UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ALINE MINALI NAKAMURA

Estudos funcionais e estruturais de carboxilesterases de Bacillus licheniformis

> São Carlos 2020

ALINE MINALI NAKAMURA

Estudos funcionais e estruturais de carboxilesterases de *Bacillus licheniformis*

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

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

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

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.

> Nakamura, Aline Minali Estudos funcionais e estruturais de carboxilesterases de *Bacillus licheniformis /* Aline Minali Nakamura; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2020. 121 p.

> Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Bacillus licheniformis. 2. Carboxilesterases. 3. alfa/beta-hidrolase. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao meu orientador Prof. Igor Polikarpov pela oportunidade que foi me dada e por ter depositado sua confiança no meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudos que me proporcionou grandes oportunidades através do processo número 2015/26041-0. E por todo o suporte para realização deste projeto.

À banca examinadora, cuja honrosa presença e avaliação serão de grande contribuição para este trabalho.

Ao Instituto de Física de São Carlos pelo apoio institucional e a todos seus funcionários, principalmente os das secretarias de pós-graduação (Ricardo e Sílvio) e de departamento (André, Bete, Patrícia e Thaís); da biblioteca (Neusa e Sabrina); das sessões de gráfica e informática (Saba); e da limpeza.

Aos técnicos do Grupo de Biotecnologia Molecular Josimar, Lívia, Maria e Possato por todo amparo, ajuda e conversas.

A todos os amigos que passaram pela sala 8.

Ao Marco Kadowaki por toda colaboração, conversas, conselhos, por tudo que me ensinou de maneira tão paciente. Pelas horas e horas no LNLS e por aquele cristal que difratou a 1.2 Å, que eu nem me lembro de quem era, só lembro que ficamos um bom tempo admirando e mudando a energia da linha para tirar o máximo dele. Foi memorável.

Ao antigo grupo das luluzinhas, que por tanto tempo fez meus dias no IFSC mais felizes. Obrigada Van, Renata, Amanda, Mel, Marina e Grazi por toda a amizade.

À Renata por toda força e incentivo que me deu. Que no início sentava todos os dias na biblioteca comigo para me ensinar física.

À Paula e ao Lorenzo, por toda a amizade. Meus companheiros de salinha, de bandejão, de cafezinho, de falar sobre cultura útil e inútil, de me ver chorar, mas também de vibrar com as coisas boas.

À Vanessa por sempre ter ficado ao meu lado me aconselhando e principalmente por ter me lembrado quem eu sou nos momentos que mais precisei.

Ao André Godoy, amigo e irmão, responsável por eu ter seguido por este caminho. Por ter me ensinado tanto e por toda a colaboração, profissional ou não, que foi essencial para conclusão desta etapa em minha vida. Amo você.

Ao meu ex-namorado e amigo Rodrigo Lanceloti por estar presente na maior parte do tempo deste aprendizado, me apoiando e acolhendo em todas as minhas fases.

À minha sócia linda e maravilhosa Cris por tudo e tanto que construímos juntas. E por todo desenvolvimento, acadêmico e pessoal, que tive ao lado dela.

A todos que o ballet colocou em meu caminho e que me proporcionaram tanta realização e crescimento pessoal. O ballet que, fazendo parte do meu mais intenso processo de autoconhecimento, me faz viver de maneira completa. Me traz paz e tranquilidade para ser uma pessoa mais leve e segura em tudo que faço. Agradecimento especial aos meus professores Marília, Gabi e Gustavo.

À minha psicóloga Diva Rubim Parentoni, que me acompanhou por muitos anos.

Aos meus amigos da bio07, que há 13 anos fazem do seu colo minha morada.

Aos caros Franz Schubert e Ludwig van Beethoven por terem embalado minha concentração em todos esses anos acadêmicos.

Aos meus filhos felinos Kuri e Kabu por toda fofura e amor. E pelas incontáveis horas que eles passaram no meu colo me provendo de ocitocina enquanto eu estudava e escrevia.

Aos meus irmãos Paulo e Robinson, por quem daria minha vida. Sou uma pessoa de extrema sorte por ter dois anjos, amigos e companheiros, que sempre me trataram com tanto amor e compaixão. Que sempre estiveram do meu lado para me acalmar nos momentos difíceis, para rir das minhas burradas e para dividir os momentos especiais.

Ao meu paizinho e minha mãezinha a quem sempre deverei minha honra, meu respeito, minha admiração, minhas conquistas. Por terem me dado todo o suporte, compreensão e amor para eu ser quem sou hoje. Tudo devo a eles.

Meus mais sinceros agradecimentos.

"Já se pode sentir, embora longe, os reflexos de uma revolução biológica, que vai se agigantando em cada momento que passa. A vida está se modificando. A luz da transformação vem de todos os espaços, vem do infinito, onde máquinas e homens jamais poderão registrar ou ver; vem também do interior do próprio homem, onde Raio X de ciência alguma poderá revelar."

B. J. Aroldo (Casa das Máquinas – Lar de Maravilhas)

RESUMO

NAKAMURA, A. M. **Estudos funcionais e estruturais de carboxilesterases de** *Bacillus licheniformis*. 2020. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Carboxilesterases compreendem uma grande classe com enovelamento α/β -hidrolase e catalisam a clivagem e a formação de ligações éster. São amplamente difundidas na natureza, sendo expressas por animais, plantas e microrganismos, desempenhando um papel essencial no metabolismo de ésteres carboxílicos endógenos e exógenos. Além das importantes funções fisiológicas, elas compõem alguns dos biocatalisadores mais importantes para setores da biotecnologia, sendo amplamente aplicados em diferentes processos industriais e com muitas preparações comerciais disponíveis. Além disso, B. licheniformis se apresenta como uma fonte promissora de carboxilesterases. No entanto, até o momento, não há informações estruturais sobre carboxilesterases deste organismo. Este estudo teve como objetivo analisar bioquímica e estruturalmente duas carboxilesterases de B. licheniformis, focando em características relevantes para aplicações biotecnológicas. BlEst1 apresentou maior atividade hidrolítica contra p-nitrofenil acetato, em pH 7,0 e a 40 °C. Além disso, BlEst1 mostrou-se estável em alguns solventes orgânicos e estabilidade em altas concentrações de sal (0 - 3 M NaCl), enquanto mantem a atividade, com aumento significativo de 17 °C na temperatura de melting, revelando sua característica halotolerante. A análise estrutural revelou uma superfície eletrostática acídica, indicando que *Bl*Est1 pode adotar o modelo de estabilização-solvatação, a teoria mais comum para a adaptação halofílica. BlEst2 apresentou um enovelamento típico de α/β -hidrolase e a presença de múltiplos domínios. O domínio catalítico apresentou duas inserções, que ocupam localizações conservadas que comumente constituem o domínio lid em lipases. Os domínios C-terminais compõem o propeptídeo de BlEst2 e sua remoção é necessária para a ativação enzimática. Além disso, eles agem como chaperonas intramoleculares, sendo necessários para o enovelamento adequado. Depois da ativação, o BlEst2 apresentou a maior atividade hidrolítica (292 U/mg) contra o p-nitrofenil butirato a pH 8,0 e 45 °C. Para ambas as enzimas encontramos incoerências entre a classificação e dados experimentais, indicando que os sistemas de classificação ainda não são representativos o suficiente para explicar a grande diversidade dentro desse grupo de hidrolases.

Palavras-chave: *Bacillus licheniformis*. Carboxilesterases. α/β -hidrolase.

ABSTRACT

NAKAMURA, A. M. Functional and structural studies of carboxylesterases from *Bacillus licheniformis*. 2020. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Carboxylesterases comprise a major class of α/β -fold hydrolases and catalyze the cleavage and formation of ester bonds. They are widespread in nature, being expressed by animals, plants and microorganisms, and playing an essential role in the metabolism of the endogenous and exogenous carboxyl esters. Besides the important physiological functions, they compose one of the most important biocatalysts for biotechnology, being widely applied on a broad range of industrial applications and with many available commercial preparations. Moreover, B. licheniformis features a promising source of carboxylesterases. However, up to date, there is no structural information regarding carboxylesterases of this organism. This study aimed to analyze biochemically and structurally two B. licheniformis carboxylesterases, focusing on relevant features for biotechnological applications. BlEst1 presented the higher hydrolytic activity against p-nitrophenyl acetate at pH 7.0 and 40 °C. Furthermore, BlEst1 showed to be stable in some organic solvent stability in high salt concentrations (0 - 3 M NaCl), while maintaining activity, with significantly increase of 17 °C on its melting temperature, revealing its halotolerant character. Structural analysis revealed an acidic electrostatic surface, indicating that *Bl*Est1 may adopt the solvation-stabilization model, the most common theory for the halophilic adaptation. *Bl*Est2 presented the core region with a typical α/β hydrolase fold and an overall multidomain structure. The catalytic domain presented two insertions, which occupy conserved locations in α/β -hydrolase proteins and commonly made up the lid domain on lipases. The C-terminal domains compose the *Bl*Est2 propeptide and their removal is required to enzyme activation. Besides this, they act like intramolecular chaperones, being required for properly folding. After activation, *Bl*Est2 presented the higher hydrolytic activity against p-nitrophenyl butyrate (292 U/mg) at pH 8.0 and 45 °C. For both enzymes, we found inconsistencies between classification and experimental data, indicating that the classification systems are not representative enough to explain the great diversity within this group of hydrolases.

Keywords: *Bacillus licheniformis*. Carboxylesterases. α/β-hydrolase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 6 Homogeneidade de *Bl*Est1. A) Análise em gel SDS-PAGE 15% da enzima purificada. M: marcador de peso molecular marcado em kDa. B) Peso

molecular de Blest1 calculado por gel-filtração analítica. O ajuste linear está representado em linha tracejada ($R^2 = 0.96$)......53

- Figura 10 Estabilidade térmica por espectroscopia de fluorescência. A) Espectros de emissão de 20 a 60 °C. B) Monitoramento da intensidade de fluorescência. ...60

- Figura 15 Cristais de obtidos de *Bl*Est1 na forma nativa e em complexo com ligantes. A) Cristais de *Bl*Est1 nativo. B) Cristais de *Bl*Est1 co-cristalizados com ácido hexanóico. C) Cristais de *Bl*Est1 em complexo com PMSF......64
- Figura 16 Estrutura tridimensional da carboxilesterase *Bl*Est1 de *B. licheniformis*. A)
 Estrutura da *Bl*Est1. A tríade catalítica está representada em azul. B)
 Representação da estrutura secundária de *Bl*Est1 utilizando o PDBsum.¹⁰¹ O

- Figura 19 BlEst1 em complexo com ligantes e suas interações. A, C e E) Mapa de densidade eletrônica 2Fo–Fc (2σ) correspondente aos ligantes ácido butírico (A), ácido hexanóico (B) e PMS (C). Os ligantes, a serina catalítica (Ser93) e o resíduo do *oxyanion hole* Phe24 estão representados em azul. B, D e F) Mapa de interações entre BlEst1 e os ligantes gerado pelo LigProt......70

- Figura 22 Análise de sequência entre *Bl*Est2 (bacld-q65fg2) e outras esterases e lipases bacterianas do banco de dados ESTHER. A) Relação entre *Bl*Est2 e outras enzimas da família PGAP1 do bloco X, lipases bacterianas do bloco L, esterases bacterianas do bloco C e esterases bacterianas do bloco X. Alinhamento de sequências feito pelo programa PROMALS3D (Pei et al., 2008) e árvore por neighbor-joining foi construída no MEGA (Kumar et al., 2016). A lipase PcL está assinalada com uma estrela e Tle4 com duas estrelas. B) Alinhamento de sequência entre *Bl*Est2 e outras enzimas não caracterizadas da família PGAP1. Aminoácidos idênticos estão assinalados como caixas vermelhas; resíduos catalíticos estão marcados com flechas vermelhas; região do padrão LIPASE_SER (Prosite, ps00120) está delimitado com uma caixa verde. Elementos de estrutura secundária do modelo de *Bl*Est2 determinado

- Figura 23 Teste de expressão de BlEst2 truncada em diferentes cepas e com diferentes concentrações do indutor IPTG. M representa o marcador de peso molecular marcado em kDa. A) Expressão em Rosetta DE3. 1. Fração insolúvel sem indução. 2. Fração solúvel sem indução. 3. Fração insolúvel após indução com 1 mM IPTG. 4. Fração solúvel após indução com 1 mM IPTG. 5. Fração insolúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 6. Fração solúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 7. Fração insolúvel após indução com 0,5% de lactose. 8. Fração solúvel após indução com 0,5% de lactose. 9. Fração insolúvel sem indução. 10. Fração solúvel sem indução. 11. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 12. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 13. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. 14. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. 15. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,2% de Triton x100 antes da lise. 16. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,2% de Triton x100 antes da lise. B) Expressão em ArticExpress. 1. Fração insolúvel sem indução. 2. Fração solúvel sem indução. 3. Fração insolúvel após indução com 1 mM IPTG. 4. Fração solúvel após indução com 1 mM IPTG. 5. Fração insolúvel após indução com 0,5% de lactose. 6. Fração solúvel após indução com 0,5% de lactose. 7. Fração insolúvel sem inducão. 8. Fração solúvel sem indução. 9. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 10. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 11. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. 12. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. C) Expressão em Rosetta-gami 2(DE3)pLysS. 1. Fração insolúvel sem indução. 2. Fração solúvel sem indução. 3. Fração insolúvel após indução com 1 mM IPTG. 4. Fração solúvel após indução com 1 mM IPTG. 5. Fração insolúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 6. Fração solúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 7. Fração insolúvel após indução com 0.1 mM IPTG. 8. Fração solúvel após indução com 0.1 mM IPTG.......86
- Figura 25 Estrutura tridimensional da carboxilesterase *Bl*Est2 de *B. licheniformis* em sua forma de propeptídeo. A) Estrutura da *Bl*Est2. A tríade catalítica está

- Figura 26 Centro catalítico do domínio I de *Bl*Est2. A) Tríade catalítica Ser119, Asp231 e His254. B) Nucleophile elbow composto pela assinatura de sequência Sm-x1-S-x2-Sm, (Sm = resíduo pequeno, x = qualquer resíduo e S = serina catalítica). C) Oxyanion hole da classe GX de acordo com o banco de dados Lipase Engineering Database ¹⁷, formado por Leu56 e Lys120. D) *Oxyanion Loop...*92
- Figura 27 Comparações entre o domínio I de Pro*Bl*Est2 e *Bl*Est2. A) Alinhamento entre domínio I de Pro*Bl*Est2 em uma conformação aberta (inserções L1 e L2 marcadas em azul) e *Bl*Est2 em conformação fechada (L1 e L2 em verde). Deslocamento de 16 Å da inserção L1 do domínio *lid* em direção ao sítio catalítico está mostrado em detalhe. B) Distribuição dos resíduos do domínio *lid* na conformação aberta. C) Distribuição dos resíduos do domínio *lid* na conformação fechada. Resíduos hidrofóbicos e polares sem carga foram coloridos em cinza, resíduos positivamente carregados em azul e resíduos negativamente carregados em vermelho. A cor do potencial eletrostático de superfície foi definida de -5 kT/e (vermelho) a 5 kT/e (azul), e calculado pelo módulo APBS do PyMOL.
- Figura 28 Comparações estruturais entre o domínio I de Pro*Bl*Est2 e as triacilglicerol lipases homólogas PAO1 de *P. aeruginosa* (PDB id 1EX9) e PcL de *P. cepacia* (PDB id 10IL). Todas as enzimas estão na conformação aberta. A) Alinhamento do domínio I de *Bl*Est2 com PAO1 e PcL. As tríades catalíticas são facilmente sobreponíveis. O *core* α/β -hidrolase está representado em cinza, enquanto os domínios *lid* de *Bl*Est2, PcL e PAO1 estão representados em rosa, verde e azul, respectivamente. B) Superfície eletrostática do domínio I de BlEst2. C) Superfície eletrostática de PcL. D) Superfície eletrostática de PAO1. O ligante cristalográfico de PAO1, o inibidor R_C-trioctil, foi sobreposto nas estruturas cristalográficas de *Bl*Est2 e PcL com o mesmo alinhamento para fins comparativos. A cor do potencial eletrostático de superfície foi definida de -5 kT/e (vermelho) a 5 kT/e (azul), e calculado pelo módulo APBS do PyMOL.95
- Figura 30 Interações entre os domínios C-terminal II e III e o domínio catalítico I de Pro*Bl*Est2, indicando um possível mecanismo inibitório. A) Resíduos entre o domínio N-terminal e os domínios C-terminal que participam da interface de 1916 Å², calculada por jsPISA (Krissinel, 2015). B) Análises de conservação de resíduos realizadas pelo ConSurf (Ashkenazy et al., 2016). A escala é configurada de resíduos mais conservados (magenta) até os mais variáveis (verde). C) As oito pontes de hidrogênio entre os resíduos dos domínios C-terminal e os resíduos do domínio *lid*. D) Sítio catalítico ocupado por um loop

do domínio C-terminal II. E) Conformação tipo grampo dos domínios C-terminal II e III, prendendo a inserção L1 do domínio *lid*......97

- Figura 31 Análise de temperatura de *melting* para Pro*Bl*Est2 e *Bl*Est2 em diferentes condições de tampão e pH por *thermal shift assay......*99
- Figura 32 Absorbância relativa do produto de reação *p*-nitrofenol em função da variação de pH em tampão acetato-borato-fosfato do pH 4 ao 10......101
- Figura 34 Especificidade de *Bl*Est2. A atividade foi calculada contra substratos de diferentes tamanhos de cadeia de 2 a 16 carbonos. Reações foram conduzidas nas condições otimizadas (35 °C, pH 8) com 1 mM de substrato......102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Informações sobre o candidato selecionado <i>Bl</i> Est14	1
Tabela 2 -	Condições testadas por thermal shift assay40	6
Tabela 3 -	Efeito de diversos compostos na atividade de <i>Bl</i> Est155	5
Tabela 4 -	Coleta de dados e processamento de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de <i>Bl</i> Est1	7
Tabela 5 –	Estabilidade térmica de <i>Bl</i> Est1 aferida por <i>thermal shift assay</i>	8
Tabela 6 -	Informações e estatísticas da coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura tridimensional da carboxilesterase <i>Bl</i> Est1 de <i>B. licheniformis</i> em sua forma nativa e em complexo com ácido butírico, ácido hexanóico e PMS. Valores da faixa mais alta de resolução são mostrados entre parênteses	5
Tabela 7 –	Informações sobre o candidato selecionado <i>Bl</i> Est278	8
Tabela 8 -	Informações e estatísticas da coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura tridimensional da carboxilesterase <i>Bl</i> Est2 de <i>B. licheniformis</i> em sua forma pro-peptideo (Pro <i>Bl</i> Est2) e em sua forma madura (<i>Bl</i> Est2). Valores da faixa mais alta de resolução são mostrados entre parênteses	0
Tabela 9 –	Pontes de hidrogênio entre o domínio catalítico I e os domínios C-terminal II e III	8

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bl	de Bacillus licheniformis
BLAST	Basic Local Alignment Search Toll
CD	Circular Dichroism
EC	Enzyme Comission
Est	de Esterase
ESTHER	ESTerases and alpha/beta- Hydrolases Enzymes and Relatives
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
LB	Lysogeny broth
LED	Lipase Engineering Database
LIC	Ligation Independent Cloning
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
рН	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
SAD	Single Anomalous Diffraction
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
T _m	Temperatura de Melting
TRX	tioredoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Enzimas que hidrolisam ligações carboxil-ester	27
1.2	Mecanismo de ação	
1.3	Enovelamento α/β hidrolase	
1.4	Classificação e bancos de dados	
1.5	Interesse biotecnológico pelas carboxilesterases	
1.6	Organismo de estudo	
2	OBJETIVOS	
3	CAPÍTULO 1 – Carboxilesterase <i>Bl</i> Est1	39
3.1	Introdução	39
3.2	Material e Métodos	41
3.2.1	Escolha do gene candidato	41
3.2.2	Análise de sequência de aminoácidos	41
3.2.3	Produção da proteína recombinante	42
3.2.4	Purificação	42
3.2.5	Caracterização bioquímica	43
3.2.5.1	Ensaios de atividade enzimática	43
3.2.5.2	Especificidade	44
3.2.6	Estudos biofísicos em solução	44
3.2.6.1	Cromatografia analítica por exclusão de tamanho	44
3.2.6.2	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	44
3.2.6.3	Análise de estabilidade térmica por thermal shift assay	45
3.2.6.4	Análise de estabilidade térmica por espectroscopia de fluorescência	47
3.2.6.5	Dicroísmo circular (CD)	47
3.2.7	Efeito do NaCl na atividade e estabilidade de <i>Bl</i> Est1	47
3.2.7.1	Ensaios de atividade enzimática	48
3.2.7.2	Análise de estabilidade térmica por thermal shift assay	48
3.2.7.3	Análise da estabilidade térmica por Dicroísmo Circular (CD)	48
3.2.7.4	Efeitos da temperatura na atividade na presença de NaCl	49
3.2.8	Estudos estruturais de <i>Bl</i> Est1	49
3.2.8.1	Cristalização e coleta de dados de difração de raios X	49
3.2.8.2	Resolução das estruturas	50

3.3	Resultados	51
3.3.1	Análise de sequência	51
3.3.2	Produção da proteína recombinante	52
3.3.3	Caracterização bioquímica de <i>Bl</i> Est1	53
3.3.4	Especificidade	55
3.3.5	Estudos biofísicos em solução	56
3.3.5.1	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	56
3.3.5.2	Estabilidade térmica por fluorimetria	57
3.3.5.3	Dicroísmo circular (CD)	60
3.3.6	Atividade e estabilidade térmica de <i>Bl</i> Est1 em altas concentrações de sal	61
3.3.7	Estruturas cristalográficas de <i>Bl</i> Est1 e análise estrutural	63
3.3.7.1	Cristalização, coleta e processamento dos dados	63
3.3.7.2	Modelo tridimensional da estrutura nativa de <i>Bl</i> Est1	66
3.3.7.3	Sítio ativo e oxyanion hole	68
3.3.7.4	Modelos tridimensionais dos complexos de <i>Bl</i> Est1	69
3.4	Discussão	71
3.4.1	Comparação entre estrutura e atividade de BlEst1 com enzimas homólogas	71
3.4.2	Halotolerância de <i>Bl</i> Est1	74
3.5	Conclusões	76
4	CAPÍTULO 2 – Carboxilesterase <i>Bl</i> Est2	77
4.1	Introdução	77
4.2	Material e Métodos	78
4.2.1	Escolha do gene candidato	78
4.2.2	Análise de sequência de aminoácidos	78
4.2.3	Produção e purificação da proteína recombinante na forma de pro-peptídeo	79
4.2.4	Produção e purificação da forma madura e ativa de <i>Bl</i> Est2	79
4.2.5	Estudos estruturais de <i>Bl</i> Est2	80
4.2.5.1	Cristalização e coleta de dados de difração de raios X	80
4.2.5.2	Resolução das estruturas	80
4.2.6	Estabilidade térmica por Thermal Shift Assay	81
4.2.7	Caracterização bioquímica de <i>Bl</i> Est2	81
4.2.7.1	Ensaios de atividade enzimática	81
4.2.7.2	Especificidade	82
4.3	Resultados	83

4.3.1	Classificação e análise de sequência	
4.3.2	Produção da forma madura de <i>Bl</i> Est2	
4.3.3	Estruturas cristalográficas de <i>Bl</i> Est2 e análise estrutural	
4.3.3.1	Cristalização, coleta e processamento dos dados	
4.3.3.2	Modelo tridimensional da estrutura de ProBlEst2	90
4.3.3.3	Sítio ativo e oxyanion hole	92
4.3.3.4	Modelo tridimensional da estrutura da forma madura BlEst2 e comparações	
	estruturais	93
4.3.3.5	A função inibitória dos domínios C-terminal II e III	95
4.3.4	Estabilidade térmica de Pro <i>Bl</i> Est2 e <i>Bl</i> Est2	98
4.3.5	Caracterização bioquímica da forma madura de <i>Bl</i> Est2	99
4.3.6	Especificidade	102
4.4	Discussão	103
4.5	Conclusões	106
5	Conclusões gerais	107
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas que hidrolisam ligações carboxil-ester

Hidrolases (EC 3) que catalisam a clivagem ou síntese de ligações éster, carboxil-éster hidrolases (EC 3.1.1.X), ou carboxilesterases, constituem um diverso grupo de hidrolases amplamente encontradas em plantas, animais e microrganismos ¹. Há uma ampla gama de hidrolases, classificadas de acordo com a reação química que catalisam e com seu substrato natural como esterases (EC 3.1.1.1 – carboxilesterases), verdadeiras lipases (EC 3.1.1.3 – triacilglicerol lipases), fosfolipases A2 (EC 3.1.1.4), fosfolipases A1 (EC 3.1.1.32), feruloil esterases (3.1.1.73), cutinases (EC 3.1.1.74) dentre ouras especificações até EC 3.1.1.114, metil-acetato hidrolases. Muitas delas aceitam uma ampla gama de substratos, o que leva a crer que as diversas classes evoluíram para permitir o acesso a diferentes fontes de carbono ou para o envolvimento em diferentes rotas metabólicas.¹

Lipases e esterases se distinguem de acordo com sua preferência por determinado substrato e pela variação na atividade de acordo com a solubilidade do substrato.² Essa distinção pode estar relacionada ao comprimento da cadeia alifática do substrato, uma vez que quanto mais longa é a cadeia do ácido graxo, sua solubilidade em meio aquoso diminui formando micelas ou emulsões. Portanto, lipases hidrolisam ácidos graxos, geralmente triacilgliceróis, insolúveis ou parcialmente insolúveis de cadeia média a longa ($C_6 - C_{22}$) enquanto que esterases são mais ativas em ésteres simples, de cadeia curta e solúveis, geralmente com menos de seis carbonos.¹ Uma vez que lipases são ativas contra substratos insolúveis em agregados, sua atividade é relacionada com a área do substrato e não sua concentração.³ Assim, enquanto esterases obedecem uma cinética clássica de Michaelis-Menten, lipases necessitam de uma concentração mínima de substrato, suficiente para ultrapassar o limite de solubilidade a ponto de formar agregados, antes de uma alta atividade ser observada.¹

Por muito tempo se distinguiu lipases de esterases por um fenômeno conhecido como ativação interfacial⁴⁻⁵ e pela presença de estrutura *lid*. A ativação interfacial foi descrita de acordo com o aumento da atividade enzimática de lipases à medida que o substrato excedia a concentração limite para formação de micelas. Diferentes explicações foram propostas para explicar esse fenômeno como propriedades do substrato e propriedades da enzima, sugerindo uma mudança conformacional na interface.⁶ Então, a elucidação das primeiras estruturas cristalográficas de lipases revelou que o sítio ativo era ocupado por *loops*, e que claramente

necessitavam de uma mudança conformacional para a ativação das enzimas,⁷⁻⁸ e que foram chamados de *lid*. Posteriormente, a resolução de complexos de lipases com inibidores elucidou a natureza das mudanças conformacionais, as quais provocam alterações na superfície da enzima, expondo a superfície hidrofóbica ao redor do sítio ativo.⁹⁻¹⁰ O movimento espacial do *lid*, associada à catálise, expõem os resíduos hidrofóbicos, que permanecem protegidos do meio aquoso na conformação fechada, e que são responsáveis pelo acoplamento da superfície lipídio-água ao sítio ativo, proporcionando a ativação da enzima e início da hidrólise.¹¹ No entanto, algumas carboxilesterases que hidrolisam substratos de cadeia longa e insolúveis não possuem a estrutura *lid*, como visto em algumas cutinases ¹² e lipases.¹³ Da mesma forma, lipase com *lid* pode não apresentar ativação interfacial.¹⁴ Sendo assim, nem o fenômeno de ativação interfacial e nem a presença de *lid* pode ser utilizado para diferenciar lipases de esterases, apesar deste ter papel importante na determinação da especificidade da enzima.¹⁵

Outra característica que aparentemente distingue lipases de esterases é uma diferença na superfície eletrostática dependente de pH. A superfície de uma proteína constitui a interface pela qual ela sente o meio químico que a circunda, sendo que todas as forças intermoleculares, dentro de 10-15 Å de distância, depende do pH, solvente e temperatura. Portanto, a atividade enzimática dependerá da protonação adequada dos resíduos catalíticos, bem como dos demais resíduos que constituem o sítio ativo dentro da faixa de pH de atividade da enzima. Em relação a lipases e esterases, não há diferença entre os respectivos pI, no entanto, lipases tem maior número de resíduos hidrofóbicos como valinas, leucinas e isoleucinas, sendo que estes são mais comuns ao redor do sítio catalítico.^{11;15} Assim, o potencial eletrostático tem papel importante tanto na associação ao substrato, quanto à liberação do produto. O sítio ativo de lipases apresenta um potencial eletrostático negativo na faixa de pH na qual apresentam maior atividade, o que acontece em pHs mais básicos, entre 8 e 9. Enquanto isso, esterases apresentam o mesmo padrão, porém em valores menores de pH o que está relacionado à máximos de atividade em pHs de básico a neutro.^{11;16}

1.2 Mecanismo de ação

Lipases e esterases são serina hidrolases, ou seja, sua maquinaria catalítica possui uma serina como resíduo catalítico chave. Além do resíduo nucleofílico Ser, a tríade é composta com um resíduo ácido, que na maioria dos casos é um ácido aspártico (Asp), mas que em algumas enzimas contém o ácido glutâmico (Glu); e uma histidina (His). Além da tríade catalítica, há outros dois resíduos necessários para catálise com função de estabilização do

oxiânion. Estes resíduos, que compõem o *oxyanion hole*, ocorrem de maneira conservada em lipases e esterases e são orientados tridimensionalmente de maneira similar em todas as estruturas. A composição do *oxyanion hole* é uma característica utilizada para classificação de carboxilesterases como abordado pelo banco de dados LED (*Lipase Engineering Database*).¹⁷ Sistemas de classificação serão discutidos posteriormente na seção 1.4.

O mecanismo catalítico é similar de serina proteases.¹⁸ Num primeiro passo, o éster se liga à enzima e a serina ataca o grupo carbonila formando um intermediário tetraédrico que é estabilizado pelos outros resíduos da tríade, His e Asp e pelo *oxyanion hole* (Figura 1).¹ O colapso desse intermediário libera a fração álcool do éster, formando o complexo acil-enzima, no qual a fração acil está covalentemente ligada à serina. Em uma reação de hidrólise, há o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao complexo acil-enzima, formando outro intermediário tetraédrico e, por sua vez, o colapso desse intermediário leva a liberação do ácido e da enzima livre. Como lipases e esterases catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de ligações éster, ou esterificação, se o complexo acil-enzima for atacado por outro nucleófilo, como uma molécula de álcool, a reação de esterificação é favorecida, e no final há a liberação de um éster e da enzima livre.¹⁹



Figura 1 – Esquema de hidrólise catalisada por lipases e esterases, envolvendo um complexo acil-enzima e dois intermediários tetraédricos (T_d1 e T_d2). A numeração dos aminoácidos corresponde ao sítio ativo da lipase CRL de *Candida rugosa*.
 Fonte: Adaptada de BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS.¹⁹

1.3 Enovelamento α/β hidrolase

Uma característica compartilhada entre lipases e esterases é a arquitetura da estrutura tridimensional, apresentando um enovelamento α/β -hidrolase que se trata de uma folha β

central rodeada, em ambas as faces, por α -hélices. Esse é o tipo de enovelamento mais comum e versátil encontrado na natureza, tendo sido caracterizado em proteases, lipases, esterases, deshalogenases, peroxidases, e epóxido hidrolases.²⁰ Essa estrutura pode apresentar variações no número de fitas β , na presença de inserções, na arquitetura do domínio de ligação ao substrato e no número de domínios,² apresentando uma enorme plasticidade. Muitas inserções são toleradas, que vão desde a alguns resíduos, até domínios adicionais completos, mantendo a maquinaria catalítica.

Em sua forma canônica, esse enovelamento apresenta folha β central formada por oito fitas β , sendo uma delas, β 2, antiparalela.²¹ Esta folha β apresenta uma torção de mão esquerda, formando um ângulo de 90° entre a primeira e a última fita β. As fitas β3 a β8 são conectadas por α-hélices (Figura 2). A disposição e número dessas hélices pode variar, podendo ser até ausentes. Apenas aC é aparentemente conservada, posicionada no centro da folha β e participando da disposição da serina catalítica. Essa arquitetura apresenta uma estrutura estável para os resíduos envolvidos na catálise, que possuem localização conservada em α/β -hidrolase.²⁰ O resíduo nucleofílico serina (que pode ser uma cisteína ou ácido aspártico em outras enzimas com esse enovelamento) fica localizada em um pequeno e curvado loop entre β 5 e α C, chamado de nucleophile elbow. O nucleophile elbow é caracterizado pelo motif Sm-x1-Nu-x2-Sm onde Sm é um resíduo de cadeia lateral curta, x é qualquer resíduo e Nu é oresíduo nucleofílico. O resíduo ácido, ácido aspártico no caso de lipases e esterases, é localizado após β 7 e a histidina após a última fita β da folha β central (Figura 2). Outros resíduos envolvidos na catálise que possuem localização conservada são os dois que compõem o oxyanion hole, que é formado pelos átomos de nitrogênio do grupo amina desses resíduos. Um deles, é o resíduo x_2 do *nucleophile elbow*, e o segundo fica no topo do *loop* logo após β 3, que é chamado de *oxyanion loop*.¹⁷

As inserções que uma enzima com enovelamento α/β -hidrolase pode apresentar, cuja possível localização está marcada com um traço pontilhado na Figura 2, constituem um exemplo de diferenciação evolutiva de um mesmo enovelamento para diferentes reações de hidrólise, a fim de se acomodar uma diversidade de substratos.²⁰ Exemplos dessa diversidade está representado na Figura 3. Para lipases, as inserções podem configuram *lids*, que auxiliam no mecanismo de ativação interfacial, explicado no item 1.1. A localização de uma das inserções que compõem *lids* é bem conservada, ocupando lugar após β 6 (Figura 3A, 3B, 3E).



- Figura 2 Diagrama de estrutura secundária da forma canônica de proteínas com enovelamento tipo α/β hidrolase. As α -hélices e as fitas β estão representadas como cilindros e flechas, respectivamente. O local dos resíduos da tríade catalítica está marcado com pontos pretos. As linhas pontilhadas indicam lugares onde podem ocorrer inserções.
- Fonte: Adaptada de NARDINI; DIJKSTRA.²⁰



Figura 3 – Diversidade estrutural apresentada por proteínas com enovelamento tipo α/β -hidrolase. As α -hélices e as fitas β do modelo canônico estão representadas como retângulos e setas claras, respectivamente. Estruturas secundárias oriundas de inserções ao modelo canônico estão representadas em preto. A localização dos resíduos da tríade catalítica está marcada com pontos pretos e com código de letra única de aminoácidos. A) Epóxido hidrolase de *A. radiobacter*²². Um domínio *lid* está localizado após β 6. B) Esterase de *B. subitilis*²³, com domínio *lid* formado pelas hélices no N-terminal e pela inserção após β 6. C) Carboxilesterase de *P. fluorescens*²⁴. Apresenta ausência da primeira fita β . D) Lipase de *S. exfoliatus*²⁵ com ausência de domínio *lid* E) Lipase de *P. aeruginosa*. Apresenta ausência das duas primeiras fitas β e um domínio *lid* após β 6. F) Acetilxilano esterase de *P. purpurogenum*²⁶, com ausência de domínio *lid*.

Fonte: Adaptada de NARDINi; DIJKSTRA.²⁰

1.4 Classificação e bancos de dados

Basicamente a classificação de lipases e esterases é feita baseada na especificidade ou em alinhamento de sequência. O primeiro critério é mais problemático uma vez que as condições experimentais devem ser similares e os substratos os mesmos, ou pelo menos relacionados, para que os resultados sejam comparáveis. Isso é agravado pela diversidade de métodos adotados para medir hidrólise de ligações éster, como uso de ésteres ligados a *p*-nitrofenol e pH-stat.²⁷ Com o aumento da disponibilidade de dados de sequências em bancos de dados, a comparação de sequências passou a trazer mais informação sobre a relação evolutiva entre proteínas e dando critérios mais claros para classificação.¹

Assim, uma classificação clássica foi proposta por Arpigny e Jaeger baseada nas sequências de aminoácidos, assinaturas de sequência conservados e em propriedades

biológicas,²⁷ baseado em 53 sequências de lipases e esterases separadas de um total de 217 entradas. As sequências redundantes foram retiradas. Assim, enzimas foram separadas em oito famílias diferentes (I a VIII). Triacilglicerol lipases, ou lipases verdadeiras (EC 3.1.1.3), foram agrupadas na família I, que é subdividida em 6 subfamílias, de I.1 a I.6. Já as demais carboxilesterases foram classificadas nas famílias de II a VIII. Estudos subsequentes revelou enzimas que não poderiam ser agrupadas nas famílias já existentes, criando-se novas famílias: IX ²⁸, X ²⁹, XI ³⁰, XII ³¹, XIII ³² e XIV.³³

Embora carboxilesterases sejam agrupadas em diversas famílias que não apresentam similaridade de sequência, elas apresentam em comum a mesma arquitetura, o enovelamento α/β -hidrolase ²¹ e algumas assinaturas de sequência. Com o aumento do acesso a dados estruturais, outras classificações começaram a surgir com critérios mais completos que integram dados de sequência e estruturais. Junto com essas classificações, houve a implementação de bancos de dados, como o ESTHER (ESTerases and alpha/beta-Hydrolases Enzymes and Relatives). ESHTER é dedicado à famílias de proteínas que apresentam enovelamento α/β hidrolase e que são relacionadas filogeneticamente ³⁴. Inicialmente, o banco de dados era subdividido em três famílias principais: carboxilesterases, lipases e lipases hormônio-sensíveis, blocos C, L e H respectivamente. Essa divisão se deu de acordo com assinaturas de sequência típicas dessas proteínas: as enzimas do bloco C possuem as entradas ps00941 e ps00122 do prosite, conhecidas como padrão Carboxylesterase_B; enzimas do Bloco L carregam a entrada ps00120, conhecido como padrão LIPASE_SER; e o Bloco H, que é relacionado com o Bloco L apresenta as entradas ps01173 e ps01174, as LIPASE_GDXG_SER, respectivamente.35 LIPASE GDXG HIS assinaturas e Posteriormente, as enzimas que não possuem nenhuma dessas assinaturas foram agrupadas no Bloco X.

Outro exemplo é o LED (*Lipase Engineering Database*) que promove uma classificação baseado em sequência, estrutura e função. Inicialmente, 92 sequências de carboxilesterases bacterianas e outras serina hidrolases homólogas foram divididas em 32 famílias e 15 superfamílias.³⁶ Posteriormente, uma nova versão com um modelo de dados mais extenso integrou dados de sequência, estrutura e informações de anotação disponíveis no *GenBank* e PDB. Essa abordagem resultou em 806 proteínas classificadas em 38 famílias e 16 superfamílias.¹⁷ A classificação é baseada em uma estrutura conservada em α/β -hidrolases, o *oxyanion hole*. Que é formado pelo grupamento amina de dois resíduos e servem para

estabilizar o intermediário tetraédrico por meio de ligações de hidrogênio entre o próton da amina e o oxigênio do grupo carbonila do substrato.³⁷

Como explicado na seção 1.3, um dos átomos é o resíduo x_2 do *nucleophile elbow* (logo após a serina catalítica), e o segundo fica no topo do *loop* (*oxyanion loop*) logo após β 3. De acordo com a composição do segundo resíduo, as proteínas são divididas em duas classes: GGGX e GX, nos quais o resíduo marcado em negrito são os que participam das ligações de hidrogênio.¹⁷ A composição do *oxyanion hole* afeta a especificidade de carboxilesterases sendo que lipases da classe GX tipicamente hidrolisam substratos de cadeia média a longa e as enzimas da classe GGGX são encontradas em esterases específicas pra substratos de cadeia curta.³⁷ Posteriormente, um terceiro grupo foi identificado, a classe Y, no qual o *oxyanion hole* não é formado por aminas e sim pelo grupo hidroxila de uma tirosina conservada.³⁸ A esta classe pertence algumas esterases e lipases bacterianas.³⁷

1.5 Interesse biotecnológico pelas carboxilesterases

O crescimento da enzimologia representou um importante marco na biotecnologia. Sendo que este mercado é ocupado principalmente por hidrolases como proteases, amilases, amidases, esterases e lipases.³⁹ Lipases e esterases emergiram na indústria devido as suas características múltiplas. São enzimas bem versáteis devido a atividade em uma ampla gama de substratos, tanto naturais quanto sintéticos; a regio- e a enantioseletividade; a alta estabilidade em solventes orgânicos; e por dispensarem cofatores.⁴⁰⁻⁴¹ Essas hidrolases foram umas das primeiras enzimas testadas como estáveis em solventes orgânicos.⁴² De fato, ambas enzimas aparentam estabilidade e atividade em diferentes solventes orgânicos, mas essa característica é mais acentuada em lipases.¹ Além disso, estas enzimas catalisam vários tipos de reações como hidrólise, esterificação, transesterificação, polimerização, lactonização, aminólise e oximólise.^{43- 44} Todas essas propriedades fazem com que as carboxilesterases sejam de grande interesse biotecnológico e atuantes em diversos setores industriais.^{40;42;45-49}

Algumas aplicações de carboxilesterases são bem estabelecidas na indústria (Figura 4). Um exemplo disso é a sua aplicação na síntese de compostos quirais utilizados no desenvolvimento de fármacos,⁵⁰⁻⁵¹ agroquímicos,⁵² cosméticos, fragrâncias e aromas.⁵³⁻⁵⁴ Outro exemplo se dá na indústria alimentícia, onde há o uso dessas enzimas em diversas áreas como panificação,⁵⁵⁻⁵⁶ laticínios,⁵⁷ indústria de embutidos,⁵⁸ e produção de óleos e gorduras.^{40,56} Na síntese de aromas dos alimentos, as lipases agem na hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos, que não são aromatizados por si só (com exceção dos ácidos graxos de cadeia curta), mas são precursores das substâncias aromatizantes.⁵⁸ São utilizadas
na indústria de couro e papel, sendo que na primeira agem no processo de calagem e retirada de gordura; e na segunda auxiliam no controle de extratos lipofílicos da madeira.⁵⁹ Na produção de biodiesel agem no processo de transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta como metanol e etanol.⁶⁰ Uma das maiores e mais bem conhecidas aplicações industriais é a adição dessas enzimas em detergentes,⁴⁰ auxiliando na retirada de gorduras.



Figura 4 - Diferentes processos industriais nos quais há a utilização de hidrólise catalisada por lipases e esterases. No sentido horário, indústria alimentícia na produção de pães, laticínios e embutidos; produção de óleos e gorduras; produção de detergentes; degradação de polímeros sintéticos; tratamento de resíduos; produção de biodiesel; produção de papel e couro; produção de sabores e fragrâncias; síntese de compostos quirais para produção de agroquímicos e fármacos. Fonte: Elaborada pela autora.

1.6 Organismo de estudo

Devido à constante busca por novas tecnologias e por enzimas mais eficientes e economicamente viáveis, Bacillus licheniformis se mostra como uma fonte de prospecção de novas carboxilesterases, além de ser um organismo de grande interesse para indústria. Isso porque pode ser aeróbio ou anaeróbio facultativo, o que permite seu crescimento em diferentes nichos e meios; é não patogênico; eficiente em secretar enzimas; e seus hábitos saprófitos fazem com que seja fonte de enzimas com potencial de aplicação em diversos processos.⁶¹ Além disso, enzimas bacterianas são de especial interesse pela facilidade de produção, baixo custo, pela suscetibilidade à mutações genéticas e por serem versáteis e estáveis em diversas condições.⁶² De fato, lipases bacterianas constituem o terceiro grupo de enzimas mais utilizado na indústria. Apesar da relevância, não há nenhum estudo estrutural de carboxilesterases de *B. licheniformis*, o que seria fundamental para se entender os mecanismos catalíticos dessas enzimas e aferir suas aplicações.

2 **OBJETIVOS**

Tendo em vista a versatilidade e importância de carboxilesterases em processos biotecnológicos, é justificável uma investigação mais profunda destes catalisadores, envolvendo sua caracterização bioquímica e estrutural. Porém, apesar da grande relevância dessa classe de enzimas para o desenvolvimento de novas tecnologias, elas são pouco estudadas em um organismo igualmente importante industrialmente, a bactéria *B. licheniformis*. Sendo assim, neste trabalho objetivamos promover uma caracterização bioquímica e estrutural de carboxilesterases de *B. licheniformis*. a fim de se entender suas características que possam ser de interesse biotecnológico. Esses objetivos incluem:

- Padronizar e otimizar os protocolos de expressão e purificação das carboxilesterases de *B*.
 licheniformis a fim de se estabelecer um protocolo de produção dessas enzimas;
- * A caracterização bioquímica dessas enzimas com a determinação de uma reação padrão com concentração de sal, pH e temperatura ideais para as condições experimentais usadas. Além de se determinar o efeito da temperatura na atividade e o padrão de especificidade;
- Caracterização biofísica das enzimas em solução, principalmente em relação à estabilidade térmica em diferentes condições e nas condições experimentais padronizadas para os ensaios bioquímicos;
- * Promover ensaios de cristalização e desenvolver protocolos de otimização dos cristais;
- Promover estudos estruturais a fim de se elucidar a estrutura cristalográfica dos alvos bem como de complexos com ligantes, quando disponível;
- * Análise dos modelos estruturais e dos dados bioquímicos e biofísicos de maneira integrada a fim de descrever as características mais interessantes dessas enzimas.

3 CAPÍTULO 1 – Carboxilesterase *Bl*Est1

3.1 Introdução

Tanto organismos halofílicos quanto halotolerantes possuem a habilidade de se desenvolver e viver em ambientes com altas concentrações de sal. Organismos halofílicos são aqueles que requerem a presença de sal para viver enquanto os halotolerantes podem crescer tanto na ausência quanto na presença de sal, apresentando assim tolerância e não dependência. Aqueles organismos halotolerantes que que são capazes de crescer em concentrações acima de 15% (m/v) (2,5 M NaCl) são considerados altamente tolerantes. Em relação aos halofílicos, de acordo com a definição mais utilizada, organismos que vivem em concentrações de 3% (água do mar), 3-15%, 25% (m/v) de NaCl são considerados, levemente, moderadamente e extremamente halofílicos, respectivamente.⁶³ Apesar de *B. licheniformis* não ser um organismo halofílico, há alguma cepas de *Bacillus*⁶⁴ e enzimas de *Bacillus*⁶⁵⁻⁶⁸ que apresentam um grau de halotolerância considerável

Enzimas halofílicas possuem maior atividade e estabilidade em altas concentrações de sal, mas apresentam baixa solubilidade em baixas concentrações de sal, ⁶⁹ o que torna técnicas cromatográficas de difícil execução. Por outro lado, enzimas halotolerantes são ativas e estáveis em ampla faixa de concentração de NaCl, retendo sua atividade mesmo na ausência de sal. Essa propriedade faz crescer o interesse por enzimas que sejam halotolerantes em detrimento das halofílicas.⁶⁸ De fato, enzimas que funcionam em condições salinas extremas são requeridas em muitos setores industriais. No setor alimentício, são aplicadas em processos fermentativos que ocorrem na presença de sal; na produção de suplementos e colorantes; no setor de tratamento de resíduos, como por exemplo no caso de áreas marinhas e de pântanos contaminadas com derramamento de óleo; e podem atuar na degradação de polímeros sintéticos dentre outras aplicações.⁶³ Esses nichos biotecnológicos citados são também amplamente ocupados por lipases e esterases.⁴⁸⁻⁴⁹

O mecanismo que confere halotolerância às enzimas pode ter explicação estrutural. Quando a superfície eletrostática de enzimas adaptadas à altas concentrações de sal foi comparada com a de homólogos não-halofílicos, as regiões constituídas por cadeias laterais com oxigênios negativamente carregados foi maior para as enzimas halofílicas do que para as não halofílicas.⁷⁰ Da mesma forma, a superfície formada por cadeias laterais com nitrogênios positivamente carregadas foi menor e halofílicos do que em não-halofílicos. Isso pode favorecer a formação de uma camada de solvatação, que age como proteção para enzimas halotolerantes e halofílicas contra condições de dessecação,⁷¹ além de evitar o desenovelamento e agregação através do aumento da estabilidade. A teoria mais comum de adaptação halofílica é o modelo de solvatação-estabilização,⁶⁹ que é descrito pela interação de íons hidratados com a superfície ácida da proteína, resultando em estabilização do enovelamento em condições extremas.

Aqui nos apresentamos uma carboxilesterase halotolerante de B. licheniformis bemcomo sua caracterização bioquímica e estrutural, apontando os fatores envolvidos no modelodeestabilização-solvataçãoparaestaenzima.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Escolha do gene candidato

O DNA genômico de B. licheniformis DSM 13 já encontrava-se disponível na biblioteca de DNAs do Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo – São Carlos – Brasil. Desta biblioteca, alvos já haviam sido clonados utilizando o método independente de ligação (LIC - Ligation-Independent Cloning) 72; 73. Desses clones foi selecionada a proteína BlEst1 (Tabela 1). Para amplificação foram desenhados oligonucleotídeos 5' os senso 5' <u>CAGGGCGCCATG</u>AAAATTGTCAAACCACAACC – 3' anti-senso е _ GACCCGACGCGGTTATGTCTGCCAATCCAACG - 3'. A região sublinhada dos oligonucleotídeos correspondem à cauda necessária para a técnica LIC. Os alvos foram inseridos ao vetor de expressão pET-TrxA/LIC (gentilmente cedido por Arie Geerlof -Helmholtz Zentrum, Alemanha).

Tabela 1 - Informações sobre o candidato selecionado BIE	Est1.
	BlEst1

	DIEStI
gene	YvaK [Bacillus licheniformis DSM 13 = ATCC 14580]
GenBank	AAU42463.1
Pfam	Hydrolase_4 (PF12146)
ESTHER ¹	CarbLipBact_1 (block X)
LED ²	abH11 - Carboxylesterases / abH11.01 - Bacillus
	carboxylesterase (class GX)

¹ESTerases, α/β Hydrolase Enzymes and Relatives Database (<u>http://bioweb.ensam.inra.fr/esther</u>). ²Lipase Engineering Database (http://www.led.uni- stuttgart.de/). Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.2 Análise de sequência de aminoácidos

O gene YvaK, que codifica uma proteína de 248 aminoácidos, foi identificado no genoma de *B. licheniformis* DSM 13/ATCC 14580. A sequência proteica foi utilizada para análise comparativa com outras proteínas. Para se entender a relação entre elas, um alinhamento foi construído pelo programa MEGA ⁷⁴ e o método de máxima verossimilhança aplicado para construção de um dendrograma pelo mesmo programa. Para esta análise foram utilizadas sequências do *Protein Data Bank* (PDB) das seguintes famílias de acordo com o

banco de dados ESTHER³⁴: *Hydrolase_4* (Bloco X), *Carb B Bacteria* (Bloco C) e *Bacterial Lipase* (Bloco L).

3.2.3 Produção da proteína recombinante

Para a produção da proteína recombinante, plasmídeos contendo os genes alvo foram transformados em linhagens de *Escherichia coli* Rosetta (DE3), pelo método de choquetérmico. Primeiramente pré-inóculos foram crescidos em meio líquido do tipo LB contendo os antibióticos canamicina (50 μ g L⁻¹) e cloranfenicol (33 μ g L⁻¹). As culturas foram então incubadas sob agitação automática a 37 °C e 250 rpm por 16 h. Esta cultura foi inoculada (0,5%, v/v) em 1,0 L de meio líquido LB com os mesmos antibióticos. O crescimento das células ocorreu à 37 °C, 200 rpm até DO₆₀₀ = 0,6 e então a expressão foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG. A expressão seguiu em agitador automático a 130 rpm a 18 °C por 16 h.

Após a expressão, as células foram sedimentadas por centrifugação a 10.000 xg por 20 min a 4 °C. Em seguida, o *pellet* celular foi ressuspendido em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM de NaCl; 10% (v/v) glicerol) com lisozima (50 mg L⁻¹ de cultura). A suspenção celular foi mantida em gelo por 30 min e a lise das células foi conduzida por sonicação (oito ciclos de 1 min com intervalos de 30 seg entre cada ciclo). Terminada a lise, o lisado celular foi centrifugado (23.000 xg; 30 min; 4 °C) e a fração solúvel da proteína recombinante fusionada a tiorredoxina-HisTag foi submetida às etapas de purificação.

3.2.4 Purificação

A purificação de *Bl*Est1 foi realizada em dois passos: cromatografia de afinidade por níquel e cromatografia por exclusão de tamanho. Os vetores utilizados para clonagem e expressão adicionam na região N-terminal da proteína clonada uma cauda de histidina, aminoácido que possui afinidade com o níquel. Dessa forma, a cromatografia de afinidade por níquel foi realizada utilizando a resina *Ni SepharoseTM 6 Fats Flow* (GE) em coluna cromatográfica, a qual foi equilibrada com tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM de NaCl). Os extratos celulares foram então aplicados às colunas. Após lavagem com tampão A com 10 mM imidazol, a eluição foi conduzida utilizando-se 150 mM imidazol. O imidazol da eluição foi diluído para 18 mM e esta foi incubada com a enzima TEV protease a 4°C por 16 h para retirada da cauda de histidinas. Então o produto da clivagem foi submetido a uma nova cromatografia de afinidade por níquel para retirada da TEV e da cauda de histidinas fusionada à proteína tiorredoxina.

Para a cromatografia de exclusão por tamanho, foi utilizada a coluna *HiLoad Superdex* 75 16/600 (GE Healthcare®) acoplada ao sistema *Äkta Purifier 10* (Amershan-Pharmacia). Equilibramos a coluna com tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl). As frações referentes ao pico cromatográfico foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE para conferir a ausência de contaminantes. As quantificações da concentração proteica das frações purificadas foram realizadas medindo-se a absorbância da proteína a 280 nm em espectrofotômetro do tipo *NanoDrop* (Thermo Scientific) e a concentração da proteína foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar teórico neste comprimento de onda $(44.350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$.

3.2.5 Caracterização bioquímica

3.2.5.1 Ensaios de atividade enzimática

A atividade enzimática foi monitorada utilizando ésteres ligados a *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich). O *p*-nitrofenol liberado após a ação das esterases foi medido por absorção a 405 nm. A atividade específica (U/mg) foi calculada como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado por minuto (U) por mg de enzima purificada e então a atividade relativa foi calculada com o objetivo de comparar diferentes condições de reação. Uma reação padrão foi definida composta por tampão (30 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl) e 75 nM de *Bl*Est1, na qual foi adicionada 1 mM do substrato *p*-nitrofenil acetato (solução estoque de 50 mM em etanol 100%). A reação foi iniciada pela adição de substrato na reação padrão pré-aquecida na temperatura de reação por 2 min. A temperatura ótima foi determinada testando-se temperaturas entre 10 e 70 °C. Em seguida, o pH ótimo foi determinado, testando-se diferentes pHs em tampão ABF (20 mM acetato, 20 mM borato, 20 mM fostato, pH 4,0 – 10).

Para conferir o efeito da temperatura na atividade, alíquotas com 75 nM de *Bl*Est1 foram incubadas a 40 e 50 °C por 72 h. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo e então a atividade residual foi medida nas condições padronizadas de atividade, utilizando *p*-nitrofenil acetato como substrato em tampão (30 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl).

O efeito de diferentes compostos incluindo solventes orgânicos, sais e detergentes na atividade foi determinado nas condições padronizadas de reação utilizando *p*-nitrofenil acetato como substrato em tampão (30 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl). A reação de 10 minutos foi iniciada pela adição do substrato na reação pré-incubada de enzima com cada composto a 40 °C por 2 min.

3.2.5.2 Especificidade

Para as reações de especificidade com o substrato, substratos sintéticos associados a *p*nitrofenol (Sigma-Aldrich) com variação do comprimento da cadeia dos ácidos graxos de dois a doze carbonos foram testados. As reações foram realizadas nas condições ótimas de temperatura e pH com a adição de 1 mM de substrato em reação padrão composta por tampão (30 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM NaCl) e 75 nM de *Bl*Est1. A reação de 10 min foi iniciada pela adição do substrato na reação pré-aquecida por 2 min.

3.2.6 Estudos biofísicos em solução

3.2.6.1 Cromatografia analítica por exclusão de tamanho

Alíquota a 1,0 mg/mL de *Bl*Est1 foi aplicada na coluna *Superdex 75 16/600* (GE Healthcare®) para aferir-se a massa de cada pico do cromatograma através de uma curva de calibração. Para isso, o kit *Gel Filtration Calibration Kits LMW e HMW* (GE Healthcare®) contendo proteínas com massa molecular conhecidas foi utilizado. O volume morto da coluna foi aferido com *blue dextran 2000*. O volume de eluição de cada proteína foi utilizado para calcular o coeficiente de distribuição de fases K_{av} de cada uma ($K_{av} =$ [volume de eluição – volume de exclusão da coluna]/[volume total da coluna – volume de exclusão da coluna]). Os valores de K_{av} foram plotados em função das massas e através da regressão linear desta curva foi possível aferir a massa de *Bl*Est1.

3.2.6.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Os estudos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foram realizadas para a obtenção de informações estruturais em solução tais como: raio de giro (R_g), volume molecular, modelo do envelope molecular e estado de oligomerização. Todo o processo de coleta, processamento e análise dos dados foi feito pelo Dr. Marco Antônio Seiki Kadowaki, até então do mesmo grupo de pesquisa. As medidas de SAXS foram realizadas na linha de luz SAXS-2 do LNLS. Duas concentrações diferentes de *Bl*Est1 (1,0 e 2,0 mg mL⁻¹) foram medidas em tampão HEPES 30 mM pH 7,5, 150 mM NaCl. As coletas foram realizadas a 25 °C, sob comprimento de onda do feixe de $\lambda = 1.488$ Å, com uma distância detector-amostra de 955 mm.

As imagens dos espalhamentos das amostras foram processadas e integradas, após a subtração do espalhamento do tampão, com o programa *Fit2D*.⁷⁵ Posteriormente, o pacote

PRIMUS ⁷⁶ foi utilizado para a análise dos dados. As análises de Guinier foram feitas pelo programa *AUTORG*, ⁷⁷ já as funções de distribuição de distâncias (p(r)) e a distância máxima (D_{max}) foram calculados pelo programa *GNOM*. ⁷⁸ O programa SAXMoW⁷⁹ foi utilizado para estimar a massa molecular com base na curva de espalhamento experimental. Dez modelos de átomos *dummy* com cadeias aleatórias de C_a foram gerados com base nos dados experimentais de SAXS utilizando o programa DAMMIF⁸⁰ e um modelo médio e normalizado foi gerado pelo programa DAMAVER.⁸¹Perfis de espalhamento teóricos do modelo do envelope e o modelo por homologia foram comparados aos perfis de espalhamento experimentais pelo programa FoXS.⁸² As figuras de sobreposição do envelope com as estruturas cristalográficas foram geradas pelo programa *PyMOL* (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.).

3.2.6.3 Análise de estabilidade térmica por thermal shift assay

A técnica de *thermal shift assay* ⁸³ foi utilizada para se aferir a temperatura de *melting* (T_m) de *Bl*Est1 bem como a estabilidade térmica em diferentes condições (Tabela 2). Para isso o equipamento *CFX96 Real-Time System* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado para monitorar a interação da sonda *Sypro Orange* (Invitrogen) com a enzima por excitação a 490 nm e emissão a 530 nm. Reações com as enzimas a uma concentração final de 0,38 mg mL⁻¹ foram adicionadas em diferentes tampões. A temperatura variou de 25 a 90 °C com gradiente de 1 °C min⁻¹. A análise dos resultados e cálculo do T_m foram realizadas no programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

pH	tampão ([]f = 50 mM)	[NaCl] (mM)
_	Água	0
3,0	Ácido Cítrico	0
4,0	Citrato de Sódio	0
4,5	Acetato de Sódio	0
4,7	Citrato de Sódio	0
5,0	Acetato de Sódio	0
5,0	Fosfato de Potássio	0
5,5	Citrato de Sódio	0
5,5	Fosfato de Sódio	0
5,8	Mes	0
6,0	Fosfato de Potássio	0
6,0	Bis-Tris	0
6,2	Mes	0
6,5	Fosfato de Sódio	0
6,5	Cacodilato de Sódio	0
6,5	Bis-Tris	0
6,5	Mes	0
6,7	Bis-Tris	0
7,0	Fosfato de Potássio	0
7,0	Hepes	0
7,0	Bis-Tris	0
7,3	Acetato de Amônio	0
7,5	Fosfato de Sódio	0
7,5	Tris	0
8,0	Imidazol	0
8,0	Hepes	0
8,0	Tris	0
8,0	Bicina	0
8,5	Tris	0
9,0	Bicina	0
9,5	Carbonato de Sódio	0
10,0	Carbonato de Sódio	0
3,0	Ácido Cítrico	300
4,5	Acetato de Sódio	300
5,0	Fosfato de Potássio	300
5,5	Bis-Tris	300
5,5	Citrato de Sódio	300
5,8	Mes	300
6,0	Bis-Tris	300
6,5	Cacodilato de Sódio	300
6,5	Fosfato de Sódio	300
7,0	Bis-Tris	300
7,0	Hepes	300
7,3	Acetato de Amônio	300
7,5	Tris	300
8,0	Hepes	300

Tabela 2 - Condições testadas por thermal shift assay.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.6.4 Análise de estabilidade térmica por espectroscopia de fluorescência

A desnaturação de *Bl*Est1 foi estudada seguindo-se a fluorescência intrínseca utilizando o espectrofluorímetro ISS-PC1 (ISS, Inc., Champaign, IL). Nos experimentos foi utilizado o comprimento de onda de 295 nm para excitação e foi monitorado os espectros de emissão de 300 a 450 nm em temperaturas de 20 °C a 60 °C. A enzima estava a uma concentração de 0,2 mg mL⁻¹ em tampão (30 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl). Esta técnica foi também utilizada para aferir a T_m, para tanto o comprimento de onda no pico de emissão da enzima a 20 °C foi registrado em temperaturas entre 20 °C e 60 °C com um gradiente de temperatura de 0,7 °C min⁻¹. A T_m foi calculada pelo ponto de transição da função de Boltzmann ajustada aos dados experimentais.

3.2.6.5 Dicroísmo circular (CD)

As análises de CD foram realizadas em espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Maryland, USA) com o auxílio da Dra. Andressa Patrícia Alves de Pinto do Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas" (IFSC – USP). Para as medidas foram utilizadas cubetas de 0,1 cm de caminho óptico, *data pitch* de 0,2 nm, velocidade de varredura de 50 nm min⁻¹, largura de banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1,0 s, na região do ultravioleta de 190 a 280 nm. *BI*Est1 encontravam-se em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 em uma concentração de 0,2 mg mL⁻¹. A contribuição do solvente foi subtraída e a elipticidade molar ($[\theta]=\theta^*M/(10^*l^*C^*n)$) calculada, onde M é a massa molecular em g mol⁻¹, *l* é o caminho óptico em cm, C é a concentração em g L⁻¹ e n é o número de resíduos. A deconvolução dos dados foi realizada pelo programa K2D3⁸⁴ e a predição do espectro da estrutura tridimensional pelo programa PDB2CD.⁸⁵ A T_m foi estimada pelo monitoramento das mudanças na elipticidade molar a 220 nm de 20 °C a 70 °C com um gradiente de 0,5 °C min⁻¹. A T_m foi calculada pelo ponto de transição da função de Boltzmann ajustada aos dados experimentais.

3.2.7 Efeito do NaCl na atividade e estabilidade de *Bl*Est1

Uma vez que os resultados de *thermal shift assay* mostraram que BlEst1 apresenta um aumento da T_m na presença de 300 mM de NaCl, prosseguimos com experimentos bioquímicos e biofísicos a fim de se elucidar esse possível aumento de estabilidade térmica.

3.2.7.1 Ensaios de atividade enzimática

1 A atividade enzimática foi monitorada utilizando ésteres ligados a *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich). O *p*-nitrofenol liberado após a ação das esterases foi medido por absorção a 405 nm. A atividade específica (U/mg) foi calculada como a quantidade de *p*-nitrofenol liberada por minuto (U) por mg de enzima purificada e então a atividade relativa foi calculada com o objetivo de comparar diferentes condições de reação. Para analisar os efeitos do NaCl na atividade, as reações foram definidas por tampão (30 mM Tris-HCl pH 7), 75 nM de emzima e concentrações de NaCl variando de 0 a 5 M. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM do substrato *p*-nitrofenil acetato (solução estoque de 50 mM em etanol 100%) na reação padrão pré-aquecida na temperatura de reação por 2 min. Os experimentos foram realizados nas condições padronizadas de pH e temperatura (como descrito no item 3.2.3.1).

3.2.7.2 Análise de estabilidade térmica por thermal shift assay

A técnica de *thermal shift assay* foi utilizada para se aferir a T_m de *Bl*Est1 bem como a estabilidade térmica na presença de 0 a 3 M NaCl. Para isso o equipamento *CFX96 Real-Time System* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado para monitorar a interação da sonda *Sypro Orange* (Invitrogen) com a enzima por excitação a 490 mm e emissão a 530 mm. Foi utilizada enzima a uma concentração final de 0,38 mg mL⁻¹. A temperatura variou de 25 a 90 °C com gradiente de 1 °C min⁻¹. A análise dos resultados e cálculo da T_m foram realizadas no programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

3.2.7.3 Análise da estabilidade térmica por Dicroísmo Circular (CD)

As análises de CD foram realizadas em espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Maryland, USA). A desnaturação foi monitorada a 222 nm de 30 a 70 °C com um gradiente de 0,5 °C min⁻¹, em tampão (30 mM Tris pH 7,0) com NaCl variando de 0,15 a 3 M. Para as medidas foram utilizadas cubetas de 0,1 cm de caminho óptico, *data pitch* de 2 °C, largura de banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 16 s. *Bl*Est1 se encontrava a uma concentração de 0,2 mg/mL. Os valores espectrais medidos foram então expressos na forma de fração de proteína desnaturada ($f_D = (x_n - x_{obs}) / (x_n - x_D) e f_D + f_n = 1$, onde *x* corresponde ao mínimo utilizado do espectro CD (222 nm); *n* indica valores espectrais da forma nativa; *D* indica valores espectrais da forma desnaturada; *obs* refere-se aos valores espectrais observados a uma dada temperatura). A T_m foi calculada pelo ponto de transição da função de Boltzmann ajustada aos dados experimentais.

3.2.7.4 Efeitos da temperatura na atividade na presença de NaCl

Para analisar o efeito da temperatura na atividade na presença de NaCl, alíquotas de 75 nM de enzima foram incubadas a 40, 50 e 60 °C por 72 h. A concentração de NaCl utilizada foi aquela que conferiu maior T_m à enzima de acordo com o experimento de *thermal shift assay*. Após a incubação, a atividade residual foi medida nas condições ótimas de temperatura e pH utilizando 1,0 mM de *p*-nitrofenil acetato como substrato em tampão (30 mM Tris pH 7, 3 M NaCl).

3.2.8 Estudos estruturais de *Bl*Est1

3.2.8.1 Cristalização e coleta de dados de difração de raios X

Os ensaios de cristalização foram realizados através do método de difusão de vapor em gota sentada. Placas de 96 reservatórios com três poços por reservatório foram utilizadas, nos quais a solução de proteína (10 mg mL⁻¹) foi misturada à solução do reservatório em três diferentes proporções, 1:1, 2:1 e 1:2. Os ensaios iniciais foram realizados através do método da matriz esparsa⁸⁶ utilizando as soluções de diversos kits de cristalização comerciais. Após a montagem do experimento, as condições de cristalização foram monitoradas periodicamente utilizando a incubadora de cristais *Rock Imager 1000* (Formulatrix) a 18 °C. A melhor condição de cristalização foi utilizada para produzir os complexos de *Bl*Est1 com ligantes pelo método de difusão de vapor em gota pendurada.

O complexo *Bl*Est1-ácido hexanóico cresceu após co-cristalização com 10 mM de ácido hexanóico. *Bl*Est1-ácido butírico foi obtido após *soaking* de 24 h com 10 mM *p*nitrofenil butirato. O complexo *Bl*Est1-PMS foi obtido após incubação com o irreversível inibidor de serina hidrolase PMSF por 24 h a 25 °C e então a supressão da atividade foi conferida com reação otimizada para a enzima usando o *p*-nitrofenil acetato como substrato. Então o complexo foi submetido a cromatografia de exclusão por tamanho em coluna *HiLoad Superdex 75 16/600* (GE Healthcare®) acoplada ao sistema *Äkta Purifier 10* (Amershan-Pharmacia) equilibrada com tampão (30 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl). Após a cromatografia, as frações contendo o complexo foram concentradas até 10 mg mL⁻¹ e submetidas à cristalização. A coleta de dados de difração de raios X foi realizada na linha de luz MX2 situada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas.⁸⁷ Antes da coleta, que é feita em condições criogênicas, os cristais foram crioprotegidos contra congelamento com óleo mineral.

3.2.8.2 Resolução das estruturas

Os processamentos dos conjuntos de dados de difração de raios X foram realizados utilizando o programa XDS,⁸⁸ promovendo a indexação, integração e escalonamento. O programa *Aimless*⁸⁹ foi utilizado para a conversão das intensidades em amplitudes e cálculo das estatísticas. A qualidade dos dados foi aferida com o programa *phenix.Xtriage.*⁹⁰ A estrutura nativa foi resolvida por substituição molecular usando o Phaser⁹¹ e a esterase homóloga Est30 (PDB 1TQH), que possui 77% de identidade de sequência como modelo de busca. Os complexos *BI*Est1-ligantes foram processados com os mesmos programas e tiveram suas fases resolvidas por substituição molecular usando a estrutura nativa como modelo. A construção dos modelos, refinamento e validação das estruturas foram realizadas pelos programas *Autobuild*,^{90;92} *phenix.refine*,^{90;93} *Coot*⁹⁴ e *Molprobity.*⁹⁵ As figuras foram produzidas com o auxílio do programa *PyMOL* (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.)

3.3 Resultados

3.3.1 Análise de sequência

A carboxilesterase BlEst1 (AAU42463.1) é uma proteína com 248 aminoácidos da cepa B. licheniformis DSM 13/ATCC 14580. De cordo com o banco de dados ESTHER, BlEst1 é classificada na família CarbLipBact 1, que é parte do grupo Hydrolase 4 do bloco X. A Figura 5 mostra a relação entre *Bl*Est1 (*Hydrolase_4 – CarbLipBact1*) e outras enzimas bacterianas que tiveram suas estruturas caracterizadas até esse momento: a esterase homóloga mais próxima Est30, uma enzima CarbLipBact1 de Geobacillus stearothermophilus (PDBid 1TQH),⁹⁶ a monoacilglicerol lipase mais próxima bMGL, uma enzima CarbLipBact2 de Bacillus sp. H257 (PDBid 3RM3),⁹⁷ enzimas das subfamílias Atu 1826-like e Proline iminopeptidase, também da família Hydrolase 4 do Bloco X; as carboxilesterases bacterianas do Bloco C; e as lipases bacterianas do Bloco L. Apesar de ser um esterase, BlEst1 está claramente separada das enzimas do Bloco C devido à ausência das assinaturas ps00941 e ps00122. Inclusive, as enzimas do Bloco C são mais relacionadas com as outras subfamílias do Bloco X do que com BlEst1, como a Proline iminopeptidase que não apresenta atividade esterase e Atu1826-like, cujas enzimas ainda não foram caracterizadas com atividade esterase até o momento. O grupo das lipases bacterianas do Bloco L se encontram em um ramo mais distante. Embora BlEst1 não tenha as assinaturas Carboxylesterase_B, ela está classificada na família abH11- Carboxylesterases, subfamília abH11.01-Bacillus *carboxylesterase* de acordo com o banco de dados *Lipase Engineering Database* (LED).¹⁷



Figura 5 – Relação entre *Bl*Est1 e outras enzimas bacterianas de diferentes famílias de acordo com o banco de dados ESTHER. Os retângulos de linha contínua englobam as proteínas da família *Hydrolase 4* do Bloco X; o retângulo de linha tracejada engloba os membros da família *Carboxylesterases* do Bloco C; e o retângulo de tracejado pequeno engloba as enzimas da família *Bacterial Lipase* do Bloco L. A serina protease subtilisina de *B. amyloliquefaciens* foi utilizada como grupo externo. As enzimas são identificadas com seus respectivos códigos de acesso do PDB. O dendrograma foi contruído por máxima verossimilhança pelo programa MEGA⁷⁴.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Produção da proteína recombinante

A enzima *Bl*Est1 foi expressa em cepa de *E. coli* Rosetta e purificada com sucesso a um rendimento final de 38 mg de proteína por litro de cultura, com nível de pureza superior a 95% de acordo com análise em gel SDS-PAGE (Figura 6A). Para se analisar a homogeneidade da amostra, uma gel-filtração analítica foi feita, e através do cálculo do coeficiente de partição (K_{av}) foi possível determinar a massa e o estado oligomérico. *Bl*Est1 apresenta massa molecular de 34,6 kDa, que é bem próxima à teórica calculada a partir da sequência de aminoácidos (28 kDa), indicando um estado monomérico em solução (Figura 6B).



Figura 6 – Homogeneidade de *Bl*Est1. A) Análise em gel SDS-PAGE 15% da enzima purificada. M: marcador de peso molecular marcado em kDa. B) Peso molecular de Blest1 calculado por gel-filtração analítica. O ajuste linear está representado em linha tracejada (R² = 0,96).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.3 Caracterização bioquímica de BlEst1

Para determinar as condições de reação de *Bl*Est1, a atividade enzimática foi medida em função de variações de temperatura e pH utilizando como substrato *p*-nitrofenil acetato. A enzima apresentou pouca ou nenhuma atividade em pHs ácidos (pH 4,0 e pH 5,0) e um súbito aumento de atividade entre pH 5,0 e pH 6,0, tendo um pico de atividade pH 7,0 (Figura 7A). Entre pHs 6,0 e 9,0 a enzima reteve 80% de sua atividade máxima. *Bl*Est1 perde totalmente a atividade em pH 10. Em função da temperatura, o máximo de atividade foi atingido em 40°C, apresentando um platô de atividade entre 40 e 45°C (Figura 7B). Com 55°C houve uma queda abrupta de atividade.

O efeito da temperatura na atividade também foi aferido por incubação de alíquotas das enzimas por 72h na temperatura ótima de atividade (40°C) e à 50°C, em seguida a atividade residual de cada alíquota foi calculada. *Bl*Est1 apresentou um perfil estável a 40 °C, retendo 40% de atividade após 72 h de incubação, porém, à 50°C após 10 h de incubação já havia perdido totalmente a atividade (Figura 7C).



Figura 7 – Efeitos da variação de pH e temperatura na atividade de *BI*Est1. A) Absorbância relativa do produto de reação *p*-nitrofenol em função da variação de pH. B) Efeito da temperatura na atividade. C) Atividade residual após incubação por 72 h a 40 e a 50 °C.

Fonte: Elaborada pela autora. Com o objetivo de se estudar o efeito de diferentes compostos na atividade, *Bl*Est1 foi incubada com solventes orgânicos, detergentes, íons entre outros (Tabela 3). *Bl*Est1 se mostrou estável em solventes orgânicos, mantendo 85% da atividade, o que é uma característica comum a carboxilesterases.¹ Ela foi fortemente inibida por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), o que é típico de serina hidrolases devido à ligação covalente do inibidor com a serina catalítica. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) levou a uma redução de 50 % da atividade, sugerindo que a enzima pode requerer íons metálicos para sua atividade, uma vez que EDTA age como agente quelante. Porém, nenhum dos íons testados aumentou a atividade enzimática. Pelo contrário, Zn^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} causaram perda total da atividade.

Tratamento	Atividade relativa (%)
Nenhum	$100,00 \pm 3,10$
Metanol (1%)	$97,30 \pm 3,62$
Isopropanol (1%)	$89,32 \pm 2,60$
Butanol (1%)	$104,67 \pm 1,44$
Glicerol (1%)	$88,77 \pm 3,38$
DMSO (1%)	$85,14 \pm 2,30$
Tween 80 (1%)	$71,\!45 \pm 0,\!78$
Triton x100 (1%)	$55,86 \pm 1,15$
EDTA (1 mM)	$49,36 \pm 3,07$
PMSF (1 mM)	$0,18 \pm 0,39$
DTT (1 mM)	$77,16 \pm 9,83$
$Mg^{2+}(1 mM)$	$81,28 \pm 3,49$
$Ca^{2+}(1 mM)$	$82,14 \pm 1,47$
$Zn^{2+}(1 \text{ mM})$	$1,\!17\pm0,\!21$
$Mn^{2+}(1 mM)$	$100,55 \pm 4,25$
$Fe^{3+}(1 mM)$	$0,\!00\pm0,\!00$
$Li^+(1 mM)$	$92,57 \pm 2,02$
$Ni^{2+}(1 mM)$	$55,62 \pm 3,61$
K^+ (1 mM)	$90,12 \pm 4,59$
$\mathrm{Co}^{2+}(1 \mathrm{~mM})$	$79,37 \pm 3,88$
Cu^{2+} (1 mM)	$0,00\pm0,00$
$Cs^+(1 \text{ mM})$	$93,25 \pm 0,29$

Tabela 3 - Efeito de diversos compostos na atividade de BlEst1.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.4 Especificidade

Para analisar a especificidade, a atividade enzimática foi medida utilizando diferentes substratos com cadeia entre 2 e 12 átomos de carbono (Figura 8). As análises revelaram que BlEst1 possui maior especificidade com substratos de cadeia curta. O máximo de atividade foi constatado contra p-nitrofenil acetato e aproximadamente 50% de atividade foi mantida contra p-nitrofenil butirato. De acordo com o aumento do tamanho do comprimento do substrato, a atividade cai, atingindo 10% do máximo contra p-nitrofenil caprilato e praticamente zero contra p-nitrofenil caprato e p-nitrofenil laurato.



Figura 8 – Especificidade de *Bl*Est1. A atividade foi calculada contra substratos de diferentes tamanhos de cadeia. Reações foram conduzidas nas condições padronizadas (40 °C, pH 7) com 1 mM de substrato.
Este a substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.5 Estudos biofísicos em solução

3.3.5.1 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As análises de SAXS foram consistentes com a de gel filtração analítica tanto em relação ao grau de oligomerização quanto em relação à massa de *Bl*Est1. As estatísticas e dados de processamento estão relacionados na Tabela 4. A massa molecular estimada baseada na curva experimental de SAXS foi de 33,4 kDa, coerente com a massa calculada através de gel filtração analítica que foi de 34,6 kDa. A curva de Guinier é linear na faixa de 0.001-0.004 Å⁻², indicando que a proteína se encontra monodispersa com R_g de 19.72 +- 0.48 Å (Figura 5A). As funções de distribuição de distâncias (p(r)) sugeriram uma forma globular com distância máxima de (D_{max}) of 62.2 Å. (Figura 9B). O envelope molecular gerado mostrou um ajuste satisfatório com os dados cristalográficos (χ FoXS = 3.12) (Figura 9A e C).

Parâmetros de coleta de dados	<i>Bl</i> Est1
Fonte de raio X	LNLS D02A-SAXS2
Comprimento de onda (Å)	1.488
q range $(Å^{-1})$	0.016 - 0.210
Tempo de exposição (s)	300
Faixa de concentração (mg/mL)	1 & 2
Temperatura (°C)	25
Parâmetros estruturais	
Rg (Å) (Guinier) (± SE)	19.72 ± 0.48
Rg (Å) GNOM) (± SE)	19.61 ± 0.00
Dmax (Å)	62.21
Resolução (Å)	30
Massa molecular	
MWSAXS (kDa)	33.4
MWTeo (kDa)	28
Estado oligomérico	monômero
Modelagem Ab initio	
Número de modelos	10
NSD	0.555 ± 0.024
X	3.12

Tabela 4 - Coleta de dados e processamento de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de BlEst1.

Fonte: cedida pelo Dr. Marco Kadowaki.



Figura 9 - Análise de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de *Bl*Est1. A) Curva de ajuste entre modelo e dados experimentais. B) Funções de distribuição de distâncias (p(r)). C) Modelagem estrutural. Envelope molecular gerado com base nos dados de SAXS está representado em cinza, sobreposto ao modelo cristalográfico (azul).

Fonte: Cedida pelo Dr. Marco Kadowaki.

3.3.5.2 Estabilidade térmica por fluorimetria

As técnicas de fluorimetria de escaneamento diferencial (*termal shift assay*) e fluorescência foram utilizadas para aferir a estabilidade térmica da enzima e obter suas temperaturas de *melting* (T_m). Além disso, a primeira técnica é capaz de aferir a estabilidade

em diferentes sais e pHs, trazendo informações sobre o melhor tampão de estocagem, bem como para medir atividade e realizar ensaios de cristalização. Por esta técnica, a T_m de *Bl*Est1 em água foi 47 (Tabela 5). No geral, pHs abaixo de 6,5 resultaram em uma diminuição da T_m . Ao adicionarmos 300 mM de NaCl (poços D1 a D12), *Bl*Est1 teve sua estabilidade aumentada para todas as condições testadas em relação às mesmas sem NaCl.

лЦ	Tompão (50 mM)	NaCl Temperatura d	
pm	Tampao (50 mivi)	(mM)	Melting
-	Água	0	47
4,0	Citrato de sódio	0	30
10,0	Carbonato de sódio	0	32
9,5	Carbonato de sódio	0	37
5,0	Acetato de sódio	0	38
4,7	Citrato de sódio	0	42
5,8	Mes	0	42
5,0	Fosfato de potássio	0	44
6,0	Bis-Tris	0	44
6,2	Mes	0	44
6,5	Mes	0	46
9,0	Bicina	0	46
5,5	Fosfato de sódio	0	47
6,0	Fosfato de potássio	0	47
6,7	Bis-Tris	0	47
7,0	Bis-Tris	0	47
8,0	Imidazol	0	47
5,5	Citrato de sódio	0	48
6,5	Bis-Tris	0	48
7,0	Hepes	0	48
5,0	Fosfato de potássio	300	48
6,5	Cacodilato de sódio	0	49
7,5	Fosfato de sódio	0	49
8,0	Hepes	0	49
8,0	Tris	0	49
8,0	Bicina	0	49
8,5	Tris	0	49
5,8	Mês	300	49
6,0	Bis-Tris	300	49
6,5	Fosfato de sódio	0	50
7,0	Fosfato de potássio	0	50
7,3	Acetato de amônio	0	50
7,5	Tris	0	50
5,5	Citrato de sódio	300	51
5,5	Bis-Tris	300	52
6,5	Cacodilato de sódio	300	52
7,0	Bis-Tris	300	52
8,0	Hepes	300	52
6,5	Fosfato de sódio	300	53
7,0	Hepes	300	53
7,3	Acetato de amônio	300	53
7.5	Tris	300	53

Tabela 5 – Estabilidade térmica de *Bl*Est1 aferida por *thermal shift assay*.

Fonte: Elaborada pela autora.

A estabilidade térmica também foi estudada por fluorescência intrínseca. *BI*Est1 possui quatro triptofanos dos quais aproximadamente metade encontram-se enterrados e metade na superfície proteica. A enzima não apresentou diferença relevante entre os espectros de emissão entre 20 e 50°C, indicando que não houve profundas alterações na estrutura terciária entre essas temperaturas (Figura 10A). Porém, o espectro a 60°C apresentou um deslocamento na emissão máxima para o azul, de 344 nm ($\lambda_{máx}$ em 20°C) para 338 nm. Este deslocamento foi acompanhado por um aumento na intensidade de fluorescência. Esses dois fatores indicam uma mudança relevante na estrutura terciária da enzima, e são comuns durante a agregação.⁹⁸ Estes resultados sugerem que o ambiente em torno dos triptofanos está mais apolar em função da agregação, de modo que os resíduos estejam enterrados nos agregados proteicos.

Com a finalidade de estabelecer uma T_m por esta técnica, a fluorescência de 20 a 60°C foi monitorada utilizando o comprimento de onda do pico de emissão a 20°C (Figura 10B). Percebe-se que a intensidade de fluorescência cai de 20°C até aproximadamente 45°C, indicando uma exposição gradual dos triptofanos ao solvente polar. A partir dos 45°C iniciase o processo de perda da estrutura terciária e agregação resultando em uma curva sigmoidal que se ajusta em uma equação de boltzmann ($R^2 = 0.98$), assumindo a existência de dois estados: não desnaturado em solução e desnaturado em agregados. A partir dessa curva foi possível o cálculo do T_m que foi de 51°C, concordando com os resultados obtidos por fluorimetria de escaneamento diferencial.



Figura 10 – Estabilidade térmica por espectroscopia de fluorescência. A) Espectros de emissão de 20 a 60 °C. B) Monitoramento da intensidade de fluorescência.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.5.3 Dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia dicroica, ou dicroísmo circular (CD) foi utilizada para se estudar a estrutura secundária de *BI*Est1. A Figura 11 mostra o espectro CD experimental na região do UV-distante (240-180 nm) em função da elipticidade molar residual ($[\theta]_{mrw}$) entre 200 e 260 nm. A presença de uma intensa banda negativa com dois picos mínimos, um em 208 e outro em 222 nm, e uma banda positiva abaixo de 200 nm indica uma proteína composta majoritariamente por α -hélices. No entanto, a banda negativa não é bem definida, contendo apenas o mínimo de 222 nm definido, o que acontece devido à contribuição das fitas β . Isso é consistente com o espectro de proteínas com enovelamento α/β -hidrolase, e concorda com os dados cristalográficos. Adicionalmente, um espectro predito a partir das coordenadas atômicas experimentais foi calculado com o programa PDB2CD,⁸⁴ que foi satisfatoriamente ajustado ao espectro experimental. Como para deconvolução é necessária a região abaixo de 200 nm e esta não foi possível medir devido a limitações experimentais, causando amplo

ruído nessa região, o espectro predito foi utilizado para o cálculo de composição de estrutura secundária. Pelo método K2D3, *Bl*Est1 apresenta 85,1% de α -hélices e 1,5 % de fitas β .



Figura 11 – Espectro de dicroísmo circular (CD) de *Bl*Est1 em função da elipticidade molar residual ([θ]_{mrw}). O espectro experimental está representado por quadrados e o espectro predito a partir da estrutura cristalográfica pelo PDB2CD ⁸⁴ está representado por círculos.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.6 Atividade e estabilidade térmica de *Bl*Est1 em altas concentrações de sal

Como apresentado no item 3.3.5.2, um experimento de *thermo shift assay* foi realizado para aferir a estabilidade térmica da enzima e obter sua T_m em diferentes condições. Com a adição de 300 mM de NaCl em algumas das condições testadas a enzima *Bl*Est1 teve sua estabilidade aumentada para todas as condições em relação às mesmas sem NaCl. Dessa forma novos experimentos bioquímicos e biofísicos foram necessários a fim de se elucidar esse possível aumento de estabilidade térmica.

Em relação aos efeitos na atividade enzimática, a liberação de p-nitrofenol foi monitorada utilizando p-nitrofenil acetato como substrato e concentrações de NaCl variando de 0 a 5 M. A Figura 12 mostra que a enzima mantém praticamente 100 % de atividade de 0 a 2 M NaCl e retém mais de 75 % de atividade em 5 M NaCl.

Em relação à estabilidade térmica de *Bl*Est1 na presença de sal, o efeito da temperatura foi avaliado tanto em relação a atividade, quanto em relação ao enovelamento. Para avaliar o enovelamento, duas técnicas foram utilizadas. A técnica de *thermo shift assay* foi utilizada para se aferir a T_m de *Bl*Est1 na presença de 0 a 3 M NaCl. Além disso, a técnica de dicroísmo circular (CD) também foi utilizada para monitorar a desnaturação de 0,15 a 3 M NaCl. Os resultados de *themo shift assay* indicaram um aumento progressivo de 17 °C na T_m , variando de 47 para 64 °C de 0 a 3 M NaCl (Figura 13A). Uma melhora similar na estabilidade térmica foi observada por CD, com um aumento de 13 °C na T_m , variando de 50 °C com 0,15 M NaCl para 63 °C com 3 M NaCl (Figura 13B).

Para analisar o efeito da temperatura na atividade na presença de NaCl, alíquotas de enzima foram incubadas a 40, 50 e 60 °C por 72 h. A concentração de NaCl utilizada foi 3 M, que é a que conferiu maior T_m à enzima de acordo com os experimentos de *thermo shift assay* e CD. Após a incubação, a atividade residual foi medida e os resultados estão representados na Figura 14. Na temperatura otimizada para as condições experimentais testadas (40 °C), a enzima se apresentou altamente estável, retendo totalmente sua atividade depois de 56 h de incubação e mantendo 94% da atividade após 72 h. A 50 °C, a enzima manteve 55% de sua atividade após 72 h, porém, a 60 °C uma completa perda de atividade foi observada antes das 8 h de incubação.



Figura 12 – Atividade da carboxilesterase *Bl*Est1 na presença de concentrações de NaCl de 0 a 5 M. Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 13 – Efeito do NaCl na estabilidade térmica e enovelamento de *Bl*Est1. A) Influência de diferentes concentrações de NaCl na temperatura de *melting* monitorada por *thermo shift assay*. Em detalhe está representado o deslocamento no sinal de fluorescência: à medida que a concentração de NaCl aumenta, há um deslocamento da fluorescência para maiores temperaturas. B) Desnaturação monitorada por dicroísmo circular (CD) a 222 nm de 30 a 70 °C. Valores espectrais estão expressos na forma de fração de proteína desnaturada (*f*_D).

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 14 – Efeito do NaCl na estabilidade térmica e atividade de BlEst1. As curvas representam os valores de atividade residual relativa após incubação de até 72 h a 40, 50 e 60 °C na presença de 3 M NaCl. Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.7 Estruturas cristalográficas de *Bl*Est1 e análise estrutural

3.3.7.1 Cristalização, coleta e processamento dos dados

*Bl*Est1 foi submetida a triagens por condições de cristalização utilizando diferentes conjuntos de soluções comerciais. Cristais nativos de *Bl*Est1 cresceram na condição composta por 0,2 M de acetato de sódio, 0,1 M de Bis-Tris propano pH 8,5 e 20% (m/v) de polietilenoglicol (PEG) 3350 do conjunto PACT *Suite* (Molecular Dimensions, USA) após

três dias (Figura 15A). A mesma condição foi utilizada para produzir os cristais dos complexos *Bl*Est1-ácido henaxóico (Figura 15B) e *Bl*Est1-PMS (Figura 15C). Para o complexo *Bl*Est1-ácido butírico, com cristais nativos (Figura 15A) foi feito *soaking* por 24 h em 10 mM *p*-nitrofenil butirato. Os cristais foram submetidos à linha de luz de raios X MXII situada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas,⁸⁷ usando uma radiação de comprimento de onda de 1.459 Å. Dados de difração foram coletados 1,7 Å de resolução para o cristal nativo e 2,2, 2,6 e 2,0 Å para os complexos com ácido butírico, ácido hexanóico e PMS, respectivamente (Tabela 6).



Figura 15 – Cristais de obtidos de *Bl*Est1 na forma nativa e em complexo com ligantes. A) Cristais de *Bl*Est1 nativo. B) Cristais de *Bl*Est1 co-cristalizados com ácido hexanóico. C) Cristais de *Bl*Est1 em complexo com PMSF.
 Fonte: Elaborada pela autora.

O conjunto de dados nativo foi integrado no grupo espacial P4₁2₁2, com parâmetro de célula unitária a = b = 58.27 Å, c = 167.73 Å, resultando em 32911 reflexões únicas com completeza de 99,92%. O cálculo do coeficiente de Matthews (2.32 Å³ Da⁻¹) indicou uma molécula da unidade assimétrica, com 46% de solvente.⁹⁹ Uma busca baseada na sequência de aminoácidos por enzimas homólogas foi feita contra o PDB pelo BLAST,¹⁰⁰ revelando 77% de similaridade de sequência com a esterase *Est30* de *G. stearothermophilus* (PDB entry 1TQH),⁹⁶ que foi utilizada como modelo para resolução da estrutura de *Bl*Est1 por substituição molecular, resultando em um modelo final com R_{work}/R_{free} de 0,17/0,21.

Os conjuntos dos complexos *Bl*Est1-ligantes foram resolvidos por substituição molecular utilizando as coordenadas atômicas de *Bl*Est1 nativo como modelo. Os dados de processamento e estatísticas estão representados na Tabela 6. Todos os conjuntos de dados foram integrados no grupo espacial P4₁2₁2 com uma molécula na unidade assimétrica de acordo com o coeficiente de Matthews (2.32 Å³ Da⁻¹). O processo de refinamento resultou em modelos finais com parâmetros estereoquímicos aceitáveis e R_{work}/R_{free} iguais a 0,26/0,29, 0,24/0,29 e 0,21/0,24 para os complexos *Bl*Est1-ácido butírico, *Bl*Est1-ácido hexanóico e *Bl*Est1-PMS, respectivamente.

 Tabela 6 Informações e estatísticas da coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura tridimensional da carboxilesterase *Bl*Est1 de *B. licheniformis* em sua forma nativa e em complexo com ácido butírico, ácido hexanóico e PMS. Valores da faixa mais alta de resolução são mostrados entre parênteses.

Coleta de dados e	<i>Bl</i> Est1 nativo	BlEst1-ácido	BlEst1-ácido	DEct1 DMS
processamento		butírico	hexanóico	BIESTI-PMS
Easter 1. 1'Carrow	MX2 (LNLS,	MX2 (LNLS,	MX2 (LNLS,	MX2 (LNLS,
Fonte de difração	Brasil)	Brasil)	Brasil)	Brasil)
Comprimento de onda (Å)	1,459	1,459	1,459	1,459
Detector	PILATUS 2M	PILATUS 2M	PILATUS 2M	PILATUS 2M
Detector	(Dectris [®])	(Dectris [®])	(Dectris [®])	(Dectris [®])
Distância cristal-detector	100	120	200	120
(mm)	100	120	200	120
Ângulo de rotação por	1	1	0.5	0.2
imagem (°)	1	1	0,5	0,2
Amplitude total de rotação	360	360	360	260
(°)	500	500	500	500
Grupo espacial	P4 ₁ 2 ₁ 2			
a h c(Å)	58,27, 58,27,	55,96 55,96	55,52 55,52	55,51 55,51
<i>u, b, c</i> (<i>H</i>)	167,73	170,67	169,35	170,39
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Mosaicidade (°)	0,21		0	0,34
Resolução (Å)	41,21 - 1,7	46,8 - 2,2	39,58 - 2,6	33,79 - 2,0
No. total de reflexões	807936 (41250)	29097 (2810)	212856 (31114)	455967 (32484)
No. de reflexões únicas	32911 (1714)	14549 (1398)	8826 (1242)	18853 (1348)
Multiplicidade	31,4 (4,4)	2,0 (2,0)	24 (25)	24 (24)
Completeza (%)	99,92 (99,72)	99,79 (99,50)	99,69 (99,76)	99,32 (98,59)
$\langle I/\sigma(I)\rangle$	33,11 (5,06)	5,52 (1,81)	4,72 (1,67)	34,99 (8,52)
R _{pi.m.}	0,02 (0,26)	0,05 (0,24)	0,12 (0,48)	0,02 (0,12)
CC _{1/2}	1 (0,98)	1 (0,92)	0,97 (0,96)	1 (0,99)
Wilson <i>B</i> factor ($Å^2$)	16,18	29,98	34,09	32,25
Refinamento				
R _{work}	0,17	0,26	0,24	0,21
R _{free}	0,22	0,29	0,29	0,24
RMSD				
Ligações (Å)	0,006	0,003	0,003	0,005
Ângulos (°)	1,05	0,86	0,86	0,94
Ramachandran plot				
Favoráveis (%)	98,37	98,33	96,67	98,33
Permitidos (%)	1,63	1,67	3,33	1,67
Outliers (%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Average B-factor	19,47	37,74	31,96	41,88
Macromolécula	17,25	37,73	32,06	41,64
Ligante	38,98	39,97	34,48	40,07
Solvente	29,63	37,74	25,86	46,33

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.7.2 Modelo tridimensional da estrutura nativa de BlEst1

O modelo final refinado de *Bl*Est1 apresenta uma cadeia polipeptídica contínua com 248 resíduos, de Met1 a Trp248. A cadeia lateral dos resíduos Met33 e Arg174 foram modelados em duas conformações diferentes. Há 98,37% dos resíduos dentro da região favorável do diagrama de Ramachandran, sem a presença de *outliers*. Densidade eletrônica interpretável de duas moléculas de Bis-Tris propano são observadas na camada de solvatação.

*Bl*Est1 apresenta um enovelamento tipo α/β hidrolase ²¹ para o domínio catalítico e um domínio adicional formado por três α-hélices (Figura 16A). A tríade catalítica Ser93, Asp192 e His222 está localizada entre os domínios. O domínio catalítico é composto por sete fitas β, β1 (Phe9- Phe11), β2 (Ala17-Leu21), β3 (Thr44-Ala47), β4 (Gln86-Leu92), β5 (Ile111- Met114), β6 (Thr184-Ala189) e β7 (Lys212-Tyr217), formando uma folha β central circundado por seis α hélices α1 (Thr28-Glu40), α3 (Pro65-Glu82), α4 (Leu94-Tyr104), α7 (Leu163-Met179), α8 (Thr197-Glu206), α9 (Ile224-Leu226) e α10 (Arg230-Thr243) (Figura 16B). A primeira fita (β1) é antiparalela às outras. O segundo domínio é formado pelas hélices α2 (Pro57-Ser62), α5 (Glu123-Glu141) e α6 (Ala145-Lys156).

A arquitetura do enovelamento típico α/β hidrolase é composta por uma folha β formada por oito fitas β , sendo a segunda fita antiparalela às outras, rodeada por α hélices ²⁰. Essa conformação pode variar em número de fitas e domínios.^{2;20} A estrutura de *BI*Est1 apresenta diferenças dessa arquitetura típica: como outras carboxilesterases,^{24;96} *BI*Est1 não possui a primeira fita e, por isso, a folha β começa com a fita antiparalela em seu N terminal (Figura 16). Além disso, difere em número de domínios, possuindo o segundo domínio de α hélices. Porém, a localização de α 5 e α 6 é conservada entre proteínas com enovelamento α/β hidrolase, localizadas após β 5 (β 6 na estrutura canônica – Figura 2).As três hélices acima do domínio α/β hidrolase participam da formação de um canal exposto ao solvente (Figura 17), no qual está localizada o bolso de ligação ao substrato que abriga os resíduos da tríade catalítica composta por um nucleófilo (Ser93), um resíduo ácido (Asp192) e uma histidina (His222).



Figura 16 - Estrutura tridimensional da carboxilesterase BlEst1 de B. licheniformis. A) Estrutura da BlEst1. A tríade catalítica está representada em azul. B) Representação da estrutura secundária de BlEst1 utilizando o PDBsum.¹⁰¹ O motivo Gly-X-Ser-X-Gly típico de carboxilesterases está destacado em azul. A tríade catalítica está assinalada com um asterisco azul.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 17 – Moléculas de água cristalográficas presentes no bolso de ligação ao substrato exposto ao solvente da estrutura nativa de BlEst1 de B. licheniformis. A serina catalítiva Ser93 está representada na forma de bastão azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.7.3 Sítio ativo e oxyanion hole

A tríade catalítica é formada por um resíduo nucleofílico (Ser93), um resíduo ácido (Asp192) e uma histidina (His222) (Figura 18A). Estes três resíduos e sua localização é conservada entre as α/β -hidrolase.²¹ A His222 é localizada no *loop* após a última fita β (β 7). Em todas as carboxil-ester hidrolases, o resíduo nucleófilo é uma serina (Ser93), situada depois de β 4 (β 5 na estrutura canônica – Figura 2) no pequeno e curvado *loop* chamado de *nucleophile elbow*, caracterizado pelo motivo Gly-x₁-Ser-x₂-Gly (Figura 18B). Próxima à fita β 6 (β 7 na estrutura canônica) está localizado o resíduo ácido, Asp192.

Já o *oxyanion hole* é formado por dois resíduos, o primeiro é o resíduo x_2 do *nucleophile elbow* e segundo está localizado em um loop após $\beta 2$ ($\beta 3$ na forma α/β hidrolase canônica) e é chamado de *oxyanion loop* (Figura 18C e 18D). O grupo amina desses resíduos atuam na estabilização do intermediário tetraédrico durante a catálise por pontes de hidrogênio. O *oxyanion hole* de *Bl*Est1 é composto por Leu94 (resíduo x_2 do *nucleophile elbow*) e Phe24 (após um resíduo Gly no *oxyanion loop*). Esta glicina é conservada entre lipases *Bl*Est2 e essa configuração (Figura 18D) classifica *Bl*Est1 na família GX (Gly23 – Phe24) no banco de dados *Lipase Engineering Database*.¹⁷



Figura 18 - Centro catalítico de *Bl*Est1. A) Tríade catalítica Ser93, Asp192 e His222. B) *Nucleophile elbow* composto pela assinatura de sequência Sm-x1-S-x2-Sm, (Sm = resíduo pequeno, x = qualquer resíduo e S = serina catalítica). C) *Oxyanion hole* formado por Phe24 e Leu94. D) *Oxyanion Loop* evidenciando a composição da classe GX de acordo com o banco de dados *Lipase Engineering Database*¹⁷.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.7.4 Modelos tridimensionais dos complexos de BlEst1

*Bl*Est1 é uma enzima que tem especificidade para substratos de cadeia curta, como apresentado no item 3.3.4. Por isso, ácidos graxos de cadeia curta foram utilizados em protocolos de *soaking* e co-cristalização com a intenção de se elucidar os aspectos estruturais envolvidos na especificidade da enzima. No entanto, não foi possível conseguir um modelo com acetato, com o qual a enzima apresenta maior especificidade, e apenas conjuntos com ácido butírico e ácido hexanóico geraram bons dados de difração de raios X, com densidade eletrônica interpretável no sítio ativo. Além disso, para entender as relações estabelecidas no sítio ativo, complexos com o inibidor irreversível de serina hidrolase, PMSF, foram estabelecidos.

As estruturas refinadas possuem uma cadeia polipeptídica contínua de 241 resíduos, da Pro6 até Tpr246. Os primeiros cinco resíduos N-terminal e os dois últimos C-terminal não foram construídos devido à falta de densidade eletrônica. Os ligantes ácido butírico (Figura 19A) e o PMS (Figura 19E) parecem estar covalentemente ligados na serina catalítica enquanto o ácido hexanóico mantém uma distância de 2,5 Å (Figura 19C). Ao analisar as interações entre ligantes e os resíduos circundantes pelo *LigProt*,¹⁰² podemos ver que o complexo com ácido butírico encontra-se na forma acil-enzima, com o BUA ligado covalentemente à Ser93 enquanto os resíduos do *oxyanion hole* permanecem ao redor apenas com contatos hidrofóbicos (Figura 19B). Já os complexos com ácido hexanóico (Figura 19D), 6NA está estabilizado por uma ligação de hidrogênio com a amina do resíduo *oxyanion* Phe24; e em *Bl*Est1-PMS, apesar de PMS estar aparentemente ligado covalentemente à Ser93, ele permanece estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupos amina dos resíduos *oxyanion* Phe24 e Leu94.



Figura 19 – *Bl*Est1 em complexo com ligantes e suas interações. A, C e E) Mapa de densidade eletrônica 2Fo–Fc (2σ) correspondente aos ligantes ácido butírico (A), ácido hexanóico (B) e PMS (C). Os ligantes, a serina catalítica (Ser93) e o resíduo do *oxyanion hole* Phe24 estão representados em azul. B, D e F) Mapa de interações entre *Bl*Est1 e os ligantes gerado pelo LigProt.
Fonte: Elaborada pela autora
3.4 Discussão

3.4.1 Comparação entre estrutura e atividade de *Bl*Est1 com enzimas homólogas

BlEst1 compartilha algumas características com a enzima homóloga mais próxima, a esterase de G. stearothermophilus Est30.96 Estas enzimas são similares tanto em sequência, apresentando 77% de identidade, quanto em estrutura com um RMSD de 0,414 para 217 átomos Cα. Est30 também possui o segundo domínio, o qual foi chamado de *cap*. Um *cap* ou *lid* é um domínio anfifílico típico de lipases, que quando em conformação fechada, protege seus resíduos hidrofóbicos fechando-se sobre o bolso de ligação ao substrato, também hidrofóbico, do domínio catalítico.9;103 A conformação aberta requer uma interface entre o solvente e um substrato insolúvel para ocorrer a ativação da enzima, estabilizando a parte hidrofóbica do *cap* com o substrato. Esse mecanismo é chamado de ativação interfacial ⁴⁻⁵ e a presença de um domínio *cap* pode auxiliar para que ele ocorra. Embora *Bl*Est1 apresente um segundo domínio além do catalítico, a enzima é ativa em substratos solúveis e não apresenta o mecanismo de ativação interfacial. Além disso, a análise da fenda catalítica na estrutura nativa mostra que ela é preenchida por solvente e ao compararmos com as estruturas dos complexos, não há nenhuma alteração conformacional do domínio adicional. Sendo assim, o segundo domínio de BlEst1, apesar de se posicionar de maneira conservada quando comparada às enzimas com *lid* (após $\beta 6$ de acordo com a numeração canônica), optamos por não o chamar de *lid* por ele não configurar conformações aberta e fechada à *Bl*Est1.

Apesar de ambas serem ativas em substratos de cadeia curta, BlEst1 e Est30³² apresentam consideráveis diferenças em sua atividade e especificidade com o substrato. Est30 forma dímeros em solução enquanto BlEst1 é um monômero. BlEst1 apresenta atividade máxima contra o substrato *p*-nitrofenil acetato (C2) (Figura 8) ao passo que Est30 apresenta maior atividade contra *p*-nitrofenil caproato (C6). As enzimas também diferem quanto as condições ótimas de atividade: Est30 é mais ativa em pH alcalino (pH 9,0) e altas temperaturas (70 °C), enquanto BlEst1 possui maior atividade em temperaturas mesofílicas (45°C) e pH neutro (pH 7,0) (Figura 7). Atividade próximo ao neutro é comum em esterases enquanto que lipases frequentemente apresentam atividade em pHs básicos.¹¹

A maior atividade apresentada por *Bl*Est1 por substratos de cadeia curta a caracteriza como uma típica esterase.^{1;104} As lipases, por geralmente apresentarem mecanismo de ativação interfacial, requerem uma interface entre o substrato e meio aquoso para a ativação ocorrer.⁵ Uma vez que ácidos graxos com cadeia longa são tipicamente insolúveis em água, o

tamanho do substrato, bem como sua solubilidade são os fatores determinantes da especificidade.¹¹ Dessa maneira, lipases apresentam tendência a hidrolisar substratos de cadeia longa enquanto que esterases são mais ativas para substratos curtos.¹ Isso explica a classificação de *Bl*Est1 no grupo abH11.01 de carboxilesterases de *Bacillus* no banco de dados LED, e não no grupo de lipases (abH18), porém a classificação na classe GX discorda da especificidade, uma vez que enzimas com *oxyanion hole* GX geralmente hidrolisam substratos de cadeia média a longa.³⁷

Para entender as características estruturais envolvidas nessa diferença de atividade, alinhamos a estrutura tridimensional de *Bl*Est1 com a lipase homóloga mais próxima, a monoacilglicerol lipase bMGL de *Bacillus sp.* H257 (PDB 3RM3).⁹⁷ Estas enzimas compartilham 30% de identidade de sequência e suas estruturas apresentam um RMSD de 0,903Å para 174 átomos Cα. Em contraste com BlEst1, bMGL é específica para 1monolauroilglicerol (cadeia com 16 átomos de carbono), um substrato de cadeia longa e insolúvel.¹⁰⁵ O alinhamento de suas estruturas mostrou que compartilham um domínio catalítico α/β hidrolase e a tríade catalítica conservada para carboxilesterases, Ser-His-Asp (Figura 20A). O segundo domínio que consiste em 3 α-hélices de *Bl*Est1 está representado em azul na Figura 20A, e contribui para a formação de um canal exposto ao solvente que acomoda o substrato (Figura 20B). Por outro lado, o segundo domínio de bMGL é constituído por um longo loop, representado em vermelho na Figura 20A, formando um típico lid de lipases ¹⁰⁶, o que transforma o canal aberto e exposto ao solvente de *Bl*Est1 em um túnel (Figura 20C). Comparações da superfície eletrostática (Figura 20D) mostraram diferenças na distribuição de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, o que determina a seletividade dos substratos. Aparentemente, o canal de ligação ao substrato de *Bl*Est1, apresenta uma grande região hidrofílica e apenas uma pequena região hidrofóbica na região do resíduo catalítico Ser93 (Figura 20D esquerda). Este sítio ativo acomoda substratos curtos, tornando energeticamente desfavorável a ligação de longos substratos. O contrário é visto para bMGL cujo túnel formado pelo *loop* é hidrofóbico, o que acomoda facilmente longos substratos (Figura 20D direita). Assim, as diferenças na forma, arquitetura e hidrofobicidade do sítio de ligação ao substrato determina a especificidade de lipases e esterases contra substratos com diferentes comprimentos de cadeia.



Figura 20 – Comparação entre a estrutura da carboxilesterase *Bl*Est1 de *B. licheniformis* com a lipase homóloga mais próxima à *Bl*Est1, a monoacilglicerol lipase bMGL de *Bacillus sp.* H257 (PDB 3RM3). A) Alinhamento das estruturas. O domínio catalítico α/β hidrolase, comum entre as duas estruturas, está representado em marrom claro, o cap da bMGL em vermelho e o domínio adicional da *Bl*Est1 em azul. A tríade superponível está em detalhe. B) Superfície da *Bl*Est1. C) Superfície da bMGL. Nos perfis de superfície a serina catalítica foi configurada em verde e a escala de cor foi adotada de verde para branco de acordo com a profundidade. D) Superfície com potencial eletrostático de *Bl*Est1 (esquerda) e bMGL (direita). A escala de cor abrange os valores de -80 kT/e (vermelho) a 80 kT/e (azul).

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com Dr. André Godoy.

3.4.2 Halotolerância de *Bl*Est1

Diante desses resultados, *BI*Est1 pode ser considerada uma enzima halotolerante. Apesar de *B. licheniformis* não ser um organismo halofílico, há alguma cepas de *Bacillus*⁶⁴ e enzimas⁶⁵⁻⁶⁸ que apresentam um grau de halotolerância considerável. *BI*Est1 reteve 75 % de sua atividade em uma ampla faixa de concentrações de NaCl. Isso pode ser atrativo do ponto de vista industrial uma vez que pode catalisar de maneira eficiente desde soluções sem sal até condições com alta concentração (5 M NaCl). Além disso, a presença de NaCl resultou em um aumento progressivo da estabilidade térmica. Além do aumento de 17 °C na T_m com 3 M NaCl (Figura 13A), nessa concentração a enzima mantém uma atividade residual de 94% e 56% após 72h de incubação na temperatura ótima (40°C) e a 50 °C, respectivamente (Figura 14). Esses valores são muito superiores quando comparados com os resultados apresentados no item 3.3.3, nos quais as reações foram feitas com apenas 0,15 M NaCl e após 72 h de incubação (Figura 7C). Esses resultados mostram o potencial de *BI*Est1 em catalisar em condições extremas, aferindo uma característica biotecnologicamente relevante pra enzima.

Os fatores responsáveis pela halotolerância de *Bl*Est1 podem ser estruturais. Quando a superfície eletrostática de enzimas adaptadas à altas concentrações de sal foi comparada com a de homólogos não-halofílicos, as regiões constituídas por cadeias laterais com oxigênios negativamente carregados foi maior para as enzimas halofílicas do que para as não halofílicas.⁷⁰ Da mesma forma, a superfície formada por cadeias laterais com nitrogênios positivamente carregadas foi menor e halofílicos do que em não-halofílicos. De fato, BlEst1 possui uma porcentagem maior de resíduos ácidos (15,3%) quando comparado com os básicos (11,3%), composição que é comparável com outras esterases halotolerantes.¹⁰⁷ *Bl*Est1 possui uma razão (Asp + Glu)/(Arg + Lys) de 1,35, que é maior do que tipicamente encontrada em proteínas globulares, que possuem em média 11,8% de Asp + Glu e 10,7% de Arg + Lys, resultando em uma razão de 1,1.¹⁰⁸ Análises da superfície eletrostática da estrutura cristalográfica de *Bl*Est1 mostrou que 100% desses resíduos ácidos estão localizados na superfície, gerando agrupamentos de resíduos Asp e Glu e criando um potencial eletrostático global negativo (Figura 21). Isso pode favorecer a formação de uma camada de solvatação, que age como proteção para enzimas halotolerantes e halofílicas contra condições de dessecação,⁷¹ além de evitar o desenovelamento e agregação através do aumento da estabilidade. A teoria mais comum de adaptação halofílica é o modelo de solvataçãoestabilização,⁶⁹ que é descrito pela interação de íons hidratados com a superfície ácida da proteína, resultando em estabilização do enovelamento em condições extremas. Esse mesmo mecanismo pode ser aplicado pela enzima halotolerante *Bl*Est1.



Figura 21 – Superfície eletrostática da estrutura cristalográfica de BlEst1. Potencial eletrostático foi calculado
pelo APBS no PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.).
A escala de cor foi definida de -1 kT/e (vermelho) to 1 kT/e (azul).Fonte:Elaboradapelaautora

3.5 Conclusões

A esterase de B. licheniformis BlEst1 apresentou algumas características de interesse biotecnológico, como a estabilidade em solventes orgânicos e sua estabilidade térmica na temperatura ideal para as condições testadas (40 °C), retendo 40% de atividade após 72 h de incubação. Além disso, ela é considerada uma enzima halotolerante, apresentando atividade em uma ampla variação de concentrações de NaCl, de 0 a 5 M. A adição de sal apresentou características relevantes também em relação a estabilidade térmica, acarretando aumento progressivo na T_m, somando 17 °C com 3 M NaCl. Essa melhora na estabilidade térmica também foi observada na atividade, uma vez que a enzima manteve quase 100% de atividade residual após 72 h de incubação a 40 °C. Com a análise da estrutura cristalográfica nativa, pudemos concluir que a halotolerância de BlEst1 possui explicação estrutural, uma vez que 100% dos resíduos ácidos estão localizados na superfície, criando um potencial eletrostático global negativo que, quando interage com íons hidratados, protege do desenovelamento e agregação, aumentando a estabilidade. Essa e uma adaptação halofílica chamada de solvatação-estabilização para condições extremas. Esse mesmo mecanismo pode ser apresentado por BlEst1 e esta habilidade agrega importante potencial biotecnológico à enzima.

4 CAPÍTULO 2 – Carboxilesterase *Bl*Est2

4.1 Introdução

Embora lipases e esterases não compartilhem similaridade de sequência devido à alta diversidade, esses dois grupos de enzimas compõem a maior classe de proteína com enovelamento α/β -hidrolase e são majoritariamente expressas com estruturas de domínio único, que divergem no número de inserções.²⁰⁻²¹ No entanto, muitas proteínas procarióticas e eucarióticas são produzidas com extensões adicionais, na forma de pro-peptídeos e pré-pro-peptídeos.^{109,} ' Essas formas são percursores inativos e necessitam passar por processos póstraducionais para se tornarem peptídeos maduros e ativos.

A forma pré-peptídeo possui a presença do peptídeo sinal, localizado no N-terminal. Peptídeos sinais são encontrados em proteínas secretadas e transmembrana, bem como em proteínas localizadas dentro de organelas em células eucarióticas. A via de secreção direciona a proteína através da membrana plasmática ou da membrana do retículo endoplasmático. Durante ou depois do transporte pela membrana, o peptídeo sinal é clivado por uma peptidase.¹¹⁰

Os peptídeos adicionais que formam os pro-peptídeos podem estar localizados tanto na região N-terminal, entre o peptídeos sinal e o domínio da forma ativa e madura, ou no C-terminal.¹¹¹ Esses peptídeos acessórios podem ser grupados em duas classificações como chaperonas intramoleculares: classe I de pro-peptídeos, que são produzidos com extensões no N-terminal e são diretamente envolvidos no enovelamento, principalmente da estrutura terciária; e a classe II de pro-peptídeos, localizados no C-terminal, e são relacionados à funções como transporte, localização e podem auxiliar na montagem da estrutura quaternária. ^{109;112} Essas extensões foram primeiramente descritas em proteases, porém foram posteriormente descobertas para algumas lipases.¹¹³

Neste capítulo apresentamos a carboxilesterase de *B. licheniformis Bl*Est2 em sua forma de pro-peptídeo e forma madura bem como os dados e análises estruturais para as duas formas além da caracterização bioquímica da forma ativa e madura

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Escolha do gene candidato

Como citado no item 3.2.1, O DNA genômico de *B. licheniformis* DSM 13 já encontrava-se disponível na biblioteca de DNAs do Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo – São Carlos – Brasil. Desta biblioteca, alvos já haviam sido clonados utilizando o método independente de ligação (LIC – *Ligation-Independent Cloning*).⁷²⁻⁷³

Para a carboxilesterase BlEst2 (Tabela 7), foram desenhados os oligonucleotídeos senso 5' – <u>CAGGGCGCCATG</u>GGAGGATTTAAAGGAGGAGGC – 3' e anti-senso 5' – <u>GACCCGACGCGG</u>TTAATCGGACAAAGGGCTGT – 3'. A região sublinhada dos oligonucleotídeos correspondem à cauda necessária para a técnica LIC. Os alvos foram inseridos ao vetor de expressão pET-TrxA/LIC (gentilmente cedido por Arie Geerlof - Helmholtz Zentrum, Alemanha).

	BIEst2
gene	hypothetical protein BL02555 [Bacillus
	licheniformis DSM 13 = ATCC 14580]
GenBank	AAU24833.1
Pfam	
ESTHER ¹	PGAP1 (block X)
LED^2	abH18 – Bacillus lipases (class
	GX)

Tabela 7 – Informações sobre o candidato selecionado BlEst2.

¹ESTerases, α/β Hydrolase Enzymes and Relatives Database (<u>http://bioweb.ensam.inra.fr/esther</u>). ²Lipase Engineering Database (http://www.led.uni- stuttgart.de/). Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Análise de sequência de aminoácidos

O gene *hypothetical protein BL02555*, que codifica uma proteína de 487 aminoácidos, foi identificado no genoma de *B. licheniformis* DSM 13/ATCC 14580. A sequência de aminoácidos foi utilizada para análise comparativa com outras proteínas a fim de se entender a relação de *Bl*Est2 com outras lipases/esterases. Foram utilizadas sequências das seguintes famílias de acordo com o banco de dados ESTHER.³⁴ PGAP1, *Bacterial Lipase* (Bloco L), *Bacterial Esterase* (Bloco X) e *Carboxylesterase* (Bloco C). Devido à baixa similaridade de sequência, o alinhamento foi feito pelo servidor PROMALS3D,¹¹⁴ que usa restrições

estruturais e de sequência, promovendo um alinhamento com base estrutural. E então, um dendrograma foi construído pelo MEGA⁷⁴ pelo método neighbor-joining.

4.2.3 Produção e purificação da proteína recombinante na forma de pro-peptídeo

A produção e purificação da forma de pro-peptídeo de *Bl*Est2 foi feita da mesma forma como descrito para *Bl*Est1 no item 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente. As quantificações da concentração proteica das frações purificadas foram realizadas medindo-se a absorbância da proteína a 280 nm em espectrofotômetro do tipo *NanoDrop* (Thermo Scientific) e a concentração da proteína foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar teórico neste comprimento de onda (69.330 M^{-1} cm⁻¹).

4.2.4 Produção e purificação da forma madura e ativa de *Bl*Est2

Para a produção da forma madura e ativa de *BI*Est2, em uma primeira etapa Pro*BI*Est2 foi produzida como descrito em 3.2.3 em sua forma recombinante fusionada a tiorredoxina-HisTag. Para a purificação, a primeira etapa que consiste em uma cromatografia de afinidade, foi feita como descrita no item 3.2.4 e Pro*BI*Est2 foi eluida em 150 mM imidazol. Então, o imidazol foi diluído para 10 mM e, ao invés de prosseguir com uma hidrólise catalisada por TEV para retirar a proteína fusionada tiorredoxina-HisTag, como feito na produção de *BI*Est1 e Pro*BI*Est2, a eluição foi submetida a uma clivagem por tripsina para remoção tanto da tiorredoxina no N-terminal quando dos domínios propeptídeos no C-Terminal. A reação com tripsina foi feita em banho-maria a 35 °C por 2 h com uma proporção de Pro*BI*Est2 e tripsina de 10:1 em tampão (50 mM Tris, pH 8). Esta reação foi anteriormente padronizada incubando Pro*BI*Est2 e tripsina em diferentes proporções (1:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1, 500:1 e 1000:1) nas condições ótimas de atividade da tripsina (50 mM Tris, pH8, 35 °C). A reação foi feita por 2 h e diferentes alíquotas retiradas ao longo do tempo foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 120 min).

Após, uma segunda cromatografia de afinidade foi feita para remover a tiorredoxina-HisTag a Pro*Bl*Est2 não clivada. O *flow-through* foi coletado e submetido a uma cromatografia de troca iônica (IEX) para separar a forma clivada de *Bl*Est2 da tripsina. Enquanto *Bl*Est2 apresenta um pI teórico de 6, o pI da tripsina é de 10,2. Portanto, uma cromatografia de troca aniônica utilizando uma HiTrapTM Q HP (GE Healthcare®) foi escolhida para terminar o processo de purificação. A coluna foi equilibrada com tampão A (50 mM Tris, pH 8) e, após a aplicação da amostra, uma lavagem com tampão A foi feita para retirar as proteínas não ligadas e então a separação seguiu com um gradiente linear de tampão B (50 mM Tris, pH 8, 1 M NaCl) de 0 a 100%. A forma madura de *Bl*Est2 foi eluida com 60% de tampão B. As frações do pico cromatográfico foram analisadas em gel SDS-PAGE desnaturante 15%.

4.2.5 Estudos estruturais de *Bl*Est2

4.2.5.1 Cristalização e coleta de dados de difração de raios X

Assim como para *Bl*Est1, os ensaios de cristalização de *Bl*Est2 foram realizados através do método de difusão de vapor em gota sentada. Placas de 96 reservatórios com três poços por reservatório foram utilizadas, nos quais a solução de proteína (10 mg mL⁻¹ para Pro*Bl*Est2 e 8 mg mL⁻¹ para forma madura de *Bl*Est2) foi misturada à solução do reservatório em três diferentes proporções, 1:1, 2:1 e 1:2. Os ensaios iniciais foram realizados através do método da matriz esparsa⁸⁶ utilizando as soluções de diversos kits de cristalização comerciais. Após a montagem do experimento, as condições de cristalização foram monitoradas periodicamente utilizando a incubadora de cristais *Rock Imager 1000* (Formulatrix) a 18 °C.

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada na linha de luz MX2 situada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas⁸⁷, com comprimento de onda de 1.459 Å. Antes da coleta, *soaking* com 100 mM de iodeto de sódio e 15% de etilenoglicol foi feito com os cristais de Pro*BI*Est2, enquanto os cristais da forma madura foram crioprotegidos com 15 % de etilenoglicol.

4.2.5.2 Resolução das estruturas

Os dados de difração de raios X foram processados utilizando o programa *XDS*⁸⁸ e *Aimless*,⁸⁹ para escalonar as múltiplas observações de reflexões, calcular a intensidade média de cada reflexão e calcular as estatísticas. A qualidade dos dados foi aferida com o programa *phenix.Xtriag*.⁹⁰ O faseamento experimental e determinação da estrutura de Pro*Bl*Est2 foi feito por difração anômala por comprimento de onda único pelo programa CRANK2.¹¹⁵ Para construção dos modelos foi utilizado o programa *Autobuild*, ¹¹⁶ e o BUSTER foi usado para o refinamento.¹¹⁷ *Coot* ⁹⁴ foi utilizado construção e aferência do modelo e *Molprobity* ⁹⁵ para validação. A estrutura da forma madura de *Bl*Est2 foi resolvida por substituição molecular utilizando a estrutura de Pro*Bl*Est2 como modelo pelo programa *Phaser*.⁹¹ As figuras foram produzidas com o auxílio do programa *PyMOL* (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.), bem como o cálculo das densidades eletrostáticas

superficiais pelo *plugin* APBS. A topografia de estrutura secundária foi feita com o auxílio do programa PDBsum.¹⁰¹

4.2.6 Estabilidade térmica por Thermal Shift Assay

A técnica de *thermal shift assay* ⁸³ foi utilizada para se aferir a temperatura de *melting* (T_m) de tanto de Pro*Bl*Est2 quanto de *Bl*Est2 como descrito para *Bl*Est1 no item 3.2.6.3. A estabilidade térmica foi analisada nas diferentes condições descritas na Tabela 2.

4.2.7 Caracterização bioquímica de *Bl*Est2

4.2.7.1 Ensaios de atividade enzimática

A atividade enzimática foi monitorada utilizando ésteres ligados a *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich). O *p*-nitrofenol liberado após a ação das esterases foi medido por absorção a 405 nm. A atividade específica (U/mg) foi calculado como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado por minuto (U) por mg de enzima purificada e então a atividade relativa foi calculada com o objetivo de comparar diferentes condições de reação. Uma reação padrão foi definida composta por tampão (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) e 35 nM de *Bl*Est2 purificada, na qual foi adicionada 1 mM do substrato *p*-nitrofenil butirato (solução estoque de 50 mM em etanol 100%). A reação foi iniciada pela adição de substrato na reação padrão pré-aquecida na temperatura de reação por 2 min. Inicialmente foi testado o efeito do NaCl na atividade utilizando-se concentrações de 0 a 2 M, padronizando o tampão de reação para: 20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl.

Para acessar a melhor temperatura para este desenho experimental, a atividade foi medida de 20 a 70 °C. Em seguida, o efeito do pH na atividade foi analisado utilizando 20 mM de tampão ABF de pH 4 a 9, a 35 °C. Um perfil de atividade em pHs básicos foi observado no experimento com tampões ABF e então os tampões 50 mM fostafo de sódio pH 6,5, 50 mM fosfato de sódio pH 7, 50 mM Tris pH 8 e 50 mM bicina pH 9 foram utilizados para definir a melhor condição experimental.

Para conferir o efeito da temperatura na atividade, alíquotas com 35 nM de *Bl*Est2 foram incubadas a 35 e 45 °C por 72 h. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo e então a atividade residual foi medida nas condições padronizadas de atividade, utilizando *p*-nitrofenil butirato como substrato em tampão (20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl).

O efeito de diferentes compostos incluindo solventes orgânicos, sais e detergentes na atividade foi determinado nas condições padronizadas de reação utilizando *p*-nitrofenil

butirato como substrato em tampão (20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl). A reação de 10 minutos foi iniciada pela adição do substrato na reação pré-incubada de enzima com cada composto a 35 °C por 2 min.

4.2.7.2 Especificidade

Para as reações de especificidade com o substrato, substratos sintéticos associados a *p*nitrofenol (Sigma-Aldrich) com variação do comprimento da cadeia dos ácidos graxos de dois a 18 carbonos foram testados. As reações foram realizadas nas condições ótimas de temperatura e pH com a adição de 1 mM de substrato em reação padrão composta por tampão (20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl) e 35 nM de emzima para *Bl*Est1. A reação de 10 min foi iniciada pela adição do substrato na reação pré-aquecida por 2 min.

4.3 Resultados

4.3.1 Classificação e análise de sequência

O gene de *Bl*Est2 (AAU24833.1) anotada como proteína hipotética faz parte do genoma da cepa *B. licheniformis* DSM 13 strain (ATCC 14580) e codifica um peptídeo de 487 aminoácidos. Com uma busca via BLAST contra o PDB foi possível identificar um domínio conservado da família α/β hidrolase e alinhamentos significativos com uma lipase de *Pseudomonas cepacia* e outra de *Pseudomonas glumae*. Como lipases e esterases constituem o maior grupo dentro da família de proteínas com enovelamento α/β hidrolase, foi feita uma busca dentro do banco de dados ESTHER, revelando que *Bl*Est2 é classificada na família PGAP1 do bloco X. Esta família agrupa proteínas hipotéticas de bactérias com função desconhecida e que possuem assinaturas de sequência similar a lipases. Como explicado no item 1.4, o banco de dados ESHTER é dedicado à famílias de proteínas que apresentam enovelamento α/β hidrolase e que são relacionadas filogeneticamente ³⁴ e as enzimas do bloco X são aquelas que não apresentam assinaturas de sequência nem de carboxilesterase (ps00941 e ps00122 do prosite, conhecidas como padrão Carboxylesterase_B), e nem de lipase (ps00120, conhecido como padrão LIPASE_SER).

Com a finalidade de se entender a relação de BlEst2 com lipases/esterases, um alinhamento entre proteínas bacterianas da família PGAP1 e dos blocos C e L foi feito bem como uma árvore foi desenhada usando o método neighbor-joining pelo programa MEGA.⁷⁴ Da família PGAP1 foram escolhidas para a análise apenas as seis primeiras proteínas com maior score e a única que possui estrutura caracterizada, a fosfolipase Tle4 de Pseudomonas aeruginosa.¹¹⁸ Além disso, foram escolhidas proteínas das famílias Bacterial Lipase do bloco L, Carboxylesterase do bloco C e Bacterial Esterase do bloco X. Devido à baixa similaridade de sequência, apenas proteínas com estrutura depositada no PDB foram escolhidas dessas famílias e o alinhamento foi promovido no servidor PROMALS3D,¹¹⁴ que utiliza restrições de sequência e estruturais para fazer o alinhamento. Os resultados estão representados na Figura 22, revelando que *Bl*Est2 está mais relacionada a lipases bacterianas do bloco L do que com esterases bacterianas do bloco C. Apesar de Tle4 ser também classificada na família PGAP1, ela está menos relacionada com *Bl*Est2, que agrupa apenas com as outras enzimas não caracterizadas de PGAP1. BlEst2 é também mais relacionada com a triacilglicerol lipase PcL de P. cepacia (PDB id 1OIL)¹¹⁹ do que com Tle4. PcL (sinalizada com uma estrela na Figura 22A) foi a enzima que apresentou maior score na busca contra o PDB e é membro da família Bacterial_lip_FamI.2, que corresponde à família das verdadeiras lipases I.2.²⁷ Essa análise sugere que a família PGAP1 apresenta uma alta diversidade e por conter muitas proteínas hipotéticas de função desconhecida, novos critérios de classificação podem ser requeridos para explicar essa família.

A Figura 22B mostra o alinhamento de *Bl*Est2 com as seis enzimas mais similares de PGAP1. Há uma alta similaridade nas regiões referentes ao enovelamento α/β hidrolase, com a típica tríade catalítica de serina hidrolases, composta por nucleófilo (Ser), resíduo ácido (Asp) e uma histidina, em região conservada (Figura 22B, flechas vermelhas). Outra região sobreponível corresponde à assinatura ps00120 (Figura 22B, caixa verde) que é definida por [LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC]. A assinatura ps00120 abriga a assinatura Gly-x₁-Ser-x₂-Gly conhecida como *nucleophile elbow*, na qual Ser é a serina catalítica. Em *Bl*Est2 e nas outras enzimas PGAP1, pequenos resíduos como Ser e Ala substituem a primeira glicina do *nucleophile elbow*, constituindo a única mudança em relação ao clássico padrão LIPASE_SER que caracteriza as lipases do bloco L (Prosite ps00120).

Outra observação importante que se pode tirar do alinhamento é que estas enzimas possuem um domínio adicional após o core catalítico α/β hidrolase, a partir do resíduo 272. Apesar de compartilharem esse domínio na região C-terminal, não há similaridade de sequência (Figura 22B). Uma análise comparativa com a fosfolipase Tle4, cuja estrutura e função é conhecida, juntamente com resultados prévios estruturais e de atividade de *Bl*Est2, sugere que este domínio C-terminal se trata de um pro-peptídeo e a sua remoção torna-se necessária para a liberação de uma forma madura e ativa de *Bl*Est2.



В



813 bacld-q65fg2_B_licheniformis_BlEst2 bacld-q65fg2_B_licheniformis_BlEst2 oceih=082952_0_iheyensis bacce=8C2141_B_cereus bachd=q%bho0_B_halodurans 9bac1=q2bey4 bey4 /ru9_5_thermophil α15 -q65fg2_B_lichenif 410 old-q65fg2_B_licheniformis_BlEst2 eih-OB2952_O_iheyensis coe-BC2141_B_cereus chd-q9kbe0_B_halodurans ey4 5_the ophilu a16 0000000 bacld-q65fg2_B_licheniformis_BlEst2 TT TT. cld-q65fg2_B_licheniformis_BlEst2 eih-OB2952_O_iheyensis cce=SC2141_B_cereus chd-q9kbn0_B_hslodurans INALON sC214:_____ q9kbn0_B_hsloov____ q2bsy4 o67ru9_S_thermophilum

Figura 22 – Análise de sequência entre *Bl*Est2 (bacld-q65fg2) e outras esterases e lipases bacterianas do banco de dados ESTHER. A) Relação entre *Bl*Est2 e outras enzimas da família PGAP1 do bloco X, lipases bacterianas do bloco L, esterases bacterianas do bloco C e esterases bacterianas do bloco X. Alinhamento de sequências feito pelo programa PROMALS3D (Pei et al., 2008) e árvore por neighbor-joining foi construída no MEGA (Kumar et al., 2016). A lipase PcL está assinalada com uma estrela e Tle4 com duas estrelas. B) Alinhamento de sequência entre *Bl*Est2 e outras enzimas não caracterizadas da família PGAP1. Aminoácidos idênticos estão assinalados como caixas vermelhas; resíduos catalíticos estão marcados com flechas vermelhas; região do padrão LIPASE_SER (Prosite, ps00120) está delimitado com uma caixa verde. Elementos de estrutura secundária do modelo de *Bl*Est2 determinado experimentalmente está disposto acima do alinhamento. A figura foi gerada pelo ESPRIPT (Robert & Gouet, 2014).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Produção da forma madura de *Bl*Est2

A primeira tentativa para se produzir a possível forma madura de *Bl*Est2 foi desenhando primers para construção da proteína truncada afim de se remover os domínios C-terminal. Após a construção do vetor e confirmação da sequência, o vetor de expressão foi transformado em diferentes cepas e diferentes protocolos de indução foram promovidos. Expressão foi testada em Rosetta DE3 (Figura 23A), ArticExpress (Figura 23B), C43(DE3) e Rosetta-gami 2(DE3)pLysS (Figura 23C), com diferentes concentrações de IPTG para indução (0,1, 0,5 e 1 mM). Lactose a 0,5% também foi testada na etapa de indução. Além disso, 0,1 e 0,2% do detergente triton x-100 foi utilizado durante a lise. No entanto, a proteína expressa estava na fração insolúvel em todas as condições testadas, indicando que os domínios C-terminal são requeridos para o enovelamento adequado, podendo atuar como chaperonas intramoleculares, uma vez que sua remoção causou a agregação e precipitação da proteína.



Figura 23 -Teste de expressão de BlEst2 truncada em diferentes cepas e com diferentes concentrações do indutor IPTG. M representa o marcador de peso molecular marcado em kDa. A) Expressão em Rosetta DE3. 1. Fração insolúvel sem indução. 2. Fração solúvel sem indução. 3. Fração insolúvel após indução com 1 mM IPTG. 4. Fração solúvel após indução com 1 mM IPTG. 5. Fração insolúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 6. Fração solúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 7. Fração insolúvel após indução com 0,5% de lactose. 8. Fração solúvel após indução com 0,5% de lactose. 9. Fração insolúvel sem indução. 10. Fração solúvel sem indução. 11. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 12. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 13. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. 14. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. 15. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,2% de Triton x100 antes da lise. 16. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,2% de Triton x100 antes da lise. B) Expressão em ArticExpress. 1. Fração insolúvel sem indução. 2. Fração solúvel sem indução. 3. Fração insolúvel após indução com 1 mM IPTG. 4. Fração solúvel após indução com 1 mM IPTG. 5. Fração insolúvel após indução com 0,5% de lactose. 6. Fração solúvel após indução com 0,5% de lactose. 7. Fração insolúvel sem indução. 8. Fração solúvel sem indução. 9. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 10. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 11. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. 12. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG e com adição de 0,1% de Triton x100 antes da lise. C) Expressão em Rosetta-gami 2(DE3)pLysS. 1. Fração insolúvel sem indução. 2. Fração solúvel sem indução. 3. Fração insolúvel após indução com 1 mM IPTG. 4. Fração solúvel após indução com 1 mM IPTG. 5. Fração insolúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 6. Fração solúvel após indução com 0,5 mM IPTG. 7. Fração insolúvel após indução com 0,1 mM IPTG. 8. Fração solúvel após indução com 0,1 mM IPTG.

Fonte: Elaborada pela autora.

E então, análises estruturais e de sequência foram promovidas utilizando a ferramenta PeptideCutter (Gasteiger et al., 2005) a fim de se investigar a presença de possíveis sítios de clivagem no *loop* que conecta o domínio α/β hidrolase aos domínios C-terminal. Um sítio para tripsina foi identificado (Figura 24A). BlEst2 e tripsina foram incubadas em diferentes proporções (1:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1, 500:1 e 1000:1), p-nitrofenil butirato foi adicionado para iniciar a reação éster hidrolase, e a liberação do produto p-nitrofenol foi monitorada a 405 nm ao longo do tempo. Quanto mais alta a concentração de tripsina presente na reação, maior foi a absorbância medida (Figura 24B), indicando que possivelmente a tripsina estava promovendo a retirada do domínio C-terminal e liberando a forma ativa de BlEst2 (Domínio I). Isto foi confirmado analisando alíquotas de cada reação em gel SDS-PAGE 15% (Figura 24C), revelando que, como esperado, nos poços do eletroferograma onde foram depositados as reações com a mais alta liberação de produto (maior absorbância), uma banda com a massa esperada do Domínio I (28 kDa) foi observada (poços 1, 2 e 3). Para evitar uma concentração alta de tripsina desnecessária, a proporção 10:1 (BlEst2:tripsina) foi escolhida para a produção de *Bl*Est2 em sua forma ativa. A clivagem foi monitorada por 2 h em condições ótimas de reação da tripsina (50 mM Tris pH8, 35 °C), as alíquotas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%, confirmando a produção de *Bl*Est2 (Figura 24D).

Após a otimização da purificação e produção de *Bl*Est2 em sua forma madura, a enzima foi produzida com sucesso em *E. coli* Rosetta DE3 com um rendimento de 24 mg de proteína por litro de cultura e com pureza aceitável como confirmado em gel SDS-PAGE 15% (Figura 24E). Dessa forma, domínios I, II e III configuram a forma de pro-peptídeo de *Bl*Est2 e a remoção dos domínios II e III é requerida para a liberação da forma madura e ativa de *Bl*Est2. Assim, após a clivagem dos domínios C-terminal, passaremos a nomear a forma completa, com domínios I, II e III como Pro*Bl*Est2 e a forma madura (domínio I) como *Bl*Est2.



Figura 24 – Otimização da produção da forma madura de *Bl*Est2 por clivagem com tripsina. A) Representação da cadeia polipeptídica de *Bl*Est2. O vetor de expressão foi construído sem o peptídeo sinal (1-22).
B) Hidrólise do *p*-nitrofenil butirato na presença de diferentes concentrações de tripsina. C) Análise em SDS-PAGE 15% ao final da reação contra *p*-nitrofenil butirato. 1 a 7 corresponde às proporções 1:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1, 500:1 e 1000:1 (*Bl*Est2:tripsina). D) Clivagem com tripsina (10:1 – *Bl*Est2:tripsina). 1 a 9 correspondem aos tempos de reação 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 120 min. E) Purificação otimizada de *Bl*est2 em sua forma madura. 1. *Flow-through* da cromatografia por afinidade. 2. Lavagem com 10 mM imidazol. 3. Eluição com 150 mM imidazol. 4. Lavagem com 1 M imidazol. 5. Após clivagem com tripsina. 6. Após cormatoografia de troca iônica. M representa o marcador de peso molecular marcado em kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Estruturas cristalográficas de *BI*Est2 e análise estrutural

4.3.3.1 Cristalização, coleta e processamento dos dados

Após triagens por condições de cristalização utilizando diferentes conjuntos de soluções comerciais, tanto Pro*Bl*Est2 quanto *Bl*Est2 cristalizaram em uma condição do *kit* PACT *Suite* (Molecular Dimensions, USA). Para Pro*Bl*Est2, a condição foi otimizada para 0,2 M cloreto de sódio, 0,1 M Tris pH 8 e 28% (m/v) PEG 6000. Já cristais de *Bl*Est2 cresceram em 0,1 M MMT pH 5 e 25% (m/v) PEG1500. E então um único cristal de cada condição foi

submetido à linha de luz de raios X MX2 situada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas,⁸⁷ usando uma radiação de comprimento de onda de 1.459 Å.

A estrutura cristalográfica de Pro*Bl*Est2 foi determinada por difração anômala e átomos de iodo foram utilizados para obtenção do sinal anômalo. O conjunto foi integrado no grupo especial ortorrômbico $P2_12_12_1$, com parâmetro de célula unitária a = 66,9, b = 78.3 Å e c = 166,5 Å. Foram preditas duas moléculas na unidade assimétrica, que foi posteriormente confirmado durante a construção do modelo. Foram identificados 20 picos referentes aos átomos de iodo que foram utilizados no faseamento. O modelo foi refinado a 2 Å de resolução e o modelo final apresentou valores de R_{work}/R_{free} de 0,19/0,22 e 98% dos resíduos dentro da região favorável do diagrama de Ramachandran. Detalhes do processamento dos dados e refinamento estão na Tabela 8.

A estrutura de *Bl*Est2 foi resolvida por substituição molecular usando as coordenadas de Pro*Bl*Est2 como modelo. Os dados foram integrados no grupo espacial ortorrômbico $P2_122_1$, com parâmetro de célula unitária a = 102,0 Å, b = 122,5 Å e c = 157,9 Å e quatro moléculas na unidade assimétrica. O modelo foi refinado a uma resolução de 3,7 Å, possuindo valores finais de R_{work}/R_{free} de 0,23/0,27 e 98% respectivamente. Estão dentro da região favorável do diagrama de Ramachandran 97 % dos resíduos. Detalhes do processamento dos dados e refinamento estão na Tabela 8.

Coleta de dados e processamento	ProBlEst2	BlEst2
Fonte de difração	LNLS	LNLS
Comprimento de onda (Å)	1,459	1,459
Detector	PILATUS 2M (Dectris®)	PILATUS 2M (Dectris®)
Grupo espacial	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_{1}22_{1}$
a,b,c (Å)	66,9, 78,3, 166,5	102,0, 122,5, 157,9
α,β,γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolução (Å)	20,1-2,0 (2,07-2,0)	21,6 - 3,6 (3,7 - 3,6)
No. total de reflexões	59739 (5862)	23466 (2306)
Completeza (%)	99,7 (99,5)	99,31 (99,78)
Multiplicidade	6,9 (5,2)	6,4 (6,3)
<i>Rp.i.m</i> _. (%)	0,077 (0,618)	0,197 (0,489)
Mean $I/\sigma(I)$	12,88 (1,93)	4,8 (1,8)
CC _{1/2}	0,99 (0,61)	0,94 (0,62)
Refinemento		
No. de moléculas na unidade	2	4
assimétrica	2	
$R_{work}/R_{\rm free}$ (%)	0,19/0,22	0,23/0,27
No. de átomos		
Macromolécula	7023	11610
Solvente	442	279
Iodo	24	-
Average <i>B</i> -factor ($Å^2$)		
Macromolécula	28,75	38,10
Solvente	32,57	38,20
Iodo	57,55	-
R.m.s deviations		
Ligações (Å ²)	0,014	0,014
Ângulos (°)	1,67	1,69
Ramachandran plot (%)		
Favoráveis	97,8	96,57
Outliers	0,22	0,27

Tabela 8 - Informações e estatísticas da coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura tridimensional
da carboxilesterase *Bl*Est2 de *B. licheniformis* em sua forma pro-peptideo (Pro*Bl*Est2) e em sua forma
madura (*Bl*Est2). Valores da faixa mais alta de resolução são mostrados entre parênteses.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3.2 Modelo tridimensional da estrutura de ProBlEst2

O modelo final de Pro*Bl*Est2 foi construído e refinado do resíduo 28 ao 482. Visto que os resíduos de 1 a 21 correspondem ao peptídeo sinal e foi retirado para a produção do vetor de expressão (Figura 24A), apenas os 7 primeiros resíduos do N-Terminal e os 5 últimos do C-Terminal não foram construídos por não apresentarem densidade eletrônica interpretável.

A Figura 25A apresenta a estrutura geral de Pro*BI*Est2, que apresenta uma estrutura com múltiplos domínios e um enovelamento do tipo α/β -hidrolase para o domínio catalítico ²¹. Além do domínio catalítico (Domínio I), Pro*BI*Est2 apresenta dois domínios adicionais adjacentes ao sítio ativo, domínio II e domínio III (Figura 22B e Figura 24B). O domínio I α/β

hidrolase é contém sete fitas β, β1(Tyr33-Gly37), β2 (Pro49-His54), β3 (Asp79-Asp84), β4 (Val113-Tyr118), β5 (Glu139-Leu144), β6 (Lys201-Leu205) e β7 (Thr245-Leu247), que compõem a folha β central. Esta folha β é rodeada por 10 α-hélices α1 (Ser59-Phe64), α2 (Asp68-Asn76), α3 (Asp90-Gly110), α4 (Lys120-His132), α5 (Asn133-His136), α9 (Gln180-Asp192), α10 (His194-Thr200), α12 (Glu236-Arg240), α13 (Phe255-Ile258) e α14 (Gly260-Ile273). O domínio catalítico possui duas inserções, L1 e L2 (Figura 25B), que ocupam posições conservadas entre proteínas com enovelamento α/β hidrolase²⁰ e geralmente constituem o chamado domínio *lid* típico de lipases. L1 é formada por três α-hélices α6 (Ser151-Tyr158), α7 (Ala162-Gly170) e α8 (Ans173-Leu179), localizada logo após β5; e L2 é constituída por α11 (Leu217-Phe227) e está localizada após β6.

Em relação aos domínios adicionais, o domínio II é do tipo β -jelly, composto por duas folhas β paralelas, uma composta por quatro fitas β : β 9 (Gly299-Val307), β 11 (Asn326-Asp331), β 12 (Gly334-Phe337) e β 15 (Gly365-Val373); e outra por cinco fitas β : β 8 (Pro290-Asn297), β 10 (Lys312-Ans321), β 13 (Ser341-Thr345), β 14 (Gly352-Asn361) e β 16 (Glu377-Asp386); enquanto o domínio III é formado por uma folha β : β 17(Val407-Glu417), β 18 (Lys420-Lys428), β 19 (Gly445-Thr457), β 20 (Asn460-Asn474) e β 21 (Gly477-Phe480), α 15 (Pro388-Thr398) e α 16 (Ile432-Leu439). Esses domínios são subsequentes e localizados na região C-terminal, e não são comuns em carboxilesterases conhecidas.



Figura 25 - Estrutura tridimensional da carboxilesterase *BI*Est2 de *B. licheniformis* em sua forma de propeptídeo. A) Estrutura da *BI*Est2. A tríade catalítica está representada como *sticks* em azul. B) Topologia de *BI*Est2, mostrando as duas inserções L1 e L2, que compõem o domínio *lid* (vermelho); e os dois domínios C-terminal, domínio II e III (verde).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3.3 Sítio ativo e oxyanion hole

Os domínios adicionais, juntamente com as inserções L1 e L2 do domínio *lid*, são posicionados sobre o domínio catalítico, com a tríade catalítica entre eles. A tríade catalítica é formada por um resíduo nucleofílico (Ser119), um resíduo ácido (Asp231) e uma histidina (His254) (Figura 26A). Os três resíduos da tríade catalítica são localizados em regiões conservadas entre enzimas com enovelamento α/β hidrolase ²⁰: o resíduo Asp231 após β 6 (β 7 na forma α/β hidrolase canônica); His254 está localizada após a última fita β da folha- β central; e o resíduo Ser119 está localizado em um pequeno e curvado loop entre β 4 e α 4 conhecido como *nucleophile elbow*, que o caso de *Bl*Est2 é formado por Ser-x₁-Ser-x₂-Gly (Figura 26B).

Já o *oxyanion hole* é formado por dois resíduos, o primeiro é o resíduo x_2 do *nucleophile elbow* e segundo está localizado em um loop após $\beta 2$ ($\beta 3$ na forma α/β hidrolase canônica) e é chamado de *oxyanion loop* (Figura 26C e 26D). O grupo amina desses resíduos atuam na estabilização do intermediário tetraédrico durante a catálise por pontes de hidrogênio. O *oxyanion hole* de *Bl*Est2 é composto por Lys120 (resíduo x_2 do *nucleophile elbow*) e Leu56 (após um resíduo Gly no *oxyanion loop*). Esta glicina é conservada entre lipases e essa composição classifica *Bl*Est2 na família GX no banco de dados LED.¹⁷



Figura 26 – Centro catalítico do domínio I de *Bl*Est2. A) Tríade catalítica Ser119, Asp231 e His254. B) Nucleophile elbow composto pela assinatura de sequência Sm-x1-S-x2-Sm, (Sm = resíduo pequeno, x = qualquer resíduo e S = serina catalítica). C) Oxyanion hole da classe GX de acordo com o banco de dados Lipase Engineering Database ¹⁷, formado por Leu56 e Lys120. D) *Oxyanion Loop*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3.4 Modelo tridimensional da estrutura da forma madura *Bl*Est2 e comparações estruturais

Para as análises estruturais de BlEst2, como há comparações entre enzimas que diferem muito quanto ao tamanho, o parâmetro TM-score foi utilizado para analisar o alinhamento estrutural uma vez que este não depende do tamanho da proteína, o que acontece com RMSD. BlEst2 apresentou o mesmo enovelamento do Domínio I de ProBlEst2, com um TM-score de 0,95. Uma mudança conformacional pode ser observada: a inserção L1 do domínio *lid* adotou uma conformação fechada, com um deslocamento de 16 Å em direção ao sítio ativo (Figura 27A). Tanto a inserção L1 quanto L2 são compostas principalmente por resíduos hidrofóbicos, sendo uma composição de 52% e 45%, respectivamente. Estes resíduos estão localizados principalmente na face virada para o sítio ativo da enzima, enquanto os resíduos eletricamente carregados e os resíduos polares sem carga estão principalmente localizados na face virada para o meio externo, dando um caráter anfipático para o domínio lid. Esta é uma característica esta que é típica de lipases que, quando em conformação fechada, protege seus resíduos hidrofóbicos fechando-se sobre o sítio ativo do domínio catalítico.^{9;103} A conformação aberta requer uma interface entre o solvente e um substrato insolúvel para ocorrer a ativação da enzima, estabilizando a parte hidrofóbica do lid com o substrato. Esse mecanismo é chamado de ativação interfacial.⁴⁻⁵ Na conformação fechada, os resíduos hidrofóbicos de L1 e L2 cobrem o sítio ativo, protegendo-o do solvente (Figura 27B e 27C).

Apesar da divergência de sequência, o domínio catalítico I de *BI*Est2 é similar a outras lipases de domínio único conhecidas, apresentando um TM-score de 0,17 contra *PcL* (PDBid 10IL),¹¹⁹ e 0,25 contra a triacilglicerol lipase de *P. aeruginosa* PAO1 (PDBid 1EX9).¹²⁰ *PcL* e PAO1 foram as enzimas com maior score nas buscas por homólogos via BLAST contra o PDB e busca no Dali Server, respectivamente. A posição dos resíduos da tríade catalítica Ser, Asp e His, é conservada entre as proteínas (Figura 28A). Diferente de outras lipases, *BI*Est2 apresenta uma fenda catalítica de neutra para positivamente carregada devido ao (Figura 27B). Por outro lado, *PcL* (Figura 28C) e PAO1 (Figura 28D) possuem uma fenda catalítica, o entanto, apesar das diferenças de carga nos resíduos que envolvem a tríade catalítica, o formato da fenda é bem similar entre as três enzimas, com a presença de três bolsos que acomodam os grupos acil de triacilgliceróis. E estrutura de PAO1 possui um ligante cristalográfico ligado covalentemente na serina catalítica, o inibidor R_c -trioctil, que pode ser

facilmente sobreposto nas estruturas cristalográficas de BlEst2 e PcL, seguindo as mesmas orientações. Isso sugere que BlEst2, assim como PAO1 e PcL pode ter uma atividade contra triacilglicerol.



Figura 27 – Comparações entre o domínio I de Pro*Bl*Est2 e *Bl*Est2. A) Alinhamento entre domínio I de Pro*Bl*Est2 em uma conformação aberta (inserções L1 e L2 marcadas em azul) e *Bl*Est2 em conformação fechada (L1 e L2 em verde). Deslocamento de 16 Å da inserção L1 do domínio *lid* em direção ao sítio catalítico está mostrado em detalhe. B) Distribuição dos resíduos do domínio *lid* na conformação aberta. C) Distribuição dos resíduos do domínio *lid* na conformação fechada. Resíduos hidrofóbicos e polares sem carga foram coloridos em cinza, resíduos positivamente carregados em azul e resíduos negativamente carregados em vermelho. A cor do potencial eletrostático de superfície foi definida de -5 kT/e (vermelho) a 5 kT/e (azul), e calculado pelo módulo APBS do PyMOL.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 28 – Comparações estruturais entre o domínio I de Pro*Bl*Est2 e as triacilglicerol lipases homólogas PAO1 de *P. aeruginosa* (PDB id 1EX9) e PcL de *P. cepacia* (PDB id 1OIL). Todas as enzimas estão na conformação aberta. A) Alinhamento do domínio I de *Bl*Est2 com PAO1 e PcL. As tríades catalíticas são facilmente sobreponíveis. O *core* α/β-hidrolase está representado em cinza, enquanto os domínios *lid* de *Bl*Est2, PcL e PAO1 estão representados em rosa, verde e azul, respectivamente.
B) Superfície eletrostática do domínio I de BlEst2. C) Superfície eletrostática de PcL. D) Superfície eletrostática de PAO1. O ligante cristalográfico de PAO1, o inibidor R_C-trioctil, foi sobreposto nas estruturas cristalográficas de *Bl*Est2 e PcL com o mesmo alinhamento para fins comparativos. A cor do potencial eletrostático de superfície foi definida de -5 kT/e (vermelho) a 5 kT/e (azul), e calculado pelo módulo APBS do PyMOL.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3.5 A função inibitória dos domínios C-terminal II e III

O único membro da família PGAP1 que possui sua estrutura cristalográfica caracterizada, além de *Bl*Est2, é a fosfolipase Tle4,¹¹⁸ que faz parte da família Tle1-4. Tle4 é uma fosfolipase de *P. aeruginosa* e age atacando a membrana celular de células rivais. Ela é expressa em complexo com Tli4, um peptídeo de dois domínios que tem como função inibir

Tle4, prendendo o seu domínio *lid*, agindo em um processo de autoproteção: o complexo Tle4-Tli4 mantém Tle4 inibida, evitando que ela degrade a membrana da sua célula hospedeira (Figura 29B). O alinhamento apresentou um TM-score de 0,11 (Figura 29A), indicando uma similaridade de estrutura apresentada por proteínas randômicas. Apesar da falta de similaridade estrutural entre os domínios catalíticos, a maneira como os domínios C-terminal II e III de Pro*Bl*Est2 interagem com o domínio I parece ser semelhante ao complexo Tle4-Tli4 (Figura 29C).



Figura 29 – Comparações estruturais entre *Bl*Est2 e o outro membro da família PAGP1, a fosfolipase Tle4 (PDB 4R1D). A) Alinhamento estrutural do domínio I de Pro*Bl*Est2 e Tle4. B) Complexo Tle4-Tli4. Tli4 é um peptídeo localizado no C-terminal e que atua na inibição de Tle4. C) Complexo do domínio catalítico I de *Bl*Est2 com os domínios C-terminal II e III.

Fonte: Elaborada pela autora.

Então, uma busca por interações entre o domínio catalítico I de Pro*BI*Est2 e os domínios C-terminal II+III foi feita utilizando-se a ferramenta jsPISA, para cálculo de interface.¹²¹ Esta busca mostrou uma área de interface significativa de 1916 Å² entre os três domínios, com a participação de 47 e 63 resíduos de interface entre domínio I e II e entre domínio I e III, respectivamente, correspondendo a uma interação peptídeo-peptídeo forte (Figura 30A). Uma análise utilizando o servidor *ConSurf*¹²² revelou que a maior parte dos resíduos dessa interface, principalmente os da inserção L1 e da região entre os domínios II e III são conservados (Figura 30B). Estes resíduos conservados são os mesmos apontados como similares e idênticos no alinhamento da Figura 22B. Esta região conservada da interface abriga oito pontes de hidrogênio entre os domínios II+III e a inserção L1 do domínio *lid* (Figura 30C e Tabela 9). Além das interações com a inserção L1, um longo loop do domínio

II ocupa a fenda catalítica, com uma distância de 6,3 Å de Ser119, cobrindo partes importantes do sítio ativo (Figura 30D). Ao comparar com o complexo Tle4-Tli4 e seu sistema inibitório, os domínios II e III também adotam a conformação de um grampo, que aprisiona entre eles a inserção L1 do domínio *lid* por pontes de hidrogênio (Figura 30E). Isto causa a inibição da atividade de *Bl*Est2 pela imobilização do domínio *lid* e bloqueio do sítio catalítico.



Figura 30 – Interações entre os domínios C-terminal II e III e o domínio catalítico I de Pro*Bl*Est2, indicando um possível mecanismo inibitório. A) Resíduos entre o domínio N-terminal e os domínios C-terminal que participam da interface de 1916 Å², calculada por jsPISA (Krissinel, 2015). B) Análises de conservação de resíduos realizadas pelo ConSurf (Ashkenazy et al., 2016). A escala é configurada de resíduos mais conservados (magenta) até os mais variáveis (verde). C) As oito pontes de hidrogênio entre os resíduos dos domínios C-terminal e os resíduos do domínio *lid*. D) Sítio catalítico ocupado por um loop do domínio C-terminal II. E) Conformação tipo grampo dos domínios C-terminal II e III, prendendo a inserção L1 do domínio *lid*.

Fonte: Elaborada pela autora.

C-terminal DII-DIII	Distância (Å)
SER470/OG	3,3
TYR416/OH	2,7
SER413/O	3,3
ASP452/OD2	2,9
VAL348/O	2,7
TYR416/OH	3,1
GLY419/N	3,5
SER470/OG	3,0
	C-terminal DII-DIII SER470/OG TYR416/OH SER413/O ASP452/OD2 VAL348/O TYR416/OH GLY419/N SER470/OG

Tabela 9 - Pontes de hidrogênio entre o domínio catalítico I e os domínios C-terminal II e III.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.4 Estabilidade térmica de ProBlEst2 e BlEst2

Para se analisar e comparar a estabilidade térmica de Pro*BI*Est2 e *BI*Est2, a técnica de fluorescência *thermal shift assay* foi utilizada. Assim foi possível monitorar a desnaturação das enzimas mediante aumento de temperatura, permitindo o cálculo da T_m , em diferentes composições de tampão, pH e concentrações de sal (Figura 31). A forma madura e ativa de *BI*Est2, apresentou um T_m 10 °C maior para quase todas as condições testadas, mostrando um aumento da estabilidade térmica em relação a forma de pro-peptídeo Pro*BI*Est2. Em água, a T_m foi de 55 e 64 °C, respectivamente, valores utilizados como controle para fins de comparação. Os pHs ácidos, abaixo de 6, e básicos, acima de 9,5, causaram uma desestabilização do enovelamento, diminuindo a T_m . A adição de 300 mM de NaCl não causou melhora e nem piora na estabilidade térmica. Nenhuma das condições testadas aumentou a estabilidade.



Figura 31 – Análise de temperatura de *melting* para Pro*Bl*Est2 e *Bl*Est2 em diferentes condições de tampão e pH por *thermal shift assay*.
 Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.5 Caracterização bioquímica da forma madura de BlEst2

Reações de hidrólise contra o substrato *p*-nitrofenil butirato foram realizadas utilizando tanto Pro*Bl*Est2 quanto *Bl*Est2 confirmando, de fato, a remoção dos domínios C-terminal II e III libera a forma madura e ativa de *Bl*Est2. *Bl*Est2 apresentou uma atividade específica de 292 U/mg, mais de duas mil vezes maior quando comparada com a atividade de Pro*Bl*Est2 nas mesmas condições (0,13 U/mg).

Com o objetivo de se determinar as melhores condições de reação para o desenho experimental utilizado, a atividade de *Bl*Est2 foi medida contra o substrato *p*-nitrofenil butirato, com variações de pH, temperatura e concentração de NaCl. A atividade em função da variação de pH foi primeiramente analisada utilizando o tampão acetato-borato-fosfato do pH 2 ao 10. Como a absorbância do produto de reação *p*-nitrofenol é altamente influenciado por variações de pH, a análise foi feita em termos de absorbância relativa. *Bl*Est2 mostrou ausência de atividade do pH 2 ao 4, uma atividade abaixo de 50% entre o pH 5 e 6 e um aumento a partir de pH 7, apresentando um pico de atividade em pH 9 (Figura 32). A fim de refinar esses resultados a atividade foi medida nos tampões 50 mM fosfato de sódio pH 6,5, 50 mM fosfato de sódio pH 7, 50 mM Tris pH 8 e 50 mM bicina pH 9 (Figura 33A), revelando um platô de atividade entre pH 8 e 9. Para evitar os efeitos do pH na hidrólise espontânea dos substratos ligados a *p*-nitrofenol, que aumenta em função do aumento do pH, o pH 8 foi escolhido para a continuidade dos experimentos.

A presença de diferentes concentrações de NaCl também foi analisada e *BI*Est2 apresentou um platô de atividade máxima entre 0,3 e 1 M NaCl (Figura 33B). Como a adição de 0,3 M NaCl não causou diminuição na estabilidade térmica como aferido por *thermal shift assay* (Figura 31), essa foi a concentração escolhida para a reação otimizada de *BI*Est2. Quando o efeito da temperatura na atividade foi analisado, a enzima apresentou um comportamento mesofílico. No entanto, um grande platô de atividade foi observado entre 20 e 55 °C, com pico em 45 °C (Figura 33C). A 60 °C a enzima reteve 20% da atividade, sendo completamente inativada a 70 °C. O efeito da temperatura foi também analisado incubando alíquotas da enzima até 72 h a 35 e a 45 °C. A enzima apresentou uma maior estabilidade térmica a 35 °C, retendo 100% da sua atividade inicial após 72 h de incubação (Figura 33D). Porém, a 45 °C houve uma perda de 60% da atividade em 24 h de incubação. Como há apenas uma diferença de 5% na atividade entre 35 °C e o pico em 45 °C, e a estabilidade a 35 °C é bem maior, esta foi a temperatura escolhida para a reação otimizada de *BI*Est2.



Figura 32 – Absorbância relativa do produto de reação *p*-nitrofenol em função da variação de pH em tampão acetato-borato-fosfato do pH 4 ao 10.
Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 33 – Perfil de atividade de *Bl*Est2 em função de variações no pH, concentrações de NaCl e temperatura. A atividade enzimática foi medida contra 1,0 mM do substrato *p*-nitrofenil butirato. A) Absorbância relativa do produto de reação *p*-nitrofenol em função da variação de pH. B) Atividade em diferentes concentrações de NaCl. C) Atividade em função da temperatura. D) Atividade residual após incubação por 72 h a 35 e a 45 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.6 Especificidade

A especificidade foi analisada medindo-se a liberação do produto *p*-nitrofenol resultando da hidrólise *p*-nitrofenil ésteres com tamanho de cadeia entre 2 e 16 carbonos. Os resultados apresentados na Figura 34 mostram que *Bl*Est2 foi mais ativa contra o substrato com comprimento de cadeia de 4 carbonos, *p*-nitrofenil butirato. No entanto, a enzima manteve 20% de sua atividade para os outros substratos, exceto para *p*-nitrofenil palmitato, para o qual a atividade caiu para 5%. Este experimento confirmou que *Bl*Est2 possui atividade hidrolítica contra ligações éster e apresenta um perfil de atividade de esterase e não de lipase.



Figura 34 – Especificidade de *BI*Est2. A atividade foi calculada contra substratos de diferentes tamanhos de cadeia de 2 a 16 carbonos. Reações foram conduzidas nas condições otimizadas (35 °C, pH 8) com 1 mM de substrato.
 Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Discussão

De acordo com o banco de dados ESTHER³⁴, *Bl*Est2 é classificada na família PGAP1 do bloco X. Essa família abriga várias proteínas bacterianas hipotéticas similares a PGAP1, que possuem função desconhecida e contém uma assinatura de sequência similar à de lipases. PGAP1 é uma proteína de membrana do retículo endoplasmático que possui uma serina catalítica e uma assinatura LIPASE SER conservado de lipases (Prosite ID, ps00120) e atividade fosfórico éster hidrolase (GO: 0042578) e fosfatidilinositol éster hidrolase (GO: 0050185).¹²³ Apresenta função inusitol deacetilase de GPI, possibilitando que proteínas ancoradas por GPI migrem do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, para assim serem conduzidas à sua localização final na membrana plasmática. A única enzima caracterizada da família PGAP1 é a fosfolipase Tle4 que faz parte da família Tle1-4 com atividade fosfolipase A1 e A2.¹¹⁸ Porém, membros de Tle1-4 não possuem homologia significativa com outras famílias de lipases, sugerindo que essas enzimas podem representar uma diversidade não caracterizada na superfamília das lipases.¹²⁴ De maneira similar, *Bl*Est2 não possui identidade de sequência com outras enzimas, incluindo Tle4 ou PGAP1. Aparentemente, há uma vasta diversidade dentro da família PGAP1. Ao mesmo tempo, a maioria das proteínas são anotadas como hipotéticas e poucas enzimas tiveram suas atividades caracterizadas e, até esse momento, apenas Tle4 teve sua estrutura determinada. Isso ressalta a necessidade de mais estudos nas enzimas PGAP1, ressaltando a importância desse estudo.

*Bl*Est2 apresenta um perfil de atividade de esterase, sendo mais ativa contra *p*nitrofenil butirato, apesar de ser mais relacionada às lipases do bloco L do ESTHER (Figura 22A) e a enzimas classificadas como lipases, como a fosfolipase Tle4 e as triacilglicerol lipases PcL e PAO1. Um padrão similar foi apresentado pela esterase EstW de *Streptomyces lividans* TK64 que, embora tenha maior atividade contra *p*-nitrofenil acetato,¹²⁵ ela está mais relacionada às lipases verdadeiras da família I de acordo com a classificação clássica,²⁷ do que a outras famílias, incluindo esterases. Além disso, EstW é classificada na família I.7, que é parte da família Lipase_2 do bloco X de acordo com o banco de dados ESTHER. Adicionalmente, Javed e colaboradores compararam 27 enzimas classificadas como lipases a respeito de sua especificidade com o substrato, que apresentaram ampla diversidade abrangendo desde substratos de cadeia curta, como o *p*-nitrofenil butirato, até o longo *p*nitrofenil palmitato¹²⁶. Dessa forma, apesar do conceito clássico de que lipases são ativas em substratos de cadeia longa,²⁷ há diversas enzimas classificadas como lipases e que são ativas 288 lipases/esterases provenientes de metagenomas mostrou um padrão de atividade de "esterase" maior do que em relação ao padrão de lipase, com uma predominância de hidrólise enzimática contra substratos de cadeia curta, com menos de 10 átomos de carbono de comprimento.¹²⁷

Apesar desses resultados e dos atuais parâmetros de classificação relacionados a lipases e esterases, um busca via BLAST contra o PDB, juntamente com análises no Dali Server, mostrou que as triacilglicerol lipases de P. cepacia, PcL (Kim et al. 1997) e de P. aeruginosa, PAO1,¹²⁰ são as enzimas mais relacionadas a *Bl*Est2. Embora o complexo Tle4-Tli4 também ser classificada na família PGAP1, ele apresenta baixa identidade de sequência (14%) e Dali Z-score (15,2) quando comparado à mesma análise entre o complexo ProBlEst2 e PcL (28% de identidade de sequência e Dali Z-score de 21,4) e ProBlEst2 e PAO1 (20% de identidade de sequência e Dali Z-score de 22,5). Além disso, o alinhamento estrutural entre *Bl*Est2, PcL e PAO1 apresenta mais sentido biológico uma vez que o domínio α/β -hidrolase e facilmente sobreponível, as fendas catalíticas possuem formato similar e os domínios lid compartilham a mesma localização (Figura 28A). Enquanto o alinhamento de BlEst2 com Tle4, que compartilha da mesma classificação, não foi tão factível (TM-score de 0,11) (Figura 29A). O constante aumento de estudos estruturais tem adicionado certas incertezas sobre o sistemas de classificação de carboxilesterases ¹²⁶, que são baseadas majoritariamente em análises de sequência de aminoácidos. Mesmo classificações que abordam de forma integrada sequência, estrutura e função, como o LED podem apresentar problemas uma vez que BlEst2 é classificada na família abH18 de lipases de Bacillus, o que é coerente de acordo com a similaridade com triacilglicerol lipases, porém pertencente à classe GX, que apresenta especificidade para substratos de cadeia média a longa, o que não é o caso de BlEst2. Nesse cenário, *Bl*Est2 pode compor um novo grupo de hidrolases de éster carboxílico.

De fato, *Bl*Est2 apresenta uma característica que não é amplamente caracterizada entre lipases/esterases, os domínios C-terminal. Análises de sequências de aminoácidos mostrou que outras enzimas não caracterizadas dentro da família PGAP1 também apresentam extensões no C-terminal, além da região do domínio catalítico α/β -hidrolase (Figura 22B), que pode apresentam função similar aos domínios II e III presentes em Pro*Bl*Est2. Domínios II e III fazem parte do pro-peptídeo e análises feitas nesse trabalho revelaram que eles agem na inibição de *Bl*Est2 por aprisionar o domínio *lid* e ocupar o sítio ativo. Isso pode acontecer para assegurar que a enzima apenas ficará ativa apenas quando estiver na via correta, possivelmente após a secreção, uma vez que *Bl*Est2 possui peptídeo sinal do tipo Sec/SPI, como previsto pelo servidor SignalP-5.0,¹¹⁰ indicando que *Bl*Est2 é secretada antes de se

tornar ativa. A presença do peptídeo sinal configura um pré-pro-peptídeo. Essa função do propeptídeo é apresentado pelo peptídeo Tli4 quando complexado com a fosfolipase Tle4, inibindo a atividade na célula mãe, e evitando que haja a degradação da própria membrana plasmática, constituindo um processo de auto-proteção. Processo similar é visto na lipase de Rhizomucor miehei, Rml, que também é expressa na forma de pre-pro-peptídeo ¹¹³. O presente estudo também oferece evidências de que o pro-peptídeo (domínios II e III) é requerido para um enovelamento correto, atuando como chaperona intramolecular, uma vez que não foi possível produzir de maneira solúvel a forma truncada de BlEst2 em diferentes cepas de expressão e utilizando diferentes protocolos de indução. Como os domínios II e III estão localizados no C-terminal e estão envolvidos não só no enovelamento da estrutura terciária, mas também na inibição da atividade enzimática, eles podem ser classificados como II.¹¹² intramoleculares chaperonas de classe

4.5 Conclusões

Este estudo promoveu a caracterização de uma nova enzima de *B. licheniformis*, na sua forma de pro-peptídeo inibida, Pro*BI*Est2, e na forma madura ativa, *BI*Est2. Esta enzima apresentou enovelamento α/β -hidrolase e atividade hidrolítica em ligações éster. Embora *BI*Est2 tenha apresentado um perfil de atividade típico de esterases, tendo seu máximo de atividade contra o substrato de comprimento de cadeia de quatro carbonos *p*-nitrofenil butirato, ela é filogeneticamente mais relacionada a famílias de lipases típicas (EC 3.1.1.3 – triacilglicerol lipases). Essa proximidade à lipases pode ser claramente observada estruturalmente em dois fatores: devido a presença de um domínio *lid* em localização conservada em triacilglicerol lipases; e fenda catalítica com a presença dos bolsos n1, n2 e n3 que acomoda triacilgliceróis. Estes fatores abrem margem para discussão sobre os atuais critérios de classificação que diferenciam lipase de esterases.

Todos os resultados e discussões apresentados neste capítulo ressaltam a importância de um estudo estrutural mais acurado das lipases já conhecidas, uma vez que padrões de atividade e análises de sequência aparentemente não são o suficiente para estabelecer um sistema de classificação representativo. Além do mais, por ser a primeira estrutura descrita de caroxilesterase de *B. licheniformis*, todo o sistema de inibição descrito pode auxiliar na busca por uma classificação mais representativa e por possíveis aplicações biotecnológicas que exigem a ativação da enzima em um passo específico do processo.
5 Conclusões gerais

Ao longo desse projeto, pudemos avançar significativamente com a caracterização tanto estrutural quanto bioquímica de duas enzimas alvo, as carboxilesterases de B. licheniformis BlEst1 e BlEst2. A resolução das estruturas cristalográficas foi de extrema importância por serem as primeiras descritas para a espécie. Os estudos com BlEst1 revelaram características relevantes como a capacidade desta enzima em trabalhar em condições extremas, como altas concentrações de sal, o que é de grande importância para a biotecnologia. Além disso, as análises estruturais revelaram que diferenças na forma, arquitetura e hidrofobicidade do sítio de ligação ao substrato determina a especificidade de lipases e esterases contra substratos com diferentes comprimentos de cadeia. Já BlEst2 apresentou um mecanismo de inibição por um pro-peptídeo formado pelo complexo com dois domínios na região C-terminal. Esse processo ainda não é extensivamente descrito para lipases. Além os resultados forneceram evidências de que esses domínios funcionam como chaperonas intramoleculares, sendo requeridos para o enovelamento correto da enzima. Para ambas as enzimas encontramos incoerências entre a classificação segundo banco de dados e os dados experimentais, indicando que os sistemas de classificação atuais de carboxilesterases ainda não são representativos o suficiente para explicar a grande diversidade dentro desse extenso hidrolases. grupo de

REFERÊNCIAS

1 BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

2 LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. *In*: POLAINA J.; MACCABE A. P. (ed.). **Industrial enzymes:** structural, function and applications: Berlin: Springer, 2007. p. 263-281.

3 VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology,** v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997

4 SCHØHEYDER, F.; VOLQVARTZ, K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. Acta Physiologica Scandinavica, v. 9, n. 1, p. 57-67, 1945.

5 SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

6 VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods in Enzymology,** v. 64, p. 340-92, 1980. DOI: 10.1016/s0076-6879(80)64016-6.

7 WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 771-774, 1990.

8 BRADY, L. *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

9 BRZOZOWSKI, A. M. *et al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491-494, 1991.

10 VAN TILBEURGH, H. *et al.* Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 814-820, 1993

11 FOJAN, P. *et al.* What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1033-1041, 2000.

12 MARTINEZ, C. *et al. Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 615-618, 1992.

13 VAN POUDEROYEN, G. *et al.* The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 1, p. 215-226, 2001.

14 THIRSTRUP, K.; VERGER, R.; CARRIERE, F. Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. **Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 2748-56, 1994..

15 CHAHINIAN, H.; SARDA, L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 10, p. 1149-1161, 2009.

16 PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 115-147, 2001.

17 FISCHER, M.; PLEISS, J. The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 319-321, 2003.

18 DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 9, p. 347-352, 1998.

19 BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Lipases and esterases. *In*: BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J (ed.). **Hydrolases in organic synthesis**: regio- and stereoselective biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. cap. 5.

20 NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology,** v. 9, n. 6, p. 732-737, 1999.

21 OLLIS, D. L. *et al.* The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

22 NARDINI, M. *et al.* The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1: an enzyme to detoxify harmful epoxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14579-14586, 1999.

23 WEI, Y. *et al.* Crystal structure of brefeldin a esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. **Nature Structural Biology,** v. 6, p. 340, 1999. <u>DOI:</u> 10.1038/7576

24 KIM, K. K. *et al.* Crystal structure of carboxylesterase from Pseudomonas fluorescens, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. **Structure**, v. 5, n. 12, p. 1571-1584, 1997.

25 WEI, Y. *et al.* Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 å resolution. **Structure,** v. 6, n. 4, p. 511-519, 1998.

26 GHOSH, D. *et al.* Determination of a protein structure by iodination: the structure of iodinated acetylxylan esterase. Acta Crystallographica Section D, v. 55, n. 4, p. 779-784, 1999.

27 ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, Pt 1, p. 177-183, 1999.

28 HANDRICK, R. *et al.* A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36215-36224, 2001.

29 LEVISSON, M.; VAN DER OOST, J.; KENGEN, S. W. Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. **FEBS Journal**, v. 274, n. 11, p. 2832-42, 2007.

30 LEE, M. H. *et al.* Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7406-7409, 2006.

31 KIM, E. Y. *et al.* Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n. 1, p.257-260, 2009.

32 EWIS, H. E.; ABDELAL, A. T.; LU, C. D. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. **Gene**, v. 329, p. 187-195, 2004. DOI: 10.1016/j.gene.2003.12.029.

33 RAO, L. *et al.* A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1814, n. 12, p. 1695-702, 2011.

34 COUSIN, X. *et al.* A cholinesterase genes server (ESTHER): a database of cholinesteraserelated sequences for multiple alignments, phylogenetic relationships, mutations and structural data retrieval. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 132-136, 1996.

35 COUSIN, X. et al. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 1, p. 143-146, 1997.

36 PLEISS, J. *et al.* Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **Journal of Molecular Catalysis B:** enzymatic, v. 10, n. 5, p. 17, 2000.

37 CASAS-GODOY, L. *et al.* Lipases: an overview. **Methods in Molecular Biology,** v. 861, p. 3-30, 2012. DOI:10.1007/978-1-61779-600-5_1.

38 FISCHER, M. *et al.* DWARF – a data warehouse system for analyzing protein families. **BMC Bioinformatics**, v.7, p.495, 2006. DOI: 10.1186/1471-2105-7-495.

39 GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

40 JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology,** v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

41 SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

42 SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angewandte Chemie International Edition, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

43 BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis**: regioand stereoselective in biotransformations. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 44 DIVAKAR, S.; MANOHAR, B. Use of lipases in the industrial production of esters. *In*: POLAINA J.; MACCABE A. P. (ed.). **Industrial Enzymes**: structural, function and applications: Berlin: Springer, 2007. cap. 17.

45 KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

46 JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

47 HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

48 PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B. S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 67, n. 2, p. 160-169, 2005.

49 KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

50 PATEL, R. N. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 343, n. 6-7, p. 527-546, 2001.

51 QUAX, W. J.; BROEKHUIZEN, C. P. Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 41, n. 4, p. 425-431, 1994.

52 TANAKA, K. *et al.* Practical asymmetric synthesis of the herbicide (S)-indanofan via lipase-catalyzed kinetic resolution of a diol and stereoselective acid-catalyzed hydrolysis of a chiral epoxide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3131-3, 2002.

53 ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (±)-menthol. **Journal of Molecular Catalysis B**: enzymatic, v. 16, n. 3–4, p. 169-173, 2001.

54 KIYOTA, H. *et al.* Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. **Tetrahedron**: asymmetry, v. 12, n. 7, p. 1035-1038, 2001.

55 LINKO, Y.-Y.; JAVANAINEN, P.; LINKO, S. Biotechnology of bread baking. **Trends in Food Science & Technology,** v. 8, n. 10, p. 339-344, 1997.

56 AEHLE, W. Industrial enzymes. *In*: AEHLE, W (ed.). **Enzymes in industry**: production and applications. 3rd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2007. cap. 5.

57 FOX, P. F. *et al.* Acceleration of cheese ripening. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 70, n. 2-4, p. 271-297, 1996.

58 FERNÁNDEZ, M. *et al.* Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Trends in Food Science & Technology,** v. 11, n. 6, p. 201-209, 2000.

59 HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

60 VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 297-305, 2004.

61 GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic, v. 68, n. 1, p. 1-21, 2011.

62 JAVED, S. *et al.* Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress** in **Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2017. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.

63 MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles,** v. 5, n. 2, p. 73-83, 2001. <u>DOI: 10.1007/s007920100184</u>.

64 GARABITO, M. J.; MÁRQUEZ, M. C.; VENTOSA, A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 95-102, 1998.

65 MONDAL, K. C. *et al.* Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. Journal of General and Applied Microbiology, v. 47, n. 5, p. 263-267, 2001.

66 MINAMI, H.; SUZUKI, H.; KUMAGAI, H. Salt-tolerant γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3, p. 431-438, 2003.

67 SANA, B. *et al.* Purification and characterization of an extremely dimethylsulfoxide tolerant esterase from a salt-tolerant *Bacillus* species isolated from the marine environment of the Sundarbans. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1571-1578, 2007.

68 TAKENAKA, S. *et al.* Characterization and mutation analysis of a halotolerant serine protease from a new isolate of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 1, p. 189-196, 2018.

69 MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles,** v. 4, n. 2, p. 91-8, 2000.

70 SIGLIOCCOLO, A. *et al.* Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. **BMC Structural Biology**, v. 11, p. 50-50, 2011. DOI: 10.1186/1472-6807-11-50.

71 MÜLLER-SANTOS, M. *et al.* First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - molecular and cell biology of lipids, v. 1791, n. 8, p. 719-729, 2009.

72 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). Nucleic Acids Research, v. 18, n. 20, p. 6069-6074, 1990.

73 CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using ligation-independent cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 35-42, 2014. DOI: 10.1016/j.pep.2014.03.008.

74 KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution,** v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

75 HAMMERSLEY, A. P. FIT2D: an introduction and overview. **ESRF Internal Report**. 1997. Disponível em: <u>http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/FIT2D_REF/node268.html</u>. Acesso em: 23 jan. 2019.

76 KONAREV, P. V. *et al.* PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 5, p. 1277-1282, 2003.

77 PETOUKHOV, M. V. *et al.* ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported smallangle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. S1, 2007. DOI: 10.1107/S0021889807002853.

78 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495-503, 1992.

79 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101-109, 2009.

80 SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879-2886, 1999.

81 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in smallangle scattering. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 3, p. 860-864, 2003.

82 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; HAMMEL, M.; SALI, A. FoXS: a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. W540-4, 2010.

83 LO, M.-C. *et al.* Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 1, p. 153-159, 2004.

84 LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins:** structure, function, and bioinformatics, v. 80, n. 2, p. 374-381, 2012.

85 MAVRIDIS, L.; JANES, R. W. PDB2CD: a web-based application for the generation of circular dichroism spectra from protein atomic coordinates. **Bioinformatics**, v. 33, n. 1, p. 56-63, 2017.

86 JANCARIK, J.; KIM, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n. 4, p. 409-411, 1991.

87 GUIMARÃES, B. G. *et al.* The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 16, n. 1, p. 69-75, 2009.

88 KABSCH, W. XDS. Acta Crystallographica Section D: biological crystallography, v. 66, n. Pt 2, p. 125-132, 2010.

89 WINN, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallographica Section D: biological crystallography, v. 67, n. 4, p. 235-242, 2011-03-18 2011.

90 ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D**: biological crystallography, v. 66, n. 2, p. 213-221, 2010-01-22 2010.

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

92 TERWILLIGER, T. C. *et al.* Iterative-build OMIT maps: map improvement by iterative model building and refinement without model bias. Acta Crystallographica Section D: biological crystallography, v. 64, n. Pt 5, p. 515-524, 2008.

93AFONINE, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. Acta Crystallographica Section D: biological crystallography, v. 68, n. Pt 4, p. 352-367, 2012.

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

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

96 LIU, P. *et al.* Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. Journal of Molecular Biology, v. 342, n. 2, p. 551-561, 2004.

97 RENGACHARI, S. *et al.* The structure of monoacylglycerol lipase from *Bacillus* sp. H257 reveals unexpected conservation of the cap architecture between bacterial and human enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - molecular and cell biology of lipids, v. 1821, n. 7, p. 1012-1021, 2012.

98 BHATTACHARYA, M.; MUKHOPADHYAY, S. Studying protein misfolding and aggregation by fluorescence spectroscopy. *In:* GEDDES, C. D. (ed.). Reviews in Fluorescence 2015. Cham: Springer International Publishing, 2016. p.1-27.

99 MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. Journal of Molecular Biology, v. 33, n. 2, p. 491-497, 1968.

100 ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

101 DE BEER, T. A. *et al.* PDBsum additions. Nucleic Acids Research, v. 42, p. D292-6, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt940.

102 WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127-34, 1995.

103 ZISIS, T. *et al.* Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation. **Biochemistry**, v. 54, n. 38, p. 5969-5979, 2015.

104 FERRER, M. *et al.* Biodiversity for biocatalysis: a review of the α/β -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 5-6, p. 235-249, 2016.

105 KITAURA, S.; SUZUKI, K.; IMAMURA, S. Monoacylglycerol lipase from moderately thermophilic Bacillus sp. strain H-257: molecular cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli of the gene. **J Biochem**, v. 129, n. 3, p. 397-402, Mar 2001. ISSN 0021-924X (Print)0021-924x. Disponível em: < <u>http://dx.doi.org/</u>>.

106 RENGACHARI, S. et al. Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase. **J Biol Chem**, v. 288, n. 43, p. 31093-104, 2013.

107 WANG, G. *et al.* A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19494, 2016.

108 TOMPA, P. Intrinsically unstructured proteins. **Trends in Biochemical Sciences,** v. 27, n. 10, p. 527-533, 2002.

109 SHINDE, U.; INOUYE, M. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. **Seminars in Cell & Developmental Biology,** v. 11, n. 1, p. 35-44, 2000.

110 ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.

111 BRAUN, P.; TOMMASSEN, J. Function of bacterial propeptides. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 6-8, 1998.

112 CHEN, Y.-J.; INOUYE, M. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. **Current Opinion in Structural Biology,** v. 18, n. 6, p. 765-770, 2008.

113 MOROZ, O. V. *et al.* Novel inhibitory function of the *Rhizomucor miehei* lipase propeptide and three-dimensional structures of its complexes with the enzyme. **ACS Omega**, v. 4, n. 6, p. 9964-9975, 2019.

114 PEI, J.; KIM, B.-H.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2295-2300, 2008.

115 PANNU, N. S. *et al.* Recent advances in the CRANK software suite for experimental phasing. Acta Crystallographica D, v. 67, Pt 4, p. 331-337, 2011.

116 TERWILLIGER, T. C. *et al.* Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. Acta Crystallographica Section D, v. 64, n. 1, p. 61-69, 2008.

117 SMART, O. S. *et al.* Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. Acta Crystallographica D, v. 68, Pt 4, p. 368-380, 2012.

118 LU, D. *et al.* The structural basis of the Tle4-Tli4 complex reveals the self-protection mechanism of H2-T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Crystallographica D, v. 70, Pt 12, p. 3233-43, 2014.

119 KIM, K. K. *et al.* The crystal structure of a triacylglycerol lipase from Pseudomonas cepacia reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 173-185, 1997.

120 NARDINI, M. *et al.* Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation: the prototype for family I.1 of bacterial lipases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31219-31225, 2000.

121 KRISSINEL, E. Stock-based detection of protein oligomeric states in jsPISA. Nucleic Acids Research, v. 43, n. W1, p. W314-W319, 2015.

122 ASHKENAZY, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W344-W350, 2016.

123 TANAKA, S. *et al.* Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 14, p. 14256-14263, 2004.

124 RUSSELL, A. B. *et al.* Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. **Nature**, v. 496, p. 508, 2013. <u>DOI: 10.1038/nature12074</u>.

125 WANG, B. *et al.* Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 334-343, 2016.

126 JAVED, S. *et al.* Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology,** v. 132, p. 23-34, 2018. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.

127 FERRER, M. *et al.* Biodiversity for biocatalysis: a review of the α/β -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 5-6, p. 235-249, 2015.

ANEXOS

Artigos publicados em periódicos:

NAKAMURA, ALINE M.; KADOWAKI, MARCO A. S.; GODOY, ANDRÉ; NASCIMENTO, ALESSANDRO S.; POLIKARPOV, IGOR. Low-resolution envelope, biophysical analysis and biochemical characterization of a short-chain specific and halotolerant carboxylesterase from *Bacillus licheniformis*. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 120, p. 1893-1905, 2018.

NAKAMURA, ALINE M.; NASCIMENTO, ALESSANDRO S.; POLIKARPOV, IGOR. Structural diversity of carbohydrate esterases. Biotechnology Research and Innovation, v. 1, p. 1-17, 2017.

Artigos em fase de preparação:

NAKAMURA, ALINE M.; KADOWAKI, MARCO A. S.; GODOY, ANDRÉ; POLIKARPOV, IGOR. The first structure of a lipase from *Bacillus licheniformis* on its propeptide and mature form revealing inhibition and intramolecular chaperone function of C-terminal domains.

NAKAMURA, ALINE M.; KADOWAKI, MARCO A. S.; GODOY, ANDRÉ; POLIKARPOV, IGOR. Structure of *Bacillus licheniformis* carboxylesterase *Bl*Est1 shed light on its preference for short chain substrates



http://www.journals.elsevier.com/biotechnology-research-and-innovation/

REVIEW ARTICLE

Structural diversity of carbohydrate esterases

Aline M. Nakamura, Alessandro S. Nascimento, Igor Polikarpov*

São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, Av. Trabalhador são-carlense, 400 – Pq. Arnold Schimidt, CEP 13566-590 São Carlos, SP, Brazil

Received 1 February 2017; accepted 7 February 2017

KEYWORDS Carbohydrate esterases; CAZy; 3D structure; Enzymatic activity

Abstract Carbohydrate esterases (CEs) catalyze the de-O or de-N-acylation by removing the ester decorations from carbohydrates. CEs are currently classified in 15 families in the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database, which classifies a large variety of enzymes that assemble, modify and breakdown carbohydrates and glycoconjugates. CEs have significant importance as biocatalysts in a variety of bioindustrial processes and applications. Thus, the understanding of molecular mechanisms involved in CE catalysis is essential. However, despite a rather large number of enzymes classified as CEs, just a few have been studied biochemically and only a handful has their three-dimensional structures determined and analyzed. Here, we present a brief overview of all currently classified CE families, mainly focusing on the structures and enzymatic activities of CEs.

Introduction

Hydrolytic enzymes that act on ester bonds, commonly termed esterases, are widely used as biocatalysts in industrial processes and biotechnology (Bornscheuer, 2002; Jaeger & Eggert, 2002; Jaeger & Reetz, 1998). The carbohydrate esterases (CEs) represent a class of esterases, which involves enzymes that catalyze the de-O or de-N-acylation to remove the ester decorations from carbohydrates (Cantarel et al., 2009). These enzymes are currently classified in 16 families in the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database, from CE1 to CE16. The CE family 10, however, has been nullified since most of the members of this family

* Corresponding author.

E-mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br (I. Polikarpov).

appeared to be esterases active against non-carbohydrate substrates, thus limiting the total number of CE families to 15.

The CAZy database (http://www.cazy.org/) is a curated database which systematically organize information about a large variety of enzymes that assemble, modify and breakdown carbohydrates and glycoconjugates, the CAZymes, classifying them according to their amino acid sequence similarities and common structural folds. This classification usually reflects enzymes mechanisms, protein fold and structural features better than specificity, grouping enzymes with different activities together in five large classes: Glycoside hydrolases (GHs), Glycosyltransferases (GTs), Polysaccharide lyases (PLs), Carbohydrate esterases (CEs), Auxiliary Activities (AAS). In addition, the Carbohydratebinding modules (CBMs), which do not exhibit catalytic activity, are grouped together (Lombard, Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.02.001

2452-0721/© 2017 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Biotecnologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Please cite this article in press as: Nakamura, A. M., et al. Structural diversity of carbohydrate esterases. Biotechnology Research and Innovation (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.02.001

International Journal of Biological Macromolecules 120 (2018) 1893-1905



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules



Low-resolution envelope, biophysical analysis and biochemical characterization of a short-chain specific and halotolerant carboxylesterase from *Bacillus licheniformis*



Aline M. Nakamura, Marco Antonio Seiki Kadowaki, André Godoy, Alessandro S. Nascimento, Igor Polikarpov * São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, Av. Trabalhador são-carleuse, 400 - Pq. Arnold Schimidt, CBP 13566-590 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 16 June 2018 Received in revised form 30 September 2018 Accepted 1 October 2018 Available online 2 October 2018

Keywords: ox/j3 hydrolase Carboxylesterases Bacillus licheniformis

ABSTRACT

Esterases are widely applied in industrial processes due to their versatility, regio- and enantioselectivity, lack of cofactors and stability in organic solvents. *Bacillus licheniformis*, a microorganism frequently used in industrial and biotechnological applications such as dairy, baking, beverage, pulp and paper, detergent and cosmetics production, organic synthesis and waste management, is a promising source of esterases. Here we describe the bio-chemical and biophysical characterization of *B. licheniformis* carboxylesterase *BlEst1* and its SAXS-derived molecular envelope. *BlEst1* has optimal hydrolytic activity against *p*-nitrophenyl acetate at pH 7.0 and 40 °C. Furthermore, *BlEst1* is stable in different organic solvents such as methanol, isopropanol and butanol. The *BlEst1* homology model reveals a typical α/β hydrolase core with an adjacent auxiliary domain, snuggly fitting the experimental low-resolution SAXS molecular envelope. Moreover, *BlEst1* maintained considerable part of its activity in the presence of up to 5 M NaCl and its thermal stability was significantly enhanced by the presence of salt, revealing its halotolerant character. The ability to work under harsh conditions makes *BlEst1* an interesting candidate for industrial applications.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Carboxylic ester hydrolases comprise a diverse group of hydrolases that catalyze the cleavage and formation of ester bonds, which includes carboxylesterases or "true" esterases (EC 3.1.1.1) and triacylglycerol lipase or "true" lipases (EC 3.1.1.3). These two groups of enzymes form the major class of α/β -fold hydrolases [1–3], which are widely distributed in plants, animals and microorganisms. Carboxylic ester hydrolases are extremely versatile enzymes, accepting a wide range of substrates while maintaining high regio-, chemo- and enantioselectivity [4,5]. Moreover, they do not require cofactors and are remarkably stable in many organic solvents [6–8]. Such properties make both esterases and lipases important molecular tools in biotechnology, which have a wide applicability as biocatalysts in a variety of industrial processes [4,8,9].

Despite similarities of their catalytic mechanisms [10], carboxylesterases have higher activity against short soluble acyl chains, while lipases have increased activity for longer and insoluble acyl chains [11]. Lipases catalyze reactions on the lipid-water interface via interfacial activation mechanism [12,13]. The activation is

E-mail addresses: asnascimento@ifsc.usp.hr (A.S. Nascimento), ipolikarpov@ifsc.usp.hr (L.Polikarpov). promoted by conformational changes of the cap domain that adopts an opened conformation in contact with the water/substrate interface [14,15]. Carboxylesterases lack the cap domain and do not require interfacial activation for their activity.

Bacillus licheniformis (taxonomic ID: 1402) is a saprophytic, grampositive and endospore-forming bacterium, that has been isolated from soil or plants [16]. Several features make B. licheniformis an organism of considerable interest for bioindustrial applications. It is aerobic or facultative anaerobic microorganism, which inhabits various ecological niches and environments [17]. Moreover, its saprophytic behavior is related to copious amounts of enzymes production to assess different carbon sources [18]. B. licheniformis secretes proteins in the medium, what makes this organism an important producer of commercial enzymes [19]. It has GRAS (Generally Regarded as Safe) status according to the U.S. Food and Drug Administration, being not pathogenic to humans [20]. A number of genes with potential biotechnological applications were identified in the B. licheniformis genome including proteases, pectinases, lipases and other enzymes that degrade polysaccharides [16]. Besides this, bacterial enzymes are interesting due to the easy production, low cost, mutations susceptibility and for being versatile and stable in many conditions [21]. Thus, molecular and biochemical information regarding B. licheniformis carboxylesterases are of interest to biotechnology research, since B. licheniformis enzymes are applied in a

Corresponding author.