis, facilitando sua liberação e aumentando k_{cat} .

Nós propomos aqui um aprimoramento do modelo de dobradiça (MUILU et al., 1998), baseado nos resultados apresentados nesse trabalho e na literatura anterior (ver **83**).

Figura 83: O ciclo catalítico da xilanase GH11 (modelo de dobradiça) e o efeito da temperatura. Uma temperatura maior (por exemplo, a temperatura ótima) aumenta a frequência de ligação (k_1) por promover um aumento na flexibilidade do domínio polegar e, consequentemente, na largura da fenda do sítio catalítico. Essa temperatura maior também perturba as ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato, favorecendo a dissociação do complexo enzima-substrato (k_2). O aumento em k_1 é maior do que em k_2 , de modo que a constante de dissociação K_D é menor em temperaturas mais altas. Finalmente, um aumento na temperatura também favorece a dissociação do complexo enzima-produto (k_3) pelo rompimento de ligações de hidrogênio entre a enzima e o produto.

Primeiramente, o aumento da temperatura da enzima para sua temperatura de atividade ótima leva a uma mudança estrutural da folha beta de fita dupla próxima ao *loop* aleatório na ponta do domínio polegar, enquanto a estrutura geral da enzima permanece bem estruturada. O domínio polegar se torna mais dinâmico, especialmente nas regiões próximas de sua ponta, cobrindo uma faixa ainda mais larga de distâncias aberto-fechado (aumento da amplitude do movimento). Uma vez que o movimento de fechar é limitado por impedimento estérico na direção dos domínios palma e dedos, o aumento da amplitude do movimento de abrir com a temperatura acaba sendo mais alto do que para o movimento de fechar. Esses processo combinado com outras mudanças conformacionais possíveis na temperatura ótima tornam a largura média da fenda do sítio catalítico maior do que em temperaturas menores. Portanto, a estrutura média da enzima livre corresponde à sua conformação aberta (O).

O acesso do substrato ao sítio catalítico é uma função da largura da fenda, de modo que quanto maior a temperatura, maior será k_1 e menor será K_D ou K_M . Após a ancoragem, o substrato é eficientemente preso no sítio catalítico pela enzima, estabilizando também a dinâmica do polegar. Essa é a conformação fechada (C).

As ligações de hidrogênio mais fracas em temperaturas mais altas devem ter um papel importante na liberação do produto após a catálise. Apenas após a hidrólise da ligação glicosídica a quebra dessa ligação covalente no centro do sítio catalítico desestabiliza o estado fechado pelo aumento da flexibilidade dos produtos e rompimento cooperativo das ligações de hidrogênio entre a enzima e os produtos (conformação frouxa, L). Esse relaxamento do complexo ES promove a liberação dos produtos do sítio catalítico. Portanto, as ligações de hidrogênio mais fracas entre a enzima e o substrato em temperaturas mais altas promove o aumento de k_3 , a constante de velocidade da dissociação do complexo enzima-produto. Nesse ponto, a enzima poderia ou liberar ambas cadeias de carboidratos recentemente formadas, ou liberar uma, mover na direção da outra, e estabelecer uma nova ligação. Entretanto, atualmente não existem evidências da existência de processividade nas xilanases GH11.

É válido mencionar que um trabalho recente (VANDERMARLIERE et al., 2008) evidenciou que um estado ligado não necessariamente leva a uma mudança tão grande da largura da fenda. Entretanto, nosso trabalho contradiz esses resultados e reforça o modelo de dobradiça clássico.

Conclusões

1. Xilanases foram criadas com mutações únicas de cisteína em posições estratégicas do domínio polegar e de regiões rígidas para referência;
2. Realizou-se, com sucesso, a modelagem molecular de um oligômero de xilose e de sondas fluorescentes e de spin, obtendo-se suas geometrias otimizadas e distribuição de carga por métodos *ab initio*;
3. Foi realizada, com sucesso, a simulação de dinâmica molecular da XynA em pH 6.0 e 20 °C, durante um tempo de 17.5 ns;
4. Todas as xilanases, tipo selvagem e mutantes, foram expressas e purificadas com sucesso, e a qualidade da estrutura secundária das enzimas produzidas foi confirmada por *CD*;
5. Todas as xilanases mutantes foram marcadas com todas as sondas fluorescentes e de spin, mas com eficiências variáveis. As marcações com *Acrylodan*, *Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester* e *MTSSL* foram as mais eficientes;
6. Todos os mutantes apresentaram atividade catalítica, embora reduzida na maioria dos casos. Os mutantes marcados apresentaram atividade catalítica ainda menor, em sua maioria;
7. O deslocamento crômico do espectro de emissão de fluorescência da sonda fluorescente sensível à polaridade *Acrylodan* conjugada com as enzimas mutantes revelou que o acesso do substrato a sítio catalítico da XynA é facilitado em temperaturas maiores;
8. As mudanças na forma da linha do espectro de *EPR* da sonda de spin *MTSSL* conjugada com as enzimas mutantes revelou a maior dinâmica do domínio polegar, e que essa dinâmica é muito aumentada em temperaturas maiores, mas diminuída na presença de substrato e produto;
9. Por *FCS*, foi possível medir com sucesso a difusão da XynA tipo selvagem na ausência de substrato, quando marcada no N-terminal com *Alexa Fluor® 488*, e de alguns mutantes marcados com *AttoOxa11*. Entretanto, a medida quantitativa dessa difusão em

substrato não foi possível, devido à grande complexidade da amostra. Consequentemente, a constante de afinidade da enzima pelo substrato também não foi determinada. Devido à supressão da emissão do fluoróforo pelos triptofanos da enzima, e possivelmente por limitações instrumentais, também não foi possível fazer medidas eficientes de *PET-FCS*, impossibilitando a determinação de parâmetros cinéticos dos movimentos do domínio polegar;

10. Por *LSM* de fluorescência, a topologia de filmes de arabinoxilano foi determinada utilizando-se o conjugado XynA-N-AF488. Por *FLIM*, analisou-se, com sucesso, a topologia de frações sólidas geradas em alguns tratamentos do bagaço da cana-de-açúcar utilizando uma XynA marcada com *AttoOxa11*. Verificou-se que a enzima apresentou afinidade diferencial pelos diferentes fragmentos sólidos, revelando variáveis teores de xilano ou outros carboidratos aos quais a enzima pode ancorar e/ou apresentar atividade hidrolítica;
11. Através da correlação dos resultados dos ensaios de fluorescência e *EPR*, foi proposto um novo modelo para os determinantes biofísicos que governam a dinâmica catalítica da XynA. Nesse modelo, a temperatura controla a abertura da fenda catalítica e a dinâmica do domínio polegar, que por sua vez controlam a entrada do substrato no sítio e a catálise em si. Quando ligada ao substrato, a enzima tem sua fenda catalítica reduzida, assim como a dinâmica do domínio polegar.

Direções Futuras

7.1. Simulação de dinâmica molecular da interação xilanase-xilano e efeito das sondas

Embora o uso de sondas no estudo da dinâmica catalítica da XynA tenha se mostrado eficiente, é bastante notável que a presença desses grupos tende a prejudicar a atividade enzimática, principalmente porque o domínio polegar é uma região muito sensível, flexível e pouco estruturada, podendo ter seus movimentos facilmente alterados pela presença de uma molécula volumosa em sua ponta, além de poder restringir o acesso do substrato à fenda catalítica. É muito importante que, no futuro, seja dada continuidade às simulações de dinâmica molecular, para verificar como mutações e marcações com sondas de diversos tipos e tamanhos alteram a dinâmica e função da enzima, principalmente no domínio polegar.

7.2. Estudo da difusão da XynA em filmes de arabinoxilano e em frações de bagaço de cana-de-açúcar por FRAP

Através da recuperação de fluorescência após fotobranqueamento (ou *FRAP*), uma XynA marcada com uma sonda fluorescente fotoestável pode ter sua difusão e afinidade medida em diferentes ambientes sobrecarregados, como filmes de arabinoxilano e o bagaço da cana-de-açúcar. Por essa abordagem, será possível uma caracterização dinâmica do comportamento dessa enzima em escala micrométrica, fornecendo informações importantes para a indústria biotecnológica e para o planejamento de novas enzimas melhoradas. Também seria interessante realizar essas medidas com diferentes mutantes, permitindo um estudo mais aprofundado dos determinantes estruturais na afinidade dessas enzimas pelos resíduos agroindustriais.

7.3. Estudo da dinâmica catalítica da XynA por PET-FCS

Embora não tenha sido possível aplicar a *PET-FCS* com sucesso nesse trabalho, essa é uma abordagem nova e com diversas vantagens, e que apesar de tudo demonstrou funcionar. Um planejamento minucioso de novas construções estratégicas e o uso de uma instrumentação mais adequada poderão gerar resultados mais favoráveis no futuro. Essa técnica poderia ter seu

potencial aumentado pela substituição da *FCS* convencional pela *FLCS*, que permitiria a melhor eliminação de efeitos de espalhamento e autofluorescência de amostras complexas. Outra abordagem interessante seria a própria imobilização da enzima em uma superfície de vidro, seguida pela realização de medidas de *single-molecule turnover* por *smPET* na presença e na ausência de substratos pequenos que espalham menos a luz (por exemplo, xilohexose).

7.4. Estudo da dinâmica catalítica da XynA por *SPT*

Outra técnica que tem se tornado cada vez mais relevante para o estudo de enzimas ativadas por carboidratos é o rastreamento de molécula única (ou *SPT*). Através do uso de microscópios de super resolução, seria possível acompanhar o movimento no espaço com o tempo de uma xilanase marcada com sonda fluorescente sobre uma superfície de substrato em nível de molécula única. Essa abordagem tem permitido explicar como enzimas individuais movimentam e ancoram sobre superfícies de carboidratos, além de propiciar o desenvolvimento de modelos de ciclo catalítico mais elaborados.

Essa abordagem poderia ainda ser aplicada para muitos mutantes de xilanase, permitindo então a desconvolução do efeito da afinidade pelo substrato e da atividade processiva sobre o mesmo.

7.5. Medida da largura da fenda catalítica da XynA nos estados ligado e livre por *EPR*

As dúvidas sobre a conformação do domínio polegar da xilanase GH11 nos estados ligado e livre podem ser facilmente resolvidas pelo uso de *EPR*. Nessa abordagem, tanto a ponta do domínio polegar como a ponta do domínio dedos seriam marcadas com sondas de spin, e o conjugado resultante seria submetido a medidas de *EPR* tanto na presença do substrato, como em sua ausência. Essa abordagem seria preferível no lugar de *FRET* porque suas medidas são independentes do espalhamento de luz apresentado por altas concentrações de substrato.

Referências

ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT. **ACD/ChemSketch 2015** Toronto, On, Canada, 2015.

AHMAD, Z. et al. Effect of Oral Application of Xylanase on Some Hematological and Serum Biochemical Parameters in Broilers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 388–390, 2013.

ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 537–541, 2012.

ANDRIĆ, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis. II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 407–425, 2010.

ANDRIENKO, G. A. **ChemCraft**, 2015.

ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 2006.

BASAK, S.; CHATTOPADHYAY, K. Fluorescence Correlation Spectroscopy Study on the Effects of the Shape and Size of a Protein on Its Diffusion Inside a Crowded Environment. **Langmuir**, v. 29, p. 14709–14717, 2013.

BATTAN, B. et al. Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 2, p. 222–9, jun. 2012.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 1 ago. 2001.

BENEDETTI, A C. E. P. et al. Low-cost carbon sources for the production of a thermostable xylanase by *Aspergillus niger*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 25–31, 2013.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011.

BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 510–514, 2009.

BERENDSEN, H. et al. **Intermolecular Forces**. [s.l: s.n.]. v. 14

BERNIER JR., R. et al. Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 511–514, 1983.

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 252–258, 2014.

BISWAS, R. et al. Use of EPR spectroscopy to study macromolecular structure and function. **Science progress**, v. 84, p. 45–67, 2001.

CHATTOPADHYAY, K. et al. Measurement of microsecond dynamic motion in the intestinal fatty acid binding protein by using fluorescence correlation spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14171–6, 29 out. 2002.

CHATTORAJ, S. et al. Heterogeneity in binary mixtures of dimethyl sulfoxide and glycerol: fluorescence correlation spectroscopy. **The Journal of chemical physics**, v. 138, n. 21, p. 214507, 7 jun. 2013.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, jan. 2005.

DAVIS, B. J. DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404–427, dez. 1964.

DE SOUZA, A. P. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564–579, 2013.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1627–40, 2012.

DORNEZ, E. et al. Inactive fluorescently labeled xylanase as a novel probe for microscopic analysis of arabinoxylan containing cereal cell walls. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6369–75, 22 jun. 2011.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Naturally occurring xylans structures, isolation

procedures and properties. **Macromol. Rapid Commun.**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

FLORA, K. et al. Unfolding of acrylodan-labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence methods. **Biophysical journal**, v. 75, n. 2, p. 1084–96, ago. 1998.

FRISHMAN, D.; ARGOS, P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. **Proteins**, v. 23, n. 4, p. 566–579, dez. 1995.

G. PRENDERGAST, F. et al. Synthesis, spectral properties, and use of 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (Acrylodan). A thiol-selective, polarity-sensitive fluorescent probe. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7541–7544, 1983.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005.

GHOSH, S. et al. Diffusion of organic dyes in a niosome immobilized on a glass surface using fluorescence correlation spectroscopy. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 14, n. 27, p. 9749–57, 21 jul. 2012.

GONÇALVES, A. M. DA C. **Preparation and Evaluation of Material Properties of Biofilms from Spruce Xylan**. [s.l.] Universidade do Porto, 2011.

GOUJON, M. et al. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 695–699, 2010.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 162–173, 2009.

HALEEM, M. A.; QAMRUDDIN, S. Studies on the Triple Helical Structure of β -D-1,3 Xylan. **Z. Naturforsch**, v. 40c, p. 751–754, 1985.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HEINEMANN, F. et al. Quantifying lipid diffusion by fluorescence correlation spectroscopy: a critical treatise. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 28, n. 37, p. 13395–404, 18 set. 2012.

HIBBS, R. E.; TALLEY, T. T.; TAYLOR, P. Acrylodan-conjugated cysteine side chains reveal conformational state and ligand site locations of the acetylcholine-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28483–28491, 2004a.

HIBBS, R. E.; TALLEY, T. T.; TAYLOR, P. Acrylodan-conjugated cysteine side chains reveal conformational state and ligand site locations of the acetylcholine-binding protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28483–91, 2 jul. 2004b.

JENSEN, M. H. et al. Intrinsic motions in the N-terminal domain of an ionotropic glutamate receptor detected by fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of molecular biology**, v. 414, n. 1, p. 96–105, 18 nov. 2011.

JOMMUENGBOUT, P. et al. Substrate-binding site of family 11 xylanase from *Bacillus firmus* K-1 by molecular docking. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 833–839, 2009.

JUNG, J. et al. Binding and movement of individual Cel7A cellobiohydrolases on crystalline cellulose surfaces revealed by single-molecule fluorescence imaging. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 33, p. 24164–24172, 2013.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dez. 1983.

KIBBE, W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 43–46, 2007.

KIEFER, F. et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 387–392, 2009.

KIHARA, T.; ITO, J.; MIYAKE, J. Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e82382, jan. 2013.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–56, jul. 1999a.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999b.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Third Edit ed. [s.l.] SPRINGER, 2006.

LEES, J. G. et al. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. **Bioinformatics**, v. 22, n. 16, p. 1955–1962, 2006.

LI, H.; ROBERTSON, A. D.; JENSEN, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 61, n. 4, p. 704–721, 2005.

LIU, H.; NAISMITH, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. **BMC biotechnology**, v. 8, p. 91, jan. 2008.

LORENZ MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

LUDWICZEK, M. L. et al. A Secondary Xylan-binding Site Enhances the Catalytic Activity of a Single-domain Family 11 Glycoside Hydrolase. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, n. 2, p. 337–354, 2007.

MARTÍN-SAMPEDRO, R. et al. Biobleaching of pulp from oil palm empty fruit bunches with laccase and xylanase. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 371–378, abr. 2012.

MCCARTY, T. A. et al. Behavior of Acrylodan-Labeled Human Serum Albumin Dissolved in Ionic Liquids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 3, p. 560–569, fev. 2008.

MCWILLIAM, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. 597–600, 2013.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: CHANDEL, ANUJ, K.; SILVA, S. S. DA (Eds.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. [s.l.] INTECH, 2013. p. 251–275.

MUILU, J. et al. Functional Conformational Changes of Endo-1,4-xylanase II From *Trichoderma reesei*: A Molecular Dynamics Study. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 31, p. 434–444, 1998.

MÜLLER, P.; SCHWILLE, P.; WEIDEMANN, T. PyCorrFit - generic data evaluation for fluorescence correlation spectroscopy. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 17, p. btu328–, 2014.

MURAKAMI, M. T. et al. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). **FEBS letters**, v. 579, n. 28, p. 6505–10, 21 nov. 2005.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and Application of Xylanase from *Penicillium* sp. Utilizing Coffee By-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657–664, 26 fev. 2010.

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73, 2012.

NEUWEILER, H.; BANACHEWICZ, W.; FERSHT, A. R. Kinetics of chain motions within a protein-folding intermediate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 51, p. 22106–10, 21 dez. 2010.

NEUWEILER, H.; DOOSE, S.; SAUER, M. A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 46, p. 16650–5, 15 dez. 2005.

NEUWEILER, H.; JOHNSON, C. M.; FERSHT, A. R. Direct observation of ultrafast folding and denatured state dynamics in single protein molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 44, p. 18569–74, 3 dez. 2009.

PAËS, G. et al. Thumb-loops up for catalysis: a structure/function investigation of a functional loop movement in a GH11 xylanase. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 1–10, 2012.

PAËS, G.; BERRIN, J.-G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 564–92, 2012.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 18, n. 3, p. 167–173, 2004.

PÉROVAL, C. et al. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor

permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3977–3983, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–91, jun. 2005.

PRADE, R. A. Xylanases: from Biology to BioTechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 101–132, dez. 1996.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.

PURICH, D. L.; ALLISON, R. D. **Handbook of Biochemical Kinetics: A Guide to Dynamic Processes in the Molecular Life Sciences**. 1^a. ed. [s.l.] Academic Press, 2000.

RIBEIRO, L. F. **Criação in vitro de xilanases estimuladas por D-xilose**. [s.l.: s.n.].

RIES, J. et al. Microsecond Folding and Domain Motions of a Spider Silk Protein Structural Switch. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 17136–17144, 2014.

RIES, J.; SCHWILLE, P. Fluorescence correlation spectroscopy. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 34, n. 5, p. 361–8, maio 2012.

ROWLEY, J. et al. Efficient extraction of xylan from delignified corn stover using dimethyl sulfoxide. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 433–438, 2013.

RULLER, R. **Evolução Dirigida de Endoxilanases e a Aplicação da Metagenômica na Biotecnologia Industrial**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 279–291, 2003.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 198–210, 2013.

SAMBROOK, J.; W. RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

SANCHEZ ALPONTI, J. **Estudo da termoestabilidade de uma endoxilanase GH11 recombinante através da mutagênese sítio-dirigida.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

SAUER, M.; NEUWEILER, H. PET-FCS: Probing Rapid Structural Fluctuations of Proteins and Nucleic Acids by Single-Molecule Fluorescence Quenching. **Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1076, p. 371–417, 2014.

SCHAEFFEL, D. et al. Fluorescence correlation spectroscopy directly monitors coalescence during nanoparticle preparation. **Nano letters**, v. 12, n. 11, p. 6012–7, 14 nov. 2012.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Meth**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SCHRODINGER LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1**, 2010.

SCHWARZE, S. et al. The N-terminal domains of spider silk proteins assemble ultrafast and protected from charge screening. **Nature communications**, v. 4, p. 2815, 2013.

SCHWILLE, P.; HAUSTEIN, E. Fluorescence Correlation Spectroscopy. p. 1–33, 2001.
SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33–64, 2002.

SUGUNAN, S. K. **Photophysical Studies of Metalloporphyrins for Sensitized Noncoherent Photon Upconversion.** [s.l.] University of Saskatchewan, 2012.

TADEU, I. et al. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC) DE BIOMOLÉCULAS: ASPECTOS FUNDAMENTAIS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.

TEMELLI, F. Extraction and Functional Properties of Barley B-Glucan as Affected by Temperature and pH. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 6, p. 1194–1198, 1997.

TÖRRÖNEN, A.; ROUVINEN, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. **Journal of biotechnology**, v. 57, p. 137–49, 16 set. 1997.

VAN GUNSTEREN, W. F. et al. **Biomolecular Simulation: The {GROMOS96} manual and userguide**. Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, 1996.

VANDERMARLIERE, E. et al. Crystallographic analysis shows substrate binding at the -3 to +1 active-site subsites and at the surface of glycoside hydrolase family 11 endo-1,4-beta-xylanases. **The Biochemical journal**, v. 410, n. 1, p. 71–79, 2008.

VIEIRA, D.; DEGREVE, L. An insight into the thermostability of a pair of xylanases: the role of hydrogen bonds. **Molecular Physics**, v. 107, n. 1, p. 59–69, 2009.

VIEIRA, D. S.; DEGRÈVE, L.; WARD, R. J. Characterization of temperature dependent and substrate-binding cleft movements in *Bacillus circulans* family 11 xylanase: a molecular dynamics investigation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1790, n. 10, p. 1301–6, out. 2009.

VIEIRA, D. S.; WARD, R. J. Conformation analysis of a surface loop that controls active site access in the GH11 xylanase A from *Bacillus subtilis*. **Journal of molecular modeling**, v. 18, n. 4, p. 1473–9, abr. 2012.

WARD, R. J. et al. Identification of a putative membrane-inserted segment in the alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 33, p. 7477–7484, 1994.

WHISTLER, R. L.; MASAK JR., E. Enzymatic Hydrolysis of Xylan. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 77, n. 5, p. 1241–1243, 1955.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., p. 668–673, 2004.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2008.

YANG, J. et al. Ion-induced aggregation of conjugated polyelectrolytes studied by fluorescence correlation spectroscopy. **The journal of physical chemistry. B**, v. 117, n. 50, p. 16314–24, 19 dez. 2013.

YEM, A. W. et al. Site-specific chemical modification of interleukin-1?? by acrylodan at cysteine 8 and lysine 103. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 5, p. 3122–3128, 1992.

ZHANG, J. et al. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9090–9095, 2011.

Apêndices

APÊNDICE A: Três calibrações do volume confocal através do ajuste das curvas de autocorrelação de fluorescência com um modelo de difusão pura de uma espécie. Foi utilizado o fluoróforo *Atto655-carboxy* como padrão em solução aquosa a temperatura ambiente (~25 °C). O tempo de aquisição foi de 5 min cada.

A

$$\begin{aligned} V_{\text{Eff}} &= 0.950 \text{ fL} \\ \tau_1 &= 56.4 \text{ } \mu\text{s} \\ D_1 &= 425.3 \text{ } \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.84 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.497 \\ \kappa &= 5.7412 \\ z_0 &= 1.7783 \text{ } \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3097 \text{ } \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 2.0877 \\ \chi^2 &= 1.169 \end{aligned}$$

B

$$\begin{aligned} V_{\text{Eff}} &= 0.965 \text{ fL} \\ \tau_1 &= 57.2 \text{ } \mu\text{s} \\ D_1 &= 425.2 \text{ } \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.57 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.329 \\ \kappa &= 5.7105 \\ z_0 &= 1.7812 \text{ } \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3119 \text{ } \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 3.0414 \\ \chi^2 &= 1.285 \end{aligned}$$

C

$$\begin{aligned} V_{\text{Eff}} &= 0.923 \text{ fL} \\ \tau_1 &= 56.2 \text{ } \mu\text{s} \\ D_1 &= 425.1 \text{ } \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \langle C \rangle &= 0.255 \text{ nM} \\ \langle N \rangle &= 0.142 \\ \kappa &= 5.6104 \\ z_0 &= 1.7344 \text{ } \mu\text{m} \\ w_0 &= 0.3091 \text{ } \mu\text{m} \\ \rho_1 &= 7.0606 \\ \chi^2 &= 1.124 \end{aligned}$$

APÊNDICE B: Calibração do volume confocal através do ajuste das curva de autocorrelação de fluorescência com um modelo de difusão pura de uma espécie. Foi utilizado o fluoróforo *Atto655-carboxy* como padrão em solução aquosa a temperatura ambiente (~25 °C). O tempo de aquisição foi de 5 min.

APÊNDICE C: Calibração do volume confocal através do ajuste da curva de autocorrelação de fluorescência com um modelo de difusão pura de uma espécie. Foi utilizado o fluoróforo *Atto655-carboxy* como padrão em solução aquosa a temperatura ambiente (~25 °C). O tempo de aquisição foi de 5 min.

APÊNDICE D: Calibração do volume confocal através do ajuste da curva de autocorrelação de fluorescência com um modelo de difusão pura de uma espécie. Foi utilizado o fluoróforo *Atto655-carboxy* como padrão em solução aquosa a temperatura ambiente (~25 °C). O tempo de aquisição foi de 5 min.

APÊNDICE E: Histograma do tempo de vida de fluorescência obtido a partir da mesma aquisição pontual referente ao **APÊNDICE D**.

APÊNDICE F: Imagens de *FLIM* de um filme de arabinoxilano de trigo na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de 0 μm em relação à superfície vidro-filme, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 1800 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} , e área de 6400 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, combinação de três imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *D*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 1.866 ns em cada pixel. *E*, idem *D*, tempo de vida de 3.294 ns; *F*, idem *D*, tempo de vida de 0.738 ns.

APÊNDICE G: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana tratado pelo método Air na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +5 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 80 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 2951 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, regiões mais brilhantes como *ROI* e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 78.32 μm^2 .

APÊNDICE H: Imagens de *FLIM* de um fragmento de bagaço de cana tratado pelo método Air na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +3 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicroico foi de 78 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 18.40 μm x 18.40 μm e 512 pixels x 512 pixels, resultando em uma densidade de 27.8 pixels μm^{-1} , e área de 338.6 μm^2 . O objeto fluorescente tem uma área de 231.3 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, região mais brilhante como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 2.756 μm^2 ; *C*, combinação de três imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada píxel; *D*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 2.733 ns em cada pixel. *E*, idem D, tempo de vida de 1.273 ns; *F*, idem D, tempo de vida de 0.479 ns.

APÊNDICE I: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana deslignificado com NaClO_2 na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +1 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 72 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 639.3 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, combinação de duas imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *D*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 1.389 ns em cada pixel. *E*, idem *D*, tempo de vida de 2.948 ns.

APÊNDICE J: Imagens de *FLIM* de um fragmento de bagaço de cana deslignificado com NaClO_2 na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +2 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 92 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 1866 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, regiões mais brilhantes como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 244 μm^2 ; *D*, combinação de duas imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *E*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 1.592 ns em cada pixel. *F*, idem E, tempo de vida de 3.388 ns.

APÊNDICE K: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana desdesignificado com NaClO_2 na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +6 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicroico foi de 70 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 59.40 μm x 59.40 μm e 512 pixels x 512 pixels, resultando em uma densidade de 8.6 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 527 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, regiões mais brilhantes como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 36.3 μm^2 ; *D*, combinação de duas imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *E*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 1.391 ns em cada pixel. *F*, idem E, tempo de vida de 2.913 ns.

APÊNDICE L: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana deslignificado com NaClO_2 na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +10 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 92 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 1774 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, combinação de duas imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *D*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 1.591 ns em cada pixel. *E*, idem *D*, tempo de vida de 3.303 ns.

APÊNDICE M: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana insolúvel em oxalato na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +3 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 82 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 3521 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região mais brilhante como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 14.7 μm^2 ; *D*, região com brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 206 μm^2 .

APÊNDICE N: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana insolúvel em oxalato na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +10 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 84 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 2577 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 799.6 μm^2 .

APÊNDICE O: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana tratado pelo método Air na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de 0 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 220 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 30.30 μm x 30.30 μm e 512 pixels x 512 pixels, resultando em uma densidade de 16.9 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 279.4 μm^2 . *A*, parâmetros de ajuste e imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 69.5 μm^2 ; *D*, combinação de três imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *E*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 1.289 ns em cada pixel. *F*, idem E, tempo de vida de 0.495 ns; *G*, idem E, tempo de vida de 3.185 ns.

APÊNDICE P: Imagens de *FLIM* de uma fração de arabinoxilano de farinha de trigo na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de 0 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 86 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . *A*, imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 991.9 μm^2 .

APÊNDICE Q: Imagens de *FLIM* de uma fração de arabinoxilano de farinha de trigo na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de 0 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 84 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 30.60 μm x 30.60 μm e 512 pixels x 512 pixels, resultando em uma densidade de 16.7 pixels μm^{-1} . *A*, imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 263.7 μm^2 ; *D*, combinação de três imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel.

APÊNDICE R: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana após extração com DMSO na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +15 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicroico foi de 193 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 μm x 80.00 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 1879 μm^2 . *A*, imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intenso como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 239.3 μm^2 ; *D*, região de brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 890.5 μm^2 .

APÊNDICE S: Imagens de *FLIM* de uma fração de bagaço de cana extraído com H₂O e etanol na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +5 µm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 202 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 80.00 µm x 80.00 µm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 3.2 pixels µm⁻¹. O objeto fluorescente tem uma área de 592.3 µm². *A*, imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intenso como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 78.61 µm²; *D*, região de brilho intermediário como ROI e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 537.2 µm².

APÊNDICE T: Imagens de *FLIM* de uma fração de xilano de madeira de faia na presença de XynA-N151C-AttoOxa11. A altura do foco foi de +1 μm em relação à superfície vidro-fragmento, e a potência óptica do feixe de laser após passar pelo espelho dicróico foi de 84 nW. O tamanho da imagem adquirida foi de 45.60 μm x 45.60 μm e 256 pixels x 256 pixels, resultando em uma densidade de 5.6 pixels μm^{-1} . O objeto fluorescente tem uma área de 641.3 μm^2 . *A*, imagem colorida de acordo com o tempo de vida de fluorescência médio de cada pixel; *B*, imagem colorida de acordo com a intensidade de fluorescência de cada pixel; *C*, região de brilho intenso como *ROI* e seus respectivos parâmetros de ajuste, área de 17.58 μm^2 . *D*, combinação de duas imagens coloridas em escala RGB de acordo com a amplitude de cada fator pré-exponencial em cada pixel; *E*, imagem gerada de acordo com a amplitude do fator pré-exponencial referente ao tempo de vida de 0.844 ns em cada pixel. *F*, idem *E*, tempo de vida de 2.208 ns.