

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

MARINA PAGLIONE RAMIA

**Estudos funcionais e estruturais de uma endoglucanase de *Phanerochaete
chryso sporium* da família 45 das hidrolases de glicosídeos**

São Carlos

2015

MARINA PAGLIONE RAMIA

Estudos funcionais e estruturais de uma endoglucanase de *Phanerochaete chrysosporium* da família 45 das hidrolases de glicosídeos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Original

São Carlos

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramia, Marina Paglione

Estudos funcionais e estruturais de uma endoglucanase de *Phanerochaete chrysosporium* da família 45 das hidrolases de glicosídeos / Marina Paglione Ramia; orientador Igor Polikarpov -- São Carlos, 2015.

137 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Celulase. 2. Endoglucanase. 3. Hidrolases de glicosídeos. 4. Cristalografia de macromoléculas. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Paglione Ramia

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 07/12/2015

Comissão Julgadora

Dr(a). Igor Polikarpov

Instituição: IFSC/USP

Dr(a). Cristina Paiva de Sousa

Instituição: UFSCar/São Carlos

Dr(a). Ana Paula Ulian de Araujo

Instituição: IFSC/USP

Dr(a). Carlos Alberto Labate

Instituição: ESALQ/USP

Dr(a). Artur Torres Cordeiro

Instituição: CNPEM/Campinas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a belíssima oportunidade da vida.

Aos meus pais Márcia e Júnior, por todo o esforço, amor e dedicação, sempre apontando o caminho e direcionando minhas escolhas até que eu pudesse fazê-las sozinha.

Ao meu irmão Miguel pelo companheirismo, cumplicidade, apoio e ombro amigo.

Ao Elder, por ser meu companheiro, e pela vida que estamos construindo juntos. Agradeço especialmente a maturidade, a força e a coragem que me impulsionam dia-a-dia a superar os obstáculos.

Ao Andre Godoy, amigo e colaborador fundamental neste trabalho. Obrigada pelas risadas, festas, açaís e por estar sempre pronto a ajudar com carinho e dedicação.

Ao Prof. Igor pela orientação e oportunidade.

Ao Prof. Alessandro e ao Prof. João por sempre estarem dispostos a oferecer auxílio.

Ao Dr. César Camilo e Dr. Marco Kadowaki pela paciência, auxílio e disposição em ensinar e ajudar sempre que preciso.

Ao Prof. Nei Pereira Júnior por me receber tão bem em sua maravilhosa cidade. Por todos que conheci lá, pela agradável recepção e disposição para me ajudar.

Ao Dr. Roberto Maeda que me recebeu, me orientou e tornou-se um grande amigo.

À FAPESP por financiar e dar todo suporte necessário para a realização desse projeto.

Ao IFSC por toda a infraestrutura e apoio oferecidos.

À Dra. Amanda por se dispor a ler esta tese e ser sempre tão prestativa. À Vanessa, Aline, Grazi, Mel e Renata por tamanho carinho e amizade, pelos nossos almoços e pelo apoio incondicional que recebo de vocês. Muito obrigada!

Aos amigos da faculdade Gabi, Dani, Jéssica, Flávia e Carla que apesar de longe sempre se fizeram presentes de alguma forma, mesmo que por meio de uma simples mensagem.

Aos irmãos de alma Galeno, Eric, Pri, Ivan e Wil. Porque apenas ver vocês me fazia transbordar de alegria. Sou grata pelos nossos poucos, mas intensos encontros. Vocês me fazem acreditar em um mundo melhor. *Gratidão!*

À todos os amigos da sala 8 e afins. Obrigada Danilo, Lis, Bruno, Caio, Atílio, Evandrinho, Vasia, Evandro, Karina, Mari e Carol.

Aos técnicos do laboratório de biotecnologia molecular João, Josimar e Maria. Meu agradecimento especial para Livia, por sempre estar disposta a ajudar, pela compreensão e carinho. Obrigada por tornar o nosso trabalho mais fácil.

À minha família em geral, tia Rose, tia Nê, tia Ana, tia Sílvia, tio Fer, tio Du, meus avós, bisavós, enfim, todos que contribuíram para que eu estivesse aqui e agora.

Às minhas primas Livia e Aline, que sempre me deram força e apoio, e mesmo não entendendo se colocaram a disposição para ler meu trabalho.

À Maria Avelar, mestre querida, e ao yoga, por me mostrar que o conhecimento não é só adquirido por meio do intelecto.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho!

Muito Obrigada!

*Existem duas maneiras de viver a vida: uma é acreditar que não existem milagres;
a outra é acreditar que tudo é um milagre.”*

Albert Einstein

RESUMO

RAMIA, M. P. **Estudos funcionais e estruturais de uma endoglucanase de *Phanerochaete chrysosporium* da família 45 das hidrolases de glicosídeos**. 2015. 137p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A importância do estudo das celulasas não se limita à aquisição de conhecimento científico, mas também ao grande potencial biotecnológico que elas representam. Isso se deve ao fato da celulose ser a molécula mais abundante presente na natureza e prover uma vasta gama de produtos e processos sustentáveis. Muitas famílias de celulasas já foram bem caracterizadas, enquanto outras permanecem ainda desconhecidas. Dentre estas últimas, a família 45 das hidrolases de glicosídeos é a família de celulasas fúngicas menos caracterizada tanto estruturalmente quanto funcionalmente. Recentemente foi proposta a divisão dessa família em três subfamílias e, até agora, apenas membros da subfamília A tiveram enzimas estruturalmente elucidadas. Nesse trabalho reportamos a estrutura cristalográfica da proteína recombinante endoglucanase de *Phanerochaete chrysosporium* (PcCel45A), a primeira das hidrolases de glicosídeos da subfamília C, e seu complexo com celobiose a 1,4 Å e 1,7 Å de resolução, respectivamente. A PcCel45A é uma enzima de domínio único, com uma estrutura em β -barril e seu empacotamento geral remete ao formato de âncora. O sítio ativo da enzima forma um longo sulco na superfície da estrutura, sendo que o seu centro catalítico é diferente das outras enzimas publicadas dessa família e o aspartato catalítico, que atua como aceptor de próton na reação de inversão, (Asp10) não é conservado. Adicionalmente, a estrutura cristalográfica dessa enzima apresenta mais similaridades com as β -expansinas (proteínas de plantas) e transglicosilases líticas (proteínas que clivam o peptidoglicano de bactérias) do que com as outras representantes da família 45, o que a torna ainda mais singular. Para entendermos melhor seu funcionamento foram realizadas mutações sítio-dirigidas nos principais resíduos do sítio ativo. O Asp121, conhecido por participar da reação de inversão das outras enzimas da família como doador de próton, mostrou-se essencial para a atividade da enzima, enquanto que outros resíduos conservados como a Tyr25, o Trp161 e o Asp92 afetaram, mas não aniquilaram a atividade da enzima, apresentando aproximadamente 20%, 50% e 10% da atividade da enzima nativa, respectivamente.

Palavras-chave: Celulase. Endoglucanase. Hidrolases de glicosídeos. Cristalografia de macromoléculas.

ABSTRACT

RAMIA, M. P. **Structural and functional studies of an endoglucanase from *Phanerochaete chrysosporium* belonging to the glycoside hydrolase family 45**. 2015. 137p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The importance of the study of the cellulases is not limited to generating significant scientific knowledge, since these enzymes represents an enormous potential in biotechnology. This is partly because cellulose is the most abundant molecule in nature and provides a wide range of products and sustainable process. Many cellulases families have been well characterized, while others still remain unknown. Among them, the glycoside hydrolase family 45 is the least well characterized both structurally and functionally, between fungal cellulases. It was recently proposed the subdivision of this family into three subfamilies, with structural information available only for subfamily A. In this work, we report the chrystallographic structure of the recombinant endoglucanase from *Phanerochaete chrysosporium* (PcCel45A), the first GH45 subfamily C and its complex with cellobiose at 1.4 Å and 1.7 Å respectively. The PcCel45A is a single domain enzyme, which has a β -barrel structure with the overall shape resembling an anchor. The active site of the enzyme has a long cleft on the surface, being remarkably different from those members of subfamily A, and the catalytic aspartate responsible for acting as proton acceptor (Asp10) is not present. Additionally, the chrystallographic structure of this enzyme has shown more similarity with β -expansins (plant proteins) and lytic transglycosylase (proteins that cleave the peptidoglycan of bacteria) than others representants of family 45, which makes it more singular. For a better understanding of its function, we perform pontual mutations in the main residues from active site. The Asp121, known for acting as proton acceptor in the inversion reaction of others enzymes, proved to be essential for the enzyme activity, while others conserved residues as Tyr25, Trp161 and Asp92 affected but not annihilated the enzyme activity, leaving approximately 20%, 50% and 10% of the native enzyme activity.

Keywords: Cellulase. Endoglucanase. Glycoside hydrolase. Macromolecular crystallography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura molecular do xiloglucano com quatro unidades de glicose (em branco e laranja claro) unidas por ligações β 1,4, com unidades de α -D-xilose ligadas a elas (azul). Cerca de metade dessas unidades contém extensões de resíduos β -D-galactose e L-fucose (laranja escuro e violeta respectivamente). 37
- Figura 2** - Representação esquemática das estruturas de polissacarídeos encontradas na parede celular. Celulose, xiloglucano (XyG) e (1,3:1,4)- β -D-glucano possui o esqueleto baseado em glicose (Glc), heteroxilano em xilose (Xyl), heteromanano em manose (Man), homogalacturonano (HG) e ramnogalactorunano II (RG I) em ácido galacturonônico (GalpA) e RG I alternados com o dissacarídeo de (GalpA) e ramnose (Rhap). 38
- Figura 3** – Monolignóis e os diferentes alvos de concentração na parede celular. Em A, as estruturas químicas dos monolignóis. Em B, representação do xilema de uma conífera. O álcool *p*-coumaril é depositado preferencialmente na lamela média e o álcool coniferil na parede secundária. 40
- Figura 4** – Em A: a pressão de turgescência (P) é a força contra a membrana plasmática. Seu sentido é para fora e é praticamente uniforme e isotrópica dentro de todos os compartimentos internos da célula. É contrabalanceada por uma força para o interior, igual e oposta exercida pela parede da célula contra a membrana plasmática (setas pretas). Essa força para dentro, gera uma tensão de tração no plano da parede da célula (seta amarela). A pressão de turgescência surge da acumulação de solutos osmoticamente ativos em todos os compartimentos intracelulares, resultando em fluxos de água transmembranares (setas vermelhas) para estabelecer o equilíbrio osmótico. O inchaço do protoplasto é limitado pela parede da célula, resultando em uma pressão de turgescência no interior da célula e em um stress no plano da parede celular. (B) Um esboço de microfibrilas de celulose (barras marrons) sendo "giradas" a partir do complexo da sintase de celulose (vermelho) e ligadas entre si por meio de polissacarídeos da matriz (cinza). Materiais de parede recém-sintetizados são depositados em um estado relaxado e se tornam um suporte somente depois que eles se integram na rede da parede. O alargamento da parede celular os torna elasticamente estirados de modo que começa a criar uma resistência. Neste ponto, o afrouxamento biofísico da rede da parede celular por expansinas ou outros agentes de afrouxamento é necessário para aliviar a tensão da parede, permitir a absorção de água e a continuidade do crescimento celular. 42

- Figura 5** - Mecanismo de reação proposto para a enzima transglicosilase lítica de *E. coli* GH102. Nesse mecanismo um aspartato realiza a doação de um próton para o oxigênio da ligação glicosídica, formando um intermediário positivamente carregado. Em seguida, o mesmo resíduo abstrai o próton do C6 ativando o O6 para um ataque intramolecular. 46
- Figura 6** - Esquema da degradação enzimática pelas enzimas endoglucanases (EGs em laranja), celobiohidrolases (CBH1 em azul claro, CBH2 em verde musgo), β -glucosidases (em verde limão), celobiose desidrogenase (CDH em cinza) e GH61, que oxida o C1 (em rosa), facilitando a ação da CBH2, e o C4 (em roxo), facilitando a atuação CBH1 (extremidade redutora). Os açúcares oxidados estão representados em vermelho. As flechas demonstram novos pontos de ataque para as CBHs a partir do meio da cadeia de celulose. 49
- Figura 7** -Árvore filogenética da família GH45. Sequências de plantas, moluscos, fungos, insetos, protozoários e bactéria foram incluídas e coloridas de acordo com a legenda. As barras verticais a direita correspondem as subfamílias, segundo a classificação proposta por Igarashi.¹² As sequências de plantas são expansinas, por isso não estão incluídas na classificação das subfamílias. 50
- Figura 8** - Representação topológica do duplo- Ψ - β -barril. As setas azuis indicam as folhas β , enquanto as caixas vermelhas indicam α -hélices. 51
- Figura 9** – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da enzima Hi_EGV. Essa enzima age com a inversão do carbono anomérico. O Asp121, doa um próton para o oxigênio da ligação glicosídica. A base da reação representada pelo Asp10 atua ativando uma água para o ataque nucleofílico. 52
- Figura 10** - Diagrama demonstrando o ponto de clivagem da celohexaose pela Hi_EGV. Essa enzima, ao clivar celohexaose, libera, preferencialmente, celobiose ou celotriose como produto que ocupa os subsítios +1 e +2 (+3 se o produto for celotriose). 52
- Figura 11** – Esquema da produção de cepas mutantes. Inicialmente o fungo é mantido em meio complexo, seguido do contato de um agente mutagênico. Em seguida, as cepas são inoculadas em meio mínimo seguida da adição de um aditivo que restauraria seu crescimento. 56
- Figura 12** - Sequência do gene PcCel45A de *P. chrysosporium*, contendo 717 pares de bases. 63
- Figura 13** – Esquema representando o sistema LIC (*Ligation Independent Cloning*). A produção de fitas simples no gene permite seu correto posicionamento na fita

simples do vetor, que se complementam, sendo, posteriormente, ligados pelas enzimas da bactéria. 65

Figura 14 – Representação esquemática do vetor pEXPYR. Esse vetor possui um gene promotor da glucoamilase (glaAp), seguido por um peptídeo sinal, cauda de histidina (H6), sítio TEV e a região ORF. Possui também uma sequência de terminação trpCt, para assegurar a correta terminação proteica. 67

Figura 15 – Representação esquemática da concentração da proteína em *hollow fiber*. Este equipamento permite a concentração de grandes volumes de extrato bruto da cultura do fungo *Aspergillus nidulans* para a produção da enzima de interesse. 71

Figura 16 - Modelo de formação do núcleo cristalino. O aumento da supersaturação promove a associação das moléculas que começam a se organizar e se reorientar, formando interações geometricamente arranjadas. Essas interações tendem a ordenar e estabilizar o agregado que aumenta de tamanho, originando o núcleo, que vai se desenvolver formando um cristal. 75

Figura 17 – Métodos de cristalização de proteínas. Em A: método da gota sentada (*sitting drop*). A solução da proteína (em rosa) é colocada sobre um pedestal juntamente com a solução de cristalização sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. Em B: método da gota pendurada (*hanging drop*). A solução da proteína é colocada sobre uma lamínula juntamente com a solução de cristalização e esta é invertida sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. 76

Figura 18 - Gel de agarose 1% demonstrando a amplificação do gene da PcCel45A com 717 pb a partir do cDNA de *P. chrysosporium*. A primeira coluna é referente ao marcador de massas moleculares. 81

Figura 19 – Teste de expressão realizado após a transformação da enzima PcCel45A em *A. nidulans*. Em A, colônias catalogadas. Em B, teste de expressão em meio contendo CMC. Após a verificação dos halos (atividade da enzima) essas colônias foram transferidas para meio líquido. A expressão em seguida foi verificada por gel SDS-PAGE. 81

Figura 20 - Análise da expressão da PcCel45A por quatro colônias anteriormente selecionadas pelo experimento top agar. A comparação da produção da proteína entre elas permitiu a obtenção da super expressora que foi escolhida para a produção da proteína em larga escala. 82

- Figura 21** - Cultura de *A. nidulans* após a incubação de 60 horas para expressão da proteína em larga escala. O meio extracelular é separado do fungo que cresce na superfície por filtração, para, posteriormente, ser concentrado em cartucho *Hollow-fiber*. 83
- Figura 22** - SDS-Page 15% relativo a concentração de 6 litros de cultura em *hollow fiber*. Após a concentração do meio, a banda mais proeminente é a proteína PcCel45A. 84
- Figura 23** - Purificação da enzima PcCel45A. Em A: Cromatograma de troca-iônica em coluna Q-sepharose 16/60 da purificação da PcCel45A. O pico, em vermelho, corresponde a eluição da proteína. Na legenda, %B corresponde ao tampão Citrato de Sódio, pH 4,0, acrescido de 1 M de NaCl. Em B: SDS-PAGE 15% demonstrando a pureza das amostras após a purificação de troca-iônica. 85
- Figura 24** - Perfil da atividade relativa da enzima PcCel45A para os diferentes pHs. Mantendo a temperatura constante, variou-se a faixa de pH entre 1 e 10, sendo que a partir do pH 7 a enzima não apresentou mais atividade significativa. 86
- Figura 25** – Perfil da atividade relativa da enzima PcCel45A variando a temperatura de 30 a 80 °C. Para este teste mantivemos o pH ótimo da enzima (pH 4,0). 87
- Figura 26** - Perfil da especificidade por substratos pela enzima PcCel45A. Histograma representado em termos de atividade relativa após 15 minutos de reação sob condições ótimas com os diferentes substratos. A maior atividade foi para liquenano, seguido por papel filtro, β -glucano, galactomanano e CMC. Nos demais substratos testados não apresentou atividade. 88
- Figura 27** - Perfil da especificidade por substratos da enzima PcCel45gj. Histograma representado em termos de atividade relativa, após 1 hora de reação, a temperatura de 30 °C. 89
- Figura 28** - Análise dos produtos de reação solúveis depois da incubação da enzima PcCel45A com PASC. A reação foi mantida à 50°C por 24 horas. Na linha 1: padrão de celooligosacarídeos com grau de polimerização de 1 a 7 (C1 a C7). Na linha 2: sobrenadante da reação de hidrólise. Na linha 3: sobrenadante da reação concentrado 10 vezes. 91
- Figura 29** - Cristal da proteína PcCel45A utilizado no experimento de difração de raios X. 95

- Figura 30** - Estrutura geral da PcCel45A, com ênfase para a fenda na superfície da enzima. O formato geral da PcCel45A lembra uma âncora, devido ao posicionamento dos *loops* 4 e 9. 97
- Figura 31** - Forma geral da estrutura de PcCel45A. As 6 folhas da estrutura β -barril estão representadas em verde, seguidas pelas 4 α -hélices em laranja. Os *loops* estão em amarelo. As esferas roxas simbolizam as pontes dissulfeto. 98
- Figura 32** - Sítio ativo de PcCel45A. Em A, vemos o sulco na superfície de PcCel45A e o posicionamento da celobiose nos subsítios +1 e +2. Em bastão estão os aminoácidos Asp92 e Asp121, a uma distância de 8 Å um do outro. Também vemos o resíduo de triptofano 161 conservado na região C-terminal da enzima. Em B, vemos com mais detalhes a interação da celobiose com os resíduos Asn99, Asp121, Met24, Gly138 e Tyr74. 99
- Figura 33** - Comparação entre PcCel45A e a enzima Hi_EGV. Em A, a estrutura global da PcCel45A (em verde oliva) sobreposta com a estrutura de Hi_EGV (em azul). Em B, superfície da PcCel45A demonstrando o sulco do sítio ativo. Em C, superfície da Hi_EGV, demonstrando o sítio ativo, com *loops* envolvendo a fenda. 101
- Figura 34** - Comparação da enzima ME_EGV com PcCel45A. Em A: sobreposição das duas estruturas. Em B: a forma geral da superfície de PcCel45A, lembrando uma âncora. Em C: a forma geral da superfície de ME_EGV, demonstrando uma fenda menos alongada e mais globular. 102
- Figura 35** - Comparação entre as estruturas de Hi_EGV e PcCel45A destacando os aspartatos. Em A: os aspartatos catalíticos (amarelo) presentes no sítio ativo de Hi_EGV em complexo com a celohexaose (verde). Em B: aspartatos do sítio de PcCel45A (em amarelo) em complexo com a celobiose (verde). 103
- Figura 36** - Sítio ativo da da Hi_EGV e PcCel45A. Em A: aminoácidos Asp121, Asp10 e Tyr8 em bastão amarelo, com destaque para a Tyr25 que compõe o chão do centro catalítico em Hi_EGV. Em B: aminoácidos Asp121, Asp92 e Tyr25 na estrutura de PcCel45A. 103
- Figura 37** - Sobreposição da estrutura de PcCel45A (em verde oliva) com o domínio 1 da expansina EXPB1 (vermelho), com ênfase para os triptofanos. Circulado em vermelho encontra-se o Trp161 de PcCel45A sobreposto com o domínio 2 das expansinas. 104
- Figura 38** - Comparação entre PcCel45A e transglicosilase lítica. Em A: Superposição da PcCel45A (azul) com o domínio 1 da transglicosilase lítica EcMltA (rosa).

Em B: Comparação entre a posição da celobiose (amarelo) e a citohexaose (cinza) de EcMltA demonstra uma posição similar no sítio ativo. Em C: A tríade catalítica Asp-Tyr-Asp de PcCel45A (verde) superposta com os resíduos de EcMltA (rosa) e NgMltA (violeta) demonstra que o posicionamento desses resíduos são conservados nessa enzima pertencente a subfamília C das GH45. 106

Figura 39 - Teste de expressão da proteína W161A. Vemos que a colônia super-expressora é a colônia 2. 111

Figura 40 - Teste de expressão da proteína D92A. Vemos que a colônia super-expressora é a colônia 2. 112

Figura 41 - Gel SDS 15% referente a purificação da enzima D92A após a cromatografia de exclusão molecular corado com nitrato de prata. 113

Figura 42 - Atividade relativa da enzima nativa (WT) e mutantes. Os resultados estão apresentados em termos de atividade relativa. As enzimas foram testadas a 50 °C por 15 minutos utilizando liquenano como substrato. 114

Figura 43 - Produção de celooligossacarídeos por PcCel45A, monitorada por HPLC após 24 horas de incubação com PASC. Em A: produtos da reação de hidrólise da enzima nativa (WT, em linha preta) e dos mutantes D121A (vermelha), D92A (azul) e W161A (verde). 115

Figura 44 - Comparação entre a fenda do sítio ativo de PcCel45A e Hi_EGV. Em A: Estrutura da PcCel45A com sítio -4, -3 e -2 preenchidos com a “celotriose” da estrutura de Hi_EGV e sítios +1, +2 e +3 preenchidos com uma superposição de um polímero mais longo sobre a celobiose do complexo PcCel45A-celobiose (em azul). O modelo foi alongado para mostrar que os açúcares +4 e +5 (magenta) seriam facilmente acomodados no sítio positivo. Em B: Estrutura da Hi_EGV com os mesmos açúcares mostrados em A. 116

Figura 45 – Sítio ativo de PcCel45A demonstrando a posição da asparagina (Asn99) comparada com o resíduo catalítico Asp121. 121

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Componentes estruturais da parede celular de plantas 36
- Tabela 2** – Sequências dos *primers* forward (FW) e reverse (RV) para produção da enzima PcCel45A. 64
- Tabela 3** - Sequências dos *primers* forward (FW) e reverse (RV) do vetor pEXPYR. 67
- Tabela 4** - Dados cristalográficos da coleta e estatísticas de refinamento da proteína PcCel45A nativa e em complexo com a celobiose. Os valores entre parênteses se referem a resolução mais alta. 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBM	Módulo de Ligação a Carboidratos (do inglês: <i>Carbohydrate Binding Module</i>)
CBH	Celobiohidrolase
CMC	Carboximetilcelulose
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol)
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNS	Ácido dinitrosalicílico
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EG	Endoglucanase
GH	Hidrolase de glicosídeo (do inglês <i>Glycoside hydrolase</i>)
GH45	Família 45 de hidrolases de glicosídeos (do inglês <i>Glycoside hydrolase family 45</i>)
GP	Grau de polimerização
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (do inglês: <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>)
LIC	Clonagem independente de ligação (do inglês <i>Ligation Independent Cloning</i>)
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MM	Meio mínimo para <i>A. nidulans</i> suplementado com maltose (do inglês <i>Minimal Medium</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PASC	Celulose amorfa (do inglês <i>Phosphoric Acid Swollen Cellulose</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietileno glicol
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	potencial hidrogeniônico
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
rpm	rotações por minuto
U	unidade de atividade enzimática
M	molar (mol L^{-1})
mM	milimolar
ng	nanograma
kDa	quilodalton (10^3 g mol^{-1})
nm	nanômetro
μmol	micromol
μM	micromolar
K_m	constante de <i>Michaelis-Menten</i>
V_{max}	velocidade máxima
nM	nanomolar
μm	micrômetro
UV	ultravioleta
λ	comprimento de onda
Å	Ângstron
F_{calc}	fator de estrutura calculado
F_{obs}	fator de estrutura observado
R_{factor}	fator R

Sumário

1 Introdução	31
2 Revisão de literatura	35
2.1 Parede celular	35
2.1.1 Componentes da parede celular	35
2.1.2 Ligações entre carboidratos	36
2.1.3 Matriz polissacarídica.....	37
2.1.3.1 Pectina.....	38
2.1.3.2 Proteínas estruturais.....	39
2.1.3.3 Lignina.....	39
2.1.3.4 Celulose.....	41
2.2 O crescimento da planta	41
2.3 A hidrólise da celulose.....	43
2.3.1 Hidrolases de glicosídeos (GH)	43
2.3.2 Transglicosilases	44
2.3.3 Celulasas	46
2.3.3.1 Endoglucanases.....	47
2.3.3.2 Exoglucanases.....	48
2.3.3.3 β -glucosidases.....	48
2.3.3.4 CBM.....	48
2.3.4 Modo de ação e sinergismo.....	48
2.4 GH45.....	50
2.4.1 Subfamília A.....	51
2.4.2 Subfamília B.....	53
2.4.3 Subfamília C.....	54
2.5 O fungo basidiomiceto <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	54
2.6 Fungos como sistema de expressão.....	55
3 Objetivos	59
3.1 Objetivos gerais	59
3.2 Objetivos específicos	59
4 Material e métodos	61
4.1 Biblioteca de cDNA de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	63
4.2 Gene da endoglucanase V de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	63

4.3 Amplificação gênica	64
4.4 Clonagem pelo sistema LIC (<i>Ligation Independent Cloning</i>)	64
4.5 Vetor pEXPYR	66
4.6 Tratamento com a T4 DNA Polimerase	68
4.7 Transformação em células DH5 α de <i>Escherichia coli</i>	68
4.8 Mutação sítio-dirigida	68
4.9 Expressão heteróloga da proteína PcCel45A em <i>Aspergillus nidulans</i>	69
4.10 Seleção dos clones e teste de expressão	69
4.11 Produção da enzima Endoglucanase V de <i>P. chrysosporium</i>	70
4.12 Purificação	70
4.12.1 Concentração da proteína PcCel45A por Fluxo Tangencial	70
4.12.2 Cromatografia de troca-iônica	71
4.13 Ensaio enzimáticos	72
4.14 Análise do produto de reação por TLC (<i>Thin Layer Chromatography</i>)	73
4.15 Análise dos produtos de reação por HPAE-PAD	74
4.16 Ensaio de cristalização	74
4.17 Coleta e processamento dos dados cristalográficos	76
4.18 Resolução da estrutura	78
5 Resultados e Discussão	81
5.1 Clonagem	81
5.2 Expressão heteróloga em <i>Aspergillus nidulans</i>	81
5.3 Expressão da endoglucanase de <i>P. chrysosporium</i> por <i>A. nidulans</i>	83
5.4 Purificação	83
5.4.1 Concentração da proteína em cartucho <i>hollow-fiber</i>	83
5.4.2 Purificação em coluna Q-sepharose (troca-iônica)	84
5.5 Caracterização bioquímica	85
5.5.1 Teste do pH ótimo	85
5.5.2 Teste de temperatura	86
5.5.3 Painel de substratos	87
5.5.5 Análise do produto da enzima nativa por TLC	90
6 Resultados e Discussão.....	93
6.1 Cristalização, coleta de dados e processamento	95
6.2 Modelo estrutural da PcCel45A	97
6.3 Estrutura da PcCel45A em complexo com a celobiose	99
6.4 Comparação entre PcCel45A e outras GH45	100
6.5 Comparação estrutural da PcCel45A e β -expansinas	104
6.6 Comparação estrutural de PcCel45A e transglicosilase lítica	105

7 Resultados e Discussão	109
7.1 Produção do DNA dos mutantes e transformação em <i>A. nidulans</i>	111
7.2 Purificação	112
7.3 Teste de atividade dos mutantes	113
7.4 Análise dos produtos por HPAE-PAD	115
8 Resultados recentes	121
9 Conclusões e perspectivas	125
REFERÊNCIAS	129

Capítulo 1

Introdução



“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”

John Dewey

1 Introdução

Diariamente, as plantas produzem aproximadamente 50 kg de celulose por pessoa, o que torna a biomassa lignocelulósica o polímero mais abundante do planeta.¹⁻² Devido a isso, a sua conversão em outros produtos e bioprocessos traz uma proposta sustentável, tornando-se alvo de pesquisas mundiais.

A celulose é um biopolímero linear composto, aproximadamente, por 10.000 a 15.000 moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4. A molécula de celulose contém muitos grupos hidroxila polares, o que permite a interação entre moléculas de cadeias adjacentes, formando fibras. Essas fibras são estruturalmente fortes e resistentes a ataques químicos e físicos, portanto, produtos de celulose são vastamente utilizados em construção e produção de papel.³ Ela também é utilizada na indústria têxtil, como as fibras de algodão, na indústria alimentícia, como aditivos, na produção de biocombustíveis, ácidos orgânicos, enzimas, biosorventes, entre outros.⁴⁻⁵

Para alguns produtos, como é o caso dos biocombustíveis, é necessário que a celulose seja hidrolisada a açúcares fermentescíveis, o que ocorre por duas vias principais: hidrólise ácida ou enzimática.

A hidrólise ácida necessita de condições mais severas para atingir altos níveis de conversão a glicose, além de formar inibidores da fermentação, o que dificulta os processos posteriores.⁶ Por essa razão, grandes investimentos estão sendo realizados para o aprimoramento da hidrólise enzimática. Sua vantagem em relação a primeira citada, consiste na alta especificidade da enzima pelo substrato, com altos rendimentos, baixos custos energéticos e condições de produção mais amenas do que os processos químicos.⁷

Apesar do grande potencial da hidrólise enzimática, alguns obstáculos ainda precisam ser superados. A recalcitrância da parede celular, por exemplo, impede a acessibilidade das enzimas no substrato.⁸ Adicionalmente, é necessário selecionar enzimas mais estáveis e eficientes, para a consequente diminuição dos custos do processo. Devido a este potencial, muitos esforços foram empregados para facilitar esse processo de hidrólise da celulose e, com isso, muito se foi descoberto a respeito das hidrolases de glicosídeos.⁹

As hidrolases de glicosídeos são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas entre polímeros de glicose ou entre uma glicose e outra molécula não polissacarídica.¹⁰ A nomenclatura desse grupo se deve ao nome do substrato que essas enzimas utilizam, podendo em alguns casos derivar dos mecanismos moleculares que possuem.

Baseada nas similaridades das sequências de aminoácidos, foi proposta uma classificação que visa refletir melhor as características estruturais dessas enzimas.¹¹ Com a comparação entre as sequências das hidrolases de glicosídeos e outras enzimas relacionadas, foi possível agrupá-las em famílias, o que facilita o entendimento das bases evolutivas desse grupo, além de uma organização mais completa das informações. O banco de dados que contém essa classificação e essas informações é o CAZy.¹⁰

Apesar de muitas famílias já possuírem seus mecanismos muito bem estabelecidos, com uma grande variedade de estruturas elucidadas, há ainda muitas lacunas a serem esclarecidas. Uma das famílias que pouco se conhece a respeito é a família 45. Há pouca informação estrutural sobre essa família e, as informações que existem, permitiram uma divisão dessa família em três subfamílias, denominadas A, B e C.¹² Apesar de escassa, grande parte das informações que existem dessa família se enquadra para as proteínas pertencentes à subfamília A, o que torna ainda mais indispensável a busca de informações funcionais e a elucidação de estruturas das outras subfamílias. Tendo isso em vista, o presente trabalho visou a elucidação estrutural de uma endoglucanase V pertencente à subfamília C e a discussão dessa estrutura comparada com as outras enzimas da família.

O microorganismo que produz essa endoglucanase é o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*. Esse fungo é classificado como sendo de podridão branca (*white-rot*), devido a sua capacidade de degradar lignina seletivamente.¹³ Além disso, possui uma maquinaria celulolítica similar e igualmente avançada a do fungo *Trichoderma reesei*, que é considerado modelo, por ser o mais bem estudado.¹⁴⁻¹⁵

Capítulo 2

Revisão de literatura



“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

Mahatma Gandhi

2 Revisão de literatura

2.1 Parede celular

A parede celular é uma estrutura presente em procariotos, fungos, plantas e algas. Entre esses diversos grupos, ela difere em composição química e estrutura microscópica. Sua função na célula vegetal é prover a força mecânica para que a planta consiga crescer em altura e se desenvolver. Ela age como um exoesqueleto que controla o formato da célula e permite que a planta suporte altas pressões de turgor.¹⁶ Ao circundar cada célula individualmente, age evitando o deslizamento entre as células adjacentes, e ao mesmo tempo permite a troca de solutos e moléculas sinalizadoras através de estruturas designadas plasmodesmos.¹⁷ Também comporta-se como uma barreira de difusão, que limita o tamanho da macromolécula que vai atingir a membrana plasmática, impedindo a entrada de patógenos.^{16; 18}

A parede celular pode ser classificada em parede celular primária e secundária. As paredes primárias são formadas quando as células estão em crescimento, sendo não especializadas e similares em todos os tipos de célula. Já as paredes secundárias são formadas quando o crescimento celular já cessou, normalmente são especializadas em sua estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula.¹⁶

2.1.1 Componentes da parede celular

As plantas convertem energia solar em energia química armazenada nas ligações entre as moléculas de açúcar, sintetizando assim carboidratos que vão servir como fonte de energia e como blocos de proteção que constituem a parede vegetal.¹⁹ Na parede celular primária, microfibrilas de celulose estão impregnadas em uma matriz de polissacarídeos. A junção dessas duas estruturas permite que a célula tenha flexibilidade e ao mesmo tempo força mecânica. Essa matriz compreende dois grandes grupos de polissacarídeos: hemiceluloses e pectina, além de uma pequena quantidade de proteínas estruturais. Dependendo do tipo de célula e das espécies de plantas, os polímeros da matriz variam. A diversidade dos polímeros componentes da parede celular das plantas pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes estruturais da parede celular de plantas.

Classe	Exemplos
Celulose	Microfibrilas de (1,4) β -D-glucano
Matriz polissacarídica: Pectinas Hemiceluloses	Homogalacturonana Ramnogalacturonano Arabinano Galactano Xiloglucano Xilano Glucomanano Arabinoxilano (1,3) β -D-glucano (1,3-1,4) β -D-glucano (gramíneas apenas)
Lignina	Álcool coniferil Álcool sinapil Álcool <i>p</i> -coumaril
Proteínas estruturais	HRGPs – GRPs, PRPs Extensinas Proteínas Arabinogalactano (AGPs)

Fonte: Elaborada pela autora

2.1.2 Ligações da estrutura de carboidratos

O carbono anomérico está sempre ligado à hidroxila de outro açúcar ou hidroxilamina (NH₂-OH). A ligação da D-glicose com outro açúcar pode ocorrer nos oxigênios dos carbonos 2, 3, 4 ou 6, sendo que o oxigênio do carbono 5 está indisponível por constituir o anel.

Os polissacarídeos são nomeados de acordo com os principais açúcares que os constituem. Todos eles possuem um esqueleto de açúcares o qual é designado pelo último nome. Por exemplo, assim como a celulose, o xiloglucano é composto por um esqueleto de resíduos (1,4) β -D-glucose. Entretanto, ele possui grupos laterais que contém xilose, galactose, e com frequência, uma fucose terminal, como observamos na figura 1.

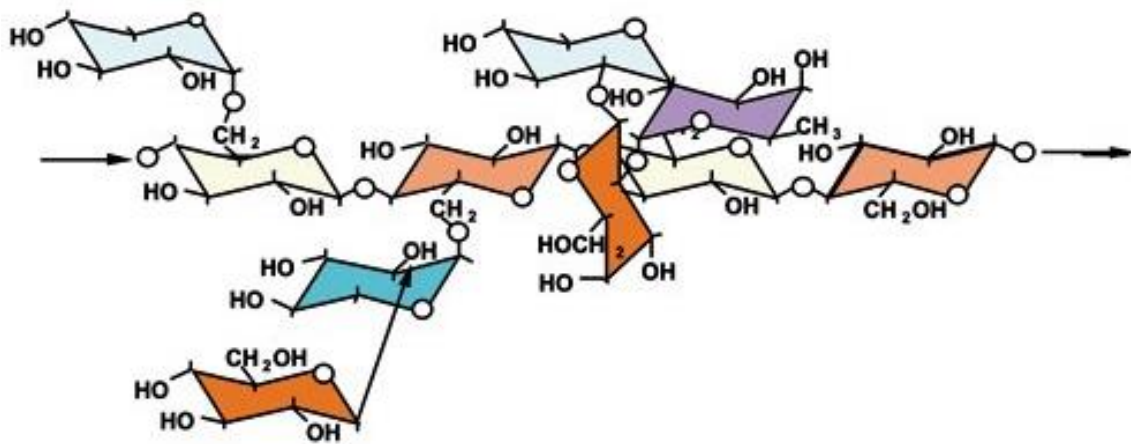


Figura 1 - Estrutura molecular do xiloglucano com quatro unidades de glicose (em branco e laranja claro) unidas por ligações β 1,4, com unidades de α -D-xilose ligadas a elas (azul). Cerca de metade dessas unidades contém extensões de resíduos β -D-galactose e L-fucose (laranja escuro e violeta respectivamente).

Fonte: CARPITA et al.²⁰

2.1.3 Matriz polissacarídica

Também conhecida como hemicelulose, a matriz polissacarídica é composta de um grupo heterogêneo de polissacarídeos. Essa matriz possui uma organização estrutural inferior, principalmente, devido às ramificações e a estrutura não linear dos polissacarídeos que a compõem. A variação de sua composição depende do tipo do tecido e da espécie da planta. Como exemplo, nas paredes primárias das dicotiledôneas, o polissacarídeo mais abundante é o xiloglucano. Os grupos laterais do xiloglucano não permite que este se agrupe em uma microfibrila cristalina (figura 1). Por serem maiores (de 50 a 500 nm) que o espaço entre as microfibrilas de celulose (20-40 nm), eles atuam unindo as microfibrilas. A matriz polissacarídica unida com a celulose se entrecruza com moléculas de lignina, formando uma grande rede de interações entre os átomos, o que provê a força estrutural observada.²¹

A fração da hemicelulose pode conter também outros importantes polissacarídeos como glucuronoarabinoxilano e glucomananos. As paredes secundárias, normalmente, possuem menos xiloglucanos e mais xilanos e glucomananos. A parede celular de gramíneas contém apenas uma pequena quantidade de xiloglucano e pectina que foram substituídos por glucuronoarabinoxilano e (1,3-1,4) β -D-glucanos. Esses últimos são iguais a celulose exceto por apresentar ligações únicas β 1,3-D-glucosídicas entre múltiplas ligações β 1,4-D-glucosídicas, introduzindo assim dobras na cadeia de celulose.¹⁷

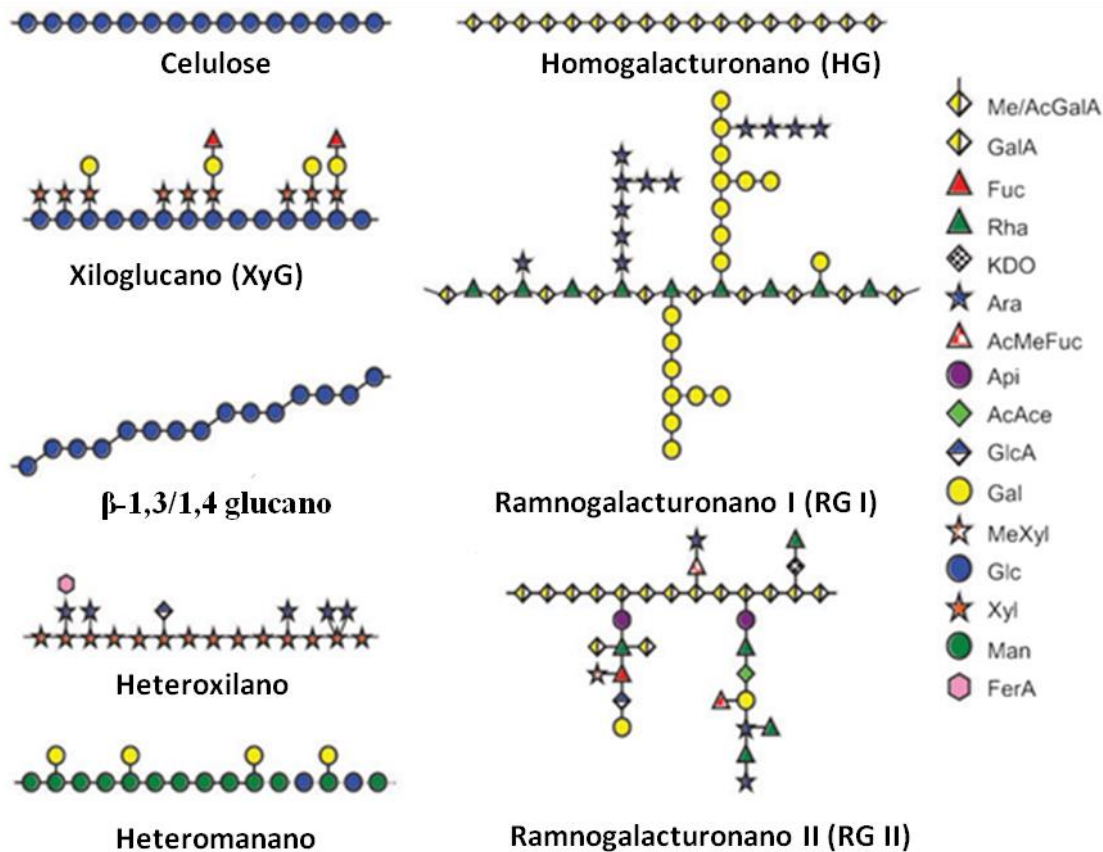


Figura 2 - Representação esquemática das estruturas de polissacarídeos encontradas na parede celular. Celulose, xiloglucano (XyG) e (1,3:1,4)- β -D-glucano possui o esqueleto baseado em glicose (Glc), heteroxilano em xilose (Xyl), heteromanano em manose (Man), homogalacturonano (HG) e ramnogalacturonano II (RG II) em ácido galacturonônico (GalpA) e RG I alternados com o dissacarídeo de (GalpA) e ramnose (Rhap).

Fonte: Adaptado de DOBLIN et al¹⁷

2.1.3.1 Pectina

A pectina compreende uma das mais complexas famílias de polissacarídeos, pois pode ser composta por até 17 tipos diferentes de monossacarídeos, que realizam mais de 20 tipos de ligações.²²

Constituem um grupo de heteropolissacarídeos que normalmente possui açúcares ácidos como o ácido galacturônico (GalpA) e açúcares neutros como a ramnose, galactose e arabinose.

O homogalacturonano (HG) é o polissacarídeo péctico mais abundante na parede celular. É constituído por uma cadeia linear de resíduos de GalpA unidos por ligação α -1,4 (figura 2). Esses resíduos encontram-se por vezes metil-esterificados no C6, assim como O-acetilados no C3 e/ou C2.²³

Outros heteropolissacarídeos que fazem parte desse grupo são consideravelmente mais complexos e incluem o ramnogalacturonano I e II (RG), o xilogalacturonano, o arabinano e o arabinogalactano I e II. O ramnogalacturonano I é constituído por um esqueleto de GalpA e ramnose intercalados, com ramificações laterais de α -arabinano e β -galactano, sendo que algumas dessas cadeias laterais tem α -fucoses terminais. Já o ramnogalacturonano II é o heteropolissacarídeo mais complexo, pois é constituído de um esqueleto de HG com pelo menos 8 resíduos de GalpA com cadeias laterais de 12 tipos diferentes de açúcares em mais de 20 tipos diferentes de ligações.²³

As pectinas constituem a fração mais solúvel dos polissacarídeos da parede e com frequência formam um gel.¹⁶ O gel da pectina é formado quando porções de HG se inter cruzam para formar uma rede cristalina tridimensional na qual moléculas de água e solutos se prendem.²⁴

2.1.3.2 Proteínas estruturais

A parede celular possui uma variedade de classes de proteínas estruturais, que são importantes para o funcionamento e para a estrutura da parede celular. Elas atuam na montagem e remodelamento da parede, quando a mesma está crescendo e se desenvolvendo. Essas proteínas são classificadas de acordo com sua composição de aminoácidos predominantes. A proteína estrutural da parede celular mais abundante é conhecida como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) que incluem as proteínas ricas em glicina (GRP), as proteínas ricas em prolina (PRP), extensinas e proteínas arabinogalactano (AGPs).¹⁷

2.1.3.3 Lignina

A lignina é um polímero tridimensional composto por unidades de fenilpropanoides, altamente ramificado e proveniente de três compostos fenólicos precursores, denominados monolignóis: os álcools coniferil, sinapil e *p*-coumaril (Figura 3).²⁵

Os monolignóis são direcionados a regiões distintas de vários tipos de parede celular (Figura 3 b) onde são polimerizados em uma estrutura com distintas características biofísicas, que oferece rigidez e resistência a compressão da parede celular.^{21:26}

A proporção desses três monômeros varia entre as espécies, órgãos das plantas e mesmo entre as camadas de uma mesma parede celular.²⁷ Entretanto, está mais presente na parede

secundária, também podendo ocorrer na parede primária e lamela média, juntamente com as celulosas e hemicelulosas.

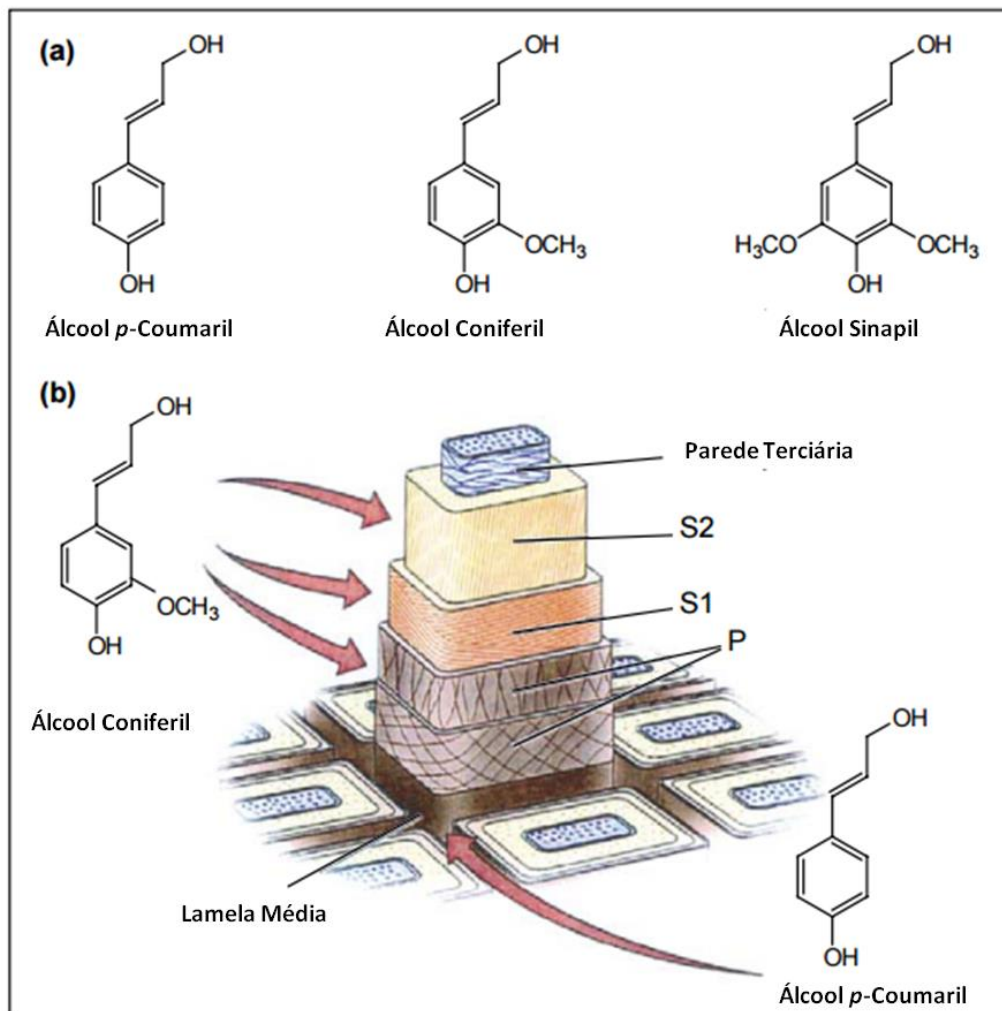


Figura 3 – Monolignóis e os diferentes alvos de concentração na parede celular. A) Estruturas químicas dos monolignóis. B) Representação do xilema de uma conífera. O álcool *p*-coumaril é depositado preferencialmente na lamela média e o álcool coniferil na parede secundária.

Fonte: Adaptado de DAVIN et al.²⁸

Diferentemente dos polímeros de celulose, amido, e outros que se ligam de maneira simples e repetitiva, os polímeros de lignina são mais complexos. Como há múltiplas ligações C-C e C-O-C em cada unidade de monolignol, ocorrem várias ramificações nas três dimensões.

A associação de lignina com os polissacarídeos da matriz é o fator que mais contribui para a recalcitrância da parede celular.

2.1.3.4 Celulose

A força mecânica da parede celular é fornecida pelas microfibrilas de celulose. Essas microfibrilas são compostas por monômeros de glucose, que se unem por ligações glicosídicas β 1,4. Os glucanos que constituem a microfibrila estão intimamente alinhados e ligados uns aos outros, formando uma estrutura altamente cristalina, excluindo a água e, tornando-se assim, inacessível ao ataque enzimático.

A estrutura precisa da celulose ainda é incerta, mas os modelos atuais sugerem que ela consiste de domínios cristalinos ligados à regiões menos organizadas, chamadas “amorfas”. Nos domínios cristalinos, os glucanos da mesma cadeia estão unidos por ligações covalentes, enquanto que os glucanos adjacentes (intercadeias) estão interagindo por ligações não covalentes, como as interações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.^{27; 29} Essas interações inter e intracadeias são responsáveis pela formação da fibrila e cristalinidade da celulose.

Um modelo completo da degradação da celulose pode ser obtido pela medida de três parâmetros: o grau de polimerização (GP), grau de oxidação e a cristalinidade.³⁰ Todos esses parâmetros variam dependendo da fonte e idade dos tecidos.³¹

2.2 O crescimento da planta

Para as plantas crescerem, a parede celular, que é rígida, de alguma forma necessita se afrouxar abrindo espaço para o crescimento celular. O tipo de afrouxamento da parede, envolvido na expansão da célula vegetal, é denominado estresse de relaxamento. Este termo é utilizado no contexto mecânico, como sendo a força exercida por unidade de área. As células vegetais acumulam solutos osmoticamente ativos que atraem água para o interior da célula por osmose. Como a célula é limitada pela parede celular há um aumento na pressão de turgescência e na força contrária, que é a tensão de tração no interior da parede celular, como pode ser observado na Figura 4.¹⁹

Ainda não está bem descrito como ocorre a abertura da parede celular, entretanto, existem algumas hipóteses. Segundo a proposição do relaxamento ácido pela ação da auxina, um mecanismo que causaria o estresse de relaxamento seria a acidificação da parede, resultante da extrusão de prótons através da membrana plasmática. Isso explicaria o motivo do afrouxamento da parede celular aumentar na presença de pHs ácidos.³²

Por ser composta de um polímero hidratado, a parede celular das plantas possuem propriedades físicas que são intermediárias entre aquelas de sólidos e líquidos. Essas propriedades são chamadas reológicas. O estress causado nas paredes celulares é resultado do aumento da pressão de turgor que, por consequência, causa uma mudança nas propriedades reológicas da célula.³³ Na figura abaixo observamos um modelo de como pode ocorrer o processo de afrouxamento da parede celular.

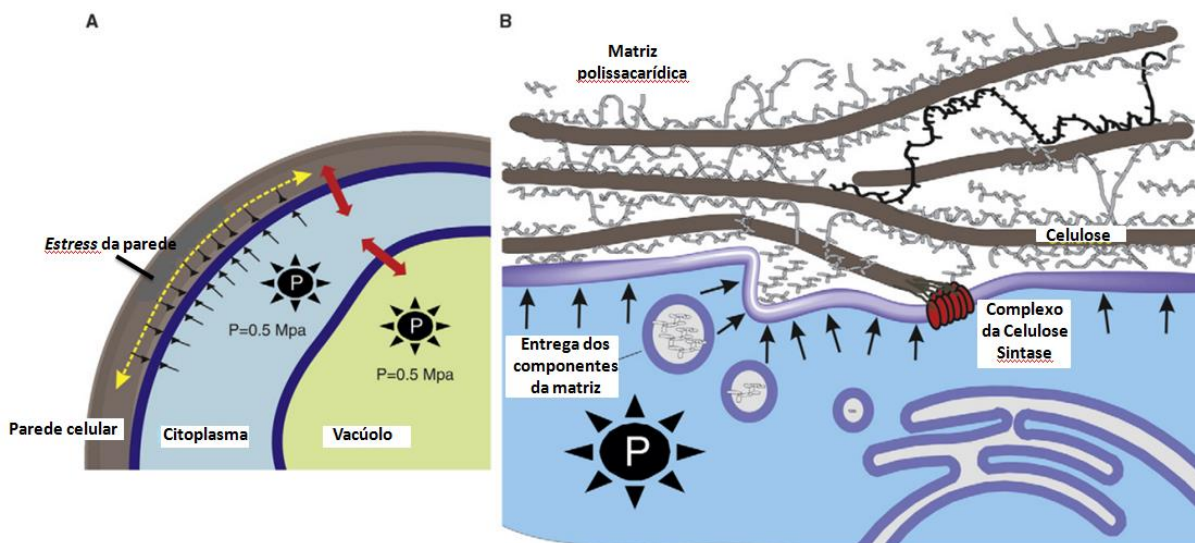


Figura 4 – A) A pressão de turgescência (P) é a força contra a membrana plasmática. Seu sentido é para fora e é praticamente uniforme e isotrópica dentro de todos os compartimentos internos da célula. É contrabalaneada por uma força para o interior, igual e oposta exercida pela parede da célula contra a membrana plasmática (setas pretas). Essa força para dentro, gera uma tensão de tração no plano da parede da célula (seta amarela). A pressão de turgescência surge da acumulação de solutos osmoticamente ativos em todos os compartimentos intracelulares, resultando em fluxos de água transmembranares (setas vermelhas) para estabelecer o equilíbrio osmótico. O inchaço do protoplasto é limitado pela parede da célula, resultando em uma pressão de turgescência no interior da célula e em um stress no plano da parede celular. B) Um esboço de microfibrilas de celulose (barras marrons) sendo "giradas" a partir do complexo da sintase de celulose (vermelho) e ligadas entre si por meio de polissacarídeos da matriz (cinza). Materiais de parede recém-sintetizados são depositados em um estado relaxado e se tornam um suporte somente depois que eles se integram na rede da parede. O alargamento da parede celular os torna elasticamente estirados de modo que começa a criar uma resistência. Neste ponto, o afrouxamento biofísico da rede da parede celular por expansinas ou outros agentes de afrouxamento é necessário para aliviar a tensão da parede, permitir a absorção de água e a continuidade do crescimento celular.

Fonte: Adaptado de COSGROVE et al.¹⁹

Em 1989, para determinar se a extensão da parede celular era causada por um simples fluxo da viscoelasticidade ou se havia a ação de proteínas, Cosgrove³⁴ realizou uma série de experimentos que confirmaram a ação de proteínas no afrouxamento da parede celular. Em seguida, McQueen³⁵ conseguiu isolar duas dessas proteínas e observou que quando colocadas

em pequenas quantidades em células da parede desnaturadas pelo calor, a extensão da parede voltava a ocorrer. Essas proteínas foram denominadas expansinas. Apesar da ação das expansinas na indução da parede, foi constatado que elas não possuíam atividade hidrolítica e seu mecanismo de ação até hoje é incerto.

Muitos estudos foram realizados constatando que as expansinas são reguladores do crescimento celular. Sabe-se que os genes da expansina são expressos no período e lugar certo para controlar o crescimento da parede e que a redução da expressão desses genes inibe o crescimento da mesma.³⁶⁻³⁷ Essas proteínas também induzem a extensão das células isoladas dependentes do pH, e sua aplicação em células vivas estimula o crescimento da parede celular.

2.3 A hidrólise da celulose

2.3.1 Hidrolases de glicosídeos (GH)

As hidrolases de glicosídeos formam um extenso grupo de enzimas que catalisam a clivagem da ligação O-glicosídica.³⁸ Elas são encontradas em quase todos os grupos de organismos sendo a única exceção arqueas e alguns parasitas eucariotos.³⁹ Considerando a grande variedade de monossacarídeos, a diversidade das ligações inter-açúcares e o fato de quase todas as moléculas poderem apresentar glicosilações (incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, antibióticos) é possível imaginar a grande variedade de enzimas necessárias para a especificidade em glicoconjugados, oligos e polissacarídeos.¹⁰

Uma vez que a variedade de carboidratos ultrapassa enormemente o número de empacotamentos possíveis das proteínas, as hidrolases de glicosídeos evoluíram a partir de um número limitado de progenitores, diversificando sua função e adquirindo novas especificidades.¹⁰

Há 26 anos, aproximadamente, Henrissat e colaboradores utilizaram uma ferramenta denominada de Análise do Agrupamento Hidrofóbico (HCA) para comparar 21 sequências de aminoácidos de celulasas disponíveis na época. Encontraram evidências de uma série de homologies entre as celulasas fúngicas e bacterianas, o que permitiu a classificação dessas enzimas inicialmente em seis famílias que iam da letra A a F.⁴⁰

Desde então o número de genes de hidrolases de glicosídeos sequenciados aumentou exponencialmente seguido por um aumento (embora menor) do número de estruturas

cristalográficas elucidadas.⁴¹ Esse fato tornou necessária uma classificação mais rigorosa para evitar ambiguidades e prover uma classificação única.

A nomenclatura IUB enzimática (1981) indica o tipo de reação que a enzima catalisa e sua especificidade para o substrato. Sendo assim, as hidrolases de glicosídeos são indicadas pelo código EC 3.2.1.x sendo que os primeiros três dígitos indicam que elas clivam O-ligações glicosídicas e o último número reflete o principal substrato e, em alguns casos (por exemplo: as amilases EC 3.2.1.1 e EC 3.2.1.2) o mecanismo da reação.³⁸

Como essas enzimas são classificadas de acordo com as similaridades das sequências de aminoácidos, essa classificação correlaciona o mecanismo enzimático e o empacotamento proteico e não a especificidade para o substrato.¹⁰ Assim sendo, em uma mesma família podemos encontrar enzimas com diferentes especificidades para substratos, sendo que enzimas que hidrolisam o mesmo substrato também são encontradas em diferentes famílias.⁴²

A hidrólise da ligação glicosídica é catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima: um ácido geral (doador de prótons) e um nucleófilo (base).³⁹ Frequentemente esses resíduos são um ácido glutâmico e/ou aspártico devido ao seu grupo carboxila. Dependendo da posição espacial desses resíduos catalíticos, a hidrólise ocorre através de retenção total ou inversão geral da configuração anomérica.⁴³ A distância entre os grupos carboxílicos desses resíduos geralmente é de 5-6 Å para retenção e 9-10 Å para enzimas de inversão. No último caso, essa distância maior se deve a necessidade de uma molécula de água no sítio ativo da enzima durante a hidrólise da reação.⁴⁴

2.3.2 Transglicosilases

Atualmente são conhecidas 135 famílias de hidrolases de glicosídeos (outubro de 2015), que incluem não só glicosidases, mas também enzimas transglicosilases (EC 2.4.1). Frequentemente enzimas glicosidases exibem uma vasta gama de especificidade para substratos sendo que muitas vezes são capazes de realizar a transferência de resíduos de glicose entre as moléculas do substrato, atuando na transglicosilação das ligações glicosídicas.^{38,10,45}

Elas são classificadas nas famílias GH2, GH13, GH16, GH23, GH31, GH70, GH77, GH102, GH103 e GH104 (CAZy, outubro de 2015).

A família GH102 é composta por transglicosilases líticas, sendo que o protótipo da família é a enzima transglicosilase lítica de *Escherichia coli* (EcMltA).⁴⁶

Essa enzima é responsável pela clivagem da parede celular bacteriana, mantendo assim uma reciclagem de peptidoglicanos, o que facilita o crescimento e a divisão da bactéria, pois permite uma abertura local da parede sem a quebra da integridade da mesma. Ela possui dois domínios, sendo o domínio I estruturalmente semelhante ao da família GH45, contendo o motivo do duplo- Ψ - β -barril. A atividade lítica dessas enzimas acontece nas ligações glicosídicas β 1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e o N-acetil-glucosamina (GlcNAc), as duas unidades de açúcares que formam a fita de peptidoglicano.

A reação catalisada por essa enzima difere parcialmente da maioria das hidrolases de glicosídeos pois, um único resíduo, geralmente um ácido aspártico (Asp308) funciona como ácido-base, fazendo com que a reação aconteça em dois passos. No primeiro, esse aspartato age como um ácido, doando um próton para o oxigênio da ligação glicosídica. A clivagem da ligação glicosídica leva a formação de um íon positivamente carregado oxocarbenio intermediário. No segundo passo da reação, o mesmo resíduo, em sua forma ionizada, age como uma base, abstraindo um próton do grupo hidroxil do C6, ativando o O6 para um ataque nucleofílico intraresíduo no átomo C1 do íon oxocarbenio. Isso completa a reação e resulta na formação do produto 1,6-anidroMurNAc.⁴⁶ Um esquema da reação pode ser observado na figura 5.

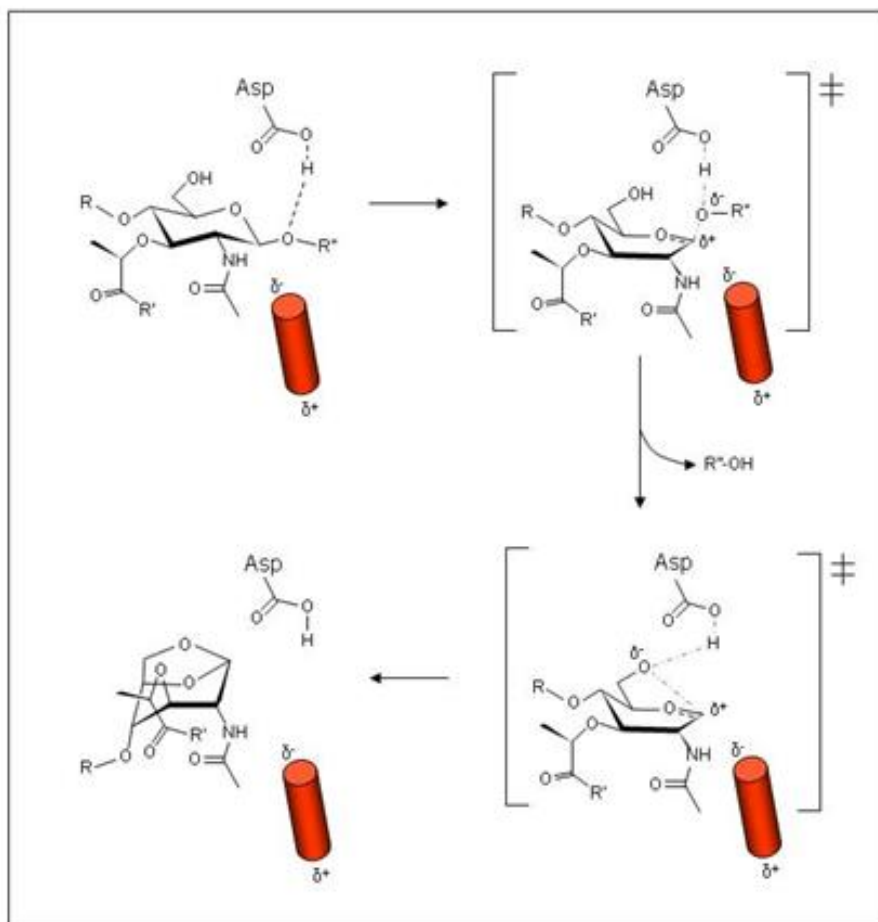


Figura 5 - Mecanismo de reação proposto para a enzima transglicosilase lítica de *E. coli* GH102. Nesse mecanismo um aspartato realiza a doação de um próton para o oxigênio da ligação glicosídica, formando um intermediário positivamente carregado. Em seguida, o mesmo resíduo abstrai o próton do C6 ativando o O6 para um ataque intramolecular.

Fonte: VAN STRAATEN et al.⁴⁶

2.3.3 Celulases

As celulases se diferem de outras hidrolases de glicosídeos por clivarem ligações β 1,4 entre os resíduos de glicose.² O modelo clássico das enzimas que clivam a celulose resultando em monômeros de glicose classifica três tipos de atividades enzimáticas, que são: as endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -glucanases e celobiohidrolases (EC 3.2.1.74 e EC 3.2.1.91 respectivamente) e as celobiasas ou β -glucosidases (EC 3.2.1.21). Todas elas agem sinergicamente clivando as ligações β 1,4 glicosídicas que conectam os resíduos de glicose, diferenciando-se apenas no modo da catálise.⁴⁷

Além das enzimas acima descritas, alguns fungos também secretam uma enzima extracelular chamada de celobiose desidrogenase (CDH; EC 1.1.99.18). Essa enzima possui

dois domínios, sendo que um contém uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e outro um grupo heme. Atua sobre a celobiose e celo-oligosacarídeos, que são oxidados para suas correspondentes lactonas durante a meia-reação redutora do cofator FAD e subsequente hidrólise à ácidos aldônicos.⁴⁸⁻⁴⁹

Adicionalmente, novos tipos de enzimas que, originalmente foram denominadas de módulos de ligação ao carboidrato (CBM 33), foram identificadas como atuantes na clivagem da celulose. Essas enzimas agora denominadas de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) dependentes de cobre AA10 e GH 61 (agora chamada de AA9) atuam como as enzimas oxidativas. Agem em conjunto com as celobiose desidrogenases adicionando quebras na estrutura da celulose e hemicelulose aumentando a atividade hidrolítica das celulases e hemicelulases.⁵⁰

Atualmente, existem muitos estudos de caracterização estrutural e funcional das celulases.⁵¹ Sabe-se que a maioria delas é composta de um domínio catalítico, responsável pela hidrólise enzimática; um módulo de ligação a carboidratos (CBM); e uma região de ligação rica em resíduos de treonina, serina e prolina pelos quais os domínios são conectados.⁵²

2.3.3.1 Endoglucanases

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) atacam a parte amorfa da celulose através da clivagem das ligações internas nas microfibrilas, diminuindo o tamanho da cadeia, gerando oligossacarídeos de diferentes tamanhos e novas extremidades livres. Assim, agem disponibilizando novos sítios para ação das celobiohidrolases. Elas parecem ter uma pequena capacidade de degradar a celulose cristalina, devido as fortes interações de hidrogênio que ocorrem nessas fibras, tornando inacessível o contato dessas enzimas.⁴⁷

Essa classe de enzimas se encontra distribuída em 13 famílias (CAZy, outubro de 2015) pertencentes a organismos eucarióticos, bactérias, fungos e arquea.⁵³ Geralmente, seu sítio ativo consiste em um sulco aberto, ou em forma de fenda, que permite a acomodação da cadeia linear de celulose aleatoriamente.⁵⁴ Para se ligar efetivamente ao sítio ativo da enzima, a molécula do substrato interage com múltiplos subsítios (de 4 a 7, aproximadamente) via interações de hidrogênio e/ou empilhamento dos resíduos aromáticos com aminoácidos do sítio ativo.⁵⁵

Para realizar a hidrólise, as endoglucanases mantém as unidades de glicose dos subsítios -1 e +1 na conformação de cadeira enquanto “esticam” a ligação glicosídica⁵⁶ ou “dobram” a ligação glicosídica, trazendo-a para uma posição axial, ao mesmo tempo em que distorcem a unidade glicosil -1 para uma conformação de barco e substituem o açúcar +1.⁵⁷

2.3.3.2 Exoglucanases

Esse grupo compreende as celobiohidrolases (CBH) e as glucanohidrolases (GH). As glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) são capazes de liberar glicose diretamente da fibra celulósica.²

As CBHs (EC 3.2.1. 91) podem ser divididas em dois tipos: CBH1, que hidrolisam os terminais redutores e as CBH2, que hidrolisam os terminais não-redutores. Ambas atuam sobre a celulose cristalina, resultando em uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Seus sítios em geral são em formato de túneis.⁹

2.3.3.3 β -glucosidase

As β -glucosidases (EC 3. 2.1. 21) atuam quebrando a ligação β 1,4, quando o grupo carboxil do resíduo conservado do sítio ativo, em geral um ácido glutâmico, doa um próton para a ligação e o íon carbônio formado é estabilizado pelo resíduo do ácido aspártico. Essas enzimas agem nos resíduos de celodextrina (GP < 7) e celobiose hidrolisando-os a glicose.² Da mesma forma, as exoglucanases e as β -glucosidases parecem sofrer inibição pelo seu próprio produto de hidrólise.

2.3.3.4 CBM

Como descrito anteriormente, muitas celulasas apresentam este domínio ligado ao domínio catalítico. Sabe-se que os CBMs ajudam a enzima a reconhecer efetivamente a superfície da celulose cristalina, trazendo o sítio ativo em contato com o substrato e assegurando sua correta orientação. Esse domínio contém de 30 a 200 aminoácidos e pode ocorrer mais de um em cada enzima.^{51; 58}

2.3.4 Modo de ação e sinergismo

A visão clássica da hidrólise da celulose designa que inicialmente, as enzimas endoglucanases, atuam hidrolisando as ligações internas da fibra de celulose aleatoriamente. Como resultado, elas produzem pequenos cortes, liberando as extremidades redutoras e não redutoras do substrato. As exoglucanases então agem sobre essas extremidades liberando celo-

oligosacarídeos e celbiose. Os produtos das endoglucanases e celbiohidrolases são inibidores dessas enzimas, portanto há a ação das β -glicosidasas que vão agir sobre as celbioses e liberar glicose.⁵⁹

Com a descoberta dessas enzimas oxidativas (CDH, CBM33 e GH61), surgiu também um novo paradigma em relação à degradação enzimática da celulose, com estas últimas facilitando a ação das celulases clássicas.⁶⁰ Pouco é compreendido sobre a ação dessas enzimas, mas o modelo mais aceito sugere que as LPMOs atuem na fibra da celulose cristalina, produzindo regiões parcialmente amorfas, com extremidades oxidadas que funcionariam como “entradas” para a ação das GHs. As CDHs funcionariam provendo elétrons para as LPMOs.⁶¹ Um esquema representando esse modelo pode ser observado na figura 6.

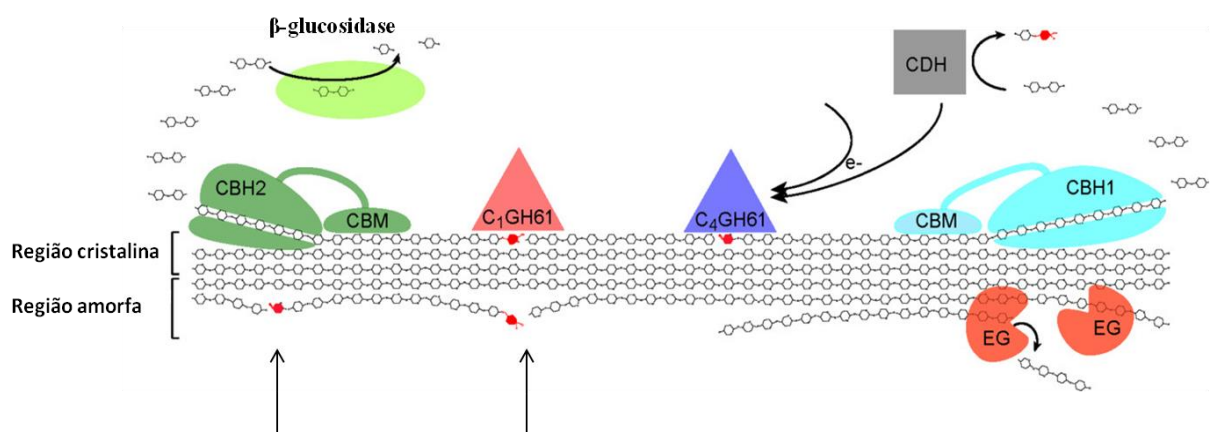


Figura 6 - Esquema da degradação enzimática pelas enzimas endoglucanases (EGs em laranja), celbiohidrolases (CBH1 em azul claro, CBH2 em verde musgo), β -glicosidasas (em verde limão), celbiose desidrogenase (CDH em cinza) e GH61, que oxida o C1 (em rosa), facilitando a ação da CBH2, e o C4 (em roxo), facilitando a atuação CBH1 (extremidade redutora). Os açúcares oxidados estão representados em vermelho. As flechas demonstram novos pontos de ataque para as CBHs a partir do meio da cadeia de celulose.

Fonte: Adaptado de HORN et al.⁶⁰

2.4 GH45

A família 45 das hidrolases de glicosídeos (também conhecida como celulases da família K), é composta basicamente, por β 1,4 e β 1,3/1,4 glucanases que pertencem a uma vasta gama de seres vivos como bactérias, fungos, plantas, protozoários e alguns animais como moluscos, insetos e nematodas.⁶² Elas compartilham um domínio catalítico pequeno (20 kDa)

e agem sobre uma grande variedade de substratos, como a celulose e seus derivados. As predições dos resíduos catalíticos permitiu a classificação da família GH45 como enzimas que hidrolisam o substrato por meio da inversão do carbono anomérico.⁶³

Com a comparação sequencial entre GHs 45 e outras classes de enzimas, foi possível observar que elas se relacionam distantemente com as expansinas das plantas. Devido a essas diferenças filogenéticas foi proposto por Igarashi a subdivisão dessa família em 3 subfamílias denominadas A, B e C, como podemos observar na figura 7.¹²

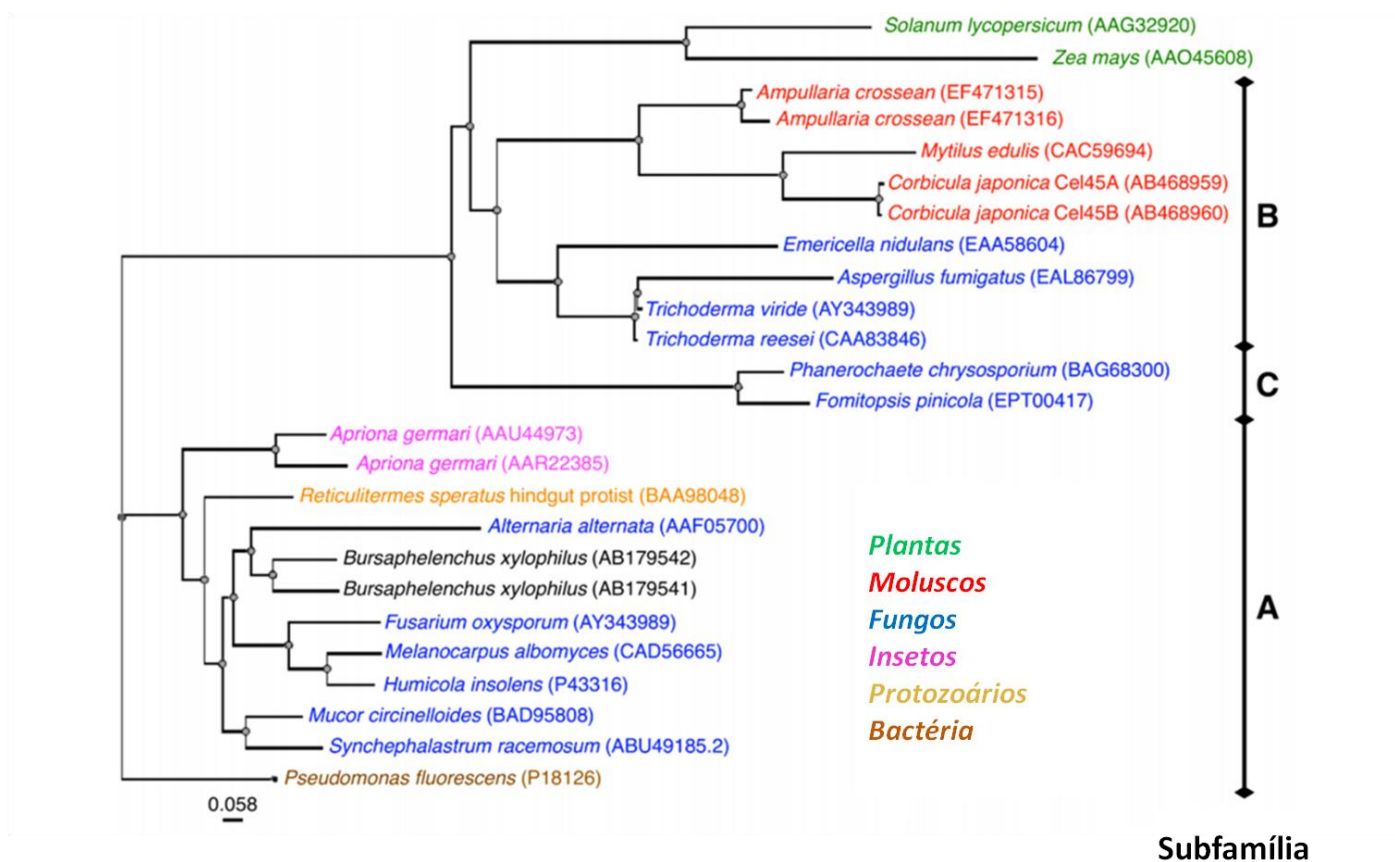


Figura 7 - Árvore filogenética da família GH45. Sequências de plantas, moluscos, fungos, insetos, protozoários e bactéria foram incluídas e coloridas de acordo com a legenda. As barras verticais à direita correspondem às subfamílias, segundo a classificação proposta por Igarashi.¹² As sequências de plantas são expansinas, por isso não estão incluídas na classificação das subfamílias.

Fonte: Adaptado de PAYNE et al.⁶⁴

2.4.1 Subfamília A

A subfamília A é a mais bem estudada e também a primeira que teve uma representante com a estrutura cristalográfica determinada.⁶³

A forma geral das enzimas dessa subfamília é a de uma esfera achatada que possui um motivo estrutural conhecido como duplo- Ψ - β -barril, formado por seis folhas β paralelas e antiparalelas que formam duas estruturas psi, como pode ser visto na Figura 8.¹⁰

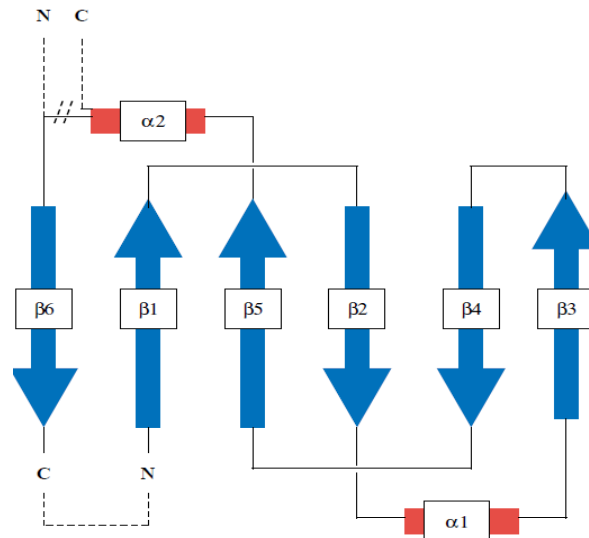


Figura 8 - Representação topológica do duplo- Ψ - β -barril. As setas azuis indicam as folhas β , enquanto as caixas vermelhas indicam α -hélices.

Fonte: CASTILLO et al.⁶⁵

A primeira representante estudada dessa família é a endoglucanase V de *Humicola insolens* (Hi_EGV). Os dados estruturais comprovaram que essa enzima age por meio da inversão do carbono anomérico. Essa enzima é composta por um domínio catalítico na região N-terminal, seguido por uma região de ligação (*linker*) anexada a um CBM na região C-terminal. Três folhas do domínio β -barril formam o sítio ativo. Na fita do meio, encontra-se o resíduo Asp121, responsável pela protonação do oxigênio glicosídico. O outro resíduo catalítico é o Asp10 que age ativando o nucleófilo (água) para o evento de deprotonação e encontra-se do outro lado do sítio ativo. Eles estão a uma distância aproximada de 8,0 Å, o que permite que essa molécula de água nucleofílica se ligue entre eles. Sendo assim, o Asp10 age como uma base catalítica, ativando uma molécula de água para o ataque nucleofílico. A representação esquemática da reação pode ser vista na figura 9.

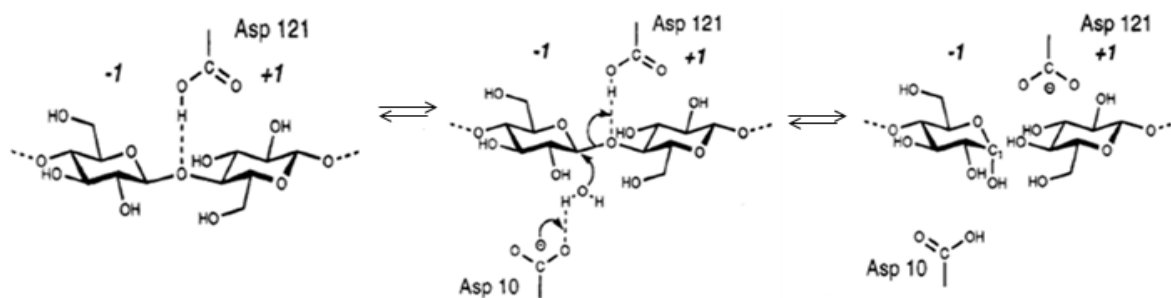


Figura 9 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da enzima Hi_EGV. Essa enzima age com a inversão do carbono anomérico. O Asp121, doa um próton para o oxigênio da ligação glicosídica. A base da reação representada pelo Asp10 atua ativando uma água para o ataque nucleofílico.

Fonte: DAVIES et al⁶³

Estudos cinéticos de Hi_EGV demonstraram que existem no mínimo seis subsítios energeticamente significantes para a ligação do substrato.⁶⁶ A clivagem ocorre entre os subsítios -1 e +1, sendo os grupos de saída considerados +1, +2, +3, +n. A Hi_EGV possui 4 subsítios antes do ponto da clivagem, marcados como -4 a -1 e dois após o ponto de clivagem, marcados como +1 e +2 como foi observado na estrutura dessa enzima com o ligante da celohexaose (pdb: 4ENG). O ponto da clivagem do substrato pode ser visto na Figura 10.

Essa enzima age na parte amorfa da celulose, não tendo sido identificada atividade na celulose cristalina.

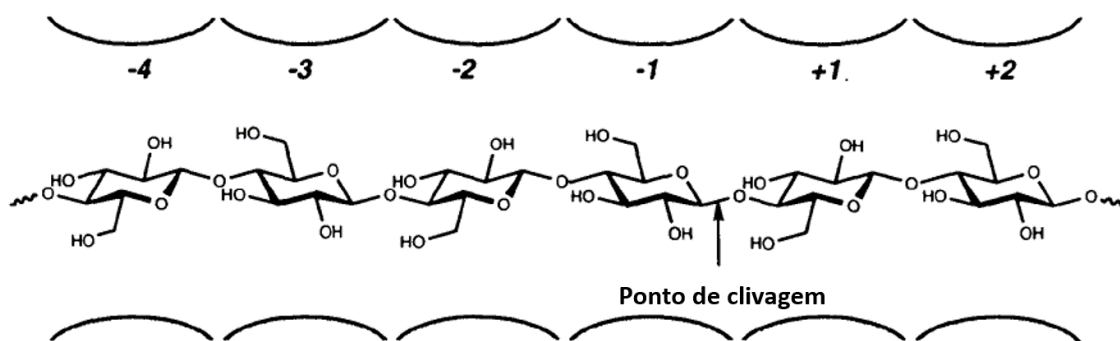


Figura 10 - Diagrama demonstrando o ponto de clivagem da celohexaose pela Hi_EGV. Essa enzima, ao clivar celohexaose, libera, preferencialmente, celobiose ou celotriose como produto que ocupa os subsítios +1 e +2 (+3 se o produto for celotriose).

Fonte: Adaptado de DAVIES et al.⁶³

Outra enzima caracterizada estruturalmente que pertence a subfamília A, é a endoglucanase V de *Melanocarpus albomyces* (maEG). Essa enzima é muito similar a Hi_EGV com 75% de identidade sequencial e RMSD menor do que 1 Å.⁶⁷

Diferentemente da Hi_EGV essa enzima não possui o CBM e a região de ligação entre o CBM e o domínio catalítico. Entretanto, sua forma global é muito semelhante a essa enzima. Também possui uma fenda similar a Hi_EGV e os resíduos catalíticos são conservados (Asp120 e Asp10 em maEG). Também apresentou maior atividade em celulose amorfa e é utilizada na indústria têxtil, para dar ao jeans um aspecto envelhecido.

Sua estrutura com a celobiose revelou a ligação do açúcar nos subsítios -2 e -3 e, assim como em Hi_EGV, não há resíduos aromáticos em sua superfície. A ligação ao substrato ocorre por meio de *loops* que envolvem o açúcar permitindo o correto posicionamento no sítio ativo.

Outra enzima com a estrutura cristalográfica determinada é a endoglucanase de *Humicola grisea*, que possui mais de 95% de identidade com Hi_EGV, com apenas 3 resíduos diferentes desta última e sem nenhuma publicação referente a ela.

2.4.2 Subfamília B

Possui uma estrutura cristalográfica resolvida que é a endoglucanase do mexilhão *Mytilus edulis* (Me_EGV). Essa enzima consiste de um módulo catalítico, com 181 aminoácidos e foi resolvida a 1,2 Å de resolução (pdb 1WC2).

Exibe apenas 13% de identidade com Hi_EGV, refletindo a grande diferença entre as subfamílias. Entretanto, o motivo estrutural do duplo- Ψ - β -barril se superpõe com RMSD de 1,6 Å para 105 átomos de C α combinados, e as estruturas são similares ao redor do sítio ativo. A base catalítica (Asp24) e o ácido catalítico (Asp132) são conservados. Em ambas as estruturas há um triptofano conservado (Trp64 em Me_EGV e Trp18 em Hi_EGV) na região do subsítio -4.

2.4.3 Subfamília C

Para essa subfamília, não havia informação estrutural disponível, com apenas a caracterização bioquímica da enzima de endoglucanase V de *Phanerochaete chrysosporium* tendo sido realizada.¹²

2.5 O fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*

Os basidiomicetos são um filo de fungos assim chamados por se reproduzirem via formação de uma estrutura chamada *basidium*.⁶⁸ Dentro desse filo existem duas classes principais, denominadas de fungos de podridão marrom e branca. A diferença entre eles é que os fungos de podridão branca conseguem degradar todos os componentes da lignina, enquanto que os de podridão marrom conseguem apenas modificar a lignina que é deixada como um resíduo na madeira em decomposição.⁶⁸ Essa diferença ocorre porque os fungos de podridão marrom não possuem uma classe de enzimas peroxidases.

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* se enquadra na classe de fungos de podridão branca, fazendo parte desse pequeno grupo de fungos capazes de degradar a lignina.

Como supracitado, a lignina presente na lignocelulose é o obstáculo mais difícil que as enzimas celulolíticas encontram para clivar a celulose eficientemente. Devido a isso, esse fungo foi o alvo de pesquisas pelas últimas 40 décadas, sendo o basidiomiceto mais bem estudado.^{69,25}

Além da degradação da lignina, outro fator que contribuiu para o extenso estudo sobre esse fungo é sua capacidade de degradar uma vasta gama de resíduos tóxicos ambientais, devido ao seu potencial de bioremediação oxidativa e tolerância a substâncias tóxicas.⁷⁰⁻⁷¹

Os estudos proteômicos do *Phanerochaete chrysosporium* demonstraram que a produção de enzimas celulolíticas por esse fungo não depende apenas da fonte de carbono, mas também é influenciada pelo tamanho da partícula e a complexidade da biomassa lignocelulósica.⁷²

É sabido que esse fungo codifica mais de 240 enzimas ativas em carboidratos, sendo 166 hidrolases de glicosídeos, 14 esterases de carboidratos e 57 glicosiltransferases, enquanto que enzimas que degradam a lignina incluem lignina peroxidase, manganase peroxidase e oxidases.⁶⁹

O modo pelo qual ele degrada a lignina é através da produção de oxidases e peroxidases que geram radicais livres altamente reativos e não específicos que bombardeiam e reagem com a lignina, gerando uma série de reações espontâneas de clivagem.⁷³⁻⁷⁴

Além da lignina este fungo também é um dos mais potentes decompositores de celulose e hemicelulose, pois cresce em madeiras em decomposição, um ambiente rico nesses polissacarídeos.^{69; 75}

2.6 Fungos como sistema de expressão

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro fungo a ser transformado com um DNA exógeno. Uma cepa dessa levedura foi construída de modo para conter duas mutações pontuais separadas dentro de um único locus, prevenindo assim qualquer reversão do gene a funcionalidade. Nesta cepa foi introduzido um plasmídeo bacteriano contendo uma cópia do gene inativado. O DNA exógeno foi a fonte da restauração da atividade do gene em falta, abrindo caminho para o desenvolvimento desta tecnologia, tornando possível a manipulação do genoma de fungos para a produção heteróloga de proteínas.⁷⁴

Para criar uma cepa geneticamente modificada, com o seu desenvolvimento somente após a inserção do plasmídeo, utiliza-se luz ultravioleta, radiação ou reagentes químicos. Para isso, colônias de conidióforos são expostas a um desses agentes mutagênicos em um meio complexo e transferidas para um meio mínimo. Todas aquelas que não crescerem nesse meio mínimo serão, em um segundo passo, testadas neste mesmo meio contendo agora um aditivo que deveria restaurar o crescimento (leucina, tirosina, alanina, por exemplo). Se o crescimento voltar a ocorrer com a adição deste aditivo, significa que a mutação específica foi identificada.⁷⁴ Um esquema dessa técnica pode ser observado na figura 11.

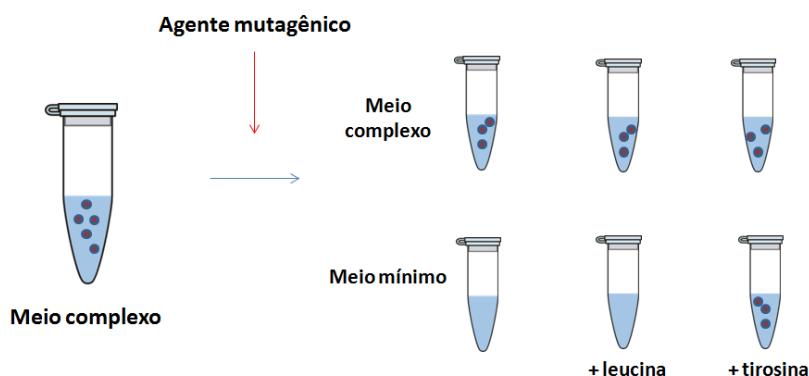


Figura 11 – Esquema da produção de cepas mutantes. Inicialmente o fungo é mantido em meio complexo, seguido do contato de um agente mutagênico. Em seguida, as cepas são inoculadas em meio mínimo, seguida da adição de um aditivo que restauraria seu crescimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

A transformação em fungos filamentosos é realizada em protoplastos ou conídios assexuais. Para a utilização dos protoplastos, ocorre a digestão da parede celular com enzimas hidrolíticas, seguida da utilização de PEG (polietilenoglicol) e cálcio para facilitar a entrada do DNA, através da indução da quebra da membrana. O período de incubação que se segue tem como objetivo a regeneração da parede do protoplasto em um meio osmoticamente estável.

Os fungos filamentosos como o *Aspergillus nidulans*, possuem um potencial considerável como sistema de expressão para proteínas heterólogas.⁷⁶ Eles são capazes de expressar continuamente e sua morfologia filamentosa permite a separação das células por filtração. Além disso, a diversidade metabólica do *Aspergillus* apresenta uma oportunidade de expandir a gama de possíveis metabólitos heterólogos neste organismo hospedeiro. O *Aspergillus* é especialmente promissor como um sistema para proteínas recombinantes, por possuir a maquinaria celular para a tradução de proteínas, enovelamento, e modificações pós-traducionais que as bactérias não possuem, além da facilidade de cultivo e a exportação da proteína direto ao meio de cultivo, o que facilita a purificação.⁷⁷

Capítulo 3

Objetivos e Justificativa



“Obstáculo é aquilo que se vê quando se tira os olhos do objetivo que se quer alcançar.”

Bob Marley

3 Objetivos

3.1 Objetivos gerais

O estudo funcional e estrutural de celulasas auxilia numa maior compreensão dos elementos moleculares responsáveis pelas características das enzimas. Sabe-se que o custo e o baixo rendimento dessas enzimas limitam suas aplicações na indústria. Portanto, investigações que visam relacionar estrutura e função podem contribuir para a produção de enzimas mais estáveis, ativas e específicas.

Do ponto de vista científico, o estudo de classes de enzimas com poucas informações disponíveis, representa um vasto campo de possibilidades, como por exemplo, um maior entendimento dos mecanismos enzimáticos, assim como uma maior compreensão entre as relações evolutivas das diferentes classes de enzimas.

Tendo em vista a importância supracitada, o objetivo desse estudo foi ampliar nossa compreensão da classe de enzimas GH45, optando pela produção e caracterização da enzima endoglucanase V (PcCel45A) do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Motivados pela informação de que esse fungo produz um complexo de enzimas lignocelulolíticas e pela necessidade de ampliar nosso conhecimento a respeito da subfamília C das GH45, visamos a elucidação estrutural desse alvo. Já existiam alguns estudos bioquímicos dessa enzima, produzida por outro sistema de expressão, e portanto buscamos a comparação entre ambas, e a complementação desses estudos. Posteriormente, para um maior entendimento das bases moleculares da função e estabilidade da enzima, foram realizadas mutagêneses em alguns resíduos específicos considerados importantes para a atividade da PcCel45A.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Clonagem do gene da PcCel45A a partir do DNA complementar (cDNA) do fungo *Phanerochaete chrysosporium*;
- ❖ Transformação e expressão heteróloga da enzima em *Aspergillus nidulans* (linhagem A773);
- ❖ Estabelecimento de um protocolo de purificação da enzima a partir do extrato bruto de secreção do fungo;

- ❖ Caracterização bioquímica da enzima, incluindo a determinação de condições ótimas de atividade, a especificidade por substrato e do produto de clivagem liberado;
- ❖ Caracterização estrutural por meio de estudos de difração de raios-X;
- ❖ Mutação sítio-dirigida em quatro resíduos do sítio ativo, considerados potencialmente importantes para a atividade da enzima;
- ❖ Produção dos mutantes D121A, D92A, Y25A e W161A;
- ❖ Caracterização bioquímica dos mutantes, incluindo testes de atividade específica e produtos liberados.

Capítulo 4

Material e métodos



*“Toda verdade passa por três estágios.
No primeiro, ela é ridicularizada.
No segundo, é rejeitada com violência.
No terceiro, é aceita como evidente por si própria..”*

4 Material e métodos

4.1 Biblioteca do cDNA de *Phanerochaete chrysosporium*

Para a extração do cDNA, o fungo *P. Chrysosporium* foi crescido na presença de 2% de celulose, em meio Agar, por dois dias, em pH 4,0. Seu RNA total foi extraído, sendo então realizada a síntese do cDNA utilizando-se a enzima Transcriptase Reversa (SuperScript® III RT, Invitrogen, CA, EUA). O cDNA específico foi amplificado por PCR com a Taq DNA polimerase de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante.

4.2 Gene da endoglucanase V de *Phanerochaete chrysosporium*

O genoma do fungo *Phanerochaete chrysosporium* está depositado no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e, a partir dele, selecionamos o gene com o código de acesso (GenBank) BAG68300.1, que codificava uma endoglucanase da família GH45. Sua sequência é mostrada na Figura 12.

```

5' GAAACATCTCACACCGCACGAAAAGTACTATGGCGAAGCTGTCGATGTTCTT
GGGCTTCGTAGCTGTTGCGACGCTCGCGAGCGCGCTGACCGTCTCCGAGAAGC
GTGCGACGGGCGGGTACGTCAGCAGGCTACTGGCCAGGCATCCTTCACGATG
TATTCGGGCTGCGGCTCTCCTGCTTGC GGCAAGGCTGCGTCAGGCTTCACTGCT
GCGATCAACCAGCTCGCGTTCGGCTCTGCGCCAGGCCTCGGTGCAGGCGACGC
ATGCGGACGCTGCTTCGCACTGACAGGAAACCACGATCCGTA CTCTCCAACTA
TACTGGCCCGTTTCGGGCAGACGATCGTTGTAAAGGTCACGGACCTATGCCCCGT
GCAAGGCAACCAGGAGTTCTGCGGACAGACGACGAGCAACCCGACGAACCAG
CACGGTATGCCGTTCCACTTCGATATCTGCGAGGACACCGGCGGATCTGCGAAG
TTCTTCCCCTCGGGACATGGCGCGCTCACAGGCACTTTCACCGAGGTGTCGTGC
TCGCAGTGGTTCGGGCTCCGACGGCGGCCAGCTCTGGAACGGTGCATGTCTCTC
TGCGGAGACTGCGCCCAACTGGCCATCGACGGCATGCGGGAACAAGGGGACT
GCCCTTCGTAAGTTTACTGCCCCTCCATGTAGCTACGTACGATCCCTTGGATT
CAAACAAAACACTGCGTCTTTTGAC 3'

```

Figura 12 - Sequência do gene PcCel45A de *P. chrysosporium*, contendo 717 pares de bases.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Amplificação gênica

Para a realização da amplificação do gene de interesse, foram utilizados oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, sendo que a sequência dos mesmos pode ser vista na tabela 2.

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos *forward* (FW) e *reverse* (RV) para a amplificação do gene da enzima PcCel45A.

Nome	Sequência
<i>P. chrysosporium_FW</i>	5' – CAGGGCGCCATGCTGACCGTCTCCGAGA – 3'
<i>P. chrysosporium_RV</i>	5' – GACCCGACGCGTTACGAAGGGGCAGTCCCC – 3'

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a correta síntese dos oligonucleotídeos utilizamos programas que analisam as sequências de aminoácidos como SignalP 3.0⁷⁸ e o TargetP.⁷⁹ Também avaliamos outras características das proteínas, como a existência de códons raros⁸⁰ e glicosilações.⁸¹

As sequências foram construídas, de forma que os 10 nucleotídeos da região 5' do oligonucleotídeo *forward*, e os 12 nucleotídeos da região 5' do oligonucleotídeo *reverse*, não possuíssem adenina na fita complementar, para podermos utilizar o método de clonagem LIC (*Ligation Independent Cloning*), como pode ser visto na Tabela 2.

A reação de amplificação do gene foi realizada utilizando a enzima *Phusion DNA Polymerase* (Finnzymes). O resultado da amplificação dos genes foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4 Clonagem pelo sistema LIC (*Ligation Independent Cloning*)

Para o sistema LIC (*Ligation Independent Cloning*) não é necessária a utilização de enzimas de restrição, digestão ou mesmo reações de ligação.⁸² Ele é baseado na atividade exonucleásica 3'-5' da enzima T4 DNA Polimerase, que cria fitas simples de 10 a 15 nucleotídeos na extremidade 5' do vetor. Juntamente, são gerados produtos de PCR dos genes desejados, também de fita simples na extremidade 5', complementares a do vetor. Para que isso ocorra, são adicionadas extensões apropriadas nos oligonucleotídeos, de tal modo que, o vetor

não tenha timina e o gene não tenha adenina nos últimos 10 nucleotídeos. Com isso, trata-se ambos, genes e vetor, com a T4 DNA Polimerase na presença somente de dATP para o gene e dTTP para o vetor. Sua atividade exonucleásica 3` - 5` se encarregará de retirar base a base em uma das fitas até parar em uma timina (vetor), e uma adenina (gene), como ilustrado na figura 13.

Pelo fato das sequências do vetor e gene serem complementares, é realizada a ligação não covalente na ausência da enzima ligase, incubando-se os fragmentos de DNA do gene e do vetor. Então, ligases da bactéria (célula hospedeira) irão unir de forma covalente as fitas. Esse método é mais eficiente por apresentar poucos falsos positivos, já que as bactérias só incorporarão DNA circulares, ou seja, que contenham o inserto (gene). Além disso, é mais rápido e econômico, permitindo que muitos genes sejam clonados ao mesmo tempo.

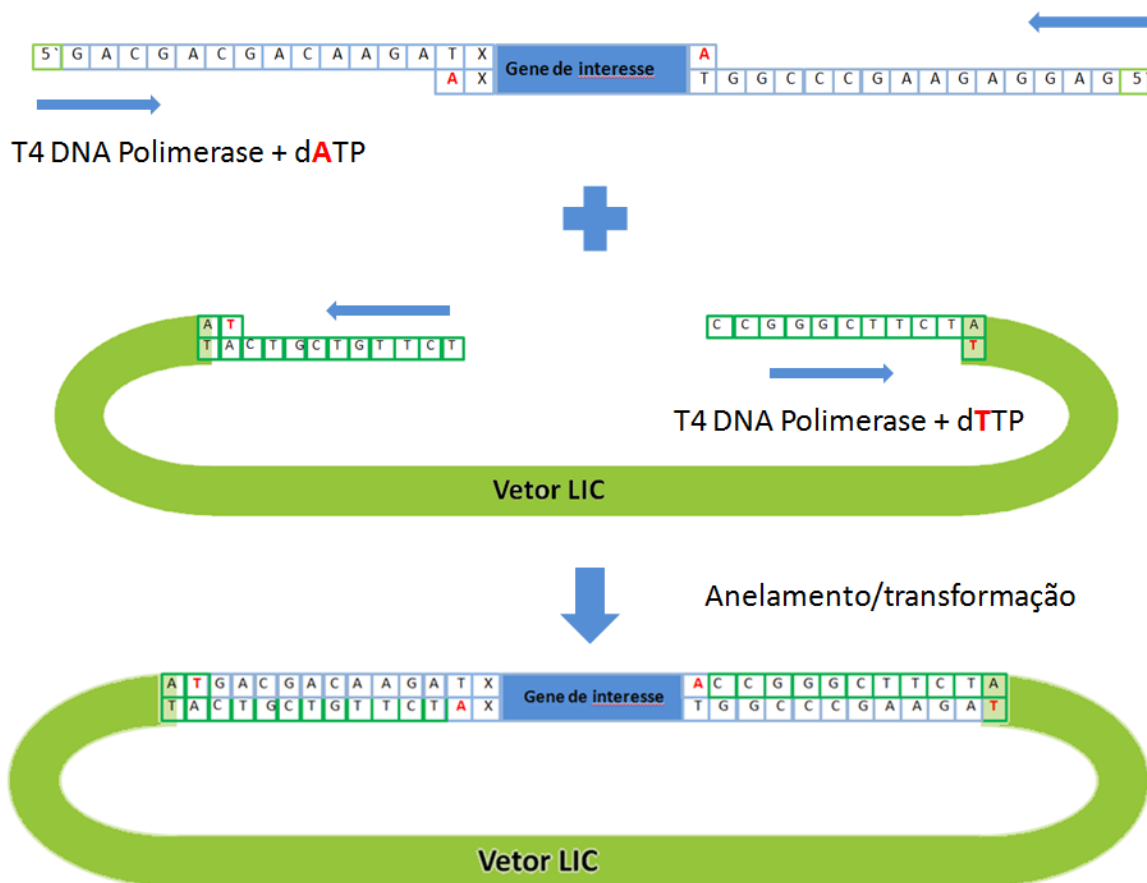


Figura 13 – Esquema representando o sistema LIC (*Ligation Independent Cloning*). A produção de fitas simples no gene permite seu correto posicionamento na fita simples do vetor, que se complementam, sendo, posteriormente, ligados pelas enzimas da bactéria.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Vetor pEXPYR

O vetor utilizado na clonagem do gene de interesse foi o pEXPYR, que é um vetor modificado a partir do plasmídeo pFE2 de *E. coli* e foi desenvolvido e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Rolf A. Prade (Universidade de Oklahoma, EUA).⁸³

Este vetor possui o gene da β -lactamase para seleção positiva em *E. coli*, usando ampicilina. Também contém um gene de resistência (Phleo) sob o controle do promotor β -tubulina de *A. niger* para seleção positiva, assim como o gene pyrG de *A. niger* para a seleção recessiva dos transformantes. O pyrG codifica a oritidina-5'-fosfato decarboxilase, que participa na biosíntese da uridina. Sendo assim, os fungos transformados serão capazes de crescer na ausência de uridina e uracila, enquanto que os não-transformados não.

Na região N-terminal, logo após o promotor da glucoamilase (glaAsp), foi adicionada uma sequência que codifica uma cauda de histidina (H6) e, juntamente a ela, um sítio de clivagem reconhecido pela protease TEV (*Tobacco Etch Virus*), seguido do gene da proteína alvo. A inserção da cauda de histidina facilita a purificação da proteína por afinidade (IMAC), ao mesmo tempo em que o sítio TEV facilita a remoção dessa cauda após a purificação.

Também foi adicionada uma sequência de terminação (trpTC) para assegurar a terminação apropriada da tradução. Com a introdução dessas proteínas, geneticamente estáveis, cuja a expressão é induzida pela maltose e secretadas no meio extracelular por causa do peptídeo sinal da glucoamilase, foi possível utilizar esse vetor para produção da enzima de interesse. O esquema do vetor está representado na Figura 14.

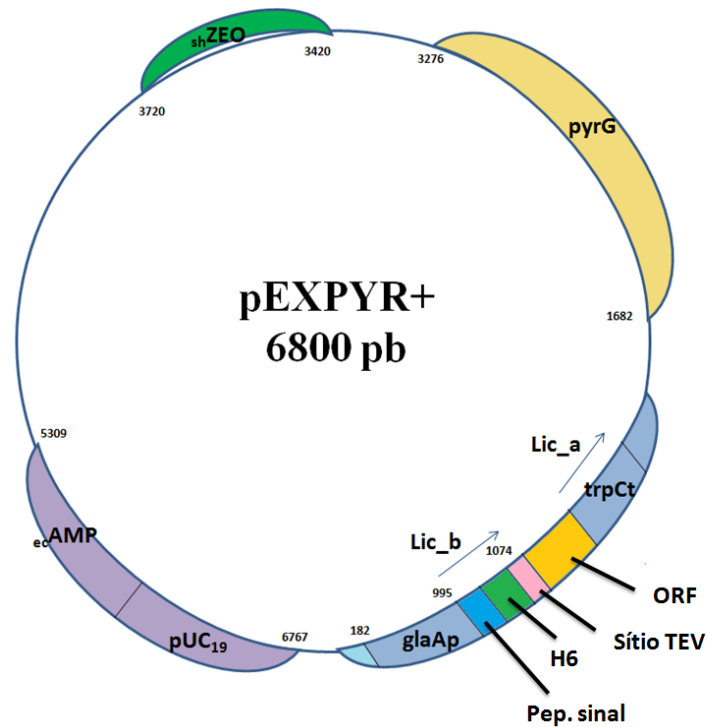


Figura 14 – Representação esquemática do vetor pEXPYR. Esse vetor possui um gene promotor da glucoamilase (glaAp), seguido por um peptídeo sinal, cauda de histidina (H6), sítio TEV e a região ORF. Possui também uma sequência de terminação trpCt, para assegurar a correta terminação proteica.

Fonte: Elaborada pela autora.

O vetor pEXPYR⁺ foi amplificado utilizando oligonucleotídeos específicos para a formação da fita complementar para o método LIC. Os mesmos podem ser vistos na Tabela 3:

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos *forward* (FW) e *reverse* (RV) do vetor pEXPYR.

Nome	Sequência
pEXPYR/LIC_FW	5'- TGGCGCCCTGAAAATACAGGTTTTTCGGTCGTTGGGATATCGTAATCGTGATGG -3'
pEXPYR/LIC_RV	5'- CCGCGTCGGGTCAAACGCTCTAGAGAACAAAACTCATC - 3'

Fonte: Elaborada pela autora.

O vetor foi amplificado em condições semelhantes às condições utilizadas para a amplificação gênica, sendo verificado por gel de agarose 1%.

4.6 Tratamento com a T4 DNA Polimerase

Os segmentos amplificados foram purificados do gel de agarose e tratados com a enzima T4 DNA Polimerase com dATP para o gene e dTTP para o vetor. Em seguida, o gene e o vetor foram incubados na mesma reação por 30 minutos, em temperatura ambiente.

4.7 Transformação em células DH5 α de *Escherichia coli*

O vetor contendo o inserto foi transformado em *Escherichia coli*, linhagem DH5 α , seguindo um protocolo que aborda choque térmico.⁸⁴ Para isso utilizou-se 10 μ L da reação de ligação em 50 μ L de célula competente. Em seguida, a reação foi deixada em gelo por 30 minutos. Para a ocorrência do choque térmico, a reação foi aquecida a 42 °C por 1 minuto e resfriada novamente por 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB e a reação foi incubada por 1 hora a 37 °C sob a agitação de 200 rpm. Após esse período, 200 μ L da reação foi plaqueada em placas de meio LB-ágar, contendo como antibiótico de seleção a ampicilina (100 μ g/mL na concentração final). As placas foram colocadas em estufa a 37 °C, *overnight*.

As colônias positivas foram selecionadas por PCR de colônia nas quais os vetores que possuíam seus insertos corretamente clonados se encontravam no devido *frame*.

Para um resultado mais conciso, as amostras foram sequenciadas para confirmar a correta clonagem do gene de interesse.

4.8 Mutação sítio-dirigida

Para realização da mutação sítio-dirigida do gene da proteína de interesse, foram desenhados oligonucleotídeos com a modificação inserida na extremidade 5' de um deles e o outro foi desenhado para começar na região -1, transpondo assim o nucleotídeo a ser modificado.⁸⁵ As mutações realizadas foram pontuais, nos resíduos Tyr25 (Y25A), Asp92 (D92A), Asp121 (D121A) e Trp161 (W161A). Todos os resíduos foram mutados para uma alanina. Foi utilizado o plasmídeo contendo o gene de interesse como molde para reação de PCR e a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo-Scientific®). Após a reação, o produto foi purificado e circularizado pela enzima T4 DNA-ligase. O plasmídeo, então, foi utilizado para a transformação das células de *Escherichia coli*, como descrito no item 4.7.

4.9 Expressão heteróloga da proteína PcCel45A em *Aspergillus nidulans*

Posteriormente a ligação do gene no vetor pEXPYR, estes foram transformados em *Aspergillus nidulans* mutante A773, gentilmente cedidos pelo CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas, Brasil).

Para isso, o mutante A773 foi inoculado em 300 mL de meio líquido contendo o meio mínimo⁸⁶ suplementado com uridina (2,5 mg/L), uracila (2,5 mg/L) e piridoxina (1 mg/L) a 30 °C, 200 rpm, por aproximadamente 14 horas. O micélio obtido foi filtrado e em seguida solubilizado com as enzimas “*Lysing enzymes from Trichoderma harzianum*” (Sigma L1412) e “*Lysozyme from Chicken Egg White*” (Sigma L6876) por 2 horas, sob agitação constante de 200 rpm.

Após a mistura tornar-se totalmente homogênea e líquida, ela foi filtrada novamente e os protoplastos coletados. Em seguida, os protoplastos foram lavados com a solução “*Double Strenght Protoplasting Solution*” (DSPS – 1,1 M KCl, 0,1 M Ácido cítrico, 1,0 M KOH) três vezes e ressuspendidos com a solução de STC50 (1,2 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,5).

Para confirmação da produção dos protoplastos, 10 µL da solução foram analisados na lupa. Com os protoplastos prontos, 25 µL de DNA na concentração de 1,0 µg/µL foram misturados a 150 µL de protoplastos por 15 minutos. A seguir, foi adicionado ao DNA e protoplastos, a solução de 50% PEG 4000. A mistura foi então homogeneizada e incubada por 15 minutos. Após a incubação, o volume da reação foi completado para 10 mL com a solução de STC50. Para a recuperação dos protoplastos transformados, a mistura foi plaqueada em placas de meio mínimo (ausente de uracila, uridina e ácido 5-fluorótico) e 1,2 M de sorbitol, incubadas a 37 °C por 4 dias.

4.10 Seleção dos clones e teste de expressão

Quando os clones do A773 transformados cresceram na placa, ocorreu a seleção e catalogação dos mesmos. Os clones foram devidamente numerados e repicados em outra placa com meio mínimo sem sorbitol.

Para encontrar os clones “super-expressores” da proteína de interesse, foi realizado um ensaio de atividade na placa de agar. Para isso foram feitas placas com 15 g/L de agar, 0,5% CMC e 0,1% AZCL-xilano, onde o fungo foi repicado de forma a permitir o crescimento

moderado do mesmo. Para verificar se houve atividade (presença de halos) a placa foi preenchida com solução de vermelho de congo (1,0 mg/mL congo red, 5 mM de NaOH) e incubada por 20 minutos. Para descolorir utilizou-se a solução 1,0 M NaCl e 5,0 mM de NaOH.

Após a verificação dos halos, os clones com maior atividade foram transferidos para 10 mL de meio mínimo com maltose, que é a fonte de indução do promotor da glucoamilase existente na construção do vetor pEXPYR. Após 72 horas de cultivo a 37 °C, as culturas foram filtradas, concentradas 10 vezes e observadas em gel SDS PAGE 15%.

Por último, ao encontrar o clone de maior expressão, este foi inoculado em 6,0 litros de meio para produção da enzima de interesse e posterior purificação.

4.11 Produção da enzima Endoglucanase V de *P. chrysosporium*

Depois de realizado o teste de expressão, o clone positivo super-expressor foi repicado em placas contendo meio mínimo e depois de incubados por 3 dias a 37 °C, os esporos foram ressuspensos em solução salina (0,5% NaCl) e inoculados em meio líquido na proporção de 2×10^6 esporos/mL. Nesse processo foram produzidos 6 litros de cultura, divididos em 12 *erlenmeyers*, e a cultura foi mantida estacionária em estufa a 37 °C por 60 horas.

4.12 Purificação

4.12.1 Concentração da proteína PcCel45A por Fluxo de Filtração Tangencial

O extrato bruto, proveniente da cultura do fungo *Aspergillus nidulans*, foi concentrado utilizando-se o equipamento *Hollow-fiber*. Este equipamento é um sistema de filtração de soluções biológicas, que utiliza cartuchos de membrana de fibra oca, para a concentração de volumes de até 10 litros. Utilizou-se uma coluna de 5 kDa (4 vezes menor do que a proteína) para que a proteína de *P. chrysosporium* não penetrasse na membrana e se concentrasse no reservatório, como visto na figura 15. Para a inserção da cultura no cartucho, esta foi anteriormente filtrada em membrana *miracloth*®. Ao final do procedimento foi adicionado 2 litros de tampão 20 mM de Tris pH 8,5 para mudança do pH da proteína, para dar continuidade na purificação utilizando a coluna de troca-iônica *Q-sepharose*.

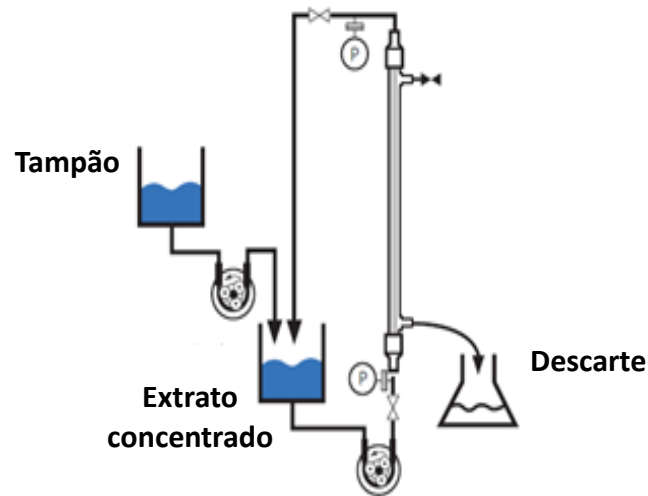


Figura 15 – Representação esquemática da concentração da proteína em *hollow fiber*. Este equipamento permite a concentração de grandes volumes de extrato bruto da cultura do fungo *Aspergillus nidulans* para a produção da enzima de interesse.

Fonte: Adaptado de GE LifeScience⁸⁷

4.12.2 Cromatografia de troca-iônica

Para realizar a cromatografia de troca iônica, o ponto isoelétrico da proteína de interesse foi pesquisado por meio do *ProtParam*, que é uma ferramenta computacional que permite o cálculo dos parâmetros físicos e químicos de proteínas através de sua sequência.⁸⁸

Assim, encontramos que o ponto isoelétrico da proteína de interesse possui o valor de 5,7, e para a realização da cromatografia, o pH utilizado foi 8,5. Isso atribui carga elétrica negativa a proteína, o que facilita sua adsorção a resina (carga elétrica positiva) e permite a eluição das proteínas de mesma carga.

Inicialmente, a coluna de *Q-sepharose* FF 16/60 foi empacotada com a resina e lavada com água. Em seguida, foi equilibrada com tampão 20 mM de Tris pH 8,5, o mesmo em que a proteína estava armazenada. Um volume de 100 mL da amostra foi injetado e a eluição se deu com o aumento gradativo do mesmo tampão, acrescido de 1,0 M de NaCl, com o objetivo de alterar as condições de força iônica, neutralizando as interações entre a proteína e a resina.

O extrato extracelular fornecido pelo *A. nidulans* produz poucos contaminantes, o que permitiu encerrar a purificação com esse único passo, diminuindo as chances de perdermos proteínas nos passos subsequentes.

As alíquotas eluídas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% e coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, para confirmação da pureza das amostras.

4.13 Ensaio enzimáticos

Inicialmente, a atividade enzimática da PcCel45A foi medida colorimetricamente usando CMC como substrato (por ser o substrato mais comumente utilizado para as endoglucanases) e ácido dinitrosalicílico (DNS), como o agente químico revelador da quantidade de açúcares redutores liberados, oriundos da atividade enzimática.⁸⁹

O método do DNS se baseia na oxidação do grupo carbonila e consequente redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico de coloração amarela, para o produto 3-amino-5-nitrosalicilato, que apresenta coloração laranja-avermelhado em condições alcalinas. O resultado pode ser mensurado por leitura a 540 nm no espectrofotômetro.

O volume total da reação foi de 100 μL , sendo 50 μL de substrato (1% w/v), 10 μL de enzima a 0,5 mg/mL e 40 μL de tampão a 50 mM. Utilizamos inicialmente o tampão universal: acetato/borato/fosfato pH 2,0 – 10. A reação foi mantida por 15 minutos a uma temperatura constante de 50 °C, utilizando-se um termociclador (BioRad).

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e como controle negativo (branco) substituímos 10 μL da enzima por 10 μL de tampão. Para parar a reação, 100 μL de DNS foi adicionado na solução e imediatamente aquecida a 95 °C. A leitura das reações foi, em seguida, registrada a 540 nm.

No pH em que a enzima apresentou maior atividade, o mesmo procedimento foi realizado, variando a temperatura entre 30 e 80 °C, em um termociclador com gradiente de temperatura.

Para testar a especificidade da enzima, foram usados diferentes substratos. A PcCel45A (0,1 mg.mL⁻¹) foi incubada com 1% (w/v) de soluções de liquenano de musgo islandês, β -glucano de Cevada, arabinano de beterraba, galactomanano, avicel PH 101 (celulose microcristalina), carboximetilcelulose (CMC), xiloglucano de tamarindo (Megazyme), 1,4- β -d-galactomanano, laminarina e disco de 0,7 cm de papel filtro Whatman N° 1 (Whatman), em um volume final de 100 μL contendo 50 mM de citrato de sódio pH 4,0 por 15 minutos a 50 °C.

Para o cálculo de açúcares redutores liberados, foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de glicose a partir da qual foi possível a estimativa da quantidade de

açúcares liberados pela hidrólise da enzima. O cálculo foi realizado por unidade de atividade enzimática (U), que é a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto. A atividade específica foi determinada como o número de unidades U por miligrama de enzima.

4.14 Análise do produto de reação por TLC (*Thin Layer Chromatography*)

A Cromatografia de Camada Fina (TLC - *Thin Layer Chromatography*) é um método simples, rápido e barato para analisar os diferentes compostos de uma mistura. Consiste na utilização de um recipiente de vidro, metal ou plástico revestido com uma placa adsorvente sólida (geralmente sílica ou alumínio).

Uma pequena quantidade da mistura a ser analisada é então pipetada na parte inferior da placa em *spots*, que é colocada dentro desse recipiente, que contém um solvente, de forma que apenas uma pequena parte da placa esteja em contato com o líquido. Este líquido, ou eluente, é a fase móvel que lentamente move a mistura por ação capilar.

Como o solvente vai se mover passando pelo ponto em que a mistura foi aplicada, um equilíbrio vai ser estabelecido para cada componente da mistura entre as moléculas que estarão adsorvidas na fase sólida e as que estiverem em solução. Em princípio, os componentes irão diferir na solubilidade e força de sua adsorção ao adsorvente e alguns serão carregados mais acima da placa do que outros. Quando o solvente atingir o topo da placa, esta é removida da solução e passa para o processo de secagem.

O produto de hidrólise de uma reação contendo PASC (0,5%), 3 μM de enzima e de tampão citrato de sódio pH 4 (50 mM) foi incubada a 50 °C por 24 horas sob agitação constante de 1000 rpm. O sistema reacional (200 μL) foi centrifugado a 13.000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para análise.

Foi aplicado 20 μL do sobrenadante em uma placa pré revestida de sílica gel 60 (Sigma). A corrida foi iniciada utilizando como fase móvel uma solução de butanol, ácido acético e água (em volume 2:1:1). Os açúcares foram revelados utilizando uma solução de ácido sulfúrico:etanol (5%) e aquecimento a 95 °C.

4.15 Análise dos produtos de reação de hidrólise por HPAE-PAD

A cromatografia de troca-iônica de alta performance (HPAE - *High-performance Anion Exchange Chromatography*) é usada para separar analitos aniônicos que são os ânions

em sua forma comum, ou analitos que podem ser ionizados em altos valores de pH, como é o caso de carboidratos em pH maior do que 12.

Essa técnica de cromatografia foi utilizada juntamente com a detecção eletroquímica por amperometria pulsada (PAD). Neste método, vários potenciais são aplicados em um eletrodo durante um período de tempo específico. As variações de potenciais são detectadas como uma forma de onda, que resulta na oxidação e redução das condições na superfície do eletrodo, resultando na oxidação dos analitos aderidos a superfície do eletrodo.

No caso dos carboidratos, seu grupo hidroxila é oxidado na superfície do eletrodo e a corrente resultante é medida. A oxidação do carboidrato é realizada em um potencial específico e resulta na perda de um próton, que causa um fluxo de corrente que pode ser medido, garantindo uma detecção sensível e seletiva. Depois da oxidação, um passo de redução e reoxidação é realizado para remover o analito ligado e renovar a superfície do eletrodo.⁹⁰

Sendo assim, os produtos da hidrólise foram analisados por HPAE-PAD para uma análise mais sensível da atividade da enzima nativa e seus mutantes. A coluna utilizada foi a troca aniônica CarboPac PA1 (Dionex ICS – 5000, Termofischer). A fase móvel da cromatografia foi uma solução de 100 mM de hidróxido de sódio com fluxo de 1 mL.min⁻¹. Uma solução de glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose foi utilizada como padrão.

4.16 Ensaios de cristalização

Em geral, a cristalização de proteínas é um processo complexo e o menos compreendido da cristalografia de macromoléculas, seguida da difração de raios-X.⁹¹ Isso se deve ao fato de proteínas serem macromoléculas grandes, flexíveis, algumas vezes compostas de múltiplas subunidades, química e fisicamente instáveis.⁹² Além disso, cada proteína é única em sua composição de aminoácidos, derivando em uma estrutura terciária singular com diferentes características em sua superfície.

No geral, quanto maior a pureza que a solução contendo a proteína apresenta, maior a chance de cristalizar. A teoria do processo de cristalização envolve três passos, descritos abaixo e representados na figura 16:

1. A proteína deve ser dissolvida em um solvente adequado (geralmente um sistema tampão), que pode ser precipitado por um sal ou composto orgânico;

2. A solução é levada a supersaturação. Nesse passo, pequenos agregados chamados núcleos do crescimento cristalino são formados. Esse processo, chamado de nucleação, representa a fase mais difícil, pois as moléculas precisam passar de um estado desordenado para um ordenado;⁹³
3. Uma vez formado o núcleo cristalino, o crescimento do cristal começa a ocorrer através da difusão de partículas para a superfície do núcleo.⁹⁴

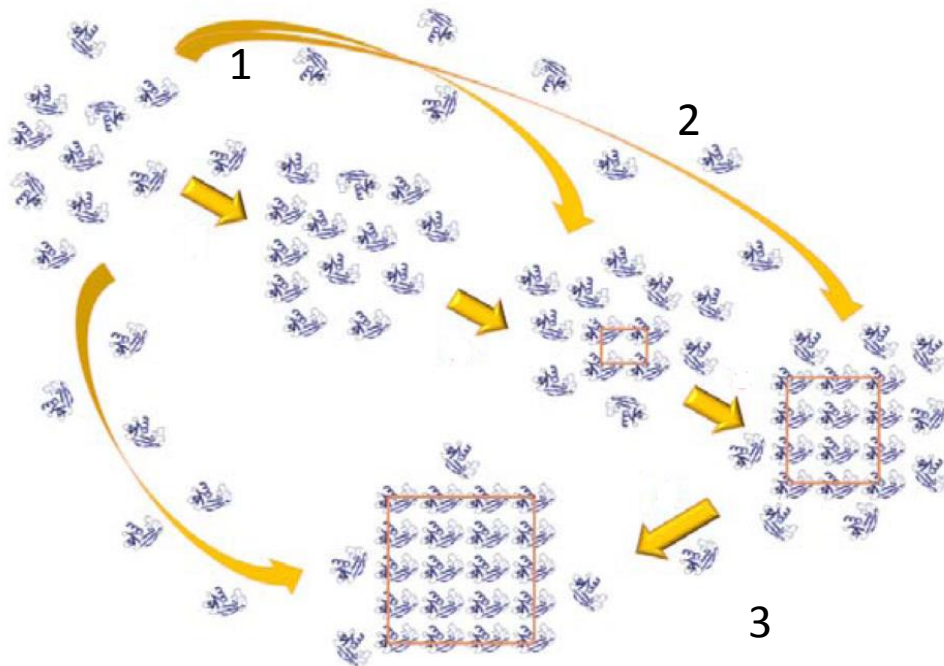


Figura 16 - Modelo de formação do núcleo cristalino. O aumento da supersaturação promove a associação das moléculas que começam a se organizar e se reorientar, formando interações geometricamente arranjadas. Essas interações tendem a ordenar e estabilizar o agregado que aumenta de tamanho, originando o núcleo, que vai se desenvolver formando um cristal.

Fonte: Adaptado de KRAUSS et al.⁹⁴

Para os nossos ensaios de cristalização, inicialmente, utilizamos o método de difusão a vapor em gota sentada, utilizando o robô de cristalização *Honeybee* e placas de 96 poços. Nesse método, uma gota contendo a macromolécula a ser cristalizada é equilibrada contra um reservatório contendo a solução de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. A diferença de concentração entre a gota e o reservatório direciona o sistema, devido à diferença de potencial químico, no sentido de um equilíbrio de concentração entre a gota e a solução do reservatório (formada usualmente por tampão, sal e precipitante). Isto se dá por difusão através da fase de vapor da solução menos concentrada para a de maior concentração.

Para um ensaio inicial fizemos um *screening* com diferentes condições de soluções de cristalização disponíveis comercialmente, entre elas os conjuntos *PEG I* e *PEGII*, *SALT RX* e *Crystal Screen*. As condições que se apresentaram promissoras, foram então refinadas manualmente, utilizando-se o método da gota suspensa em placas de 24 poços. Esse método também tem como princípio a difusão a vapor, diferenciando-se da gota sentada apenas na posição da gota. Utilizamos 1 μl de proteína e 1 μl de solução de cristalização sobre uma lamínula siliconizada. A lamínula foi invertida e selada sobre um reservatório contendo 1000 μl de solução de cristalização (Figura 17).

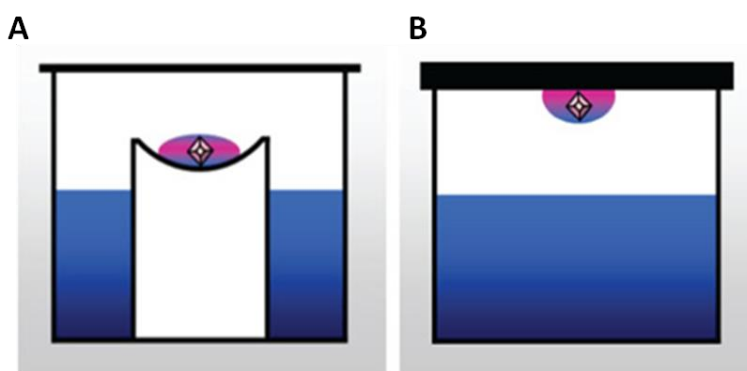


Figura 17 – Métodos de cristalização de proteínas. Em A: método da gota sentada (*sitting drop*). A solução da proteína (em rosa) é colocada sobre um pedestal juntamente com a solução de cristalização sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. Em B: método da gota pendurada (*hanging drop*). A solução da proteína é colocada sobre uma lamínula juntamente com a solução de cristalização e esta é invertida sobre o reservatório contendo a solução de cristalização.

Fonte: COLLABORATIVE Crystallization Center (C3)⁹⁵

A concentração inicial da proteína utilizada nesses ensaios de cristalização foi de 14,5 mg.mL^{-1} .

4.17 Coleta e processamento dos dados cristalográficos

A cristalografia estrutural de macromoléculas baseia-se na difração de raios X pelos elétrons dos átomos que formam as moléculas presentes no cristal. Como os motivos estruturais similares, que formam a célula unitária, são repetidos em todo o volume do cristal, de uma forma periódica, é possível reconstruir os dados obtidos para formar uma estrutura em 3D.

A geometria (tamanho e forma) da célula unitária e o comprimento de onda de raios X (de 0,8 a 1,6 \AA), que está na mesma faixa das distâncias interatômicas das moléculas do cristal, permitem que em determinadas regiões ocorra o aumento do espalhamento da radiação

(interferência construtiva) e a extinção em outras (interferência destrutiva), dando origem ao padrão de difração, observados nos experimentos de difração de raios X por um cristal de macromolécula.

Para a proteína apo, previamente aos experimentos de difração de raios X, os cristais foram crioprotetidos adicionando 10% (v/v) de etilenoglicol a solução de cristalização e coletados em fluxo de vapor de nitrogênio em temperatura criogênica (100 K). Os dados de difração de raios X foram coletados no *National Synchrotron Light Source* (NSLS, EUA) durante o curso do RapiData (2013) pelo aluno de doutorado do nosso grupo Andre Godoy. Os experimentos foram realizados na linha de feixe X4C, equipada com o detector MAR 165 CCD, a um comprimento de onda de 0,98 Å.

Para obter-se o maior número possível de reflexões medidas, é necessário que diferentes planos do retículo cristalino entrem em condição de difração. Para isso, utilizamos o método de rotação, em que o comprimento de onda (λ) é fixado, e o cristal rotacionado ao redor de um único eixo, fazendo com que a cada momento, novos planos entrem em condição de difração.

Após obter as primeiras reflexões, realizou-se a indexação das imagens. Nesse passo é possível determinar os parâmetros independentes da informação de fase, como a orientação e dimensão da célula unitária, o grupo pontual, que designa a simetria do cristal e estimar a mosaicidade. Realizando esse passo no início da coleta é possível planejar uma estratégia que maximize a qualidade dos resultados, minimizando o tempo de exposição do cristal no feixe de raios X.

Ao finalizar a coleta das imagens, realizou-se a integração dos dados coletados utilizando o programa XDS.⁹⁶ Nesse passo há a determinação da intensidade de cada reflexão medida. Devido a fatores como a variação da radiação incidente, absorção dos raios difratados ou destruição do cristal, as intensidades de cada ponto são gravadas em escalas diferentes. Para agrupar os dados é necessário que eles estejam em uma mesma escala e, para isso, foi realizado o escalonamento dos dados. Após esse passo é possível que reflexões equivalentes e simétricas, provenientes de diferentes imagens tenham suas intensidades somadas, permitindo a fusão dos dados.

A estrutura da enzima em complexo com a celobiose foi determinada utilizando-se a técnica de *soaking*, onde os cristais da proteína nativa, utilizados para a coleta de dados, foram, previamente aos experimentos de difração de raios X, mergulhados em uma solução saturada de celobiose. Depois de 3 horas, os cristais foram coletados no Bruker APEX DUO, com um sistema de difração equipado com um goniômetro KAPPA e detector APEX II CCD. O tempo

de exposição foi de 10 segundos por *frame*. Os dados foram integrados com SAINT e escalonados via SADABS.⁹⁷ As estatísticas da coleta dos dados e a determinação do grupo espacial foram obtidos com XPREP,⁹⁷ e estão mostrados na tabela 4.

4.18 Resolução da estrutura

A obtenção do modelo estrutural da PcCel45A se deu por substituição molecular,⁹⁸ utilizando um método de comparação de pares com estruturas cristalinas disponíveis, usando o algoritmo de Markov.⁹⁹ O melhor modelo encontrado para a resolução da estrutura foi o da endoglucanase de *Mytilus edulis* (Me_EGV, PDB 1wc2) com apenas 20% de identidade sequencial com a PcCel45A. Essa baixa identidade sequencial fez com que o modelo inicialmente gerado necessitasse de ajustes. Para isso foi realizada a modificação da densidade eletrônica pelo programa RESOLVE¹⁰⁰ e submetido ao AutoBuild.¹⁰⁰ O refinamento visa encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da macromolécula e sua estrutura real. Essa concordância reside na igualdade entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e os fatores de estrutura observados (F_{obs}).

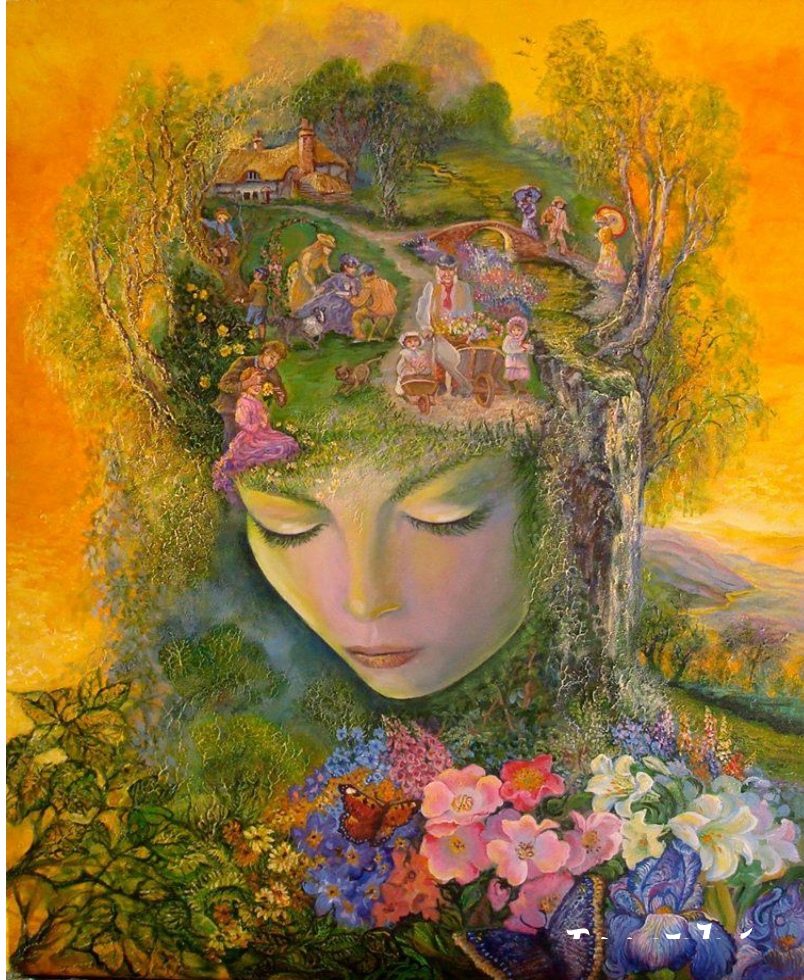
Sendo assim, o acompanhamento da qualidade do processo de refinamento é feito por meio do cálculo do R_{factor} que mede a discrepância entre o F_{calc} e o F_{obs} . Para evitar que haja uma minimização artificial do R_{factor} , que pode ser obtida por meio de um processo de super-refinamento, uma pequena porcentagem das reflexões são excluídas do refinamento e utilizadas como um conjunto teste para a validação no cálculo de um novo fator R, chamado R_{free} .

O modelo final foi então construído e refinado com os programas Coot¹⁰¹ e phenix.refine¹⁰² e validado pelo programa MolProbity.¹⁰³

Capítulo 5

Resultados e discussão

- Obtenção da enzima pura e sua caracterização



“A vida só dá asas para quem não tem medo de cair.”

Kleber Martins

5 Resultados e Discussão

5.1 Clonagem

O gene da PcCel45A foi clonado pelo sistema LIC utilizando o vetor pEXPYR. A reação de amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1% (figura 18). O plasmídeo recombinante e recém construído, foi então, transformado em *E. coli* linhagem DH5 α , para a propagação do mesmo e o DNA plasmidial foi extraído. Essa propagação e

extração de DNA é necessária para a obtenção de altas concentrações do plasmídeo (acima de 500 ng/μL), imprescindível para o processo de transformação em *Aspergillus nidulans*.

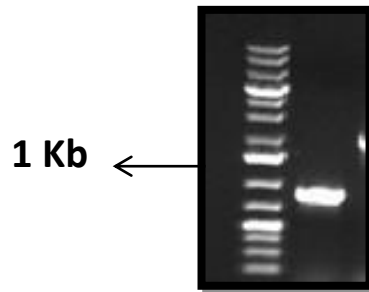


Figura 18 - Gel de agarose 1% demonstrando a amplificação do gene da PcCel45A com 717 pb a partir do cDNA de *P. chrysosporium*. A primeira coluna é referente ao marcador de massas moleculares.

Fonte: Elaborada pela autora.

O uso da técnica de clonagem independente de ligase (LIC) como estratégia de clonagem se mostrou bastante eficiente e com poucos falso-positivos.

5.2 Expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans*

O teste inicial da expressão foi realizado na placa com Agar e CMC, no qual obteve-se informações das colônias que mais apresentaram atividade (maiores halos na placa), como pode ser visto na figura 19.



Figura 19 – Teste de expressão realizado após a transformação da enzima PcCel45A em *A. nidulans*. A) Colônias catalogadas. B) Teste de expressão em meio contendo CMC. Após a verificação dos halos (atividade da enzima) essas colônias foram transferidas para meio líquido (C). A expressão em seguida foi verificada por gel SDS-PAGE.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir desse teste, as colônias que apresentaram halos maiores foram transferidas para 10 mL de meio mínimo com maltose, incubadas por 60 horas e o resultado foi analisado por SDS-PAGE (figura 20).¹⁰⁴ Observando a expressão das colônias no gel, foi possível optar pela colônia que apresentou maior atividade e menos contaminantes, sendo esta escolhida para a produção da enzima em larga escala.

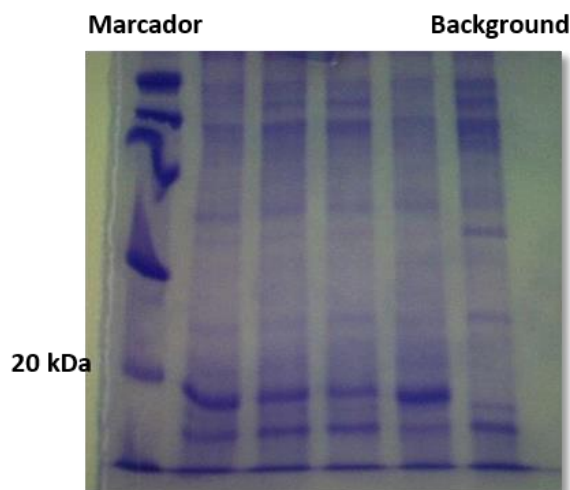


Figura 20 - Análise da expressão da PcCel45A por quatro colônias anteriormente selecionadas pelo experimento top agar. A comparação da produção da proteína entre elas permitiu a obtenção da super expressora que foi escolhida para a produção da proteína em larga escala.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Expressão da endoglucanase de *P. chrysosporium* por *A. nidulans*

A partir das placas repicadas do clone “super-expressor” de *A. nidulans*, os esporos foram inoculados em 6 litros de cultura contendo meio mínimo, 1 mg/L de piridoxina, 3% de maltose e 100 mM de tampão fosfato para manter o meio em pH 6,5. O meio foi mantido estacionário em estufa a 37 °C por 60 horas. Após a incubação, separou-se o meio extracelular do fungo que cresce na superfície, por meio de filtração em membrana *Miracloth*® (Figura 21).



Figura 21 - Cultura de *A. nidulans* após a incubação de 60 horas para expressão da proteína em larga escala. O meio extracelular é separado do fungo que cresce na superfície por filtração, para, posteriormente, ser concentrado em cartucho *Hollow-fiber*.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Purificação

5.4.1 Concentração da proteína em cartucho *hollow-fiber*

Após o cultivo, o meio foi concentrado em cartucho *hollow-fiber* até aproximadamente 100 mL. Realizou-se a troca de tampão adicionando 20 mM de Tris pH 8,5 ao cartucho e permitindo a concentração até 100 mL novamente. O resultado foi observado em gel SDS-PAGE, como pode ser visto na Figura 22. Apesar da existência de alguns contaminantes, é possível observar que a proteína mais expressa é a PcCel45A.

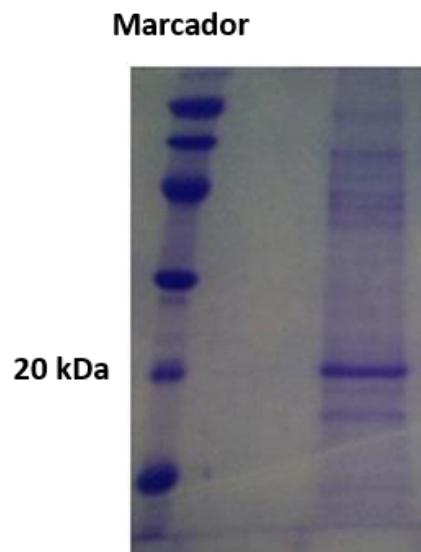


Figura 22 - SDS-Page 15% relativo a concentração de 6 litros de cultura em *hollow fiber*. Após a concentração do meio, a banda mais proeminente é a proteína PcCel45A.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.2 Purificação da proteína pela técnica de troca-iônica em coluna *Q-sepharose*

O extrato concentrado foi então aplicado a uma coluna *Q-sepharose* em sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare®). Após o término da corrida, foram eluídas duas frações de 10 mL relativas ao pico. Estas foram aplicadas em gel SDS-PAGE e pudemos comprovar a pureza das mesmas, como pode ser observado na Figura 23. Para a realização dos ensaios cristalográficos, as frações foram concentradas em *vivaspin* (Amersham Bioscience) corte de 10 kDa até a concentração final de 14,5 mg/mL.

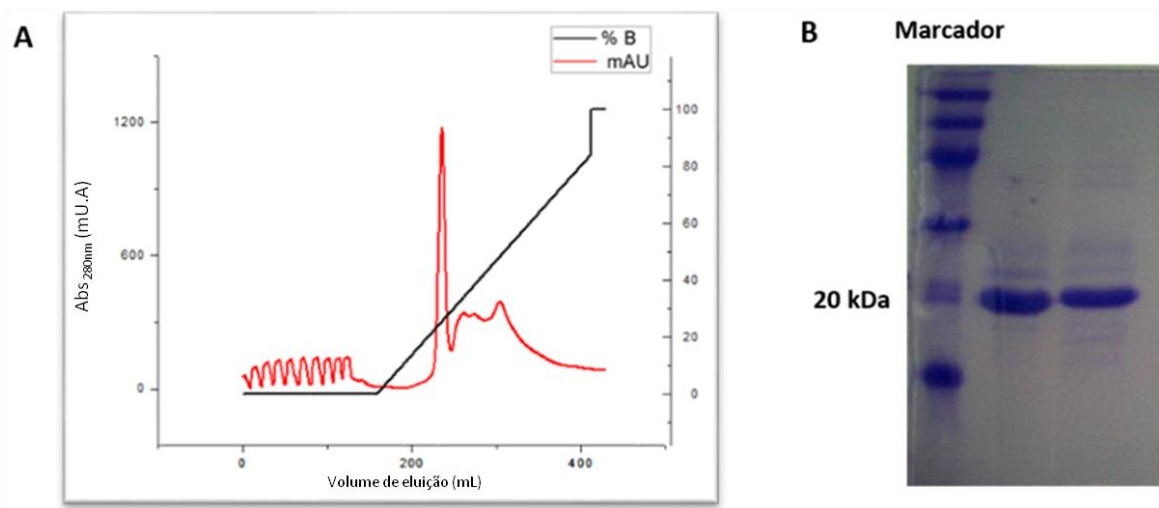


Figura 23 - Purificação da enzima PcCel45A. A) Cromatograma de troca-iônica em coluna Q-sepharose 16/60 da purificação da PcCel45A. O pico, em vermelho, corresponde a eluição da proteína. Na legenda, %B corresponde ao tampão Citrato de Sódio, pH 4,0, acrescido de 1 M de NaCl. B) SDS-PAGE 15% demonstrando a pureza das amostras após a purificação de troca-iônica.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 Caracterização bioquímica

Após a obtenção da proteína pura, iniciamos a caracterização bioquímica da enzima.

5.5.1 Teste do pH ótimo

Inicialmente, foi feito um *screening* de pHs com a temperatura em 50 °C. Essa temperatura foi abordada uma vez que é a temperatura ótima mais comum para celulasas. A análise dos resultados obtidos, demonstrou que a enzima PcCel45A possui sua maior atividade em pH 4,0, confirmando o seu perfil acidófilo assim como outras enzimas da família e celulasas fúngicas em geral. Para os pHs maiores do que 4,0, a sua atividade diminui drasticamente, sendo, praticamente, inativa a partir do pH 7,0. O perfil de atividade da PcCel45A em função do pH, para a determinação do pH ótimo, pode ser visto na Figura 24.

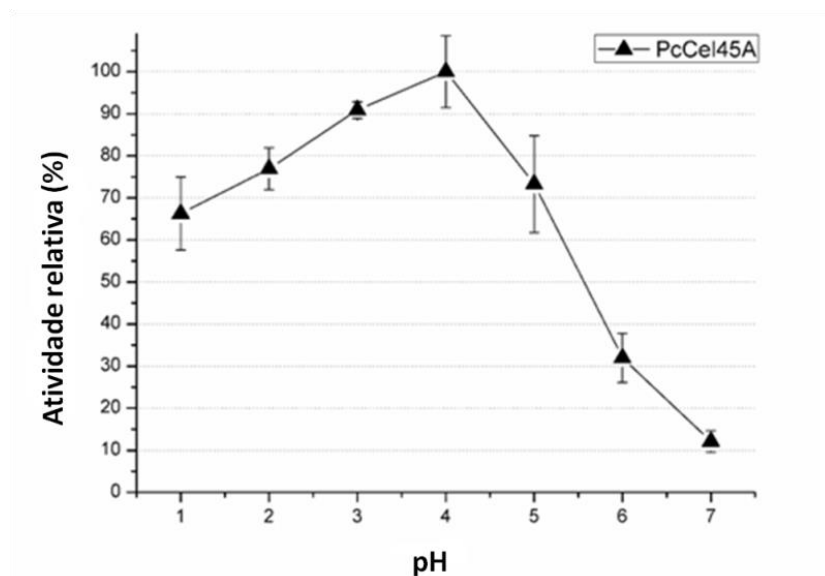


Figura 24 - Perfil da atividade relativa da enzima PcCel45A para os diferentes pHs. Mantendo a temperatura constante, variou-se a faixa de pH entre 1 e 10, sendo que a partir do pH 7 a enzima não apresentou mais atividade significativa.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.5.2 Teste de temperatura

Após a análise do pH em que a proteína apresentava maior atividade, fizemos o mesmo teste variando a temperatura. A PcCel45A teve sua atividade ótima por volta de 70 °C, resultado próximo a temperaturas ótimas de outras enzimas desse fungo.¹⁵ Comparando nossos resultados com as enzimas da família 45, percebemos que a endoglucanase de *Syncephalastrum racemosum* (subfamília A)¹⁰⁵, e a endoglucanase de *Melanocarpus albomyces* (maEG)⁶⁷ também apresentam uma temperatura ótima de 70 °C. Outras enzimas como a endoglucanase de *Penicillium decumbens*.¹⁰⁶, a endoglucanase de *Staphylotrichum coccosporum*¹⁰⁷ e a endoglucanase de *Trichoderma reesei*¹⁰⁸ apresentaram uma atividade ótima em 60 °C. Os resultados da temperatura ótima da PcCel45A pode ser visualizado na Figura 25.

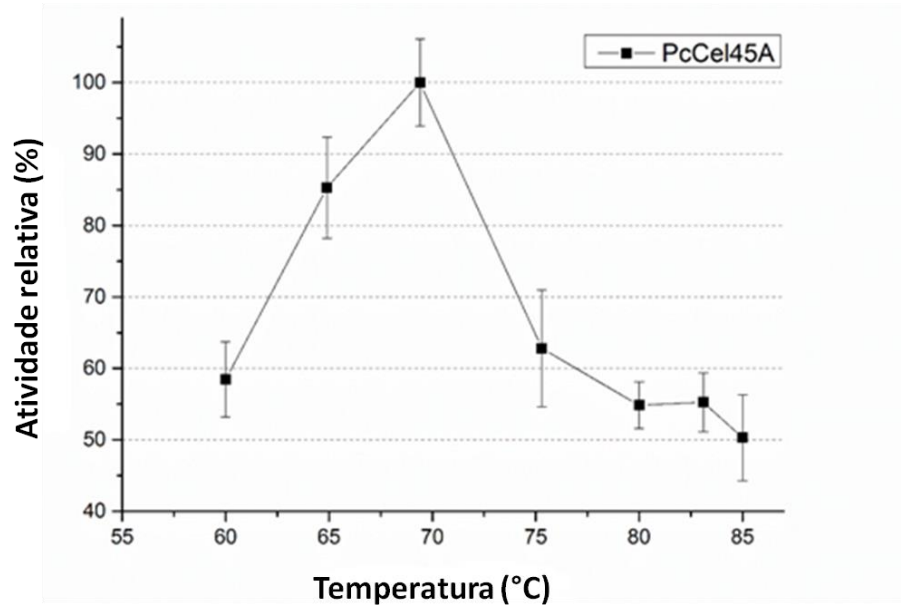


Figura 25 – Perfil da atividade relativa da enzima PcCel45A variando a temperatura de 30 a 80 °C. Para este teste mantivemos o pH ótimo da enzima (pH 4,0).

Fonte: Elaborada pela autora.

Sob condições ótimas de pH e temperatura em liquenano, a enzima demonstrou uma atividade específica de aproximadamente $1,22 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$. Esse valor, embora menor do que o encontrado para a maioria das endoglucanases de outras famílias, é próximo ao relatado para algumas enzimas da mesma família, como a endoglucanase de *Neurospora crassa*.¹⁰⁹

5.5.3 Painel de substratos

A enzima teve sua especificidade testada frente a diferentes substratos, apresentando atividade nos seguintes: liquenano, seguida de papel de filtro (aproximadamente 80% da atividade relativa à máxima observada em liquenano), β -glucano (38%), galactomanano (11%) e CMC (10%), como pode ser observado na figura 26.

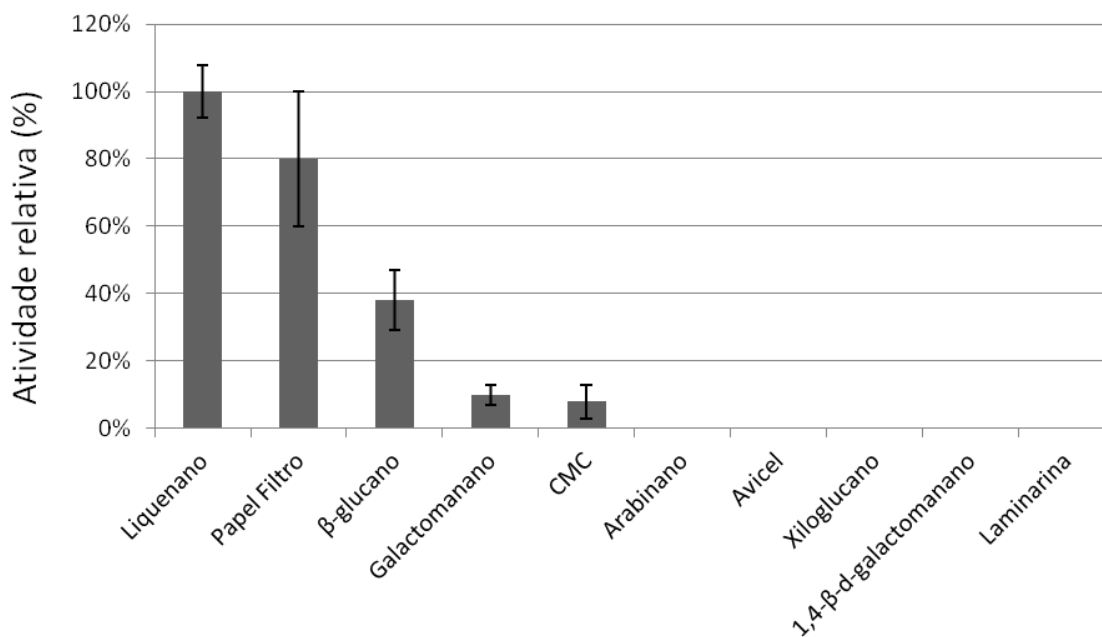


Figura 26 - Perfil da especificidade por substratos pela enzima PcCel45A. Histograma representado em termos de atividade relativa após 15 minutos de reação sob condições ótimas com os diferentes substratos. Desvio padrão referente a três experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A caracterização bioquímica dessa enzima já havia sido realizada por outro grupo,¹² e para nos referir à ela utilizaremos o nome PcCel45App. Os testes com a PcCel45A tiveram como objetivo a comparação entre os resultados, pois apesar de serem a mesma enzima, os sistemas de expressão em que elas foram produzidas eram diferentes, sendo que o outro grupo utilizou *Pichia pastoris*.

Para a caracterização da PcCel45App, foi utilizado MCC (celulose microcristalina), PASC, CMC, liquenano, β-glucano de cevada, glucomanano e xilano. Os resultados podem ser observados na figura 27.

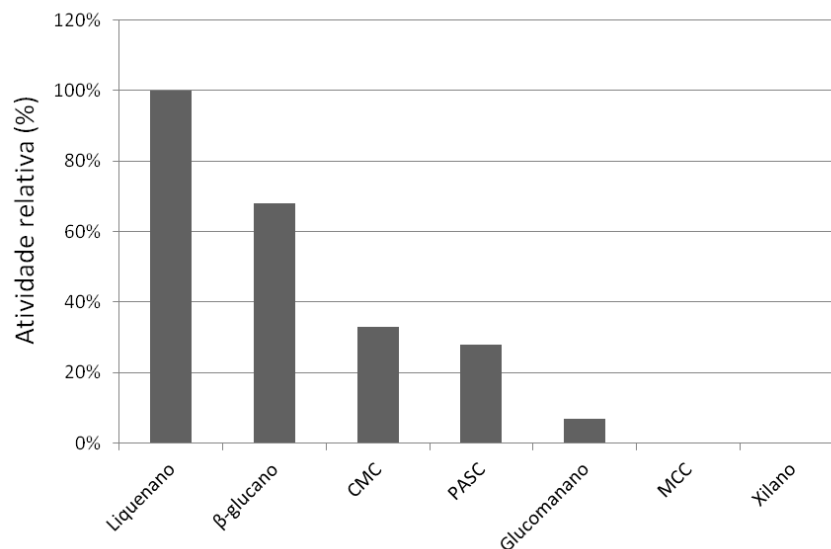


Figura 27 - Perfil da especificidade por substratos da enzima PcCel45pp. Histograma representado em termos de atividade relativa, após 1 hora de reação, a temperatura de 30 °C.

Fonte: Adaptado de IGARASHI,et al¹²

Comparando os resultados, percebemos que ambas as enzimas apresentaram maior atividade para o substrato liquenano, que é constituído por ligações β 1,3/ β 1,4 na proporção de 1:2. O substrato papel de filtro aparece nos nossos testes como o segundo maior em atividade enzimática, e não foi testado pelo o outro grupo. O papel de filtro é composto por ligações β 1,4, diferenciando-se do avicel (celulose microcristalina) por possuir um maior grau de polimerização e menor cristalinidade.

Ambas as enzimas apresentaram atividade para β -glucano (ligações β 1,3/ β 1,4 na proporção de 1:4) e CMC (ligações β 1,4). Para PcCel45A utilizamos galactomanano, enquanto que para PcCel45App foi utilizado glucomanano. A enzima apresentou atividade em ambos os substratos. A diferença entre eles reside no esqueleto principal, sendo o galactomanano constituído por galactose, enquanto que o glucomanano é constituído por glicose.

Os resultados do outro grupo permitiram concluir que a PcCel45App possui maior atividade para substratos com ligações mistas (β 1,3/ β 1,4), representados pelo liquenano e β -glucano, do para substratos com ligações β 1,4. Os resultados para PcCel45A são similares, pois ambas as enzimas apresentaram maior atividade para liquenano, β -glucano, CMC e gluco/galactomanano. Entretanto, a PcCel45A apresentou maior atividade enzimática utilizando papel de filtro como substrato em relação a β -glucano, sugerindo que a macroestrutura do substrato além da composição das ligações glicosídicas influenciam na atividade enzimática.

Para certificar-nos da ação da PcCel45A testamos também laminarina, que é um polissacarídeo constituído por monômeros de glicose unidos por ligações (β 1-3), com ramificações (β 1-6). Apesar do esqueleto desse substrato ser constituído por ligações (β 1-3), a enzima não demonstrou atividade, o que indica que a clivagem da enzima nos substratos mistos ocorre nas ligações β 1,4.

As preferências clássicas por substratos dessa família descreve que as enzimas apresentam maior atividade em liquenano e β -glucano, seguida por uma menor atividade em celulose cristalina (avicel e papel filtro). Além disso, não apresentam atividade em xilano, laminarina, celobiose e substratos sintéticos.⁶⁴ Apesar da maioria dos testes de especificidade de substratos estar vinculado com enzimas da subfamília A, consideramos que essa enzima possui uma preferência por substratos muito próxima, o que é um dado interessante se considerarmos que são enzimas muito diferentes.

5.5.4 Análise do produto da enzima nativa por TLC

Para analisar o produto da reação da PcCel45A utilizamos β -glucano e PASC. Para β -glucano, não conseguimos observar acúmulo de celooligossacarídeos. Já com a utilização de PASC foi possível observar celooligossacarídeos com o grau de polimerização de 3, 4 e 5, como pode ser observado na Figura 28.

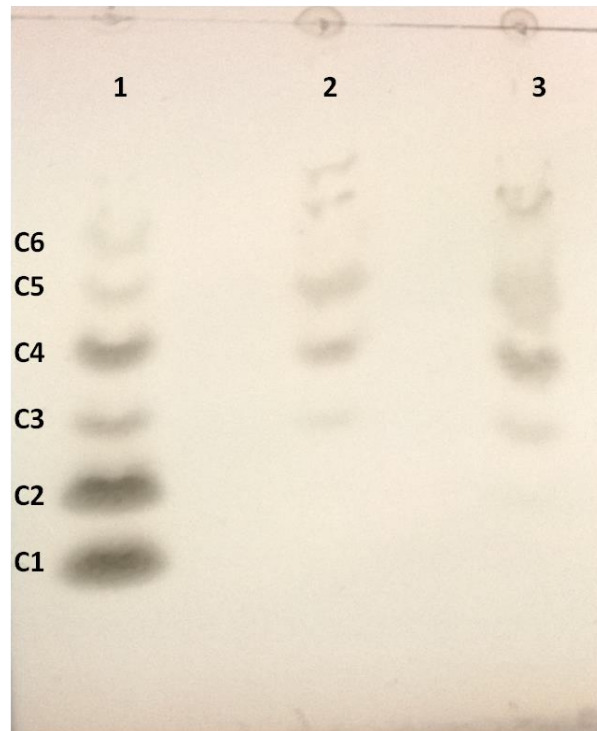


Figura 28 - Análise dos produtos de reação solúveis depois da incubação da enzima PcCel45A com PASC. A reação foi mantida à 50°C por 24 horas. Na linha 1: padrão de celooligossacarídeos com grau de polimerização de 1 a 6 (C1 a C6). Na linha 2: sobrenadante da reação de hidrólise. Na linha 3: sobrenadante da reação concentrado 10 vezes.

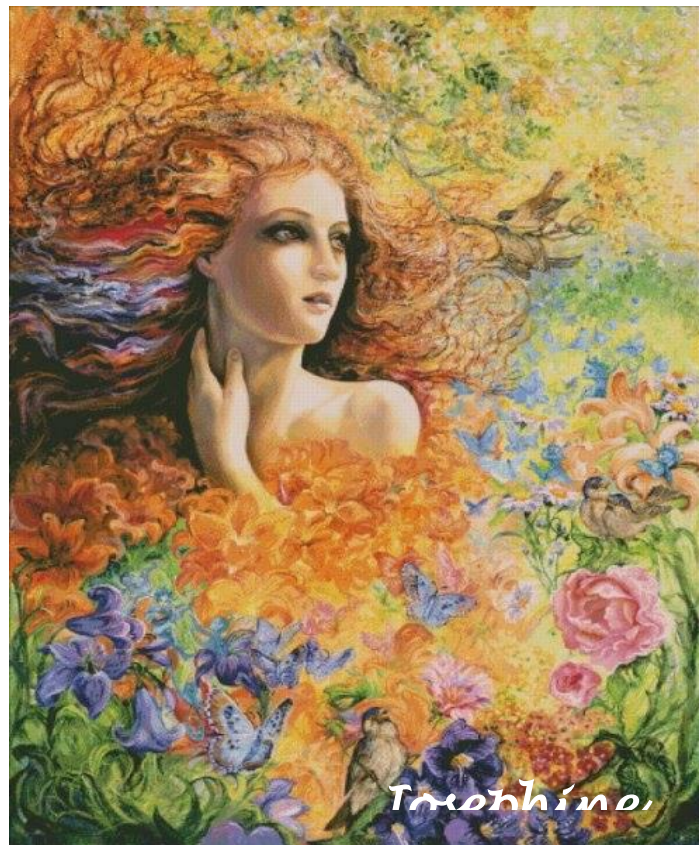
Fonte: Elaborada pela autora.

A análise do produto da clivagem, ao utilizarmos β -glucano, tanto por TLC quanto por HPAE-PAD demonstrou que a enzima não produz oligossacarídeos quando há ligações β 1,3/ β 1,4. Isso provavelmente ocorre pois a enzima pode não reconhecer as unidades repetitivas do liquenano e β -glucano que são celotrioses conectadas por ligações β 1,3. Assim, pode ser que ocorra apenas uma hidrólise parcial para esses substratos, como foi sugerido por outro grupo.¹²

Capítulo 6

Resultados e discussão

- Obtenção da estrutura da enzima e sua singularidade



“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”

Albert Einstein

6 Resultados e Discussão

6.1 Cristalização, coleta e processamento dos dados cristalográficos

Os cristais da PcCel45A foram obtidos na solução de 0,5 M de sulfato de amônio; 0,1 M de Hepes pH 7,5; 30% v/v (+/-) 2-metil-2,4-pentanediol. Após a coleta, os dados foram integrados em grupo pontual ortorrômbico, com grupo espacial sendo $P2_12_12_1$, com os parâmetros da célula unitária iguais a 45,6 Å, 58,6 Å e 63,7 Å. O cristal utilizado para o experimento de difração de raios X pode ser observado na figura 29.

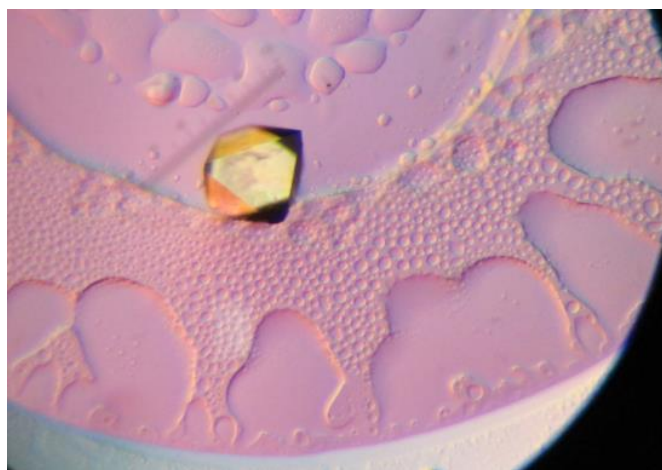


Figura 29 - Cristal da proteína PcCel45A utilizado no experimento de difração de raios X.

Fonte: Elaborada pela autora.

O conteúdo da unidade assimétrica foi estimado através do coeficiente de Matthews ($V_m = 2,35 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$) que indicou a presença de apenas uma molécula da PcCel45A na célula unitária e 28% de solvente. A estrutura cristalográfica da enzima “apo” foi refinada resultando em um R_{work} final de 15,1% e R_{free} de 17,8% a 1,4 Å de resolução. O modelo final consiste de 180 resíduos da proteína, 230 moléculas de água e 16 moléculas de etilenoglicol. Depois do refinamento, 97% dos resíduos se encontravam em regiões permitidas pelo gráfico de Ramachandran. A estrutura da PcCel45A tem duas cisteínas (64 e 94) com ângulos ruins (SG-SG), possivelmente devido a danos da radiação. O complexo PcCel45A-celobiose foi refinado a 1,7 Å, e tem qualidade similar ao da enzima “apo”. Ambas as estruturas estão completas dos resíduos 8 ao 187. Apesar de ser expressa pelo fungo *Aspergillus nidulans* nenhuma

modificação pós-traducional foi encontrada na estrutura da enzima recombinante. Os dados cristalográficos e as estatísticas de refinamento se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados cristalográficos da coleta e estatísticas de refinamento da proteína PcCel45A nativa e em complexo com a celobiose. Os valores entre parênteses são referentes à última camada de resolução.

	PcCel45A	Complexo PcCEL45A+CELOBIOSE
COLETA DE DADOS		
Detector	MAR 165 CCD	APEX II CCD detector
Comp. de onda (Å)	0,97924	1,5418
Faixa de resolução (Å)	31,84 (1,47)	36,74 (1,70)
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cela unitária (a, b, c) (Å)	45,6; 58,6; 63,7	45,3; 58,2; 62,9
Reflexões únicas	29354 (2568)	18567 (1694)
Multiplicidade	7,4 (2,4)	5,7 (3,5)
Completeza (%)	98,22 (87,02)	99,08 (92,12)
Mean I/sigma(I)	12,50 (3,04)	8,42 (1,86)
R-merge (%)	4.3 (17.9)	37.65 (11.35)
PARAMETROS DE REFINAMENTO		
R _{work} (%)	15,11	17,74
R _{free} (%)	17,83	20,68
Ligantes	16	28
Águas	230	271
Resíduos de aminoácidos	180	180
RMSD(ligações) (Å)	0,016	0,014
RMSD(ângulos) (°)	1,52	1,23
Ramachandran favoráveis (%)	97	97
Ramachandran desfavoráveis (%)	0	0
MÉDIA B-fatores		
Proteína, global (Å ²)	15,60	14,00
Ligante (Å ²)	29,30	22,40
Solvente (Å ²)	28,80	26,10

6.2 Modelo estrutural da PcCel45A

A forma geral da estrutura da PcCel45A lembra uma âncora, com uma grande fenda na superfície da enzima, de proporções aproximadas de 40 Å de comprimento, 13 Å de profundidade e 12 Å de largura, como pode ser observado na figura 30.

Análoga com as outras estruturas existentes da família 45,⁶⁷ a estrutura da PcCel45A se caracteriza pela presença de um duplo- Ψ - β -barril, formado por seis folhas- β , quatro α -hélices e nove *loops*. A estrutura contém também 5 pontes dissulfetos entre as cisteínas 28 e 123, 33 e 61, 64 e 149, 94 e 103, 165 e 179, respectivamente.

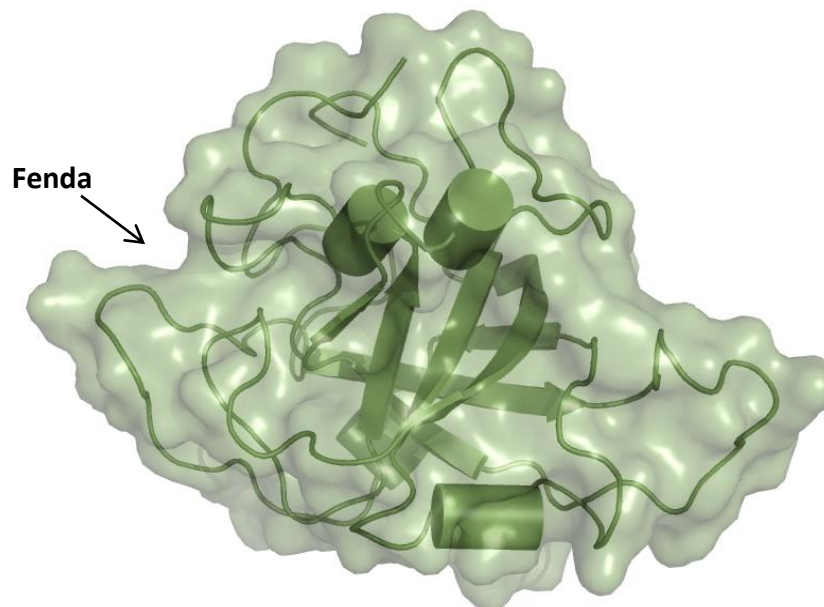


Figura 30 - Estrutura geral da PcCel45A, com ênfase para a fenda na superfície da enzima. O formato geral da PcCel45A lembra uma âncora, devido ao posicionamento dos *loops* 4 e 9.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma análise detalhada da estrutura permite-nos perceber que a folha β 1 (Thr17 – Tyr25) está conectada com a β 2 (Thr41 – Asn45) pelo segundo *loop*, e ambas se encontram no sítio ativo da enzima. Entre elas está a β 5 (Phe118 – Cys123), que é paralela a folha β 1 e anti-paralela a β 2, formando o sulco. Uma ponte dissulfeto entre Cys28 e Cys123 estabiliza a conexão entre as folhas β 1 e β 5. As folhas β 3 (Gly62 – Gly69) e β 6 (Thr143 – Glu146) estão localizadas

no lado oposto do barril e seus resíduos não interagem diretamente com o sítio ativo (Figura 31).

Começando após o *loop* 4, a região N-terminal da folha β 4 (denominada de β 4' e que compreende os resíduos Ile86 a Val90), é anti-paralela a β 3. Após atingido o fim do barril, a folha β 4 forma uma dobra na posição da Thr91 com um ângulo de, aproximadamente, 90° e continua como folha β 4'' (Asp92– Cys94). A ponte disulfeto entre as cadeias laterais de Cys94 e Cys103 da hélice 2 estabiliza essa dobra não usual na cadeia principal da enzima. A folha β 4'' não apenas forma parte da superfície do sítio ativo no lado oposto da folha β 1, como contém resíduos que podem ser importantes para a atividade da enzima, como o Asp92 (Figura 31A).

Juntamente com o *loop* 2 e 3, o *loop* 9 (Trp152 – Ser187) sela o outro lado do sulco, na vizinhança da folha β 4''. Esse é o maior *loop* da estrutura de PcCel45A, que forma dois grampos, sendo o primeiro (Trp152 – Cys165) estrangulado por uma ponte disulfeto entre Cys165 e Cys179 e onde se encontra o aminoácido Trp161, o único triptofano superficial da estrutura. O segundo grampo (Cys165 – Ser187) é parte da região C-terminal da enzima.

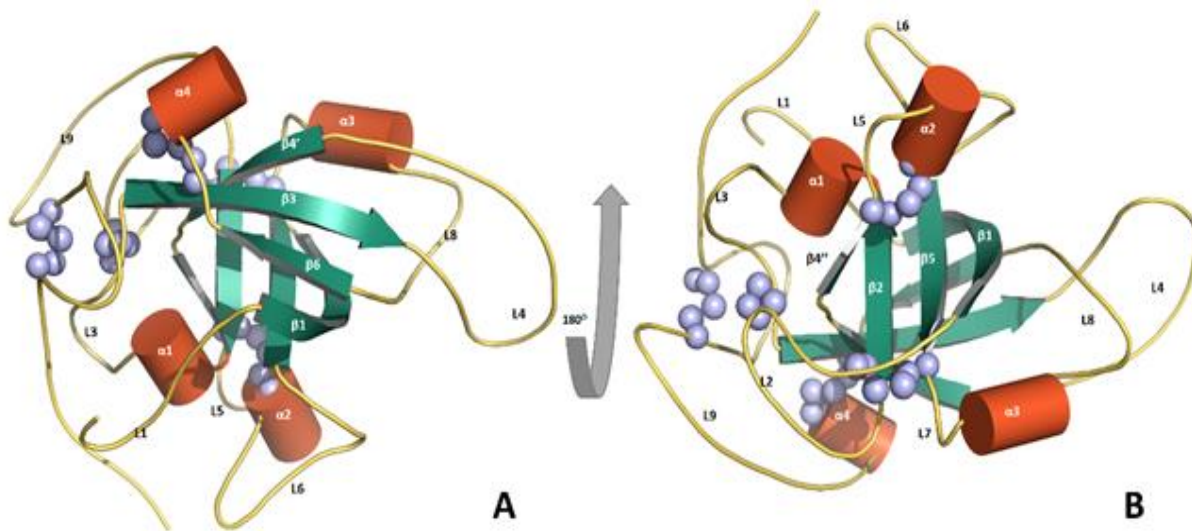


Figura 31 - Forma geral da estrutura de PcCel45A. As 6 folhas da estrutura β -barril estão representadas em verde, seguidas pelas 4 α -hélices em laranja. Os *loops* estão em amarelo. As esferas roxas simbolizam as pontes disulfeto.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3 Estrutura da PcCel45A em complexo com a celobiose

O complexo da PcCel45A-celobiose revelou uma única celobiose na fenda do sítio ativo. Assim como outras GH45, o sítio ativo é subdividido em seis subsítios com relação à clivagem do carboidrato: o +1 e +2 se encontram na extremidade redutora do carboidrato e o -1, -2, -3 e -4 estão na extremidade não redutora do carboidrato.⁵⁶ A molécula de celobiose do complexo PcCel45A-celobiose se encontra nos subsítios +1 e +2 como pode ser visto na Figura 32A.

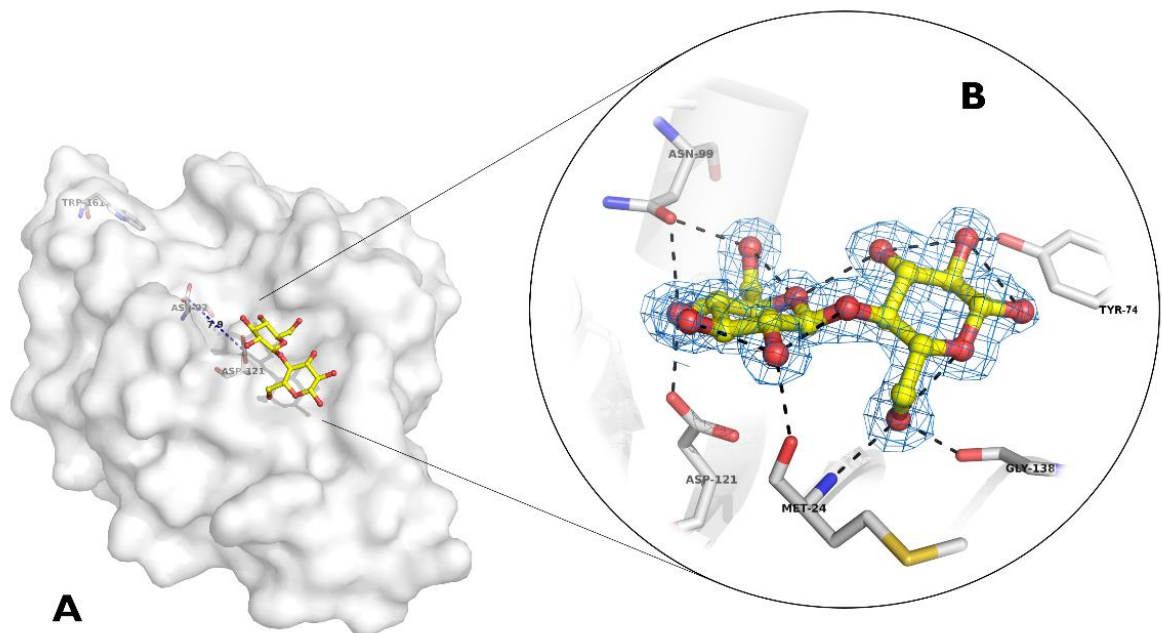


Figura 32 - Sítio ativo da PcCel45A. A) Ênfase para o sulco na superfície da PcCel45A e o posicionamento da celobiose nos subsítios +1 e +2. Em bastão estão os aminoácidos Asp92 e Asp121, a uma distância de 8 Å um do outro. Também vemos o resíduo do triptofano 161 conservado na região C-terminal da enzima. B) Ênfase para a interação da celobiose com os resíduos Asn99, Asp121, Met24, Gly138 e Tyr74.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resíduos Asp121, Met24, Gly138 e Tyr74 interagem diretamente com a celobiose por meio de ligação de hidrogênio, como vemos na Figura 322B. Na posição +2, o nitrogênio amídico da Met24 e o oxigênio da carbonila da Gly138 interagem com o O6' da celobiose,

possivelmente, estabilizando o ligante no sítio ativo. O O2' da celbiose faz uma ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do anel aromático fenil da Tyr74 (2,9 Å). Na posição +1, a hidroxila do O2 da celbiose forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da Met24.

A comparação entre a estrutura apo-PcCel45A e seu complexo com a celbiose revelou que a ligação do ligante induz a uma pequena mudança conformacional na folha β 1 e β 5, onde os resíduos Met24 e Asp121 estão respectivamente localizados. Ainda assim, nenhuma diferença significativa foi notada entre a enzima apo e seu complexo (RMSD de 0,12 Å para C α).

6.4 Comparação entre PcCel45A e outras GH45

Como já dito anteriormente, a família 45 das GHs não possui muitas informações estruturais, sendo as estruturas disponíveis, em sua maioria, pertencentes à subfamília A (Hi_EGV, maEG e HG_EGV).

Embora os elementos de estrutura secundária (duplo- Ψ - β -barril) sejam conservados em todas as GH45, quando comparamos PcCel45A com as proteínas da subfamília A, vemos que esta possui diferenças significativas. O RMSD entre os carbonos α da PcCel45A e Hi_EGV é de 12 Å e com as maEG 15 Å e HG_EGV é de 16 Å. Também se diferenciam pela forma, pois as estruturas de Hi_EGV e maEG (que são as mais bem estudadas) tem o formato de uma esfera que possui uma fenda envolta por *loops*, enquanto PcCel45A tem o formato de uma âncora, onde a fenda cruza a superfície da estrutura. A comparação entre as enzimas Hi_EGV e PcCel45A podem ser observadas na figura 33.

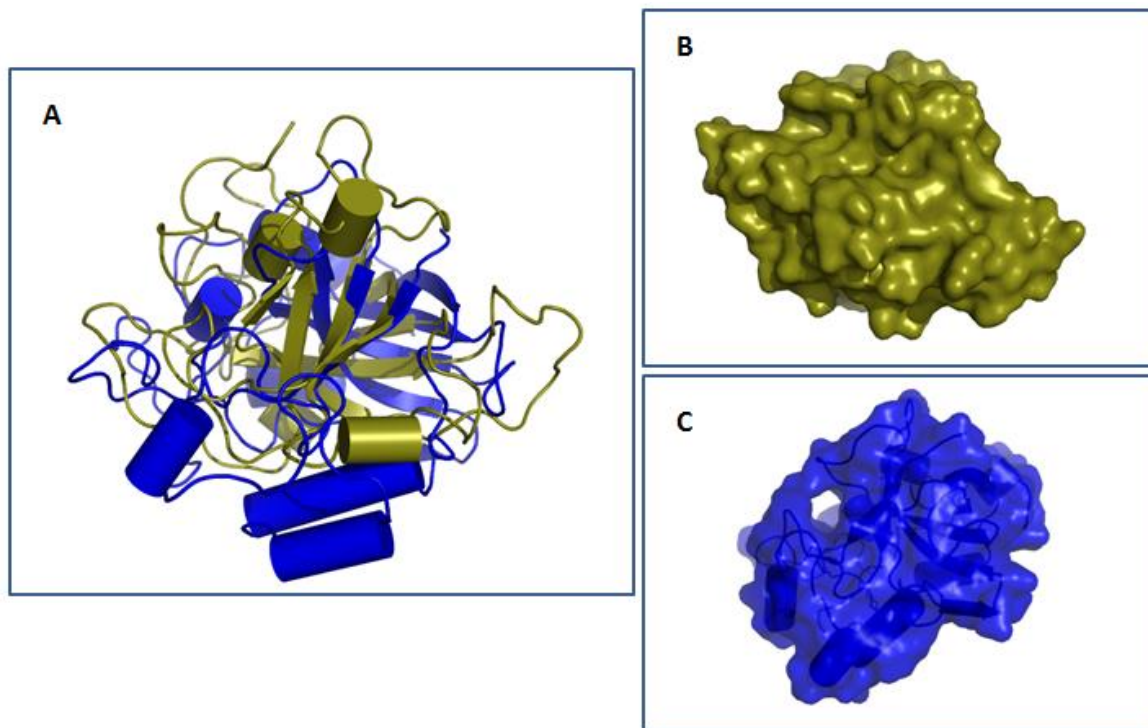


Figura 33 - Comparação entre PcCel45A e a enzima Hi_EGV. Em A, a estrutura global da PcCel45A (em verde oliva) sobreposta com a estrutura de Hi_EGV (em azul). Em B, superfície da PcCel45A demonstrando o sulco do sítio ativo. Em C, superfície da Hi_EGV, demonstrando o sítio ativo, com *loops* envolvendo a fenda.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas enzimas da subfamília A, os longos loops envolvem e seguram o substrato no sítio ativo, já a fixação do substrato no sítio ativo da PcCel45A parece ocorrer por meio de resíduos aromáticos da superfície, como Tyr25, Tyr74 e Trp161.

A comparação da PcCel45A com a única estrutura da subfamília B (ME_EGV) disponível demonstra que há 20% de identidade sequencial (RMSD: 3,1 Å para C α). A PcCel45A possui a fenda mais alongada, isso porque o *loop* 4 está posicionado exteriormente, enquanto que na ME_EGV esse *loop* está interno, conferindo a esta estrutura uma forma mais globular, parecida com aquelas da subfamília A. A comparação entre as estruturas pode ser observada na Figura 34.

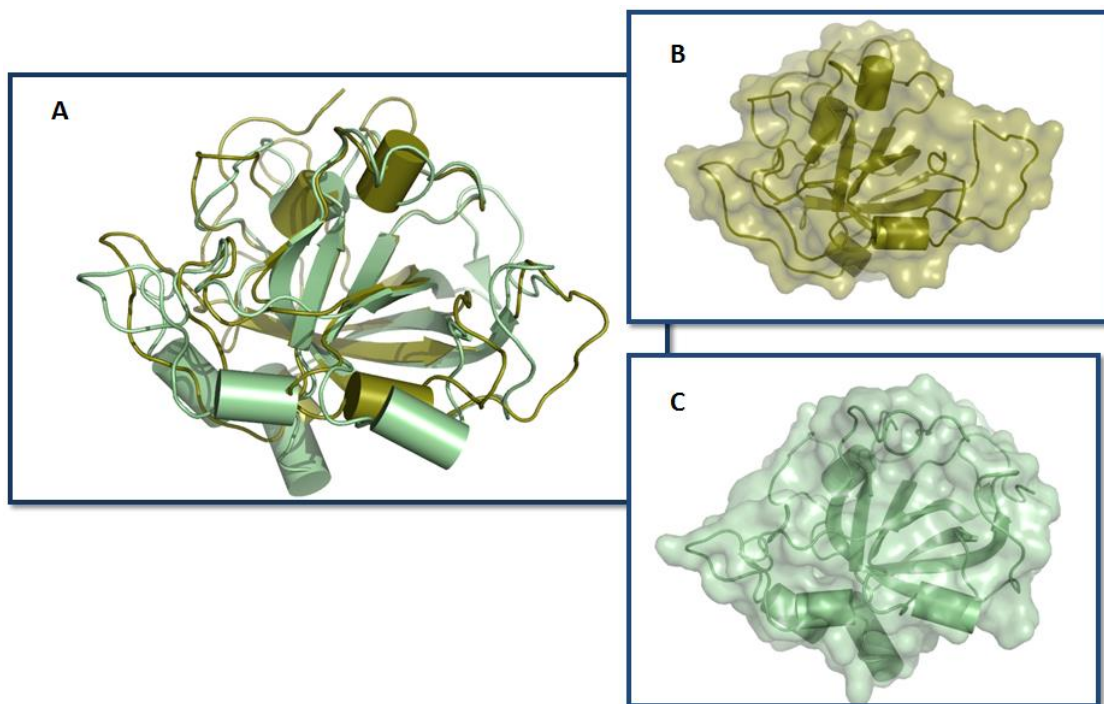


Figura 34 - Comparação da enzima ME_EGV com PcCel45A. A) Sobreposição das duas estruturas. B) Forma geral da superfície de PcCel45A, lembrando uma âncora. C) Forma geral da superfície de ME_EGV, demonstrando uma fenda menos alongada e mais globular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da morfologia única da estrutura da PcCel45A, outra importante diferença encontrada entre essa enzima e as outras representantes da família, é o fato do Asp10, conhecido como o aceptor de próton na reação de inversão, não existir em PcCel45A (Figura 3535).

Ao invés dele, a PcCel45A possui um outro aspartato, Asp92 que se encontra na fenda (folha $\beta 4''$) e está a 8 Å de distância do Asp121. Entretanto, comparando com os aspartatos catalíticos de Hi_EGV, por exemplo, esse resíduo de PcCel45A está posicionado linearmente ao Asp121, como vemos na Figura 3535. Essa posição dificultaria a clivagem do substrato pela reação de inversão.

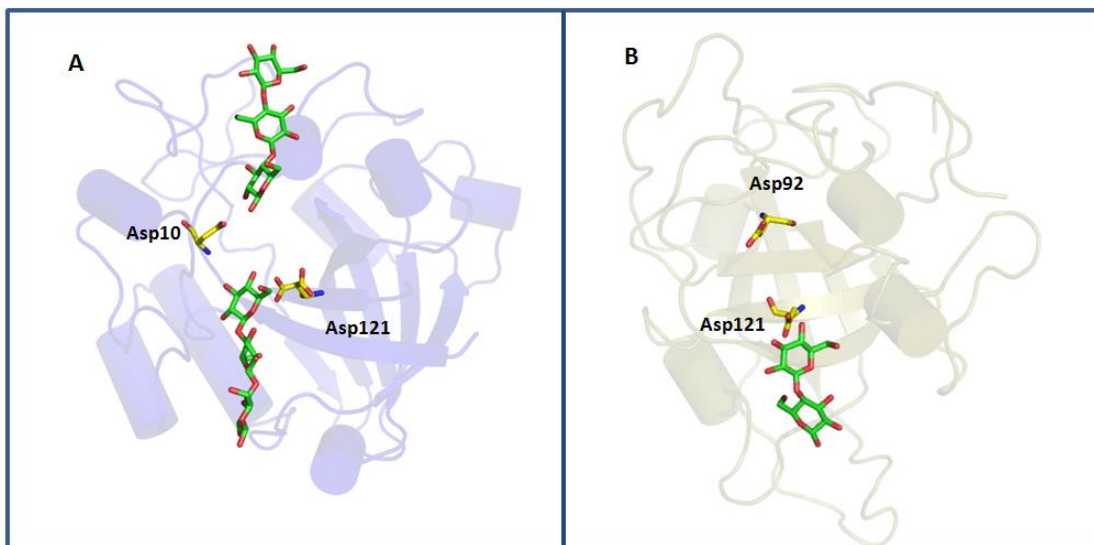


Figura 35 - Comparação entre as estruturas de Hi_EGV e PcCel45A destacando os aspartatos. A) Ênfase para os aspartatos catalíticos (amarelo) presentes no sítio ativo de Hi_EGV em complexo com a celohexaose (verde). B) Ênfase para os aspartatos do sítio de PcCel45A (em amarelo) em complexo com a celobiose (verde).

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro resíduo que é conservado nas estruturas de Hi_EGV e maEG e também se encontra em PcCel45A, é a Tyr25. Esse resíduo está localizado no final da folha β_1 e assim como nas outras estruturas forma o chão do centro catalítico, como vemos na Figura 36.

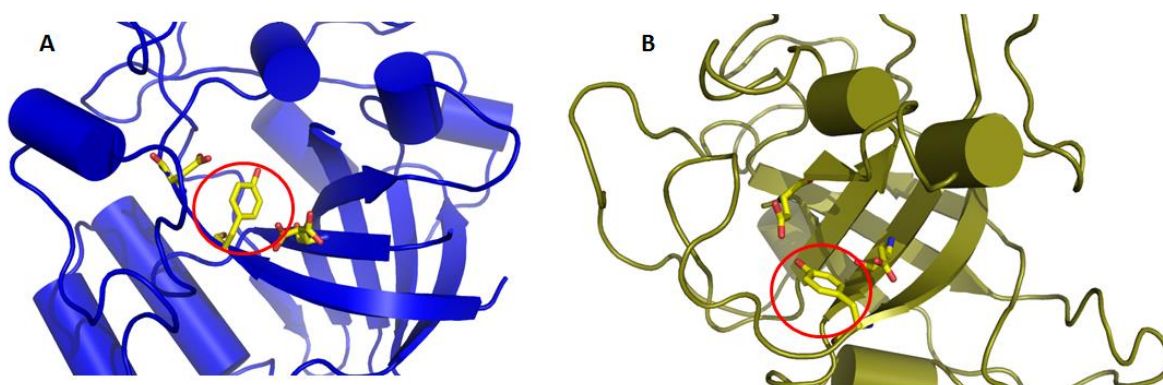


Figura 36 - Sítio ativo da da Hi_EGV e PcCel45A. A) Aminoácidos Asp121, Asp10 e Tyr8 em bastão amarelo, com destaque para a Tyr25 que compõe o chão do centro catalítico em Hi_EGV. B) Aminoácidos Asp121, Asp92 e Tyr25 na estrutura da PcCel45A.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os outros representantes da GH45 em complexo com o substrato e PcCel45A em complexo com a celobiose, percebemos que o posicionamento do ligante na fenda é similar em todas as enzimas, tendo o Asp121 ligado ao subsítio +1 do substrato, o que sugere que a clivagem pela PcCel45A também ocorra entre o subsítio -1 e +1 e que de fato o Asp121 é o doador de próton para reação.

6.5 Comparação estrutural da PcCel45A e β -expansinas

Já se sabe por meio de estudos filogenéticos que as enzimas da família 45 possuem uma ligação distante com as expansinas das plantas.¹² Em uma comparação entre a PcCel45A com o domínio um das expansinas foram encontradas inúmeras similaridades. A comparação estrutural com uma expansina conhecida como β -expansina da subfamília do grupo 1 de pólen de grama alergênico (EXPB1) demonstrou um RMSD de 0,87 Å (para 138 átomos) e uma identidade de sequência de 15%. A sobreposição das estruturas pode ser vista na Figura 37.

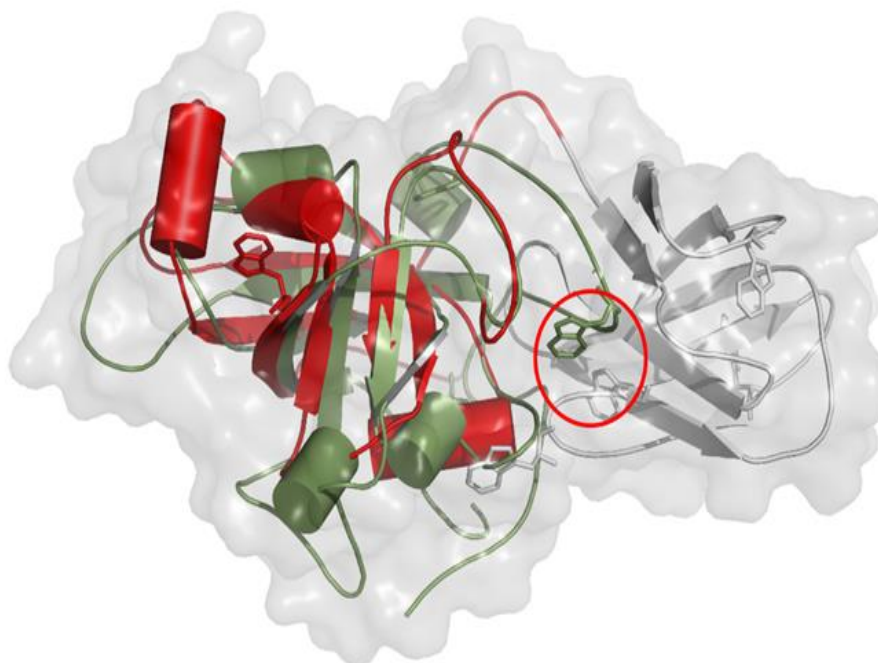


Figura 37 - Sobreposição da estrutura da PcCel45A (em verde oliva) com o domínio 1 da expansina EXPB1 (vermelho), com ênfase para os triptofanos. Circulado em vermelho encontra-se o Trp161 de PcCel45A sobreposto com o domínio 2 das expansinas.

Como vemos na figura 37, a estrutura do domínio 1 da EXPB1 possui três hélices, uma menos que a estrutura da PcCel45A. Entretanto, elas são maiores do que as quatro hélices da enzima. Duas delas ($\alpha 1$ e $\alpha 3$) estão na mesma posição. A folha $\beta 3$ da PcCel45A é maior do que a $\beta 3$ de EXPB1. Duas, das três pontes dissulfeto encontradas em EXPB1 são conservadas em PcCel45A. A ponte entre as Cys42 e Cys70 em EXPB1 se sobrepõe com a ponte Cys33 e Cys61 em PcCel45A. Ambas estão situadas na folha $\beta 4$ (EXPB1) e folha $\beta 4'$ (PcCel45A). A outra ponte disulfeto, que está localizada exatamente na mesma posição em ambas enzimas ocorre entre a Cys73 e Cys140 (EXPB1) e Cys64 e Cys149 (PcCel45A). Embora as duas pontes estejam na mesma posição e orientação em relação ao resto da estrutura, essa ponte liga a hélice $\alpha 4$ à folha $\beta 3$ em PcCel45A, enquanto que em EXPB1 une as fitas $\beta 3$ e $\beta 6$. Todas as fitas se sobrepõem e a hélice $\alpha 1$ e $\alpha 3$ de PcCel45A pareia com a hélice $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da EXPB1, embora em PcCel45A elas sejam menores.

O motivo bem conservado que é conhecido como HFD (histidina, fenilalanina e ácido aspártico) é parte do sítio ativo conservado das GH45¹⁸ e também se encontra em PcCel45A. Corresponde aos resíduos 119-121 e se encontra na fita $\beta 5$ que contém o aspartato catalítico Asp121. Em EXPB1 se encontra nos resíduos 105-107 e também estão na fita $\beta 5$.

O aspartato catalítico das GH45 da subfamília A, Asp10 também não se encontra em EXPB1. Entretanto, EXPB1 possui um aspartato (Asp95) na mesma posição em que PcCel45A possui o Asp92 e já foi proposto que este resíduo poderia ter alguma função na atividade da proteína.¹¹⁰

Já foi descrito que o domínio 2 das expansinas tem características similares ao CBM tipo A.¹¹¹ Ainda não é sabido com certeza o correto funcionamento deste CBM, mas evidências sugerem que ele se liga a superfície hidrofóbica da celulose cristalina com uma faixa de resíduos aromáticos corretamente posicionados para ligar o anel piranosídico do substrato. Esses resíduos formam uma superfície planar no domínio 2 das expansinas e sua importância já foi provada.¹¹¹ Como a PcCel45A não possui um domínio de ligação ao substrato, o Trp161 que se localiza exatamente na posição do domínio de CBM nas expansinas, poderia estar relacionado com o reconhecimento do substrato (Figura 37).

6.6 Comparação estrutural de PcCel45A e transglicosilase lítica

Utilizando a ferramenta computacional SPASM¹¹² para buscar no PDB estruturas que tivessem a tríade Asp-Tyr-Asp (relativo ao Asp92, Tyr25 e Asp121 da PcCel45A) encontramos

um motivo estrutural muito similar em uma transglicosilase lítica (LT) de *E. coli* (EcMltA, PDB 2AE0) e de *Neisseria gonorrhoeae* (NgMltA, PDB 2G5D).

A sobreposição da estrutura de PcCel45A com o domínio 1 das LTs da família GH102 revelou similaridades significantes. As estruturas se sobrepõem com RMSD de 0,6 Å e 0,76 Å para carbonos α , respectivamente. Nos dois casos o aspecto geral do duplo- Ψ - β -barril é o mesmo.^{46; 113} Além disso, a sobreposição da celobiose do complexo PcCel45A-celobiose é muito similar aquela observada para a citohexaose em complexo com EcMltA⁴⁶. A figura 38 ilustra as similaridades de empacotamento e posicionamento de resíduos do sítio ativo.

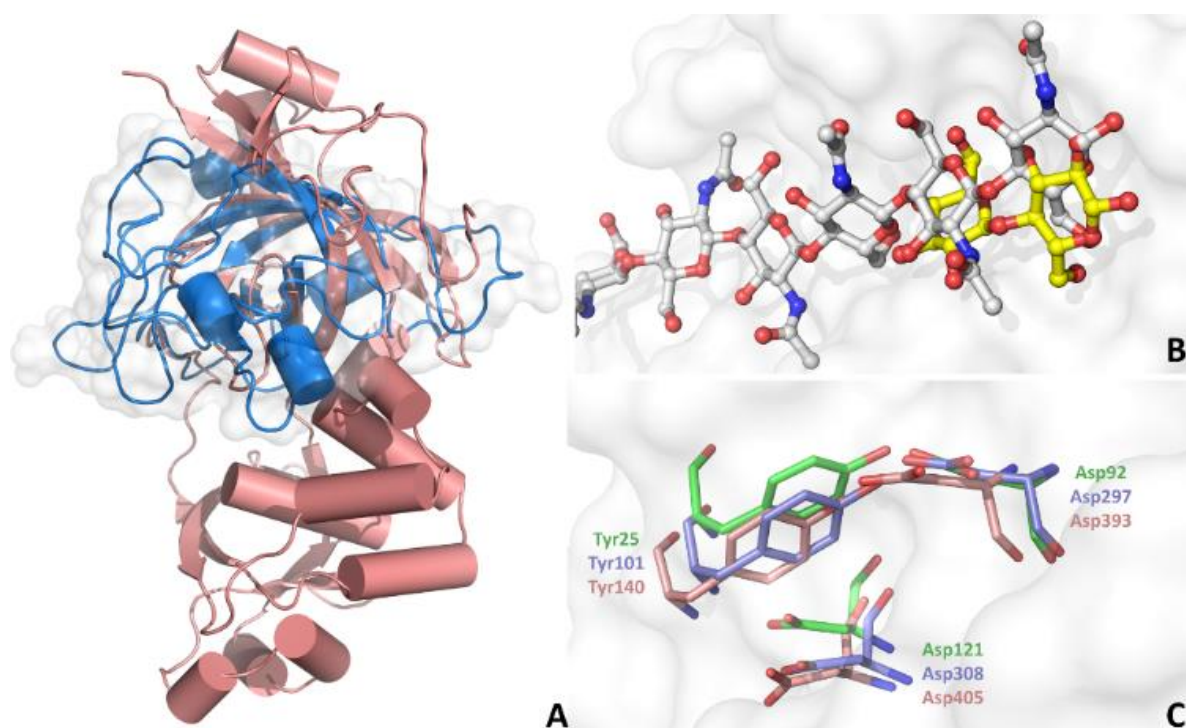


Figura 38 - Comparação entre PcCel45A e transglicosilase lítica. A) Sobreposição da PcCel45A (azul) com o domínio 1 da transglicosilase lítica EcMltA (rosa). B) Comparação entre a posição da celobiose (amarelo) e a citohexaose (cinza) de EcMltA demonstra uma posição similar no sítio ativo. C) A tríade catalítica Asp-Tyr-Asp da PcCel45A (verde) sobreposta com os resíduos de EcMltA (rosa) e NgMltA (violeta) demonstra que o posicionamento desses resíduos são conservados nessa enzima pertencente a subfamília C das GH45.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado, a estrutura da PcCel45A apresenta mais similaridades com outras classes de proteínas (como β -expansinas e LTs) do que com as próprias enzimas da família.

O Asp121 está inserido em um ambiente hidrofóbico e seu grupo carboxílico faz ligação de hidrogênio com o quarto átomo de oxigênio do açúcar da celobiose que se encontra

no subsítio +1. Esse fato, juntamente com o que foi observado para a enzima Hi_EGV,⁵⁶ indica que este resíduo participe da reação de clivagem.

Analisando a estrutura da PcCel45A observamos que apesar do Asp121 ser conservado, não há um outro resíduo ácido na posição da base (Asp10 em Hi_EGV) o que nos faz questionar o mecanismo de ação da enzima. Uma análise mais aprofundada do sítio ativo revelou que a enzima possui um outro aspártico, o Asp92 na mesma distância em que o Asp10 se encontra do Asp121 em Hi_EGV. Entretanto esse resíduo está posicionado linearmente ao Asp121, o que dificultaria a clivagem do substrato por inversão do carbono anomérico.

Apesar disso, o resíduo Asp92 é conservado em outras proteínas como no caso das β -expansinas e LTs. Outro resíduo que é conservado nas GH45 canônicas e LTs e também se encontra na PcCel45A é a Tyr25 que interage diretamente com o Asp92 formando uma ponte entre os Asp121 e Asp92.

Outra característica interessante é que PcCel45A possui um longo *loop* (*loop* 9) que se sobrepõe ao domínio 2 das expansinas. Na extremidade desse *loop* e na fenda do sítio ativo encontra-se o Trp161, que pode estar envolvido com a ligação ao substrato, já que o domínio 2 das expansinas também possui muitos resíduos aromáticos envolvidos com a ligação do substrato e PcCel45A não possui nenhum módulo de ligação ao substrato anexado a ela.

Todo esse estudo sobre o sítio ativo da enzima nos levou a definir que mutações sítio-dirigidas em resíduos específicos poderiam explicar o funcionamento da enzima. Sendo assim, realizamos mutações nos resíduos Asp92, Asp121, Trp161 e Tyr25. Todos eles foram mutados para uma alanina.

Capítulo 7

Resultados e discussão

- Produção dos mutantes e análise do produto da reação



“Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio, e eis que a verdade se me revela.”

Albert Einstein

7 Resultados e Discussão

7.1 Produção do DNA dos mutantes e transformação em *A. nidulans*

Com o plasmídeo circularizado e transformado em bactéria, produzimos DNA suficiente das quatro enzimas mutantes para posterior transformação em *A. nidulans*. Cada transformação produz em média 20 colônias e não é sempre que o DNA é incorporado ao DNA do fungo, capaz de produzir a enzima.

Nessa primeira transformação encontramos a colônia super-expressora para a enzima W161A. Conferimos por meio de gel SDS 15% a expressão da proteína, como observado na figura 39.

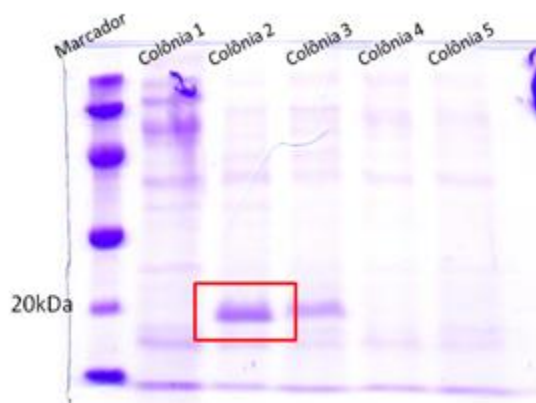


Figura 39 - Teste de expressão da proteína W161A. Vemos que a colônia super-expressora é a colônia 2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela figura 39 observamos que houve a expressão da proteína na colônia 2 e na colônia 3. Entretanto, como todas as amostras foram concentradas na mesma proporção, notamos pelo gel que a colônia 2 expressa mais proteína do que a 3. Sendo assim, essa foi escolhida para o prosseguimento do trabalho.

Para as enzimas Y25A e D121A foi necessária a realização de mais duas transformações, para que conseguíssemos encontrar uma colônia que expressasse a proteína em grande quantidade.

Para a enzima D92A foram ao todo seis tentativas. Na figura 40 vemos o teste de expressão realizado para essa enzima.

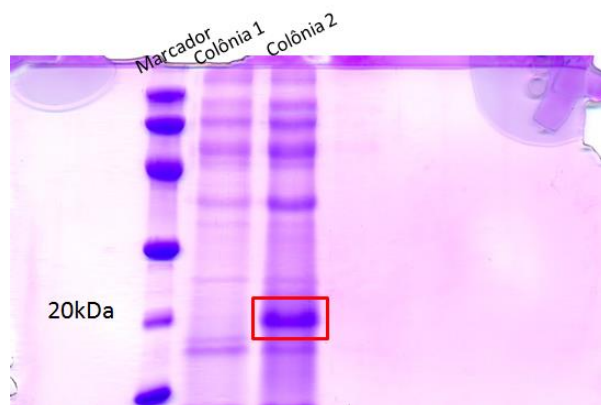


Figura 40 - Teste de expressão da proteína D92A. Vemos que a colônia super-expressora é a colônia 2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela figura 40 vemos que a proteína D92A está presente na colônia 2. Entretanto, quando comparamos a figura 39 e a figura 40 vemos claramente que apesar de estar sendo expressa, a proteína D92A possui muito mais contaminantes do que a W161A. Devido a essa diferença não conseguimos concluir a purificação desta enzima em apenas um único passo.

7.2 Purificação

Todas as enzimas passaram pela concentração em cartucho *Hollow-fiber* e tiveram seu pH aumentado para 8,5 para facilitar os passos subsequentes da purificação. O extrato concentrado foi então aplicado a coluna *Q-sepharose* em sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare®). Após o término da corrida, as frações eluídas foram aplicadas em gel SDS-PAGE e com a observação do mesmo pudemos comprovar a pureza das enzimas produzidas. As proteínas W161A e Y25A, a partir dessas frações eluídas, foram utilizadas para testes de atividade. A proteína D121A também foi utilizada para os testes de atividade e por termos maiores quantidade desta enzima foi possível tentar cristalizá-la utilizando os conjuntos comerciais que apresentavam condições parecidas com as quais a enzima nativa foi cristalizada, entretanto não obtivemos sucesso.

A enzima D92A necessitou de mais um passo cromatográfico para completa purificação da mesma. Para isso foi utilizada a cromatografia por exclusão molecular (gel filtração). Na figura 41 observamos o gel SDS referente a enzima D92A, após a etapa de gel

filtração. Esse gel foi corado com nitrato de prata, pois obtivemos uma quantidade menor do que das outras enzimas anteriormente purificadas.

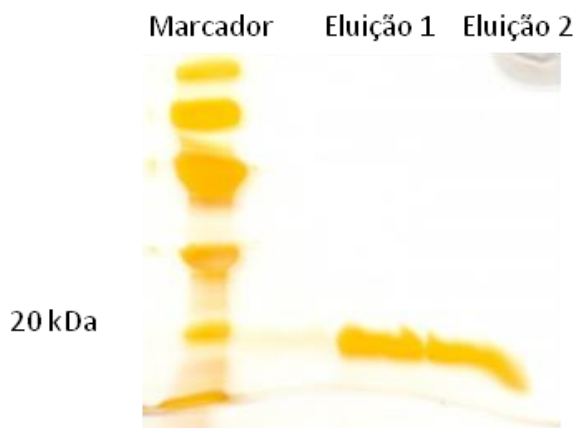


Figura 41 - Gel SDS 15% referente a purificação da enzima D92A após a cromatografia de exclusão molecular corado com nitrato de prata.

Fonte: Elaborada pela autora.

7.3 Teste de atividade dos mutantes

O teste de atividade dos mutantes foi feito, inicialmente, utilizando o substrato liquenano, pois é nesse substrato que a enzima nativa apresentou a maior atividade. Utilizamos a temperatura de 50 °C, mesmo a temperatura ótima da enzima nativa sendo 70 °C. Isso porque ao monitorar a atividade da enzima nativa e mutantes na temperatura de 70 °C percebemos que a enzima atingia um pico a 5 minutos e logo sua atividade específica diminuía progressivamente. Além disso, as mutações poderiam ter desestabilizado a estrutura da enzima, o que tornaria os mutantes menos estáveis a altas temperaturas.

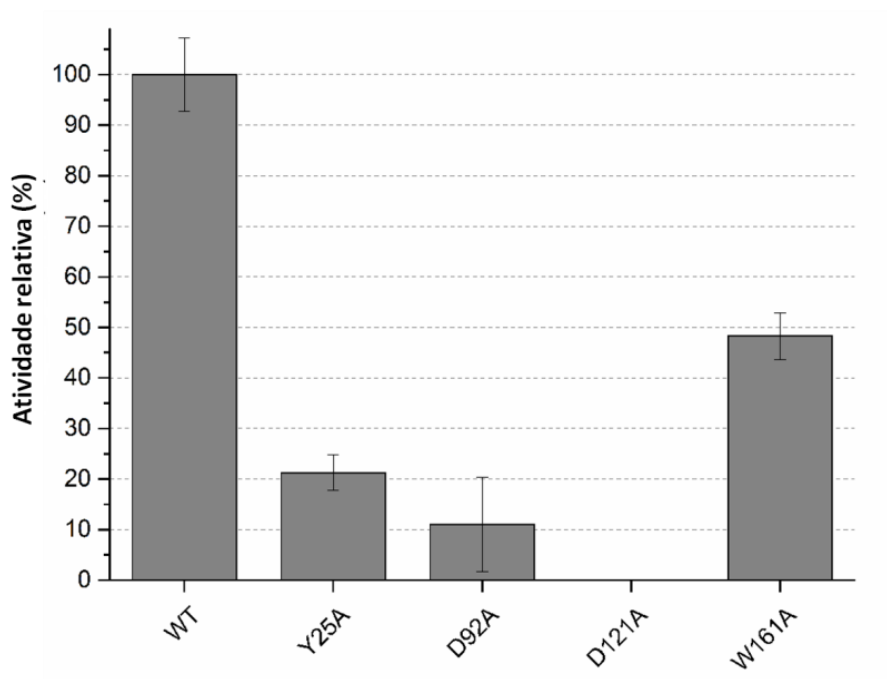


Figura 42 - Atividade relativa da enzima nativa (WT) e mutantes. Os resultados estão apresentados em termos de atividade relativa. As enzimas foram testadas a 50 °C por 15 minutos utilizando liquenano como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados da atividade da Figura 42 sugeriram que as mutações comprometeram significativamente a atividade da enzima nativa. O mutante D121A, como era de se esperar, não apresentou atividade, confirmando a hipótese de que este resíduo possui uma função essencial para a atividade enzimática da PcCel45A.

Para o mutante W161A, a enzima perdeu 50% da atividade, o que demonstra que esse resíduo possui importância para a atividade da enzima, entretanto a enzima ainda é capaz de continuar ativa, mesmo em sua ausência. Isso sugere que este resíduo apresenta alguma função relacionada a interação com o substrato, como hipotetizamos inicialmente.

A mutação na Tyr25 (Y25A) também afetou a atividade da enzima de uma forma mais severa se comparada ao W161A, pois restou apenas 20% da atividade enzimática.

Em relação ao mutante D92A percebemos que houve uma grande perda da atividade (aproximadamente 90% em relação a enzima nativa), entretanto, ainda foi possível detectar açúcares redutores.

Para confirmação dos resultados, utilizamos a cromatografia HPAE-PAD.

7.4 Análise dos produtos por HPAE-PAD

Com a intenção de confirmar os efeitos das mutações sobre a atividade da enzima, utilizamos essa técnica para analisar os produtos das reações. O resultado pode ser observado na Figura 43.

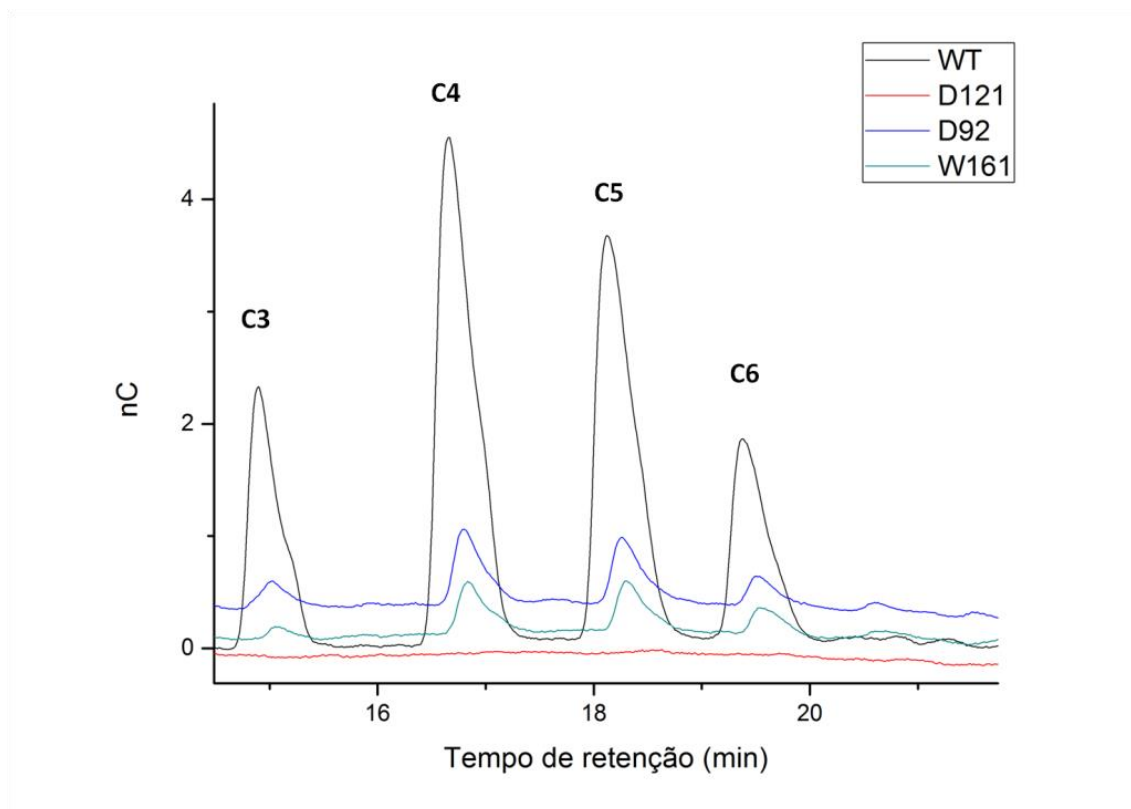


Figura 43 - Produção de celooligosacarídeos por PcCel45A, monitorada por HPLC após 24 horas de incubação com PASC. Os produtos da reação de hidrólise da enzima nativa (WT) estão representados em linha preta e dos mutantes D121A em vermelho, D92A em azul e W161A em verde. Na legenda em cima dos picos está representado o grau de polimerização dos celooligosacarídeos (C3, C4, C5 e C6).

Fonte: Elaborada pela autora.

Confirmando os resultados obtidos para a enzima nativa utilizando TLC, a enzima apresentou como produto de reação a celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose, ao utilizarmos PASC como substrato.

Conseguimos observar também que, em relação aos mutantes, os resultados confirmaram os dados obtidos pela atividade. Os mutantes D92A e W161A apresentaram menor atividade em relação a enzima nativa, enquanto que o mutante D121A perdeu completamente a atividade.

Esse resultado juntamente com a estrutura da enzima nos permite entender melhor seu sítio ativo e funcionamento. Como não observamos celobiose como produto isso sugere que os subsítios da enzima precisam ser sempre preenchidos com moléculas maiores do que dois açúcares. Aparentemente os substratos preferidos devem possuir entre 7 e 9 açúcares, visto que há maior liberação de C4/C5, C4/C4 e C4/C3, respectivamente.

Comparando com a enzima Hi_EGV, nota-se também que esta tem os sítios -4, -3, -2, +1, +2 e +3 ocupados, sugerindo novamente que a ocupação dos sítio -4 a -1 é ideal e existe a necessidade de se ter mais que 2 unidades no sítio positivo. A diferença entre elas está no fato de que a PcCel45A parece preferir substratos maiores, uma vez que foi possível para Hi_EGV utilizar celohexaose como substrato, enquanto que a PcCel45A não conseguiu clivar o mesmo açúcar.⁵⁶

A explicação para isso pode ser demonstrada ao analisarmos as estruturas. Enquanto PcCel45A possui uma fenda mais alongada (em formato de âncora), que facilmente acomodaria um substrato com até C5 nos subsítios positivos, Hi_EGV é mais globular e não possui uma fenda longa o suficiente para acomodar mais do que 3 moléculas de açúcar no subsítio positivo. Isso explicaria porque a alta especificidade por C6 (C3/C3) ou C7 (C4/C3) e baixa atividade sobre substratos mais longos, uma vez que os sítios positivos (>C3) e negativos (>C4) não interagem com a enzima. A Figura 44 demonstra essas diferenças de acordo com uma modelagem dos substratos no sítio ativo da enzima realizada com o programa Pymol.¹¹⁴

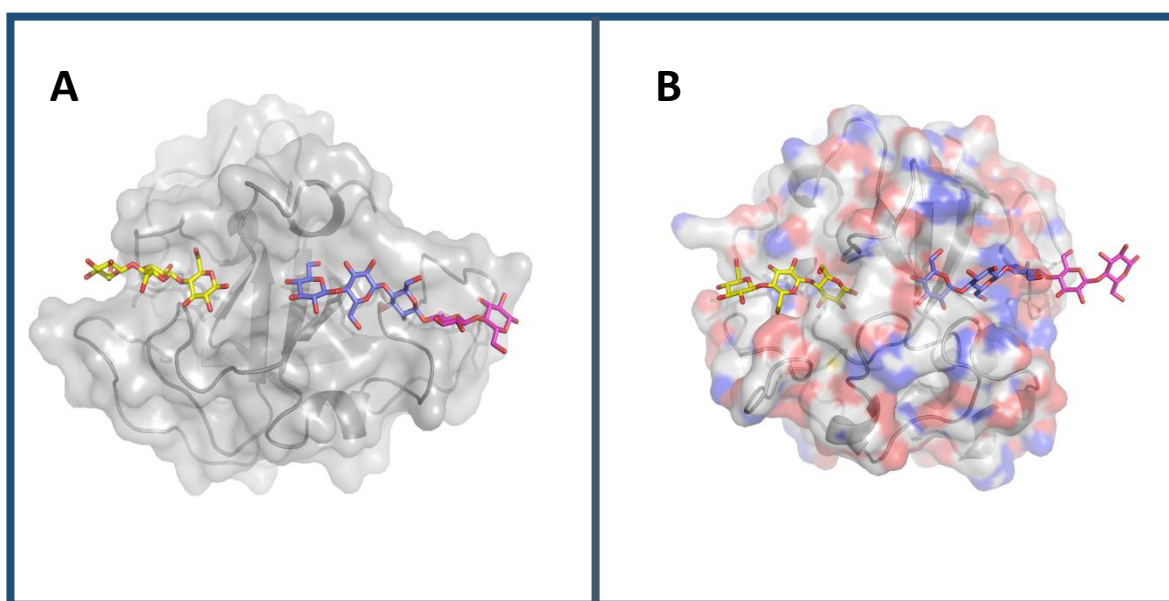


Figura 44 - Comparação entre a fenda do sítio ativo da PcCel45A e Hi_EGV. A) Estrutura da PcCel45A com os subsítios -4, -3 e -2 preenchidos com a “celotriose” da estrutura de Hi_EGV e subsítios +1, +2 e +3

preenchidos com uma sobreposição de um polímero mais longo sobre a celobiose do complexo PcCel45A-celobiose (em azul). O modelo foi alongado para mostrar que os açúcares +4 e +5 (magenta) seriam facilmente acomodados no sítio positivo. B) Estrutura da Hi_EGV com os mesmos açúcares mostrados em A.

Fonte: Elaborada pela autora.

Capítulo 8

Resultados e discussão

- Resultados recentes



“Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão.”

Max Planck

8 Resultados recentes

Recentemente outro grupo de pesquisa publicou a estrutura da PcCel45A (PcCel45App) e utilizou cristalografia de nêutrons para visualizar o mecanismo de funcionamento dessa enzima, já que essa técnica permite a visualização dos átomos de hidrogênio.¹¹⁵

Foi observado que no sítio ativo da PcCel45A, em posicionamento similar ao resíduo acceptor de próton em Hi_EGV (Asp10) havia uma asparagina (Asn99 da PcCel45A), que foi proposta por esse grupo a agir como acceptor de próton na reação de inversão, como pode ser observado na figura 45.

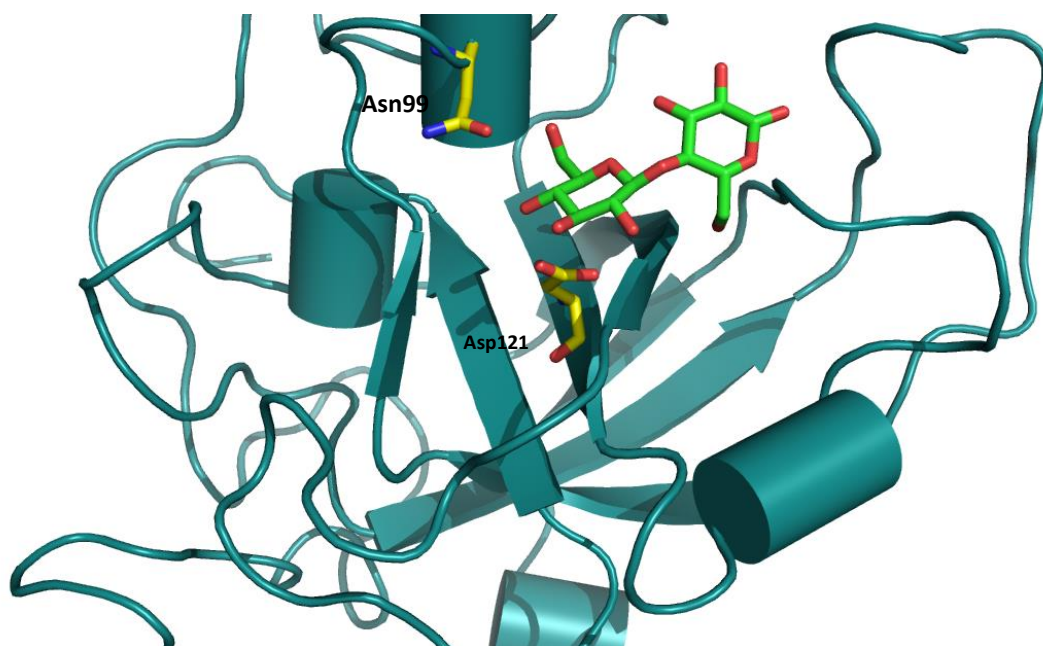


Figura 45 – Sítio ativo da PcCel45A demonstrando a posição da asparagina (Asn99) comparada com o resíduo catalítico Asp121.

Fonte: Elaborada pela autora.

O aminoácido asparagina possui um grupo carboxiamida como cadeia lateral, por isso é considerado como amida do ácido aspártico. É um aminoácido neutro, polar e sem carga em qualquer pH biologicamente relevante,¹¹⁶ por isso inicialmente não consideramos que tivesse a possibilidade de fazer parte da reação de catálise.

Utilizando as técnicas de cristalografia de raios X e cristalografia de nêutrons, foi possível observar que a cadeia lateral do resíduo de asparagina, assume uma forma ácida imídica ($\text{HO-CX}=\text{NH}$) e não a típica forma amida ($\text{O}=\text{CX-NH}_2$) na estrutura. O valor estimado do pK_a para a protonação/deprotonação do nitrogênio da forma imídica é estimado em 4,5 a 7,5, enquanto que para o oxigênio é por volta de 0. Essa informação suporta a ideia de que o nitrogênio da asparagina pode ser a base catalítica de PcCel45A, embora não explique claramente como o átomo de oxigênio da asparagina seja protonado.

A análise do mapa por cristalografia de nêutrons, permitiu observar que os átomos de nitrogênio da vizinhança da amida da Cys96 e os átomos de oxigênio da cadeia lateral e principal da Asn99 se conectavam. A transferência intramolecular de prótons nas ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e amida de pequenas moléculas frequentemente ocorre se as posições do nitrogênio e oxigênio são adequadas. Essa possibilidade dá suporte para a ideia

de que a transferência do próton do grupo amida da Cys96 à carbonila do grupo lateral da Asn99 pode ocorrer e isso seria consistente com a estabilização da forma ácida-imídica da Asn99 por múltiplas tautomerizações na superfície da enzima.

Esses resultados só foram possíveis devido a cristalografia de nêutrons, pois ao comparar com os dados da cristalografia de raios X, mesmo obtendo uma resolução de 0,65 Å não foi possível a observação dos hidrogênios na molécula da proteína.¹¹⁵

Capítulo 9

Conclusão e perspectivas



*“ E disse a flor para o pequeno príncipe:
É preciso que eu suporte uma ou três larvas para conhecer
as borboletas.”*

Antoine Saint-Exupéry

9 Conclusões e perspectivas

Este trabalho surgiu da necessidade de se obter mais informações a respeito da família 45 de hidrolases de glicosídeos. Para isso nossos esforços foram focados na enzima endoglucanase V de *Phanerochaete chrysosporium* (PcCel45A), que apesar de ter sido caracterizada bioquimicamente por outro grupo, havia algumas informações incompletas e seu modelo estrutural não estava disponível. Essa enzima foi escolhida por pertencer à subfamília C, subfamília esta sem informações estruturais disponíveis.

Para isso, nossos objetivos incluíram a caracterização bioquímica da enzima PcCel45A, bem como a sua elucidação estrutural. Para produção da enzima, utilizamos o sistema LIC para clonagem, assim como a expressão heteróloga em fungo filamentosso (*Aspergillus nidulans*).

A análise do perfil bioquímico da enzima confirmou sua característica acidófila (pH ótimo 4) e uma alta temperatura ótima (70 °C). Quanto a preferência por substratos, a PcCel45A apresentou a maior atividade para o substrato liquenano, seguida por papel de filtro, β -glucano, galactomanano e CMC. Não foi possível detectar a produção de celooligossacarídeos quando o substrato contém ligações β 1,3, entretanto, ao utilizarmos o PASC como substrato, conseguimos detectar a produção de celooligossacarídeos com grau de polimerização 3, 4 e 5 ao analisarmos os produtos por TLC. Para uma detecção mais sensível dos produtos da reação de hidrólise, utilizamos a técnica de HPAE-PAD, na qual foi possível detectar os celooligossacarídeos com 3, 4, 5 e 6 açúcares, sendo os maiores picos relativos a açúcares com 4 e 5 unidades.

Examinando sítio ativo de PcCel45A, é possível observar que a preferência por substratos maiores pode ser devido a longa fenda e ao formato de âncora do sítio ativo desta enzima. Modelos gerados pelo Pymol demonstraram que o sítio dessa enzima é capaz de acomodar substratos maiores (com até 10 açúcares) do que o de outras enzimas da família. Essa observação pode explicar a razão de não encontrarmos celooligossacarídeos pequenos quando utilizamos substratos com ligações β 1,3.

A determinação da estrutura revelou características muito interessantes e singulares da enzima estudada. Sua característica principal é um enovelamento do tipo duplo- Ψ - β -barril, que é conservado em outras enzimas. Apesar dessa similaridade, a forma global da PcCel45A é muito diferente das outras GH45. A enzima PcCel45A possui uma fenda mais alongada, que parece acomodar melhor o substrato no sítio ativo, por meio de resíduos aromáticos, enquanto que as outras enzimas possuem uma fenda menor e utilizam *loops* que envolvem o substrato.

Outro fato interessante é que a PcCel45A é mais parecida com membros que pertencem a classes de proteínas como β -expansinas e LTs do que com as próprias enzimas da família 45 de GHs. Podemos observar isso, ao realizar a sobreposição entre as estruturas, observando os valores de RMSD obtidos.

Ainda com relação ao modelo estrutural obtido da PcCel45A, foi observada a ausência do resíduo Asp10, sendo este, o acceptor do hidrogênio da molécula de água, que permite a clivagem do substrato pela reação de inversão, que é usual para as outras GH45.

A PcCel45A demonstrou ter um outro aspartato, Asp92 a mesma distância do Asp121 (8 Å). Esse resíduo é conservado em outras classes de proteínas como β -expansinas e LTs. Entretanto, esse resíduo se encontra no sítio ativo, posicionado linearmente ao resíduo Asp121, o que dificultaria a clivagem do substrato.

Ainda observando o sítio ativo da PcCel45A, notamos que existe uma Tyr25 que é conservada em outras GH45 e nas classes similares. Essa Tyr25 está em contato direto com o Asp92 e próxima do Asp121, o que nos levou a supor que poderia ter alguma função na atividade da enzima.

Outro resíduo interessante é o Trp161 que está posicionado no *loop* 9 da enzima, na região que forma a extremidade da superfície, posição na qual, quando sobrepomos PcCel45A e β -expansinas, se encontra o domínio 2 desta última. É especulado que este domínio funcione como um CBM tipo A, que liga o substrato por meio de resíduos aromáticos.

Todas essas observações sobre o sítio ativo da enzima nos levaram a realizar mutações sítio-dirigidas nesses resíduos. Sendo assim, produzimos os mutantes D121A, D92A, Y25A e W161A.

Os testes de atividade demonstraram que o mutante W161A perdeu 50% da atividade. O Y25A perdeu 80%, enquanto que o mutante D92A perdeu em média 90% da atividade. Como esperado o mutante D121A perdeu toda a atividade, confirmando sua importância catalítica.

Para confirmar esses resultados realizamos a análise do produto da reação para cada enzima. Novamente os resultados para D121A confirmaram o aniquilamento da atividade desse mutante, enquanto o W161A e D92A perderam a atividade em proporção similar. Não obtivemos Y25A suficiente para esse teste. Esses resultados mostraram que, de fato, esses resíduos apresentam uma importância funcional na atividade da enzima.

Recentemente, um estudo publicado sobre a mesma enzima, considerou que a base catalítica seria uma asparagina, Asn99 na estrutura da PcCel45A, que em seu estado imídico seria capaz de ser o acceptor da reação de catálise. Essa observação só foi possível devido à cristalografia de nêutrons, que é capaz de visualizar os hidrogênios da estrutura.

Consideramos que este trabalho veio demonstrar que apesar de muito ter sido estudado sobre as hidrolases de glicosídeos, existem ainda algumas lacunas que precisam ser preenchidas. A família 45 é um exemplo disso, devido as poucas informações disponíveis. Este trabalho veio contribuir para ampliar nosso conhecimento a respeito dessa família, demonstrando por meio do modelo estrutural, as similaridades dessa família com as β -expansinas e LTs, o que antes só havia sido discutido por análise da sequência dos aminoácidos.

As perspectivas deste trabalho é buscar a elucidação estrutural de mais enzimas da família GH45, focando nas subfamílias B e C, que ainda necessitam de informações estruturais. Por meio do estudo bioquímico e análise do modelo estrutural, poderia-se confirmar se mais enzimas apresentam esse mecanismo de ação atípico.

REFERÊNCIAS

1 HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 358-64, Aug. 1999.

2 LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

3 SADDLER J., L. A.; KADOLPH S. **Textiles**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2001. 427p.

4 RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**,

Aug. 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106> > Acesso em: out. 2015.

5 CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2015.

6 STANGHERLIN, S. **Vantagens e desvantagens das hidrólises enzimáticas e químicas na produção de bioetanol a partir do bagaço da cana de açúcar**. Disponível em: < <http://pesquisa.unifacs.br/wp-content/uploads/2015/04/F%C3%A1bio-Cirqueira-da-Silva.pdf>>. Acesso em: out. 2015.

7 YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**. v. 02, n. 4, p. 421-449, 2014

8 WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, p. 189-226, Nov. 1999. doi: 10.1146/annurev.energy.24.1.189.

9 ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, Dec. 2004.

10 CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v.37, p. D233-8, Jan. 2009. doi: 10.1093/nar/gkt1178.

11 HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. 3, p. 781-788, Aug. 1993.

12 IGARASHI, K. et al. Characterization of endoglucanase belonging to new subfamily of glycoside hydrolase family 45 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, Aug. 2008. doi: 10.1128/AEM.00812-08.

13 GAO, D. et al. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 70-7, Mar. 2010.

14 SZABÓ, I. J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed-batch cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 221-230, July 1996.

15 KHALIL, A. I. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 753-759, Nov. 2002.

16 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2010. 782 p.

17 DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Evans review: plant cell walls: the skeleton of the plant world. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 5, p. 357-381. Apr. 2010.

18 COSGROVE, D. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, p. 321 - 326, 2000. doi:10.1038/35030000

19 SZYMANSKI, D. B.; COSGROVE, D. J. Dynamic coordination of cytoskeletal and cell wall systems during plant cell morphogenesis. **Current Biology**, v. 19, n. 17, p. 800-811, Sept. 2009.

20 CARPITA, N. C. et al. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. **Plant Physiology**, v. 127, n. 2, p. 551-565, Jan. 2001.

21 RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, Aug. 2008.

22 VORAGEN, A. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, Apr. 2009.

23 MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-77, June 2008.

24 WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, Mar. 2006.

25 SYED, K.; YADAV, J. S. P450 monooxygenases (P450_{ome}) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 339-63, Nov. 2012.

26 WHITING, P.; GORING, D. A. I. Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids. **Wood Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 261-267, Dec. 1982

27 ROBYT, J. F. **Essentials of carbohydrate chemistry**. New York: Springer Verlag, 1998. 399 p.

28 DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Lignin primary structures and dirigent sites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 407-15, Aug. 2005.

29 EMSLEY, A. M.; STEVENS, G. C. Kinetics and mechanisms of the low-temperature degradation of cellulose. **Cellulose**, v. 1, n. 1, p. 26-56, Mar. 1994.

30 PAWCENIS, D. et al. Towards determination of absolute molar mass of cellulose polymer by size exclusion chromatography with multiple angle laser light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1409, p.53-59, June, 2015. doi:10.1016/j.chroma.2015.06.042

31 BACIC, E. A. **The biochemistry of plants: structure and function of plant cell wall**. San Diego: Academic Pres Inc., 1988. 529p.

- 32 RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1271-4, Aug. 1992.
- 33 LIPCHINSKY, A. How do expansins control plant growth? a model for cell wall loosening via defect migration in cellulose microfibrils. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 12, p. 3277-3284, Dec. 2013.
- 34 COSGROVE, D. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. **Planta**, v. 177, n.1, p. 121 - 130, 1989.
- 35 MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D.; COSGROVE, D. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, v. 4, n.11, p. 1425 - 1433, 1992.
- 36 CHO, H.T.; COSGROVE, D. J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, v. 97, n. 17, p. 9783-9788, Aug. 2000.
- 37 WU, Y. et al. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. **Plant Physiology**, v. 126, n. 4, p. 1471-9, Aug. 2001.
- 38 NAUMOFF, D. G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. **Biochemistry**, v. 76, n. 6, p. 622-35, June 2011.
- 39 LOMBARD, V. et al. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D490-5, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1178
- 40 B HENRISSAT, M. C.; TOMME, L.P.; LEMESLE, J.; MORNON, P.. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. **Gene**, v. 81, n. 1, p. 83-95, 1989.
- 41 HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, p. 309-16, Dec. 1991.
- 42 DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, Sept. 1995.
- 43 MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-892, 1994.
- 44 WITHERS, S. G.; AEBERSOLD, R. Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 361-72, Mar. 1995.
- 45 JUERS, D. H.; HUBER, R. E.; MATTHEWS, B. W. Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between beta-galactosidase and other glycohydrolases. **Protein Science**, v. 8, n. 1, p. 122-36, Jan. 1999.
- 46 VAN STRAATEN, K. E. et al. Structure of *Escherichia coli* Lytic transglycosylase MltA with bound chitohexaose: implications for peptidoglycan binding and cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21197-205, 2007.

- 47 FELIX, C. R.; LJUNGDMAL, L. G. The cellulosome: the exocellular organelle of clostridium. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 791-819, 1993.
doi: 10.1146/annurev.mi.47.100193.004043
- 48 HARREITHER, W. et al. Cellobiose Dehydrogenase from the Ligninolytic Basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2750-2757, May 2009.
- 49 KIRK, K.; CULLEN, D. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**: enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. New York: John Wiley and Sons, 1998. 577p.
- 50 MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. **Briefings Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 471-81, Nov. 2014.
- 51 BHATTACHARYA, A. S.; BHATTACHARYA, A.; PLETSCHE, B. I. Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bioethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 6, p. 1117-29, June 2015.
- 52 RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry**, v. 67, n. 8, p. 850-871, Aug. 2002.
- 53 YENNAMALLI, R. M. et al. Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 136, Sept. 2013.
- 54 SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588-613, Dec. 2014.
- 55 VLASENKO, E. et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2405-11, Apr. 2010.
- 56 DAVIES, G. et al. Structures of oligosaccharide-bound forms of the endoglucanase V from *Humicola insolens* at 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 34, n. 49, p. 16210 - 16220, 1995.
- 57 DAVIES, G. J. et al. Mapping the conformational itinerary of beta-glycosidases by X-ray crystallography. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 3, p. 523-527, June 2003.
- 58 COUTURIER, M. et al. A thermostable GH45 endoglucanase from yeast: impact of its atypical multimodularity on activity. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 103, 2011.
- 59 PARAMESWARAN, B.; RAVEENDRAN, S.; ASHOK, P. Provided for hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Biofuels**, 2011. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/227414108_Provided_for_Hydrolysis_of_Lignocellulosic_Biomass_for_Bioethanol_Production>. Acesso em: 02 nov. 2015.
- 60 HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, July 2012.

- 61 FUSHINOBU, S. Metalloproteins: a new face for biomass breakdown. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 88-89, Dec. 2013.
- 62 DAVIES, G. J.; WILSON, K. S.; HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 321, n. 2, p. 557-9, Jan. 1997.
- 63 DAVIES, G. J. et al. Structure determination and refinement of the *Humicola insolens* endoglucanase V at 1.5 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v.52, n.1, p.7-17, 1996.
- 64 PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, Jan. 2015.
- 65 CASTILLO, R. M. et al. A six-stranded double-psi β barrel is shared by several protein superfamilies. **Structure**, v. 7, n. 2, p. 227-236, Feb. 1999.
- 66 SCHOU, C. et al. Stereochemistry, specificity and kinetics of the hydrolysis of reduced cellodextrins by nine cellulases. **European Journal Biochemistry**, v. 217, n. 3, p. 947 - 953, Nov. 1993.
- 67 HIRVONEN, M.; PAPAGEORGIOU, A. C. Crystal structure of a family 45 endoglucanase from *melanocarpus albomyces*: mechanistic implications based on the free and cellobiose-bound forms. **Journal of Molecular Biology**, v. 329, n. 3, p. 403-410, June 2003.
- 67 GUERRIERO, G. et al. Deconstructing plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. **Plant Science**, v. 234, p. 180-193, May 2015.
doi:10.1016/j.plantsci.2015.02.010.
- 69 MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695-700, June 2004.
- 70 ASGHER, M. et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, n. 6, p. 771-83, Nov. 2008.
- 71 ZACCHI, L. et al. Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 185-192, Oct. 2000.
- 72 ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S. K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1493-1504, Feb. 2012.
- 73 KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- 74 KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. 2nd ed. New Jersey: Wiley, 2011. 376p.

75 BALDRIAN, P.; VALÁŠKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 501-21, May 2008.

76 LIN, W. L. et al. Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylase production in recombinant *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 41, n. 2, p. 273-9, Jan. 1993.

77 MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 469-76, Mar. 2011.

78 PETERSEN, N. T.; BRUNAK, S.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.
doi:10.1038/nmeth.1701

79 EMANUELSON, O.; NIELSEN, H.; Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**. v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.

80 RACC - NIH. **Laboratory for structural genomics and proteomics**. Disponível em: <<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>> Acesso em: maio de 2012.

81 NETNGLYC. **Center for biological sequence analysis**. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>> Acesso em: maio de 2012

82 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Reviews**, v. 18, n. 20, p. 6069-74, Oct. 1990.

83 SEGATO, F.; GONÇALVES, A.T.; LUCAS, C.R.; SQUINA, F.; PRADE, R. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100-6, July 2012.

84 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. U.S.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

85 RABHI, I. et al. A novel simple and rapid PCR-based site-directed mutagenesis method. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 27-34, Jan. 2004.

86 BARRATT, R.W.; JOHNSON, G.B.; OGATA, W.N. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 52, n. 1, p. 233-246, 1965.

87 GE Healthcare LifeScience. Disponível em: <<https://www.gelifesciences.com>> Acesso em: maio de 2013

88 GASTEIGER E., H. C.; GATTIKER A., DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. **The proteomics protocols handbook: protein identification and analysis tools on the expasy server**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571-607.

89 BAILEY, M. A note on the use of dinitrosalicylic acid for determining the products of enzymatic reactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 494-496, Nov. 1988.

90 THERMOSCIENTIFIC. **Thermo fisher scientific**. Disponível em: < <http://www.thermoscientific.com/en/home.html>> Acesso: out. de 2015.

91 DRENTH, J. **Principles of protein x-ray crystallography**. 3rd ed. Groningen: Springer. 2007.345p.

92 LEUNISSEN, M. **An essay on several aspects of protein crystallization research**. 2001. Disponível em: < <http://people.ds.cam.ac.uk/ml527/publications/assets/leunissen-literatureresearch.pdf> >. Acesso em: 23 out. 2015,

93 MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 254-265, Nov. 2004.

94 KRAUSS, I. R. et al. An overview of biological macromolecule crystallization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11643-11691, May 2013.

95 CSIRO. **Collaborative Crystallisation Center**. Disponível em: <www.csiro.au/C3>. Acesso em: out. 2015.

96 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 125-32, 2010.

97 BRUKER. **APEX2**. Wisconsin, USA. 2007.

98 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, July 2007.

99 SODING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 244-8, July 2005. doi: 10.1093/nar/gki408

100 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 213-221, 2010.

101 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: biology crystallography**, v. 66, n. 4, p. 486-501, 2010.

102 AFONINE, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D: biology crystallography**, v. 68, n. 4, p. 352-67, Apr. 2012.

103 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: biology crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12-21, Jan 2010.

104 SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-79, Nov. 1987.

105 WONGANU, B. et al. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 58, n. 1, p.78-86, 2008.

106 LIU, G.; WEI, X.; QIN, Y.; QU, U. Characterization of the endoglucanase and glucomannanase activities of a glycoside hydrolase family 45 protein from *Penicillium decumbens* 114-2. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 56, n. 3, p. 223-9, June 2010.

107 KOGA, J. et al. Purification and characterization of a new family 45 endoglucanase, STCE1, from *Staphylotrichum coccosporum* and its overproduction in *Humicola insolens*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 33, p. 4210-7, July 2008.

108 KARLSSON, J. et al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**. v. 99, n. 1, p. 63-78, Oct. 2002.

109 KADOWAKI, M. A. et al. Functional characterization and low-resolution structure of an endoglucanase cel45a from the filamentous fungus *neurospora crassa* or74a: thermostable enzyme with high activity toward lichenan and beta-glucan. **Molecular Biotechnology**, v. 57, n. 6, p. 574-88, June 2015.

110 YENNAWAR, N. H. et al. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 40, p. 14664-14671, 2006.

111 GEORGELIS, N.; YENNAWAR, N. H.; COSGROVE, D. J. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 37, p. 14830-14835, Aug. 2012.

112 KLEYWEGT, G. J. Recognition of spatial motifs in protein structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 4, p. 1887-97, 1999.

113 POWELL, A. J. et al. Crystal structures of the lytic transglycosylase MltA from *N.gonorrhoeae* and *E.coli*: insights into interdomain movements and substrate binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 1, p. 122-36, 2006.

114 The PyMOL Molecular Graphics System: version 1.7.4. Disponível em: <<https://www.pymol.org/citing>>. Acesso em: out. 2015.

115 NAKAMURA, A. et al. “Newton’s cradle” proton relay with amide–imidic acid tautomerization in inverting cellulase visualized by neutron crystallography. **Science Advances**, v. 1, n. 7, Aug. 2015. doi: 10.1126/sciadv.1500263

116 TUTORVISTA. Disponível em:

<<http://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/asparagine.html>>. Acesso em out. 2015.