

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

Adriano Alves Furtado

**Estudos estruturais e bioquímicos de 10 enzimas com
possível atividade de PET hidrolase oriundas de
metagenoma antártico**

São Carlos

2023

Adriano Alves Furtado

**Estudos estruturais e bioquímicos de 10 enzimas com
possível atividade de PET hidrolase oriundas de
metagenoma antártico**

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

Área de concentração: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garrat

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2023

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.

Furtado, Adriano Alves

Estudos estruturais e bioquímicos de 10 enzimas com possível atividade de PET hidrolase oriundas de metagenoma antártico / Adriano Alves Furtado; orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

123 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. PET. 2. PETase. 3. Cristalografia. 4. Difração de raios X. 5. CBM. I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho ao meu tio Eduardo que infelizmente já não está mais entre nós,
mas que sempre acreditou em mim e me inspirou com sua paixão pela ciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração aos meus pais, Valdemar de Sousa Furtado e Adriana Alves de Carvalho, e aos meus irmãos, Rafael Augusto e Kesley Alves Furtado, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando ao longo de toda a minha jornada.

Quero expressar minha gratidão ao meu professor orientador na graduação, Dr. Ivo de Almeida Marques, pela inspiração que me levou a essa maravilhosa área conhecida como física biomolecular, e pelas valiosas contribuições ao meu aprendizado durante todo o processo de iniciação científica. Sinceramente, agradeço ao meu estimado orientador, Dr. Richard Charles Garrat, por nossas conversas enriquecedoras e pela maravilhosa oportunidade de expandir significativamente meu conhecimento ao longo desses dois anos de mestrado.

Gostaria de agradecer também aos professores do laboratório, Dr. Otavio Henrique Thiemann, e especialmente ao professor Dr. João Renato, pelas discussões acaloradas, inspiração e por me ensinar tanto no campo da cristalografia (sabendo que ainda tenho muito a aprender).

Expresso também minha profunda gratidão a todos os meus novos amigos, Marco (Brazuca), Marco (Peruano), Matheus, Erick, Tamires, Thiago, Sara, Leo (goiano), Leonardo, Daniela, Vania, Jessenia, Giovanna, Agha, Eloy e Vinicius, pela oportunidade de conviver e pela valiosa experiência social de conhecer pessoas tão incríveis. Em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos de Goiânia, o André, pelo companheirismo, e o Rodrigo, por além de todo apoio, tornar tudo sempre mais divertido. Também agradeço ao meu amigo Felipe Gatica, pelo apoio e por toda contribuição, sendo minha ponte ao Chile nesses últimos anos.

Gostaria de destacar meu eterno agradecimento ao meu estimado mestre, Jhon Vargas, e ao incrível chefinho Diego, pelo companheirismo e por sua ajuda durante todo o processo do mestrado. Também sou grato aos técnicos do laboratório, Dr. Humberto D'Muniz Pereira, pela sua amizade e assistência em relação à sua expertise em cristalografia, à Dra. Susana Andrea Sculaccio, pela orientação na expressão, purificação e por todo apoio. Tenho plena convicção de que, não importa onde eu esteja, serei sempre um orgulhoso "filhote" da Su.

Por fim, gostaria de expressar minha imensa gratidão ao meu amigo Luis Valverde, por todo o apoio e por estar ao meu lado nos momentos mais felizes e mais desafiadores. Sua presença torna tudo mais fácil e divertido, e seu notável esforço é uma constante inspiração para mim. Sou extremamente grato por existir na minha vida, minha luz meu Sol e estrelas.

*“No início, o Universo foi criado. Isso irritou profundamente muitas pessoas e, no geral,
foi encarado como uma péssima idéia.”*

Douglas Adams

RESUMO

FURTADO, A. A. **Estudos estruturais e bioquímicos de 10 enzimas com possível atividade de PET hidrolase oriundas de metagenoma antártico.** 2023. 123p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Até o momento, os plásticos têm sido os produtos com maior acúmulo nos últimos anos e sua fragmentação tem sido um dos maiores poluentes. O polietileno tereftalato (PET) é um dos materiais mais utilizados na fabricação de garrafas descartáveis e tem sido o foco estratégico para decomposição e mitigação da poluição. No entanto, os processos desenvolvidos até agora têm sido ineficientes. Com a descoberta de enzimas que degradam o PET, surge a oportunidade de aplicação biotecnológica para minimizar esses problemas. Neste trabalho, estudamos 11 enzimas recombinantes da Antártica (e uma variação) com potencial atividade catalítica contra o PET, identificadas por metagenômica. Os parâmetros de expressão proteica foram otimizados em diferentes cepas de *Escherichia coli* e as purificações foram realizadas em duas ou três etapas (Cromatografia de Afinidade, Troca Iônica e Exclusão Molecular) com algumas adaptações. A partir das purificações, isolamos 10 proteínas. Os ensaios de cristalização levaram a cristais para 8 enzimas, das quais obtivemos 4 estruturas cristalográficas resolvidas entre 2,32 Å e 1,2 Å. Análises estruturais das estruturas resolvidas por difração de raios-X e estruturas teóricas geradas pelo AlphaFold2 foram realizadas por meio de docking molecular entre as enzimas e um fragmento de PET. Essas análises revelaram mudanças sequenciais e estruturais críticas. Com a intenção de acumular um maior conhecimento sobre PETase, que poderia ser empregada na melhoria das enzimas para fins biotecnológicos, experimentos biofísicos e bioquímicos foram realizados, onde observamos comportamentos distintos tanto para a estabilidade térmica quanto para atividade.

Palavras-chave: PET. PETase. Cristalografia. Difração de raios X. CBM.

ABSTRACT

FURTADO, A. A. **Structural and biochemical studies of 10 enzymes with possible PET hydrolase activity from an Antarctic metagenome.** 2023. 123p. Dissertation (Master in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Plastics have been the most accumulated products in recent years, and their fragmentation has become one of the major pollutants. Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most commonly used materials in the production of disposable bottles and has been a strategic focus for decomposition and mitigation of pollution. However, the processes developed so far have been inefficient. With the discovery of enzymes that degrade PET, there is an opportunity for biotechnological application to minimize these problems. In this study, we investigated 11 recombinant Antarctic enzymes (and a variant) with potential catalytic activity against PET, identified through metagenomics. Protein expression parameters were optimized in different strains of *Escherichia coli*, and purifications were performed in two or three steps (Affinity Chromatography, Ion Exchange, and Size Exclusion) with some adaptations. From the purifications, we isolated 10 proteins. Crystallization assays resulted in crystals for 8 enzymes, from which we obtained 4 crystal structures resolved at resolutions ranging from 2.32 Å to 1.2 Å. Structural analyses of the resolved structures by X-ray diffraction and theoretical structures generated by AlphaFold2 were performed through molecular docking between the enzymes and a PET fragment. These analyses revealed critical sequential and structural changes. With the aim of accumulating greater knowledge about PETase, which could be employed in the improvement of enzymes for biotechnological purposes, biophysical and biochemical experiments were conducted, where distinct behaviors were observed for both thermal stability and activity.

Keywords: PET (Polyethylene Terephthalate). PETase . Crystallography. X-ray Diffraction. CBM (Carbohydrate-binding module).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de reação da síntese de PET	29
Figura 2 – Hidrólise enzimática de PET	30
Figura 3 – Estrutura cristalina da IsPETase	31
Figura 4 – Resíduos envolvidos no sítio ativo da IsPETase.	32
Figura 5 – Sequência de aminoácidos de resíduos-chave em enzimas de degradação de PET	33
Figura 6 – Representação de um mapa de plasmídeo simplificado	34
Figura 7 – Esquema de enovelamento guiado por chaperonas	35
Figura 8 – Ciclo de redução simplificado de thioredoxina redutase	36
Figura 9 – Esquema de purificação utilizando uma coluna cromatográfica de afinidade a metal (IMAC)	37
Figura 10 – Esquema simplificado de purificação utilizando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular	37
Figura 11 – Esquema de purificação utilizando uma coluna cromatográfica de troca iônica	38
Figura 12 – Formação de ondas circularmente polarizada de mão direita e esquerda	39
Figura 13 – Espectro de CD para diferentes estruturas secundárias	40
Figura 14 – Diagrama de fases de um experimento de cristalização de proteínas	41
Figura 15 – Esquema da técnica " <i>sitting drop diffusion</i> "	42
Figura 16 – Interferência entre raios X a nível planar.	42
Figura 17 – Esquema dos passos utilizados.	45
Figura 18 – Protocolo de purificação por afinidade utilizando	48
Figura 19 – Esquema demonstrando a remoção das chaperonas	49
Figura 20 – Método de refolding	50
Figura 21 – Afinidade : Gel de SDS-PAGE para G1, G3 e G8	55
Figura 22 – SEC : Gel de SDS-PAGE 15% para G1, G3 e G8	56
Figura 23 – Troca iônica : Gel de SDS-PAGE 15% para G3 e G8	56
Figura 24 – Afinidade : Gel de SDS-PAGE para MetaG4, MetaG4CBM, MetaG7 e MetaG9	57
Figura 25 – SEC : Gel de SDS-PAGE 15% para G4, G4CBM, G7 e G9	57
Figura 26 – Afinidade : Gel de SDS-PAGE para G6, G5 e G10	58
Figura 27 – Afinidade : Gel de SDS-PAGE para G6, G5	59
Figura 28 – Afinidade : Gel de SDS-PAGE para refolding de G9	59
Figura 29 – Descrição do diagrama de dificuldade das MetaG's.	60
Figura 30 – Diagrama de dificuldade das MetaG's.	61
Figura 31 – Curva de desnaturação térmica de Mors1 e G7	65

Figura 32 – Curva de desnaturação térmica de G4 e G4CBM	65
Figura 33 – Curva de desnaturação termica de MetaG1	66
Figura 34 – CD de MetaG1	66
Figura 35 – Espectro de CD para MetaG8	67
Figura 36 – Curva de transição térmica de MetaG9	68
Figura 37 – CD de MetaG1	68
Figura 38 – Alinhamento entre subsítios 1 e 2	69
Figura 39 – Alinhamento entre Petases-like.	70
Figura 40 – Alinhamento entre subsítios 1 e 2 para MetaG's e Mors1	71
Figura 41 – Cristais de MetaG3	72
Figura 42 – Cristais G3 melhorados	73
Figura 43 – Estrutura cristalográfica de MetaG3	75
Figura 44 – Cristais de MetaG4	76
Figura 45 – Estrutura cristalografica de MetaG4	79
Figura 46 – Cristais de Meta G9	81
Figura 47 – Cristais otimizados de G9	83
Figura 48 – Estrutura cristalográfica de MetaG9	84
Figura 49 – Cristais de Mors1	85
Figura 50 – Estrutura cristalográfica de Mors1	87
Figura 51 – Cristais de não difratados	89
Figura 52 – Cristais otimizados de G7	90
Figura 53 – Estruturas preditas pelo AlphaFold2	91
Figura 54 – Docking realizado entre o fragmento de PET e as estruturas e IsPETase	92
Figura 55 – Docking realizado entre o fragmento de PET e as estruturas de IsPETase , MetaG8, MetaG2 e MetaG3.	93
Figura 56 – Superposição da estrutura AlphaFold de G8 e G3	94
Figura 57 – Docking da estrutura AlphaFold de MetaG1 e MetaG6.	94
Figura 58 – Estrutura AlphaFold de MetaG5 e ligante de G3	95
Figura 59 – Estrutura cristalográfica de MetaG4 com ligante	96
Figura 60 – Estrutura cristalográfica de MetaG9 e Mors1 com ligantes de G3 e IsPETase	97
Figura 61 – Estrutura predita de MetaG7 e ligantes de G3 e IsPETase	97
Figura 62 – Hidrolise de PNPA em PNP	98
Figura 63 – Estrutura da unidade monomérica da policaprolactona.	99
Figura 64 – Caracterização enzimática de MetaG7 em relação às nanopartículas de PCL	100
Figura 65 – Caracterização enzimática de MetaG4CBM em relação às partículas insolúveis de BHET	101
Figura 66 – Comparação entre o CBM de G4 e da Xilanase	102

Figura 67 – Alinhamento entre o CBM de G4 e da Xilanase	103
Figura 68 – Esquema sugerido da interação entre o G4CBM e BHET	103
Figura 69 – Sequencias de linkers de CBM	104
Figura 70 – Degradação enzimática de filmes de PET amorfos.	119
Figura 71 – Catalise enzimática de pNPA por G4 e G7.	121
Figura 72 – Catalise enzimática de ésteres por G4 e G7 a 30 °C.	122
Figura 73 – Catalise enzimática de ésteres por G4 a 40 °C.	123
Figura 74 – Ensaio de degradação de películas de PET por G4 e G7.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de dados MetaG3	74
Tabela 2 – Tabela de dados MetaG4	78
Tabela 3 – Tabela de dados MetaG9	82
Tabela 4 – Tabela de dados Mors1	86
Tabela 5 – Tabela de docking	93
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos de G4 y G7 para hidrolise de pNPA e pNPB a 30 °C	121
Tabela 7 – Parametros cinéticos de G4 para hidrolise de pNPA e pNPB a 40 °C .	122

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Antibióticos específicos para cada cepa e enzimas solubilizadas	46
Quadro 2 – Tampões para purificação	47
Quadro 3 – Condições de cristalização MetaG3	72
Quadro 4 – Condições de cristalização G3 otimizada	73
Quadro 5 – Condições de cristalização MetaG4	77
Quadro 6 – Condições de cristalização G9	81
Quadro 7 – Outras condições de cristalização	89
Quadro 8 – Parâmetros cinéticos da hidrólise de PCL	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PET	Polietileno tereftalato
PETase	Enzima degradadora de PET
EG	Etilenoglicol
TPA	Ácido tereftálico
MHET	Mono(2-hidroxietil)teraftálico
BHET	Bis(2-hidroxietil)tereftalato
PCL	Policaprolactona
IsPETase	PETase da bactéria <i>Ideonella sakaiensis</i>
G1 a G10	Proteínas MetaG1 a MetaG10
CBM	<i>Carbohydrate-binding module</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i> (Cromatografia de afinidade de metal imobilizado)
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia de exclusão molecular)
MW	<i>Molecular Weight</i> Peso Molecular
CD	Dicroísmo Circular
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
T_t	Temperatura de transição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Polietileno tereftalato	29
1.2	PETase	30
1.3	Expressão heteróloga	33
1.4	Solubilização da Proteína	34
1.4.1	Uso de chaperonas	35
1.4.2	Pontes dissulfeto	35
1.5	Purificação	36
1.5.1	Cromatografia por afinidade	36
1.5.2	Cromatografia de exclusão molecular	37
1.5.3	Cromatografia de troca iônica	38
1.5.4	Purificação de chaperonas	38
1.6	Dicroísmo Circular	39
1.7	Cristalografia de proteínas	40
1.7.1	Cristalização por difusão de vapor em gota sentada	41
1.7.2	Difração de Raios X	42
1.8	Objetivos	43
1.8.1	Principal	43
1.8.2	Específicos	43
2	MÉTODOLOGIA	45
2.1	Construção dos Plasmídeos	45
2.2	Métodos de transformação, expressão e solubilização	45
2.2.1	Protocolo expressão e solubilização em BL21(DE3) e Origami-2(DE3)	46
2.2.2	Protocolo expressão e solubilização em ArcticExpress(DE3)	47
2.2.3	Protocolo expressão e solubilização em BL21+TaKara	47
2.3	Purificação	47
2.3.1	Protocolo de Purificação por afinidade a metal IMAC	47
2.3.2	Protocolo de Purificação por exclusão molecular (SEC)	48
2.3.3	Protocolo de Purificação por troca iônica	48
2.3.4	Remoção de chaperonas em purificação por afinidade a metal (IMAC)	49
2.4	Refolding	50
2.5	Ensaio de atividade	51
2.5.1	Teste de atividade esterásica	51
2.5.2	Ensaio com PCL	51
2.5.3	Ensaio com BHET	51

2.6	Alinhamento Múltiplo das Sequências	52
2.7	Docking Molecular	52
2.8	Dicroísmo Circular	52
2.9	Ensaio de cristalização	53
2.10	Coleta de dados e resolução das estruturas	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
3.1	Expressão e solubilização	55
3.1.1	Expressão e purificação em BL21(DE3)	55
3.1.2	Expressão e purificação em Origami-2(DE3)	56
3.1.3	Expressão e purificação em ArcticExpress(DE3) e +TaKaRa	58
3.1.4	Ensaio de refolding	59
3.2	Facilidade na obtenção das proteínas	60
3.2.1	MetaG1	62
3.2.2	MetaG3	62
3.2.3	MetaG4	62
3.2.4	MetaG4CBM	62
3.2.5	MetaG5	62
3.2.6	MetaG6	63
3.2.7	MetaG7	63
3.2.8	MetaG8	63
3.2.9	MetaG9	63
3.2.10	Mors1	64
3.3	Estabilidade térmica das enzimas	64
3.3.1	Mors1 e MetaG7	64
3.3.2	MetaG4 e MetaG4CMB	65
3.3.3	MetaG1	66
3.3.4	MetaG8 e MetaG9	67
3.4	Alinhamento das sequencias	69
3.4.1	Alinhamento das sequencial das potenciais PETases	69
3.5	Ensaio cristalográfico	72
3.5.1	MetaG3	72
3.5.1.1	Descrição da estrutura: MetaG3	74
3.5.2	MetaG4	76
3.5.2.1	G4: Descrição da estrutura	78
3.5.3	MetaG9	80
3.5.3.1	G9:Descrição da estrutura	83
3.5.4	Mors1	85
3.5.4.1	Mors1: Descrição da estrutura	86
3.5.5	Outros ensaios de cristalização	88

3.6	Estruturas AlphaFold	91
3.7	Docking molecular	92
3.8	Ensaio de atividade	98
3.9	Testes com PNPA	98
3.9.1	Atividade em PCL policaprolactona	99
3.9.2	Atividade em BHET	100
3.10	Análise da função do domínio CBM em G4	101
4	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	113
	ANEXO A – SEQUENCIA DE AMINOACIDOS COMPLETA DAS TRANSFORMAÇÕES.	115
	ANEXO B – PARAMETROS CINÉTICOS DE MORS1 (DE BLÁZQUEZ-SÁNCHEZ)	119
	ANEXO C – PARAMETROS CINÉTICOS DE METAG4 E METAG7 (DE GÁTICA, F.)	121

1 INTRODUÇÃO

A parte inicial desta dissertação será dividida em duas partes principais. A primeira (os dois primeiros tópicos) terá como objetivo introduzir o leitor ao polietileno tereftalato (PET) e à enzima PETase, buscando familiarizá-lo com a história e o mecanismo de atividade enzimática, diretamente relacionados à sua estrutura. A segunda parte será uma breve introdução às técnicas utilizadas para obtenção e estudo das proteínas expressas, com ênfase em aplicações e variações que serão utilizadas nas metodologias e explicadas nos resultados. Boa leitura!

1.1 Polietileno tereftalato

O polietileno tereftalato, comumente conhecido como plástico PET, é um polímero da família do poliéster amplamente utilizado devido à sua versatilidade. Ele é formado por etilenoglicol (EG) com ácido tereftálico (TPA) ou dimetil tereftalato (DMT), que são obtidos a partir de fontes de combustíveis fósseis. Esses componentes se combinam para formar monômeros, como mono-2-hidroxietil tereftalato (MHET) e bis-2-hidroxietil tereftalato (BHET). A condensação desses monômeros forma longas moléculas de PET (figura 1) (1).

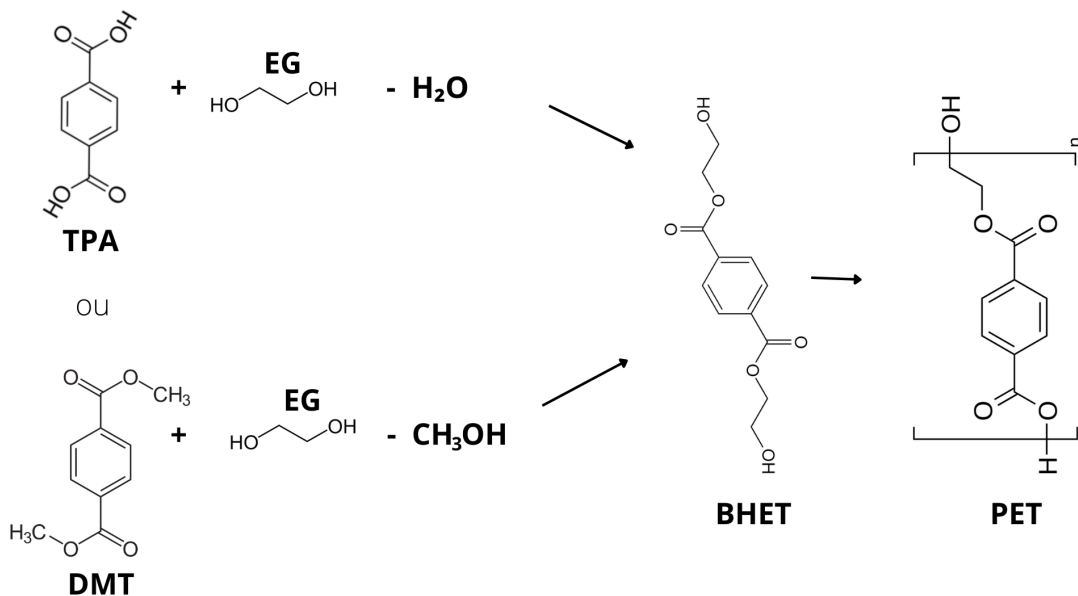


Figura 1 – Esquema de reação da síntese de PET indicando as etapas de esterificação, transesterificação e polimerização.

Fonte: Elaborada pelo autor

O plástico PET geralmente é utilizado na forma amorfa ou semicristalina e é altamente considerado por suas propriedades, incluindo leveza e durabilidade, ampla faixa

de temperatura de uso e baixa permeabilidade a gases, especialmente com dióxido de carbono. A combinação de propriedades do plástico PET o torna um material preferido em diversas aplicações, sendo comumente utilizado como garrafas de bebidas, filmes flexíveis para embalagens e filamentos para a indústria têxtil. (2) Sua natureza quase inquebrável, o torna também um substituto seguro e confiável para o vidro em várias aplicações.

Outro benefício crucial do PET é sua reciclabilidade, podendo assim reaproveitado para uso em outras aplicações, reduzindo o desperdício e o impacto ambiental. No entanto, apesar disso, as taxas de reciclagem de PET ainda são relativamente baixas, com menos da metade das 480 bilhões de garrafas plásticas fabricadas em 2016 sendo recicladas. (3) Como resultado, há uma necessidade crescente de maior conscientização e esforços para promover a reciclagem e a reutilização do plástico PET, juntamente com uma mudança mais ampla em direção a alternativas mais sustentáveis e ecológicas.

1.2 PETase

A crescente preocupação pública com o tratamento de resíduos estimulou o estudo da biodegradação de polímeros sintéticos, onde os primeiros degradantes de poliéster datam desde 1975. (4) Todavia foi apenas em 2016 que o primeiro organismo degradador de PET, a bactéria *Ideonella sakaiensis* foi descrita, isolada de uma amostra de sedimento retirada de uma instalação de reciclagem de garrafas plásticas na cidade de Sakai, no Japão.(5)

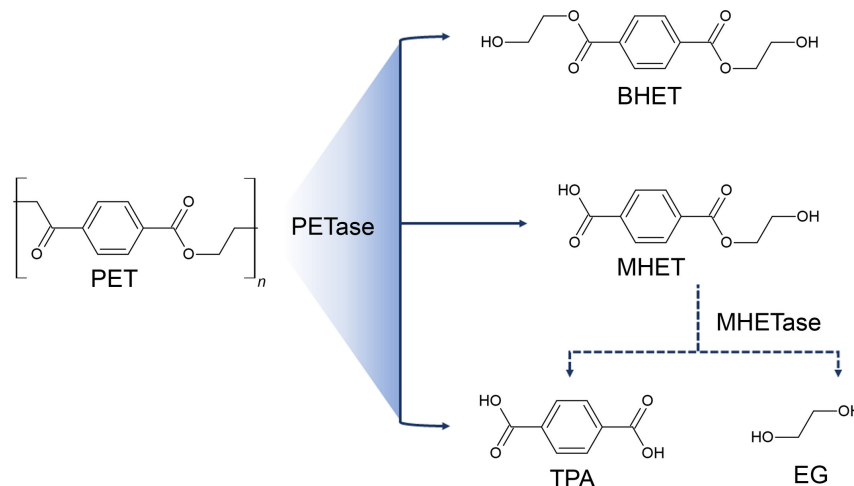


Figura 2 – Hidrólise enzimática de PET por PETases e MHETases.

Fonte: PIRILLO; POLLEGIONI; MOLLA. (6)

O processo de degradação operado pela *Ideonella sakaiensis* consiste na secreção de uma enzima (PETase) capaz de fazer a hidrólise das ligações de ésteres do polietileno tereftalato, que é capaz de degradar PET em ácido mono(2-hidroxi)tereftálico (MHET), um heterodímero composto de ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol. A PETase também degrada o PET em outro intermediário conhecido como Bis-(2-hidroxi)tereftalato (BHET) que também pode ser convertido em MHET e etilenoglicol (EG) (figura 2). A

bactéria ainda utiliza uma segunda enzima, denominada MHETase capaz de hidrolisar o MHET em o ácido tereftálico (TPA) e EG, sendo estes absorvido pela *Ideonella sakaiensis* e muitas outras bactérias da comunidade microbiana.

A enzima PETase é uma alfa-beta-alfa esterase com modificações em certos subsítios que lhe permitem ancorar ao polímero PET (figura 3). No caso da PETase da *Ideonella sakaiensis* (isPETase) o sítio ativo contém três resíduos, Ser160, His237 e Asp206, que formam uma tríade catalítica. A fenda de ligação ao substrato na superfície da enzima é predominantemente hidrofóbica e se estende por aproximadamente 40 Å, dividida em dois subsítios. Existe também em IsPETase, duas pontes dissulfeto, uma primeira presente em todas homologas PETases e uma adicional presente em algumas.

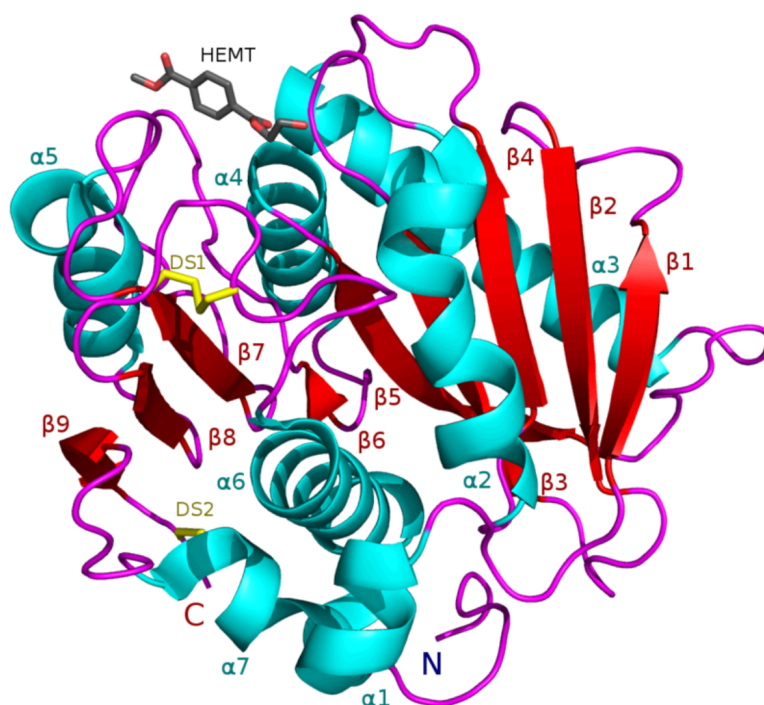


Figura 3 – Estrutura cristalina da IsPETase PDBID: 5XH3. As folhas β (β 1-9) e as hélices α (α 1-7) são numeradas de acordo com sua ordem na cadeia peptídica de N-para C-terminal.

Fonte: HAN *et al.* (7)

O primeiro subsítio de ligação é formado por Tyr87 e Trp185, dois resíduos aromáticos que conferem estabilidade ao ligante ao interagir com o anel benzênico (figura 4). Prevê-se também que Met161 e Ile208 ajudem na ligação do ligante, fornecendo uma superfície hidrofóbica na parte inferior e lateral do subsítio I. O subsítio II compreende os resíduos Thr88, Ala89, Trp159, Ile232, Asn233, Ser236, Ser238, Asn241, Asn244, Ser245, Asn246 e Arg280. Enquanto as interações no subsítio II são mediadas principalmente por interações hidrofóbicas, os átomos de oxigênio da carbonila na quarta porção MHET também se envolvem em interações polares com a cadeia principal de Ser236 e a cadeia lateral de Asn246. (7)

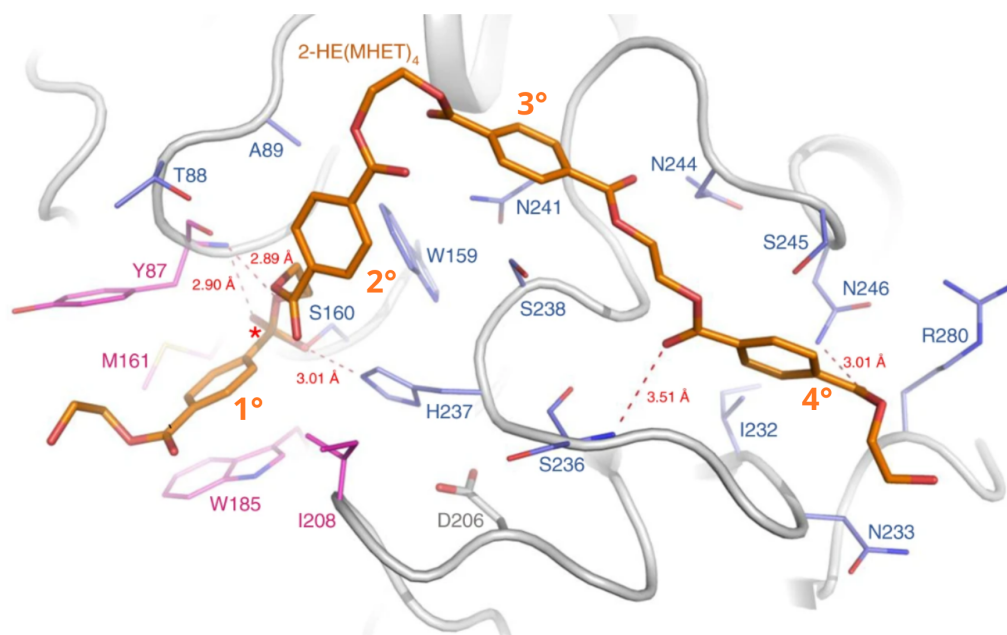


Figura 4 – A estrutura IsPETase é apresentada como um diagrama de cartoon na cor cinza. Os resíduos envolvidos na ligação de 2-HE(MHET)₄ são mostrados como um modelo de linha, e aqueles que constituem o subsítio I e o subsítio II são distinguidos com as cores magenta e azul claro, respectivamente, e a ligação éster que é clivada pela enzima é indicado com uma marca de estrela. O modelo de acoplamento 2-HE(MHET)₄ é mostrado como stick laranja. As pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos e o substrato são mostradas como linhas vermelhas.

Fonte: HAN *et al.* (7)

Desde a descoberta da isPETase, várias outras enzimas foram identificadas como enzimas do tipo PETase (ou PETase-like). Essas enzimas exibem características adicionais além dos subsítios mencionados anteriormente, incluindo a presença de pontes dissulfeto específicas e uma região de loop, que foram usadas para categorizá-las em três grupos: tipo I, tipo IIa e tipo IIb (figura 5). Apesar dessas diferenças, todas as PETases conhecidas compartilham resíduos conservados que formam a tríade catalítica (Ser, His e Asp), indicando um mecanismo catalítico comum entre essas enzimas. Além disso, os resíduos que compreendem o subsítio I são altamente conservados em todas as PETases, sugerindo um modo semelhante à ligação da primeira porção MHET ao subsítio I entre essas enzimas (figura 4) (7).

Nas PETases tipo I, não há pontes dissulfeto adicionais e a região do loop estendido é semelhante à encontrada nas tipo II, com uma redução no número de resíduos (figura 5). Além disso, todas as enzimas deste grupo contêm His e Phe/Tyr nas posições correspondentes a triptofano W159 e serina S238 na IsPETase (tipo IIb), respectivamente. É sugerido que esses resíduos (em IsPETase) estreitam e aprofundam o subsítio II em comparação com as PETases tipo I ou IIa, permitindo melhor acessibilidade do segundo

Resíduos em IsPETase	Triáde Catalítica			Subsítio I				Subsítio II					Loop estendido					Ponte dissulfeto adicional			
	S160	H237	D206	Y87	Q119	M161	W185	T88	A89	W159	S238	N241	S242	G243	N244	S245	N246	Q247	C203	C239	
Tipo I	S	H	D	Y _F	Q _Y	M	W	TL	A _G	H	F	N _Q	TS _L	LMF	SPVYIAE	N _D	-	-	-	GA	FA
Tipo IIa	S	H	D	Y _F	Q	M	W	VL	S _L	W	FY	N	G _{TSD}	G _D	Y _{GNS}	FSTIFLA	N _{YIS}	NED _G	C	C	
Tipo IIb	S	H	D	Y _F	Q	M	W	T	A	W	S _T	N	S _T	G	N	S	N	Q _A	C	C	

Figura 5 – Sequência de aminoácidos de resíduos-chave em enzimas de degradação de PET. Os principais resíduos envolvidos na catálise enzimática, a constituição do subsítio I e subsítio II, o loop estendido e a ligação dissulfeto adicional no alinhamento da IsPETase.

Fonte: HAN *et al.* (7)

MHET ao subsítio de ligação.

Estudos experimentais envolvendo mutação dessas regiões têm corroborado essa hipótese, mostrando uma redução significativa na atividade de hidrólise de PET e BHET, quando os resíduos correspondentes aos grupos I ou IIa são adicionados em IsPETase. (7) Apesar do progresso na compreensão das enzimas semelhantes à PETase, ainda há muito a ser aprendido, especialmente no que diz respeito às enzimas que se desviam das categorias conhecidas.

1.3 Expressão heteróloga

Expressão heteróloga refere-se à expressão de um gene ou de um fragmento de um gene em um organismo hospedeiro que não o possui naturalmente. Avanços recentes em genética, clonagem e diferentes técnicas de biologia molecular permitiram aos pesquisadores expressar proteínas heterólogas em vários sistemas biológicos, como células de insetos, mamíferos, leveduras e bactérias. A capacidade de produzir proteínas recombinantes oferece uma ferramenta poderosa para aplicações relativas à pesquisa científica. Em menor escala, a superexpressão de proteínas pode facilitar estudos que visam desvendar a função da proteína, enquanto em escala maior é crucial para a produção de enzimas, vacinas e outras moléculas bioativas, garantindo sua eficácia e disponibilidade.

Dentre os diferentes tipos de sistemas de expressão heteróloga, a mais utilizada segue sendo a expressão em bactéria, em particular utilizando diversas cepas de *Escherichia coli* (8), por sua taxa de crescimento rápido (20-30 minutos) e custo relativamente baixo.

A técnica consiste na produção e inserção de um vetor de expressão, um plasmídeo modificado que contém sequências de DNA necessárias para a clonagem e expressão do gene de interesse (figura 6).

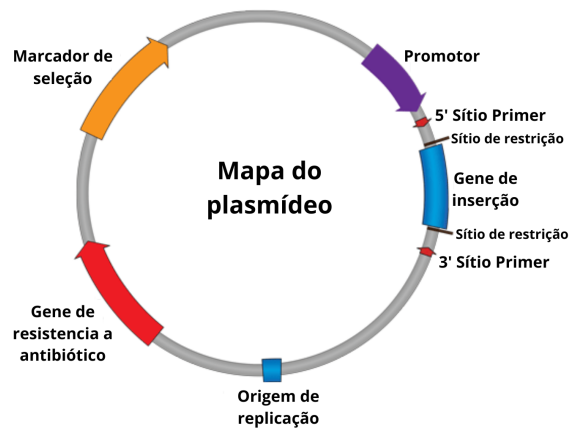


Figura 6 – Representação de um mapa de plasmídeo simplificado.
Fonte: MORGAN. (9)

Os vetores de expressão usualmente são formados por uma origem de replicação, promotor, uma sequência codificadora, uma região de terminação, marcador de seleção, sítio de clonagem e elementos de regulação onde a origem de replicação é uma sequência de DNA que permite a replicação autônoma do plasmídeo dentro da célula bacteriana. O promotor é responsável por iniciar a transcrição, ou seja, a síntese do RNA a partir do DNA. A sequência codificadora do gene de interesse é o segmento de DNA que contém a informação para a produção da proteína desejada. A região de terminação se trata de uma sequência de DNA que marca o final da transcrição do gene de interesse. Os marcadores de seleção são genes introduzidos de maneira a conferir uma característica adequada a seleção artificial. E por fim os sítios de clonagem que são sequências de DNA onde o gene de interesse pode ser inserido no vetor de expressão, onde este contém sequências de nucleotídeos reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição específicas que permitem a inserção do gene de interesse de forma precisa.

1.4 Solubilização da Proteína

Com o plasmídeo construído e inserido na célula de interesse, a expressão então pode ser iniciada a partir de um indutor. Porém com a superexpressão de proteínas um dos primeiros desafios começa na solubilização da mesma. Após a expressão, usualmente diferentes técnicas de lise podem ser empregadas para quebrar a parede celular e expor as proteínas em seu interior. Todavia em muitos dos casos, boa parte, ou mesmo todas as proteínas recombinantes podem formar corpos de inclusão, devido a um folding inadequado formando agregados insolúveis. A formação de corpos de inclusão pode ser indesejada em algumas aplicações de expressão heteróloga, pois os agregados insolúveis podem dificultar a recuperação e purificação das proteínas no seu estado nativo.

1.4.1 Uso de chaperonas

Uma das estratégias possíveis para auxiliar na solubilização de proteínas recombinantes é a utilização de chaperonas, uma classe de proteínas que desempenham um papel crítico no enovelamento de proteínas. Proteínas não enoveladas usualmente possuem resíduos hidrofóbicos, que são expostos à solução celular, essas regiões expostas são muitas vezes responsáveis pela formação dos corpos de inclusão. As chaperonas moleculares são capazes de se ligar a resíduos hidrofóbicos de proteínas desenoveladas e as ajudam a chegar no enovelamento correto (figura 7) (10). A síntese das chaperonas, muitas vezes respondem a certas condições de estresse, podendo algumas ser induzidas através de choque térmico, entre outros fatores, sendo esta classe chamada de chaperonas de choque térmico (Hsp) (11). Embora a indução por choque térmico tenha sido amplamente utilizada, a co-expressão de chaperonas a partir de cepas específicas ou a inserção de plasmídeos adicionais tem se mostrado uma abordagem altamente eficiente para aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes. Isso permite um maior controle sobre o processo, permitindo a escolha de chaperonas específicas e ajuste fino das condições de expressão para otimizar a solubilização de proteína alvo.(12)

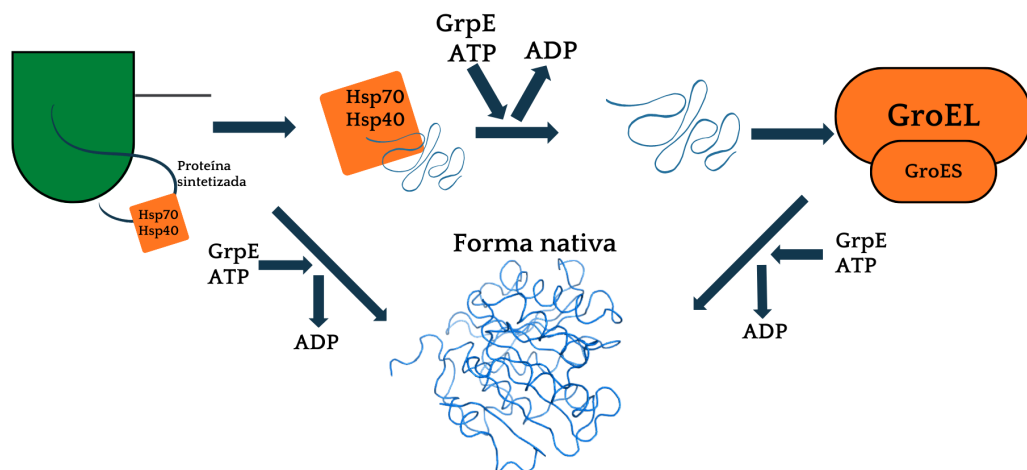


Figura 7 – Esquema simplificado do enovelamento guiado pelas chaperonas HSP40, HSP70, GroEL e GroES. Durante a síntese, as regiões hidrofóbicas da proteína podem permanecer expostas. Nesse momento, as chaperonas HSP70 e HSP40 podem interagir com a proteína desenovelada, auxiliando em seu correto enovelamento para a forma nativa. A hidrólise de ATP para ADP induz uma mudança conformacional no complexo chaperônico, resultando na liberação da proteína alvo. Caso a proteína não tenha alcançado sua conformação nativa, o processo pode ser repetido com a ajuda das chaperonas GroEL e GroES.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.2 Pontes dissulfeto

Ao tentar produzir proteínas heterólogas em diferentes organismos, muitas vezes são necessárias otimizações, seja no gene de expressão para a utilização de códons já

presentes na célula de expressão ou adicionando códons extras na própria cepa. Todavia, isso pode não ser suficiente, principalmente considerando que o interior das células podem ser muito distintos. No caso de proteínas que necessitam da formação de pontes dissulfeto durante seu enovelamento, por exemplo, existe alta probabilidade da mesma se tornar insolúvel em *Escherichia coli*, já que em condições fisiológicas, o citoplasma é mantido em um estado reduzido (13). Isso se dá principalmente devido a um ciclo de redução operado pelas enzimas tioredoxina e glutatona redutase (figura 8).

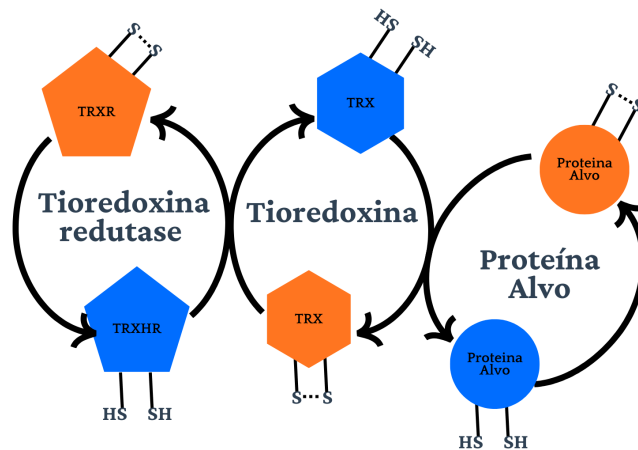


Figura 8 – Ciclo de redução simplificado de tioredoxina redutase.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como forma de superar o desafio de expressar proteínas dependentes de pontes dissulfeto em *E. Coli*, diferentes cepas foram criadas com mutações nos genes responsáveis pela síntese das enzimas redutoras. Assim, ao tornar o ambiente citoplasmático da bactéria suficientemente oxidativo, foi observado um aumento considerável produção de proteínas solúveis, devido a formação eficiente de pontes dissulfeto nativas. (14)

1.5 Purificação

1.5.1 Cromatografia por afinidade

Quando todo o processo de expressão e solubilização é bem sucedido, o próximo passo, usualmente, é o isolamento da proteína alvo via diferentes técnicas de purificação. No caso de proteínas heterólogas, um passo inicial comum é a utilização de técnicas de cromatografia por afinidade. Nessa técnica de purificação quando a proteína não possui uma afinidade natural a ser explorada, a mesma pode ser marcada com uma tag, como uma proteína de fusão ou uma cauda carregada, que podem ser adicionadas no gene de expressão. A tag de afinidade é então utilizada para purificação da proteína alvo em uma coluna de cromatografia, onde a proteína se liga à resina de afinidade, enquanto as impurezas são lavadas. Em seguida, a proteína alvo é eluída adicionando algum competidor ou algum reagente que muda as condições de eluição (figura 9).

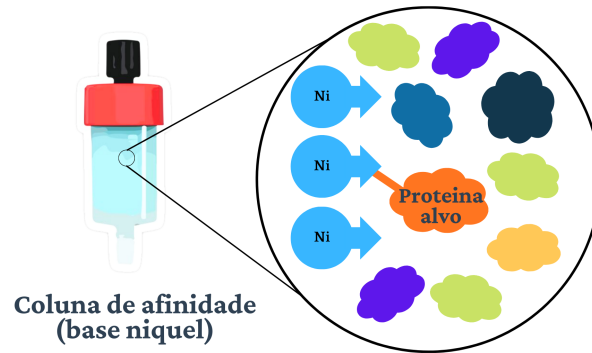


Figura 9 – Esquema de purificação utilizando uma coluna cromatográfica de afinidade a metal (IMAC) com fase estacionária a base de níquel.
Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5.2 Cromatografia de exclusão molecular

Outra técnica amplamente utilizada para purificação de proteínas é a cromatografia de exclusão molecular (SEC), também conhecida como cromatografia de gel filtração. Em SEC a amostra contendo uma mistura de proteínas é carregada no topo da mesma, em seguida, uma fase móvel é passada pela coluna, por gravidade ou uma aplicação de pressão. A fase móvel então carrega a amostra pela coluna, que é preenchida por grânulos porosos ou de gel que possuem uma variedade de tamanhos de poros. Assim as proteínas maiores, que não conseguem entrar nos poros, eluem primeiro, pois percorrem um caminho mais curto. As menores, por sua vez, podem entrar nos poros, percorrendo um caminho mais longo (figura 10). Assim as proteínas são separadas com base no seu tamanho, ou peso molecular (MW).

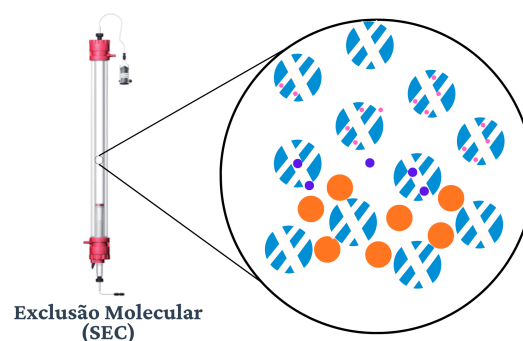


Figura 10 – Esquema simplificado de purificação utilizando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular. Moléculas maiores (laranja) passem mais rapidamente pela coluna comparadas com moléculas de tamanho intermediário (roxo) ou menores (rosa).
Fonte: Elaborada pelo autor

1.5.3 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia por troca iônica é outra das técnicas utilizadas para purificação. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é uma resina carregada, seja negativamente (troca catiônica) ou positivamente (troca aniônica). A amostra contendo a mistura de proteínas é aplicada na coluna, e em seguida uma fase móvel. Assim as proteínas interagem com a resina de forma com que as mais carregadas (opostas a carga da resina) se ligam mais fortemente. A eluição das proteínas da coluna é geralmente realizada por meio de uma mudança nas condições da fase móvel, como a alteração do pH ou da força iônica. Isso permite interromper as interações eletrostáticas entre as proteínas e a fase estacionária, permitindo que as proteínas sejam eluídas (figura 11).

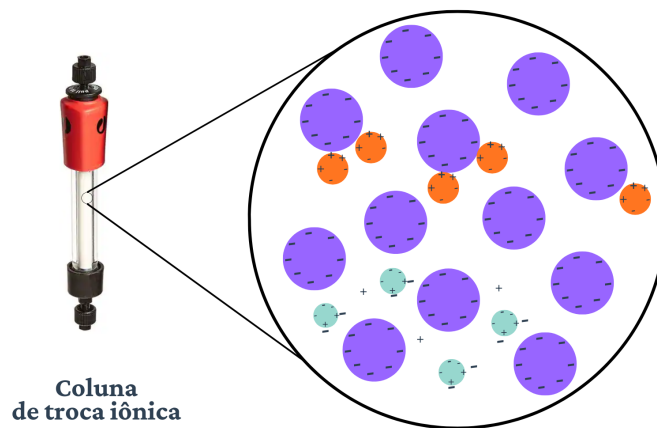


Figura 11 – Esquema de purificação utilizando uma coluna cromatografica de troca ionica, superficies mais carregadas (em laranja) interagem mais fortemente em relação as menos carregadas (cinza).

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5.4 Purificação de chaperonas

Além dos métodos tradicionais de purificação, muitas vezes é necessário um ajuste mais fino das condições. Particularmente quando sua proteína alvo interage com outras proteínas, formando complexos. Assim, além de agentes desnaturantes, outras moléculas como ATP podem ser utilizados para remoção de chaperonas, proteínas que comumente formam complexos com proteínas heterólogas expressas. Muitas HSPs são caracterizadas por serem dependentes da hidrólise de ATP para auxiliar o enovelamento de proteínas, e a utilização do mesmo já foi aplicado com sucesso na remoção de chaperonas no processo de purificação. (15)

1.6 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é o dicroísmo envolvendo uma luz circularmente polarizada, ou seja, um fenômeno fundamentado pela diferença de absorção de uma luz polarizada circularmente de mão direita e de mão esquerda (16). Uma onda eletromagnética polarizada circularmente é composta por ondas verticalmente e horizontalmente polarizadas de mesma amplitude, separadas por uma fase de $\pm\frac{\pi}{2}$. Onde o sinal da fase dita a orientação da polarização circular (figura 12).

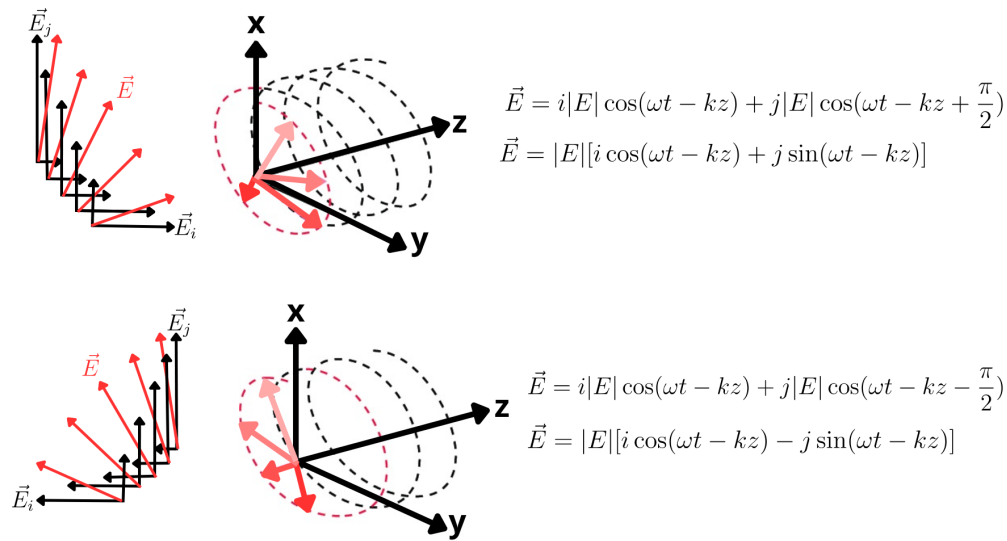


Figura 12 – Formação de ondas circularmente polarizada de mão direita e esquerda a partir da combinação de ondas horizontalmente e verticalmente polarizadas de mesma amplitude.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Naturalmente, ao combinar duas ondas circularmente polarizadas, de mão direita e esquerda, no vácuo a onda resultante é polarizada verticalmente:

$$E = |E|[i \cos(\omega t - kz) + j \sin(\omega t - kz)] + |E|[i \cos(\omega t - kz) - j \sin(\omega t - kz)] \quad (1.1)$$

$$E = 2|E|i \cos(\omega t - kz) \quad (1.2)$$

Todavia, se a mesma combinação ocorre em um meio onde a absorção da luz circularmente polarizada, de mão direita e esquerda são absorvidas em intensidades diferentes as componentes horizontais não se cancelam. Desta forma a onda é polarizada elipticamente. Assim, a partir da elipsidade da onda polarizada, pode-se saber o grau de dicroísmo circular que o material induz.

$$E = |E_1|[i \cos(\omega t - kz) + j \sin(\omega t - kz)] + |E_2|[i \cos(\omega t - kz) - j \sin(\omega t - kz)] \quad (1.3)$$

$$E = i|E_1 + E_2| \cos(\omega t - kz) + j|E_1 - E_2| \sin(\omega t - kz) \quad (1.4)$$

O dicroísmo circular é uma manifestação da atividade óptica exibida em moléculas quirais. Como consequência, proteínas compostas principalmente por aminoácidos levógiros podem apresentar atividade de dicroísmo circular. Ainda mais importante é que uma estrutura secundária também transmitirá um CD distinto (figura 13). Assim o sinal de dicroísmo circular será distinto para diferentes estruturas secundárias, podendo ser utilizado para estimar a fração de uma molécula que está na conformação de alfa-hélice, folha beta, volta beta ou alguma outra.

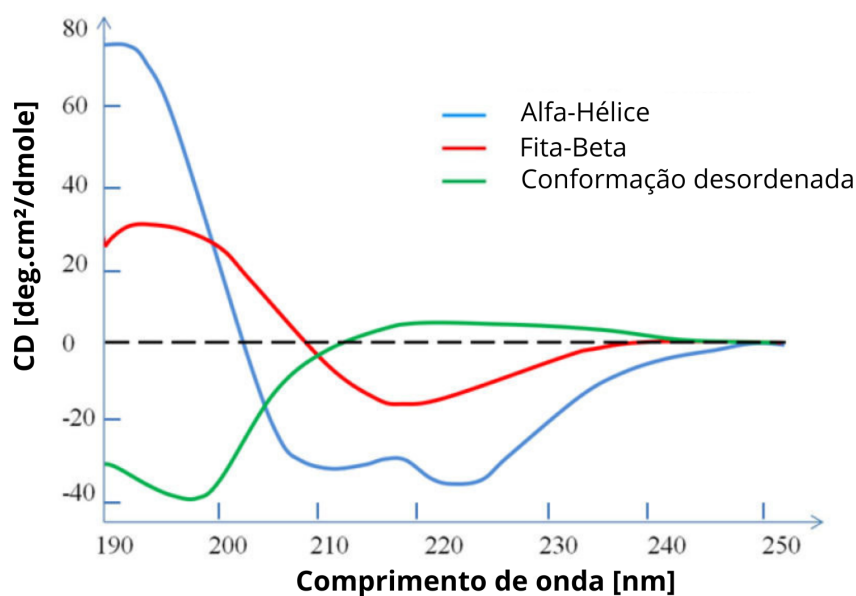


Figura 13 – Espectro de CD para diferentes estruturas secundárias. Em azul temos o espectro de dicroísmo de Alfa-hélices, em vermelho de Fitas-Beta e em verde de regiões desordenadas.

Fonte: WEI; THYPARAMBIL; LATOUR. (17)

1.7 Cristalografia de proteínas

A técnica de cristalização de proteínas teve início no início do século XX com a obtenção dos primeiros cristais de hemoglobina e urease.(18) Inicialmente, o principal objetivo da cristalização era o processo de purificação de proteínas. Em 1934, foram registradas as primeiras fotografias de difração de raios X da enzima pepsina (19), o que deu origem à aplicação da cristalografia de raios X no estudo de macromoléculas biológicas.

A cristalização de macromoléculas em solução é um fenômeno de equilíbrio reversível que possui parâmetros termodinâmicos e cinéticos específicos dependendo das propriedades

físicas e químicas do solvente e do soluto. Em condições de supersaturação, onde a concentração do soluto excede sua concentração de saturação, o sistema é dirigido a um estado de equilíbrio no qual a proteína é separada entre uma fase sólida e uma solúvel. Embora haja uma redução na entropia do sistema, as interações químicas estáveis formadas entre as moléculas reduzem a energia potencial do sistema, impulsionando o processo de ordenamento das moléculas em uma rede cristalina(20) (figura 14).

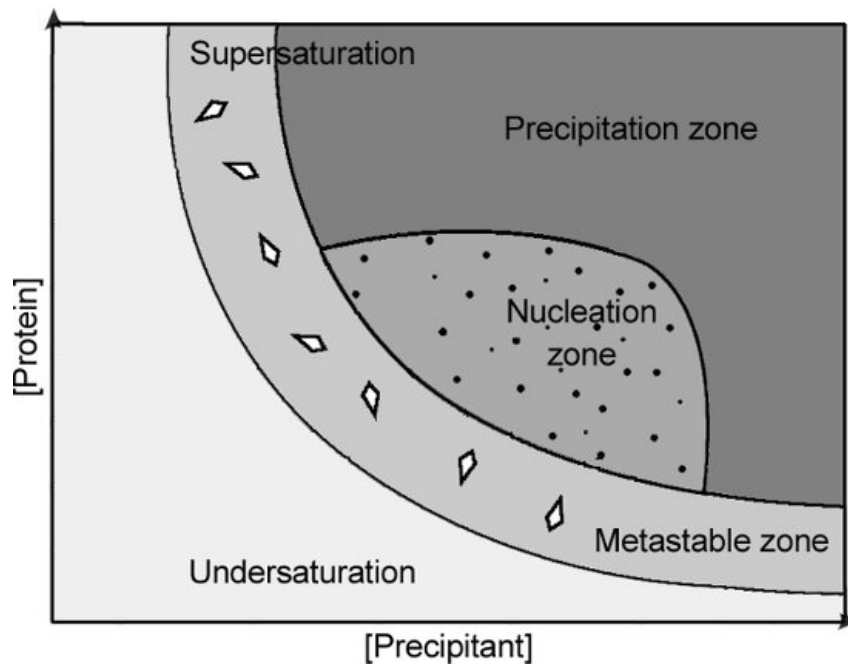


Figura 14 – . Os cristais só podem se formar quando a proteína está supersaturada. A nucleação ocorre na zona de nucleação e o crescimento do cristal na zona metaestável. Quando uma proteína é subsaturada, a gota permanecerá clara. Fonte: PICHLO *et al.* (21)

Existem várias técnicas utilizadas para promover o processo de formação de cristais, entre elas: cristalização em membrana, em gel, por difusão de líquidos, por difusão de vapor, entre outras. Neste trabalho, nos focamos na técnica de difusão em vapor, mais especificamente na variação denominada "cristalização por difusão de vapor em gota sentada".

1.7.1 Cristalização por difusão de vapor em gota sentada

A técnica de difusão por vapor em gota sentada é amplamente utilizada na cristalização de macromoléculas. Consiste basicamente em uma gota composta por uma mistura da amostra alvo com o precipitante, que é colocada em equilíbrio de vapor com um reservatório líquido contendo o precipitante. Normalmente, a gota contém uma concentração menor de precipitante em comparação ao reservatório, e para alcançar o equilíbrio, o vapor de água deixa a gota e migra para o reservatório. Ao longo desse processo, a amostra sofre

um aumento na supersaturação relativa, e o equilíbrio é alcançado quando a concentração do precipitante na gota é aproximadamente a mesma do reservatório (figura 15).

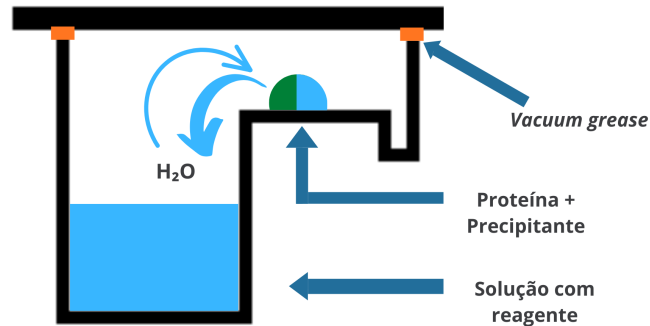


Figura 15 – Esquema da técnica de cristalização por difusão de vapor em gota sentada.
Fonte: Elaborada pelo autor

1.7.2 Difração de Raios X

A determinação da estrutura de uma macromolécula a partir de um cristal é frequentemente realizada por meio da técnica de difração de raios X. Quando os raios X atingem um átomo, ocorre uma interação com os elétrons ao redor do núcleo atômico, levando esses elétrons oscilarem com a mesma frequência da onda incidente. Os elétrons assim emitem uma nova onda com a mesma energia da onda original, processo conhecido como espalhamento elástico.

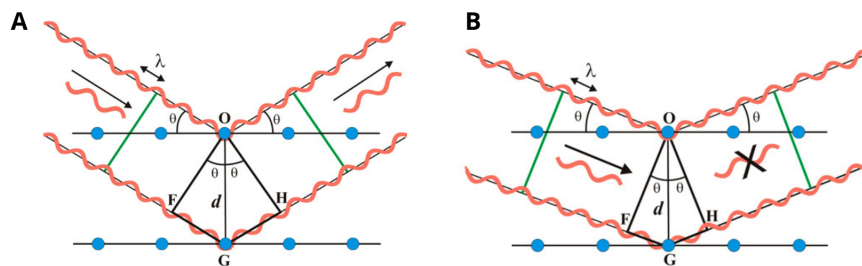


Figura 16 – Interferência entre raios X a nível planar. (A) Ondas emitidas a um ângulo específico onde a onda espalhada possui a mesma fase, assim a interferência entre elas é construtiva. (B) Ondas emitidas a um ângulo onde a onda espalhada possui uma diferente fase, causando interferência destrutiva.
Fonte: PERUTZ. (22)

Em um cristal, átomos ou moléculas formam uma rede com distâncias bem definidas entre eles. Quando os planos dessa rede cristalina são expostos a um feixe de raios X, os raios X são espalhados por esse arranjo regular. Em ângulos específicos, nos quais as ondas espalhadas pelos átomos desses planos interferem construtivamente ocorre uma amplificação desse sinal, esse fenômeno é chamado de difração (figura 16). Naturalmente a ocorrência

de uma interferência destrutiva, ocorrerá quando as ondas estiverem em fase, situação que só acontecerá se a diferença de caminho percorrido pelas frentes de onda corresponde a um número inteiro de comprimentos de onda, desta relação se deriva a lei de Bragg.

$$FG + GH = n \cdot \lambda \quad (1.5)$$

$$FG = GH \cdot \lambda \quad (1.6)$$

$$\sin \theta = \frac{FG}{d} \quad (1.7)$$

logo:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (1.8)$$

Utilizando do padrão de difração de raios X obtido de um cristal, é possível aplicar técnicas matemáticas e algoritmos para determinar a distribuição tridimensional dos átomos no cristal. Essa informação é essencial para a obtenção da estrutura e as propriedades da molécula a ser estudada.

1.8 Objetivos

1.8.1 Principal

O objetivo principal deste trabalho é determinar e avaliar as estruturas cristalográficas de 12 enzimas com potencial de degradação de PET provenientes de organismos antárticos. Destas, 10 são de um projeto metagenômico (MetaG1, MetaG2, MetaG3, MetaG4CBM, MetaG5, MetaG6, MetaG7, MetaG8, MetaG9, MetaG10), uma variação de MetaG4CBM sem o domínio de ligação CBM (descrita como MetaG4) e uma cutinase já descrita bioquimicamente, mas sem estrutura resolvida (Mors1, cujo protocolo de purificação foi desenvolvido por Jhon Antoni Vargas Santillan). Além disso, visa realizar a caracterização biofísica dessas proteínas e conduzir ensaios de atividade enzimática.

1.8.2 Especificos

- Desenvolver o protocolo de expressão e solubilização das 11 enzimas MetaG's
- Desenvolver o protocolo de purificação das 11 enzimas MetaG's
- Avaliar parâmetros biofísicos das enzimas recombinantes, a partir de CD e SEC-MALS
- Cristalizar as enzimas recombinantes e determinar as suas estruturas por difração de raios-X.
- Utilizar as informações estruturais obtidas para um melhor entendimento do funcionamento de cada enzima

2 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho é composta por diferentes etapas, que abrangem desde a transformação e expressão das proteínas até a análise dos resultados obtidos (figura 17). Cada etapa foi separada em temas e subtemas, com o intuito de fornecer uma compreensão clara da motivação por trás de cada parte e apresentar os protocolos específicos utilizados em cada experimento.

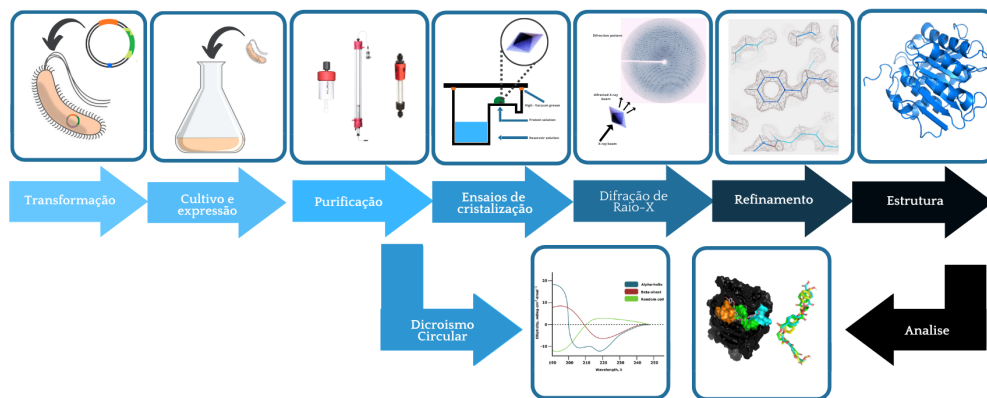


Figura 17 – Esquema dos passos utilizados, desde a transformação a análise dos dados, após purificação ensaios biofísicos foram realizados em paralelo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1 Construção dos Plasmídeos

Genes sintéticos codificantes para cada uma das enzimas metagenômicas de interesse (10 genes; enzimas MetaG1-MetaG10) assim como para Mors1, com otimização do uso de códons para expressão em *Escherichia coli*, foram adquiridos comercialmente (Genscript, Piscataway, NJ, EUA). Os genes foram inseridos em um vetor pET28a-TEV entre os sítios de restrição NdeI e BamHI. A inserção de cada gene sintético nesses vetores adiciona uma tag de 6 histidinas (HisTag) a cada enzima em sua região amino terminal, permitindo assim sua purificação por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) (Sequências no Anexo A).

2.2 Métodos de transformação, expressão e solubilização

Um dos primeiros desafios enfrentados durante o trabalho em questão foi a solubilização e purificação das 12 proteínas envolvidas no projeto. Com intuito de superar este desafio diversas estratégias foram utilizadas. Para as enzimas não solúveis em BL21 (DE3) a primeira das estratégias aplicadas foi a utilização da Origami-2 (DE3), uma cepa com

deficiência em tioredoxina e glutatona redutase, proteínas que fazem parte do ciclo de redução das pontes dissulfeto (esperadas nas estruturas das potenciais PETases).

Outra estratégia utilizada para a solubilização das proteínas expressas consiste na co-expressão de chaperonas que se ligam à proteína recombinante, reduzindo o mal enovelamento e aumentando a solubilidade. Assim, duas cepas diferentes foram utilizadas, a BL21 (DE3), insertada com plasmídeos do set TaKaRa de chaperonas. E por fim a cepa ArcticExpress (DE3) que utiliza chaperonas de um organismo antártico que mantém sua atividade em baixas temperaturas. No quadro 1, esta destacado as cepas utilizadas para cada enzima, assim como os antibióticos de seleção.

Quadro 1 – Antibióticos específicos para cada cepa e enzimas solubilizadas

Cepas	Antibióticos	Enzimas
BL21(DE3)+TaKaRa	Cloranfenicol (50 $\mu\text{l/ml}$)	G2, G6, G10
ArcticExpress(DE3)	Gentamicina (7 $\mu\text{l/ml}$) e Estreptomicina (50 $\mu\text{l/ml}$)	G5
BL21-Plyss(DE3)	Cloranfenicol (50 $\mu\text{l/ml}$)	G1, G3, G8
Origami-2 (DE3)	Estreptomicina (50 $\mu\text{l/ml}$), Tetraciclina (12,5 $\mu\text{l/ml}$)	G4, G4CBM, G7, G9, Mors1

Fonte: Elaborado pelo autor

Para realizar a transformação, o mesmo protocolo foi utilizado em todas as cepas. Onde os plasmídeos contendo os genes de interesse foram inseridos nas células quimio-competentes por transformação bacteriana através de choque térmico. As bactérias foram incubadas em placas contendo 20ml de meio LB-ágar suplementado com os antibióticos apropriados por 16 horas a 37°C. Para a seleção do plasmídeo pET28a-TEV utilizamos kanamicina a uma concentração de 34 $\mu\text{l/mL}$, enquanto para as cepas específicas foi utilizado os antibióticos destacados no quadro 1.

2.2.1 Protocolo expressão e solubilização em BL21(DE3) e Origami-2(DE3)

Após o crescimento das células transformadas, uma colônia foi isolada e inoculada em 5mL de meio LB contendo os antibióticos correspondentes, e incubada a 37°C com agitação de 90 rpm por 16 horas. O meio contendo as colônias foi então transferido para um Erlenmeyer contendo 1 L de meio LB com os antibióticos de resistência e incubada a 37°C com agitação de 150 rpm até atingir uma densidade ótica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) entre 0,6 e 0,8. Em sequencia foi feita a indução da expressão das proteínas recombinantes com 0,250 mM de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 16 horas a 17°C com agitação de 150 rpm. Com o fim do periodo de expressão as células foram coletadas por centrifugação a 4700g por 45 minutos a 4°C. Coletada, as células foram ressuspensas em 50 mL do tampão A (25 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) e submetida à sonicação com pulsos

de ultrassom de 14 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 59 segundos entre cada ciclo. Por fim foi realizado a separação da fração solúvel e insolúvel por centrifugação a 14.000 g por 30 minutos a 4°C.

2.2.2 Protocolo expressão e solubilização em ArcticExpress(DE3)

O protocolo para a cepa ArcticExpress foi semelhante ao anterior, com a diferença na temperatura de incubação, que foi de 30°C, e na temperatura e tempo de indução, que foram de 10°C por 24 horas. O tampão utilizado na lise para o caso da ArcticExpress foi o Tampão C, composto por 25 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e MgATP.

2.2.3 Protocolo expressão e solubilização em BL21+TaKara

Para a cepa TaKaRa, foram feitas algumas alterações no protocolo de indução e solubilização. Além dos antibióticos adicionados ao meio de 1L, foi utilizado também 0,5 mg/ml de L-arabinose para a indução prévia das chaperonas. A temperatura de expressão e indução foi de 37°C, sendo que a indução foi realizada por 3 horas. Assim como em ArcticExpress, o tampão utilizado para lise foi o C.

2.3 Purificação

O processo de purificação da proteína recombinante se deu principalmente a partir de três diferentes técnicas de cromatografia, afinidade a metal (IMAC), exclusão molecular (SEC) e quando necessário troca iônica. Além disso, algumas adaptações foram necessárias no caso de coexpressões de chaperonas e serão elucidados nos tópicos a seguir. Os tampões utilizados para todos os ensaios de purificação estão listados no quadro 2.

Quadro 2 – Tampões para purificação

Tampões	Composições
Tampão A	150 mM de NaCl, 25 mM de Tris/HCl e 20 mM de imidazol, (pH 7,5)
Tampão B	150 mM de NaCl, 25 mM de Tris/HCl e 500 mM de imidazol (pH 7,5)
Tampão C	150 mM de NaCl, 25 mM de Tris/HCl e 5mM de MgATP (pH 7,5)
Tampão D	150 mM de NaCl, 25 mM de Tris/HCl (pH 7,5)
Tampão E	25 mM de Tris/HCl (pH 7,5)
Tampão F	1 M de NaCl, 25 mM de Tris/HCl (pH 7,5)
Tampão G	150 mM de NaCl, 25 mM de Tris/HCl, 4mg/mL de leite em pó (fervido e centrifugado) e 5mM de MgATP (pH 7,5)

Fonte: Elaborado pelo autor

2.3.1 Protocolo de Purificação por afinidade a metal IMAC

A fração solúvel, após lise celular por sonicação, foi isolada por centrifugação a 14.500 g por 30 min a 4 °C. Em seguida, a fração solúvel foi carregada em uma coluna

HisTrap HP 5ml (Cytiva) conectado ao Akta Start (Cytiva), previamente equilibrado no tampão A. Posteriormente, a resina foi lavada com tampão A, até que o leitor de UV do Akta Start retornasse ao valor inicial. As proteínas foram eluídas usando um gradiente de imidazol de 20 a 500 mM (proveniente da mistura dos tampões A e B), onde a partir do software UNICORN a concentração de imidazol foi fixada do início ao final de cada pico (figura 18).

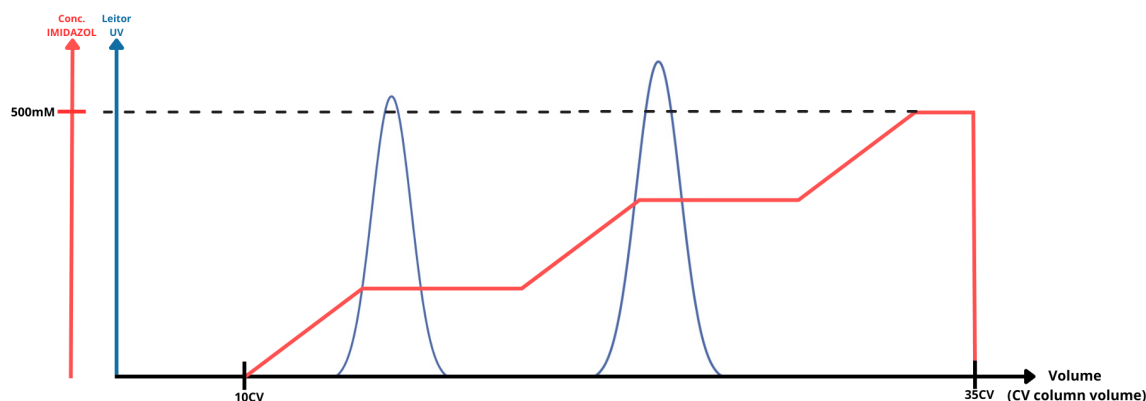


Figura 18 – Protocolo de purificação por afinidade utilizando HisTrap HP 5ml (Cytiva), o gradiente é fixado no começo de cada pico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.3.2 Protocolo de Purificação por exclusão molecular (SEC)

As eluições com maior grau de pureza, provenientes da cromatografia de afinidade, foram agrupadas e concentradas até 2 mL usando um concentrador Nanosep Ultra (PALL Corporation) com limite de peso molecular de 10 kDa. Após concentrada, a amostra foi injetada em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular, Superdex 200 XK-16 (GE Healthcare), conectada no AKTA Start e pré-equilibrada em tampão D. As frações referentes aos picos de absorvância foram coletados e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

2.3.3 Protocolo de Purificação por troca iônica

Para as amostras onde a purificação por exclusão molecular não foi eficiente (MetaG1 e MetaG3 como será descrito em resultados) foi realizado a cromatografia por troca iônica, onde a coluna escolhida foi a MonoQ (Cytiva). O primeiro passo foi retirar o NaCl utilizando uma Dessalting HP (Cytiva), onde a proteína foi injetada (na coluna previamente equilibrada com tampão E) e eluída com tampão E. Com a amostra preparada, a mesma foi em fim injetada na MonoQ(Cytiva) conectada no AKTA-Pure(Cytiva), onde as proteínas foram eluídas usando um gradiente de NaCl de 20 a 500 mM (proveniente da mistura dos tampões E e F). A partir do software UNICORN a concentração de sal foi

fixada do início ao final de cada pico e as frações foram coletados para análise de pureza com SDS-PAGE.

2.3.4 Remoção de chaperonas em purificação por afinidade a metal (IMAC)

Embora a estratégia de coexpressar chaperonas seja bem sucedida em muitos casos na solubilização de proteínas recombinantes, é comum que as chaperonas formem um complexo com a proteína alvo. Este tipo de interação pode acarretar em uma dificuldade a mais no processo de purificação, muitas vezes sendo copurificada durante os três passos principais de purificação (IMAC, SEC e troca iônica). Para superar esse desafio, foi necessário realizar modificações na estratégia de purificação. Uma dessas modificações foi a inclusão de ATP durante o processo de lise, molécula comumente utilizada por muitas HSPs no processo de auxílio no enovelamento de proteínas. Além disso, utilizou-se proteínas desnoveladas provenientes do leite em pó (em um tampão contendo ATP) para competir com a proteína alvo pelas chaperonas, enquanto a mesma permanecia retida na coluna de cromatografia (figura 19). Essa abordagem foi utilizada para MetaG5 e MetaG6.

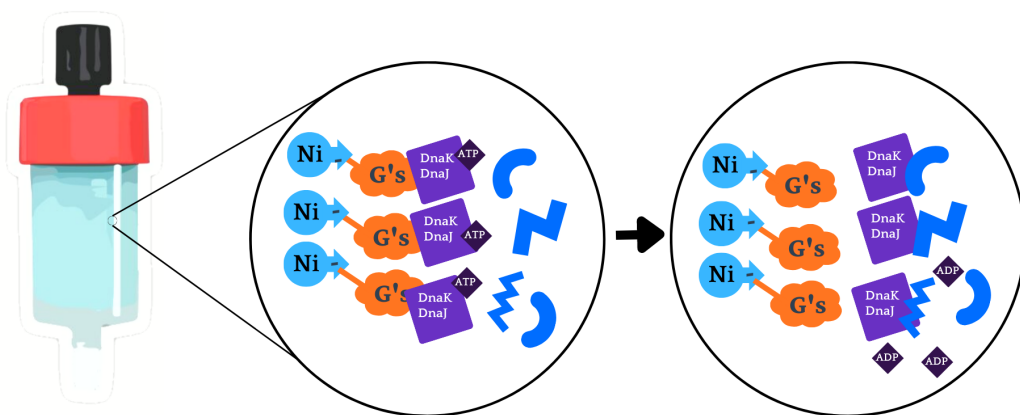


Figura 19 – Esquema demonstrando a remoção das chaperonas complexadas com as proteínas alvo. Em azul claro, temos o níquel (Ni) imobilizado interagindo com as proteínas-alvo "G's" em laranja, que estão complexadas com as chaperonas DnaK e DnaJ. Ao adicionar ATP e proteínas desnaturadas, a chaperona se desconecta da proteína alvo e se liga às proteínas desnoveladas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim o protocolo ficou similar ao da seção 2.3.1. Onde após lise celular por sonicação, dessa vez feita com tampão C, a parte solúvel foi isolada por centrifugação a 14.000 g por 30 min a 4 °C. Em seguida, a fração solúvel foi carregada em uma coluna HisTrap HP 5ml (Cytiva) conectado ao Akta Start (Cytiva), previamente equilibrado no tampão A. Em sequência a resina foi lavada três vezes, primeiro com o tampão A, até que o leitor de UV do Akta Start retornasse ao valor inicial, em sequência com tampão G, e por fim uma última lavagem com tampão A. Finalmente as proteínas foram eluídas usando um gradiente de imidazol de 20 a 500 mM (proveniente da mistura dos tampões A

e B), onde a partir do software UNICORN a concentração de imidazol foi fixada do início ao final de cada pico. Observação: O tampão G foi preparado a partir de uma solução de leite em pó que foi fervido e centrifugado, o sobrenadante foi separado e resfriado, sendo utilizado como base para a preparação do tampão.

2.4 Refolding

Em paralelo a tentativas de solubilização e purificação da parte solúvel, foi desenvolvido também um protocolo de refolding, com intuito de recuperar a parte insolúvel das proteínas expressas (bem sucedido em recuperar a enzima MetaG9 ativa).

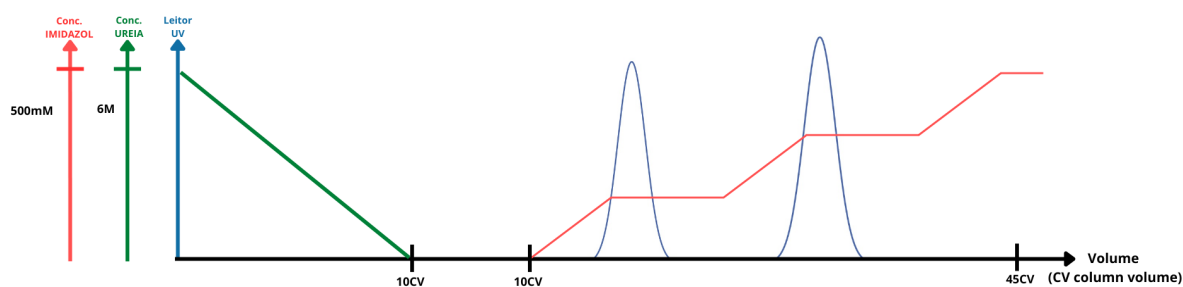


Figura 20 – Esquema utilizado para refolding na coluna HisTrapHP 5ml(Cytiva).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a expressão, e lise, conforme descrito nos protocolos anteriores a amostra foi centrifugada a 14.000 g. Em sequência, o pelet (fração insolúvel) foi separado e ressuscitado em ureia 2 M, Tris-HCl 25 mM, NaCl 0,5 M, Triton™ X-100 2% pH 8.0 e entrão centrifugado a 14.000 g. O novo pelet resultante da segunda centrifugação foi lavado novamente com uma variação do tampão anterior, porem com ausencia do Triton™ X-100 e ureia onde finalmente fração insolúvel é separada em uma terceira centrifugação. A ressuspensão do pelet lavado é feito com o tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 0,5 M, cloridrato de guanidina 6 M, 2-mercaptoetanol 1 mM (pH 8.0) e uma nova centrifugação a 14.000 g é realizada. O sobrenadante resultante da ultima centrifugação é então injetada na coluna HisTrapHP 5ml(Cytiva) previamente equilibrada com o mesmo buffer de ressuspensão. Com a amostra injetada, lavamos a coluna com um buffer similar ao anterior, trocando cloridrato de guanidina por ureia, iniciamos um gradiente decrescente misturando o buffer com e sem ureia, onde a contagem de ureia foi zerada em 10 volumes de coluna (figura 20). Em seguida, a purificação prosseguiu através de um gradiente ascendente de imidazol, seguindo o mesmo método descrito para a purificação por afinidade.

2.5 Ensaios de atividade

2.5.1 Teste de atividade esterásica

Durante o trabalho, diversos ensaios enzimáticos foram realizados utilizando substratos que simulam o polímero PET. O mais utilizado e também o mais simples foi com o PNPA (p-nitrofenil acetato) com o intuito de testar atividade esterásica das enzimas (um ensaio meramente qualitativo). Nele adicionamos 200 μ l de um tampão de Fosfato de Sódio 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0 a dois tubos transparentes. Em um dos tubos, adicionamos nossa proteína (com uma concentração final variada, geralmente $>0,01$ mg/ml). Em seguida, adicionamos 5 μ l de uma solução concentrada de PNPA (200 mM) diluída em etanol nos dois tubos. Conforme ocorre a clivagem da ligação éster do PNPA, nossa solução fica mais amarela, indicando atividade. É importante destacar que a mudança de cor também é observada no tubo sem proteína (hidrólise espontânea em água), no entanto, é possível notar uma diferença significativa no tempo de coloração.

2.5.2 Ensaios com PCL

Nos ensaios enzimáticos com policaprolactona (PCL), um poliéster que pode avaliar a atividade esterástica em polímeros, a concentração de substrato foi mantida constante, variando a concentração de enzima adicionada. Os ensaios foram realizados a 30°C em uma mistura de reação contendo 125mM de fosfato de sódio, 200mM de NaCl pH 8,0 e 1 mg/ml de nanopartículas de PCL. A concentração inicial de proteína foi de 0,7 mg/ml, e o volume variou utilizado entre 0,5 a 10ul (para um volume final do ensaio de 200ul). Os ensaios foram realizados em triplicata usando microplacas de 96 poços, medindo a mudança na turbidez em OD600 em intervalos de 10 segundos para um tempo de reação total de 10 minutos com um leitor de microplacas multimodo Synergy HTX (Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EUA).

2.5.3 Ensaios com BHET

De forma similar ao ensaio descrito anteriormente, com BHET, a concentração de substrato também foi mantida constante. Os ensaios foram realizados a 25°C em uma mistura de reação contendo 25mM de fosfato de sódio, 50mM de NaCl pH 8,0 e 10,5mg/ml de BHET. Para a preparação, o BHET(Sigma-Aldrich) foi misturado com o tampão até uma concentração final de 10,5mg/ml e então submetida à sonicação com pulsos de ultrassom de 7 ciclos de 30 segundos. A concentração inicial de proteína foi de 2,1mg/ml, e o volume variou utilizado entre 1,0 a 5,0ul (volume final 200ul). Os ensaios foram realizados em triplicata usando microplacas de 96 poços, medindo a mudança na turbidez em OD600 em intervalos de 2 minutos e ressuspendendo a amostra a cada medida, para um tempo de reação total de até 20 minutos com um leitor de microplacas multímmodo (SPECTRAMAX-Plus).

2.6 Alinhamento Múltiplo das Sequências

As sequências de aminoácidos de LCC, IsPETase, VgCUT, Mors1, e MetaG's foram salvas no formato FASTA e alinhadas utilizando Clustal Omega (23) disponibilizado no site <https://www.ebi.ac.uk/>. Posteriormente, o alinhamento gerado foi visualizado em um programa online ESPript3 (24).

2.7 Docking Molecular

O docking molecular flexível do intermediário tetraédrico de BHET e um fragmento de PET para estruturas IsPETase, Mors1, MetaG's foi realizado a partir do software AutoDock Vina. O ligante foi construído utilizando a ferramenta "Polimer Builder" (25) presente na interface gráfica web para CHARMM (26) e preparado pelo Chimera (27). As estruturas das proteínas foram sobrepostas em um alinhamento 3D e caixa da grade foi centralizada em x: -0,43, y: -14,30 e z: -10,52 com tamanhos de 18,72, 14,73 e 25,02Å respectivamente.

2.8 Dicroísmo Circular

Com o intuito de analisar as propriedades das proteínas estudadas em solução com diferentes temperaturas, empregou-se a técnica de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD). Os espectros CD foram registrados utilizando um espectropolarímetro J-815 (JASCO, Corporation, Tóquio-Japão). O intervalo de comprimento de onda de UV distante (Far/UV) das amostras foi monitorado entre 200 e 280 nm, com resolução de 0,2 nm, numa cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. O sistema de variação térmica Peltier foi acoplado, com uma taxa de variação de 50 nm/min. As proteínas foram utilizadas em concentrações de 0,200 mg/mL em tampão fosfato de sódio-Na 25 mM, contendo NaCl 50 mM e pH 7,5. A temperatura de transição média (T_m) entre o estado enovelado e desenovelado das proteínas foi determinada por um gradiente de temperatura de 4 a 94°C, medido em intervalos de 0,5°C/min. A curva de melting foi gerada pela mudança do sinal de CD em função da temperatura usando o comprimento de onda específico de 222 nm, que corresponde ao mínimo das hélices- α .

Os espectros foram obtidos através do software Spectra Manager (JASCO) e analisados utilizando o programa CDTools 108 e SpectraGryph 1.2. Para remover as contribuições do solvente, os espectros originais foram subtraídos e processados utilizando o algoritmo de Transformada Rápida de Fourier (FFT). Os gráficos foram gerados no software OriginLab 109, versão 9.9.0.225.

2.9 Ensaios de cristalização

Os primeiros ensaios cristalográficos das proteínas recombinantes foram realizados aplicando a técnica de difusão de vapor por gota sentada automatizada, com o robô *Crystal Gryphon* (*Art Robbins Instruments*®). As placas utilizadas para os ensaios iniciais foram *Intelli-plate 96-low profile* (*Art Robbins Instruments*) e *Swissci 96-Well* (*Molecular-Dimensions*), com os kits de cristalização comerciais *Morpheus MD*®, *Salt HT Screen HP*®, *Index HR*®, *JCSG MD*® e *SG1 MD*®. A proporção da solução de cristalização e proteína foi de 2:1, 1:1 e 1:2, com um volume final de 0.6 μ L e 50 μ L de solução no reservatório. A concentração inicial da proteína variou entre 0,8 mg/mL e 14 mg/mL de acordo com o limite obtido no processo de concentração realizado após a purificação. As placas foram seladas com um filme adesivo e armazenadas no hotel de placas *Rock Imager 1000* (*Formulatrix*), que conta com um sistema de imagem automatizado com luz UV/visível para diferenciar cristais de sal e proteína. Além disso, o equipamento possui uma temperatura regulada de 20°C para garantir as condições ideais de armazenamento.

Alternativamente, para tentar melhorar os cristais de proteína que se formaram pequenos, aglomerados ou poli cristais, foram realizados refinamentos dos parâmetros das condições originais utilizadas. Para este processo foi utilizado placas *VDXm Plate* (*Hampton Research*) de 24 poços e a técnica de difusão de vapor por gota sentada. A proporção da solução de cristalização e proteína variou em torno da condição escolhida para abertura, com um volume final de 2 μ L e 150 μ L de solução no reservatório. A abertura da condição aconteceu com a mudanças na temperatura de crescimento, pH e concentração do precipitante. Quando obtidos cristais, os mesmos foram resfriados rapidamente e mantidas em nitrogênio líquido.

2.10 Coleta de dados e resolução das estruturas

Os dados de difração de raios-X foram coletados à 100 K no síncrotron Sirius (LNLS-CNPEM, Campinas) usando a linha de luz Macaná abrigando um detector PILATUS 2M ou no síncrotron Diamond Light Source (Didcot, Reino Unido) usando a linha de luz I03 com um detector Eiger2 XE. Os dados foram indexados, integrados e escalonados usando Xia2 ou Autoproc. Modelos preditos por AlphaFold2 foram utilizados para realização da substituição molecular com o Phaser do pacote Phenix.(28) Por fim rodadas alternadas de refinamento e reconstrução de modelo foram realizadas usando os softwares Phenix e Coot, onde foi acompanhado o Rfree produzindo assim os modelos finais que foram validados pelo Molprobability. (29)

Para as estruturas tridimensionais não resolvidas por cristalografia, utilizamos a interface ColabFold, que possibilita o uso do AlphaFold2 na plataforma de computação em nuvem do Google Colab (30).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Expressão e solubilização

Conforme descrito na metodologia, foram empregadas diversas estratégias de solubilização das potenciais PETases, as quais foram adaptadas a cada cepa, adicionando-se diferentes etapas de purificação conforme necessário. Para uma melhor compreensão, estes foram divididos nos subcapítulos a baixo, que acompanharão as diferentes estratégias em ordem de aplicação.

3.1.1 Expressão e purificação em BL21(DE3)

As primeiras cepas utilizadas para a expressão das 12 potenciais PETases, foram as BL21(DE3) e BL21(DE3)PlySS. Entre as 12 enzimas, três ficaram solúveis em ambas as cepas, sendo essas MetaG1, MetaG3 e MetaG8.

Com as três primeiras enzimas solúveis, partimos para o primeiro passo de purificação, utilizando da técnica de cromatografia de afinidade ao níquel, essencial para isolar a proteína de interesse de todas as outras expressas da própria maquinaria da bactéria *E. coli*. As bandas observadas no gel de SDS-PAGE (figura 21) mostram proteínas solúveis, com a bandas próximas a 32 kDa para as três proteínas.

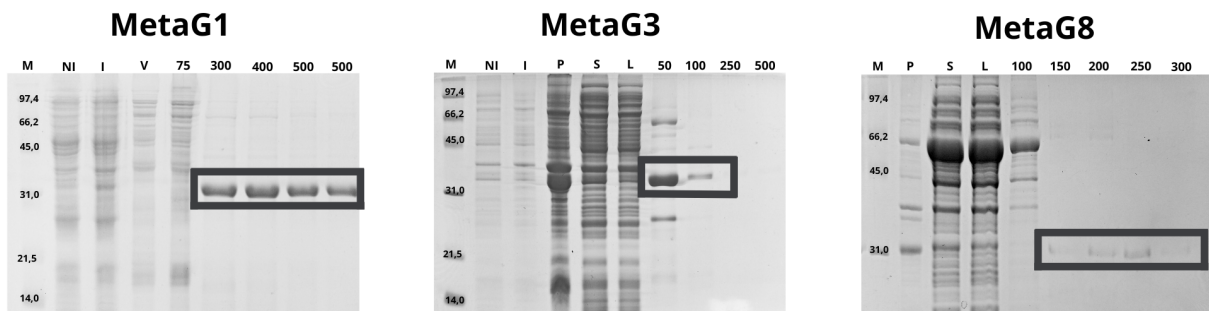


Figura 21 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade de MetaG1, MetaG3 e MetaG8 . M: marcador de massa molecular, NI: Não induzido, I: Induzido, P: Fração insolúvel(Pelet), S: Fração solúvel, L: Lavado com tampão, 20-500: Concentração de imidazol das eleições de 20 a 500mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O segundo passo de purificação foi utilizando da técnica de cromatografia por exclusão molecular (SEC), onde as frações mais puras, provenientes da cromatografia de afinidade foram concentradas e aplicadas na coluna HiLoad Superdex 200 16/60. A obtenção de MetaG8 pura foi bem sucedida utilizando essa estratégia, no entanto, a mesma abordagem não teve o mesmo êxito para MetaG3, pois todas as frações pareciam estar

levemente contaminadas. Além disso, no caso de MetaG1, a proteína injetada na coluna não foi observada em nenhum momento durante o processo de purificação, possivelmente devido a alguma interação com a coluna ou precipitação (figura 22).

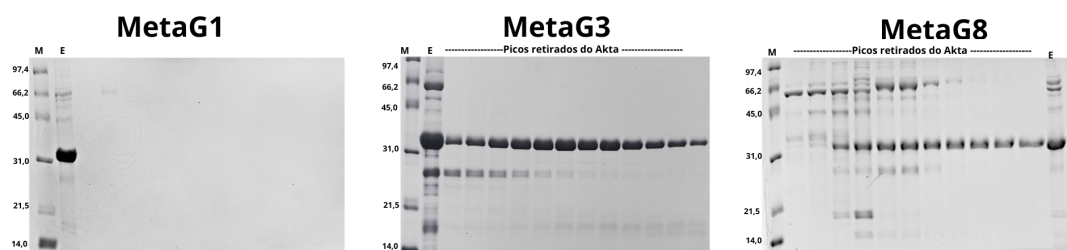


Figura 22 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por exclusão molecular de MetaG1, MetaG3 e MetaG8 . M: marcador de massa molecular, E: Entrada (amostra injetada), Picos do akta: frações relativas a picos de absorvância de UV observados durante a purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma alternativa em ambos os casos, MetaG1 e MetaG3, foi a purificação das proteínas provenientes da cromatografia por afinidade a partir da técnica de cromatografia por troca iônica forte, utilizando a coluna MonoQ. A técnica utilizada obteve êxito na purificação da enzima MetaG1, sendo essa a sua última etapa de purificação. Já para MetaG3, foi necessária uma etapa adicional de SEC (para as frações menos puras), resultando na purificação de todas as três enzimas (figura 23), as quais foram devidamente separadas para futuros ensaios.



Figura 23 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por troca iônica de MetaG1 e MetaG3 e exclusão molecular de MetaG3 . M: marcador de massa molecular, E: Entrada (amostra injetada), Picos do akta: frações relativas a picos de absorvância de UV observados durante a purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.2 Expressão e purificação em Origami-2(DE3)

A próxima cepa utilizada com intuito de solubilizar e purificar as 9 potenciais PETases restantes foi a Origami-2(DE3), amplamente aplicada para proteínas com pontes dissulfeto críticas. A partir desta, mais cinco enzimas foram solubilizadas, Mors1, MetaG4,

MetaG4CBM, MetaG7 e MetaG9. Os resultados das purificações por cromatografia de afinidade ao níquel mostram proteínas solúveis, com as bandas próximas a 32kDa (MetaG4, MetaG7, Mors1 e MetaG9) e 45kDa (esperado pois MetaG4CBM possui um domínio extra de ligação a carboidratos) (figura 24).

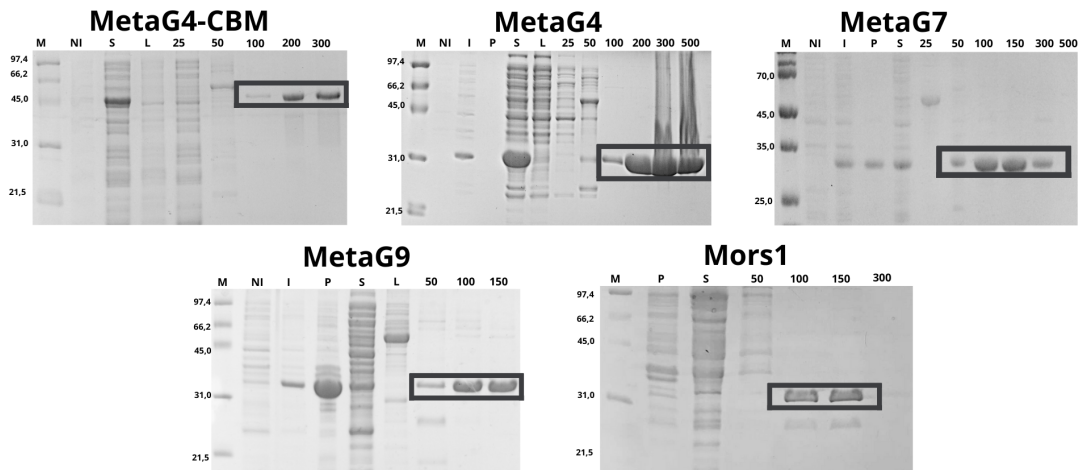


Figura 24 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade de Mors1, MetaG4, MetaG4CBM, MetaG7 e MetaG9 . M: marcador de massa molecular, NI: Não induzido, I: Induzido, P: Fração insolúvel (Pelet), S: Fração solúvel, L: Lavado com tampão, 20-500: Concentração de imidazol das eleições de 20 a 500mM. Fonte: Elaborada pelo autor.

As cinco enzimas purificadas por IMAC foram concentradas e submetidas à purificação por SEC utilizando a coluna HiLoad Superdex 200 16/60 (figura 25).

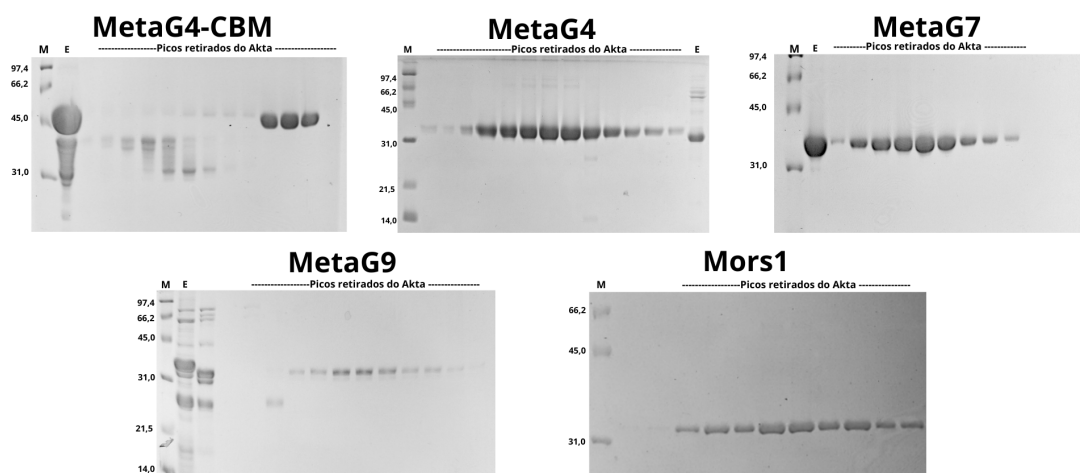


Figura 25 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por exclusão molecular de Mors1, MetaG4, MetaG4CBM, MetaG7 e MetaG9. M: marcador de massa molecular, E: Entrada (amostra injetada), Picos do akta: frações relativas a picos de absorvância de UV observados durante a purificação. Fonte: Elaborada pelo autor.

A técnica se mostrou eficiente para todas as proteínas, proporcionando a obtenção de frações puras que foram cuidadosamente separadas para utilização em experimentos futuros.

3.1.3 Expressão e purificação em ArcticExpress(DE3) e +TaKaRa

Utilizando as cepas com chaperona ArcticExpress(DE3) e TaKaRa, todas as quatro enzimas restantes foram solubilizadas, sendo três em +TaKara (MetaG2, MetaG6, MetaG10) e uma em ArcticExpress(DE3) (MetaG5). A purificação, utilizando da técnica de cromatografia IMAC mostram proteínas solúveis (todas próximas a 32kDA), porem com baixa afinidade a coluna de níquel, sendo eluídas com baixas concentrações de imidazol (figura 26). A tecnica de exclusão molecular foi aplicada com a HiLoad Superdex 200 16/60 porem sem sucesso ao purificar as potenciais PETases devido a presença de chaperonas, que possivelmente formam um complexo nas enzimas de interesse .

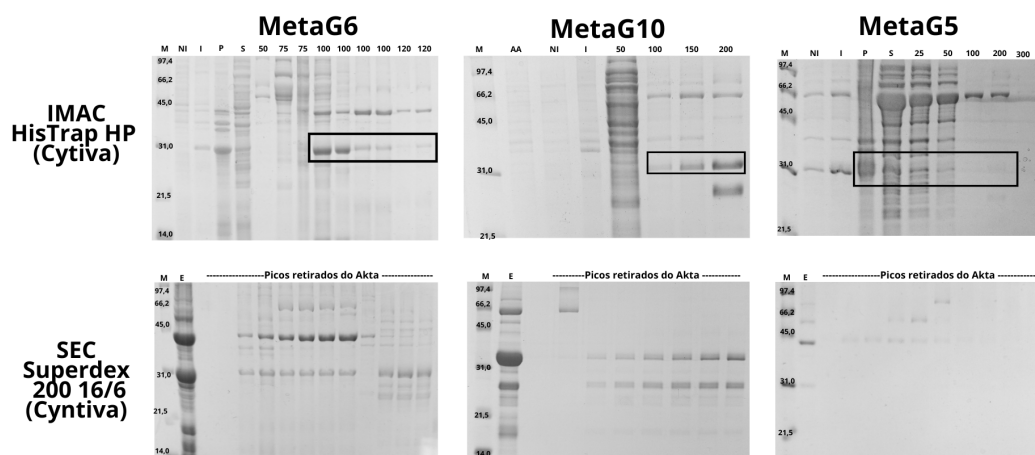


Figura 26 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade de MetaG6, MetaG5 e MetaG10. M: marcador de massa molecular, NI: Não induzido, I: Induzido, P: Fração insolúvel(Pelet), S: Fração solúvel, L: Lavado com tampão, 20-300: Concentração de imidazol das eleições de 20 a 300mM. Proteínas organizadas em colunas e linhas a técnica cromatográfica utilizada em cada ensaio de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o intuito de dissociar as proteínas alvo das chaperonas, um protocolo utilizando ATP e leite em pó (descrito na metodologia) foi aplicado e bem sucedido para a purificação de MetaG6 e MetaG5. Onde a partir do no gel de SDS-PAGE podemos observar uma diminuição considerável na quantidade de contaminantes (figura 27). Onde na ultima tentativa, as enzimas foram direto para ensaios cristalográficos devido a instabilidade das proteínas ao armazenamento.

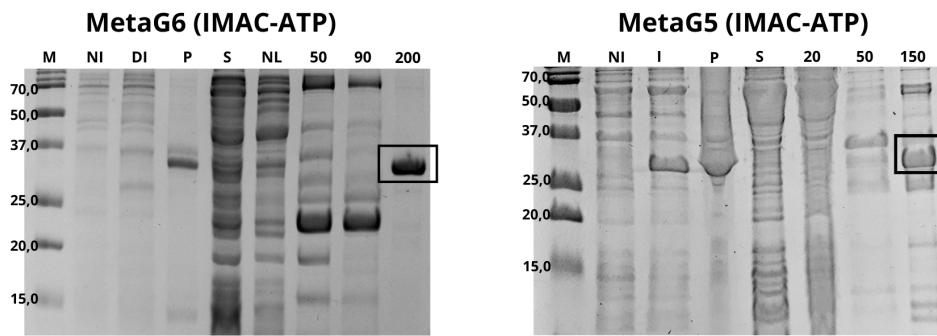


Figura 27 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade de MetaG6, MetaG5 e MetaG10. M: marcador de massa molecular, NI: Não induzido, I: Induzido, P: Fração insolúvel (Pelet), S: Fração solúvel, L: Lavado com tampão, 20-200: Concentração de imidazol das eleições de 20 a 200mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.4 Ensaios de refolding

Outra técnica utilizada de purificação foi utilizando o processo de refolding, onde começamos com a enzima MetaG9, com o objetivo de estabelecer um protocolo. No momento da tentativa de refolding, ainda não tínhamos solubilizado todas as proteínas propostas no início do trabalho. MetaG9 foi escolhida pois tínhamos a enzima purificada fração solúvel, o que nos permitiria realizar comparações.

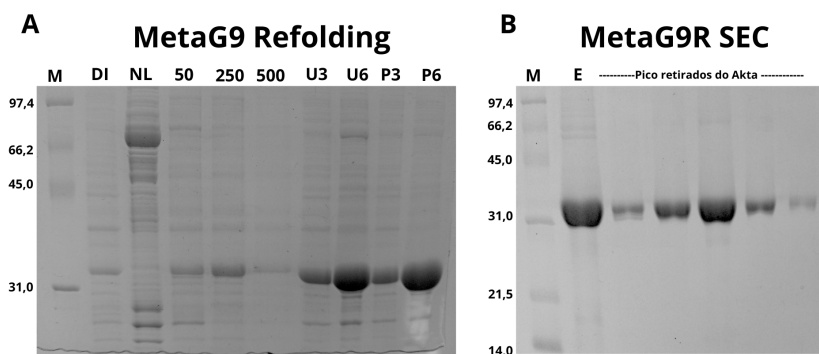


Figura 28 – (A) Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade de da fração solúvel e refolding da parte insolúvel de MetaG9. M: marcador de massa molecular, DI: Induzido; NL: fração não ligada a coluna quando lavada com com tampão, 50-500: Concentração de imidazol das eluições de 50 a 500mM; U3 e U6: Fração insolúvel resuspendida em 3M e 6M de ureia ; P3 e P6: Fração insolúvel purificada partindo da fração solubilizada em 3M e 6M de ureia. (B) Gel SDS-PAGE 15% da purificação por SEC de MetaG9 após refolding

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a aplicação da técnica, obtivemos uma fração pura de MetaG9 (figura 28), recuperada a partir dos corpos de inclusão, conforme descrito na metodologia. O mesmo protocolo foi aplicado às enzimas MetaG2 e MetaG10, no entanto, as proteínas recuperadas

não apresentaram atividade com PNPA, ao contrário de MetaG9. Assim, não apresentaremos mais dados experimentais sobre MetaG2 e MetaG10 no decorrer do trabalho.

3.2 Facilidade na obtenção das proteínas

Quando realizamos uma investigação sobre estrutura e atividade de enzimas, usualmente o objetivo final é avaliar a empregabilidade das mesmas, no caso deste trabalho para o estudo de degradação de PET. Sendo assim, além dos resultados estruturais e enzimáticos, acredito que seja imprescindível destacar o comportamento das enzimas desde a dificuldade de purificação quanto de armazenamento. Assim, com o objetivo de esclarecer o quão aplicável seja cada enzima, será apresentado essa seção descrevendo o comportamento de cada proteína purificada. Nos diagramas das figuras 30, estão ilustradas a dificuldade de cada etapa, no qual as cores variam de vermelho a azul, sendo o vermelho indicativo de alta dificuldade e o azul indicativo de alta facilidade, uma avaliação qualitativa descrita no diagrama da figura 29. MetaG2 e MetaG10 foi omitida pois ainda não obtemos ambas enzimas ativas, e diferente de MetaG8 não foi realizadas purificações o suficiente para chegar em uma conclusão.

Diagrama de estabilidade

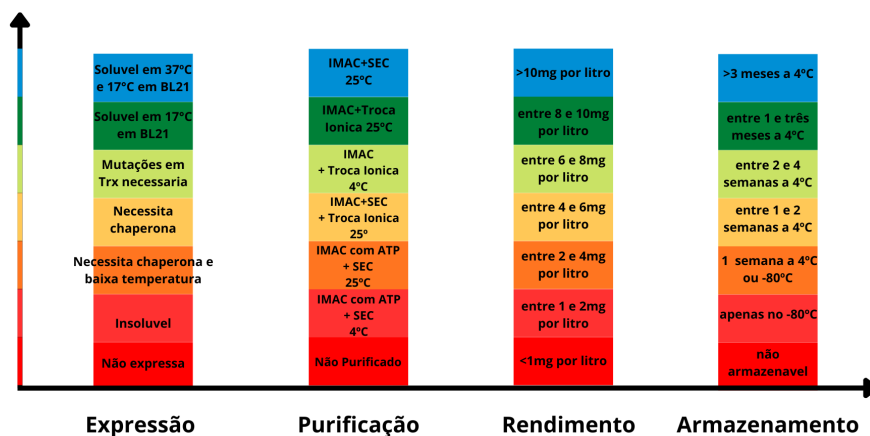


Figura 29 – Descrição do diagrama de dificuldade. Dificuldade de cada etapa, em que as cores variam de vermelho a azul. O vermelho indica alta dificuldade, enquanto o azul indica alta facilidade para processos de expressão, purificação, rendimento e armazenamento da enzima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

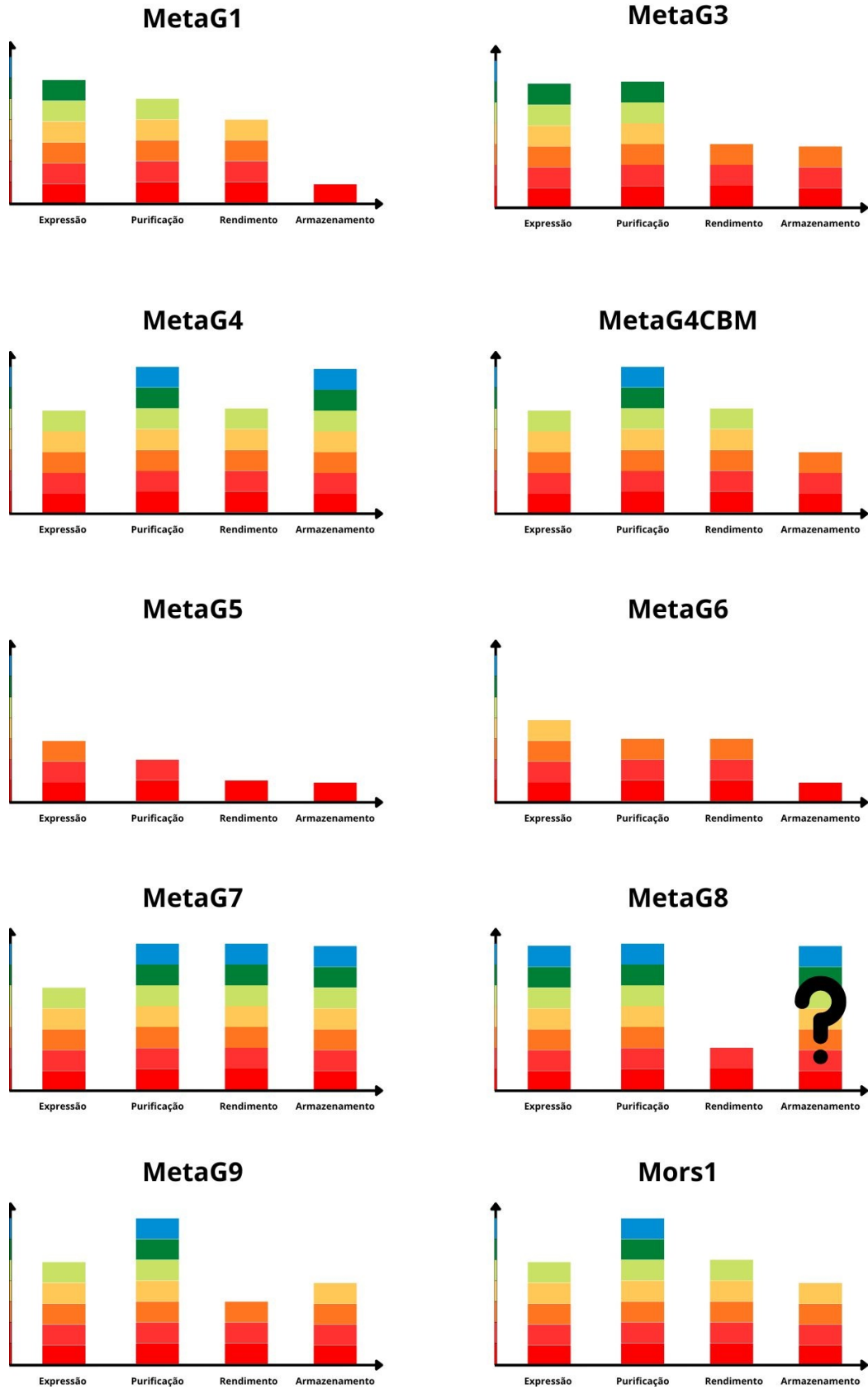


Figura 30 – Diagrama de dificuldade das MetaG's. Dificuldade de cada etapa para MeatG's e Mors1, em que as cores variam de vermelho a azul. O vermelho indica alta dificuldade, enquanto o azul indica alta facilidade para processos de expressão, purificação, rendimento e armazenamento da enzima.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.1 MetaG1

MetaG1 foi uma das primeiras enzimas obtida na forma solúvel, sendo esta expressa em BL21(DE3). Durante o processo de purificação percebemos a instabilidade da mesma em temperatura ambiente, onde a precipitação ocorria em poucos minutos. Com afinidade e troca iônica realizada em 4°C fomos capazes de obter MetaG1 pura em uma quantidade razoável de proteína (4mg por litro de expressão). Mesmo armazenada a 4°C em um dia perdíamos quase toda proteína devido a precipitação, o congelamento também não era possível, pois a proteína precipitava durante o processo de descongelamento. Outro ponto a se destacar, é que MetaG1 também se demonstrou instável a concentrações superiores a 1mg/ml, levando a precipitação. Dessa forma, todos experimentos com MetaG1 precisaram ser realizados no mesmo dia da purificação.

3.2.2 MetaG3

Assim como MetaG1, MetaG3 foi expressa de forma solúvel em BL21(DE3). A purificação precisou de três etapas como descrito nos resultados acima, porém todas puderam ser feitas em temperatura ambiente. O rendimento foi de aproximadamente 3mg por litro de expressão e seu armazenamento a 4°C manteve a proteína ativa contra PNPA por uma semana.

3.2.3 MetaG4

MetaG4 foi expressa e solúvel em uma cepa com mutações que facilitaram a formação de pontes dissulfeto. A purificação exigiu apenas dois passos (IMAC e SEC) e foi realizado a temperatura ambiente. O rendimento foi alto, com 7mg por litro de expressão. A proteína armazenada a 4°C apresentou pouca precipitação mesmo durante meses e continuou ativa com PNPA, tanto armazenada a 4°C quanto descongelada de -80°C.

3.2.4 MetaG4CBM

Assim como MetaG4, sua versão com domínio de ligação CBM, MetaG4CBM, foi solúvel na cepa com mutações que facilitam a formação de pontes dissulfeto. O rendimento foi alto, com 7mg por litro de expressão. A purificação também exigiu apenas dois passos (IMAC e SEC), que foram realizadas a temperatura ambiente. A proteína armazenada a 4°C apresentou pouca precipitação em uma semana, todavia perdeu atividade com BHET, a perda de atividade também foi observada quando descongelada de -80°C.

3.2.5 MetaG5

Na solubilização de MetaG5 precisamos utilizar chaperonas da cepa ArticExpress(DE3). Para purificação de MetaG5, foi necessário a aplicação do protocolo com ATP e leite em pó, onde as purificações foram realizadas em baixa temperatura. O rendimento

foi baixo, em torno de 0,5mg por litro de expressão. Como MetaG1, MetaG5 se apresentou instável a temperatura ambiente, e não pode ser armazenada a 4°C, levando a precipitação em um dia, o mesmo ocorrendo ao descongelar a enzima de -80°C. Assim como MetaG1, MetaG5 também se demonstrou instável a concentrações superiores 1mg/ml, levando a precipitação. Todos experimentos realizados precisaram ser feitos no dia da purificação.

3.2.6 MetaG6

MetaG6 necessitou de chaperonas, porém pode ser expressa em poucas horas a 37°C utilizando o set TaKaRa de chaperonas. A purificação precisou de um passo adicional, com o protocolo de ATP e leite em pó, porém pode ser realizada a temperatura ambiente. O rendimento foi de 3mg por litro de expressão. A proteína começou a apresentar precipitação em uma semana a 4°C, onde observou-se perda de atividade contra PNPA.

3.2.7 MetaG7

MetaG7 foi expressa e solúvel em uma cepa com mutações que facilitaram a formação de pontes dissulfeto. A purificação exigiu apenas dois passos (IMAC e SEC) e foi realizado a temperatura ambiente. O rendimento foi o maior obtido, com mais de 10mg por litro de expressão. MetaG7 também foi a mais estável de todas as proteínas, apresentando pouco sinal de precipitação mesmo após 6 meses a 4°C (onde a mesma se mostrou ativa contra PNPA), a proteína descongelada de -80°C também apresentou pouca precipitação e foi ativa.

3.2.8 MetaG8

MetaG8 foi uma das primeiras enzimas solúveis, sendo solúvel em BL21(DE3). A purificação exigiu dois passos (IMAC e SEC), todavia apenas uma parte das frações coletadas do akta estavam puras. O rendimento foi relativamente baixo, próximo a 1mg por litro de expressão.

A avaliação da estabilidade de MetaG8 é complicada, pois não obtivemos até o momento a proteína bem enovelada (avaliada por CD, vide abaixo), mas ao mesmo tempo a enzima não apresentava sinal de precipitação em altas temperaturas ou altas concentrações. Experimentos de dicroísmo circular serão descritos posteriormente, onde tentamos esclarecer o comportamento observado de MetaG8.

3.2.9 MetaG9

MetaG9 foi uma das enzimas expressas e solúveis em uma cepa com mutações que facilitaram a formação de pontes dissulfeto. A purificação exigiu apenas dois passos (IMAC e SEC) e o rendimento foi de 3mg por litro de expressão. Seu armazenamento a 4°C manteve a proteína ativa com PNPA por uma semana.

Vale destacar que MetaG9 também foi purificada de corpos de inclusão, onde a proteína se manteve estável e ativa a como sua fração solúvel.

3.2.10 Mors1

Mors1 também foi expressa e solúvel em uma cepa com mutações que facilitaram a formação de pontes dissulfeto. A purificação exigiu apenas dois passos (IMAC e SEC) e o rendimento foi de 6mg por litro de expressão. Seu armazenamento a 4°C manteve a proteína ativa com PNPA por uma semana e a enzima descongelada de -80°C se manteve ativa.

3.3 Estabilidade térmica das enzimas

Com intuito de determinar a estabilidade térmica das potenciais PETases, parte da fração purificada foi separada para a técnica de dicroísmo circular. Avaliamos o estado de enovelamento das proteínas recombinantes Mors1, MetaG1, MetaG4, MetaG4CBM, MetaG7, MetaG8 e MetaG9 mediante o monitoramento do espectro de CD em 222nm em função do aumento da temperatura através de um gradiente de 4 a 94°C medido em intervalos de 0,5°C/min .

Vale destacar que tentativas para MetaG5 e MetaG6 foram realizadas porem sem sucesso, onde as proteínas armazenadas para o CD já não apresentavam mais atividade catalítica contra PNPA (onde a amostras recém purificadas se demonstravam ativas). Assim todos os ensaios apresentados a seguir foram realizados com proteínas recém purificadas devido a instabilidade de armazenamento. Para melhor compreensão os resultados serão apresentados nas subseções a seguir, que estão divididos com base no comportamento das enzimas em questão.

3.3.1 Mors1 e MetaG7

As análises de dicroísmo circular pode ser utilizada para revelar a temperatura de melting T_m , que é a temperatura na qual a elipticidade observada corresponde à metade da faixa de elipticidade entre as populações enoveladas e desenoveladas.

Após realizar a curva de desnaturação térmica e monitorar o sinal do espectro CD a 222 nm, realizamos um ajuste usando a equação de Boltzmann onde determinamos o T_m para MetaG7 e Mors1. MetaG7 exibiu uma temperatura de melting de $52,8 \pm 0,4$ °C e Mors1 apresentou um T_m de $51,7 \pm 0,2$ °C, indicando que ambas são enzimas mesófilas (figura 31).

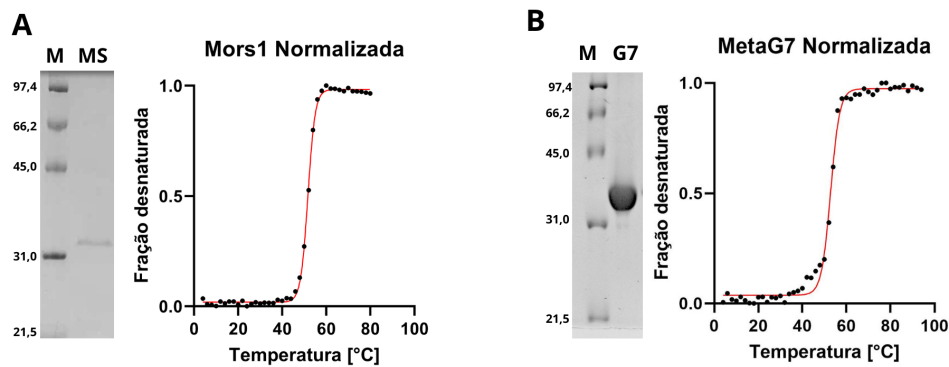


Figura 31 – (A) Curva de desnaturação térmica e Gel de SDS-PAGE 15% referente a Mors1 e (B) referente a MetaG7. M: marcador molecular, MS: proteína Mors1 purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular, G7: proteína MetaG7 purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular. Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.2 MetaG4 e MetaG4CMB

As proteínas MetaG4 com e sem o domínio CBM apresentaram pouca diferença no ponto de vista de estabilidade térmica. A curva de desnaturação, na qual o sinal de espectro CD foi monitorado a 222nm, mostra a temperatura de melting (T_m) obtida de $52,0 \pm 0,2$ para MetaG4 e $55,6 \pm 0,1$ para MetaG4CBM após um ajuste de Boltzman (figura 32). Estes resultados mostram um grau de estabilidade térmica relativamente alta para ambas em concentrações abaixo de 0,2mg/ml, assim como uma baixa influencia do domínio de ligação CBM no que diz respeito a estabilidade térmica do domínio catalítico MetaG4.

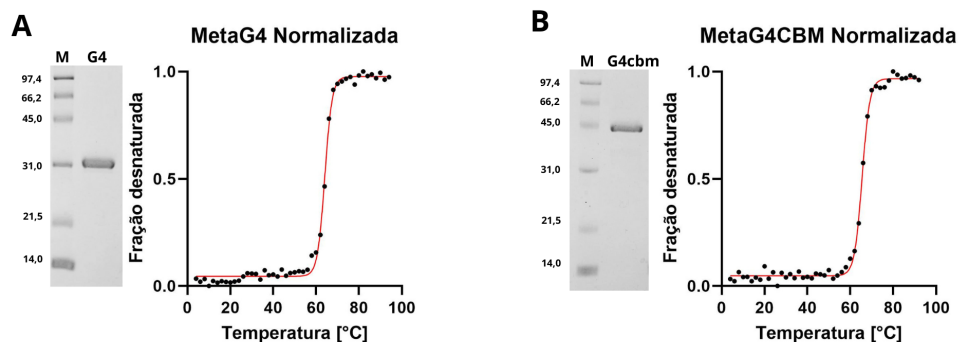


Figura 32 – (A) Curva de desnaturação térmica e Gel de SDS-PAGE 15% referente a MetaG4 e (B) referente a MetaG4CBM. M: marcador molecular, G4: proteína MetaG4 purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular, G4cbm: proteína MetaG4CBM purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular. Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.3 MetaG1

No caso de MetaG1, em 4°C a curva de desnaturação térmica, na qual o sinal de espectro CD foi monitorado a 222nm, apresentou uma temperatura de melting (T_m) de $55,5 \pm 0,2$ após um ajuste de Boltzmann no sinal detectado (figura 33). Estes resultados mostram um grau de estabilidade térmica relativamente alta para MetaG1 em baixas concentrações ($<0,2\text{mg/ml}$).

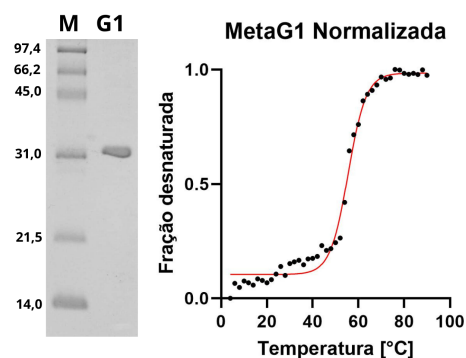


Figura 33 – Curva de desnaturação térmica e Gel de SDS-PAGE 15% referente a MetaG1. M: marcador molecular, G1: proteína MetaG1 purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todavia ao contrário do visto em Mors1 e na maioria das outras MetaG's, em MetaG1 uma lenta e gradual perda de estruturas secundárias ocorre no início do gradiente (figura 34). A perda inicial de suas estruturas secundárias pode explicar a instabilidade da enzima em concentrações maiores, onde uma possível exposição de regiões hidrofóbicas podem levar a precipitação com maior facilidade.

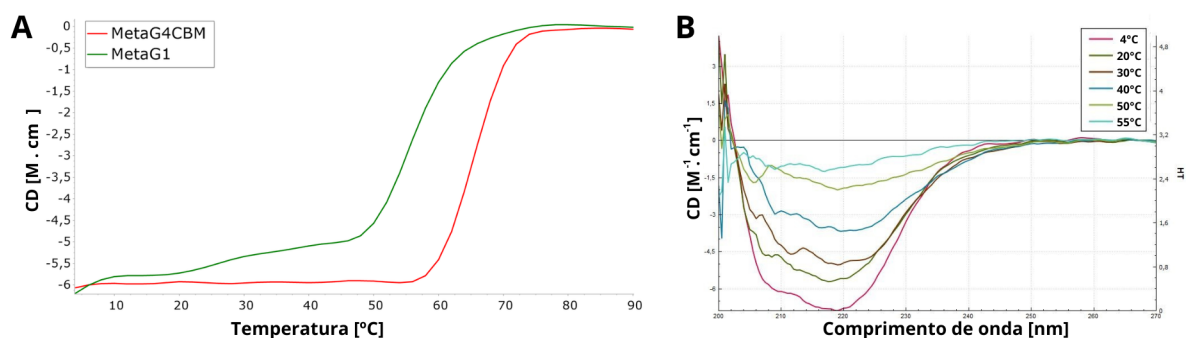


Figura 34 – (A) Sinal de CD para MetaG1 em comparação a MetaG4CBM a 222nm em um gradiente de temperatura que varia de 4 a 90°C (B) Sinal de CD de 200 a 260nm em diferentes temperaturas para MetaG1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.4 MetaG8 e MetaG9

A curva de desnaturação térmica para MetaG8, na qual o sinal de espectro CD foi monitorado a 222nm se mostrou quase invariável em todo intervalo de 4°C a 94°C. O experimento foi repetido com proteínas recém purificadas e o mesmo resultado foi obtido, com MetaG8 não demonstrando nenhum sinal de precipitação, mesmo em temperaturas elevadas (94°C). A curva de CD de 200nm a 260nm revelou um espectro característico de uma proteína composta principalmente por loops, o que não é compatível com a previsão do AlphaFold2 (figura 35 B e C) ou com estruturas de PETases conhecidas. A hipótese principal é que MetaG8 esteja desenovelada, onde este estado apresenta alta estabilidade térmica, sendo resistente a precipitação em temperaturas elevadas. Esse resultado pode explicar a dificuldade de cristalizar a enzima, que foi uma das únicas entre as purificadas que não formou cristais nos ensaios cristalográficos (seção 3.5).

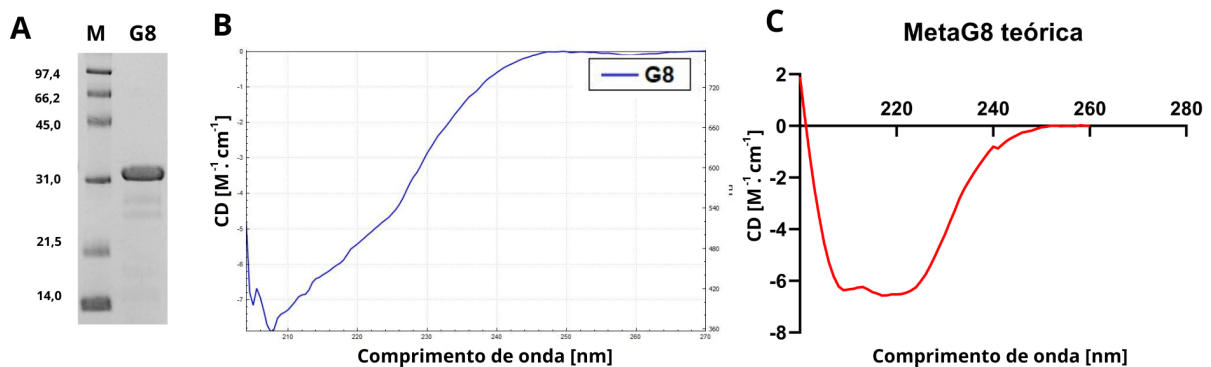


Figura 35 – Gel de SDS-PAGE 15% referente a MetaG8. M: marcador molecular, G8: proteína MetaG8 purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular. (B) Espectro de CD para MetaG8. (C) Curva teórica de CD redita pelo servidor PDB2CD (31) usando o modelo alphafold de MetaG8

Fonte: Elaborada pelo autor.

Diferente de MetaG8, a curva de CD para MetaG9 em baixas temperaturas (4°C a 35°C) demonstrou um espectro de uma amostra com presença maior de elementos de estrutura secundária α/β . No entanto, ao analisar a curva de desnaturação térmica da proteína utilizando o sinal de espectro CD monitorado a 222nm, não foi observada precipitação. Em vez disso, foi observada uma redução significativa das estruturas secundárias α/β com uma temperatura de transição T_t de $41,78 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (figura 36), seguida por uma estabilidade ao longo do restante da curva.

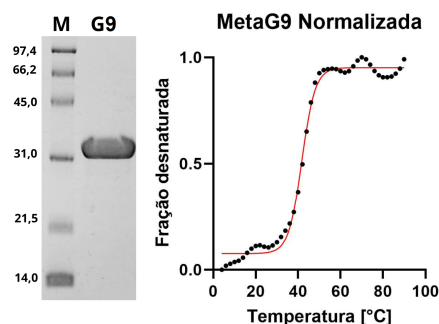


Figura 36 – Curva de transição térmica e Gel de SDS-PAGE 15% referente a MetaG9 . M: marcador molecular, G9: proteína MetaG9 purificada utilizada para o experimento de dicroísmo circular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando os resultados de MetaG9 com MetaG8, observamos que ao chegar na temperatura de transição, MetaG9 muda seu estado de enovelamento chegando em um sinal em 222nm próximo ao observado no espectro de de CD para G8 (figura 37 C), porem com um sinal de uma proteína parcialmente enovelada (figura 37 B).

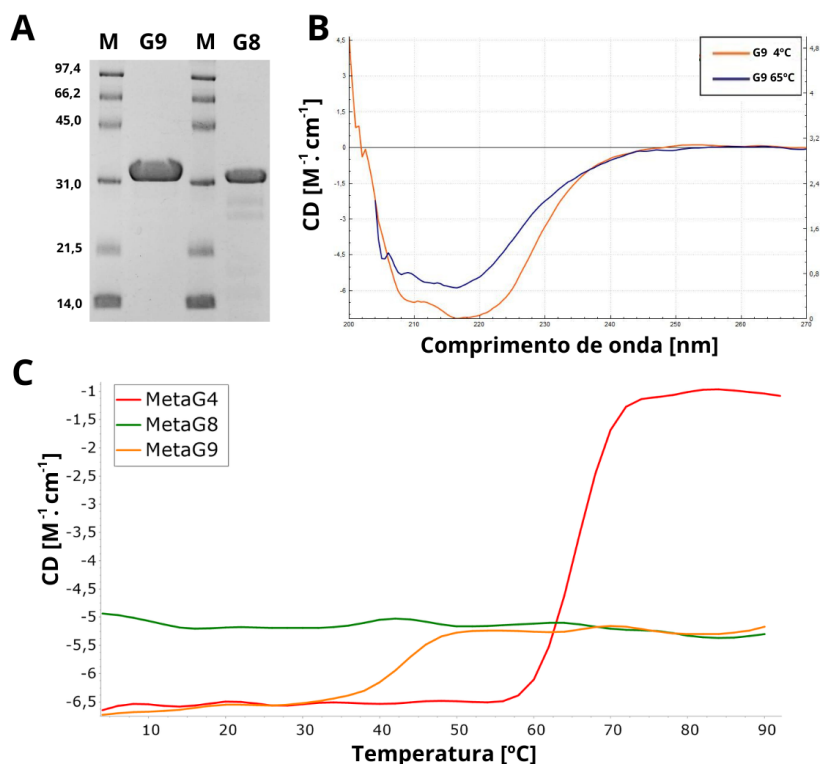


Figura 37 – (A)Gel de SDS-PAGE 15%, M: marcador molecular, G9 e G8: proteínas purificadas para o experimento de dicroísmo circular; (B) Sinal de CD de 200 a 260nm onde em laranja temos MetaG9 a 4°C e em azul MetaG9 a 65°C; (C) Sinal de CD para MetaG9 e MetaG8 em comparação a MetaG4 a 222nm em um gradiente de temperatura que varia de 4 a 90°C .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nossa hipótese é que ambas as proteínas possuem duas fases distintas: uma primeira fase ativa, na qual suas estruturas α/β estão conservadas, e uma segunda fase desenovelada e termoestável, com alta presença de loops, mas sem atividade (figura 37). Essa hipótese foi testada em um rápido ensaio enzimático, onde a MetaG9 não aquecida demonstrou atividade catalítica contra PNPA, mas tanto a MetaG8 quanto a fração da MetaG9 previamente aquecida não apresentaram atividade. Além disso, observamos que a redução da temperatura não foi o suficiente para voltar MetaG9 para sua forma ativa, mesmo depois de 7 dias a 4°C. Para maiores conclusões, necessitamos de estudos mais aprofundados.

3.4 Alinhamento das sequencias

Nas próximas seções, iremos abordar os subsítios de ligação I e II em várias ocasiões. Devido ao grande número de proteínas com diferentes numerações de resíduos de aminoácidos, utilizaremos uma notação especial para nos referirmos a essas posições. Para o subsítio I, usaremos as designações S1-1 a S1-4, enquanto para o subsítio II utilizaremos as designações S2-1 a S2-5, conforme ilustrado na Figura 38 (derivada da figura 5 apresentada na introdução).

	Subsítio I				Subsítio II				
	(S1-1)	(S1-2)	(S1-3)	(S1-4)	(S2-1)	(S2-2)	(S2-3)	(S2-4)	(S2-5)
Tipo I	Y_F	QY	M	W	TL	A_G	H	F	N_Q
Tipo IIa	Y_F	Q	M	W	VL	S_L	W	FY	N
Tipo IIb	Y_F	Q	M	W	T	A	W	S_T	N

Figura 38 – Nomenclatura dos subsítios de ligação I e II. Podemos observar as diferenças de aminoácido entre as PETases-like tipo I, IIa e IIb, para facilitar o entendimento nas descrições dos resultados as posições referentes serão nomeadas S1-1 a S1-4 para posições do subsítio I e S2-1 a S2-5 para posições do subsítio II.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4.1 Alinhamento das sequencial das potenciais PETases

Com o objetivo de conhecer os aminoácidos de cada subsítio de ligação e comparar com PETases conhecidas de cada tipo, realizamos o alinhamento múltiplo entre as nossas MetaG's e Mors1 com, LCC (tipo I) e VgCut(tipo IIa) e IsPetase (tipo IIb), sendo a numeração referente a MetaG3 (figura 39). Vale ressaltar que algumas das predições feitas pelo ClustalX durante o processo de alinhamento foram corrigidas com base nas estruturas cristalográficas, assim o alinhamento apresentado é a versão corrigida do primeiro alinhamento.

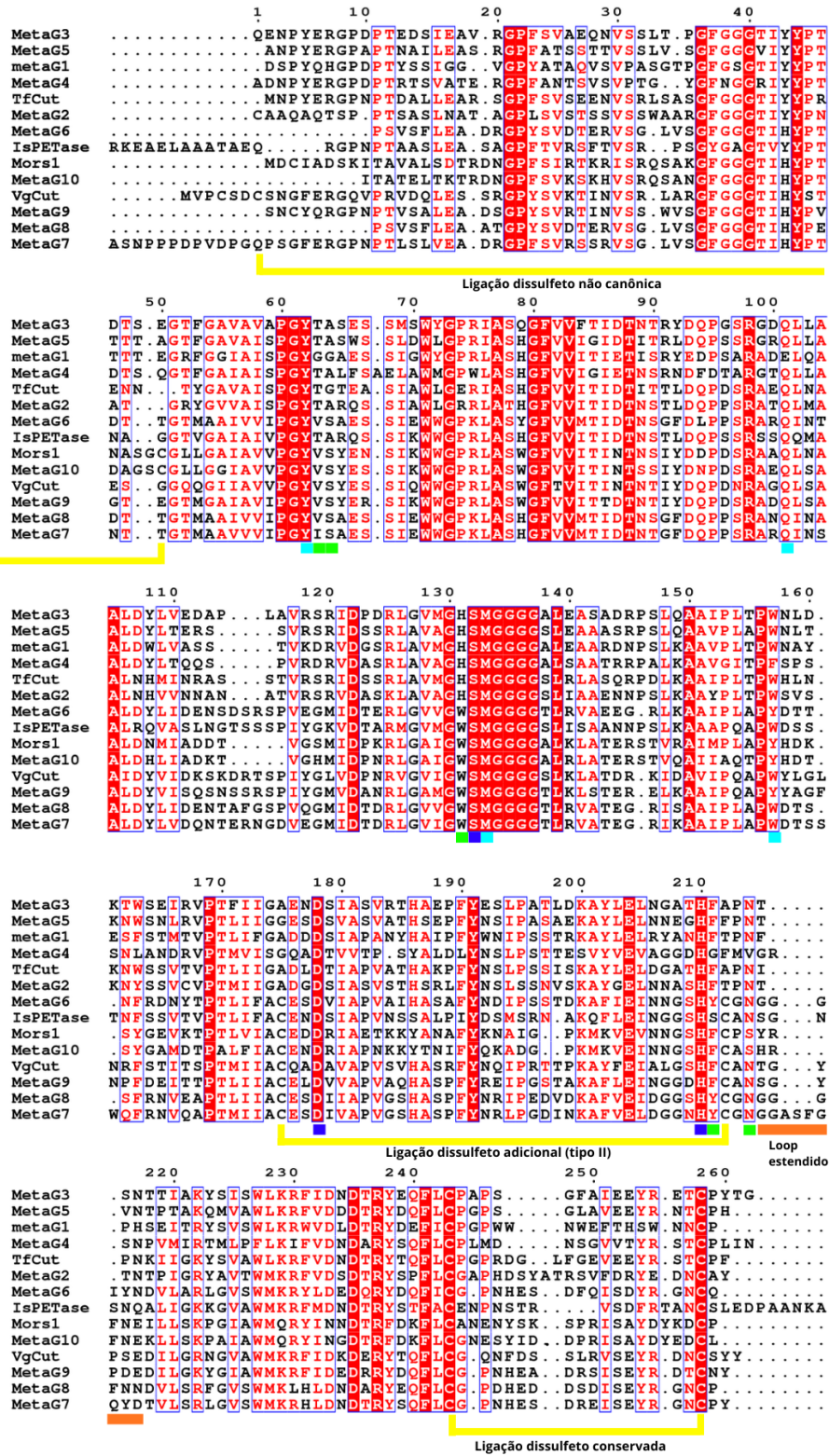


Figura 39 – Alinhamento múltiplo entre as seqüências das PETases-like tipo I (TfCut), tipo IIa (VgCut) e tipo IIb (IsPETase) com as seqüências das MetaG's e Mors1. Caixa azul destacando regiões de alta identidade, onde os aminoácidos sombreados de vermelho são completamente conservados. A tríade catalítica foi destacada em azul escuro, o sítio de ligação I foi destacado em ciano, o sítio de ligação II em verde, a possível ligação dissulfeto adicional em amarelo e o loop estendido em laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como podemos observar pelo alinhamento sequencial todas as enzimas apresentaram a triade catalítica Ser-His-Asp conservada assim como as cisteínas para formação da ponte dissulfeto principal (conservada em todas PETases like). Das 11 proteínas alvos (Mors1 e MetaG's), temos em nossas amostras 4 PETases-like canônicas, sendo MetaG3, MetaG5 e MetaG2 do tipo I e MetaG8 do tipo IIa (7). Das que se desviam das PETases canônicas, MetaG7 e MetaG9 são muito próximas do tipo IIa, com uma isoleucina não canônica na posição S2-1 em MetaG7 e uma tirosina na posição S1-4 em MetaG9. Para o restante, embora MetaG1 e MetaG4 se aproximem do tipo I, e MetaG6, MetaG10 e Mors1 do tipo IIa, todavia as mudanças são críticas com duas ou mais mudanças, nos subsítios S1-1, S1-4, S2-1 ou S2-5 (figura 40). Por esse motivo, se justifica a abordagem em larga escala na tentativa de identificar novas PETases com propriedades inéditas.

	Subsítio I				Subsítio II				
	(S1-1)	(S1-2)	(S1-3)	(S1-4)	(S2-1)	(S2-2)	(S2-3)	(S2-4)	(S2-5)
Tipo I	Y _F	QY	M	W	TL	A _G	H	F	N _Q
Tipo IIa	Y _F	Q	M	W	VL	S _L	W	FY	N
Tipo IIb	Y _F	Q	M	W	T	A	W	S _T	N
MetaG3	Y	Q	M	W	T	A	H	F	N
MetaG5	Y	Q	M	W	T	A	H	F	N
MetaG4	Y	F	M	F	T	A	H	G	V
MetaG1	Y	D	M	W	G	G	H	F	N
MetaG2	Y	Q	M	W	T	A	H	F	N
Mors1	Y	D	M	Y	V	S	W	F	S
MetaG6	Y	L	M	Y	V	S	W	Y	N
MetaG8	Y	Q	M	W	V	S	W	Y	N
MetaG7	Y	Q	M	W	I	S	W	Y	N
MetaG9	Y	Q	M	Y	V	S	W	F	N
MetaG10	Y	D	M	Y	V	S	W	F	S

Figura 40 – Alinhamento entre os subsítios I e II das MetaG's e Mors1. As regiões dos subsítios com aminoácidos não canônicos foram sombreadas em vermelho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação à ponte dissulfeto adicional (figura 39), Mors1, MetaG6, MetaG7, MetaG8, MetaG9 e MetaG10 têm potencial para a formação, com as cisteínas das posições equivalentes (em outras PETases tipo II) sendo conservadas. Como esperado das PETases-like tipo I, as MetaG1, MetaG2, MetaG3, MetaG4 e MetaG5 apresentam um loop estendido de 3 aminoácidos, enquanto MetaG6, MetaG8 e MetaG9 apresentam 6 resíduos de aminoácidos, semelhantes às PETases-like canônicas do tipo II. Mors1 e MetaG10 se desviam dessa regra, apresentando 5 aminoácidos, e MetaG7 apresenta 9 aminoácidos adicionais na região do loop estendido. A fim de aprofundar a compreensão do impacto dessas mudanças, foram realizados estudos estruturais, cujos resultados serão apresentados nas próximas seções.

3.5 Ensaios cristalográficos

Para melhor compreensão das proteínas PETase-like de origem antártica, diversos ensaios foram realizados com intuito de resolver suas estruturas tridimensionais por cristalografia de raios-X. Os resultados destes ensaios, assim como a descrição individual das estruturas resolvidas serão divididas nas subseções a seguir.

3.5.1 MetaG3

Após otimização da purificação de MetaG3 (Metodologia) e aplicação do método de cristalização por difusão de vapor em gota a 20°C, cristais foram obtidos com sucessos para tentativa de difração. Utilizamos três kits comerciais de cristalização, com proporção 1:1 e concentração de proteína de 2mg/ml, 5mg/ml e 7,4mg/ml. Obtivemos cristais em quatro condições de ShotGun SG1, uma condição de Morpheus I e três condições de SaltRx HT. Todavia apenas os cristais obtidos em SaltRx HT estavam em condições para difração (quadro 3)(figura 41).

Quadro 3 – Condições de cristalização MetaG3

Condição	Precipitante	Tampão	Concentração de proteína
D2 SaltRx HT	2,5M Nitrato de amônio	0,1M propano de BIS-TRIS pH 7,0	2mg/ml
B1 SaltRx HT	3,2M Cloreto de sódio	0,1M propano de BIS-TRIS pH7.0	2mg/ml
B2 SaltRx HT	3,2M Cloreto de sódio	0,1M Tris pH 8,5	2mg/ml

Fonte: Elaborada pelo autor

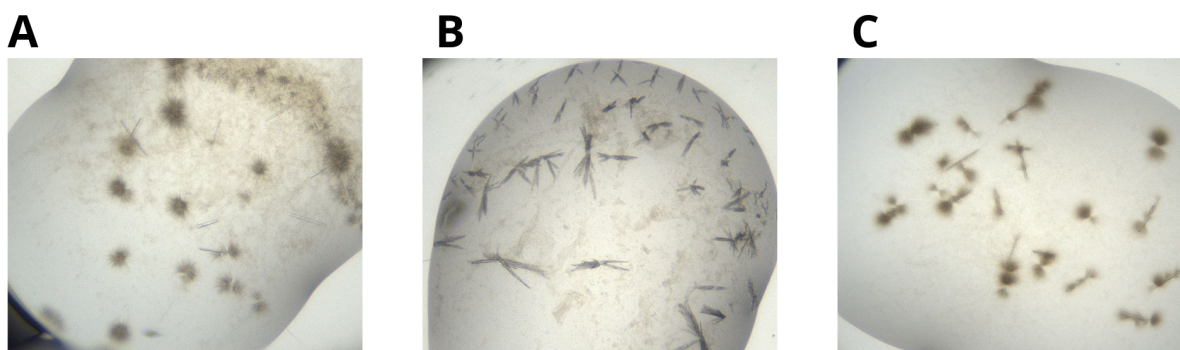


Figura 41 – Cristais de Meta G3, todos a 2 mg/ml de concentração inicial e em SaltRx HT. (A) Condição D2; (B) Condição B1; (C) Condição B2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cristais das três condições de SaltRx HT (B1, B2 e D2) com proporção 1:1 e concentração de proteína de 2mg/ml, foram usados para a coleta de dados de difração. No entanto, mesmo o cristal de melhor qualidade de dados (B2) apresentava alta anisotropia e uma resolução final de 2,5 Å, o que dificultou tanto a resolução quanto o refinamento da estrutura. Assim, novos ensaios foram realizados com proporção 1:1 e concentração de proteína de 1,5mg/ml, 2mg/ml e 3mg/ml, utilizando dois kits comerciais adicionais, JCSG-plus e PACT. Destas tentativas, duas novas condições nos gerou cristais em condição para difração, ambas em JCSG todos a 1,5mg/ml de concentração inicial de proteína (quadro 4)(figura 42).

Quadro 4 – Condições de cristalização G3 otimizada

Condição	Precipitante	Tampão	Concentração de proteína
B9 JCSG-plus-HT	20% de PEG 6k	0,1M citrato de sódio pH 5.0	1,5mg/ml
B10 JCSG-plus-HT	50% de PEG 200	0,1M de cloreto de sódio e cacodilato de sódio pH 6.5	1,5mg/ml

Fonte: Elaborada pelo autor

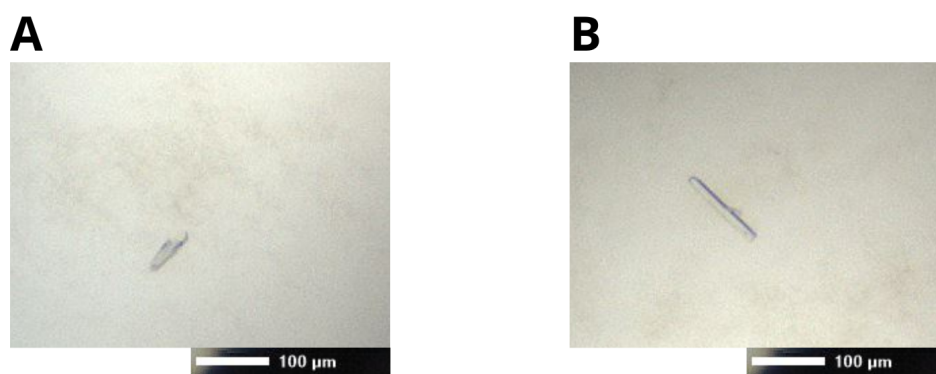


Figura 42 – Cristais de Meta G3, todos a 1,5mg/ml de concentração inicial (A) Condição B9 de JCSG-plus-HT ; (B) Condição B10 de JCSG-plus-HT.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cristais das duas condições de JCSG (B10 e B9) com proporção 1:1 e concentração de proteína de 1,5mg/ml, foram usados para a coleta de dados de difração. Entre eles, o cristal que cresceu na condição B10 forneceu dados de melhor qualidade com resolução final de 1,59 Å. Os valores finais de R_{work} e R_{free} após as rodadas de refinamento foram de 19,18 e 21,23%, respectivamente, tendo uma molécula na unidade assimétrica. Todos os parâmetros de coleta de dados e controle de qualidade chegaram dentro dos valores esperados e estão destacados na Tabela 1.

Tabela 1 – Tabela de dados MetaG3

Parâmetro	Valor
Fonte de raios X	Sirius MANACA
Detector	Pilatus 2M
Parâmetros da célula: a, b, c (Å)	72.45 87.34 89.53
Parâmetros da célula: α , β , γ (°)	90,0 90,0 90,0
Grupo espacial	<i>I</i> 222
Resolução (Å)	36,23 – 1,59 (1,68 - 1,59)
λ (Å)	0,977
Multiplicidade	12,85 (11,21)
Rmeas (%)	19,6 (205,8)
CC(1/2)	99,8 (51,5)
Completude (%)	99.00 (100)
Reflexões	496790 (68818)
Reflexões únicas	38653 (6137)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11,71 (1,47)
Reflexões utilizadas no refinamento	38650
R (%)	19,18
Rfree (%)	21,23
Número de átomos: proteína	1970
Número de átomos: água	408
Número de átomos: ligante	1
B (Å ²)	16,85
Erro de coordenadas (baseado em ML) (Å)	0,18
Erro de fase (°)	20,32
Ramachandran favoráveis (%)	98,05
Ramachandran permitidos (%)	1,95
Clashscore de todos os átomos	4,19
Comprimentos de ligação (RMSD) (Å)	0,016
Ângulos de ligação (RMSD) (°)	1,543
Entrada PDB	none

Valores em parenteses se referem a ultima faixa de resolução 1,68 a 1,59Å .

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.1.1 Descrição da estrutura: MetaG3

Em geral, a estrutura cristalina de MetaG3, assim como todas que serão descritas na sequência, se mostrou muito parecida a suas homólogas PETase-like, com um enovelamento α/β -hidrolase sendo composto por uma folha β central de 9 fitas circundados por 8 α -hélices (Figura 43A). O alinhamento tridimensional entre MetaG3 e as PETases tipo I(TfCut), tipo IIa(VgCut) e tipo IIb(IsPETase) resultaram em um RMSD de 0,397, 0,767 e 0,613 Å demonstrando uma forte similaridade estrutural com a PETase tipo I, mas não desviando muito mesmo em diferentes grupos de PETases (Figura 43D).

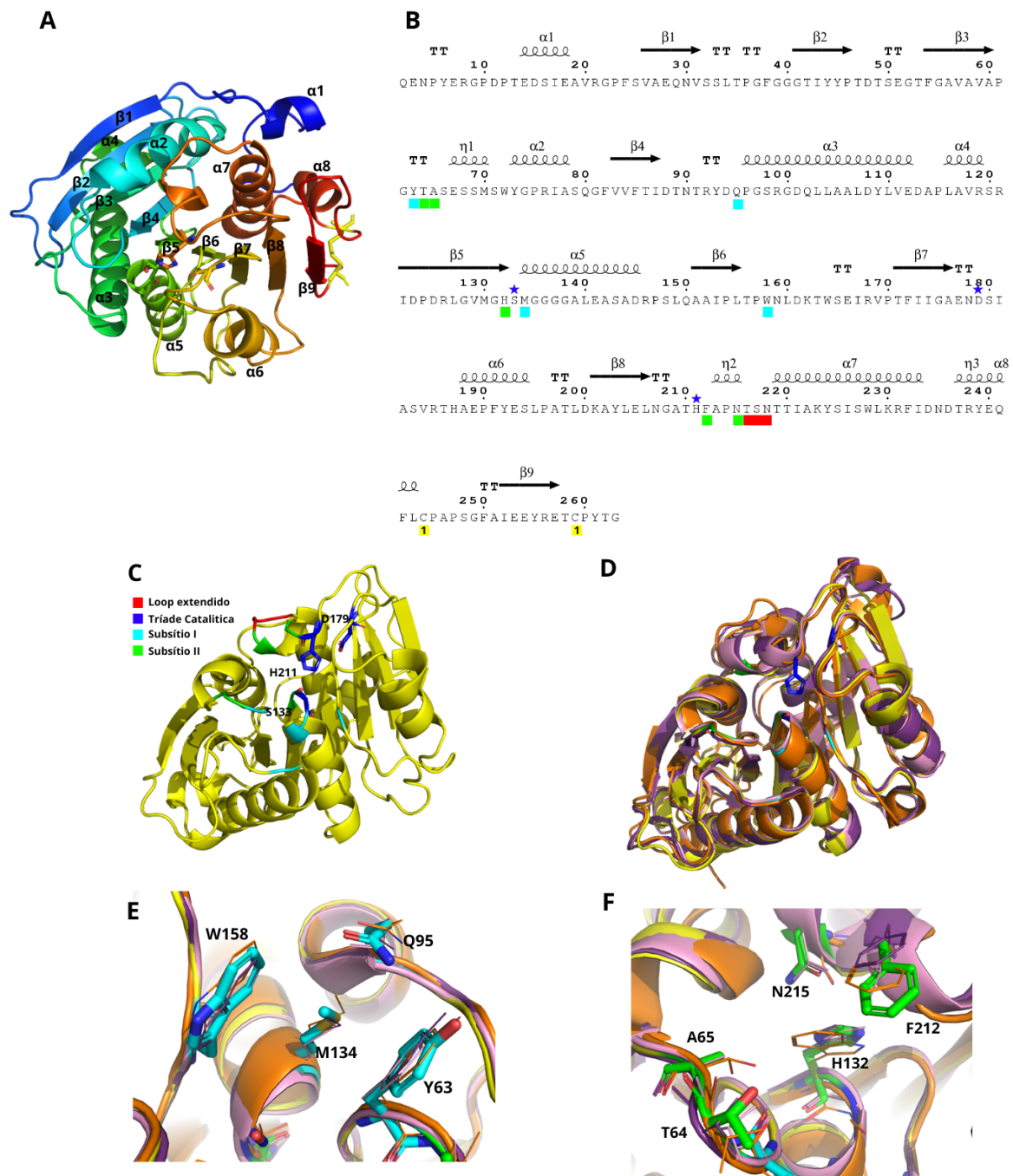


Figura 43 – (A) Estrutura cristalográfica de MetaG3, α -hélices e fitas- β numeradas, cisteínas em amarelo; (B) Sequencia de MetaG3 associada com suas estruturas secundarias, 1 em amarelo representando sua única ponte dissulfeto, quadrados em ciano, verde e vermelho representam os subsítios de ligação I e II e loop estendido respectivamente, estrela azul marca a tríade catalítica; (C) Estrutura cristalográfica de MetaG3 com tríade catalítica, subsítio I, II e loop estendido marcados em azul, ciano, verde e vermelho respectivamente; (D) Comparação entre estruturas de MetaG3 com suas homologas tipo I (TfCut em roxo), tipo IIa (VgCut em laranja) e tipo IIb (IsPETase em rosa), (E) com foco no subsítio de ligação I (F) e subsítio II.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

A posição da tríade catalítica Ser-His-Asp é conservada (Figura 43B e C) e os subsítio I e II são compatíveis com PETases-like tipo I confirmando o proposto no alinhamento das sequencias. No subsítio I, temos uma tirosina na posição S1-1 (Y63), uma glutamina na posição S1-2 (Q95), uma metionina na posição S1-3 (M134) e um triptofano na posição S1-4 (W158), todos bem alinhados com os resíduos de aminoácidos equivalentes em sua homóloga do tipo I TfCut. No subsítio II, temos uma alanina em S2-1 (A65), uma treonina em S2-2 (T64), uma histidina em S2-3 (H132), uma fenilalanina em S2-4 (F212) e uma asparagina em S2-5 (N215). Há um deslocamento da fenilalanina da posição S2-2 em relação à TfCut, no entanto, essa região comumente apresenta variações conformacionais em outras homólogas. Outra características que confirmou MetaG3 como uma PETase-like canonica do tipo I foi a presença de três resíduos no loop estendido que conecta a fita β -8 e α -hélice-7. A única ponte dissulfeto esperada, com base no alinhamento sequencial também esta presente na estrutura. Em suma, o MetaG3 aparenta ser uma integrante canônica das PETase-like do tipo I, sem apresentar grandes surpresas ou novidades estruturais.

3.5.2 MetaG4

Para MetaG4 tivemos sucesso na obtenção de cristais com a aplicação do método de cristalização por difusão de vapor em gota a 20°C. Assim como em MetaG3, os três primeiros kits SaltRx HT, Morpheus I e ShortGun SG1 formaram cristais para G4. Onde os melhores foram selecionados em SaltRx HT (quadro 5)(figura 44).

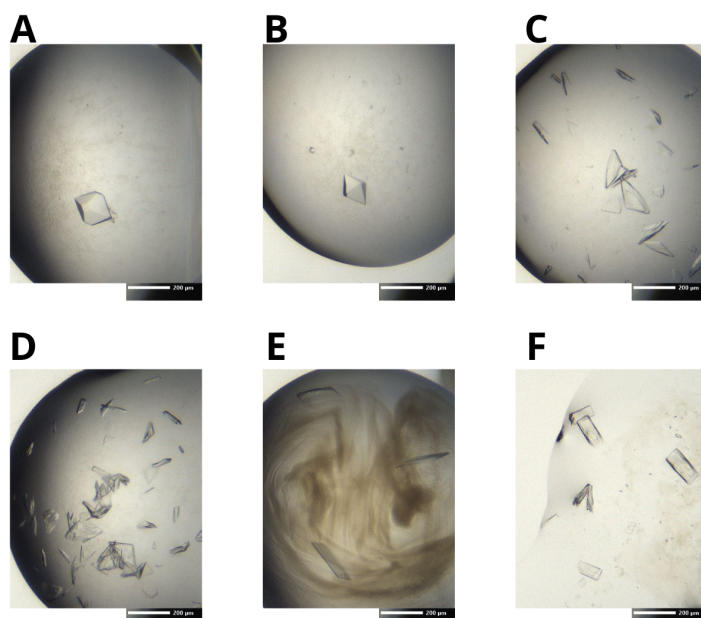


Figura 44 – Cristais de Meta G4, todos a em Salt Rx (A) Condição F2 a 7mg/ml (B) e a 5mg/ml de proteína (C) Condição E9 a 5mg/ml de proteína; (D) e a 2,5mg/ml de proteína (E) Condição A10 a 5mg/ml de proteína (F) condição A7 a 2,5mg/ml de proteína.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 5 – Condições de cristalização MetaG4

Condição	Precipitante	Tampão	Concentração de proteína
F2 SaltRx HT	2,5M de sulfato de amônio	0,1M de propano de BIS-TRIS pH 7,0	7 e 5mg/ml
E9 SaltRx HT	1,8M Fosfato monobásico de sódio monohidratado, Fosfato dibásico de potássio pH 6,9	-	2,5 e 5mg/ml
A10 SaltRx HT	2,2M Cloreto de sódio	0,1M BIS-TRIS propano pH 7,0	5mg/ml
A7 SaltRx HT	3,5M Cloreto de amônio	0,1M BIS-TRIS propano pH 7,0	2,5mg/ml

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dos cristais selecionados para coleta de dados de difração, a condição A10, com proporção 1:1 e concentração inicial de proteína de 5mg/ml, forneceu dados de melhor qualidade. Por fim obtivemos uma estrutura tendo uma molécula na unidade assimétrica, com resolução final de 1,18 Å e valores finais de R_{work} e R_{free} de 16,06% e 17,80%, respectivamente. Parâmetros de coleta de dados, refinamento e controle de qualidade são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tabela de dados MetaG4

Parâmetro	Valor
Fonte de raios X	Diamond
Detector	Eiger2 XE
Parâmetros da célula: a, b, c (Å)	34.15, 76.31, 43.02
Parâmetros da célula: α , β , γ (°)	90.0, 108.2, 90.0
Grupo espacial	$P2_1$
Resolução (Å)	38.15 - 1.18
λ (Å)	0.9795
Multiplicidade	6.3 (3.8)
Rpim (todos I+ e I-) (%)	4.2 (76.1)
CC(1/2)	0.998 (0.340)
Completude (%)	93.6 (56.9)
Reflexões	405748 (10996)
Reflexões únicas	64308 (2857)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8,9 (0,9)
Reflexões utilizadas no refinamento	64257
R (%)	16.06
Rfree (%)	17,80
Número de átomos: proteína	1982
Número de átomos: água	364
Número de átomos: ligante	0
B (Å ²)	11,84
Erro de coordenadas (baseado em ML) (Å)	0,13
Erro de fase (°)	19,37
Ramachandran favoráveis (%)	97,73
Ramachandran permitidos (%)	1,89
Clashscore de todos os átomos	4,87
Comprimentos de ligação (RMSD) (Å)	0,013
Ângulos de ligação (RMSD) (°)	1,307
Entrada PDB	none

Valores em parenteses se referem a ultima faixa de resolução 1,28 a 1,18Å .

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.2.1 G4: Descrição da estrutura

A estrutura cristalina de MetaG4 se mostrou uma α/β -hidrolase sendo composto por uma folha β central de 9 fitas circundados por 7 α -hélices (Figura 45A).

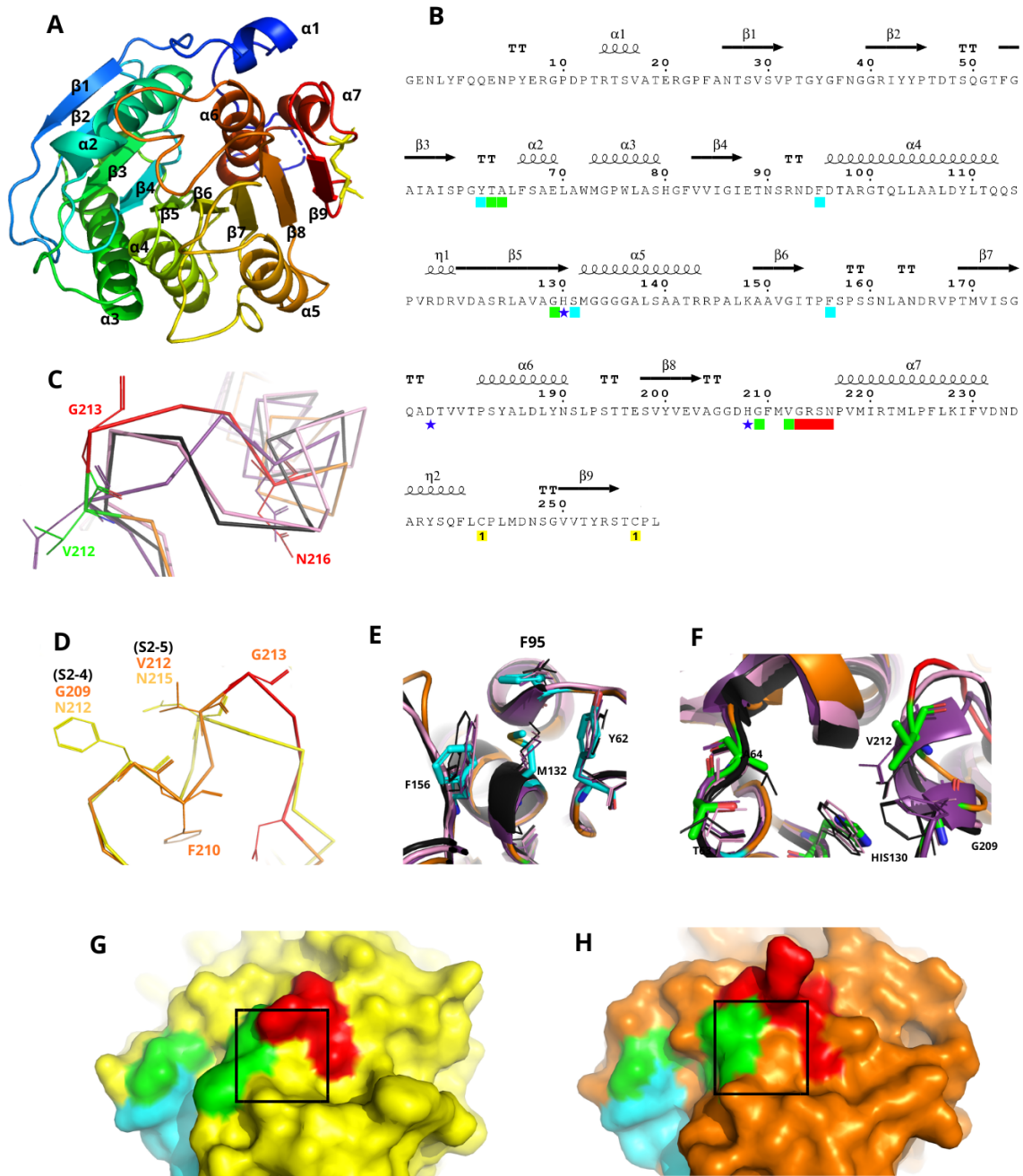


Figura 45 – (A) Estrutura cristalográfica de MetaG4, α -hélices e fitas- β numeradas, cisteínas em amarelo. (B) Sequência de MetaG4 associada com suas estruturas secundárias, 1 em amarelo representando sua única ponte dissulfeto, quadrados em ciano, verde e vermelho representam os subsítios de ligação I e II e loop estendido respectivamente, estrela azul marca a tríade catalítica. (C) Comparação entre o loop estendido de MetaG4, marcado em vermelho com os loops das homologas tipo I (TfCut em roxo), tipo IIa (VgCut em preto) e tipo IIb (IsPETase em rosa). (D) Alinhamento entre as estruturas MetaG3 em amarelo e MetaG4 em laranja (loop estendido de MetaG4 em vermelho). (E) Comparação entre MetaG4 e suas homologas tipo I (TfCut), tipo IIa (VgCut) e tipo IIb (IsPETase) na região do subsítio I (F) e na região do subsítio II. (G) MetaG3 e (H) MetaG4 representados em superfície com subsítio I em ciano, subsítio II em verde e loop estendido em vermelho, região enquadrada destacando a diferença nessa região entre as duas enzimas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na estrutura, mesmo observando que a posição da tríade catalítica (Ser-His-Asp) é conservada, mudanças críticas ocorrem nos subsítios de ligação I e II. Embora o subsítio I seja quase compatível com o de uma PETase-like tipo I, sendo composto por uma tirosina Y62 (S1-1), fenilalanina F95 (S1-2) e metionina M132 (S1-3), onde se esperaria um triptofano na posição S1-4 (não só em tipo I, mas em qualquer PETase-like) temos uma fenilalanina (F156) (Figura 45E). No subsítio de ligação II, também temos mudanças críticas onde observamos uma compatibilidade com PETases tipo I em alguns aminoácidos, como a tirosina T63 (S2-1), alanina A64 (S2-2) e histidina H129 (S2-3). No entanto, na posição onde seria esperada uma fenilalanina na posição S2-4, encontramos uma glicina (G209), e onde seriam esperadas glutamina ou asparagina na posição S2-5, encontramos uma valina (V212)(Figura 45F).

As mudanças no subsítio II só puderam ser observadas por meio da estrutura cristalográfica, uma vez que o primeiro alinhamento sugeriu a presença de uma fenilalanina (F210) canônica em S2-4 e uma glicina (G213) em S2-5. No entanto, ao alinhar as estruturas das homólogas com MetaG4, fica claro que a posição correspondente em S2-4 é ocupado por uma glicina (G209) e a posição S2-5 por uma valina (V212) (Figura 45D e F)(Obs. Alinhamento da figura 39 foi corrigido com base nas estruturas). Com base nessas mudanças, podemos observar que a inserção que inicialmente parecia ocorrer em G209 na verdade ocorre na glicina G213, que agora faz parte do loop estendido, o qual contém quatro aminoácidos, diferindo dos três resíduos característicos do loop estendido encontrado em PETases tipo I. Essa glicina no loop estendido também se mostra crítica, resultando um ângulo ϕ não permitido para outros aminoácidos que por este motivo adquire uma conformação distinta das observadas em suas homólogas tipo I ou tipo II (Figura 45C). Ao compararmos a mesma região com MetaG3, podemos observar que, devido a essa flexibilidade, a região de ligação no subsítio 2 e o loop estendido se torna mais aberto em MetaG4 (Figura 45G e H).

3.5.3 MetaG9

Ao final do processo de purificação de G9, aplicamos o método de cristalização por difusão de vapor em gota sentada a 20°C, utilizando os kits SaltX HT, Shotgun SG1 e Morpheus. Com três meses obtivemos cristais em três condições, sendo esses B7 e B9 em Morpheus I e H12 em Shotgun SG1, com uma proporção de 1:1 e concentração inicial de proteína de 5mg/ml (quadro 6) (Figura 46).

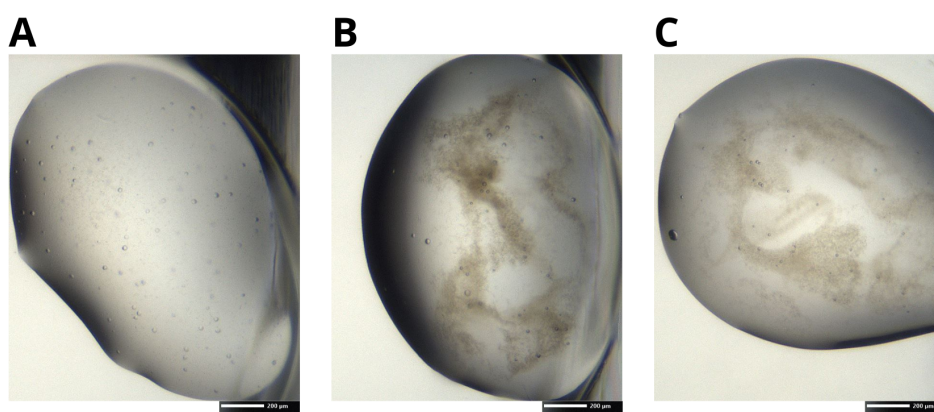


Figura 46 – Cristais de Meta G9, todos a 5mg/ml de concentração inicial (A) e condição H12 ShotGun SG1; (B) condição B7 Morpheus I; (C) condição B9 Morpheus I.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 6 – Condições de cristalização G9

Condição	Precipitante	Tampão	Concentração de proteína
B7 Morpheus I	20% PEG 500, 20% PEG 20000	0,1M HEPES e MOPS (ácido) pH 7,5	5mg/ml
B9 Morpheus I	20% etilenoglicol, 10% PEG 8000	0,1M Tris e BICINA pH 8.5	5mg/ml
H12 ShotGun SG1	4,2M Cloreto de sódio	0,1M Hepes pH 7,5	5mg/ml

Fonte: Elaborado pelo autor.

De todos os cristais selecionados para a coleta, o que apresentou melhores conjuntos de dados foi cortado a uma resolução de 3Å. Neste momento, como tínhamos recém purificado G9 a partir da recuperação dos corpos de inclusão (conforme descrito na metodologia) realizamos novas tentativas de cristalização para G9 com as proteínas recuperadas por meio da repetição da condição de crescimento. Assim obtivemos três novos cristais na condição ShotGun SG1 H12 (4,2M Cloreto de sódio, 0,1M Hepes pH 7,5), desta vez na concentração de 7.4mg/ml (Figura 47).

A partir desta condição, obtivemos uma estrutura com resolução final de 2,32 Å e valores finais de Rwork e Rfree de 19,86 e 22,4% , respectivamente, com oito moléculas na unidade assimétrica. Os parâmetros de coleta de dados e controle de qualidade estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Tabela de dados MetaG9

Parâmetro	Valor
Fonte de raios X	Sirius MANACA
Detector	Pilatus 2M
Parâmetros da célula: a, b, c (Å)	213,57 213,57 145,08
Parâmetros da célula: α , β , γ (°)	90,0, 90,0, 120,0
Grupo espacial	$P6_5$
Resolução (Å)	48,36 – 2,32 (2,46 - 2,32)
λ (Å)	0,977
Multiplicidade	20,619 (21,065)
Rmeas (%)	43,2 (404,6)
CC(1/2)	0,995 (0,370)
Completude (%)	99,4 (100)
Reflexões	3355484 (550141)
Reflexões únicas	162739 (26118)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13,3 (2,4)
Reflexões utilizadas no refinamento	162726
R (%)	19,86
Rfree (%)	22,43
Número de átomos: proteína	16230
Número de átomos: água	724
Número de átomos: ligante	0
B (Å ²)	42,71
Erro de coordenadas (baseado em ML) (Å)	0,31
Erro de fase (°)	21,74
Ramachandran favoráveis (%)	96,52
Ramachandran permitidos (%)	3,29
Clashscore de todos os átomos	4,25
Comprimentos de ligação (RMSD) (Å)	0.005
Ângulos de ligação (RMSD) (°)	0,707
Entrada PDB	none

Valores em parenteses se referem a ultima faixa de resolução 2,46 a 2,32Å .

Fonte: Elaborada pelo autor.

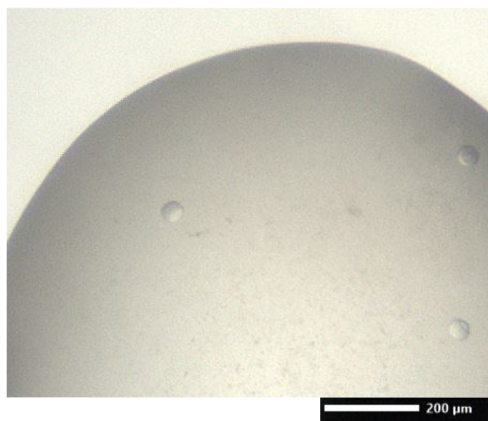


Figura 47 – Cristais selecionados para tentativa de difração, a condição ShotGun SG1 H12, com proporção 1:1 e concentração inicial de proteína de 7.4mg/ml).
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.3.1 G9:Descrição da estrutura

A estrutura cristalográfica da MetaG9, assim como as estruturas mencionadas anteriormente, apresenta um enovelamento canônico α/β -hidrolase, sendo esta composta por 9 fitas beta envolvidas por 6 hélices alfa. Durante a análise do arranjo cristalino, observamos que a célula unitária continha oito proteínas, o que proporcionou uma oportunidade para comparar suas estruturas. No entanto, ao realizar a sobreposição das estruturas, percebemos poucas diferenças conformacionais significativas entre elas. Em particular, os sítios de ligação e o loop estendido se mostraram altamente conservados, com pouca ou nenhuma variação ressaltando a estabilidade estrutural dessas regiões em MetaG9 (Figura 47A).

Quando alinhada tridimensionalmente com suas homologas tipo I(TfCut), tipo IIa (VgCut) e tipo IIb(IsPETase), apresenta o RMSD de 0,688, 0,341 e 0,400Å respectivamente, evidenciando sua similaridade com PETases conhecidas, com destaque a tipo IIa. Seus sítios de ligação são quase totalmente compatíveis com as PETases do tipo IIa, com exceção da presença de uma tirosina (Y158) na posição S1-4 do sítio I, onde normalmente seria esperado um triptofano (Figura 47C). Apesar da diferença no aminoácido da posição S1-4, o sítio de ligação I mostra-se estruturalmente bastante similar às PETases canônicas. O sítio de ligação II é compatível com PETases do tipo IIa, apresentando alta similaridade estrutural nessa região (Figura 47D). O mesmo ocorre com o loop estendido que conecta a fita β -8 com a hélice α -6, confirmando os 6 resíduos previstos no alinhamento sequencial e demonstrando alta similaridade estrutural quando comparada a VgCut ou IsPETase(Figura 47E). A estrutura cristalográfica também confirmou a presença das duas pontes dissulfeto, características das PETases tipo II (Figura 47F).

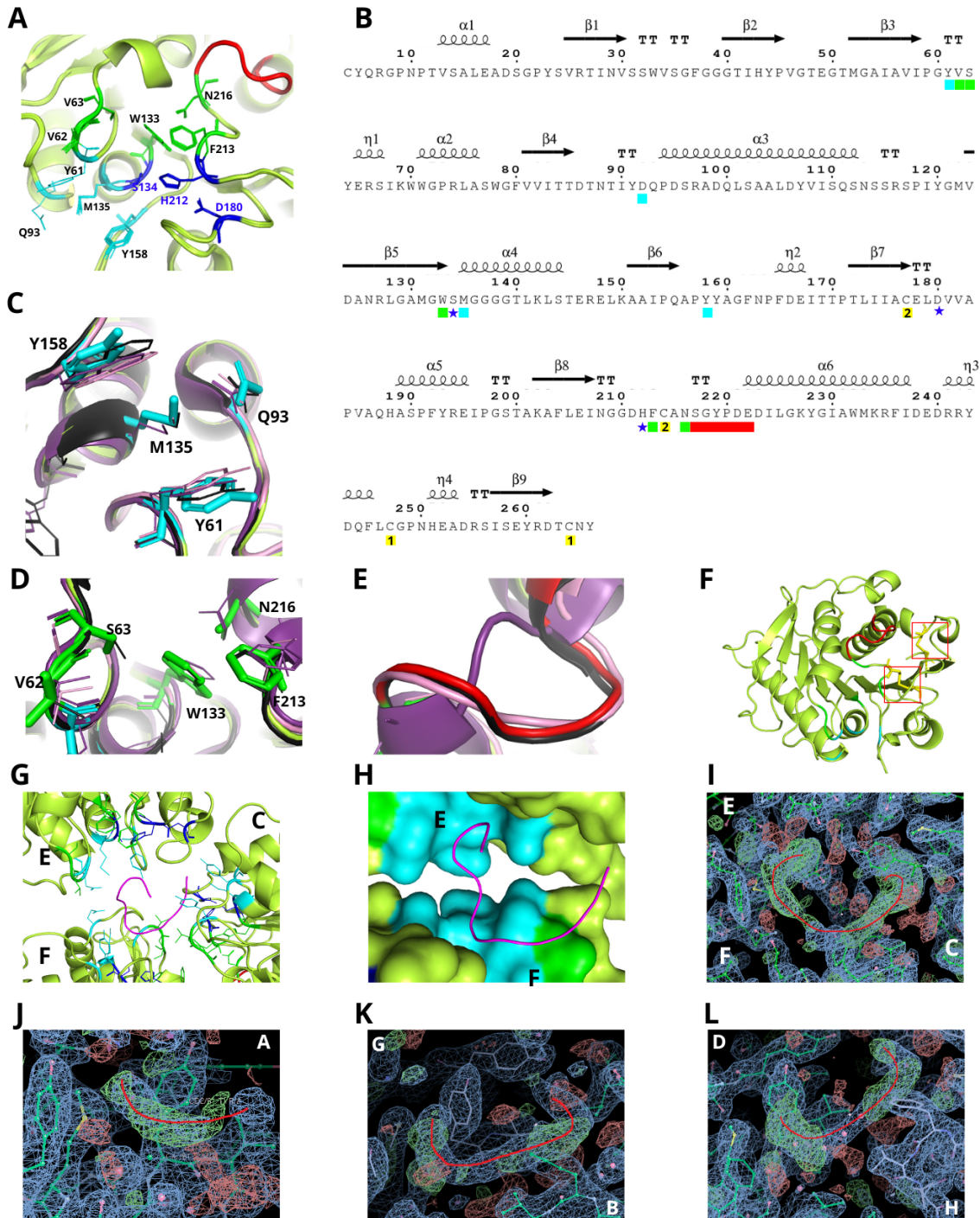


Figura 48 – (A) 8 proteínas (G9) da célula unitária alinhadas tridimensionalmente com destaque aos subsítios de ligação I (ciano), II (verde) e loop estendido (vermelho). (B) Sequência de G9 associada com suas estruturas secundárias, quadrados em ciano, verde, vermelho e amarelo representam os subsítios de ligação I e II, loop estendido e pontes dissulfeto respectivamente, estrela azul marca a tríade catalítica. (C) Comparação entre subsítio I (ciano), (D) subsítio II (verde) e (E) loop estendido (vermelho) de G9 com homologas tipo I (TfCut em roxo), tipo IIa (VgCut em preto) e tipo IIb (IsPETase em rosa) (F) Estrutura de G9 destacando duas pontes dissulfeto (G) Representação em cartoon e em (H) surface entre ligante (rosa) com subsítios de ligação I entre cadeias C, E e F. (I) Mapa de densidade destacando (em vermelho) ligantes das cadeias C, E e F; (J) cadeia A; (K) cadeias B e G e (L) cadeias D e H.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outra característica interessante observada no mapa de densidade de MetaG9 é a presença de um ligante não identificado que está presente em todas as 8 proteínas da célula unitária. Com destaque a uma longa região de densidade eletrônica encontrado entre as cadeias C, E e F, que se encaixa nos subsítios de ligação I nas três proteínas (Figura 47 G, H e I). Esse mesmo padrão é repetido nas outras proteínas da célula unitária, embora com um ligante reduzido na cadeia A e dois ligantes compartilhados pelas cadeias B-G e D-H (Figura 47 J, K e L). No entanto vale destacar que a identidade desses ligantes ainda não foram determinadas. Uma vez que não há nada na condição de cristalização que explicaria essa densidade, suponha-se que deve ter adquirido da bactéria. A presença do ligante sugere que o sitio de ligação I deva ter certa tolerância e que talvez seja capaz de ligar outros substratos. Uma vez que o mesmo não foi observado com os demais MetaG's, são necessárias investigações mais aprofundadas para uma maior compreensão.

3.5.4 Mors1

Ao aplicar o método de cristalização por difusão de vapor em gota a 20°C, utilizamos os kits MORPHEUS (Molecular Dimensions), JCSG+Suite (Qiagen), BCS (Molecular Dimensions), ShotGun SG1 (Molecular Dimensions) e Index (Hampton Research). Com oito meses obtivemos cristais em uma única condição, sendo C2 em ShotGun SG1 (1,4 M Malonato de Sódio dibásico monoidratado, pH 7.0), com uma proporção de 1:1 e concentração inicial de proteína de 0,8mg/ml (Figura 49).

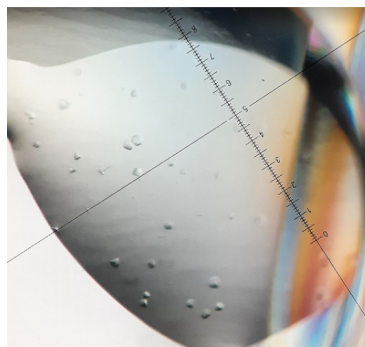


Figura 49 – Cristais de Mors na condição C2 ShotGun SG1 (1,4 M Malonato de Sódio dibásico monoidratado, pH 7.0) e 0,8mg/ml de proteína.

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir desta condição, obtivemos uma estrutura com duas moléculas na unidade assimétrica resolução final de 1,6 Å e valores finais de R_{work} e R_{free} de 15,44 e 17,97%, respectivamente. Os parâmetros de coleta de dados e controle de qualidade estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Tabela de dados Mors1

Parâmetro	Valor
Fonte de raios X	Sirius MANACA
Detector	Pilatus 2M
Parâmetros da célula: a, b, c (Å)	131,18, 131,18, 131,18
Parâmetros da célula: α , β , γ (°)	90,0, 90,0, 90,0
Grupo espacial	$P2_13$
Resolução (Å)	92,76 – 1.60 (1,68 – 1,60)
λ (Å)	0,977
Multiplicidade	38,4 (39,3)
Rpim (todos I+ e I-) (%)	4,4 (35,4)
CC(1/2)	0,999 (0,813)
Completude (%)	99.83 (100)
Reflexões	38650 (38650)
Reflexões únicas	99279 (14382)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13,3 (2,4)
Reflexões utilizadas no refinamento	99233
R (%)	15,44
Rfree (%)	17,97
Número de átomos: proteína	4112
Número de átomos: água	712
Número de átomos: ligante	18
B (Å ²)	14,48
Erro de coordenadas (baseado em ML) (Å)	0,15
Erro de fase (°)	17,08
Ramachandran favoráveis (%)	96,39
Ramachandran permitidos (%)	3,23
Clashscore de todos os átomos	3,81
Comprimentos de ligação (RMSD) (Å)	0,017
Ângulos de ligação (RMSD) (°)	1,501
Entrada PDB	8SPK

Valores em parenteses se referem a ultima faixa de resolução 1,68 a 1,60Å .

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.4.1 Mors1: Descrição da estrutura

A estrutura cristalográfica da Mors1, assim como suas homologas, apresentou um enovelamento canônico α/β -hydrolase tendo um centro composto por 9 fitas beta envolvido por 6 alfa hélices (Figura 50A). A tríade catalítica Ser-His-Asp está localizada na mesma posição das suas homólogas. No entanto, duas mudanças ocorrem no subsítio de ligação I, na posição S1-2, temos um ácido aspártico (D153) em vez de uma glutamina e na posição S1-4, uma tirosina (Y214) onde seria esperado um triptofano, ambos resíduos altamente conservados em PETases-like. Com essa diferença entre aminoácidos, não só o subsítio de ligação I é alterado, mas também o loop que conecta as fitas β -6 e β -7, que migra em

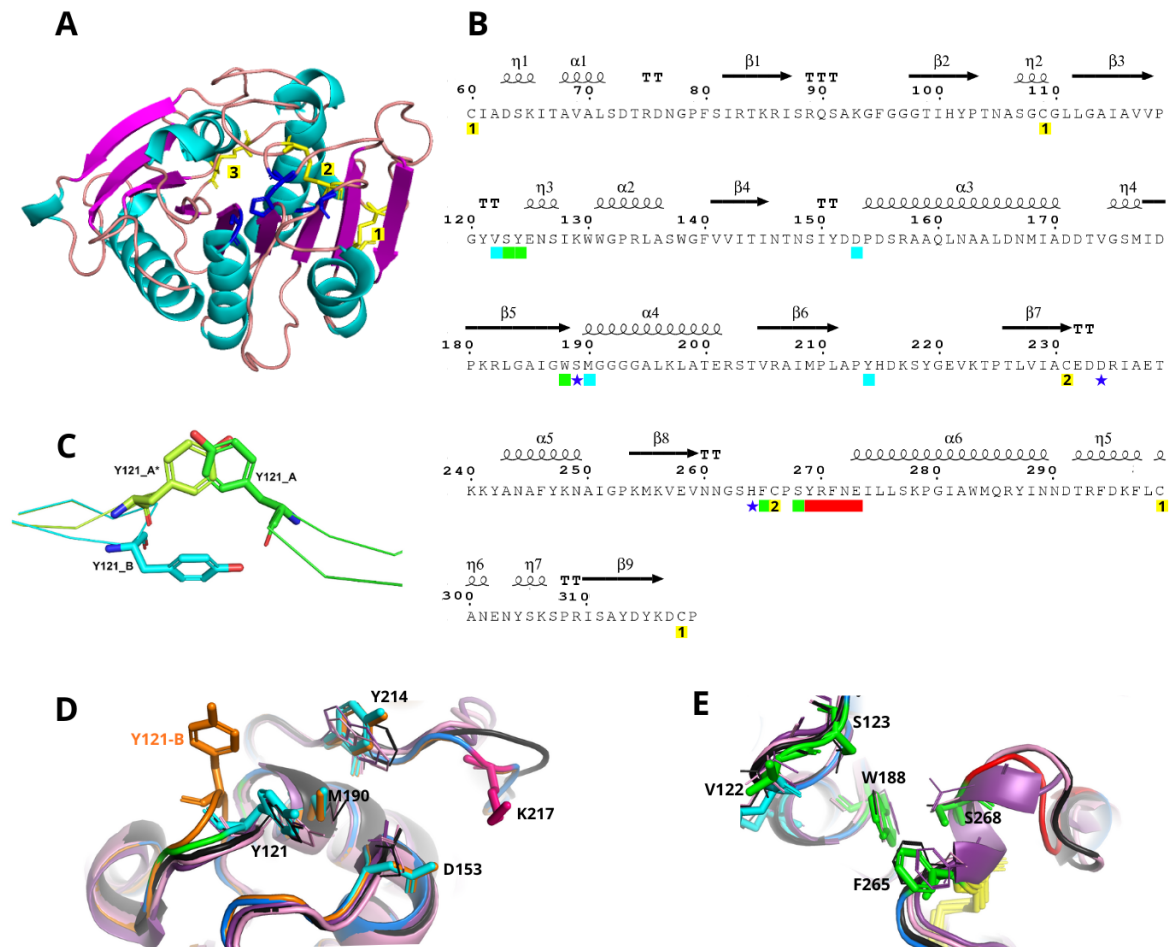


Figura 50 – (A) Estrutura cristalográfica de Mors1, α -hélices destacadas em ciano, fitas- β em rosa choque, loops em rosa leve, cisteínas em amarelo e tríade catalítica em azul; (B) Sequencia de Mors1 associada com suas estruturas secundarias, quadrados em ciano, verde, vermelho e amarelo representam os subsítios de ligação I e II, loop estendido e pontes dissulfeto respectivamente, estrela azul marca a tríade catalítica. (C) Representação em sticks das diferentes conformações observadas para Y121 nas cadeias A e B (em verde e azul, respectivamente). Em amarelo é mostrada a posição que Y121 adotaria na subunidade B se a simetria perfeita de dois eixos fosse mantida. Y121A* é, portanto, a posição gerada aplicando uma rotação de 180° a Y121A, resultando em um choque estérico severo. (D) Comparação entre a cadeia A de Mors1 no subsítio I (ciano), (D) subsítio II (verde) e loop estendido (vermelho) de Mors1 com homologas tipo I (TfCut em roxo), tipo IIa (VgCut em preto) e tipo IIb (IsPETase em rosa) e cadeia B de Mors1 (em laranja).

Fonte: Elaborada pelo autor.

direção à hélice α -2, possivelmente devido à interação entre os resíduos de lisina (K217) carregados positivamente com o ácido aspártico (D153) com carga negativa (Figura 50D). O subsítio de ligação II é em sua maior parte compatível com PETases tipo IIa com uma serina (S268) na posição S2-1 onde se esperaria uma asparagina, porém com baixa variação conformacional na região do subsítio II quando comparada a suas homologas

(Figura 50E). Confirmando o previsto no primeiro alinhamento sequencial, Mors1 também apresenta uma variação no loop estendido, quando comparado a PETases-like, contendo 5 aminoácidos ao invés dos 6 canônicos em tipos II. (7)

As duas moléculas na unidade assimétrica estão relacionadas por um eixo de ordem dois não cristalográfico. A cadeia lateral de Y121 da cadeia A (Y121A) está localizada nesse eixo, forçando a quebra da simetria perfeita e resultando em uma nova conformação da cadeia lateral e da cadeia principal ao redor de Y121 da cadeia B (Y121B). Enquanto Y121A adota a conformação canônica observada em outras enzimas PETases-like, onde faz parte da parede do sítio de ligação ao substrato, Y121B é deslocada em cerca de 6 Å para evitar o choque estérico (Figura 50C). Isso leva a uma obstrução parcial do sítio de ligação e requer alterações na cadeia principal antes tirosina Y121, incluindo uma ligação peptídica cis Pro-Gly bastante incomum. A exigência de isomerização da ligação peptídica para que a cristalização ocorra pode explicar o tempo excepcionalmente longo para o surgimento dos primeiros cristais (8 meses). Vale ressaltar que essa parte do mapa mostrou fortes sinais de desordem, indicando que esta região da molécula talvez seja mais flexível do que o visto até o momento.

A estrutura cristalina de Mors1 também nos permitiu confirmar a presença de uma terceira ligação dissulfeto. Mors1 contém a ligação dissulfeto C-terminal canônica entre C299-C318 presente em todas as PETases (DB3), uma ligação dissulfeto no sítio ativo entre C231-C266 exclusiva das PETases tipo II e uma ligação dissulfeto N-terminal entre os resíduos C60 e C109 (DB1) encontrada em Mors1, porém não canônica entre as PETases-like. Também é importante destacar que a sequência N-terminal de Mors1, onde está localizada a terceira ponte dissulfeto, apresenta variações sequenciais significativas em comparação com o restante das enzimas degradadoras de PET estudadas. A presença dessa ponte dissulfeto adicional pode conferir estabilidade adicional a essa região não conservada da proteína. (32)

3.5.5 Outros ensaios de cristalização

Durante o decorrer deste trabalho diversos ensaios cristalográficos foram realizados para as diferentes PETases-like. Embora tivemos sucesso na obtenção da estrutura cristalográfica para MetaG3, MetaG4, MetaG9 e Mors1, o mesmo não ocorreu para maior parte das enzimas purificadas. Para estas, além dos três kits citados anteriormente SaltX HT, Morpheus I e ShortGun SG1, também realizamos o ensaio com os kits comerciais Index HR, JCSG Plus e Cristal Screen. Assim obtivemos cristais para MetaG1, MetaG6, MetaG7, MetaG5 e MetaG4CBM, porém sem condições de difração, onde os cristais se mostraram muito pequenos para coleta ou, no caso de MetaG7, não houve pontos suficientes (durante a coleta) para a indexação (Figura 51).

Quadro 7 – Outras condições de cristalização

Proteína	Condição	Precipitante	Tampão	Concentração de proteína
MetaG1	B1 SaltRx HT	3,2M Cloreto de sódio	0,1M de propano de BIS-TRIS pH 7,0	1mg/ml
MetaG4cbm	F4 Morpheus I	1,8M 12,5% PEG 1000, PEG 3350 e MPD	0,1 M Imidazol e MES monohidrato pH 6,5	5mg/ml
MetaG4cbm	E12 Morpheus I	1,8M 12,5% PEG 1000, PEG 3350 e MPD	0,1 M Tris e BICINA pH 8,5	5mg/ml
MetaG5	C2 SaltRx HT	1,8 M de Fosfato de sódio monobásico monoidratado, Fosfato de potássio dibásico / pH 6,9	–	1,5mg/ml
MetaG6	A7 SaltRx HT	0,7 M de Formiato de magnésio di-hidratado	0,1M BIS-TRIS propano pH 7,0	2,5mg/ml
MetaG7	C4 JCSG Plus	10% de Polietileno glicol 6,000	0,1M HEPES pH 7.0	14mg/ml

Fonte: Elaborado pelo autor.

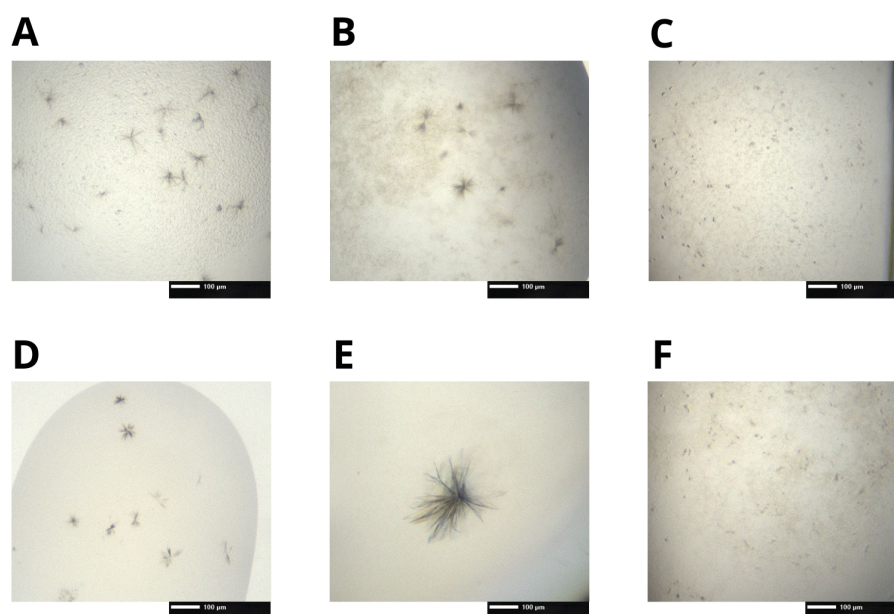


Figura 51 – (A) MetaG1 Condição B1 SaltRx HT a 1mg/ml (B) G5 condição E9 SaltRx HT e a 1,5mg/ml de proteína (C) MetaG4CBM condição F4 Morpheus I a 5mg/ml de proteína; (D) MetaG6 condição C2 SaltRx e a 2,5mg/ml de proteína (E) MetaG7 condição C4 JCSG a 5mg/ml de proteína (F) MetaG4CBM condição E12 Morpheus I a 5mg/ml de proteína.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Sem sucesso na difração dos cristais produzidos, iniciamos a otimização das condições experimentais. Para a proteína MetaG4CMB (que é a mesma enzima MetaG4 que resolvemos, porem com um domínio extra de ligação a carboidratos), iniciamos a otimização com uma varredura de pH e concentração de precipitante. No entanto, o primeiro ensaio gerou cristais muito pequenos. Diante disso, aplicamos uma estratégia de seeding, que resultou em cristais semelhantes aos anteriores e ineficientes para coleta. Além disso, realizamos uma co-cristalização com outra PETase (MetaG4CBM + MetaG1), que gerou cristais difratáveis, porem ao resolver a estrutura, conseguimos ver apenas o domínio enzimático MetaG4, não nos resultando em nenhuma informação nova. Os cristais de MetaG4CBM cresceram ao longo de um período de 1 a 2 meses, o que dificultou o processo de otimização. Isso pode indicar que o domínio catalítico esta flexível em relação ao domínio CBM, o que provavelmente se deve a natureza do linker (loop que conecta os dois domínios) cuja a extensão resulta na desordem relativa dos domínios.

No caso de MetaG7, as mesmas estrategias foram utilizadas. Todavia, significantes melhorias foram observadas na qualidade dos cristais ao abrir a condição inicial (C4 em JCSG Plus - quadro 7) e diminuir a temperatura de incubamento para 4°C. Os cristais de MetaG7 otimizados cresceram em um mês na condição 9% de Polietileno glicol 6,000 e 0,1M HEPES pH 6.0 com concentração de 10g/ml de proteína a 4°C e foram congelados para a próxima coleta (Figura 52).

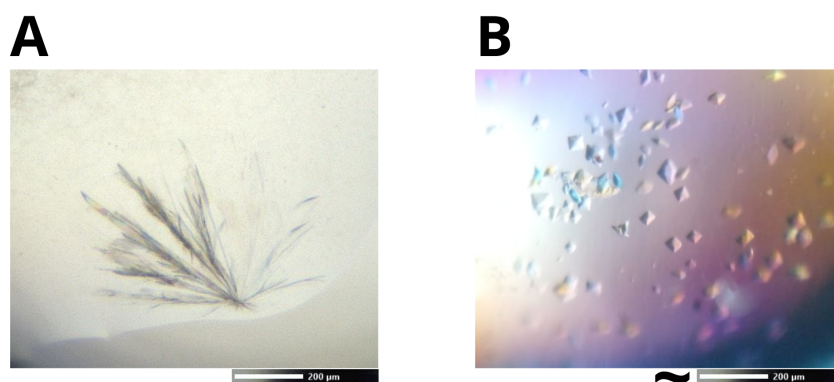


Figura 52 – Cristais de MetaG7 na condição 9% de Polietileno glicol 6,000 e 0,1M HEPES pH 6.0 com concentração de proteína (A) 14mg/ml a 20°C e (B) e 10mg/ml a 4°C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Poucas tentativas de otimização foram aplicadas a MetaG1 e MetaG6 devido a dificuldade de obtenção e/ou armazenamento das proteínas. Mesmo assim ensaios com abertura de pH e concentração de precipitantes foram aplicados, também sem sucesso.

3.6 Estruturas AlphaFold

Para as potenciais PETases não resolvidas por cristalografia, fizemos a predição da estrutura tridimensional via AlphaFold2 (Figura 53).

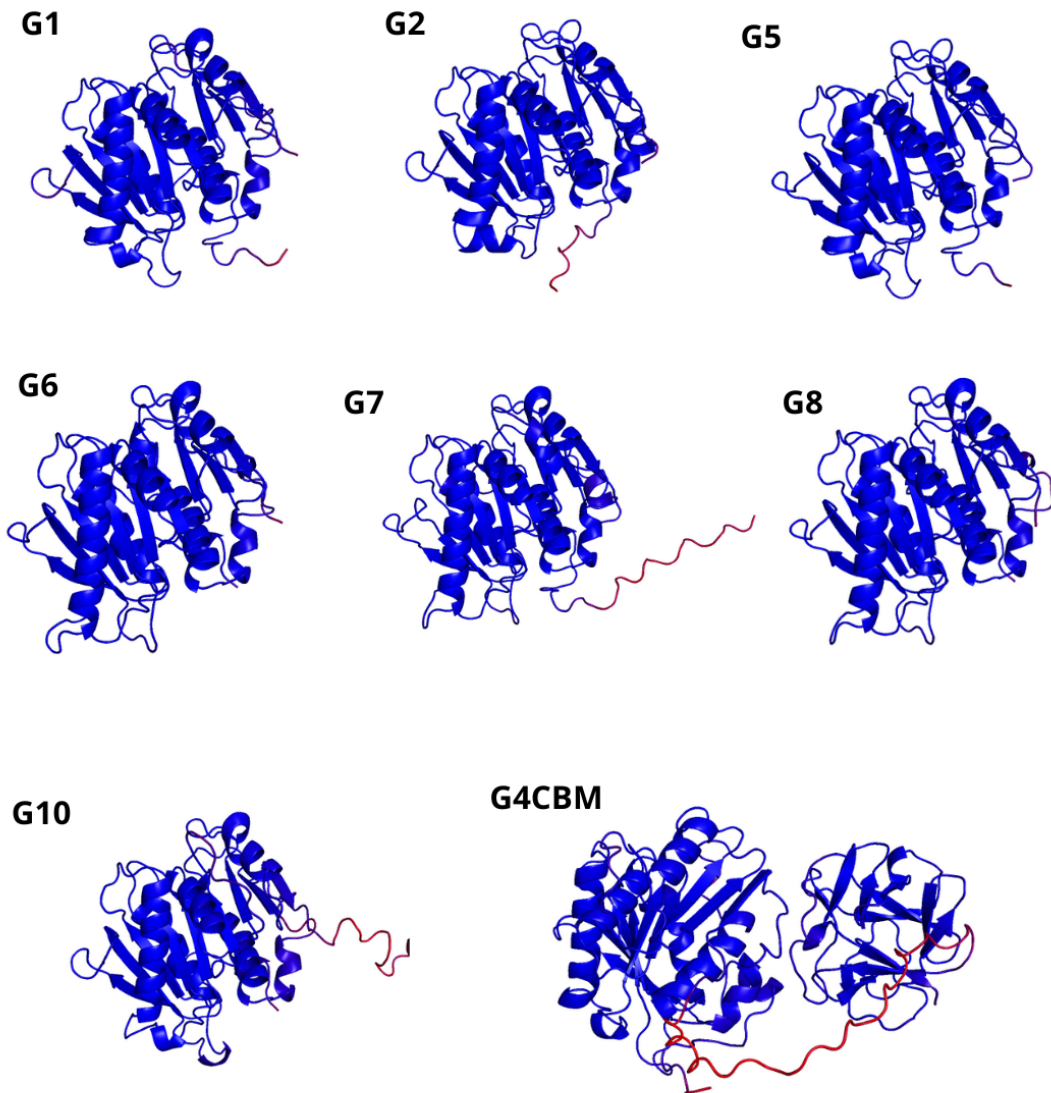


Figura 53 – Estruturas preditas pelo AlphaFold2, representadas usando um sistema de cores que reflete a confiabilidade das predições baseado em IDDT (Local Distance Difference Test). Nesse sistema, as regiões em azul escuro são consideradas mais confiáveis, enquanto as regiões em vermelho são menos confiáveis.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As estruturas teóricas preditas indicam alto grau de confiabilidade (indicada pela cor azul escura), com a excessão das regiões mais flexíveis, usualmente nos N-terminais.

As regiões desordenadas no N-terminal em MetaG1, MetaG2, MetaG5 e em particular MetaG7 e MetaG10, podem ser um motivo para a dificuldade de cristalização destas proteínas. Esse resultado pode ser valioso no sentido de indicar possíveis formas de construção, eliminando a região flexível e visando novas tentativas de cristalização. Dentre as estruturas resolvidas, MetaG4CBM se destaca por possuir um domínio de ligação a açúcar (CBM) além de seu domínio enzimático. Além disso seu linker (que conecta o domínio enzimático e o domínio CBM) mostra baixa confiabilidade, podendo este ser mais um indicio de flexibilidade, sugerido anteriormente. Devido a essa particularidade, dedicaremos uma seção especial(3.10) para discutir essa estrutura em mais detalhes.

3.7 Docking molecular

Com intuito de entender melhor a interação entre PET e as potenciais PETases, realizamos o docking molecular usando as mesmas e um fragmento de PET (composto por três monômeros). Com isso obtivemos um encaixe adequado para quatro estruturas teóricas (MetaG1, MetaG2, MetaG6, MetaG8) e uma estrutura experimental (MetaG3). Dessas, três (MetaG2, MetaG3 e MetaG8) pertencem às quatro PETases-like canônicas juntamente com MetaG5, dentre as 11 estudadas neste trabalho, sendo MetaG2, MetaG3 e MetaG5 do tipo I e MetaG8 do tipo IIa. Com objetivo de comparação, fizemos inicialmente um docking com os mesmos parâmetros para a PETase conhecida, IsPETase (7) (codigo PDB : 5XJH) (Figura 54).

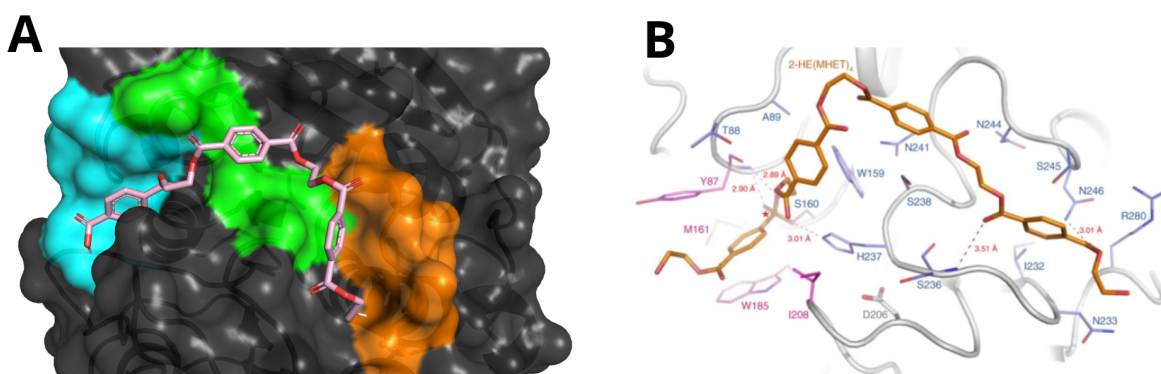


Figura 54 – Docking realizado entre o fragmento de PET e a estrutura IsPETase. Subsítios de ligação I em ciano, subsítio II em verde e loop estendido em laranja.(B) Docking realizado entre a 2-HE(MHET)₄ e IsPETase.
Fonte: Adaptada de HAN *et al.* (7)

Tabela 5 – Tabela de docking

Proteína	Score
MetaG1	-5,9 kcal/mol
MetaG2	-5,5 kcal/mol
MetaG3	-5,6 kcal/mol
MetaG6	-6,2 kcal/mol
MetaG8	-7,7 kcal/mol
IsPETase	-7,7 kcal/mol

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como podemos observar na figura 54 , o fragmento de PET adotou uma conformação semelhante à molécula 2-HE(MHET)4 quando acoplada à IsPETase, como relatado por Han, X. *et al.* (7), uma PETase tipo I1b (7), com pequenas mudanças ocorrendo nas regiões de ligação (grupo etileno), o que não surpreende devido a sua flexibilidade.

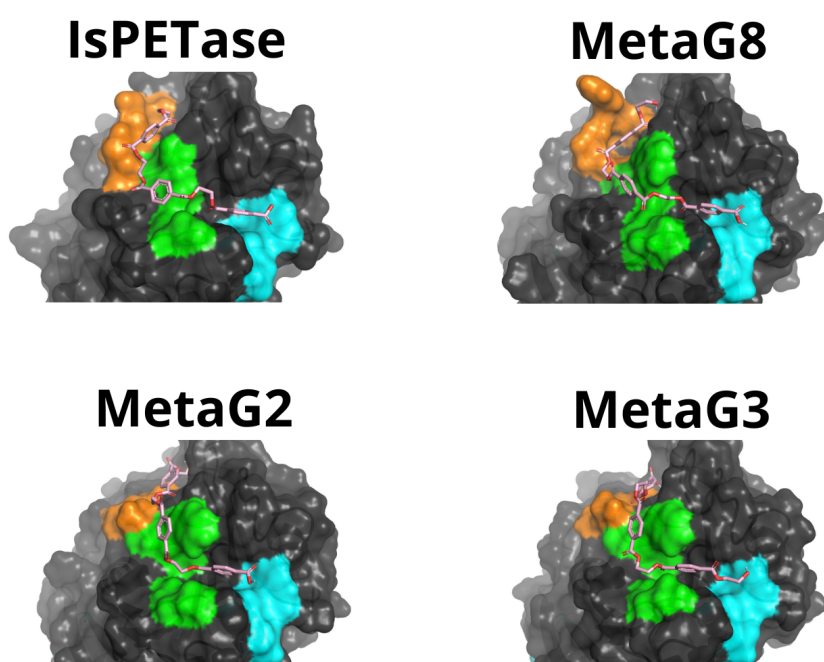


Figura 55 – Docking realizado entre o fragmento de PET e as estruturas de IsPETase , MetaG8, MetaG2 e MetaG3. Subsítios de ligação I em ciano, subsítio II em verde e loop estendido em laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No caso do MetaG8, a conformação foi muito similar a IsPETase (figura 55), evidenciando os bolsões presentes na superfície da PETase-like tipo I1a. Já para nossas PETases-like do tipo I, MetaG3 e MetaG2, foi necessário ocorrer uma alteração conformacional a fim de acomodar o fragmento de PET , o que pode ser uma possível explicação para

a redução da energia de ligação (tabela 55). Essa mudança conformacional em MetaG3 e MetaG2 pode ser atribuído, em parte, à diminuição do bolsão que conecta a asparagina da posição S2-5 do subsítio II a treonina do loop estendido subsequente (T216 em MetaG3, T214 em MetaG2), que no caso de PETases tipo I são reduzidos em comparação a tipo II (figura 56).

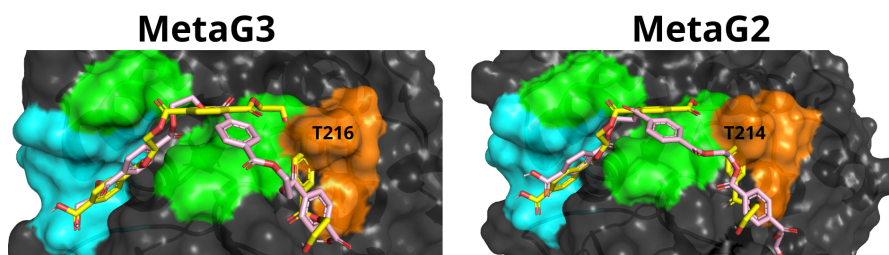


Figura 56 – Estruturas de MetaG3 e MetaG2 (mostrada na forma de superfície) com ligante docado (em rosa), sobreposto a posição do mesmo ligante(em amarelo) encontrada em MetaG8, subsítio I destacado em ciano, subsítio II em verde e loop estendido destacado em laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as PETases-like não canônicas (que não possuem os resíduos do subsítio I ou II conservados para tipo I ou II), conseguimos realizar o docking para as estruturas teóricas MetaG1 e MetaG6. As mudanças sequenciais comentadas no alinhamento não pareceram causar mudanças significativas nos sulcos responsáveis pela ligação do fragmento de PET. Em ambas, a conformação assumida pelo ligante foi similar a observada em PETases tipo I descritas anteriormente (MetaG3 e MetaG2), mesmo com MetaG6 sendo mais próxima das tipo II (figura 57).

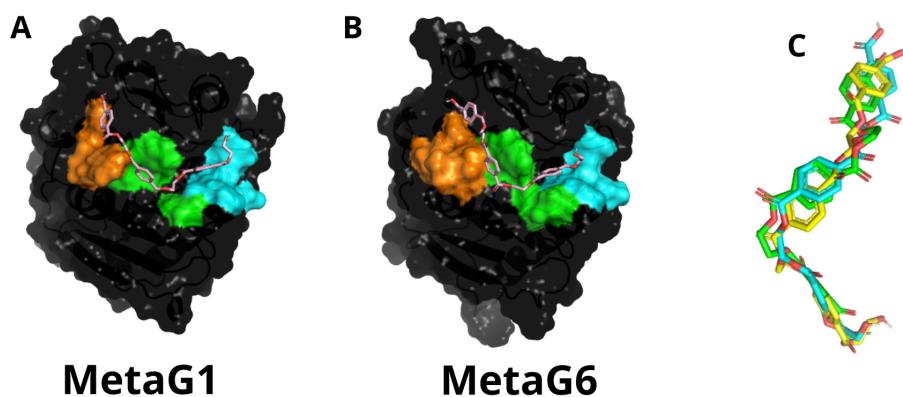


Figura 57 – (A) Docking da estrutura AlphaFold de MetaG1 e MetaG6. Subsítios de ligação I em ciano, subsítio II em verde e loop estendido em laranja . (C) Posicionamento de PET ligado a G3 (verde), G1 (amarelo) e G6 (ciano).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para MetaG5, que é uma PETase-like canônica tipo I, curiosamente não foi possível o encaixe do fragmento de PET. Ao investigarmos a estrutura, podemos observar que uma possível causa está relacionada ao estreitamento de um sulco próximo ao final do loop estendido, mais especificamente próximo à asparagina N215 (em MetaG5). Isso ocorre devido a ocorrência de um ácido glutâmico (E206) na posição onde observamos glicinas e alaninas nas suas homologas (figura 58). Como a posição ocupada por esse aminoácido não foi descrita anteriormente, esse resultado pode ser um indício de mais uma região crítica para as PETases. No entanto, para obter conclusões mais precisas, são necessários estudos estruturais adicionais, como a utilização de estruturas cristalográficas, preferencialmente ligado a algum substrato análogo a PET.

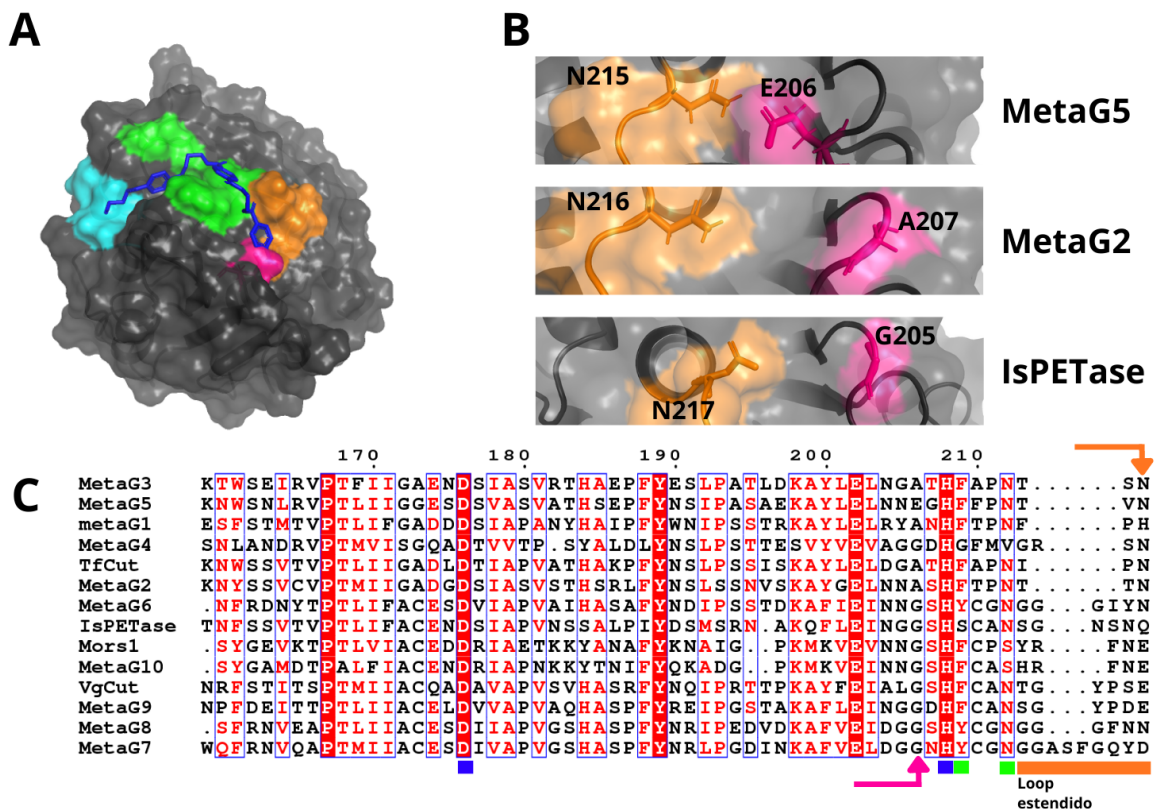


Figura 58 – (A) Estrutura AlphaFold de MetaG5 sobreposta com MetaG3(omitida) e seu ligante em azul, onde podemos observar o choque entre o ligante e a região formada pelo fim do loop (laranja) e o ácido glutâmico (rosa); (B) Comparação entre a mesma região, no fim do loop estendido, entre MetaG5, MetaG2 e IsPETase; (C) Alinhamento entre homologas (numeração referente a MetaG5) com destaque ao surgimento do ácido glutâmico destacada pela seta rosa, o final do loop estendido está marcada pela seta laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A tentativa falha de docking molecular também nos atentou a outras mudanças críticas nas nossas PETases-like não canônicas. Começando pela estrutura cristalográfica de MetaG4 que como descrita no alinhamento, e posteriormente corrigida na descrição da estrutura cristalográfica possui um numero significativos de diferenças em seus subsítios de ligação (substituições W156F na posição S1-4, F209G na posição S2-4 e (E,Q)212V na posição S2-5). Mas ao avaliar a superfície de MetaG4 na região de ligação, encontramos novas características notáveis em sua conformação. A principal certamente é o surgimento de um ácido glutâmico E69, que não está presente em nenhuma das homólogas estudadas nesta dissertação que ocupa um sulco do subsítio de ligação devido a inserção de uma alanina A68. Esse aminoácido extra faz com que E69 forme uma protuberância onde antes havia um sulco entre o sítio II e o loop estendido, impedindo o encaixe do fragmento de PET. Essa protuberância, como podemos observar na imagem 59, é formada por dois aminoácidos "inesperados", a valina, presente no subsítio II (onde normalmente esperaríamos um glutamato ou glutamina), e o acido glutâmico E69.

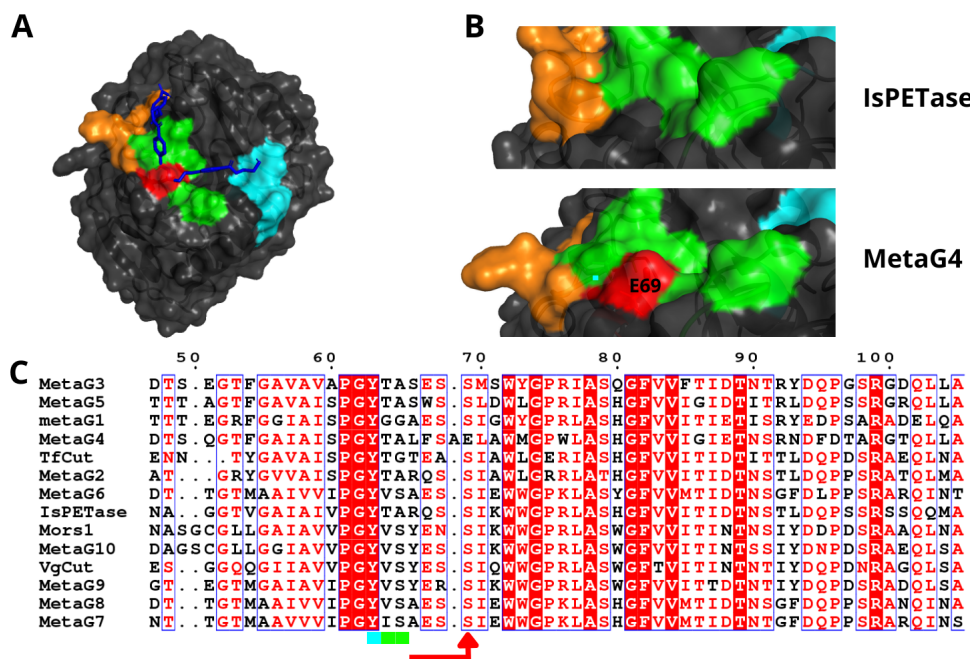


Figura 59 – (A) Estrutura cristalográfica de MetaG4 (mostrada em superfície) junto com ligante na posição encontrada em MetaG8 onde podemos observar o choque entre o ligante e ácido glutâmico (vermelho); (B) Comparação entre a mesma região entre IsPETase e MetaG4; Subsítios de ligação I em ciano, subsítio II em verde, loop estendido em laranja e ácido glutâmico em vermelho. (C) Alinhamento entre homólogas (numeração referente a MetaG4) com destaque ao ácido glutâmico na posição indicada pela seta vermelha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estrutura cristalográfica de MetaG9 e Mors1 também falhou no docking molecular com fragmento de PET. Todavia, como podemos observar da figura 60, as mudanças

no subsítio de ligação comentadas na descrição das estruturas cristalográficas, pouco influenciaram na profundidade do bolsão. O impedimento para o docking em ambas as enzimas, vem do posicionamento do loop estendido, possivelmente devido aos resíduos aromáticos, tirosina Y219 em MetaG9 e fenilalanina F214 em Mors1. Como o loop flexível de ambas MetaG9 e Mors1 é canônico em PETases-like, possivelmente esse impedimento vem devido ao estado de energia do sistema ao qual a estrutura foi resolvida (relacionado a forças de empacotamento cristalino).

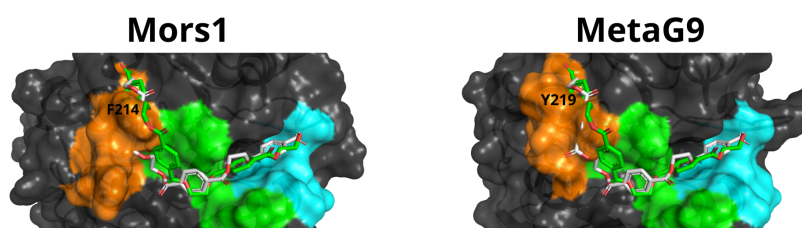


Figura 60 – Estrutura cristalográfica de MetaG9 e Mors1 (representadas em superfícies) sobrepostas com MetaG3 e IsPETase(omitidas) com seus ligantes, podemos observar o choque entre entre o ligantes (de MetaG3 em verde e IsPETase em branco) e os resíduos aromáticos de MetaG9(Y219) e Mors1(F214) que pertencem ao loop estendido. Subsítios de ligação I em ciano, subsítio II em verde e loop estendido em laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mesmo fenômeno ocorre com as estruturas de Alphafold2 para MetaG7, todavia, com mudanças consideravelmente mais críticas. O que parecia ser um loop extremamente alongado na região de MetaG7 (com 9 resíduos), revelou-se, pela estrutura teórica, um loop característico das PETases tipo II (6 resíduos), porém com uma hélice alfa estendida (alfa-6) no final de sua extensão. Assim, ocorre a formação de uma protuberância no fim do loop estendido, formado pelos aminoácidos, glutamina Q236 e tirosina Y237 (figura 61).

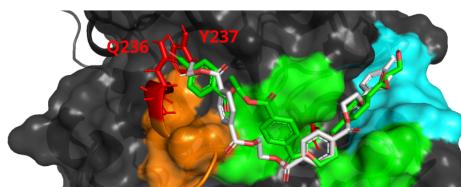


Figura 61 – Estrutura predita de MetaG7 (representada em cartoon) sobreposta com MetaG3(em superfície) e IsPETase(omitida) com seus respectivos ligantes, podemos observar o choque entre entre o ligantes (de MetaG3 em verde e IsPETase em branco) e os resíduos no início da alpha helice estendida, glutamina Q236 e tirosina Y237. Subsítios de ligação I em ciano, subsítio II em verde e loop estendido em laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Vale ressaltar que as tentativas de docking foram realizadas com o objetivo de auxiliar nossa compreensão dos subsítios de ligação das estruturas, identificando resíduos que podem ser considerados críticos, especialmente para as enzimas em que a dockagem não foi possível. No entanto, os resultados devem ser avaliados com cautela e não substituem experimentos bioquímicos, que são necessários para a avaliação da atividade em relação à PET. Além disso, algumas previsões críticas feitas pelo Alphafold2, como a extensão da alfa-hélice posterior ao loop estendido em MetaG7, também precisam ser confirmadas por meio de resultados experimentais, como cristalografia de raios-X.

3.8 Ensaio de atividade

O trabalho em questão foi realizado em colaboração um grupo liderado pelo Prof. Dr. César A. Ramírez-Sarmiento do Instituto de Engenharia Biológica e Médica de Pontificia Universidad Catolica de Chile. Onde nosso grupo se focaria na resolução das estruturas e e grupo do Prof. Dr. César A. Ramírez-Sarmiento na parte enzimática. Todavia durante 20 dias do mestrado pude participar e aprender sobre a parte de enzimática do trabalho em questão. Naquele momento eu teria obtido 10 enzimas purificadas, as quais realizei testes de atividade, sob a orientação de Felipe Ignacio Gatica Vargas. Nos subtópicos a seguir, apresentarei alguns dos resultados obtidos.

3.9 Testes com PNPA

O teste de atividade com PNPA (acetato de nitrofenol-p), um ensaio qualitativo que demonstra atividade esterásica ao hidrolisar PNPA em PNP exibindo uma cor amarelada, foi realizado com as 10 das proteínas estudadas, sendo estas MetaG1, MetaG3, MetaG4, MetaG4CBM, MetaG5, MetaG6, MetaG7, MetaG8, MetaG9 e Mors1.

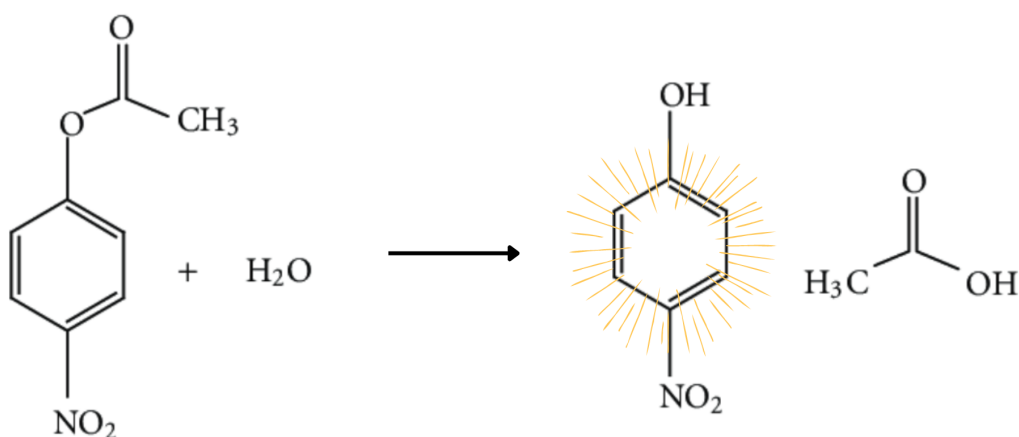


Figura 62 – Hidrolise de PNPA (acetato de nitrofenol-p) em PNP(nitrofenol-p), onde o PNP exibe uma cor amarelada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Destas apenas MetaG8 não apresentou atividade em PNPA o que indica atividade esterásica para quase todas as enzimas testadas. Observando o comportamento de MetaG8 apresentado no dicroísmo circular, imaginamos que embora pura, ainda não conseguimos obter a enzima em questão na sua forma enovelada. Vale ressaltar que MetaG5, MetaG6 e MetaG9 perderam atividade em 2 dias armazenadas a 4°C mesmo sem sinal de precipitação, MetaG1 precipitou em um dia sob mesma condição.

Testes mais quantitativos foram realizados por Felipe Ignacio Gatica Vargas para G4 e G7 e serão apresentados no Anexo C.

3.9.1 Atividade em PCL policaprolactona

Testamos também nossas enzimas em conjunto com PCL, um poliéster alifático utilizado para avaliar a atividade esterásica das enzimas em relação a polímeros.

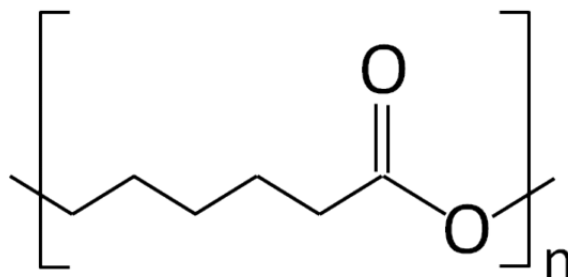


Figura 63 – Estrutura da unidade monomérica da policaprolactona.

Fonte: MAZZARINO, L. (33)

Entre as enzimas testadas, apenas MetaG7 e Mors1 apresentaram atividade com as nanopartículas de PCL. Considerando que os parâmetros cinéticos de Mors1 já foram relatados anteriormente (34) (Anexo B), decidimos prosseguir com ensaios quantitativos de degradação do substrato, desta vez focando em MetaG7. Para isso monitoramos a diminuição da turbidez de uma solução de nanopartículas após a adição da enzima, já que o polímero não é solúvel em água e trabalhamos com nanopartículas suspensas em tampão. Na imagem 64, podemos observar o resultado de uma cinética de pseudo-primeira ordem para MetaG7, com um ajuste R2 de 0,96.

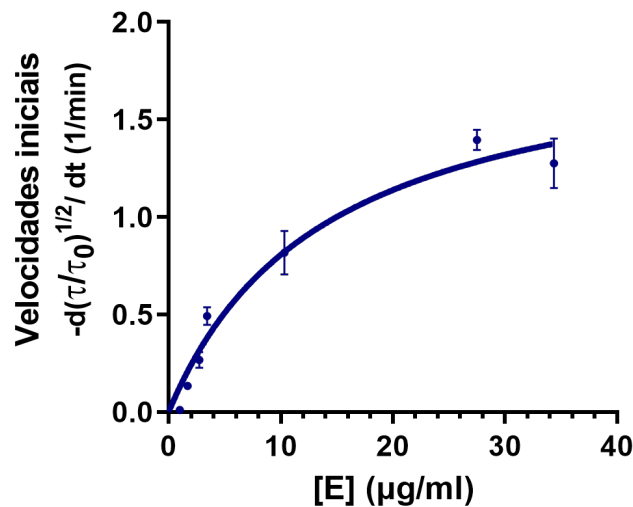


Figura 64 – Caracterização enzimática de MetaG7 em relação às nanopartículas de PCL. Concentração inicial de 1 mg/mL variando a concentração da enzima entre 1 e 34 µg/mL a 30°C.

Fonte: Elaborada pelo autor sob orientação de Felipe Ignacio Gatica Vargas.

Os parâmetros cinéticos de MetaG7 resultaram em um K_a de 71 ± 1 mL/mg e K_t de 1939 ± 160 (10⁻³/min⁻¹). Destaca-se que a constante de adsorção é ligeiramente menor do que a relatada para outras PET hidrolases na literatura, enquanto a taxa de hidrólise aparente (k_t) é um pouco mais alta (ANEXO) (34).

3.9.2 Atividade em BHET

No teste de atividade com partículas insolúveis de BHET (Tereftalato de bis-hidroxieta), apenas MetaG4CBM demonstrou atividade, resultando na clarificação da solução inicialmente turva. (35) Então como descrito na metodologia, seguimos realizamos ensaios quantitativos de degradação do substrato, monitorando a diminuição da turbidez da solução após a adição de nossa proteína. Não foi possível obter pontos o suficiente para uma cinética de pseudo-primeira ordem, pois com concentrações maiores de proteína, o erro associado aumentou consideravelmente, o que indica que a técnica de ressuspensão da solução de forma manual não foi adequada. Todavia, os pontos obtidos demonstram uma atividade expressiva de MetaG4CBM frente a partículas insolúveis de BHET (figura 65).

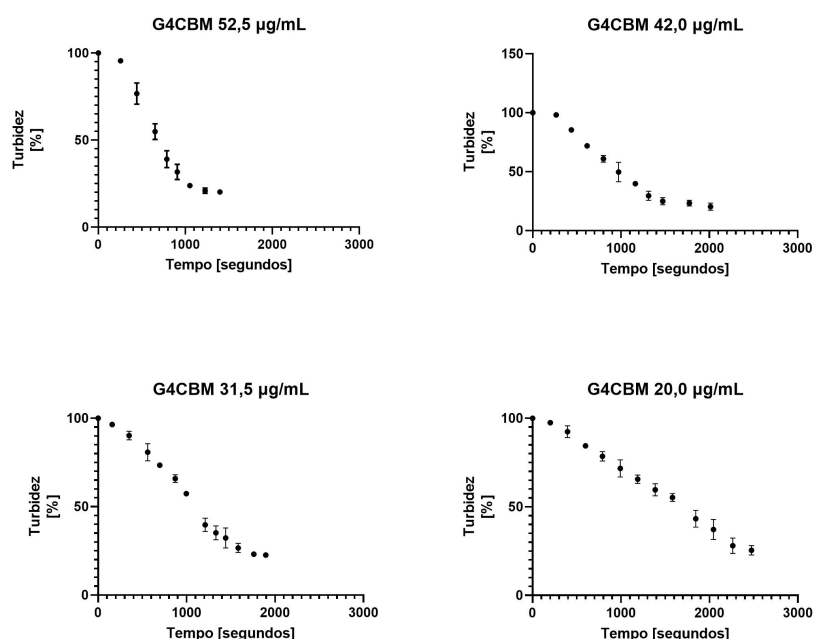


Figura 65 – Caracterização enzimática de MetaG4CBM em relação às partículas insolúveis de BHET. Concentração inicial de de substrato 10,5 mg/mL variando a concentração da enzima entre 1 e 34 µg/mL a 30 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Curiosamente apenas MetaG4CBM demonstrou atividade com partículas insolúveis de BHET. Considerando que a diferença entre MetaG4 e MetaG4CBM é a ausência do domínio CBM é razoável assumir que este domínio está assumindo um papel crítico na atividade da enzima. Outro ponto importante a destacar é que a forma comum de medir a atividade em relação ao BHET é através da sua solubilização em Dimetilsulfóxido (DMSO), e os ensaios são realizados em horas. (36) O objetivo do ensaio descrito neste trabalho foi medir a degradação do BHET em sua forma insolúvel, que devido à sua hidrofobicidade, dificulta o acesso da enzima (assim como ocorre no PET).

3.10 Análise da função do domínio CBM em G4

Com o objetivo de compreender melhor o papel do domínio extra, realizamos uma busca no banco de dados PDB a partir do BLAST(NCBI) para a região CBM de G4CBM. Encontramos três estruturas resolvidas com 62,20% de identidade, todas a mesma xilanase de *Streptomyces olivaceoviridis*, sendo que uma delas foi cristalizada e resolvida com ligante. A estrutura escolhida como base para nossas comparações foi a 1ISV (37) depositada no banco de dados de proteína PDB, e embora a identidade do domínio CBM seja alta, o domínio catalítico apresentou pouca similaridade.

Para complementar a análise e comparar a estrutura homóloga com o nosso CBM,

realizamos docking entre moléculas de BHET com o domínio CBM de G4 (obtido por AlphaFold2) (figura 66). Daqui em diante iremos nos referir ao modelo teórico do domínio CBM de MetaG4CBM como CBMg4, assim como a estrutura cristalográfica do CBM da Xilanase como CBMxil, como forma de simplificação.

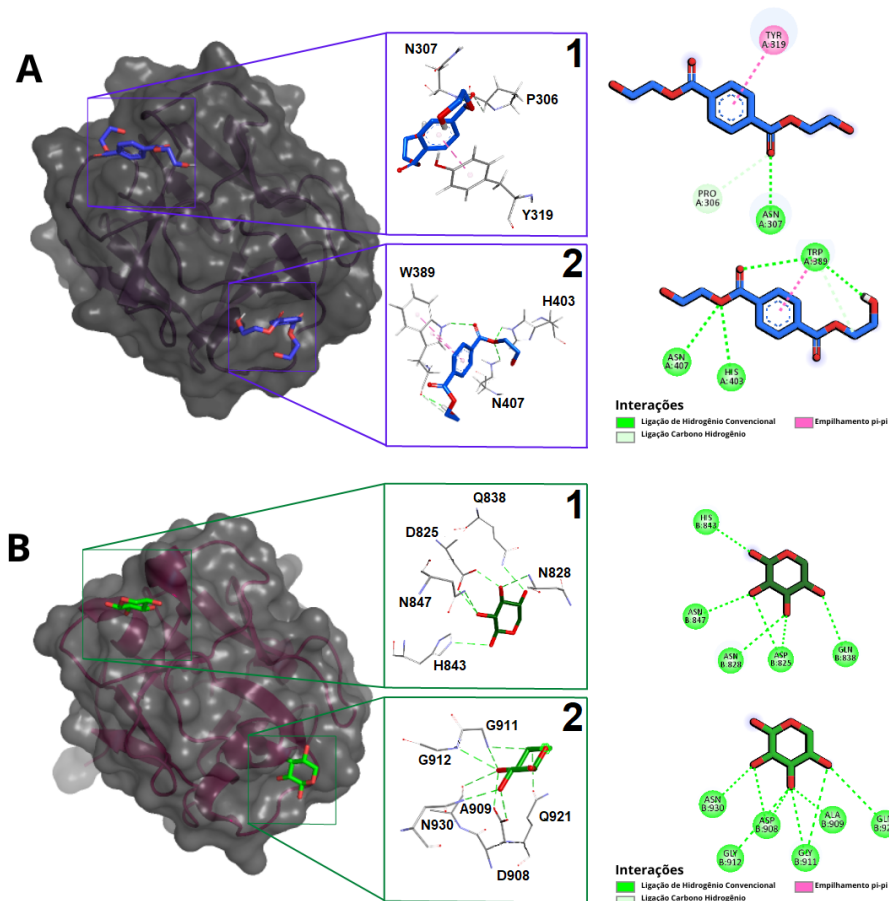


Figura 66 – Comparação entre o CBM de G4 e da Xilanase. (A) Docking entre BHET e CBMg4, destaque para resíduos com potencial para participar da ligação. (B) Ligação entre xilose e CBM da Xilanase.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir do docking, podemos observar que as mesmas regiões responsáveis pela ligação da xilana na homóloga é compatível com a BHET, todavia com a participação de diferentes aminoácidos da região (não surpreendente dado as diferenças químicas entre os dois substratos). No caso de CBMxil existe uma dominância de ligações de hidrogênio e para CBMg4 temos interações do tipo pi-pi nas duas regiões de ligação. A partir do alinhamento entre a sequencia destas duas regiões (figura 67) podemos ver que na região de ligação 1, tanto os aminoácidos responsáveis pela ligação da xilana quanto para a molécula de BHET são em sua maioria conservadas. Por outro lado o mesmo não ocorre na região de ligação 2, onde observamos uma alta variabilidade de aminoácidos, com destaque para a substituição de um triptofano crítico para a ligação do BHET (W389), que é substituído

por uma valina (V910).

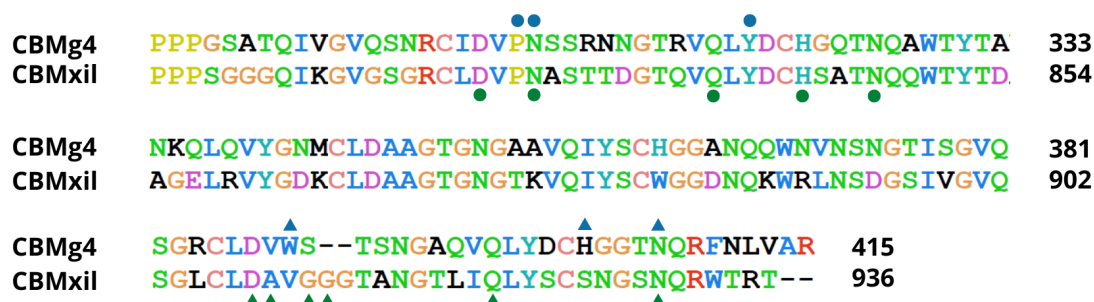


Figura 67 – Alinhamento sequencial entre o domínio de ligação CBM de MetaG4 e a xilanase. As bolinhas representam o primeiro subsítio de ligação, enquanto os triângulos representam o segundo subsítio. Os resíduos de interação com xilana estão destacados em verde, enquanto aqueles que interagem com BHET estão destacados em azul.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base nos resultados do docking e nos ensaios enzimáticos iniciais, uma hipótese para explicar o fenômeno observado é que o BHET, sendo insolúvel em água, forma aglomerados hidrofóbicos que dificultam o acesso da enzima MetaG4 na ausência do domínio de ligação. Assim, o CBM atua como uma âncora que se liga a esses aglomerados hidrofóbicos, permitindo que a enzima acesse o BHET com o seu domínio catalítico. Esse comportamento é similar ao que já foi descrito para a xilanase, onde o domínio CBM se liga a xilana (figura 68). (38) Ainda não é possível afirmar definitivamente que o clareamento da solução é devido à hidrólise (embora essa seja a principal hipótese (35)), pois não foi possível determinar se o CBM está dissociando as moléculas de BHET ou se a hidrólise está de fato ocorrendo. Para investigar isso, pretendemos realizar ensaios futuros para analisar os produtos gerados.

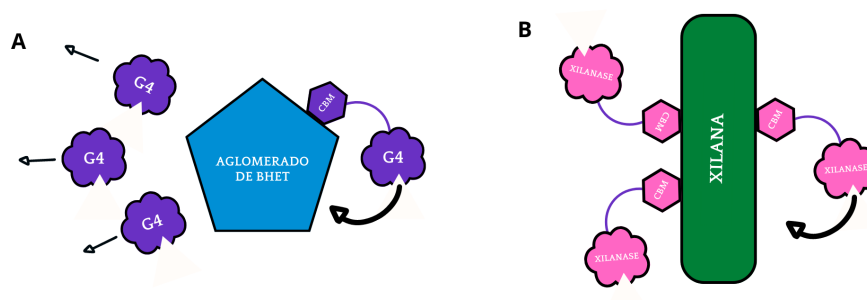


Figura 68 – Esquema sugerido da interação entre o MetaG4CBM e BHET em comparação com (B) Esquema de interação entre Xilanase com xilana.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Realizamos uma pesquisa na literatura e identificamos dois artigos que abordam a fusão de CBMs a PETases como objeto de estudo. O primeiro apresenta por testes de afinidade e dinâmica molecular (39), potenciais CBMs para a fusão. O segundo e mais recente, se propõe a fazer a fusão de diferentes CBMs a PETase LCC, onde conclui que há pouca relevância industrial para enzimas de fusão CBM acima de 10 % em peso de carga de PET para substratos de PET amorfo (40). Todavia em nenhum dos artigos foi estudado enzimas com potencial para degradação de PET naturalmente com CBM, por esse motivo estudos de MetaG4 contra PET fazem parte de nossos planos futuros.

Uma diferença notável entre as enzimas fusionadas estudadas por Graham, Rosie, *et al* (40) e MetaG4CBM esta no loop que conecta o domínio de ligação ao domínio catalítico, onde utilizaram-se de um unico linker, presente em uma celobiohidrolase da familia 7 de *Trichoderma reesei* (figura 69). Devemos destacar loop que conecta MetaG4 ao CBM apresenta uma alta prevalência de sequências de prolinas triplas, conectadas a treoninas e serinas (TTPPP ou TSPPP). Isso pode desempenhar um papel crucial na ligação entre os domínios enzimáticos e de ligação, conferindo maior flexibilidade ou orientando os domínios de maneira apropriada. Por outro lado, o linker utilizado por Graham, Rosie, *et al.* (40) pode não ser capaz de fornecer as mesmas condições, uma vez que possui uma sequência menor e distinta (figura 69). Essa diferença pode ser um dos motivos que explicam a falha em produzir uma enzima efetiva ao fundir esses dois domínios.

G4linker **TCPLINTPTT³PPPTS³PPPTS³PPPTT³PPPGSAT**

Xilanlinker **GGSS³T³PPS³GGG**

TrCel7Alinker **GN³PPGN³PPG³TTT³RRP³ATT³TGSS³PGP**

Figura 69 – Sequencias dos linkers que conectam MetaG4 (G4linker), Xilanase (Xilanlinker) e Trcel (TrCel7Alinker) a seus domínios de ligação CBM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados do docking com fragmentos de PET e BHET também destacam a importância de avaliar cuidadosamente a atividade em relação a substratos semelhantes ao PET. MetaG4 demonstrou diferenças críticas nos domínios de ligação ao PET, no entanto, quando o domínio CBM estava presente, MetaG4CBM foi a única capaz de demonstrar atividade frente a partículas insolúveis de BHET, e o fez com alta eficiência. Isso ocorre principalmente porque o CBM foi capaz de ancorar-se na superfície hidrofóbica formada pelas partículas de BHET. Considerando que a hidrofobicidade da superfície é uma das principais dificuldades na degradação do PET, o estudo de moléculas quiméricas que

combinam o domínio CBM de MetaG4CBM com outras PETases conhecidas representa uma abordagem interessante e promissora para o desenvolvimento de proteínas com alta atividade catalítica em relação ao PET. No entanto, é importante ressaltar que são necessários estudos adicionais para investigar mais a fundo essa relação e compreender em detalhes os mecanismos envolvidos.

4 CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados obtidos, observamos que as técnicas que empregamos para a obtenção de proteínas PETase-like solúveis e puras foram bem-sucedidas. O processo de purificação foi a parte mais desafiadora do trabalho, desde a solubilização até a obtenção das enzimas isoladas. No entanto, por meio da aplicação de diferentes abordagens, como o uso de chaperonas e ATP para remoção das mesmas conseguimos obter as 10 das 12 proteínas propostas no início do trabalho. De forma paralela, tivemos sucesso em conseguir proteínas reenoveladas de G9, das quais obtivemos uma estrutura cristalográfica.

As enzimas, embora homólogas, exibiram comportamentos consideravelmente distintos, especialmente em relação à sua estabilidade, o que aumentou a complexidade dos estudos biofísicos em alguns casos. Por meio de estudos de dicroísmo circular, conseguimos avaliar de maneira mais clara algumas dessas diferenças. A enzima MetaG1, que sempre foi instável durante o armazenamento e processo de concentração, apresentou uma gradual e lenta perda de estruturas secundárias, o que pode resultar na exposição de regiões hidrofóbicas e facilitando precipitação. Já a enzima MetaG8 mostrou um sinal característico de uma estrutura desordenada, o que pode explicar por que ela foi uma das poucas que não geraram cristais e a única (com múltiplos ensaios) sem atividade no teste contra PNPA.

Os ensaios cristalográficos resultaram na obtenção de cristais para a maioria das proteínas estudadas, incluindo Mors1, MetaG1, G3, G4, G4CBM, G5, G6, G7 e G9. Dessas proteínas, foram resolvidas estruturas cristalográficas de quatro: Mors1, MetaG3, MetaG4 e MetaG9, com resoluções de 1,60 Å, 1,59 Å, 1,18 Å e 2,32 Å, respectivamente. Das estruturas, tiramos informações valiosas, como as mudanças estruturais nos loops estendidos de G4 e Mors1, assim como o efeito da não conservação dos resíduos presentes nos subsítios de ligação. Outro ponto importante é que as estruturas nos permitiram avaliar propriedades dos sítios não previstos de forma fidedigna a partir da sequência de aminoácidos e corrigir alguns erros cometidos no primeiro alinhamento.

O docking molecular entre as estruturas cristalográficas e teóricas (AlphaFold2) com o fragmento de PET revelou informações importantes sobre mudanças na sequência das PETases-like que resultaram em alterações estruturais significativas. Destas, MetaG5, a única PETase-like canônica que não foi acoplada ao fragmento de PET, possivelmente devido a um ácido glutâmico E206 como fator determinante. Além disso, MetaG7 e MetaG4 (não canônicas) também apresentaram dificuldades no acoplamento devido à presença de um ácido glutâmico E69 em MetaG4 e à extensão de uma hélice alfa ao fim do loop flexível em MetaG7. Embora estruturas experimentais precisem ser resolvidas para conclusões mais assertivas sobre G5 e G7.

A proteína G4 foi particularmente interessante devido às diferenças críticas em seus sítios de ligação. No entanto, somente a sua versão não clivada, MetaG4CMB, que contém um domínio de ligação a açúcar CBM, apresentou atividade quando testada com BHET insolúvel (entre as 10 enzimas purificadas). Para investigar a interação entre o CBM e o aglomerado de BHET, realizamos docking entre os 2 e sugerimos um mecanismo no qual a G4CBM se liga ao aglomerado de BHET de forma semelhante ao observado em uma xilanase homóloga. No entanto, até o momento, nenhuma PETase com esse domínio extra natural foi relatada, e sugerimos que o loop que conecta os dois domínios pode desempenhar um papel crítico em sua funcionalidade, o que ainda não foi testado, mas deve ser feito no futuro.

Como perspectiva futura para dar continuidade ao trabalho realizado, sugiro direcionar o foco para a proteína MetaG4CBM e buscar por homólogos que também possuam o domínio CBM adicional. Uma abordagem interessante seria a fusão entre PETases conhecidas e o domínio enzimático G4, juntamente com mutações nas regiões canônicas dos sítios de ligação das PETases-like, a fim de investigar a efetividade do domínio CBM na hidrólise de PET. Além disso, os ensaios cristalográficos do domínio CBM isolado e na presença de BHET solúvel podem fornecer informações valiosas sobre a interação do domínio com o substrato.

Em suma, a riqueza dos resultados, particularmente envolvendo os subsítios de ligação, representa uma das maiores contribuições deste trabalho. Mostramos grande variabilidade nas sequências e estruturas dos subsítios I e II e o loop estendido. No futuro, um trabalho sistemático deve ser feito para investigar quais variáveis trazem propriedades vantajosas e desvantajosas na degradação de PET.

REFERÊNCIAS

- 1 SINHA, V.; PATEL, M. R.; PATEL, J. V. Pet waste management by chemical recycling: a review. **Journal of Polymers and the Environment**, Springer, v. 18, n. 1, p. 8–25, 2010.
- 2 VOS, L. D. *et al.* Poly (alkylene terephthalate) s: From current developments in synthetic strategies towards applications. **European Polymer Journal**, Elsevier, v. 161, n. 11, p. 110840, 2021.
- 3 LAVILLE, S.; TAYLOR, M. A million bottles a minute: world's plastic binge 'as dangerous as climate change'. **The Guardian**, v. 28, n. 6, p. 2017, 2017.
- 4 TABUSHI, I. *et al.* Polyester readily hydrolyzable by chymotrypsin. **Journal of Polymer Science: polymer letters edition**, v. 13, n. 8, p. 447–450, 1975.
- 5 YOSHIDA, S. *et al.* A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 2016.
- 6 PIRILLO, V.; POLLEGIONI, L.; MOLLA, G. Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate. **The FEBS Journal**, Wiley Online Library, v. 288, n. 16, p. 4730–4745, 2021.
- 7 HAN, X. *et al.* Structural insight into catalytic mechanism of pet hydrolase. **Nature Communications**, Nature Publishing Group UK London, v. 8, n. 1, p. 2106, 2017.
- 8 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 5, p. 172, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- 9 MORGAN, K. **Plasmids 101: the promoter region**. Disponível em: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-the-promoter-region>. Acesso em 26 jun. 2023.
- 10 NATALELLO, A. *et al.* Biophysical characterization of two different stable misfolded monomeric polypeptides that are chaperone-amenable substrates. **Journal of Molecular Biology**, Elsevier, v. 425, n. 7, p. 1158–1171, 2013.
- 11 FRUITÓS, E. G.; GIRALT, A. A. **Insoluble Proteins: methods and protocols**. Berlin: Springer, 2022.
- 12 MAMIPOUR, M.; YOUSEFI, M.; HASANZADEH, M. An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, v. 102, p. 367–375, 2017.
- 13 BESSETTE, P. H. *et al.* Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the escherichia coli cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 96, n. 24, p. 13703–13708, 1999.

- 14 DERMAN, A. I. *et al.* Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 262, n. 5140, p. 1744–1747, 1993.
- 15 RIAL, D. V.; CECCARELLI, E. A. Removal of dnak contamination during fusion protein purifications. **Protein Expression and Purification**, Elsevier, v. 25, n. 3, p. 503–507, 2002.
- 16 ARCHER, R. D. Inorganic electronic structure and spectroscopy *In*: SOLOMON, E. (ed.) **Methodology**. New York: Wiley Interscience, 1999. v. 1.
- 17 WEI, Y.; THYPARAMBIL, A. A.; LATOUR, R. A. Protein helical structure determination using cd spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : proteins and proteomics**, Elsevier, v. 1844, n. 12, p. 2331–2337, 2014.
- 18 REICHERT, E. T.; BROWN, A. P. The differentiation and specificity of corresponding proteins and other vital substances in relation to biological classification and organic evolution: the crystallography of hemoglobins. **Science**, AAAS, v. 33, n. 839, p. 147–150, 1911.
- 19 BERNAL, J. D.; CROWFOOT, D. X-ray photographs of crystalline pepsin. **Nature**, Nature Publishing Group UK London, v. 133, n. 3369, p. 794–795, 1934.
- 20 DURBIN, S.; FEHER, G. Protein crystallization. **Annual Review of Physical Chemistry**, Annual Reviews, v. 47, n. 1, p. 171–204, 1996.
- 21 PICHLO, C. *et al.* Production, crystallization and structure determination of c. difficile ppep-1 via microseeding and zinc-sad. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 118, p. 55022, 2016. DOI:10.3791/55022.
- 22 PERUTZ, M. **Cristalografia**. Disponível em: <https://www.maxperutz.org.uk/>. Acesso em: 26 de junho de 2023.
- 23 CLUSTAL, W. *et al.* Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, 1994.
- 24 ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new endscript server. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press, v. 42, n. W1, p. W320–W324, 2014.
- 25 KIM, S. *et al.* **CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules**. New York: Wiley Online Library, 2017.
- 26 JO, S. *et al.* Charmm-gui: a web-based graphical user interface for charmm. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 2008.
- 27 PETERSEN, E. F. *et al.* Ucsf chimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, Wiley Online Library, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.

-
- 28 ADAMS, P. D. *et al.* Phenix: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, International Union of Crystallography, v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010.
- 29 CHEN, V. B. *et al.* Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, International Union of Crystallography, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.
- 30 BERNHOFER, M. *et al.* Predictprotein-predicting protein structure and function for 29 years. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press, v. 49, n. W1, p. W535–W540, 2021.
- 31 MAVRIDIS, L.; JANES, R. W. Pdb2cd: a web-based application for the generation of circular dichroism spectra from protein atomic coordinates. **Bioinformatics**, Oxford University Press, v. 33, n. 1, p. 56–63, 2017.
- 32 BETZ, S. F. Disulfide bonds and the stability of globular proteins. **Protein Science**, Wiley Online Library, v. 2, n. 10, p. 1551–1558, 1993.
- 33 MAZZARINO, L.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: a new strategy for buccal curcumin release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Elsevier, v. 103, n. 11, p. 3764–3771, 2014.
- 34 BLÁZQUEZ-SÁNCHEZ, P. *et al.* Antarctic polyester hydrolases degrade aliphatic and aromatic polyesters at moderate temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 88, n. 1, p. e01842–21, 2022.
- 35 BELISÁRIO-FERRARI, M. R. *et al.* Fast turbidimetric assay for analyzing the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate model substrates. **Biotechnology Journal**, Wiley Online Library, v. 14, n. 4, p. 1800272, 2019.
- 36 ERICKSON, E. *et al.* Comparative performance of petase as a function of reaction conditions, substrate properties, and product accumulation. **ChemSusChem**, Wiley Online Library, v. 15, n. 1, p. e202101932, 2022.
- 37 FUJIMOTO, Z. *et al.* Crystal structures of the sugar complexes of streptomyces olivaceoviridis e-86 xylanase: sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module. **Journal of Molecular Biology**, Elsevier, v. 316, n. 1, p. 65–78, 2002.
- 38 NEMMARU, B. *et al.* Reduced type-a carbohydrate-binding module interactions to cellulose i leads to improved endocellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Wiley Online Library, v. 118, n. 3, p. 1141–1151, 2021.
- 39 WEBER, J. *et al.* Interaction of carbohydrate-binding modules with poly (ethylene terephthalate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 103, p. 4801–4812, 2019.
- 40 GRAHAM, R. *et al.* The role of binding modules in enzymatic poly (ethylene terephthalate) hydrolysis at high-solids loadings. **Chem Catalysis**, Elsevier, v. 2, n. 10, p. 2644–2657, 2022.
- 41 GATICA, F. **Caracterización bioquímica y estructural de potenciales hidrolasas del poliéster PET descubiertas en metagenomas marinos polares.** Trabajo de Conclusão de Curso - Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile 2022.

ANEXOS

ANEXO A – SEQUENCIA DE AMINOACIDOS COMPLETA DAS TRANSFORMAÇÕES.

>MORS1

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDCIADSKITAVALS DTRDNGPFSIRTKRIS
RQSAKGFGGGTIHYPTNASGCGLLGAI VVPGYVSYENSIKWWGPRLASWG
FVVITINTNSIYDDPDSRAAQLNAALDNMIADDTVGS MIDPKRLGAIGWSM
GGGGALKLATERSTVRAIMPLAPYHDKSYGEVK TPTLVIACEDDRIAETKK
YANAFYKNAIGPKMKVEVNNGSHFCPSYRFNEILL SKPGIAWMQRYINNDT
RFDKFLCANENYSKSPRISAYDYKDCP

>metaG1

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMDSPLYQHGPDP TYSSIGGVGPYATAQVSV
PASGTPGFGSGTIYYPTTTTEGRFGGIAISP GYGAESSIGWYG PRLASH
GFVVIT IETISRYEDPSARADELQAALDWL VASSTVKDRVDGSRLAVMGH
SMGGGGALEAARDNPSLKA AVPLTPWNAYESFSTMTVPTLIFGADDD SIA
PANYHAIPFYWNIPSTRKAYLELRYANHFTPNF PHSEITRYSVSWLKRW
VDLDTRYDEFICPGPWWNWEFTHSWNNCP

>metaG2

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMCAAQAQTSPPTSASLNATAGPLSVSTSS
VSSWAARGFGGGTIYYPNATGRYGVVAISP GYTARQSSI AWLGRRLATHG
FVVITIDTNSTLDQPPSRATQLMAALNHVVNNANATVRSRVDASKLAVAG
HSMGGGSLIAAENNPSLKAAYPLTPWSVSKNYSSVCVPTMIIGADGDSI
ASVSTHSRLFYNSLSSNVSKAYGELNNASHFTPN TTNTPIGRYAVTWMKR
FVDS DTRYSPFLCGAPHDSYATRSVFD RYEDNCAY

>metaG3

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMQENPYERGPDP TEDSIEAVRGPF SVAEQ
NVSSLTPGFGGGTIYYPTDTSEGTFGAVAVAPGYTASESSMSWYGPRIAS
QGFFVFTIDTNTRYDQPGSRGDQLLAALDYLVEDAPLAVRSRIDPDLGV
MGHSMGGGGALEASADRPSLQAAIPLTPWNLDKTWSEIRVPTFIIGAEND
SIASVRTHAEPFYESLPATLDKAYLELNGATHFAPNTSNTTI AKYSISWL
KRFIDN DTRYEQFLCPAPSGFAIEEYRETCPYTG

>metaG4

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMADNPYERGPDP TRTSVATERGPFANTSV
SVPTGYGFNGGRIYYPTDTSQGTFGAIAISP GYTALFSAELAWMGPWLAS

HGFVVIETNSRNDFTARGETQLLAALDYLTQQSPVRDRVDASRLAVAG
HSMGGGGALSAATTRPALKAAGVITPFSPSSNLANDRVPTMVISGQADTV
VTPSYALDLYNSLPSTTESVYVEVAGGDHGFVGRSNPVMIRTMLPFLKI
FVDNDARYSQFLCPLMDNSGVVTYRSTCPLIN

>metaG4_CBM

MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMADNPYERGPDPTRTSVATERGPFANTSV
SVPTGYGFNGGRIYYPTDTSQGTFGAIAISPGYTALFSAELAWMGPWLAS
HGFVVIETNSRNDFTARGETQLLAALDYLTQQSPVRDRVDASRLAVAG
HSMGGGGALSAATTRPALKAAGVITPFSPSSNLANDRVPTMVISGQADTV
VTPSYALDLYNSLPSTTESVYVEVAGGDHGFVGRSNPVMIRTMLPFLKI
FVDNDARYSQFLCPLMDNSGVVTYRSTCPLINTPTTPPPTSPPTSPPT
SPPPTTPPPGSATQIVGVQSNRCIDVPNSSRNNGTRVQLYDCHGQTNQAW
TYTANKQLQVYGNMCLDAAGTGNGAAVQIYSCHGGANQQWNVNSNGTISG
VQSGRCLDVWSTSNGAQVQLYDCHGGTNQRFNLVAR

>metaG5

MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMANPYERGPAPTNAILEASRGPFATSSTT
VSSLVSGFGGGVIYYPTTTTAGTFGAVAISPGYTASWSSLDWLGPRIASH
GFVVIIDITITRLDQPSSRGRQLLAALDYLTERRSVRSRIDSSRLAVAGH
SMGGGSLEAAASRPSLQAAVPLAPWNLTKNWSNLRVPTLIIGGESDSVA
SVATHSEPFYNSIPASAEKAYLELNNEGHHFPNTVNTPTAKQMVAVLKRF
VDDDRYDQFLCPGPSGLAVEEYRNTCPH

>metaG6

MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMPSVSFLEADRGPYSVDTERVSGLVSGFG
GGTIHYPTDTTGTMAAIVVIPGYVSAESSIEWWGPKLASYGFVMTIDTN
SGFDLPPSRARQINTALDYLDIDENSRSRSPVEGMIDTERLGVVWWSMGGG
GTLRVAEEGRKAAIPLAPYDTTNFRDNYTPTLIFACESDVIAPVAIHAS
AFYNDIPSSTDKAFIEINNGSHYCGNGGGIYNDVLARLGVSWMKRYLDED
QRYDQFICGNHESDFQISDYRGNCQ

>metaG7

MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMASNPPDPVDPGQPSGFERGPNPTLSLV
EADRGPFSVRSRVSGLVSGFGGGTIHYPTNTTGTMAAVVIPGYISAES
SIEWWGPKLASHGFVMTIDTNTGFDQPPSRARQINSALDYLDQNTERN
GDVEGMIDTDRLGVIGWSMGGGGTLRVATEGRKAAIPLAPWDTSSWQFR
NVQAPTMI IACESDIVAPVGSHPFYNRLPGDINKAFVELDGGNHYCGN
GGASFGQYDVTLSRLGVSWMKRHLNDTRYSQFLCNPHESDREISEYRG

NCPY

>metaG8

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMPSVSFLEAATGPYSVDTERVSGLVSGFG
GGTIHYPEDTTGTMAAIVVIPGYVSAESSIEWWGPKLASHGFVMTIDTN
SGFDQPPSRANQINAALDYLIDENTAFGSPVQGMIDTDRLGVVWWSMGGG
GTLRVATEGRISAAIPLAPWDTSSFRNVEAPTLIIACESDIIAPVGS HAS
PFYNRIPEDVDKAFVEIDGGSHYCGNGGGFNNDVLSRFGVSWMKLHLDND
ARYEQFLCGPDHEDDSISEYRGNCP

>metaG9

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMSNCYQRGNPTVSALEADSGPYSVRTIN
VSSWVSGFGGGTIHYPVGTEGTMGAI AVIPGYVSYERSIKWWGPRLASWG
FVVITTDNTIYDQPDSRADQLSAALDYVISQSNSSRSPIYGMVDANRLG
AMGWSMGGGGTLKLS TERELKAAIPQAPYYAGFNPFDEITPTLIIACEL
DVVAPVAQHASP FYREIPGSTAKAFLEINGGDHFCANS GYPDEDILGKYG
IAWMKRFIDEDRRYDQFLCGPNHEADRSISEYRDTCNY

>metaG10

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMITATELTKTRDNGPFSVKSKHVSRSAN
GFGGGTIHYPTDAGSCLLGGIAVVPGYVSYESSIKWWGPRLASWGFVVI
TINTSSIYDNPDSRAEQLSAALDHLIADKTVGHMIDPNRLGAIGWSMGGG
GALRLATERSTVQAI IAQTPYHDTSYGAMDTPALFIACENDRIAPNKKYT
NIFYQKADGPKMKVEINNGSHFCASHRFNEKLLSKPAIAWMQRYINGDTR
FDKFLCGNESYIDDPRISAYDYEDCL

Fonte: Elaborada pelo autor

ANEXO B – PARAMETROS CINÉTICOS DE MORS1 (DE BLÁZQUEZ-SÁNCHEZ)

Quadro 8 – Parâmetros cinéticos da hidrólise de PCL

Enzima	kt ($10^{-3}/\text{min}^{-1}$)	KA (ml/mg)
Mors1	1544 ± 23	152 ± 5
IsPETase	1688 ± 81	94 ± 8
Tcur1278a	122 ± 12	41 ± 5
Tcur0390a	108 ± 6	96 ± 10

Fonte: BLÁZQUEZ-SÁNCHEZ (34)

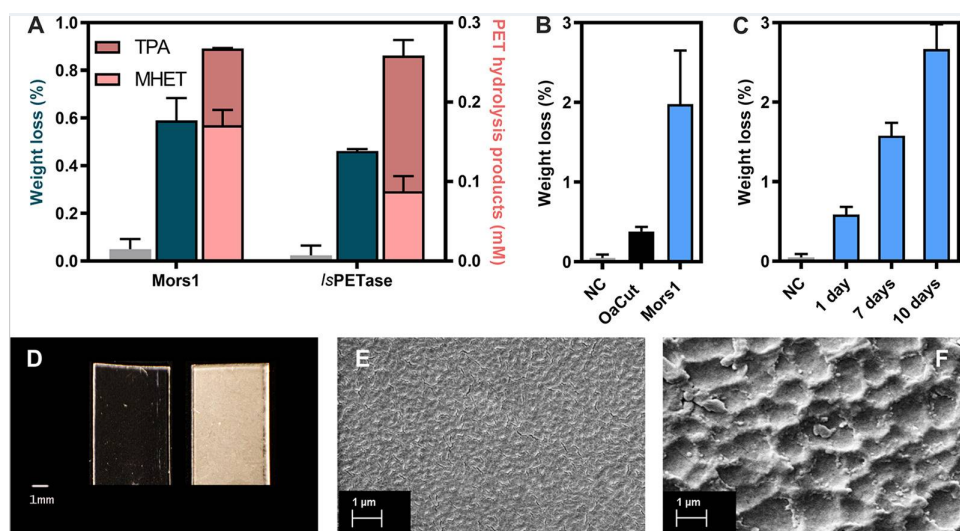


Figura 70 – Degradação enzimática de filmes de PET amorfos. (A) Perda de peso dos filmes de PET (em verde escuro) e quantidades de TPA e MHET (em rosa) liberadas por Mors1 e IsPETase após um tempo de reação de 24 horas a 25°C. Em cinza, controle negativo sem enzima. (B) Perda de peso dos filmes de PET após um tempo de reação de 6 dias a 25°C com Mors1 e OaCut. NC: Controle negativo sem enzima. (C) Perda de peso dos filmes de PET após um tempo de reação de 1, 7 e 10 dias a 25°C com Mors1. (D) Mudanças na superfície dos filmes de PET amorfos. Um filme usado como controle negativo sem enzima é mostrado à esquerda, enquanto um filme tratado com Mors1 por 10 dias a 25°C é mostrado à direita. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de um filme de PET não tratado (E) e um filme tratado com Mors1 por 10 dias a 25°C (F).

Fonte: BLÁZQUEZ-SÁNCHEZ (34).

ANEXO C – PARAMETROS CINÉTICOS DE METAG4 E METAG7 (DE GATICA, F.)

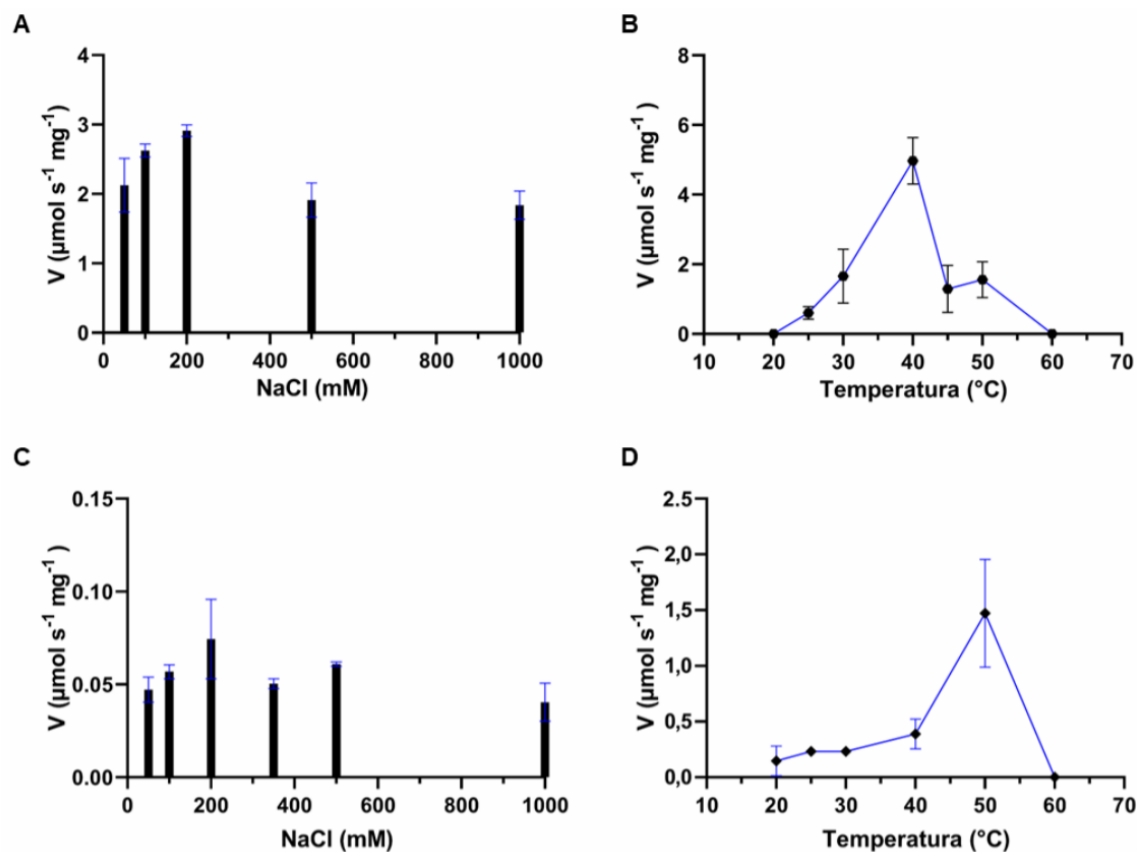


Figura 71 – Catalise enzimática de pNPA por G4 e G7. (A) Velocidades iniciais de G4 em diferentes concentrações salinas usando 0,8 mM de pNPA. (B) Velocidades iniciais de G4 em diferentes temperaturas usando 0,5 mM de pNPA. (C) Velocidades iniciais de G7 com diferentes concentrações de NaCl usando 0,8 mM de pNPA. (D) Velocidades iniciais de G7 em diferentes temperaturas usando 0,5 mM de pNPA..

Fonte: GATICA. (41)

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos de G4 y G7 para hidrólise de pNPA e pNPB a 30 $^{\circ}\text{C}$

Enzima	Substrato	V_{max} ($\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/V_{\text{max}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
MG4	pNPA	11 ± 1	7000 ± 2500	345 ± 6	49300
	pNPB	2.2 ± 0.3	3100 ± 1100	69.5 ± 6	22400
MG7	pNPA	2.5 ± 0.3	2200 ± 900	89.0 ± 12	40500
	pNPB	0.72 ± 0.1	3900 ± 1500	24.6 ± 4	6310

Fonte: GATICA, F. (41).

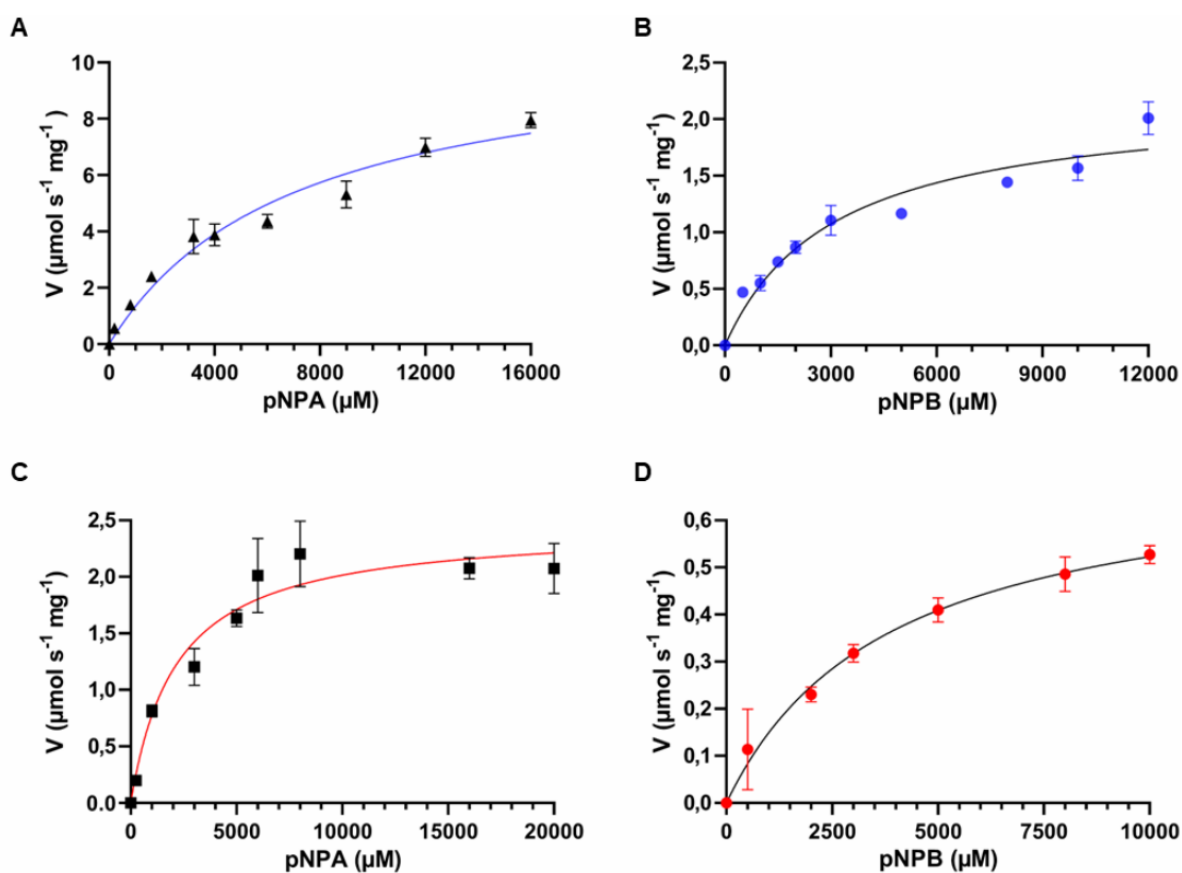


Figura 72 – Catalise enzimática de ésteres por G4 e G7 a 30 °C. (A) Curva de Michaelis-Menten ajustada para MG4 com pNPA (linha azul contínua), indicando os pontos considerados para a caracterização (triângulos). (B) Curva de Michaelis-Menten ajustada para MG4 com pNPB (linha preta contínua), indicando os pontos considerados para a caracterização (círculos). (C) Curva de Michaelis-Menten ajustada para MG7 com pNPA (linha vermelha contínua), indicando os pontos considerados para a caracterização (quadrados). (D) Curva de Michaelis-Menten ajustada para MG7 (linha preta contínua), indicando os pontos considerados para a caracterização (círculos).

Fonte: GATICA. (41)

Tabela 7 – Parametros cinéticos de G4 para hidrolise de pNPA e pNPB a 40 °C

Enzima	Substrato	V_{\max} ($\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/V_{\max} ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
MG4	pNPA	29 ± 8	5800 ± 3600	920 ± 170	159000
	pNPB	5.9 ± 1	4500 ± 2200	190 ± 32	42200

Fonte: GATICA. (41)

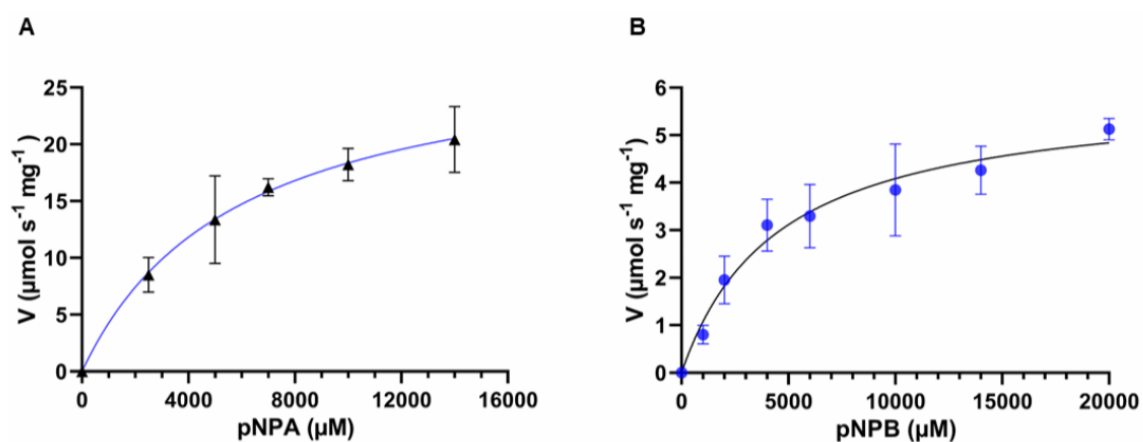


Figura 73 – Catalise atividade enzimática de ésteres por G4 a 40 °C. (A) Curva de Michaelis-Menten ajustada para G4 com pNPA (linha azul contínua), indicando os pontos considerados para a caracterização (triângulos). (B) Curva de Michaelis-Menten ajustada para G4 com pNPB (linha preta contínua), indicando os pontos considerados para a caracterização (círculos).
Fonte: GATICA. (41)

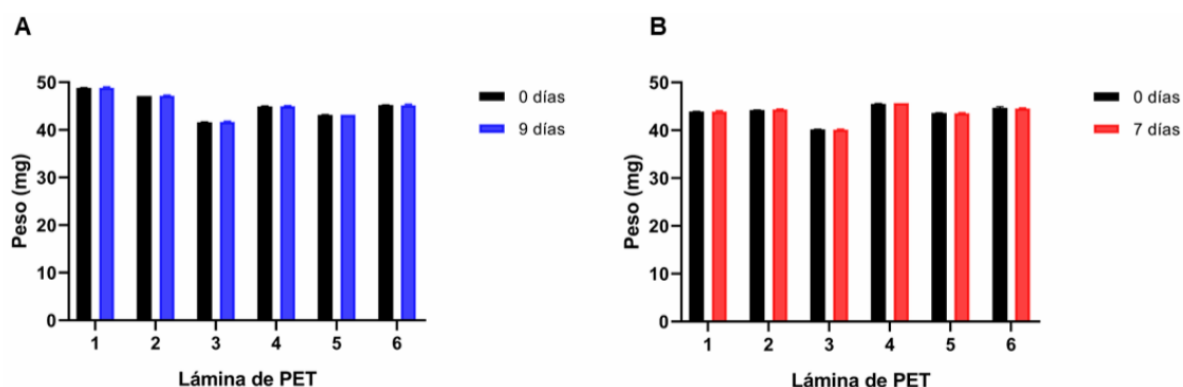


Figura 74 – Ensaio de degradação de películas de PET por G4 e G5. (A) O experimento foi realizado por 9 dias a 25 °C. (B) Ensaio realizado por 7 dias a 40 °C. As películas 1-2-3 são controles negativos e as películas 4-5-6 continham 20 µg de G4.

Fonte: GATICA. (41)