UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FLÁVIO RODOLFO ROSSETO

Caracterização Bioquímica, Biofísica e Estrutural da Principal Endoglucanase Secretada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913

São Carlos
2011

FLÁVIO RODOLFO ROSSETO

Caracterização Bioquímica, Biofísica e Estrutural da Principal Endoglucanase Secretada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913

Dissertação 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 Mestre em Física Biomolecular

Área de Concentração: Física Aplicada – Opção Biomolecular.

Orientador: Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa**)**

São Carlos

2011

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Rosseto, Flávio Rodolfo.

Caracterização bioquimica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por xanthomonas campestris pv. Campestris ATCC33913../ Flávio Rodolfo Rosseto; orientador Igor Polikarpov. –versão corrigida- São Carlos, 2011.

92p.

Dissertação (Mestrado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada – Opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

1. Xanthomonas campestris. 2. Endoglucanases. 3. Bietanol. 4. Celulases. I. Título.

À minha família, e a Deus acima de tudo.

Agradecimentos

Primeiro e acima de tudo a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, por guiar meus caminhos e me conceder sabedoria e saúde;

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), por oferecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq e Fapesp, pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida;

Ao LNLS e pesquisadores do CTBE pelo espaço cedido para realização de diversos experimentos;

Ao Prof. Igor Polikarpov por ter me concedido a oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e pela amizade;

Aos meus pais, Dirce e Antônio e ao meu irmão Fábio por todo esforço e apoio, fundamental para que eu chegasse até aqui;

Aos docentes e funcionários do Instituto de Física de São Carlos, em especial a aqueles que deram apoio ou inspiração para o desenvolver do trabalho: Bianca, Suzana, Livia M., Maria, Prof. Richard, Prof. Otávio, Prof. Tito, Samira, Silvio, Ricardo e Vitor;

A todos aqueles que estiveram ao meu lado no laboratório ou que contribuíram de maneira um pouco mais distante, mas que não poderiam deixar de ser lembrados, como Amanda, Atílio, Bachega, Bruno, Caio, César, Daiana, Fer Batista, Fer Costa, Gabi, Heline, Jademilson, Larissa, Leonardo, Livia Faim, Marcos Michel, Mamé, Mario, Maycou, Simone, Tavin, Vanessa, Wally, Camila, Leonardo, Marcelo, Carlinhos, Fayene, Luciene e Guilherme.

Ao grupo de Bioetanol que esteve tão unido durante todo esse tempo e que forneceu suporte a qualquer necessidade: Renatinha, por todo companheirismo, Vivi (Serpa), por ser um grande exemplo e me ensinar inúmeras coisas de caráter e ciência, a Fran, por tantos momentos de risadas, viagens e auxílio com alguns experimentos, Marisa e Malu por estarem sempre a disposição, a Lis pelos momentos de descontração, sem esquecer a agregada ao grupo Ana pelos momentos de academia, corrida, amizade e pessoa sem a qual os experimentos de cristalografia jamais teriam sido concretizados;

E finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“*Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino*”

(Paulo Freire)

RESUMO

ROSSETO, F. R. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

O esgotamento das fontes de combustíveis fósseis e questões ambientais têm gerado grandes preocupações para a sociedade, e alternativas sustentáveis e eficientes para solucionar e trazer inovações na produção de biocombustíveis estão cada vez mais próximas. O uso de biomassa pode ser uma vantajosa opção, mas para isso, é necessária a degradação das moléculas constituintes de sua parede celular a açúcares fermentáveis. A biotecnologia tem melhorado e aumentado as opções para suprir fontes sustentáveis e preservação do meio ambiente. A transformação de biomassa na escala industrial para produção de bioetanol depende da capacidade de otimizar o processo de hidrólise enzimática da celulose utilizando enzimas de complexo celulolítico, principalmente de fontes bacterianas e fungos filamentosos. Dessa forma, estudamos a principal endoglucanase de *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913, que foi inicialmente identificada através de zimogramas e espectrometria de massas que mostrou boa cobertura de sequência e purificada utilizando passos de precipitação com sulfato de amônio seguida do uso de uma coluna de exclusão molecular. Esta enzima teve seus parâmetros cinéticos determinados, mostrando-se ativa para diversos substratos testados e também grande estabilidade para variações de pH e temperatura, com condições ótimas de $pH_{ótimo}$ = 7.0 e $T_{ótima}$ = 45°C. Além da

caracterização enzimática, a posição relativa entre o domínio catalítico e de ligação da celulose (CBM) da Endoglucanase por SAXS também foram determinadas, e ainda, para finalizar os estudos estruturais, a estrutura cristalográfica do domínio catalítico da enzima foi determinada com resolução de 2.8Å, contendo quatro moléculas por unidade assimétrica.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris.* Endoglucanases. Bioetanol. Celulases.

ABSTRACT

ROSSETO, F. R. **Biochemical, biophysical and structural studies of the major Endoglucanase secreted by *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The exhaustion of fossil fuels and the environment issues related have ~~been~~ generated many concerns for the society and searching for sustainable and effective alternative are being done in order to solve and bring innovations for biofuel production. Biomass can be a good alternative, but, for the success, it will be necessary degrading the cellular wall molecules into fermentable sugar. Biotechnology has improved and increased options in order to supply sustainable sources and environment preservation. The biomass transformation for bioethanol production, at the industrial scale, depends on the capacity of optimize the enzymatic hydrolysis of cellulose using enzymes of the cellulolytic complex, mainly produced by bacteria and filamentous fungi. We have studied the main endoglucanase of *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913 which has been initially identified by zymograms and mass spectrometry with high coverage sequence, and purified using precipitation with ammonium sulfate followed by size exclusion column. This enzyme had its kinetic parameters determined showing activity for the substrates tested and also has showed stability for pH and temperature changes, with optimal conditions of pH_{opt} = 7.0 and T_{opt} = 45°C. Following this enzymatic characterization, the relative position of the catalytic domain and cellulose binding domain (CBM) was determined by SAXS. In order to complete the structural studies,

the crystallographic structure of the catalytic domain has been determined with 2.8Å of resolution, showing four molecules by asymmetric unity.

Key words: *Xanthomonas campestris.* Endoglucanases. Bioethanol. Cellulases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Energética no Brasil (A) e no Mundo (B)..... 24

Figura 2 - Bioconversão de energia solar em biocombustíveis. A Energia solar é coletada pelas plantas através da fotossíntese e estocadas como lignocelulose. A decomposição do material celulósico em açúcares simples de 5 e 6 carbonos é alcançada através de pré tratamentos físicos e químicos, seguidos pela ação das enzimas sobre a biomassa. Os açúcares simples podem ser subsequentemente convertidos em combustíveis por microorganismos..... 25

Figura 3 - Estrutura e composição da molécula de celulose 25

Figura 4 - Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular de vegetais 26

Figura 5 - Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediada por CBMs 28

Figura 6 - Mecanismo de atuação das celulases para a hidrólise da celulose cristalina..... 30

Figura 7 - Estrutura química do ácido metil dodecenóico (DSF), responsável pelo fator de virulência em *Xanthomonas campestris*..... 32

Figura 8 - Placa de meio LB com Xanthomonas campestris pv. campestris após período de incubação em estufa a 30°C..... 37

Figura 9 - Aminoácidos aromáticos que possibilitam os ensaios de espectroscopia de emissão de fluorescência..... 47

Figura 10 - Técnicas de difusão de vapor utilizadas na cristalização de macromoléculas..... 49

Figura 11 - Ensaios enzimáticos comparativos em placas de CMC coradas com vermelho de congo mostrando atividade enzimática para os diferentes meios de cultura testados: (a) Controle, (b) LB, (c) MMXO, (d) MMXO + Avicel e (e) MMXO + CMC 52

Figura 12 - (a)SDS-PAGE: (I) Marcador molecular (II, III e IV) Proteínas extracelulares totais em diferentes concentrações em condições desnaturantes. (b) Zimograma identificando regiões onde há enzimas (em condições não desnaturantes) com atividades para CMCase para as diferentes concentrações de proteína identificadas por I, II e III..... 53

Figura 13 - Espectro de massas com peptídeos identificados. A sequência primária da proteína encontra-se em destaque com os resíduos identificados por espectrometria de massas destacados em verde..... 54

Figura 14 - Cromatograma de exclusão molecular para purificação da endoglucanase majoritária de *Xcc* (identificada no segundo pico)..... 55

Figura 15 - SDS-PAGE com passos de purificação – I: Marcador Molecular; II: Extrato total de proteínas extracelulares de *Xcc*; III: proteínas precipitadas com a adição de 20% de sulfato de amônio; IV: proteínas precipitadas com 40% sulfato de amônio; V: primeiro pico da cromatografia de exclusão molecular; VI: segundo pico da cromatografia de exclusão molecular mostrando a endoglucanase majoritária purificada..... 56

Figura 16 - Influência do pH para a atividade de CMCase para endoglucanase de *Xcc*..... 57

Figura 17 - Influência da temperatura para a atividade de CMCase para endoglucanase de *Xcc*..... 58

Figura 18 - Efeito da concentração de substrato solúvel (CMC) na velocidade de reação..... 60

Figura 19 - Espectros de Eletroforese capilar de oligossacarídeos marcados com APTS: Hidrólise incompleta e completa de oligossacarídeo formado por cinco (A) e seis(B) glicoses. Os dois oligossacarídeos estão marcados com APTS pela extremidade não redutora e os símbolos C6, C5, C4, C3 e C2 indicam o grau de polimerização dos oligômeros de glicose..... 62

Figura 20 - Espectros de Eletroforese capilar da hidrólise de beta-glucano (A), CMC (B) e Avicel (C) com produtos marcados com APTS. O produto de cada substrato foram marcados posteriormente a hidrólise com APTS. Os símbolos C4, C3, C2 e C1 indicam o grau de polimerização dos produtos em relação a um marcador para oligômeros de glicose..... 63

Figura 21 - Prováveis domínios conservados detectados através do programa BLASTP 2.2.25+..... 65

Figura 22 - Curva de espalhamento experimental da endoglucanase de *Xcc (*log I(q) x q) e resultados de procedimento de ajuste. Curva experimental (círculo com barra de erros); intensidade de espalhamento simulado para o DAM (linha azul clara); intensidade de espalhamento simulado para o modelo de corpo rígido contendo os domínios de ligação a celulose e catalítico (linha azul)..... 66

Figura 23 - Função de distribuição de distâncias para os dados experimentais da endoglucanase de *Xcc*..... 66

Figura 24 - Janela programa SAXS Mow mostrando as curvas da saída .out do gnom e seus resultados para o cálculo de massa molecular..... 67

Figura 25 - Sobreposição do modelo de átomos dummy de *Xcc* e dos domínios cristalográficos de maior identidade sequencial dos domínios de ligação a celulose e catalítico. Os modelos cristalográficos foram rotacionados como corpo rígido para ajuste contra os dados de SAXS. A partir do modelo superior à esquerda, os modelos inferior a esquerda e da direita são rotacionados 90º em relação aos eixos y e x, respectivamente..... 68

Figura 26 - Influência da celobiose na estabilidade térmica da endoglucanase de *Xcc* monitorada pela técnica de dicroísmo circular. Endoglucanase nativa em preto e Endoglucanase na presença do inibidor (celobiose) em vermelho. O valor da temperatura de transição (T_m) para a enzima com e sem celobiose são respectivamente Tm_{endo_cel} = 73.1 e Tm_{endo} = 69.2°C 70

Figura 27 - Efeitos sobre a estrutura secundária através da variação de pH para a endogluanase verificada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) Espectros de CD em função do pH. Os valores de pH são 2.6 (preto), 4.0 (cinza), 6.0 (rosa), 8.0 (verde) e 10.0 (vermelho) 71

Figura 28 - Espectro de emissão de fluorescencia para os pHs 2.6, 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0 da Endoglucanase..... 72

Figura 29 - Gel SDS-PAGE apresentando a diferença de tamanho entre a Endoglucanase completa (I) e seu domínio catalítico isolado (II)..... 73

Figura 30 - Cristais da Endoglucanase que cresceram em condição Tris HCl 0.1M pH8.5 e 2.0M fosfato de amônio dihidrogenado 74

Figura 31 - Padrão de difração para os cristais de Endoglucanase 75

Figura 32 - Disposição e orientação das quatro cadeias apresentadas para a estrutura cristalográfica 76

Figura 33 - Cadeia A da estrutura cristalográfica resolvida. A figura B encontra-se rotacionada de 90° em relação a A 78

Figura 34 - Sobreposição da estrutura da Endoglucanase com a celotetraose da estrutura da EGAc (PDB:1ECE) (A) e com duas moléculas de celobiose da EGPh (PDB:2ZUM) (B). Os resíduos conservados do sítio ativo envolvidos na clivagem estão mostrados como *sticks* e nomeados. (C) cavidade catalítica com ambos substratos 79

Figura 35 - Sobreposição da Endoglucanase, EGAc (PDB:1ece) e EGPh (PDB:2ZUM) (A). As diferenças estruturais estão mostradas em vermelho para Endoglucanase, azul para EGAc e verde para A EGPh. (B) Ligações de dissulfeto Cys 229-Cys246 (vermelho) presentes na Endoglucanase e Cys169-Cys171 presentes na EGAc. (C) A posição da ligação de dissufeto é similar na Endoglucanase e EGPh e diferente na EGAc e envolve somente uma cisteína conservada, Cys140..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos para endoglucanase obtidos utilizando CMC como substrato..... 60

Tabela 2 - Parâmetros estruturais derivados dos dados de SAXS para a Endoglucanase de *Xcc*..... 69

Tabela 3 - Estatísticas cristalográficas: Endoglucanase de *Xcc*..... 77

SUMÁRIO

1 Introdução **23**
1.1 Bioenergia 23
1.2 Hidrolise da Celulose 27
1.3 Xanthomonas 31
1.4 Endoglucanases de *Xanthomonas campestris pv. campestris* 32

2 Objetivos **35**

3 Materiais e Métodos **37**
3.1 Cultivo de *Xanhomonas campestris pv. campestris* ATCC33913 37
3.2 Identificação da Endoglucanase 39
3.3 Purificação da Endoglucanase Majoritária 40
3.4 Determinação das condições ótimas de pH e temperatura 41
3.5 Determinação de parâmetros cinéticos – K_m e $V_{máx}$ 42
3.6 Eletroforese Capilar 43
3.7 Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo - SAXS 44
3.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência 45
3.8.1 Estabilidade Térmica e de variação de pH utilizando CD 45
3.8.2 Espectroscopia de Fluorescência – variação de pH 47
3.9 Ensaios de Cristalização 49
3.10 Coleta de Dados e Processamento 50

4 Resultados **51**
4.1 Expressão de Endoglucanases 51
4.2 Identificação da Endoglucanase Majoritária 52
4.3 Purificação da Endoglucanase 54
4.4 Determinação das condições ótimas de temperatura e pH para atividade da Endoglucanase 57
4.4.1 pH ótimo 57
4.4.2 Temperatura ótima 58

4.5 Cinética Enzimática 59
4.6 Eletroforese Capilar 61
4.7 Estrutura de baixa resolução - SAXS 64
4.8 Desnaturação Térmica usando Dicroísmo Circular 69
4.9 Ensaios de Estabilidade com variação de pH utilizando CD 70
4.10 Espectroscopia de Fluorescência 71
4.11 Cristalização, Coleta de Dados e Resolução da Estrutura Cristalográfica da Endoglucanase 73

5 Conclusões 83

REFERÊNCIAS 85

1 Introdução

1.1 Bioenergia

A população mundial continua a crescer, sendo que estimativas mostram que a mesma pode chegar a 9.4 bilhões em 2050[1]. Com essa expansão, a demanda por alimento, combustível e energia também irá crescer, tornando mais evidente as limitações mundiais. De acordo com a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas[2], o combustível fóssil é a fonte de energia mais importante para o mundo atual, totalizando apenas com o uso do petróleo 35% da energia primária consumida, seguido do uso do carvão mineral (23%), gás natural (21%), madeira, carvão vegetal e outros biocombustíveis (10%), energia nuclear (7.6%), hidroelétricas (2.7%) e outras fontes de energia renováveis como geotérmica, solar e eólica (0.7%) (Figura 1). As quatro principais fontes de energia contribuem diretamente com a emissão de gases que geram o efeito estufa, o fator primário para o aquecimento global[3].

O Brasil, o maior e mais populoso país da América Latina, tem um padrão de fontes energéticas próxima a apresentada mundialmente, diferenciando-se apenas no quanto cada uma delas representa. A fonte de energia primária do Brasil também é o petróleo, contribuindo com 38.5% de nossa energia, seguido da biomassa (29.7%), hidroelétricas (15%) e gás natural (9.3%) (Figura 1)[3].

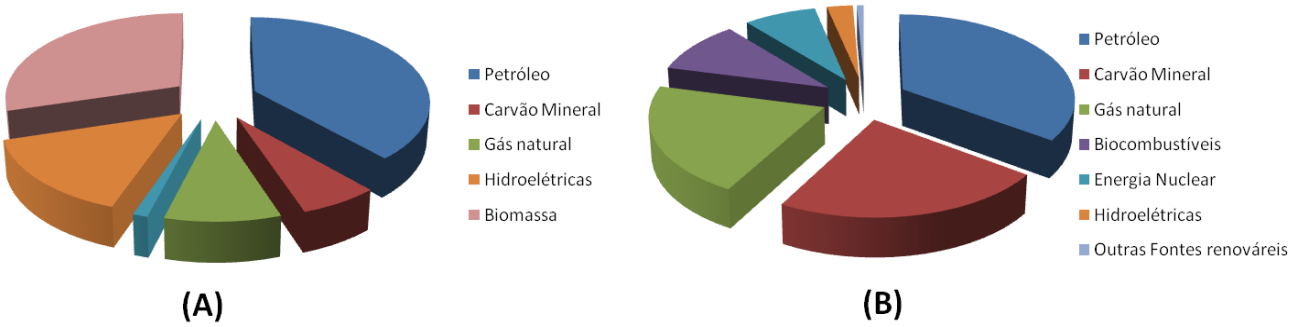


Figura 1 – Distribuição Energética no Brasil (A) e no Mundo (B)[3].

Em termos globais, a redução de nossa dependência pelos combustíveis fósseis é prioridade para manter um ambiente seguro e sustentável. Como uma fonte renovável de energia, a bioenergia vai diminuir o impacto pelos futuros problemas com petróleo e as respostas as preocupações ambientais sobre a poluição do ar e gases de efeito estufa, além de contribuir com oportunidades para agricultores e comunidades rurais[4].

A energia solar recebida pela superfície da Terra é 12 vezes maior que a energia necessária para suprir as necessidades humanas atuais e aproximadamente 4 vezes a demanda de energia necessária em 2050. Ela é estocada através da fotossíntese e é 10 vezes maior que a usada mundialmente[5] . A celulose, constantemente re-sintetizado pela fotossíntese é o polímero mais abundante que compõe a parece celular das plantas[6], (de um terço a metade do total) com uma biossíntese anual estimada em 10^{11} toneladas[7]. Tecnologias precisam ser desenvolvidas para tornar possível a conversão de bilhões de toneladas de biomassa produzidas por ano em biocombustíveis[8].

A Figura 2 ilustra os passos da bioconversão da energia solar em biocombustíveis[9].

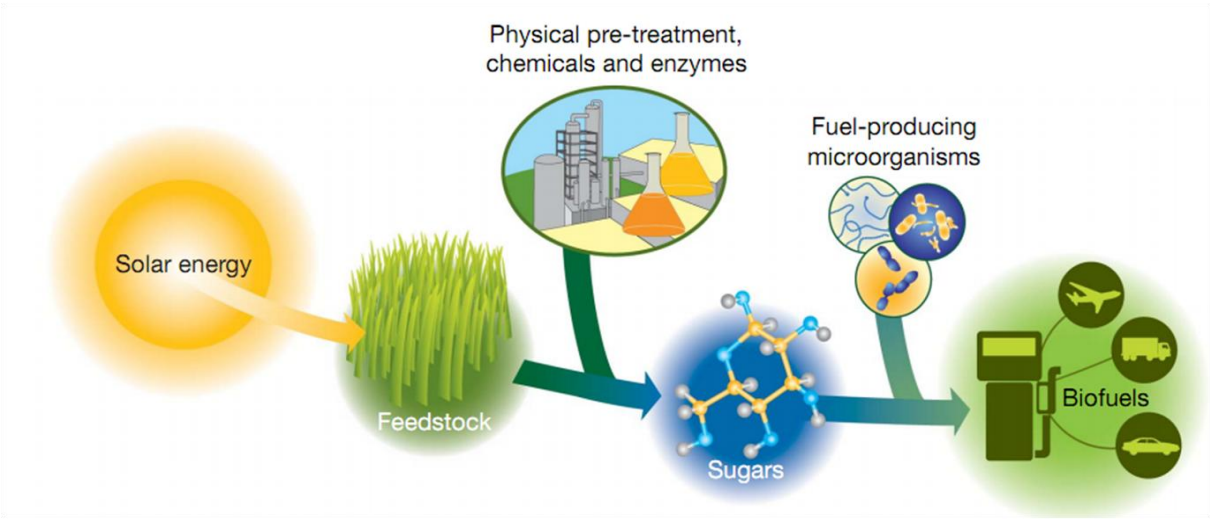


Figura 2 - Bioconversão de energia solar em biocombustíveis. A Energia solar é coletada pelas plantas através da fotossíntese e estocadas como lignocelulose. A decomposição do material celulósico em açúcares simples de 5 e 6 carbonos é alcançada através de pré tratamentos físicos e químicos, seguidos pela ação das enzimas sobre a biomassa. Os açúcares simples podem ser subsequentemente convertidos em combustíveis por microorganismos.

A celulose é um homopolímero, linear, formado por unidades de celobiose (produto da desidratação de duas glicoses), como ilustra a Figura 3. Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas[10].

As pontes de hidrogênio inter-e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática[11; 12].

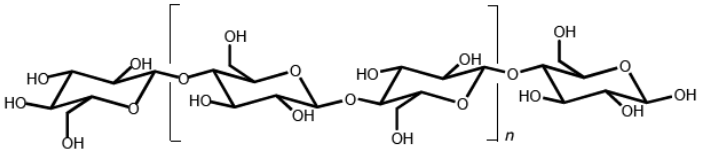


Figura 3 - Estrutura e composição da molécula de celulose.

A degradação enzimática de celulose e hemicelulose tem sido um alvo interessante para investigação científica nos últimos anos[13]. Muitos resíduos, como bagaço de cana de açúcar, são fontes ricas em celulose (35 a 50%), hemicelulose (20 a 35%) e lignina (10 a 25%)[14] (Figura 4), e tem sido visto como uma via promissora para o desenvolvimento de uma fonte de energia sustentável: o bioetanol.

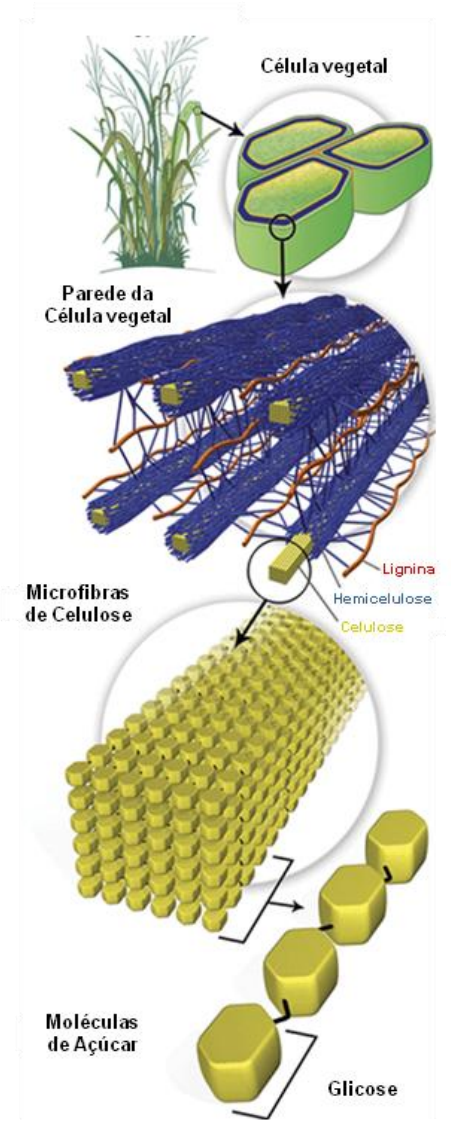


Figura 4 – Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular de vegetais.

1.2 Hidrólise da Celulose

Para que ocorra a fermentação e a produção de etanol a partir de fontes lignocelulósicas, a celulose (insolúvel) deve ser decomposta em unidades simples de açúcar (solúvel). Neste ponto são necessárias algumas enzimas, chamadas celulases. Estas enzimas são produzidas por microorganismos como bactérias e fungos, sendo as principais celulases: as endoglucanases (endo-1,4-β-D-glucanases); as exoglucanases (exo-1,4-β-D-glucanases) subclassificadas em glucanohidrolases e celobiohidrolases (CBHs) e as β-glicosidases (1,4-β-D-glicosidases)[15-16] de forma independente ou complexada[17].

A celulose, um polímero insolúvel constituído por uma cadeia de resíduos de β-(1,4)-glicoses[18-19], tem se mostrado como objeto de pesquisas intensas por mais de um século, e estamos cada vez mais próximos de compreender sua arquitetura molecular[18-19]. Sabemos que as moléculas nativas de celulose são encontradas em forma de fibras, sendo que esta forma possui individualmente um alto grau de arquitetura, dependendo da fonte (camada da parede celular ou tipo de planta)[19].

Resumidamente, as características estruturais dominantes visualmente da celulose em plantas superiores são microfibrilas de celulose com diâmetro de 10-20 nm, cruzadas com outros componentes da parede celular como xiloglucanos[18-19]. Microfibrilas são fibrilas ramificadas compostas por aproximadamente 30 a 36 cadeias de glucanos unidas lateralmente por meio de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals para formar estruturas cristalinas[18]. Apesar dos consideráveis progressos feitos para elucidar a estrutura cristalina da celulose, elas ainda não são bem conhecidas[18-19].

Trabalhos feitos por Krässing[20] mostraram que altos graus de agregrados fibrilares produzem uma estrutura mais compacta da celulose, que resulta em uma superfície acessível interna menor. Uma característica importante dessas regiões altamente ordenadas é que as cadeias de celulose são tão fortemente empacotadas que até mesmo pequenas moléculas como água podem não conseguir penetrar

nessa estrutura[20]. A acessibilidade limitada destas regiões leva a dificuldades na atuação das celulases. Com este tipo de estrutura, é evidente que só as moléculas de celulose situadas na superfície seriam suscetíveis a ação das enzimas. Se a hidrólise da celulose ocorre somente na superfície desta estrutura, a superfície disponível é potencialmente determinante na taxa de hidrólise[21-22].

Em 1985, Coughlan[23] propôs o termo “amorfogênese” para sugerir um possível mecanismo de dispersão, expansão ou delimitação do substrato celulósico, resultando na redução do grau de cristalinidade e da criação de superfícies internas reativas mais acessíveis. Consequentemente, a amorfogênese aumenta a reatividade dos substratos celulósicos, aumentando a quantidade de celulose acessível diretamente às enzimas[24].

Para isso as celulases precisam adsorver sobre a superfície da celulose insolúvel, antes de promover a hidrólise, e penetrar no espaço interfibrilar. Assim a maior parte do substrato inacessível é estruturalmente exposto a fim de aumentar a desordem molecular das regiões empacotadas da celulose[23] (Figura 5).

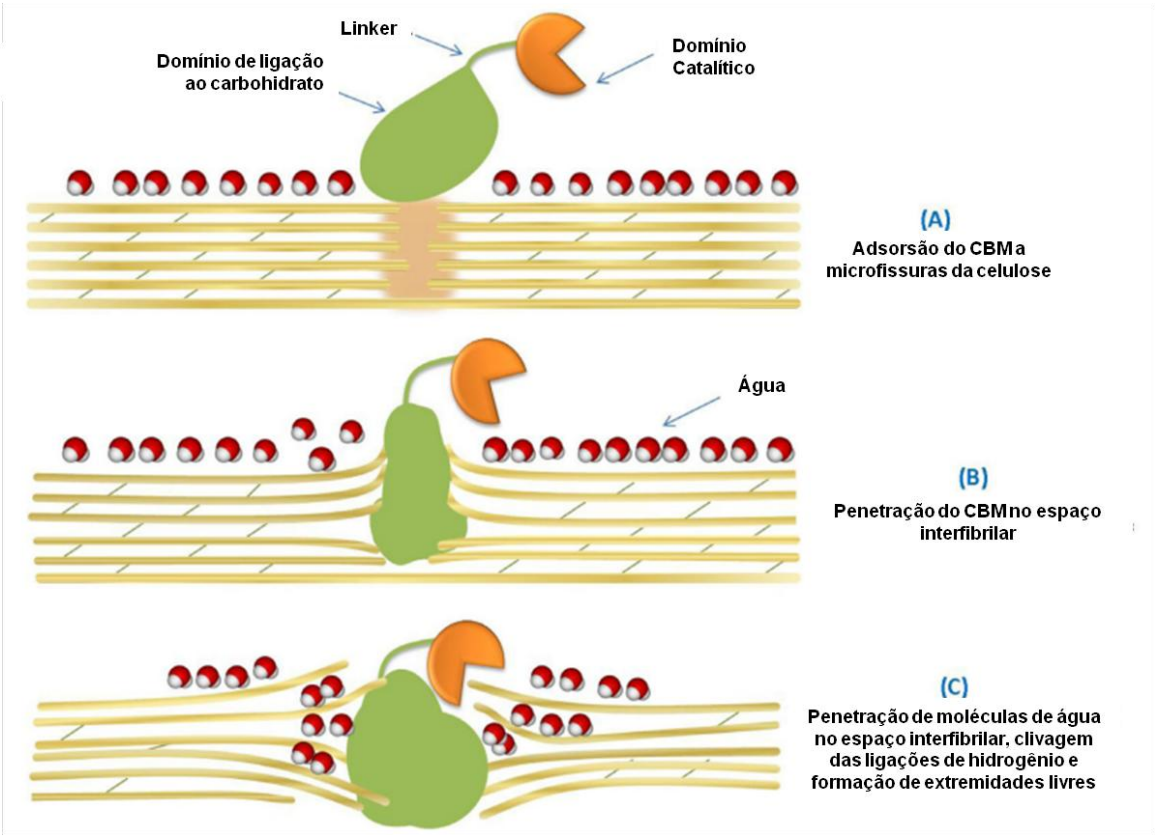


Figura 5 – Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediada por CBMs[24].

As celulases são compostas por pelo menos dois domínios distintos: um domínio catalítico e um domínio de ligação a celulose (CBM)[25]. O CBM é o responsável pela adesão das enzimas na fibra de celulose entre outras funções como: concentração de enzima na superfície do substrato/efeito na proximidade (transferência de fase); direcionar e identificar/selecionar o substrato; e o desmembramento do substrato cristalino não hidrolisável. CBMs que são específicos para celulose insolúvel podem ser agrupados em duas categorias gerais: uma que interage com a celulose cristalina (CBMs tipo A) e outra que interage com a celulose não cristalina (CBMs tipo B)[26]. Esses domínios não catalíticos são facilmente adsorvidos em locais acessíveis sobre o substrato, formando um complexo realizado por ligações não covalentes e termodinamicamente favoráveis[27]. Consequentemente, o domínio catalítico é alinhado com o substrato de forma a estabelecer uma alta concentração local de enzima sobre a superfície da celulose.

A hidrólise da celulose, então, é iniciada através das endoglucanases que atuam aleatoriamente hidrolisando ligações internas β-1,4 glicosídicas na região amorfa da celulose, reduzindo significativamente o grau de polimerização do substrato e liberando novas extremidades na cadeia da celulose, que são alvos das exoglucanases (atuando nas extremidades redutoras e não redutoras) e glucanohidrolases que liberam unidades de celobiose e glicose respectivamente, sendo a celobiose reduzida a glicose através da hidrólise promovida pelas β-glicosidases[15] (Figura 6).

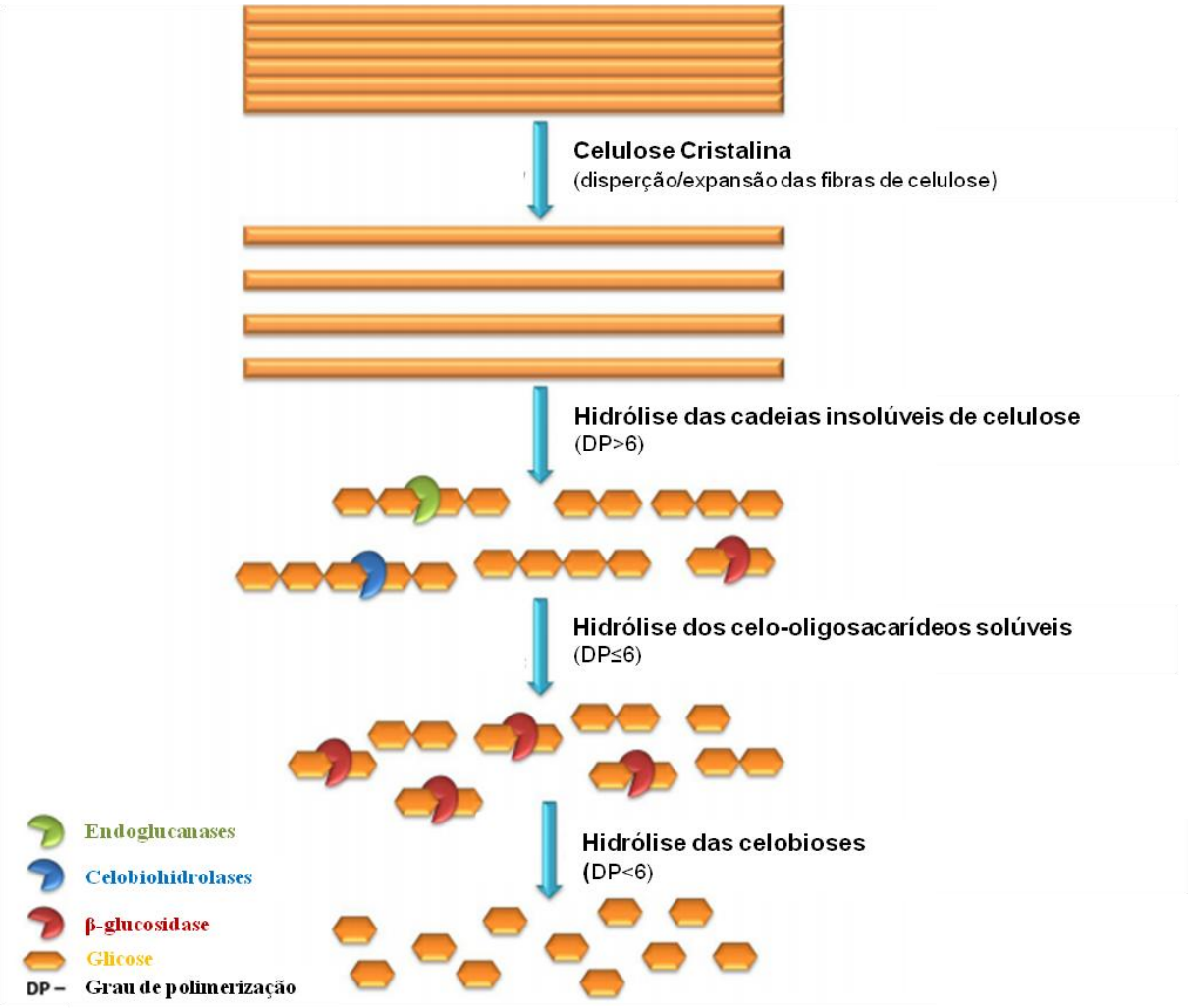


Figura 6 – Mecanismo de atuação das celulases para a hidrólise da celulose cristalina[24].

As celulases são classificadas em famílias de glicosil hidrolases[28] com base em sua seqüência de aminoácidos e semelhanças de enovelamento[29]. As endoglucanses são classificadas nas famílias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44 ,45, 48 e 51; As exocelulases (CBH I e II) pertencem as famílias GH 7 e 6, enquanto a exocelulase glucanohidrolase pertence as famílias GH 1 e 3; a terceira classe, as beta glicosidases, por sua vez, são classificadas nas famílias GH 1, 3, 9, 30 e 116 (Carbohydrate Active Enzymes database - CAZY: http://www.cazy.org/)[29].

Em anos anteriores, as investigações de celulases centraram-se em fungos, principalmente do gênero Trichoderma. No entanto, nos últimos 20 anos o interesse

na produção de celulases por bactérias tem aumentado, havendo diversos relatos de bactérias celulolíticas como os gêneros Clostridium, Cellulomonas[13] e Xanthomonas.

1.3 Xanthomonas

Microorganismos do gênero Xanthomonas são bactérias fitopatogênicas relativamente comuns responsáveis por causar “Black root” em crucíferas, levando normalmente a grandes perdas econômicas. Industrialmente, este microorganismo é utilizado para produzir um heteropolissacarídeo extracelular de primeira geração, conhecido como goma xantana. Este composto apresenta excelentes propriedades reológicas, normalmente usado como estabilizante, espessante, emulsificante, e agente para suspensão nas indústrias alimentícias, cosméticas e petrolífera[30-31].

As bactérias colonizam a superfície dos vegetais pela adesão a certas estruturas. Após invadirem espaços intracelulares, desenvolvem micro colônias rodeadas de material fibrilar, como a goma xantana. Como o muco secretado pela bactéria apresenta alta capacidade de retenção de água, os espaços tornam-se congestionados; este fenômeno é conhecido como “water soaking”. O tecido é continuamente desintegrado e é o primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana[32]. Como a congestão é progressiva, os danos vão agravando-se e então a planta vai murchando devido à redução da fotossíntese e aumento da permeabilidade da membrana celular. E é neste tecido necrosado que as enzimas atuam[33].

A presença de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação da parede celular tem sido reportada para o gênero Xanthomonas, sendo que a análise do genoma de *X. campestris pv. campestris* revelou a presença de vários genes que codificam enzimas envolvidas neste processo, incluindo além de pectinases, liases e xilanases, nove celulases[34], indicando, portanto, que *Xcc* é capaz de secretar

diversas enzimas que degradam os polissacarídeos estruturais como a celulose e pectinas[33].

A indução dessas proteínas decorrentes do fator de virulência é dada através de um processo conhecido como *quorum-sensing,* no caso de *Xanthomonas campestris pv. campestris*[35]*, que* na bactéria apresenta-se como um mecanismo de sinalização química que altera a expressão gênica e ativa um comportamento cooperativo entre bactérias da mesma espécie em condições de alta densidade celular[36-38]*.* A comunicação intercelular que ocorre durante o *quorum-sensing* se faz através de pequenas moléculas sinalizadoras que são chamadas de auto-indutores. Vários auto-indutores têm sido identificados em bactérias; entre eles destacam-se as acil homoserinalactonas (HSL) produzidas pelas bactérias Gram-negativas e peptídeos cíclicos produzidos pelas Gram-positivas. Recentemente identificou-se ácidos graxos com até 16 carbonos que funcionam como auto-indutor em algumas bactérias Gram-negativas incluindo *Xanthomonas* sp. (ácido metil dodecenóico para *Xanthomonas campestris* – Figura 7) e *Ralstonia sp.*[39]*.*

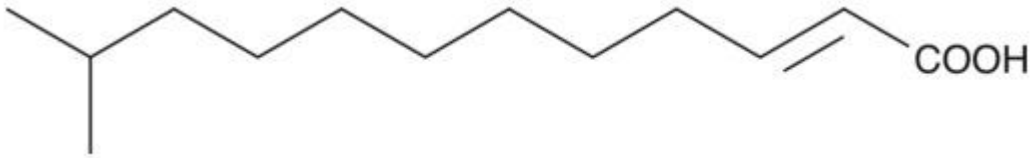


Figura 7 – Estrutura química do ácido metil dodecenoico (DSF), responsável pelo fator de virulência em *Xanthomonas campestris*[39].

1.4 Endoglucanases de *Xanthomonas campestris pv. campestris*

As principais celulases secretadas por *Xcc* são endoglucanases, sendo a majoritária no extrato enzimático total a endoglucanase codificada pelo gene engXCA[40]. As enzimas de *Xcc,* incluindo as endoglucanases, possuem pouquíssimas informações na literatura, disponíveis apenas nas questões dos genes

codificadores das enzimas[40-42] ou mutações com a finalidade industrial possibilitando melhoras nas características na produção e utilização da goma xantana[43].

A endoglucanase majoritária de *Xcc* é classificada dentro da família GH5 de acordo com o banco de dados CAZY[29]. GH5 é uma das maiores famílias de glicosídeo hidrolases disponíveis no CAZY. Uma quantidade notável de variedade de enzimas é encontrada nessa família, incluindo endoglucanases, xilanases e xiloglucanases. Enzimas da família GH5 são encontradas em grande parte em bactérias, fungos e plantas, não sendo conhecida nenhuma enzima humana para esta família[44].

Através da sequência disponível (Sequência NCBI: NP_638867.1) para *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC33913 e do programa BLASTP2.2.25+[45], observamos que a enzima é composta por dois domínios: catalítico e CBM, ligados através de um linker com cerca de 30 resíduos de aminoácidos.

Pela deficiência de dados na literatura esta enzima foi escolhida como alvo do estudo descrito nesta dissertação com a finalidade de entendê-la bioquímica, biofísica e estruturalmente além de avaliar sua eficiência e condições sobre sua atuação com finalidades biotecnológicas incluindo a produção de bioetanol.

2 Objetivos

Sendo as endoglucanases uma das enzimas fundamentais na degradação da celulose a açúcar redutor para a produção de etanol lignocelulósico, este trabalho tem como principal objetivo a caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da Endoglucanase principal secretada por endoglucanases de *Xanthomonas campestris pv. campestris* para a possíveis aplicações biotecnológicas, incluindo o bioetanol.

Os objetivos específicos foram:

- Identificar e purificar a Endoglucanase;
- Determinar condições ótimas da enzima, seus parâmetros cinéticos e padrões de hidrólise;
- Compreender mudanças estruturais influenciadas através de variações de pH e temperatura;
- Verificar e identificar os domínios da Endoglucanase através de SAXS;
- Conduzir ensaios de cristalização e determinar a estrutura cristalográfica da enzima.

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultivo de Xanthomonas campestris pv campestris *ATCC33913*

A cepa *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC 33913 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Shaker Chuck Farah (IQ/USP) para estudos das celulases.

Para o cultivo de *Xcc*, partindo de um estoque de células em 20% glicerol mantidas a -80ºC, uma pequena parcela de células são transferidas para uma placa de petri meio LB (Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L e Ágar 15 g/L) contendo 100 µg/mL de ampicilina (antibiótico no qual *Xcc* é naturalmente resistente), levando de três a cinco dias para o desenvolvimento celular em estufa a 30ºC (Figura 8).

Figura 8 – Placa de meio LB com Xanthomonas campestris pv. campestris após período de incubação em estufa a 30ºC.

Com estas placas prepara-se o pré inoculo com 50 mL de meio 2XTY (Triptona16 g/L, Extrato de levedura 10 g/L e NaCl 10 g/L) contendo também 100 µg/mL de ampicilina e crescendo por 16 horas mantido em incubadora com controle de temperatura e agitação a 30ºC e 250 rpm. O pré inoculo é, então, adicionado a 500 mL do mesmo meio de cultura estéril e a mesma concentração de antibiótico e mantido a 30ºC e 250 rpm por mais 36 horas.

Cultivos em bioreatores também foram realizados com as mesmas condições e proporções utilizadas para o cultivo em incubadoras, onde foram obtidas os mesmos padrões de expressão.

Para a cultura de *X. campestris* foram feitos alguns testes para verificar a influência do meio de cultura para a expressão das celulases de interesse. Então, utilizamos para isso basicamente quatro meios de cultura diferentes:

- LB;
- MMXO (meio mínimo);
- MMXO+CMC, substituindo fontes de carbono por carboximetilcelulose (CMC);
- MMXO + Avicel, substituindo fontes de carbono por celulose microcristalina (Avicel).

A avaliação da expressão das celulases nestes diferentes meios foi feita através de um teste enzimático em placa de petri com CMC (derivado de celulose, com características de celulose amorfa e ramificada, formada pela substituição parcial dos grupos hidroxilas por grupos carboximetil: $-CH_2-COOH$) como substrato, com a finalidade de buscar principalmente atividades de endoglucanases. Para este teste de atividade, utilizamos um preparo sólido contendo ágar 1.5% (m/V), 50 mM K_2HPO_4 pH6.0 e CMC 0.1% (m/V). Um pequeno orifício de tamanho padrão (aproximadamente 0.5 cm de diâmetro) foi feito no centro de cada placa e adicionamos 50 µL de enzima incubando por 20 horas a 37°C. A placa foi então corada com solução de vermelho de congo 0.1% e descorada com solução NaCl 1 M até que os halos de atividade enzimática estivessem visíveis.

3.2 Identificação da Endoglucanase

Para identifição da Endoglucanase de interesse, zimogramas e espectrometria de massa[46] (MALDI-Q-TOF Premier, Waters) foram as principais técnicas utilizadas para encontrar a proteína por sua atividade enzimática e sua sequência primária.

Para o zimograma, foram feitos géis SDS-PAGE (Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) 10% acrilamida convencionais, porém, acrescido de 0,1% de carboximetilcelulose[47]. O gel de acrilamida foi dividido em duas partes. Na primeira, amostras desnaturadas por ação de temperatura e com tampão contendo β-mercaptoetanol foram adicionadas em diferentes concentrações. Na segunda parte, amostras não desnaturadas foram adicionadas. Após a corrida, que foi feita em baixa temperatura (10ºC), as duas partes do gel foram separadas, a primeira foi então corada com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e a segunda foi colocada em solução de triton X100 por 30 minutos para remoção do SDS do gel. Após a lavagem com triton, o gel foi retirado desta solução e lavado em duas etapas de 30 minutos cada com tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0. Com o tampão citrato incorporado ao gel, este foi levado para um banho a 50ºC por 15 minutos para iniciar a ação das enzimas sobre o substrato (CMC) contido no gel. Finalmente a segunda parte do gel foi corada com vermelho de congo 0,1% e descorado com NaCl 1 M até que as bandas fossem visualizadas. Um tratamento com ácido acético 10% foi feito para aumentar o contraste entre as regiões claras (bandas com atividade CMCase) das regiões coradas (ausência de atividade enzimática).

Para confirmação de que a suposta endoglucanase encontrada através de zimograma é a enzima buscada e que esta foi realmente identificada, a banda de proteína foi recortada do gel de poliacrilamida e clivada com tripsina (Sigma) por digestão em gel[48]. Os peptídeos derivados foram analisados em um espectrômetro de massas do tipo Electrospray Tandem MS/MS (Q-TOF), equipado com interfase

nanospray (Micromass), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Brasil. O programa MASCOT (www.matrixscience.com) foi usado na identificação de proteínas. A lista de massas dos peptídeos foi pesquisada usando a base de dados de proteína NCBInr (base de dados não-redundante do National Center for Biotechnology information).

3.3 Purificação da Endolgucanase Majoritária

Após o cultivo de *Xcc*, a cultura foi centrifugada a 8000xg por 15 minutos para a remoção das células. O sobrenadante, contendo a endoglucanase de interesse uma vez que esta é secretada pela bactéria, foi concentrado por ultrafiltração tangencial em sistema *hollowfiber (GE Healthcare)*, com cartucho de 10 Kda de corte (UFP-10-E-35 (GE) e o preparo enzimático foi, então, armazenado a 4°C até a a etapa de purificação ser realizada.

A endoglucanase foi purificada por técnicas de precipitação com sulfato de âmonio seguida de cromatografia líquida em equipamento de FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography – Amersham Bioscience*).

Notamos que a remoção total do sal do meio de cultura (NaCl) de *Xcc* é capaz de melhorar a eficiência da purificação da endoglucanase partindo do extrato enzimático total, principalmente no passo de precipitação com sulfato de amônio.

O extrato enzimático total foi submetido a passos sucessivos de precipitação com sulfato de amônio a 20% e 40%. Em cada um dos passos, após a adição de $(NH_4)_2SO_4$, a solução foi centrifugada a 13000xg por 20 minutos. O precipitado contendo proteínas foi ressuspendido em tampão Tris 50 mM pH 8.0 e centrifugado novamente a fim de permanecer apenas com a parcela solúvel de proteínas.

Após a purificação parcial da Endoglucanase obtida com 40% de $(NH_4)_2SO_4$, utilizamos uma coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25 Superfine - GE), pré-equilibrada com Tris 50 mM, pH 8.0, obtendo a endoglucanase pura.

3.4 Determinação das condições ótimas de pH e temperatura

O pH ótimo foi determinado através de medidas de atividade enzimática da proteína purificada com CMC como substrato em pH variando de 2 a 10 a 50°C. Determinado o pH ótimo, este foi utilizado para a determinação da temperatura ótima, obtida por determinação da atividade sobre o mesmo substrato variando a temperatura entre 30 e 80°C[49].

Os ensaios de atividade enzimática (CMCase) foram determinados utilizando CMC (0.5% m/v) preparado em solução tampão adequada. A reação de 100 µL total contendo enzima na concentração de 400 nM e concentrações finais de 0.25% (m/v) de CMC e 50 mM de tampão foi incubada também a temperatura adequada por 30 minutos. As reações foram paradas com a adição de 100 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e incubado a 100°C por 5 minutos[50]. A cor característica promovida pelo DNS para cada uma das reações foram lidas a 540 nm utilizando um espectrofotômetro (Multiskan Spectrum – Thermo Scientific).

As concentrações das enzimas purificadas foram medidas através do coeficiente de extinção (117225 $M^{-1}cm^{-1}$) absorbância a 280 nm utilizando Espectrofotometro NanoDrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific) e/ou utilizando o Kit Bio-Rad de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad Laboratories), que nos fornece a concentração de proteína através de um ensaio baseado no método de Bradford[51], usando albumina bovina (Sigma) como padrão de referência.

3.5 Determinação de parâmetros cinéticos – K_m e $V_{máx}$

Os ensaios cinéticos deste trabalho foram realizados junto ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE, Campinas – SP).

Os ensaios de atividade de CMCase para a realização da cinética foram realizados conforme a descrição anterior. A taxa de reação (V_0) foi determinada mantendo-se fixa a concentração da enzima em 200 nM e variando a concentração do substrato CMC em tampão Tris 50 mM pH 7.0 a 45°C. A atividade enzimática foi monitorada nas concentrações de 0.05, 0.1, 0.25, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5 e 4% (m/V) de CMC de baixa viscosidade. A leitura dos dados foram feitas após 30 minutos de reação seguida da adição de DNS por absorbância a 540 nm.

Os dados então foram representados graficamente para cada uma das concentrações de CMC, permitindo o cálculo da velocidade de reação (V_0) – concentração do produto liberado (mM) dividido pelo tempo de reação. Com esses dados, é ainda possível calcular outras constantes cinéticas da endoglucanase para CMC: velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_m). Para determinar esses parâmetros utilizamos o software SigmaPlot 10.0. A partir destes dados, ainda calculamos também o K_{cat} e a eficiência catalítica da enzima.

3.6 Eletroforese Capilar

Com a finalidade de compreender melhor a forma de atuação da enzima em possíveis substratos, utilizamos a técnica de eletroforese capilar, que através da marcação de polissacarídeos com 8-aminopireno-1,3,6-ácido trisulfonico (APTS), que nos permite identificar os padrões de hidrólise para os substratos analisados.

Para a análise da endoglucanase utilizamos os seguintes substratos: Avicel, CMC, β-glucano, e polissacarídeos formados por 5 e 6 unidades de glicose. Foram realizadas hidrólises parciais e totais com esses substratos, variando para isso o tempo em que enzima e substrato marcados com 1 pM de APTS ficaram incubados a 50°C.

A análise dos produtos de quebra dos substratos foram realizadas por um detector de fluorescência com laser induzido – BioFocos 2000 (*Bio-Rad Laboratories*, Inc.). Um capilar de sílica fundida (TSP050375, *Polymicro Technologies*) de 50 µm de diâmetro e 31 cm de comprimento foi utilizado como coluna de separação dos oligossacarídeos. As condições de eletroforese foram 15kV/70-100 µA utilizando 100 mM fosfato de sódio (pH 2.6) como tampão de corrida e temperatura controlada a 20°C. O capilar foi lavado com 1 M NaOH seguido pela corrida do tampão para prevenir contaminações. Os substratos marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro de 520 nm[52].

3.7 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo – SAXS

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foi utilizado para a determinação de modelos tridimensionais de baixa resolução (envelopes)[53-56] com a finalidade de obter informações estruturais da enzima em solução. A coleta de dados de SAXS foram realizadas para diferentes concentrações da endoglucanase na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (LNLS) utilizando comprimento de onda λ=1.488 Å, detector bidimensional e distância amostra-detector de 1028.4 mm, cobrindo um intervalo de transferência de momento de $0.0411\ Å^{-1} < q < 0.3253\ Å^{-1}$.

A análise sistemática foi realizada levando-se em conta o ruído gerado pelo CCD, a intensidade do feixe, a absorção da amostra e o espalhamento da solução tampão em que as proteínas encontravam-se. Finalmente os padrões bidimensionais das diferentes concentrações da endoglucanase foram integrados em 2Θ. O raio de giro (R_g) foi obtido por dois métodos distintos, utilizando a equação de Guinier[57] e pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado no programa Gnom[58], onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias *p(r)* e o diâmetro máximo ($D_{máx}$) da proteína.

Estruturas de baixa resolução foram obtidas a partir dos dados experimentais da endoglucanase utilizando o programa Dammin[59]. Para os dois domínios da proteína (catalítico e CBM), estruturas terciárias resolvidas de domínios de proteínas homólogas com alta identidade para a Endoglucanase em estudo foram posicionadas de modo a preencher o DAM, ou seja, o mapa de densidade eletrônica. Os domínios cristalográficos de ligação a celulose (pdb id 1EXG)[60] e o domínio catalítico (pdb id 2ZUM)[61] de *Cellulomonas fimi* e *Archaeon Pyrococcus horikoshii* respectivamente foram posicionados no DAM respeitando a sequência de estrutura primária. Os valores de R_g, e D_{max}, a curva de espalhamento simulado das

coordenadas atômicas e as discrepâncias entre o modelo proposto e os dados experimentais foram calculados utilizando o programa Crysol[62].

3.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência

3.8.1 Estabilidade Térmica e de variação de pH utilizando CD

O fenômeno de dicroísmo circular (*Circular Dichroism*, CD) é a propriedade observada em uma molécula que possui centros assimétricos (centro quiral), quando ela absorve diferenciadamente a luz circularmente polarizada a direita e a luz circularmente polarizada a esquerda[63].

Peptídeos e proteínas são amplamente estudados por CD, pois os principais centros quirais destas moléculas (C_α) estão ao longo da cadeia principal. Portanto, seus espectros de CD na região entre 180 e 260 nm (região do UV-distante) fornecem informações capazes de caracterizar e discriminar estruturas secundárias (α-hélices, fitas-β, voltas e estruturas não ordenadas) presentes nestas moléculas[64].

A espectroscopia de CD em proteínas e peptídeos é uma ferramenta muito utilizada no estudo de mudanças conformacionais (sofridas devido a variações de solventes, temperatura e de pH), na interação com ligantes e em ensaios de desnaturação e renaturação de proteínas[65-66].

A estimativa do conteúdo de frações de estrutura secundária de uma proteína é feita com base num grupo de proteínas de referência que possuem estrutura secundária e espectros de CD conhecidos. Com o auxílio de programas computacionais, que utilizam diferentes métodos de desconvolução, são extraídas as componentes comuns dos espectros de CD da proteína analisada e a porcentagem que as mesmas representam no espectro[67].

Os espectros CD foram coletados a temperatura controlada de 25°C utilizando o espectropolarímetro JASCO J-720 (JASCO Corporation, Tóquio, Japão) na faixa de 195 a 245 nm em cubetas cilíndricas de quartzo de caminho óptico de 1 nm. Os espectros de CD foram tipicamente recuperados empregando-se médias de 8 varreduras. As contribuições dos tampões obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros foram corrigidos a fim de eliminar qualquer efeito de ruído. Os espectros originais foram filtrados com Transformadas de Fourier, preservando as bandas típicas de cada espectro. Em todos os casos, eles foram obtidos em elipticidade (θ) e, convenientemente transformados em elipticidade molar ([θ]).

A solução protéica proveniente da purificação, foi utilizada para analisar a integridade das estruturas secundárias nas condições de extração e monitorar as possíveis mudanças conformacionais induzidas por influência do pH e temperatura através das medidas de CD. Ensaios de variação de temperatura para o intervalo de 20 a 80°C e concentração de 2,5 µM de enzima foram realizados para obtenção do T_m com a proteína com e sem celobiose (40 mM).

O pH de uma solução é uma das características mais comuns que podem gerar mudanças conformacionais em uma proteína. Para observar essas possíveis mudanças por influência do pH, amostras da enzima foram incubadas em soluções tamponadas em diferentes pHs. As soluções tampão utilizadas foram: Na_2HPO_4/ácido cítrico para os pHs 2.6, 4.0, 4.5 e 6.0, Na2HPO4/NaH2PO3 para o pH 8.0 e tampão glicina para pH10, todos a 20mM.

Após incubar por 16 horas a endoglucanase nos diversos pHs, os espectros de CD foram coletados a 25°C em cada um dos tampões com pH variando de 2.6 a 10.

3.8.2 Espectroscopia de Fluorescência – variação de pH

A espectroscopia de emissão de fluorescência estática também é largamente usada no estudo de proteínas e peptídeos para fornecer informações relacionadas as vizinhanças dos grupos fluorescentes (fluoróforos naturais), que em proteínas são os aminoácidos aromáticos: Phe, Tyr e Trp (Figura 9). A fluorescência destes resíduos é altamente sensível ao ambiente em que se encontram, portanto, monitorar suas alterações pelos parâmetros da espectroscopia de fluorescência, tais como posição do máximo de emissão ($\lambda_{máx}$) e mudanças no rendimento quântico (ϕ_F) devido a ação de solventes, ligantes e pH, sugerem discretas mudanças conformacionais sofridas nas vizinhanças dos fluoróforos[68].

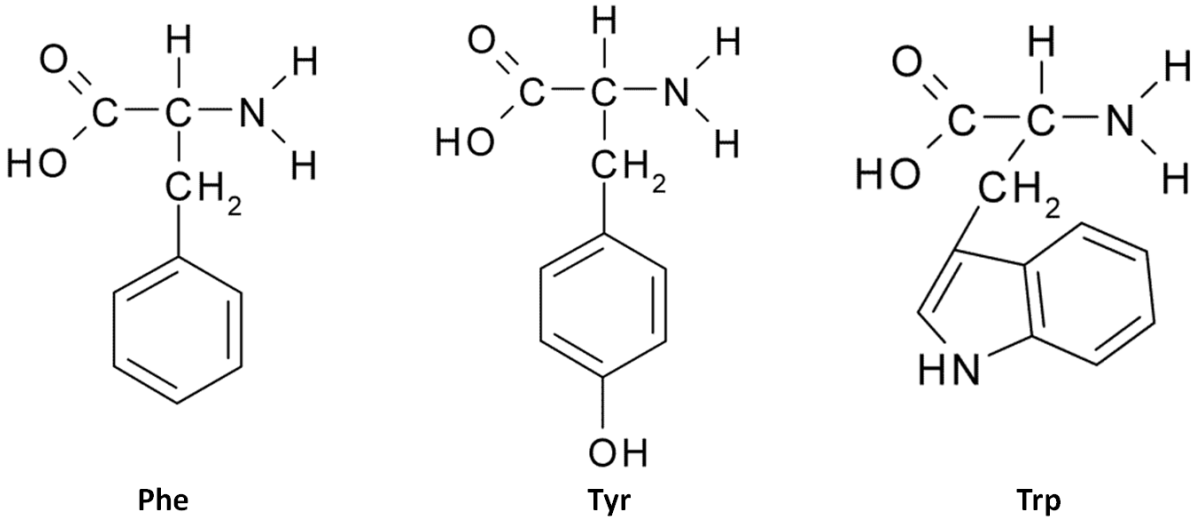


Figura 9 – Aminoácidos aromáticos que possibilitam os ensaios de espectroscopia de emissão de fluorescência.

As medidas de emissão de fluorescência da endoglucanase foram realizadas em um espectrofluorímetro K2 (ISS Inc Champaign, IL – EUA) com temperatura controlada a 25°C, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Amostras foram excitadas a 295 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm. A fim de minimizar o efeito do espalhamento de luz, os

espectros de emissão de fluorescência dos tampões foram subtraídos dos espectros da amostra.

As condições do ensaio, como concentração de enzima, tampões e pHs utilizados para este caso foram as mesmas para a realização dos ensaios de CD.

3.9 Ensaios de Cristalização

A cristalização de proteínas é uma das mais importantes ferramentas para estudos estruturais destas macromoléculas que envolve uma sequência de eventos complexos intimamente relacionados para a obtenção dos cristais. Para os ensaios de cristalização é necessário que o sistema contendo a proteína de interesse em alto nível de pureza seja levado gradualmente a um estado de supersaturação para que ocorra a nucleação (formação de pequenos agregados ordenados) e posteriormente o crescimento de cristais[69-70].

Para os ensaios de cristalização, utilizamos dois métodos clássicos baseados em sistemas de difusão de vapor: “Gota Suspensa” e “Gota Sentada” (Figura 10). Nessas técnicas uma pequena gota de proteína é misturada com um volume igual ou similar de solução de cristalização (formada usualmente por tampão, sal e precipitante). Para a técnica de gota pendurada, a gota é colocada sobre uma lamínula siliconizada, a qual é invertida e selada sobre um reservatório contendo uma solução de cristalização. Para a técnica de gota sentada, a gota fica depositada em um poço. A diferença de concentração entre a gota e o reservatório direciona o sistema no sentido de um equilíbrio de concentração entre a gota e a solução do reservatório. Isso ocorre por difusão através da fase de vapor da solução menos concentrada para a de maior concentração [71].

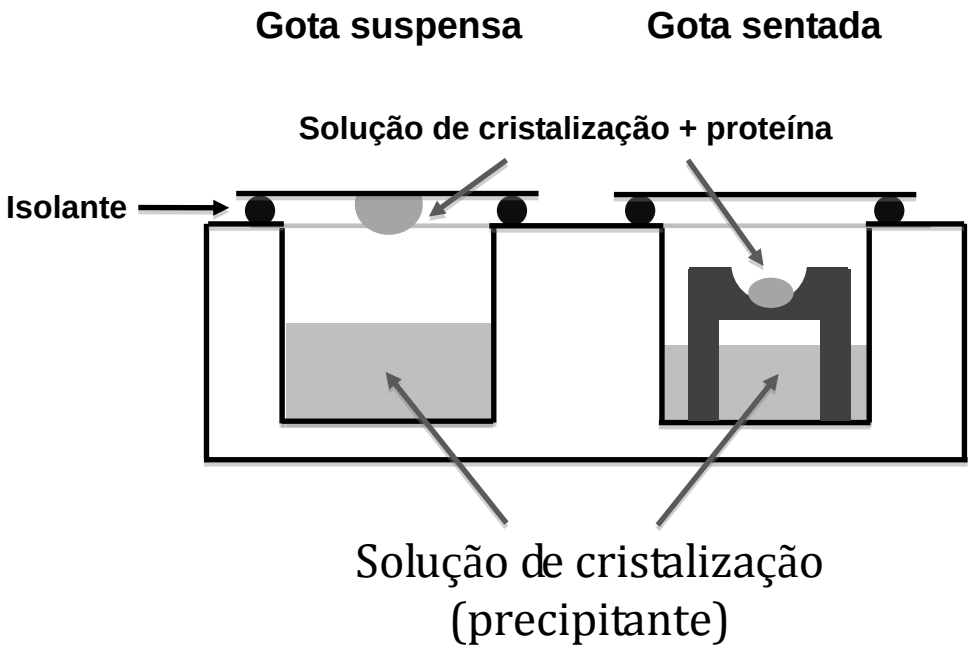


Figura 10 - Técnicas de difusão de vapor utilizadas na cristalização de macromoléculas.

A identificação das condições de cristalização da endoglucanase estudada foi feita inicialmente com a enzima concentrada (8 mg/mL em tampão Tris 50 mM pH 8,0) através de uma triagem utilizando o sistema robotizado Honeybee 931 (Genomic Solutions Inc.). Neste ensaio, que utiliza sistema de gota sentada, foram testados 4 kits de cristalização, o que totaliza 384 condições de cristalização.

Nessa triagem inicial, cresceram pequenos cristais na condição de 0.1 M Tris HCl pH 8.5 e 2.0 M fosfato de amônio dihidrogenado. Com a finalidade de obter cristais maiores esta condição foi reproduzida com a técnica de gota suspensa. Os cristais cresceram a até seu tamanho máximo em aproximadamente 15 dias. Todos os experimentos de cristalização foram feitos sob temperatura controlada a 18°C.

3.10 Coleta de Dados e Processamento

Os cristais que mostraram-se visualmente melhor formados foram submetidos a difração de raios-X em três equipamentos diferentes. Inicialmente foram testados cristais no Laboratório de Cristalografia do IFSC, que dispõe de um anodo rotatório modelo UltraX 18 (RIGAKU/MSC) com detector tipo placa de imagem modelo Mar345dtb (MAR Research). Também foram testados cristais nas linhas MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas – SP)[72] e na linha X25 do *Brookhaven National Laboratory* (BNL, Upton – NY). Todos os cristais foram testados em temperatura criogênica (100 K), crioprotegidos com adição de etilenoglicol 20% (V/V) da solução de cristalização em que o cristal foi obtido.

A indexação das primeiras imagens e estratégia de coleta de dados foram realizadas com o programa iMOSFLM[73] do pacote CCP4[74]. Nessa etapa, foram determinados os parâmetros de cela e escolhido o grupo espacial, baseando-se no grupo com maior simetria e menor penalidade. A estratégia de coleta foi orientada de acordo com o grupo espacial, verificando-se a presença de *overlaps* e a distância da placa e tempo de exposição foram otimizados para maximizar a qualidade dos resultados. Após a coleta dos conjuntos de dados, as imagens foram indexadas e integradas com o programa iMOSFLM[73] e o escalonamento foi realizado com o programa SCALA[75], ambos do pacote CCP4[74]. O número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente foram estimados utilizando-se o programa Matthews_coeff do CCP4[74].

A estrutura foi determinada por substituição molecular, utilizando-se o programa Phaser[76], também pertencente ao pacote CCP4, utilizando como modelo a estrutura com identidade sequencial de 47% depositada no banco de dados PDB (Protein Data Bank – www.pdb.org) com código de acesso 2ZUM[61]. Após obtenção das fases iniciais, o modelo foi refinado com a finalidade de encontrar concordâncias entre os fatores de estrutura calculados (F*c*) e observados (F*o*), que normalmente é representado diretamente pelo denominado R_{fator}. Normalmente os fatores de estrutura teóricos (F*c*), calculados com base no modelo inicial, apresentam baixa

concordância com os fatores de estrutura encontrados experimentalmente (F*o*). Semelhante ao R_{fator}, acompanhamos e analisamos também o R_{free}, que relaciona os fatores de estrutura observados e calculados a partir do modelo e utilizado para validar a qualidade da estrutura de forma independente e imparcial ao processo. O refinamento consiste em ajustar o modelo buscando a melhor concordância dos fatores de estrutura calculado e observado através de mudanças nos parâmetros posicionais. O refinamento foi realizado com programa PHENIX[77] (espaço recíproco) intercalando com revisões e ajustes do modelo com o mapa de densidade eletrônica de forma manual usando o programa gráfico Coot[78] (espaço real). As imagens foram produzidas utilizando o programa Pymol (De Lano Scientific).

4 Resultados

4.1 Expressão de Endoglucanases

Quatro meios de cultura foram utilizados para indução de endoglucanases: LB, MMXO e MMXO substituindo glicose por celulose microcristalina (Avicel) e carboximetilcelulose (CMC).

Com estas variações, observamos que entre um meio mínimo e um mais rico em relação aos nutrientes não havia grandes diferenças. Já em relação à adição de compostos celulósicos (Avicel e CMC), estes não mostraram melhoras em relação a expressão e atividade enzimática (Figura 11).

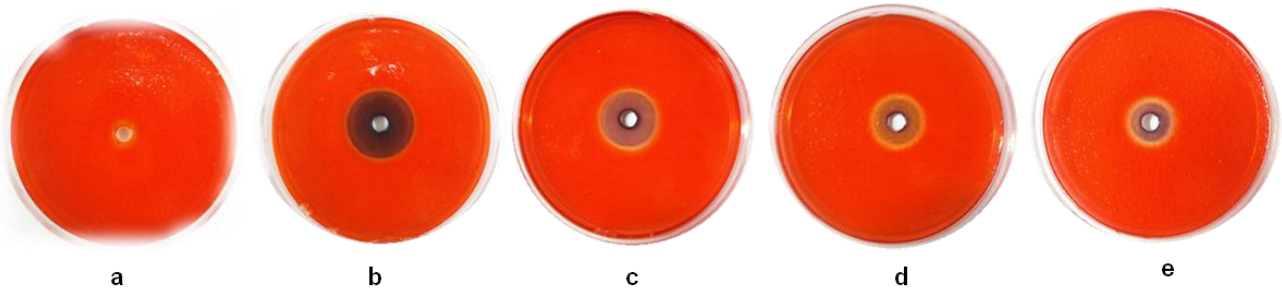


Figura 11 – Ensaios enzimáticos comparativos em placas de CMC coradas com vermelho de congo mostrando atividade enzimática para os diferentes meios de cultura testados: (a) Controle (b) LB, (c) MMXO, (d) MMXO + Avicel e (e) MMXO + CMC.

Sendo o tamanho do halo diretamente proporcional a atividade enzimática, o meio escolhido para o cultivo da bactéria foi o LB, já que este, além de ser largamente conhecido e utilizado, mostrou resultados satisfatórios para obtenção de celulases. Tal característica provavelmente está relacionada ao fato de que o meio de cultura LB é um meio nutricionalmente mais rico em relação ao MMXO que permite uma concentração de células maior e, portanto possibilita a ativação do *quorum sensing* de Xanthomomas que está relacionado ao fator de virulência incluindo as endoglucanases.

4.2 Identificação da Endoglucanase Majoritária

Definido o meio de expressão para celulases, buscamos a endoglucanase de interesse em meio as demais proteínas extracelulares apresentadas e verificadas por SDS-PAGE (Figura 12a) . Com este objetivo iniciamos a identificação através de zimogramas (Fig. 12b).

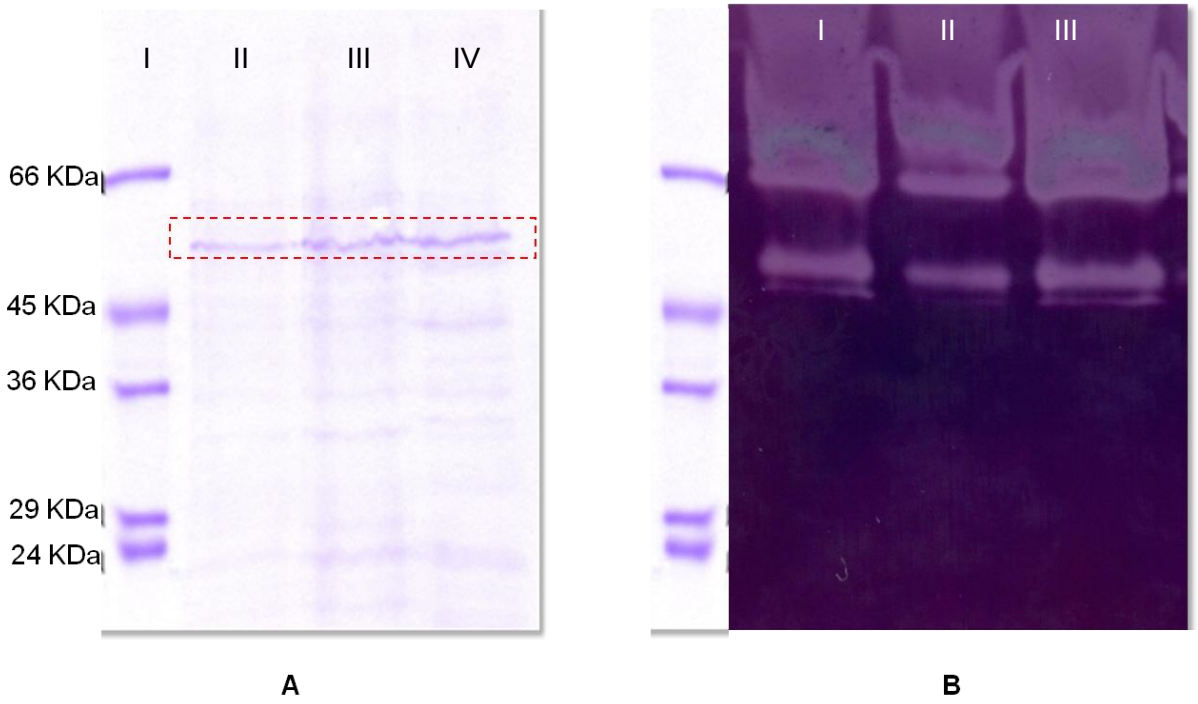


Figura 12 - (a) SDS-PAGE: (I) Marcador molecular (II, III e IV) Proteínas extracelulares totais em diferentes concentrações em condições desnaturantes. (b) Zimograma identificando regiões onde há enzimas (em condições não desnaturantes) com atividades para CMCase para as diferentes concentrações de proteína identificadas por I, II e III.

Conhecendo a sequência da proteína de interesse, que possibilita o cálculo de sua massa molecular teórica (49.5 kDa) e unindo aos dados do zimograma e SDS-PAGE contendo extrato total de proteínas, chegamos próximo a afirmar que a endoglucanase majoritária foi localizada (destacada em vermelho na Figura 13), porém, para confirmar, utilizamos espectrometria de massas da amostra digerida por tripsina. A análise por espectrometria de massas possibilitou cobertura de grande parte da sequência da proteína (aproximadamente 55%) e obtenção de dados suficientes para dar certeza de que a Endoglucanase havia sido encontrada com *Score* de 1146 (Figura 13).

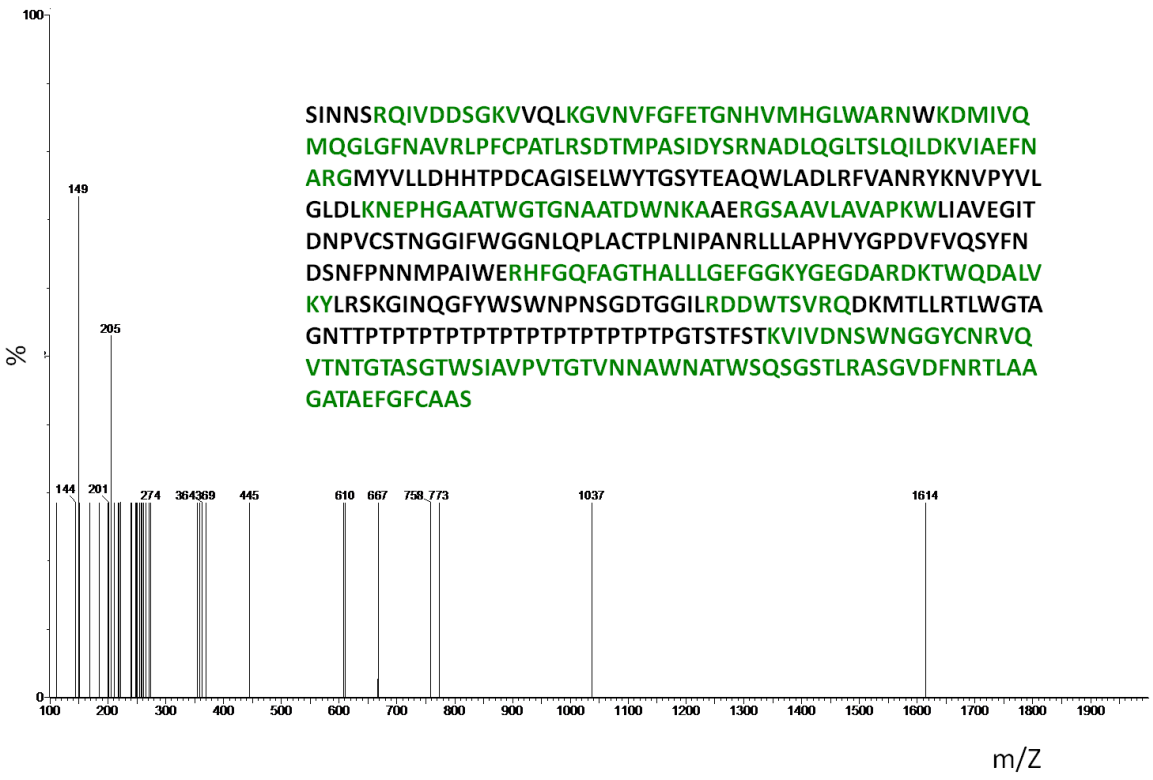


Figura 13 - Espectro de massas com peptídeos identificados. A sequência primária da proteína encontra-se em destaque com os resíduos identificados por espectrometria de massas destacados em verde.

Com este resultado passamos a afirmar que a endoglucanase majoritária de *Xcc* foi identificada entre aquelas expressas e apresentadas no meio extracelular do cultivo.

4.3 Purificação da Endoglucanase

Com a enzima identificada, foi possível partir para o passo de purificação. Impossibilitados de utilizar cromatografia líquida como primeiro passo, já que nesse

ponto as proteínas encontram-se junto a goma xantana, a purificação baseou-se inicialmente em precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações.

Notamos que ao precipitar o extrato total de proteínas com 20%, grande parte dos contaminantes eram eliminados, e posteriormente aumentando a concentração de sulfato de amônio para 40% a endoglucanase encontrava-se parcialmente purificada e já sem a presença de goma xantana, permitindo o uso de colunas cromatográficas.

A finalização da purificação da enzima foi feita utilizando uma coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25 Superfine – GE, 5ml), apresentando basicamente dois picos de absorbância a 280 nm. A enzima pura encontra-se no segundo pico, num volume de aproximadamente 10 mL. O primeiro pico (cerca de 3 mL) ainda apresenta a Endoglucanase em quantidade bem menor, porém com os contaminantes (Figura 14). Ao término da purificação, obtivemos um rendimento de aproximadamente 1 mg de Endoglucanase pura por litro de cultura, o que representa cerca de 3% do total de proteínas secretadas.

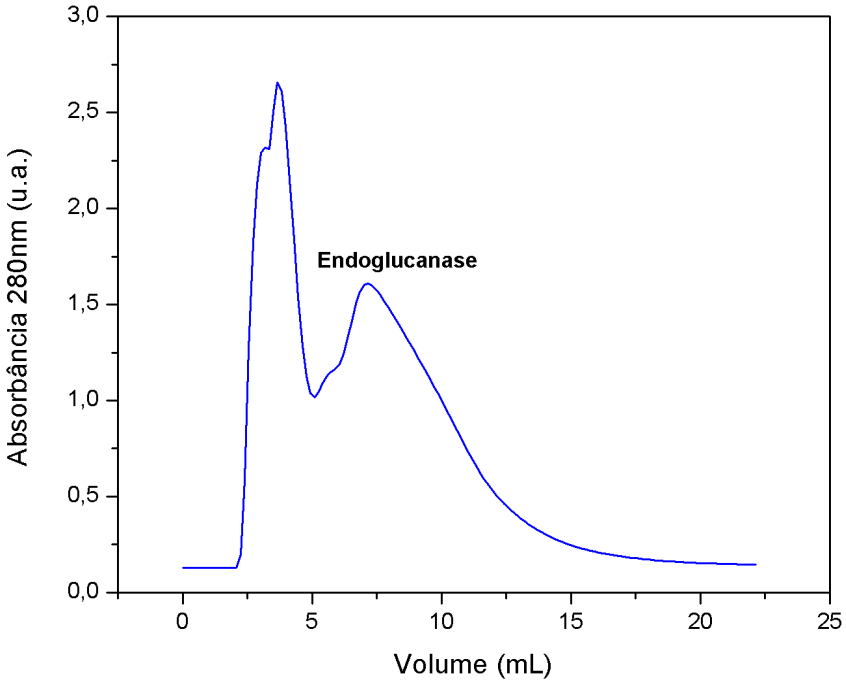


Figura 14 – Cromatograma de exclusão molecular para purificação da endoglucanase majoritária de *Xcc* (identificada no segundo pico).

A figura 15 mostra de maneira resumida os dois passos necessários para a purificação da enzima.

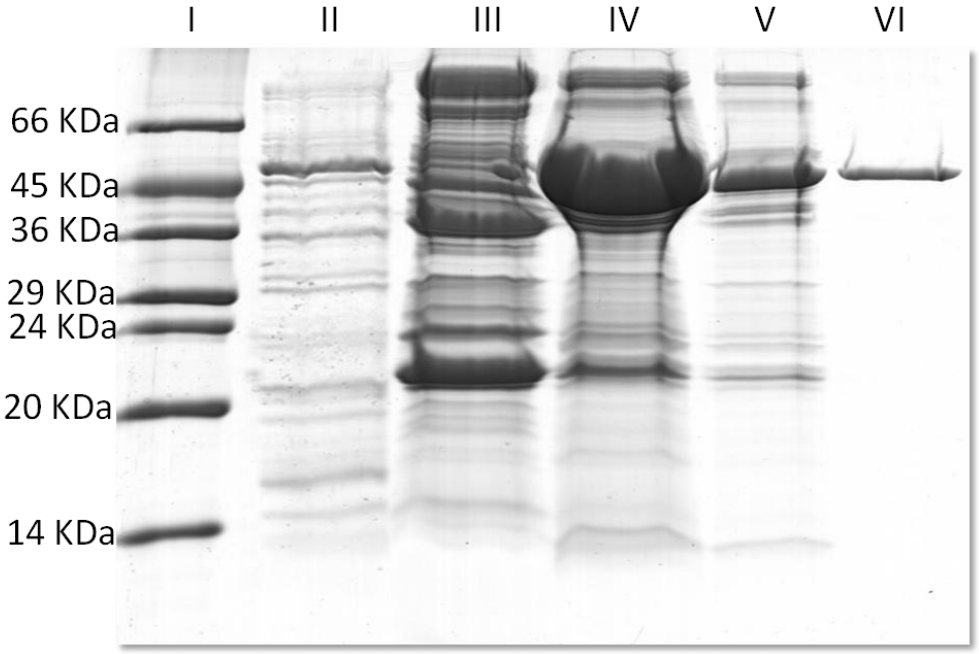


Figura 15 - SDS-PAGE com passos de purificação – I: Marcador Molecular; II: Extrato total de proteínas extracelulares de *Xcc*; III: proteínas precipitadas com 20% de sulfato de amônio; IV: proteínas precipitadas com 40% sulfato de amônio; V: primeiro pico da cromatografia de exclusão molecular; VI: segundo pico da cromatografia de exclusão molecular mostrando a endoglucanase majoritária purificada.

4.4 Determinação das condições ótimas de temperatura e pH para atividade da Endoglucanase

4.4.1 pH ótimo

Com o ensaio realizado variando o pH de 2.0 a 10.0 calculamos a atividade relativa entre cada um dos pHs analisados para o ensaio de CMCase. Com esses dados plotamos uma curva a fim de demonstrar de forma mais clara a influência do pH na reação (Figura 16).

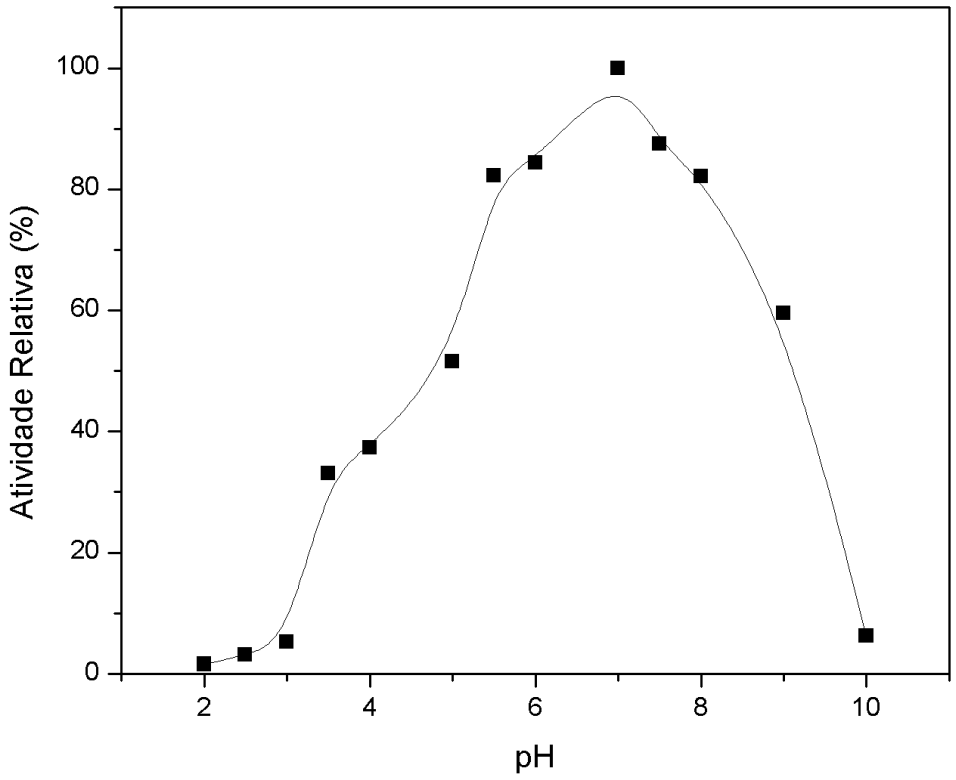


Figura 16 – Influência do pH para a atividade de CMCase para endoglucanase de *Xcc.*

Através do gráfico (Figura 16) podemos concluir que o melhor pH para a atuação da endoglucanase é o pH 7.0, porém, se analisarmos um pouco melhor esta curva notamos que no intervalo de pH 4.5 a 9.0 ainda verificamos significativa

atividade variando em aproximadamente 50%, o que nos leva a dizer que a enzima possui uma boa faixa de estabilidade e atuação para pH.

4.4.2 Temperatura ótima

Da mesma forma feita para a análise de pH, utilizamos um ensaio variando a temperatura de 30 a 80°C e calculamos a atividade relativa para cada uma das temperaturas analisadas para o ensaio de CMCase e então construímos uma curva de atividade para determinar a temperatura ótima da enzima (Figura 17).

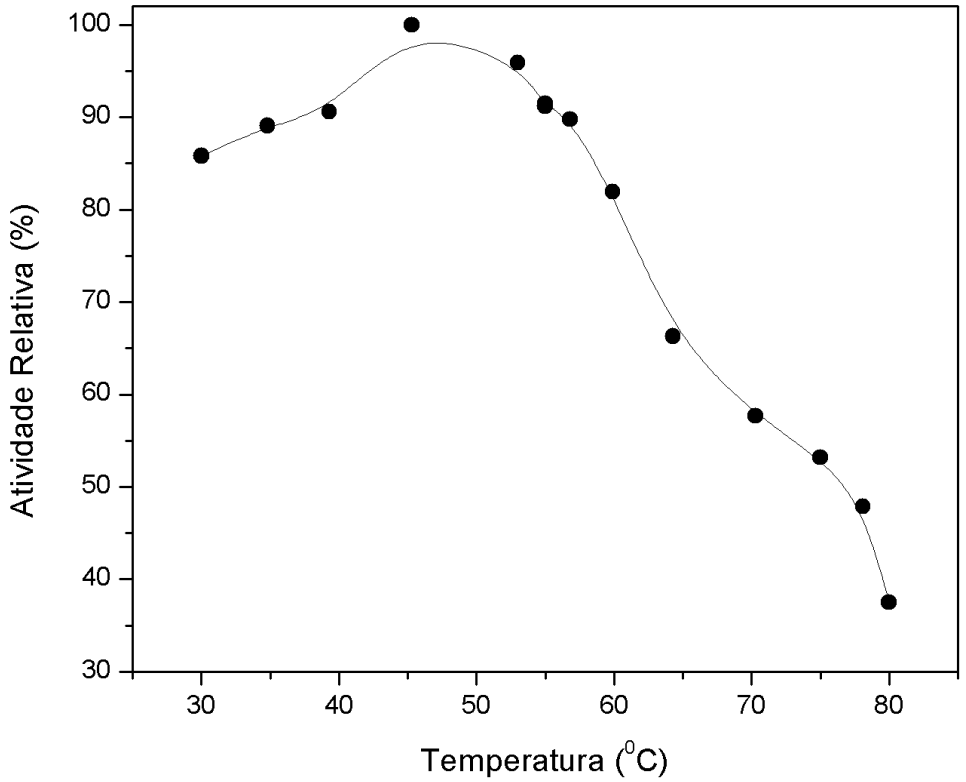


Figura 17 – Influência da temperatura para a atividade de CMCase para endoglucanase de *Xcc.*

A curva mostrada na Figura 17 que demonstra a influência da temperatura para a atividade de CMCase da enzima, revela que a temperatura ótima para sua atuação é de 45°C. Além da temperatura ótima, podemos notar que a proteína apresenta atividade em uma grande faixa de temperatura sem grandes perdas, já que entre 30 e 60°C a atividade em relação a temperatura ótima cai menos de 20%, para temperaturas até 70°C observamos uma queda de aproximadamente 40% da atividade, e ainda a 80°C é possível observar atividade considerável da enzima para uma temperatura tão alta.

4.5 Cinética enzimática

Determinados a temperatura e pH ótimo para a atuação da endoglucanase, a concentração de enzima e tempo de reação, possibilitamos o cálculo e a determinação das velocidades de reação (produto liberado/tempo de reação) para diferentes concentrações de substrato testadas (0.05, 0.1, 0.25, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5 e 4% (m/v) de CMC de baixa viscosidade). A velocidade inicial encontrada foi relacionada à concentração de substrato para formação da curva de Michaelis e Menten demonstrando o efeito da concentração de substrato na velocidade de formação de produto (Figura 18).

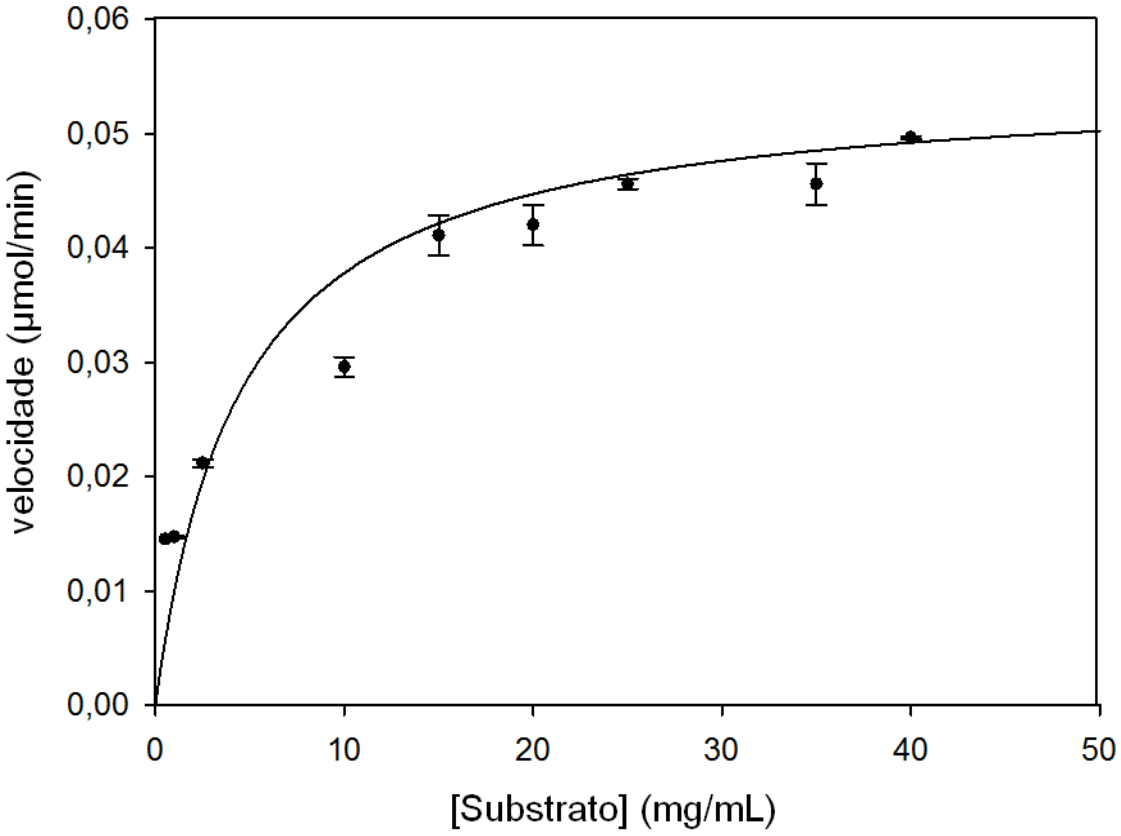


Figura 18 – Efeito da concentração de substrato solúvel (CMC) na velocidade de reação.

Com estes dados, utilizamos o programa SigmaPlot 10.0 para o cálculo dos parâmetros cinéticos da endoglucanase de *Xcc*. Os parâmetros obtidos encontram-se ilustrados na tabela 1.

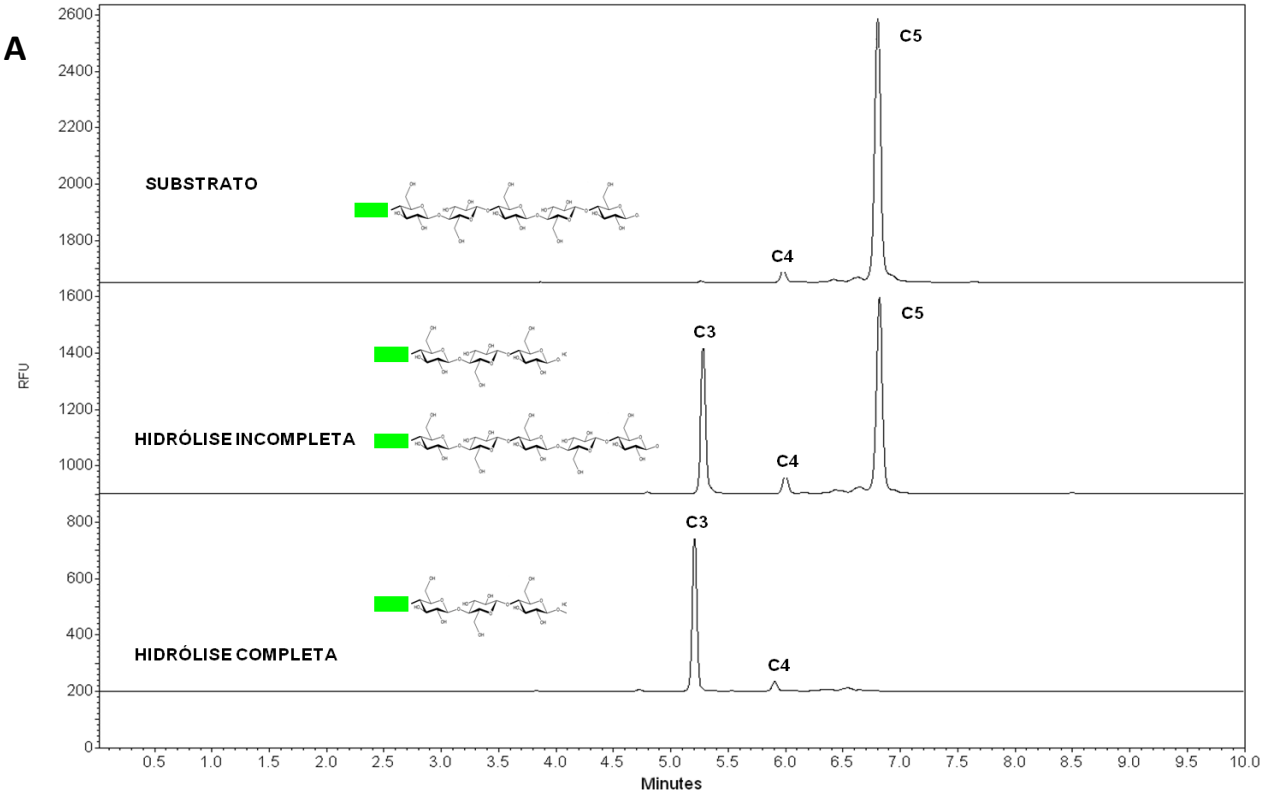
Tabela 1 – Parâmetros cinéticos para Endoglucanase obtidos utilizando CMC como substrato.

	Km ($mg.mL^{-1}$)	Vmax ($\mu mol.min^{-1}.mL^{-1}$)	Kcat (min^{-1})	Eficiência Catalítica ($mL.mg^{-1}.mM^{-1}$)
Endoglucanase	4.50 ± 0.804	0.05 ± 0.00186	273.60	60.80

Estes estudos cinéticos em concentrações saturantes de substrato CMC mostram que a atividade da endoglucanase segue a cinética de Michaelis-Menten na qual, o valores K_m e K_{cat} foram estimados em 4.5 $mg.mL^{-1}$ e 273.60 min^{-1}.

4.6 Eletroforese Capilar

Utilizando a técnica de eletroforese capilar, foi possível verificar a forma de atuação da enzima em cinco substratos diferentes. Inicialmente, dois polissacarídeos formados por 5 e 6 unidades de glicose e marcados anteriormente com APTS foram submetidos a hidrólise enzimática (Figura 20). Já a hidrólise com β-glucano, CMC e Avicel foi realizada e posteriormente, seus produtos foram marcados com APTS (Figura 21), observados através de excitação a 488nm e as emissões coletadas a 520 nm.



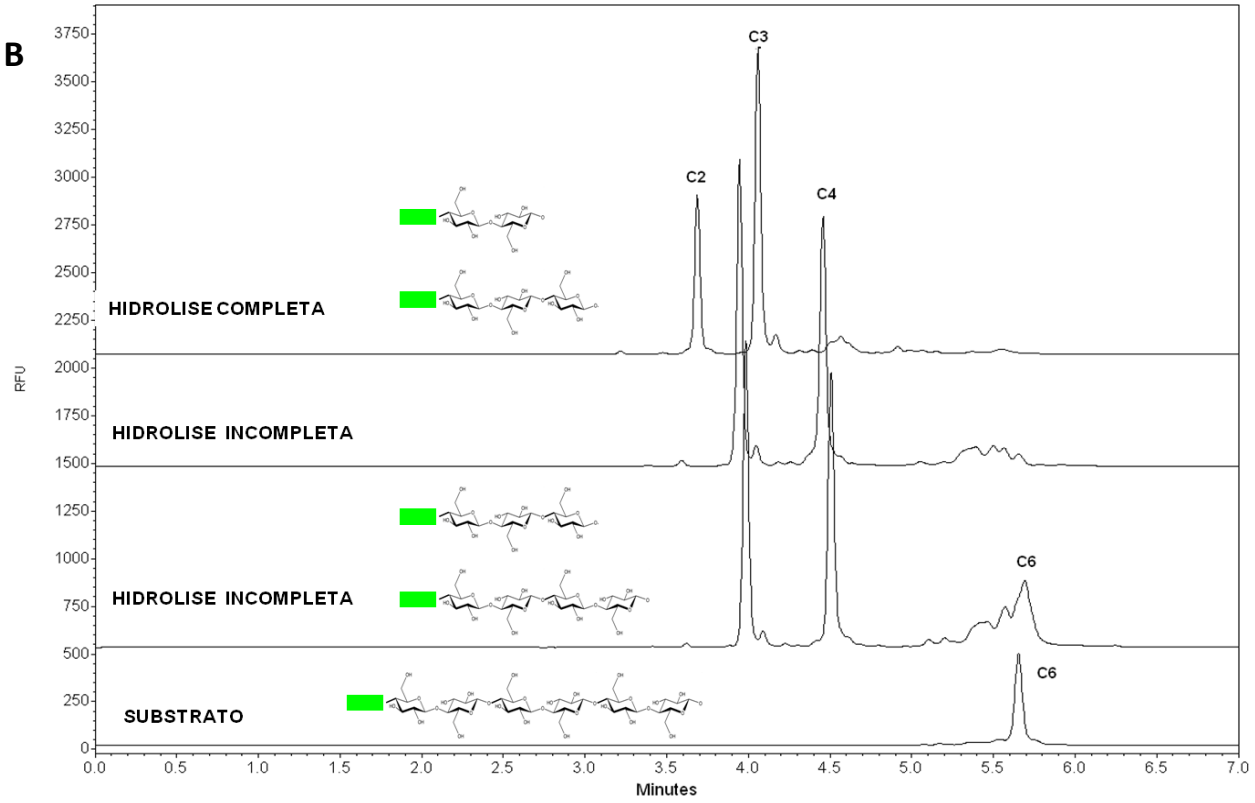


Figura 19 - Espectros de Eletroforese capilar de oligossacarídeos marcados com APTS: Hidrólise incompleta e completa de oligossacarídeo formado por cinco (A) e seis(B) glicoses. Os dois oligossacarídeos estão marcados com APTS pela extremidade não redutora e os símbolos C6, C5, C4, C3 e C2 indicam o grau de polimerização dos oligômeros de glicose.

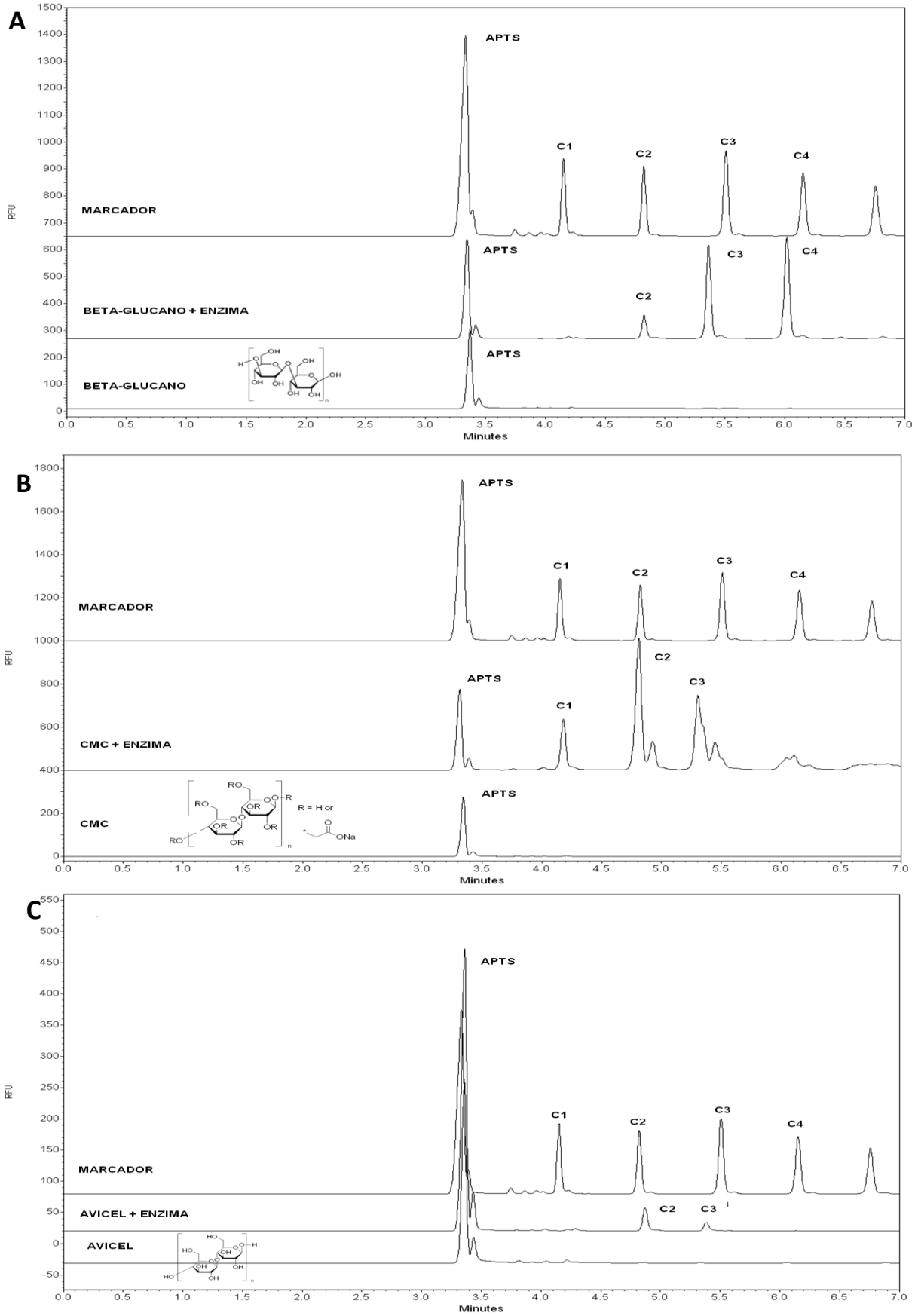


Figura 20 - Espectros de Eletroforese capilar da hidrólise de beta-glucano (A), CMC (B) e Avicel (C) com produtos marcados com APTS. O produto de cada substrato foi marcado posteriormente à hidrólise com APTS. Os símbolos C4, C3, C2 e C1 indicam o grau de polimerização dos produtos em relação a um marcador para oligômeros de glicose.

Com a hidrólise dos substratos mais simples, mostrados na figura 19, podemos observar que o sacarídeo contendo 5 glicoses (C5) foi hidrolisado liberando uma molécula com duas unidades de glicose (C2) e a enzima não foi capaz de hidrolisar o substrato restante, com três glicoses (C3). No caso mostrado na figura 19B, que tem substrato formado por seis unidades de glicose (C6), observamos o mesmo padrão de hidrólise (liberando C2), só que neste caso o substrato restante de quatro unidades de glicose (C4) ainda foi reduzido a C2, porém, o C3 que também foi formado não teve continuidade da ação da enzima. Com o resultado destes substratos simples, é possível concluir que a enzima provavelmente precisa de no mínimo quatro moléculas de glicose para realizar sua catálise, já que nos dois casos, quando o substrato foi reduzido a C3, este se manteve mesmo nos casos em que enzima e substrato ficaram incubados por tempos mais longos.

Nos casos dos ensaios realizados com substratos mais complexos, mostrados na figura 20, notamos padrões de hidrólise diferentes para cada um dos ensaios, o que pode ser justificado pela própria natureza dos substratos, pois estes possuem características estruturais diferentes, como ramificações no caso do CMC e β-glucano e cristalinidade do Avicel. Não é possível observar produtos maiores que os apresentados em função do tempo de corrida realizado para este experimento, mas através dos picos apresentados, notamos que o substrato em que enzima tem menor facilidade de clivar é o Avicel, quando comparado ao β-glucano ou CMC.

4.7 Estrutura de baixa resolução – SAXS

A análise da sequência da endoglucanase através de comparações a banco de dados sugeriu fortemente que a endoglucanase é formada por dois domínios distintos - um domínio menor, de ligação a celulose, (CBM) e um maior, domínio catalítico (Figura 21).

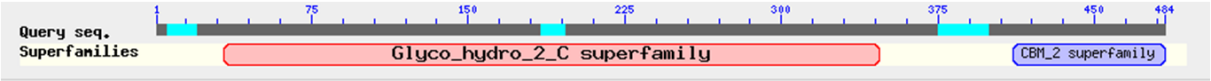


Figura 21 – Supostos domínios conservados detectados através do programa BLASTP 2.2.25+[45].

A fim de verificar estes supostos domínios e também conhecer o estado oligomérico da enzima, coletamos dados de SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron através dos quais determinamos a estrutura de baixa resolução da endoglucanase.

As curvas de SAXS para diferentes concentrações da endoglucanase medida mostraram-se similares. Os dados apresentados são provenientes da amostra a 3.5mg/mL. A curva de SAXS e os ajustes com os espalhamentos simulados para o modelo de corpo rígido (RBM) e para o DAM são mostrados na figura 22. A *p(r)* da endoglucanase é alongada possuindo $D_{máx}$ de 115.00 ± 0.50 Å. A *p(r)* não contém parte negativa no eixo das abscissas, o qual indica ausência de efeitos de interferência produzidas por correlações espaciais inter-partículas (Figura 23).

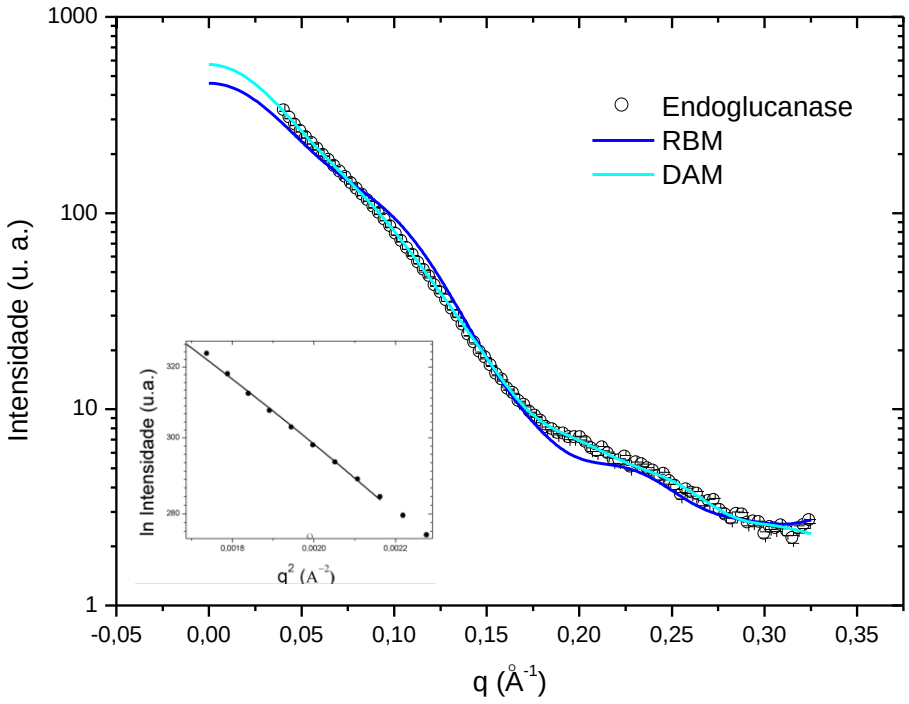


Figura 22 - Curva de espalhamento experimental da endoglucanase de *Xcc (*log I(q) x q) e resultados de procedimento de ajuste. Curva experimental (círculo com barra de erros); intensidade de espalhamento simulado para o DAM (linha azul clara); intensidade de espalhamento simulado para o modelo de corpo rígido contendo os domínios de ligação a celulose e catalítico (linha azul).

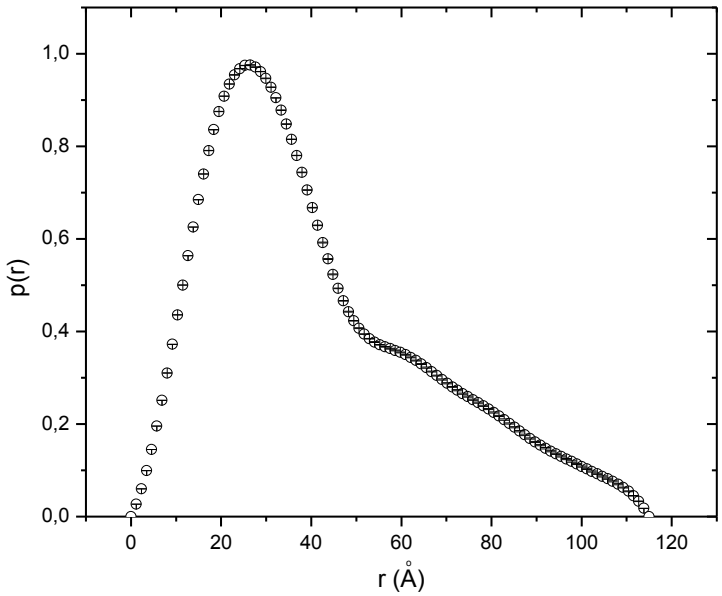


Figura 23 – Função de distribuição de distâncias para os dados experimentais da endoglucanase de *Xcc*.

Com o arquivo de saída (.out) do gnom, rodamos o programa SAXS Mow (http://www.ifsc.usp.br/~saxs/saxsmow.html)[79], que possibilita o cálculo da massa molecular aproximada através da curva experimental e sua *p(r)*. Através deste programa obtivemos massa estimada em 50.9 kDa, o que nos dá uma diferença de apenas 2.8% de acordo com a massa teórica (Figura 24), mostrando a qualidade dos dados experimentais e na determinação das curvas.

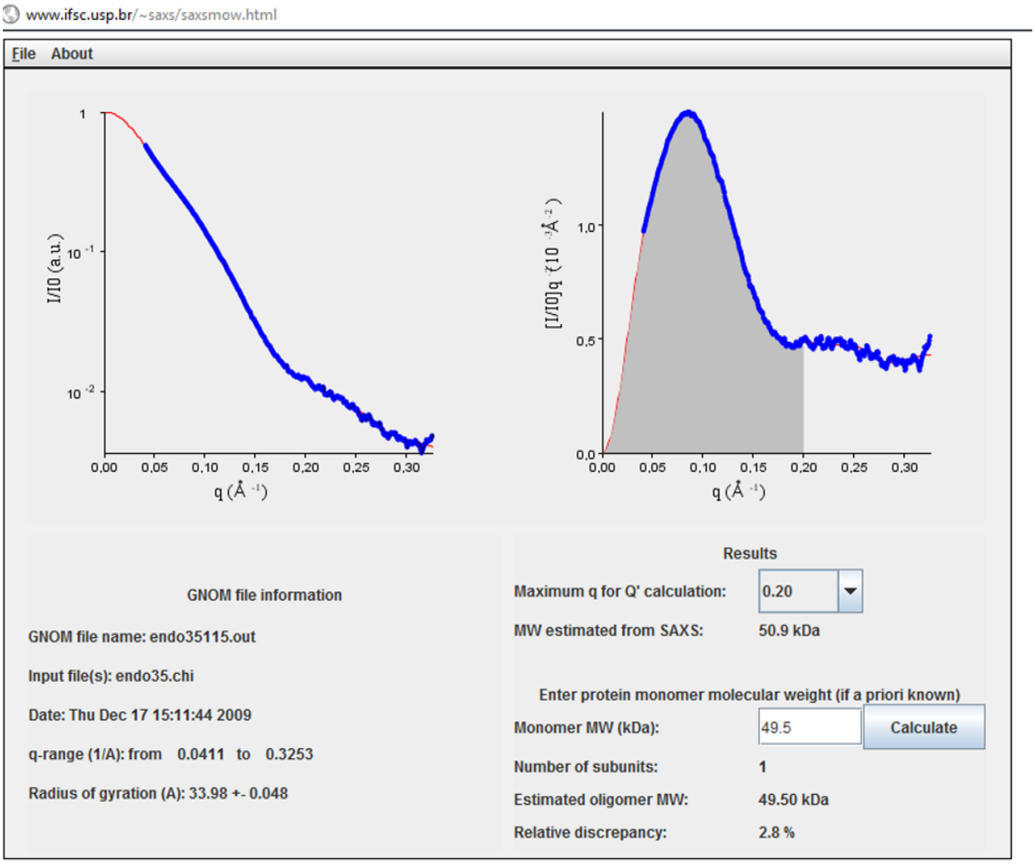


Figura 24 – Janela programa SAXS Mow mostrando as curvas da saída .out do gnom e seus resultados para o cálculo de massa molecular.

Modelo tridimensional (DAM) foi gerado *ab initio* a partir dos dados de SAXS. Para verificar a unicidade do modelo, simulações independentes partindo de diferentes parâmetros iniciais foram realizadas, chegando a resultados consistentes. Finalmente, com os modelos e a sobreposição destes com as estruturas cristalográficas de maior identidade da proteína estudada, verificamos que esta enzima, assim como para outras celulases já descritas principalmente de fungos e

também como desconfiávamos através da sequência analisada, possui dois domínios: catalítico e de ligação a celulose, com uma região entre eles (linker), como podemos verificar através do modelo obtido mostrado na Figura 25.

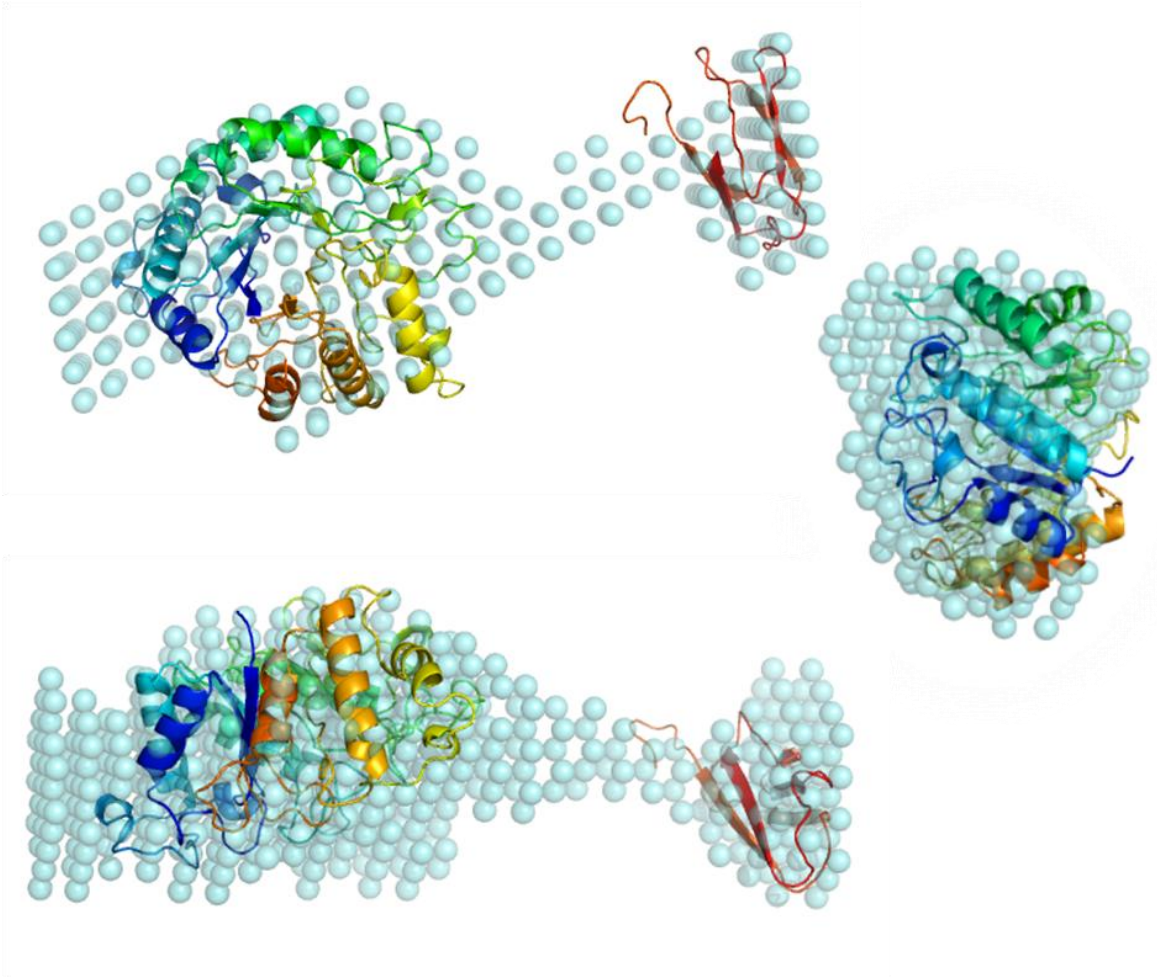


Figura 25 - Sobreposição do modelo de átomos dummy de *Xcc* e dos domínios cristalográficos de maior identidade sequencial dos domínios de ligação a celulose e catalítico. Os modelos cristalográficos foram rotacionados como corpo rígido para ajuste contra os dados de SAXS. A partir do modelo superior à esquerda, os modelos inferior à esquerda e da direita são rotacionados 90º em relação aos eixos y e x, respectivamente.

Os parâmetros estruturais derivados dos experimentos utilizando SAXS para a endoglucanase majoritária de *Xanthomonas campestris pv. campestris* ATCC 33913 estão ilustrados na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros estruturais derivados dos dados de SAXS para a endoglucanase de *Xcc*.

	Exp†	DAM‡	RBM ϕ
D_{max} (Å)	115.0 ± 0.50	116	108.8
R_g (Å)	33.98 ± 0.50	33.19	31.55
Resolução (Å)	19.31	-	-
MW_{SAXS} (kDa) €	50.9	-	-

†Calculados a partir dos dados experimentais.
‡ Parâmetros para modelos de átomos dummy.
ϕ Parâmetros calculados para o modelo de corpo rígido.
€ Calculado a partir do programa SAXSMoW.
Resolution: $2\pi/q_{max}$.

4.8 Desnaturação Térmica usando Dicroísmo Circular

Com a finalidade de encontrar a temperatura de transição do estado enovelado da proteína (T_m) utilizamos ensaios de dicroísmo circular variando a temperatura de 20°C a 90°C na presença e ausência do inibidor (celobiose). Nos dois casos analisados o processo de desnaturação térmica mostrou-se irreversível, uma vez que a proteína aquecida até 90°C não apresentava espectro de CD semelhante ao encontrado no estado nativo, mesmo que resfriando o sistema lentamente até retornar a 20°C. Para o estado nativo, a temperatura de transição do estado enovelado foi de 69.2°C e na presença de celobiose o valor aumentou para 73.1°C, o que mostra que a presença do inibidor ocorre uma possível mudança na estrutura secundária, que favorece uma estabilidade térmica maior para a proteína, aumentando seu T_m em aproximadamente 4°C (Figura 26).

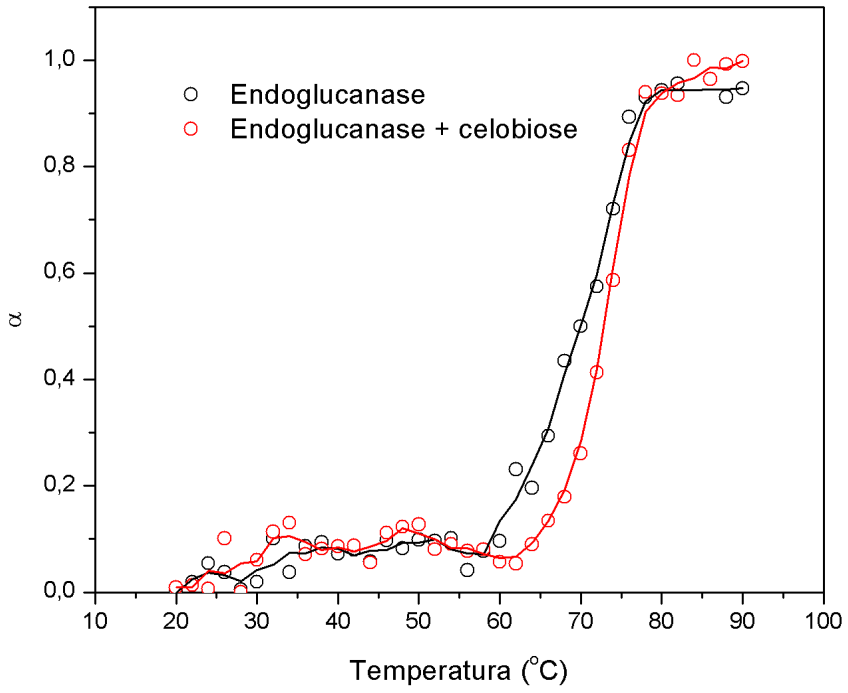


Figura 26 - Influência da celobiose na estabilidade térmica da endoglucanase de *Xcc* monitorada pela técnica de dicroísmo circular. Endoglucanase nativa em preto e Endoglucanase na presença do inibidor (celobiose) em vermelho. O valor da temperatura de transição (T_m) para a enzima com e sem celobiose são respectivamente Tm_{endo_cel} = 73.1°C e Tm_{endo} = 69.2°C.

4.9 Ensaios de estabilidade com variação de pH utilizando CD

A análise dos espectros de dicroísmo circular para cada um dos pHs (Figura 27) demonstraram que a Endoglucanase preserva um enovelamento próximo ao nativo com conformações ligeiramente diferentes quando em pHs mais básicos. Porém, quando observamos a proteína em pHs extremamente ácidos (próximos a 2.5) observamos um decréscimo na elipticidade molar. A redução da elipticidade molar provavelmente indica uma desestruturação da molécula com uma diminuição da estrutura secundária regular. Em pH 2.6 o espectro de CD indica que a proteína

perdeu estrutura regular, pois apresenta um espectro de CD mais próximo a proteínas

com estrutura secundária não-regular, porém, notamos que os mínimos não são muito alterados, o que permite dizer que a enzima ainda não está completamente desnaturada, ou seja, ainda mantém parte de sua estrutura secundária.

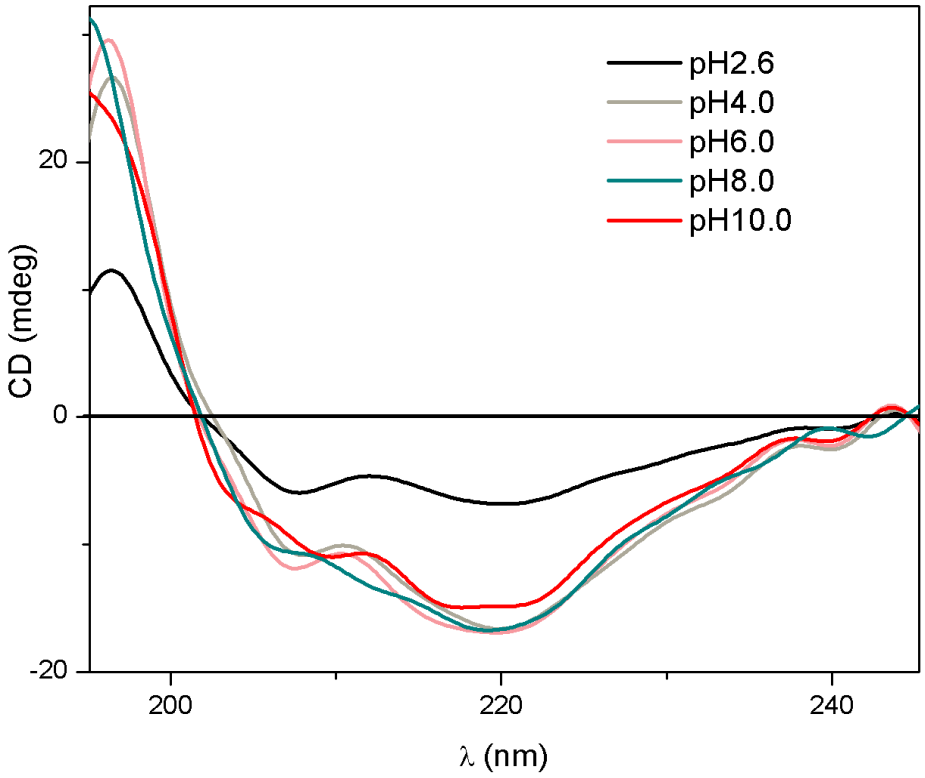


Figura 27 - Efeitos sobre a estrutura secundária através da variação de pH para a Endoglucanase verificada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) Espectros de CD em função do pH. Os valores de pH são 2.6 (preto), 4.0 (cinza), 6.0 (rosa), 8.0 (verde) e 10.0 (vermelho).

4.10 Espectroscopia de Fluorescência – variação de pH

Através da espectroscopia de fluorescência é possível fazer análises da estrutura terciária da enzima em solução, utilizando para isso, medidas de

fluorescência intrínseca empregando os triptofanos da proteína como sondas, já que o espectro de emissão do triptofano é muito sensível ao seu ambiente e pode fornecer informações úteis sobre o estado enovelado da proteína.

Após excitação a 295 nm, o espectro de emissão de fluorescência da Endoglucanase (300 a 450 nm) mostrou para a maior parte dos pHs analisados um comprimento de onda máximo de 335 nm (pHs 4.0, 6.0 e 8.0), porém, há um decréscimo para 334 nm para pH 10.0 e quando em pH extremamente ácido (pH 2.6) o máximo foi obtido em 328 nm (Figura 28). Esse decréscimo revela que neste caso houve uma modificação do ambiente em que o triptofano se encontra em relação aos outros pHs, podendo ocorrer uma internalização ou possivelmente alguma modificação nas cadeias laterais dos resíduos, já que o máximo neste caso foi menor que para as demais análises[68]. Com estas observações, verificamos que os dados obtidos por emissão de fluorescência corroboram com os dados obtidos com dicroísmo circular, já que estes mostram que a enzima tem mudanças estruturais quando em pHs extremamente ácidos.

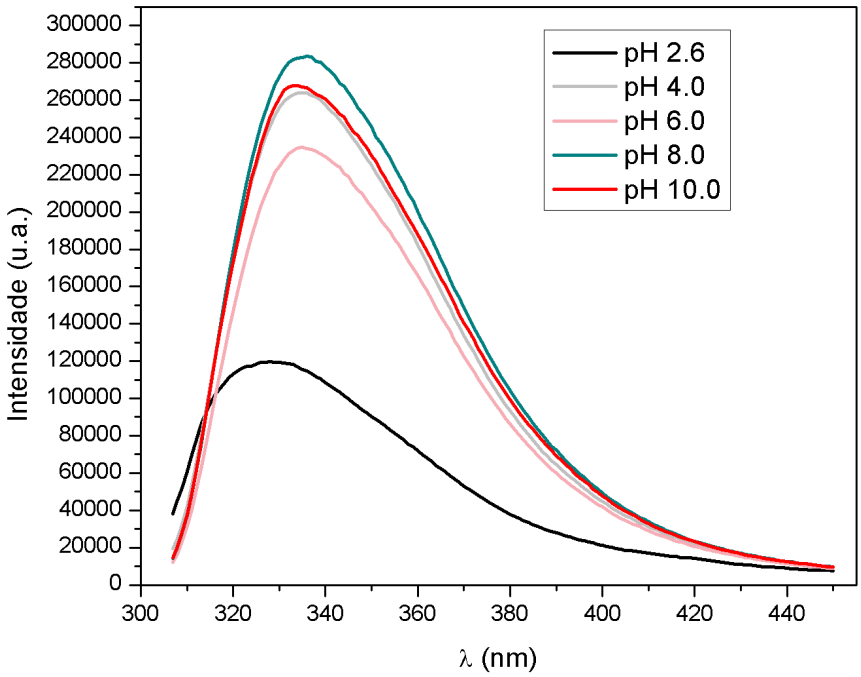


Figura 28 - Espectro de emissão de fluorescencia para os pHs 2.6, 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0 da Endoglucanase.

4.11 Cristalização, Coleta de Dados e Resolução da Estrutura Cristalográfica da Endoglucanase

Ao iniciar os ensaios de cristalização, notamos grandes dificuldades em obter cristais da proteína completa (domínio catalítico-linker-CBM), pois ao manter a enzima a baixa temperatura, esta começa a ser digerida por algum tipo de protease, provavelmente algum contaminante mesmo que mínimo restante da purificação, e após aproximadamente uma semana, observamos através de um SDS-PAGE que a proteína passa de aproximadamente 50 KDa para 36 KDa (Figura 29), sendo esta diferença (14 KDa) próxima ao tamanho do linker e CBM juntos. Assim, conduzimos os testes de cristalização utilizando esta nova amostra contendo apenas o domínio catalítico da Endoglucanase.

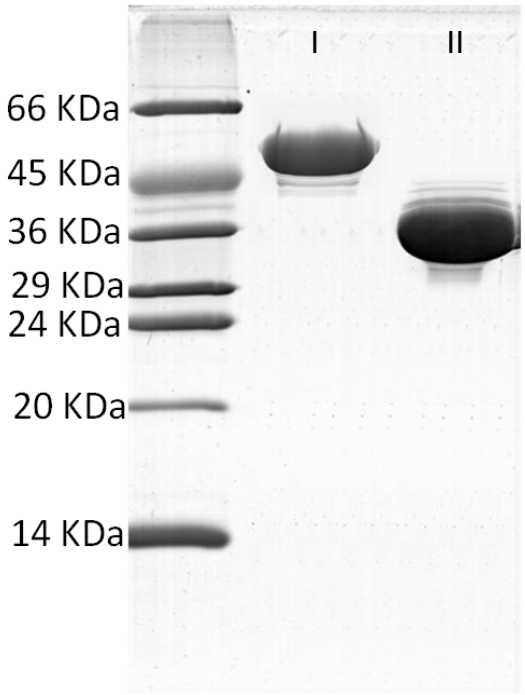


Figura 29 - Gel SDS-PAGE apresentando a diferença de tamanho entre a Endoglucanase completa (I) e seu domínio catalítico isolado (II).

Após um *screening* com kits de cristalização disponíveis em nosso laboratório, foi obtida uma solução de cristalização na condição de foi 0.1 M Tris HCl pH 8.5 e 2.0 M fosfato de amônio dihidrogenado, que apresentou pequenos cristais quando em gota sentada e posteriormente realizando os ensaios em gota suspensa obtivemos cristais mais adequados para iniciar coletas (Figura 30).

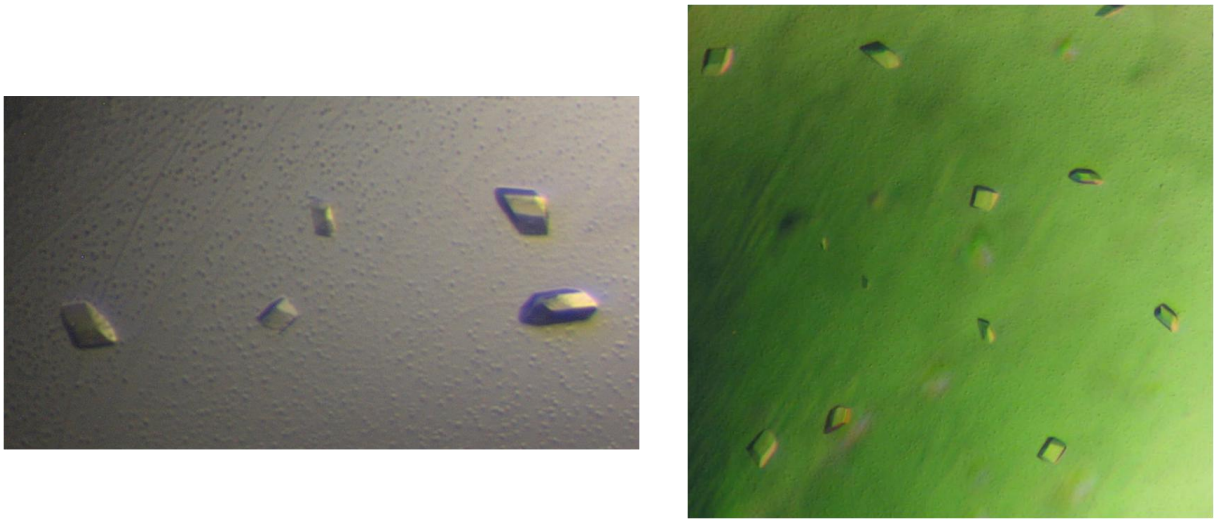


Figura 30 - Cristais da Endoglucanase que cresceram em condição Tris HCl 100 mM pH 8.5 e 2.0 M fosfato de amônio dihidrogenado.

Previamente a coleta de dados, os cristais foram colocados em uma solução crioprotetora com a mesma composição da solução em que o cristal foi formado contendo 20% de etilenoglicol. Os cristais foram coletados no ânodo rotatório UltraX 18 (RIGAKU/MSC) do IFSC, na linha MX2 do LNLS[72] e também na linha X25 do *Brookhaven National Laboratory* (BNL, Upton – NY). Após o processamento dos três conjuntos de dados, verificou-se que o conjunto com maior resolução foi obtido com a coleta no anodo rotatório, utilizando-se um comprimento de onda de 1,54 Å e esse conjunto foi utilizado para a substituição molecular. A Figura 31 ilustra o padrão de difração dos cristais da Endoglucanase.

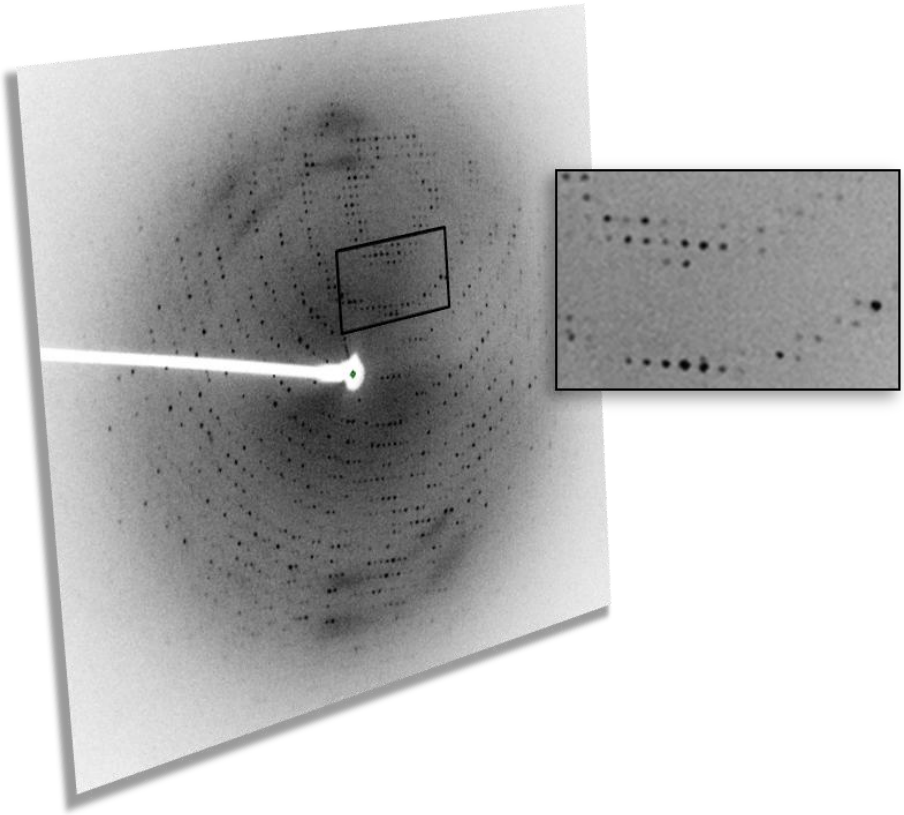


Figura 31 – Padrão de difração para os cristais de Endoglucanase.

As fases iniciais foram determinadas pela técnica de substituição molecular utilizando-se como modelo a estrutura 2ZUM[61] (PDB) através do programa PHASER, ambos os programas pertencentes ao pacote CCP4[80]. (Os refinamentos foram realizados alternando-se ciclos de refinamento no programa Phenix[81] e visualização e construção do modelo com o programa COOT[78].

A estrutura tridimensional da Endoglucanase foi determinada a uma resolução de 2.8 Å. A proteína cristalizou no grupo espacial monoclínico C2 e apresenta quatro moléculas na unidade assimétrica e uma porcentagem de solvente de aproximadamente 68% (Figura 32). A estrutura da Endoglucanase apresentou boa geometria e foram observados 93.80% nas regiões preferidas e nenhum resíduo em regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran (Tabela 3). A completeza obtida foi 100% e obteve-se alta redundância. O conjunto foi refinado a valores de R_{fator} 0.2145 e R_{free} 0.2372. A tabela 3 mostra os parâmetros referentes às estatísticas de coleta e processamento dos dados de difração de raios X da Endoglucanase de *Xcc*.

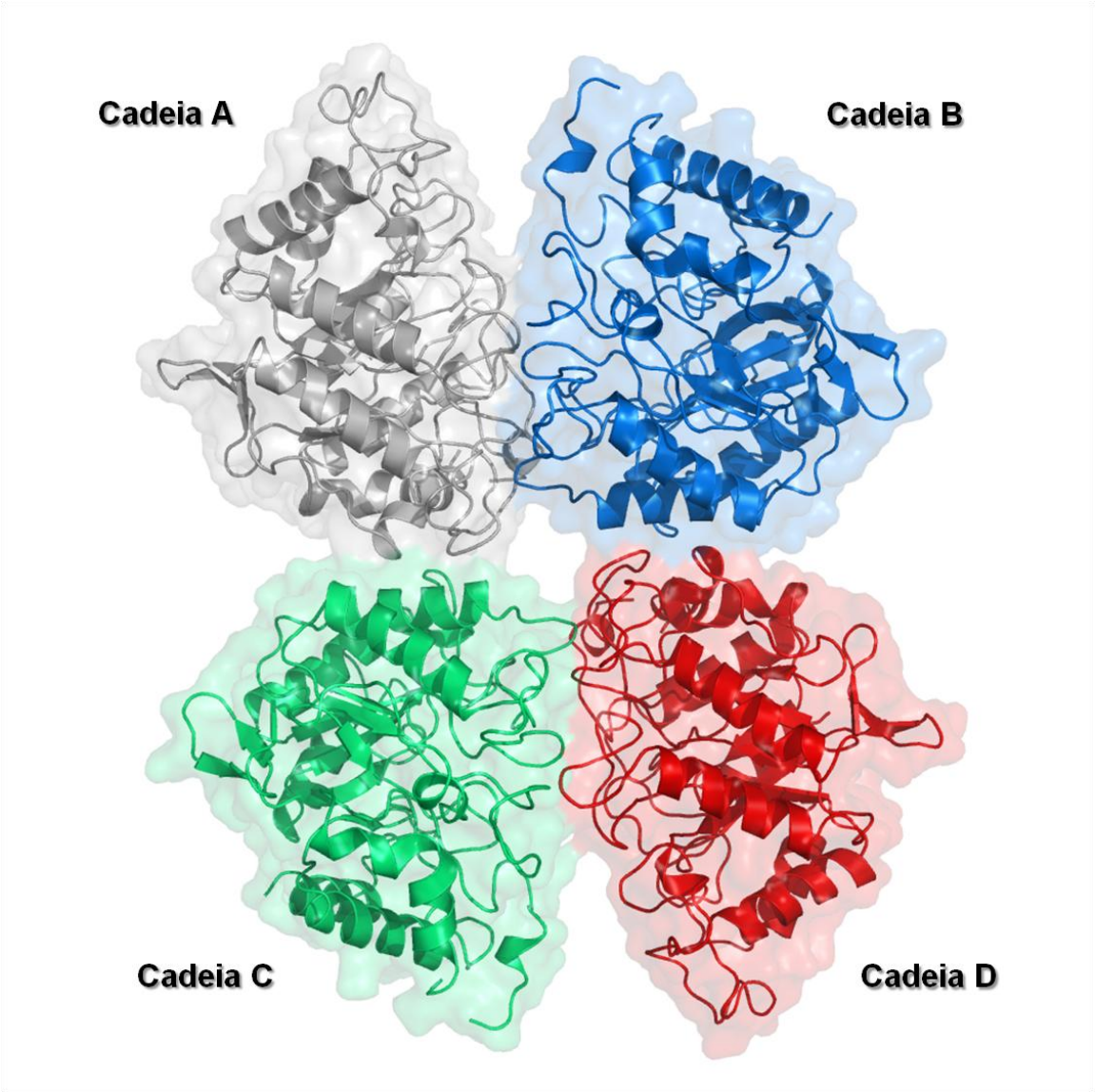


Figura 32 – Disposição e orientação das quatro cadeias apresentadas para a estrutura cristalográfica.

Tabela 3 - Estatísticas cristalográficas: Endoglucanase de *Xcc.*

Coleta de dados	
Grupo espacial	C2
Parâmetros da cela unitária	
a (Å)	174.59
b (Å)	141.36
c (Å)	107.79
β	110.44
N^{o}. de moléculas na unidade assimétrica	4
Resolução (Å)	66.27-2.8 (2.95-2.8)
Comprimento de onda (Å)	1.54
Reflexões únicas	60359 (8817)
R_{merge} (%)[a]	0,10 (0.461)
Multiplicidade	3.6 (3.6)
Completeza (%)	100 (100)
(I/σ(I) médio	10 (2.7)
Bfator médio- Wilson plot (Å^2)	65.3
Refinamento	
R_{fator}[b]	0.2145
R_{free}[b]	0.2372
R.m.s.d.	
Distância de ligação (Å)	0.03
Ângulo de ligação (º)	1.2
Ramachandran Plot (%)	
Regiões preferidas	93.80
Regiões permitidas	7.2
Outliers	0

[a] *$R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - (I(hkl)$, onde $I_i(hkl)$ é a intensidade observada para I(hkl) e <I(hkl)> é a média das intensidades. Entre parênteses os valores referentes a camada mais externa de resolução.*

[b] *R factor/ R free = $\sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$ onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observados e calculados; 5% das reflexões foram incluídas nos testes de ajuste para o cálculo do R_{free}.*

O modelo refinado da estrutura do domínio catalítico da Endoglucanase compreende os resíduos 27 a 343. A Endoglucanase pertence a Família 5, que é a maior das famílias das β-glicohidrolases classificadas atualmente, incluindo mais de 60 enzimas de fungos e bactérias, que clivam retendo a configuração do carbono anomérico. Como esperado para essa família, sua estrutura consiste em um barril-TIM, que tipicamente é composto por oito unidades α -hélices e fitas β repetidas, sendo as fitas β internas e paralelas cobertas pelas α-hélices pela parte externa[82]. Estima-se que cerca de 10% das enzimas possuem enovelamento do tipo barril-TIM, o que mostra que este enovelamento é comum entre enzimas[83]. Além disso, muitas das enzimas com este enovelamento são glicosídeo hidrolases[84] que utilizam aspartatos ou glutamatos como resíduos catalíticos para a hidrólise da ligação glicosídica[85].

Além dos elementos do barril, a estrutura apresenta 3 pequenas fitas β antiparalelas na porção N-terminal do barril, que ajudam a fechar a porção amino-terminal do barril e proteger do solvente (Figura 33).

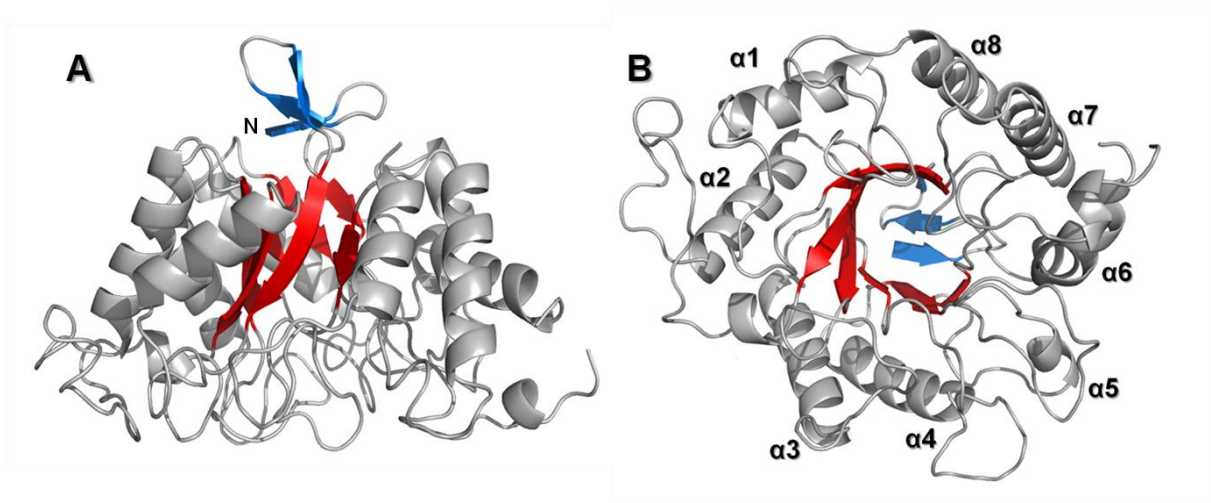


Figura 33 – Cadeia A da estrutura cristalográfica resolvida. A figura B encontra-se rotacionada de 90° em relação a A.

No sítio ativo, os resíduos Arg83, His136, Asn181, Glu182, Glu303, Trp337, Tyr263 e His261 são absolutamente conservados na família GH5 e estão envolvidos nas interações em torno da mólecula de glicose e da ligação glicosídica a ser

atacada durante a clivagem (Figura 34). Dentre os resíduos conservados, o Glu303 tem sido identificado como o nucleófilo na reação de deslocamento[86] e o Glu182[87-88] como o doador de próton. O mecanismo de deslocamento duplo foi originalmente proposto por Koshland (1993)[89] e envolve a ligação do substrato a enzima, seguida por um ataque de um nucléofilo da enzima ao carbono anomérico numa reação de catálise ácida, formando um intermediário glicosídeo-enzima[90]. Esse intermediário é então hidrolisado por um ataque de uma água ao centro do carbono anomérico por uma reação geral de catálise básica, formando o produto e retornando a enzima ao seu estado de protonação original[90].

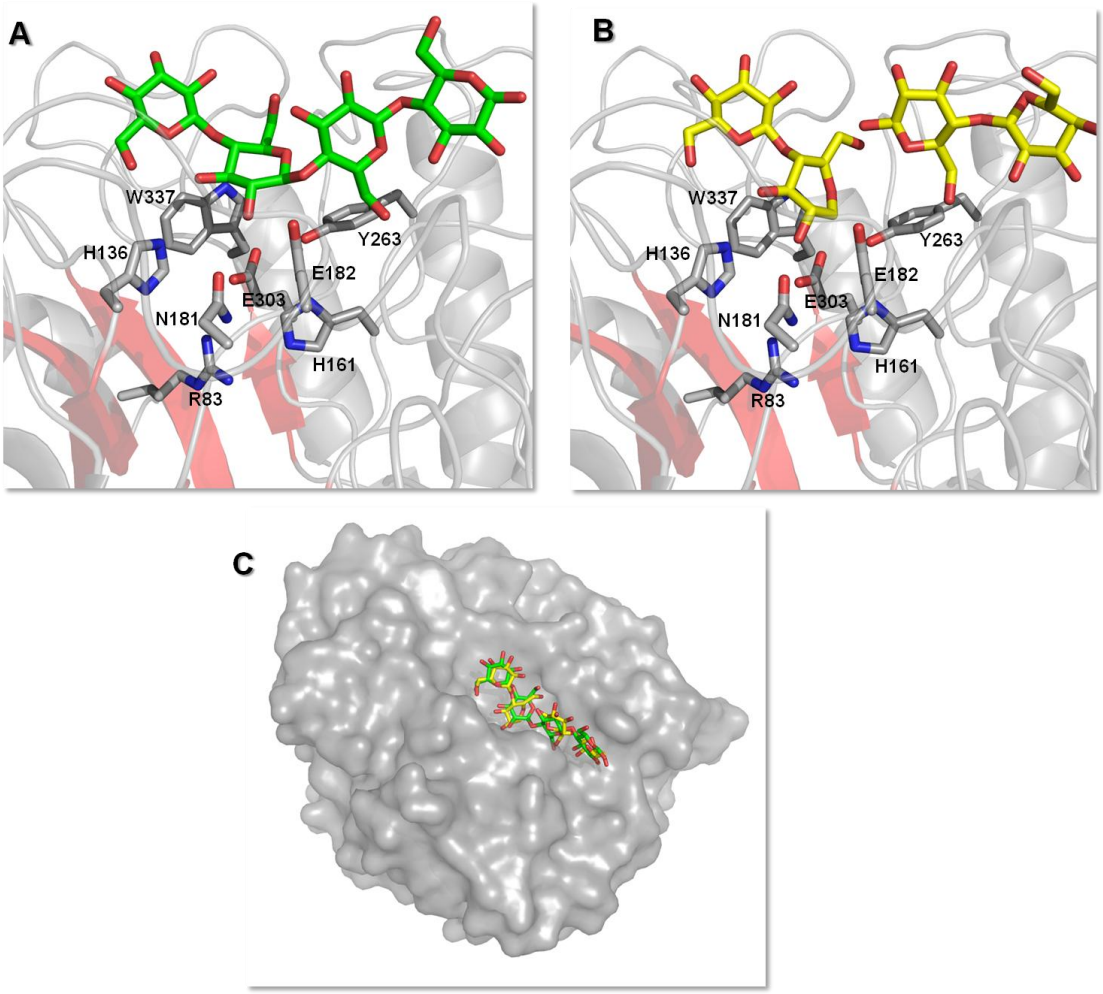


Figura 34 - Sobreposição da estrutura da Endoglucanase com a celotetraose da estrutura da EGAc (PDB:1ECE) (A) e com duas moléculas de celobiose da EGPh (PDB:2ZUM) (B). Os resíduos conservados do sítio ativo envolvidos na clivagem estão mostrados como *sticks* e nomeados. (C) cavidade catalítica com ambos substratos.

A sobreposição da Endoglucanase com a estrutura homóloga do organismo *Pyrococcus horikoshii* (EGPh) (PDB:2ZUM) e com a estrutura de *Acidothermus cellulolyticus* (EGAc) (PDB:1ECE) apresentam um R.m.s.d. (*Root mean square deviation*) de 0.68 Å e 0.85 Å para os C^{α}, respectivamente. Este resultado mostra uma grande similaridade estrutural do domínio barril TIM, porém foram observadas algumas diferenças na região N-terminal, nos *loops* 1 e 2 e nas ligações de dissulfeto (Figura 35).

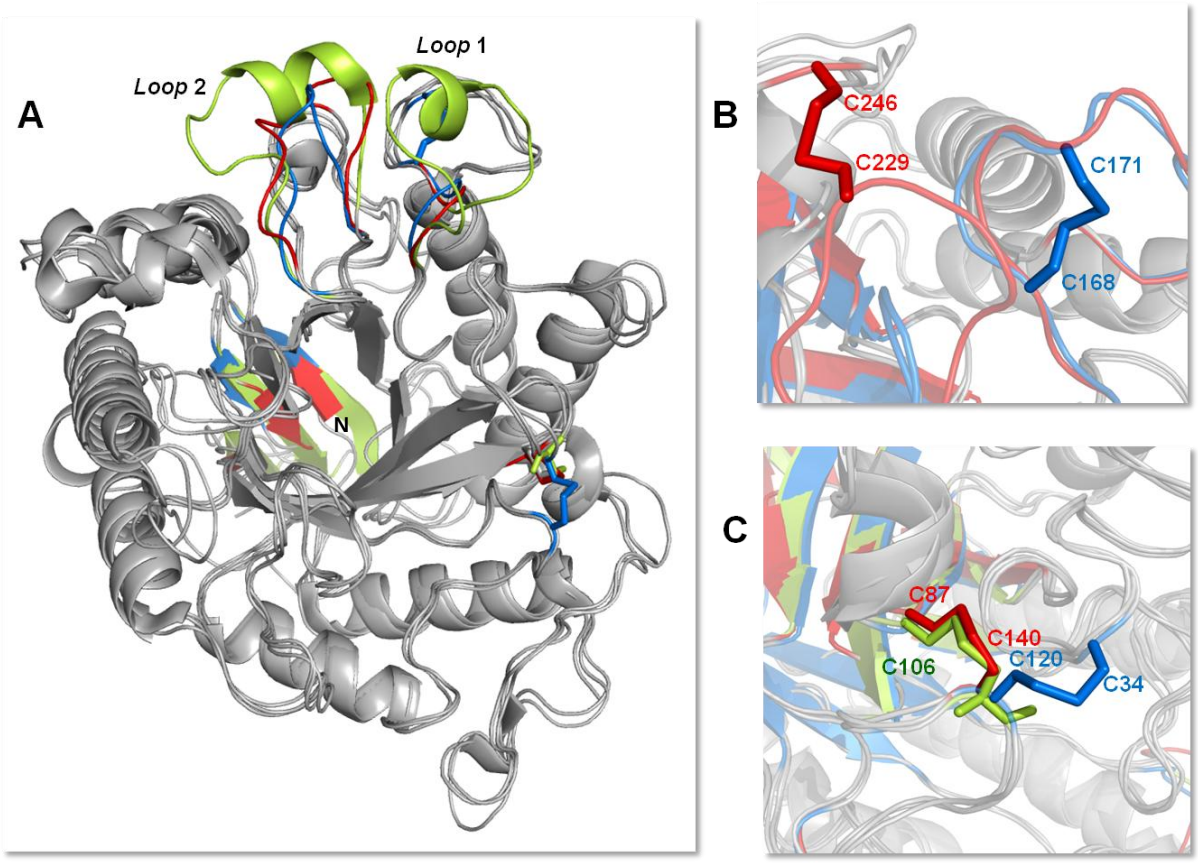


Figura 35 - Sobreposição da Endoglucanase, EGAc (PDB:1ece) e EGPh (PDB:2ZUM) (A). As diferenças estruturais estão mostradas em vermelho para Endoglucanase, azul para EGAc e verde para A EGPh. (B) Ligações de dissulfeto Cys 229-Cys246 (vermelho) presentes na Endoglucanase e Cys169-Cys171 presentes na EGAc. (C) A posição da ligação de dissufeto é similar na Endoglucanase e EGPh e diferente na EGAc e envolve somente uma cisteína conservada, Cys140.

Na região N-terminal, a estrutura 2ZUM apresenta fitas mais longas, enquanto que as fitas presentes em nossa estrutura se assemelham mais em tamanho com as da estrutura 1ECE (Figura 35A). Além disso, a estrutura 2ZUM apresenta pequenas α-hélices, que estão ausentes em nossa estrutura e na estrutura 1ECE. As pontes de dissulfeto também apresentam diferenças quando comparamos as três estruturas. Na estrutura da Endoglucanase estão presentes duas pontes de

dissulfeto que ajudam a estabilizar a estrutura, uma ocorrendo entre a Cys87 e a Cys140 e a outra entre a Cys229 e a Cys246 (Figura 35 B,C). A única cisteína conservada é a Cys140, equivalente a Cys159 (2ZUM) e C120 (1ECE) situadas no loop 3, porém a orientação da ligação de dissulfeto varia na 1ECE, mas é igual para a Endoglucanase e 2ZUM (Figura 35C). Além desta cisteína conservada, a Endoglucanase possui uma ponte de dissulfeto entre Cys229 e Cys246 unindo dois *loops*, enquanto a 1ECE apresenta uma ponte de dissufeto entre a Cys168 e Cys171 no mesmo *loop* (Figura 35B).

A estrutura cristalográfica revelou que a Endoglucanase possui um domínio catalítico composto de um barril TIM conforme esperado para a família GH5. A sobreposição da estrutura com proteínas homólogas contendo substratos (2ZUM e 1ECE) revelaram que os 8 resíduos conservados envolvidos na hidrólise do substrato encontram-se na mesma orientação estrutural encontrada na Endoglucanase.

5 Conclusões

Neste trabalho, foi possível realizar todos os objetivos propostos. Em um primeiro passo, definimos a melhor forma de expressão de celulases e identificamos a principal endoglucanase de *Xanthomonas campestris pv. Campestris*, o que possibilitou análises biofísicas como determinação do pH e temperatura ótima (7.0 e 45°C respectivamente). Experimentos com dicroísmo circular e emissão de fluorescência mostraram que a enzima é bastante estável com relação a variações de pH, sendo prejudicada estruturalmente apenas em pHs extremamente ácidos. Observamos através de CD, que a enzima é termoestável, com T_m de aproximadamente 73°C e através dos testes enzimáticos verificamos que a proteína possui atividade enzimática considerável para uma grande faixa de temperatura, até próximo ao valor do T_m.

Estudos utilizando eletroforese capilar mostraram e comprovaram que a enzima é capaz de promover a hidrólise de CMC, β-glucano e Avicel, além da análise de dois polissacarídeos formados por cinco e seis unidades de glicose que mostraram que são necessários no mínimo 4 unidades de glicose em uma molécula para que ela possa realizar sua função.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo nos permitiram determinar a estrutura de baixa resolução da Endoglucanase completa e através desta observamos e confirmamos a presença de dois domínios para esta enzima: um domínio maior (catalítico) e um menor (CBM) unidos por um *linker*.

Finalmente, após obter cristais do domínio catalítco da enzima, este teve sua estrutura cristalográfica resolvida a uma resolução de 2.8 Å, contendo quatro moléculas na unidade assimétrica. O domínio catalítico apresenta um enovelamento do tipo barril TIM e os resíduos do sítio catalítico são conservados para proteínas da mesma família.

Os estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais apresentados neste trabalho, podem ser de grande validade para buscar novas formas de utilização desta enzima para aplicações biotecnológicas, além de auxiliar a busca de melhorias em sua forma de aplicação e atuação para a produção de bioetanol através de hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

1 BUREAU, U. S. C. World population information. Washington, DC., 2006. Disponível em: <http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopinfo.html >. Acesso em: 28/05/2011.

2 FAO. Bioenergy. Roma - Italy, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j4313e.htm >. Acesso em: 23/05/2011.

3 NASS, L. L.; PEREIRA, P. A. A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview: **Crop Science**. v.47, n. 6, p. 2228-2237, 2007.

4 HAZELL, P. **Developing bioenergy:** a win–win approach that can serve the poor and the environment. Washington - DC: IFPRI - Focus 14 2006. Disponivel em: <http://www.ifpri.org/sites/default/files/pubs/2020/focus/focus14/focus14_12.pdf>. Acesso em: 02/06/2011.

5 DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Bioliology Reviews,** v. 69, n. 1, p. 124-54, Mar 2005. ISSN 1092-2172.

6 WILSON, D. B.; IRWIN, D. C. Genetics and properties of cellulases. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v.63**,** p.2-4, 1999. DOI: 10.1007/3-540-49194-5_1.

7 SUN, J. X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability,** v. 84, n. 2, p. 331-339, May 2004. ISSN0141-3910.

8 PERLACK, R. D. WRIGHT, L.L.; TURHOLLOW, A.F.; GRAHAM, R.L.; STOKES, B.J.; ERBACH, D.C. **Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry:** the technical feasibility of a billion-ton annual supply: U.S. Department of Energy 2005.

9 RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature,** v. 454, n. 7206, p. 841-5, Aug 2008. ISSN 1476-4687.

10 FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry** - ultrastructure reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

11 WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology,** v. 160, p. 3-11, 1988. ISSN 0076-6879.

12 CONVERSE, A. O.; WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. In: WORKSHOP ON APPLICATION OF BIOTECNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS, IEA/BIOFOR .1994. Ottawa. **Proceedings** … Ottawa: IEA/BIOFOR, 1994.

13 ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 11**,** n. 10, p. 612-643, 1989.

14 SAHA, B. C. **Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology, 2**004. Disponivel em: < http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/25781/1/IND43914667.pdf>. Acesso em: 31/05/2011

15 KLEYWEGT, G. J.; ZOU, J.Y.; DIVNE, C.; DAVIES, G. J.; SINNING, I; STAHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; TEERI, T.T.; JONES, T.A. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from Trichoderma reesei at 3.6 A resolution, and a comparison with related enzymes. **Journal of Molecular Biology,** v. 272, n. 3, p. 383-97, Sep 1997. ISSN 0022-2836.

16 GAO, J. M.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal Aspergillus terreus M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology,** v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008. ISSN 0960-8524.

17 BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances,** v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997. ISSN 0734-9750.

18 SOMERVILLE, C. BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S.; YOUNGS, H. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science,** v. 306, n. 5705, p. 2206-11, Dec 2004. ISSN 1095-9203.

19 DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural Food Chemistry,** v. 54, n. 3, p. 597-606, Feb 2006. ISSN 0021-8561.

20 KRÄSSING, H. A. Effect of structure and morphology on accessibility and reactivity. In:_____ **Cellulose:** structure, accessibility, and reactivity. New York: Gordon an Breach Science**,** 1993. p.167-324.

21WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I.; BHAT, K. M. The mechanism of fungal cellulase action. synergism between enzyme components of Penicillium pinophilum cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. **Biochemistry Journal,** v. 260, n. 1, p. 37-43, May 1989. ISSN 0264-6021.

22 LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 121-124, p.

1081-99, 2005. DOI: 10.1007/978-1-59259-991-2_91.

23 COUGHLAN, M. P. **The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application**: biotechnology and genetic engineering reviews Newcastle-upon-Tyne: InterscienceRussel, 1985. p. 37-109.

24 ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology Biofuels,** v. 3, p. 4, 2010. ISSN 1754-6834.

25 GILKES, N. R. et al. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiology Reviews,** v. 55, n. 2, p. 303-15, Jun 1991. ISSN 0146-0749.

26 BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemistry Journal,** v. 382, pt 3, p. 769-81, Sep 2004. ISSN 1470-8728.

27 LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews,** v. 66, n. 3, p. 506-77, Sep 2002. ISSN 1092-2172.

28 TOMME, P.; VAN, TILBEURGH, H.; PETTERSON, G.; VAN DAMME, J.; VANDEKERCKHOVE, J.; KNOWLES, J.; TEERI, T.; CLAEYSSENS, M. Studies of the cellulolytic system of Trichoderma reesei QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. **European Journal Biochemistry,** v. 170, n. 3, p. 575-81, Jan 1988. ISSN 0014-2956.

29 CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISST, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research,** v. 37, p. D233-D238, 2009. ISSN 0305-1048.

30 YALPANI, M. Syntesis and characterization of polysaccharides**.** In: YALPANI, M. (Ed.) **Industrial polysaccharides: symposium proceedings.** Amsterdan: Elsevier**,** 1987**.** p. 1-5. (Progress in Biotechnology).

31 SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides.** Cambrige: Cambridge University Press, 1990. p. 54-88. (Cambrige studies in biotechnology, 9)

32 RUDOLPH, K. **Infection of the plant by Xanthomonas**. London: Chapman & Hall**,** 1993. p.193-245.

33 SUTHERLAND, I. W. **Xanthan**. London: Chapman & Hal, 1993**.** p. 363-388.

34 VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.; MENCK, C.F.; DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; OLIVEIRA, M.C.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P.; SIMPSON, A.J.

Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology,** v. 40, p. 169-89, 2002. ISSN 0066-4286.
35 SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C.E.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in Xanthomonas campestris. **Molecular Microbiology,** v. 38, n. 5, p. 986-1003, 2000. ISSN 0950-382X.

36 WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A.M.; SLATER, H.; SIMPSON, N.J.; SALMOND, G.P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Review,** v. 25, n. 4, p. 365-404, Aug 2001. ISSN 0168-6445.

37 WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell Development Biology,** v. 21, p. 319-46, 2005. ISSN 1081-0706.

38 BAYSSE, C.; CULLINARE, M.; DENERVAUD.; BURROWES, E.; DOW, J.M.;MORRISSEY, J.P; TAM, L.; TREVORS, J.T.; O'GARA, F.. Modulation of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa through alteration of membrane properties. **Microbiology,** v. 151, pt 8, p. 2529-42, Aug 2005. ISSN 1350-0872.

39 ZHANG, L. H.; DONG, Y. H. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Molecular Microbiology,** v. 53, n. 6, p. 1563-71, Sep 2004. ISSN 0950-382X.

40 GOUGH, C. L.; DOW, J.M.; KEEN, J.; HENRISSAT, B.; DANIELS, M.J. Nucleotide-sequence of the engxca gene encoding the major endoglucanase of Xanthomonas campestris pv campestris. **Gene,** v. 89, n. 1, p. 53-59, Apr 1990. ISSN 0378-1119.

41 CHUNG, W. J.; SHU, H.Y.; LU, C.Y.; WU, C.Y.; TSENG, Y.H.; TSAI, S.F.; LIN, C.H. Qualitative and comparative proteomic analysis of Xanthomonas campestris pv. campestris 17. **Proteomics,** v. 7, n. 12, p. 2047-2058, Jun 2007.

42 DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. **Nature,** v. 417, n. 6887, p. 459-463, May 2002. ISSN 0028-0836.

43 SCHROTER, K.; FLASCHEL, E.; PUHLER, A.; BECKER, A. Xanthomonas campestris pv. campestris secretes the endoglucanases ENGXCA and ENGXCB: construction of an endoglucanase-deficient mutant for industrial xanthan production. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 55, n. 6, p. 727-733, Jun 2001. ISSN 0175-7598.

44 DAVIES, G. CAZypedia (carbohydrate-active enzymes). 2010. Disponível em: < http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_5 >. Acesso em: 18/05/2011.

45 ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research,** v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1997. ISSN 0305-1048.

46 AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature,** v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 2003. ISSN 0028-0836.

47 HOLT, S. M.; HARTMAN, P. A. A Zymogram method to detect endoglucanases from bacillus-subtilis, myrothecium-verrucaria and Trichoderma-reesei. **Journal of Industrial Microbiology,** v. 13, n. 1, p. 2-4, 1994. ISSN 0169-4146.

48 TARENTINO, A. L.; PLUMMER, T. H. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from Flavobacterium meningosepticum. **Methods in Enzymology,** v. 230, p. 44-57, 1994. ISSN 0076-6879.

49 KAUR, J. CHADHA, B.S.; KUMAR, B.A.; SAINI, H.S. Purification and characterization of two endoglucanases from Melanocarpus sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology,** v. 98, n. 1, p. 74-81, Jan 2007. ISSN 0960-8524.

50 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducingsugars. **Analitical Chemistry**, v. 31**,** p. 426-428, 1959.

51 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry,** v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697.

52 DOS SANTOS, C. R.; SQUINA, F.M.; NAVARRO, A. M.; OLDIGES, D.P.; LEME, A.F.; RULLER, R.; MORT, A.J.; PRADE, R.; MURAKAMI, M.T. Functional and biophysical characterization of a hyperthermostable GH51 α-L-arabinofuranosidase from Thermotoga petrophila. **Biotechnology Letters,** v. 33, n. 1, p. 131-7, Jan 2011. ISSN 1573-6776.

53 GRIMM, E. D.; PORTUGAL, R.V.; DE OLIVEIRA NETO, M.; MARTINS, N.H.POLIKARPOV, I.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B. Structural analysis of an Echinococcus granulosus actin-fragmenting protein by small-angle x-ray scattering studies and molecular modeling. **Biophysical Journal,** v. 90, n. 9, p. 3216-23, May 2006. ISSN 0006-3495.

54 ROJAS, A. L.; FICHER, H.; ENEISKAYA, E. V.; KULMINSKAYA, A. A.; SHABALIN, K. A.; NEUTROEV, K. N.; CRAIEVICH, A. F.; GOLUBEV, A. M.; POLIKARPOV, I. Structural insights into the beta-xylosidase from Trichoderma reesei obtained by synchrotron small-angle X-ray scattering and circular dichroism spectroscopy. **Biochemistry,** v. 44, n. 47, p. 15578-84, Nov 2005. ISSN 0006-2960.

55 FISCHER, H.; DIAS, S. M.; SANTOS, M. A.; ALVES, A.C.; ZNCHIN, N.; CRAIEVICH, A.F.; APRELETTI, J.W.; BAXTER, J. D.; WEBB, P.; NEVES, F. A.; RIBEIRO, R. C.; POLIKARPOV, I. Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron X-ray solution scattering. **Journal of Biologycal Chemistry,** v. 278, n. 18, p. 16030-8, May 2003. ISSN 0021-9258.

56 APARICIO, R.; FISCHER, H.; SCOTT, D. J.; VERSCHUEREN, K. H., KULMINSKAYA, A. A.; ENEISKAYA, E. V.; NEUSTROEV, K. N.; CRAIEVICH, A. F.; GOLUBEV, A. M.; POLIKARPOV, I. Structural insights into the beta-mannosidase from T. reesei obtained by synchrotron small-angle X-ray solution scattering enhanced by X-ray crystallography. **Biochemistry,** v. 41, n. 30, p. 9370-5, Jul 2002. ISSN 0006-2960.

57 GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering.** London: Academic Press 1982.

58 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria.: **Journal Applied Crystallography**. 25**:** 495-503 p. 1992.

59 SVERGUN, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal,** v. 76, n. 6, p. 2879-86, Jun 1999. ISSN 0006-3495.

60 XU, G. Y.; ONG, E.; GILKES, N.R.; KILBURN, D.G.; MUHANDIRAM, D.R.; HARRIS-BRANDTS, M.; CARVER, J.P.; KAY, L.E.; HARVEY, T. Solution structure of a cellulose-binding domain from Cellulomonas fimi by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry,** v. 34, n. 21, p. 6993-7009, May 1995. ISSN 0006-2960.

61 KIM, H. W.; ISHIKAWA, K. Structure of hyperthermophilic endocellulase from Pyrococcus horikoshii. **Proteins,** v. 78, n. 2, p. 496-500, Feb 2010. ISSN 1097-0134.

62 SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. Crysol - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates: **Journal Applied Crystallography**. v. 28**,** p**.** 768-773 p. 1995.

63 CAMPBEL, I.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy.** Benjamin Cummings Publish Co. Inc., 1984. ISBN-13**:** 978-0805318470

64 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. **Analitical Biochemistry,** v. 299, n. 2, p. 271-4, Dec 2001. ISSN 0003-2697.

65 NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; WOODY, R. W. **Circular Dichroism -** principles and applications. New York:Wiley- VCH, 1994.

66 KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochemistry and Biophysical Acta,** v. 1338, n. 2, p. 161-85, Apr 1997. ISSN 0006-3002.

67 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular

dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analitical Biochemistry,** v. 287, n. 2, p. 252-60, Dec 2000. ISSN 0003-2697.
68 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2nd ed. Nova York: Plenum Publishers, 1999.

69 MCPHERSON, A.; DELUCAS, L. Crystal-growing in space. **Science,** v. 283, n. 5407, p. 1459, Mar 1999. ISSN 0036-8075.

70 DRENTH, J. **Principles of X-ray Crystallography**. 3rd ed. New York: Springer, 2009.

71 MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Methods,** v. 34, n. 3, p. 254-65, Nov 2004. ISSN 1046-2023.

72 POLIKARPOV, I.; PERLES, L.A.; DE OLIVEIRA, R.T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E.E.; GARRATT, R.C.; CRAIEVICH, A. Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. **Journal of Synchrotron Radiation,** v. 5, pt 2, p. 72-6, Mar 1998. ISSN 0909-0495.

73 LESLIE, A. G. The integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallography D -** biological crystallography**,** v. 62, pt 1, p. 48-57, Jan 2006. ISSN 0907-4449.

74 BAILEY, S. The CCP4 suite - programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica D**, v.50**,** p**.** 760-763, 1994.

75 EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica D,** v. 62, pt 1, p. 72-82, Jan 2006. ISSN 0907-4449.

76 MCCOY, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. **Acta Crystallographica D,** v. 63, pt 1, p. 32-41, Jan 2007. ISSN 0907-4449.

77 ADAMS, P. D.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; HUNG, L.W.; IOERGER, T.R.; MCCOY, A.J.; MORIARTY, N.W.; READ, R.J.; ASACCHETTINI, J.C.; SAUTER, N.K.; TERWILLIGER, T.C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallography D -** bioloical crystallography**,** v. 58, pt 11, p. 1948-54, Nov 2002. ISSN 0907-4449.

78 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallography D -** biolical crystallography**,** v. 60, pt 12, p. 2126-32, Dec 2004. ISSN 0907-4449.

79 FISCHER, H.; OLIVEIRA NETO, M.; NAPOLITANO, H. B.; CRAIEVICH, A. F.; POLIKARPOV, I. The molecular weight of proteins in solution can be determined from a singles SAXS measurement on a relative scale: **Journal Applied Crystallography**. v. 43p. 101-109, 2010.

80 BARLEY, S. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallography D:** biological crystallography**,** v. 50, pt 5, p. 760-3, Sep 1994. ISSN 0907-4449.

81 ADAMS, P. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallography D -** biological crystallography**,** v. 66, pt 2, p. 213-21, Feb 2010. ISSN 1399-0047.

82 WIERENGA, R. K. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. **FEBS Letters,** v. 492, n. 3, p. 193-8, Mar 2001. ISSN 0014-5793.

83 COPLEY, R. R.; BORK, P. Homology among (betaalpha)(8) barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. **Journal of Molecular Biology,** v. 303, n. 4, p. 627-41, Nov 2000. ISSN 0022-2836.

84 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. ISSN 0961-8368.

85 JENKINS, J. LEGGIO, L.; HARRIS, G.; PICKERSGILL, R. Beta-glucosidase, beta-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold beta/alpha architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of beta-strands four and seven. **FEBS Letters,** v. 362, n. 3, p. 281-5, Apr 1995. ISSN 0014-5793.

86 TULL, D.; WITHERS, S.G.; GILKES, N.R.; KILBURN, D.G.; WARREN, R.A.; AEBERSOLD, R. Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a "retaining" exoglucanase from Cellulomonas fimi. **Journal of Biological Chemistry,** v. 266, n. 24, p. 15621-5, Aug 1991. ISSN 0021-9258.

87 BORTOLI-GERMAN, I. HAIECH, J.; CHIPPAUX, M.; BARRAS, F. Informational suppression to investigate structural functional and evolutionary aspects of the Erwinia chrysanthemi cellulase EGZ. **Journal of Molecular Biology,** v. 246, n. 1, p. 82-94, Feb 1995. ISSN 0022-2836.

88 WANG, Q.; TULL, D.; MEINKE, A.; GILKES, N.R.; WARREN, R.A.; AEBERSOLD, R.; WITHERS, S.G. Glu280 is the nucleophile in the active site of Clostridium thermocellum CelC, a family A endo-beta-1,4-glucanase. **Journal of Biological Chemistry,** v. 268, n. 19, p. 14096-102, Jul 1993. ISSN 0021-9258.

89 KOSHLAND, M. E. The origin of fecal antibody and its relationship to immunization with adjuvant. **Journal of Immunology,** v. 70, n. 4, p. 359-65, Apr 1953. ISSN 0022-1767.

90 MCCARTER, J.; ADAM, M.; WITHERS, S. Binding-energy and catalysis - fluorinated and deoxygenated glycosides as mechanistic probes of escherichia-coli (lacz) beta-galactosidase. **Biochemical Journal,** v. 286, p. 721-727, SEP 15 1992 1992. ISSN 0264-6021.