

Estudos funcionais e estruturais de enzimas da família GH43 com potenciais aplicações biotecnológicas

Projeto de iniciação científica – PIBIC

Orientador: Dr. Mário T. Murakami
Co-orientadora: Dra. Mariana A. B. de Moraes

Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Campinas, 2018

Introdução

A parede celular vegetal constitui uma estrutura complexa, composta principalmente por polissacarídeos (celulose e hemicelulose), lignina e proteínas. Seus papéis fisiológicos incluem o crescimento, a comunicação intercelular e a interação da planta com o ambiente, além de conferir uma importante barreira de defesa contra patógenos e estresses mecânicos (Minic & Jouanin, 2006).

Enzimas que degradam a parede celular vegetal têm atraído grande interesse da comunidade científica seja por sua função biológica ou por sua aplicação em processos industriais como a produção de biocombustíveis sustentáveis, alimentos, bebidas, papel e tecidos (Kirk et al., 2002). Nesses casos, as rotas enzimáticas possibilitam maior integração entre as etapas de processamento e condições ambientais mais brandas (Sun & Cheng, 2002).

As principais enzimas responsáveis pela despolimerização de polissacarídeos vegetais são denominadas hidrolases glicosídicas (*Glycosides Hydrolases* - GH) (Davies & Henrissat, 1995), uma superfamília, composta por cerca de 130 famílias já identificadas, as quais são classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) de acordo com a sequência, especificidade ao substrato e mecanismo molecular (Henrissat, 1991).

Nesse cenário, os membros da família GH43 destacam-se por serem onipresentes em organismos especializados na maceração de biomassa vegetal (Mewis et al., 2016, Kohler et al., 2015). Atualmente, o banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org>), reporta 4.555 membros da família GH43, o que a torna uma das mais abundantes GHs, sugerindo um importante papel para o acesso a uma variedade de substratos complexos e apontando a

necessidade de uma vasta caracterização estrutural e funcional dessas enzimas (Kaoutari et al., 2013, Wu et al., 2015).

A família GH43 é dividida em 37 subfamílias (Mewis et al., 2016), entretanto somente 21 possuem membros caracterizados, dentre as quais apenas 14 tem algum representante com estrutura resolvida (CAZy), evidenciando a escassez de informações bioquímicas e estruturais sobre esta enigmática família de grande importância biológica e biotecnológica.

Interessantemente, em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (Xac), bactéria fitopatogênica causadora do cancro cítrico, foram identificadas seis enzimas pertencentes à família GH43, sendo essa uma das famílias mais abundantes de GHs em seu genoma.

Assim, nesse estudo, inserido no Projeto Temático FAPESP “Explorando novas estratégias para a despolimerização de polissacarídeos da parede celular vegetal” (Processo 2015/26982-0), visamos estudar duas enzimas da família GH43, identificadas no genoma de Xac. Os resultados gerados poderão revelar o potencial biotecnológico dessas enzimas ou gerar informações para a engenharia de proteínas visando otimizar propriedades catalíticas e/ou estabilidade.

Objetivos

O objetivo geral desse trabalho é a caracterização estrutural e funcional de duas enzimas de Xac (Xac1275 e Xac4183), pertencentes à família GH43. Os objetivos específicos consistem em:

- Expressar as proteínas recombinantes em diferentes cepas e *Escherichia coli*;
- Purificar as proteínas expressas na forma solúvel através de métodos de cromatografia líquida;
- Realizar análises espectroscópicas e de homogeneidade estrutural através de ensaios como espalhamento dinâmico de luz (DLS) e dicroísmo circular (CD);
- Submeter as amostras puras e homogêneas a ensaios de cristalização para posterior experimento de difração de raios X;
- Avaliar as propriedades enzimáticas dos alvos estudados através de ensaios de cinética.

Metodologia

- **Testes de expressão e expressão em larga escala**

O vetor de expressão pET28a com a sequência codificante da respectiva proteína clonada, será utilizado para transformar *Escherichia. coli* de diferentes linhagens disponíveis no laboratório. Uma colônia isolada será crescida por 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm, em meio LB contendo canamicina (50 µg/mL). Após esse período uma diluição (1:100) será realizada e a cultura crescida a 37 °C até a fase log de crescimento ser atingida (O.D. 600 = 0,6). Neste ponto, uma alíquota será separada e a cultura induzida com o indutor isopropil-X-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A incubação será continuada por 4 horas a 37 °C e 30 °C, ou por 16 horas a 20 °C.

As células serão coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão apropriado. A lise será feita por sonicação em sonicador Branson Sonifier 450 (Branson ultrasonics corporation, Danbury, CT, USA) seguida de centrifugação, onde pellet e sobrenadante, referentes às frações insolúvel e solúvel respectivamente, serão separados e a expressão avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida preparados pelo protocolo tradicional (Laemmli, 1970).

- **Purificação das proteínas recombinantes**

As purificações serão realizada em sistema AKTA FPLC (GE Healthcare, General Electric Co, Chalfont St. Giles, UK) com coluna HiTrap Chelating (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK), previamente carregada com solução de NiSO₄. As frações provenientes da cromatografia serão analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida preparados pelo protocolo tradicional (Laemmli, 1970).

De acordo com o grau de pureza da primeira etapa purificação, outras cromatografias poderão ser realizadas, como a cromatografia por troca iônica. A cromatografia de exclusão molecular será realizada com o objetivo de garantir uma homogeneidade estrutural e remoção de agregados para a cristalização das proteínas.

- **Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

Os experimentos para determinar a homogeneidade estrutural das amostras serão realizados no equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern instruments, Malvern, UK) e as estratégias de aquisição de dados serão calculadas pelo *software* do próprio equipamento. As amostras serão previamente centrifugadas por 20 minutos a 15000 rpm e a 4 °C.

- **Dicroísmo circular (CD)**

As medidas de CD serão realizadas em espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD, USA) equipado com um controlador de temperatura acoplado a um banho,

medindo-se a elipsidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 a 190 nm.

Os valores obtidos em miligraus serão convertidos para elipsidade molar por resíduo ($[\theta]_{MRW}$), em miligraus.cm²/dmol, que é definida pela equação (Adler et al., 1973):

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{10 \times d \times c} \quad (1)$$

Onde θ_{obs} é a elipsidade observada em graus, MRW é a massa molecular média dos resíduos da proteína, d é o caminho óptico da cubeta em centímetros e c é a concentração da proteína em mg/mL. O valor de MRW é calculado dividindo-se a massa molecular da proteína pelo número de resíduos. As curvas serão analisadas utilizando o *software* GraphPad Prism v. 6.0.

- **Ensaio de cristalização**

Será utilizado o método de difusão de vapor tanto em gota sentada como pendente, que envolve a diluição da proteína em uma solução com precipitante e aditivos, a qual trocará vapor de água com uma solução duas vezes mais concentrada contida em um reservatório, estando gota e o reservatório em um mesmo compartimento fechado sem contato físico. Serão utilizados os equipamentos disponíveis no Laboratório Robotizado de Cristalização de Proteínas, LNBio (Campinas, SP). Os ensaios serão feitos em placas de 96 poços, e as gotas preparadas pelo sistema cartesiano *Honeybee*, utilizando-se os kits disponíveis no laboratório, contendo uma combinação de diferentes agentes precipitantes em concentrações variadas e em diferentes pHs. A presença de cristais será monitorada através do equipamento Rock Imager (Fomulatrix, Bedford, MA, USA).

Para a obtenção de cristais maiores e/ou com melhor formação, serão realizados refinamentos das condições iniciais de cristalização de cada proteína, através da variação de parâmetros como pH, concentração de proteína e/ou precipitante, volume das gotas e uso de aditivos.

- **Ensaio enzimáticos**

A hidrólise dos substratos sintéticos p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (pNP-Ara), p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNP-Xil), p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNP-Glu), p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (pNP-Gal) e p-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (pNP-Man) será determinada descontinuamente, acompanhando a liberação do íon p-nitrofenolato ($\epsilon_{400nm} = 17500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), que será medido espectrofotometricamente em 400 nm. As reações serão iniciadas pela adição de enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompida pela adição de tetraborato de sódio saturado, em intervalos de tempo adequados.

Controles sem adição de enzima serão realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios.

As enzimas serão caracterizadas a partir da determinação de suas condições ótimas de pH, temperatura, estabilidade ao pH e estabilidade térmica através do sistema adaptativo de McIlvaine. Ainda, poderão ser avaliados os efeitos da adição de monossacarídeos, íons metálicos e EDTA na atividade das enzimas.

A hidrólise de substratos naturais, como o arabinana, arabinoxilana e arabinogalactana, será determinada por dosagem de açúcares redutores liberados, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A reação será interrompida por adição do reagente DNS, e aquecimento da reação a 100 °C por 10 minutos. O produto formado será dosado espectrofotometricamente em 540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberada será estimada por meio de uma curva padrão de arabinose ou xilose, dependendo da especificidade da enzima em análise.

Referências

- Minic, Z., Jouanin, L. (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44, 435-49.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 14, 345-51.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, p. 1-11.
- Davies, G. J., Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 15(9), 853-9.
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280, 309-16.
- Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., Henrissat, B. (2016) Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: a Motivation for Detailed Enzyme Characterization. *Appl Environ Microbiol* 82, 1686-92.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A. (2015) Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat Genet* 47, 410-415.
- Kaoutari, A. E., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., Henrissat, B. (2013) The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota *Nature Reviews Microbiology* 11, 497-504.
- Wu, M., McNulty, N. P., Rodionov, D. A., Khoroshkin, M. S., Griffin, N. W., Cheng, J., Latreille, P., Kerstetter, R. A., Terrapon, N., Henrissat, B., Osterman, A. L., Gordon, J. I. (2015) Genetic determinants of in vivo fitness and diet responsiveness in multiple human gut Bacteroides. *Science* 350:aac5992.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5.
- Adler, A. J., Greenfield, N. J., Fasman, G.D. (1973). Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol* 27, 675-735.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31, 426-28.