

Estudos estruturais de proteínas de nova família de hidrolases glicosídicas

Responsável: Camila Ramos dos Santos

Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Introdução

As hidrolases glicosídicas (GHs) são enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre 2 carboidratos ou entre 1 carboidrato e uma porção não-carboidrato. Elas são encontradas em praticamente todos os seres vivos e exercem papéis fundamentais na manutenção do ciclo de carbono, permitindo que microrganismos do solo decomponham biomassa vegetal liberando gás carbônico e vários outros compostos orgânicos de importância ecológica; na saúde humana, participando ativamente da colonização do trato gastrointestinal pela microbiota; e na infecção por microrganismos, tendo muitas vezes papéis-chave nas complexas interações patógeno-hospedeiro. Do ponto de vista biotecnológico, as GHs têm sido utilizadas em diversos ramos da indústria, como têxtil, alimentícia, bebidas, ração animal, detergentes e papel (Kirk *et al.*, 2002). Além disso, as GHs apresentam grande potencial de aplicação na redução/transformação da biomassa lignocelulósica em açúcares simples para produção de biocombustíveis e outros químicos de maior valor agregado (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Entretanto, devido à heterogeneidade dos carboidratos que compõe a biomassa vegetal e sua intrínseca recalcitrância imposta pela sua arquitetura molecular e insolubilidade, diversas enzimas são necessárias para sua completa desmontagem. Todavia, o pouco conhecimento disponível sobre a vasta diversidade de GHs presentes na natureza limita a geração de inovação nesse setor biotecnológico. Das mais de 330.000 GHs classificadas no banco de dados CAZy, apenas 2% já foram estudadas do ponto de vista bioquímico e menos ainda do ponto de vista estrutural. Além disso, a maioria dos estudos apresentam um viés para determinadas espécies e para determinadas famílias.

Uma nova família foi criada baseado nos estudos funcionais da enzima GLU1 do fungo basidiomiceto *Lentinula edodes* (Sakamoto *et al.*, 2011). Esta enzima foi caracterizada como uma endo- β -1,3-glicanase (também conhecida como laminarinase, EC 3.2.1.39); entretanto, não apresenta similaridade de sequência significativa com quaisquer proteínas descritas anteriormente no CAZy. De acordo com o CAZy as proteínas pertencentes a esta família se distribuem principalmente em bactérias e fungos, e somente recentemente 3 sequências de membros desta família foram identificadas em vírus da espécie *Yellowstone lake phycodnavirus 1*, que são conhecidos por infectarem algas. A família não teve nenhum membro caracterizado estruturalmente e as informações funcionais se limitam a um único artigo científico publicado (Sakamoto *et al.*, 2011). Desta forma, fica evidente a necessidade da realização de estudos estruturais associados com enzimologia e mutagênese para se inferir noções básicas sobre esta família como sua estrutura tridimensional, mecanismo de catálise e diversidade funcional.

Estado da arte

Aspectos estruturais e funcionais de hidrolases glicosídicas vem sendo estudados há décadas e ainda assim há muito para se descobrir nessa área. Famílias importantes ainda não foram totalmente exploradas como, por exemplo, a família 5. Em 2012, Aspeborg e colaboradores subdividiram essa família com cerca de 3000 membros em 51 subfamílias e observaram que 20 delas não tinham sequer um membro caracterizado (Aspeborg *et al.*, 2012). Além disso, muitas famílias apresentam somente um membro caracterizado, justamente aquele responsável pela criação da família. Se por um lado pouco se conhece do universo GH, por outro lado os avanços tecnológicos têm permitido avançar muito rapidamente na descoberta de novas estratégias para a degradação de carboidratos, como por exemplo, as celulasas multi-domínios que “escavam” a fibra de celulose (Brunecky *et al.*, 2013). Além disso, outra abordagem bastante atual é a identificação e caracterização completa de clusters gênicos envolvidos na degradação de um único polissacarídeo (Larsbrink *et al.*, 2014). Em dezembro de 2016 aprovamos um Projeto Temático que tem como um dos seus objetivos caracterizar essa nova família de hidrolases glicosídicas. Para isso, a família foi subdividida em grupos e pretende-se, através da caracterização de membros desses grupos, acessar toda a diversidade estrutural e funcional da família.

Objetivos

Esse projeto de iniciação científica tem como objetivo principal realizar a caracterização estrutural de uma proteína de uma nova família de hidrolases glicosídicas, para a qual até o momento não se determinou nenhuma estrutura.

Para isso, os objetivos específicos são:

- Expressão e purificação de três enzimas diferentes;
- Caracterização preliminar das proteínas recombinantes utilizando dicróismo circular e espalhamento dinâmico de luz;
- Ensaio de cristalização das proteínas puras;
- Otimização das condições de cristalização obtidas;
- Determinação da estrutura tridimensional de pelo menos uma proteína.
- Análise da estrutura, correlacionando com os resultados funcionais já obtidos pelo grupo.

Metodologia

Testes de expressão em pequena escala (5 ml) serão realizados em diferentes cepas de *Escherichia coli*. Serão testados parâmetros como concentração de IPTG, tempo e temperatura. A análise dos níveis de expressão será realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Determinada a melhor condição para expressão

da proteína recombinante na fração solúvel, será realizada a expressão em larga escala (1 litro).

As proteínas recombinantes serão expressas em fusão com uma cauda de histidinas no N-terminal (pET28a), permitindo realizar a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado. As amostras serão submetidas à cromatografia de exclusão molecular (SEC), para retirada de agregados e separação de diferentes formas oligoméricas da proteína, caso estejam presentes na solução. As amostras obtidas em cada etapa de purificação serão analisadas por SDS-PAGE. A concentração da proteína purificada será estimada pela medida da absorção da amostra em 280 nm.

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitirá analisar o grau de homogeneidade estrutural da amostra e calcular o raio hidrodinâmico de proteínas puras. A monodispersividade, que indica a existência de somente uma população, é uma característica desejável, pois tem se mostrado um fator importante para o sucesso nos ensaios de cristalização.

A técnica de dicroísmo circular permitirá analisar os conteúdos de estrutura secundária das proteínas e poderá ser utilizada para acessar informações sobre sua estabilidade térmica e química, além da influência de pHs, íons, força iônica, solventes orgânicos, entre outros, na sua termoestabilidade.

Os ensaios de cristalização serão realizados pelo método de difusão de vapor em gota sentada em condições de temperatura e umidade controladas. Nesta técnica, a solução da proteína é submetida a um estado de supersaturação, por meio de difusão de vapor, que pode favorecer o aparecimento de cristais. Os testes iniciais se basearão em kits comerciais e serão realizados no LNBio (CNPq) que conta com três robôs, para o preparo de soluções, preparo das placas de cristalização e captura de imagens, acessadas remotamente através da internet. A otimização dos cristais obtidos poderá ser feita variando-se concentração da proteína, concentração dos agentes precipitantes, pH dos tampões, temperatura, utilizando-se o método de sementeira e kit de aditivos (Additive Screen – Hampton Research, 96 soluções).

Os dados de difração de raios X serão coletados na linha de luz MX2 do LNLS (CNPq), que é dedicada a cristais de macromoléculas. Devido à ausência de estruturas de proteínas similares, essa estrutura será determinada através de faseamento experimental. Para isso, os cristais serão incorporados de espalhadores anômalos como selênio, ou de átomos pesados como chumbo, iodo, etc. Tendo-se obtido o mapa de densidade eletrônica, o modelo atômico da proteína em questão será construído e submetido a ciclos de refinamento.

Referencias

- Aspeborg, H., Coutinho, P. M., Wang, Y., Brumer, H., 3rd & Henrissat, B. (2012). *BMC evolutionary biology* **12**, 186.
- Brunecky, R., Alahuhta, M., Xu, Q., Donohoe, B. S., Crowley, M. F., Kataeva, I. A., Yang, S. J., Resch, M. G., Adams, M. W., Lunin, V. V., Himmel, M. E. & Bomble, Y. J. (2013). *Science* **342**, 1513-1516.

- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Liden, G. & Zacchi, G. (2006). *Trends in biotechnology* **24**, 549-556.
- Kirk, O., Borchert, T. V. & Fuglsang, C. C. (2002). *Current opinion in biotechnology* **13**, 345-351.
- Larsbrink, J., Rogers, T. E., Hemsworth, G. R., McKee, L. S., Tauzin, A. S., Spadiut, O., Klintner, S., Pudlo, N. A., Urs, K., Koropatkin, N. M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Kelly, A. G., Cederholm, S. N., Davies, G. J., Martens, E. C. & Brumer, H. (2014). *Nature* **506**, 498-502.
- Sakamoto, Y., Nakade, K. & Konno, N. (2011). *Applied and environmental microbiology* **77**, 8350-8354.