

DO MICROBIOMA DA CAPIVARA À BIOCATÁLISE: CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS DA FAMÍLIA GH173 COM VISTAS ÀS SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Pesquisador responsável: Dr. Clelton A Santos

clelton.santos@lnbr.cnpem.br

LNBR-CNPem

INTRODUÇÃO

As enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) são classificadas com base nas atividades catalíticas e similaridade de sequências de aminoácidos no banco de dados Carbohydrate Active enZymes (CAZy database – www.cazy.org). As hidrolases de glicosídeos (GHs) correspondem a maior classe de CAZymes, sendo responsáveis por catalisarem a hidrólise de ligações glicosídicas em glicosídeos, glicanos e glicoconjugados [1-3].

O trato gastrointestinal de herbívoros vem sendo explorado, como uma fonte importante para a descoberta de novas CAZymes em virtude da presença de abundante comunidade microbiana, que desenvolveu neste ambiente, estratégias enzimáticas para superar a recalcitrância da biomassa. Empregando CAZymes com atividades complementares exo, endo e auxiliares os microrganismos conseguem extrair os açúcares dos polissacarídeos e fermentá-los, gerando ácidos graxos de cadeia curta que são empregados como a principal fonte de energia [4]. Com o desenvolvimento de métodos ômicos mais acessíveis e precisos, a compreensão da utilização de carboidratos pela microbiota intestinal de herbívoros está expandindo rapidamente, permitindo que cada vez mais diferentes ambientes possam ser explorados.

Em um trabalho recente do nosso grupo [5], através de abordagens multiômicas integrativas explorou-se o microbioma intestinal da capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), que é considerado o maior herbívoro roedor do mundo. Com esse estudo foi possível determinar a composição da comunidade microbiana presente, as estratégias enzimáticas e as vias metabólicas envolvidas na desconstrução dos carboidratos complexos. Os resultados do referido estudo demonstraram que essa microbiota possui um arsenal extremamente rico de CAZymes para a desconstrução de carboidratos complexos, o que culminou na descoberta de uma nova família de hidrolases de glicosídeos denominada GH173 (Figura 1).

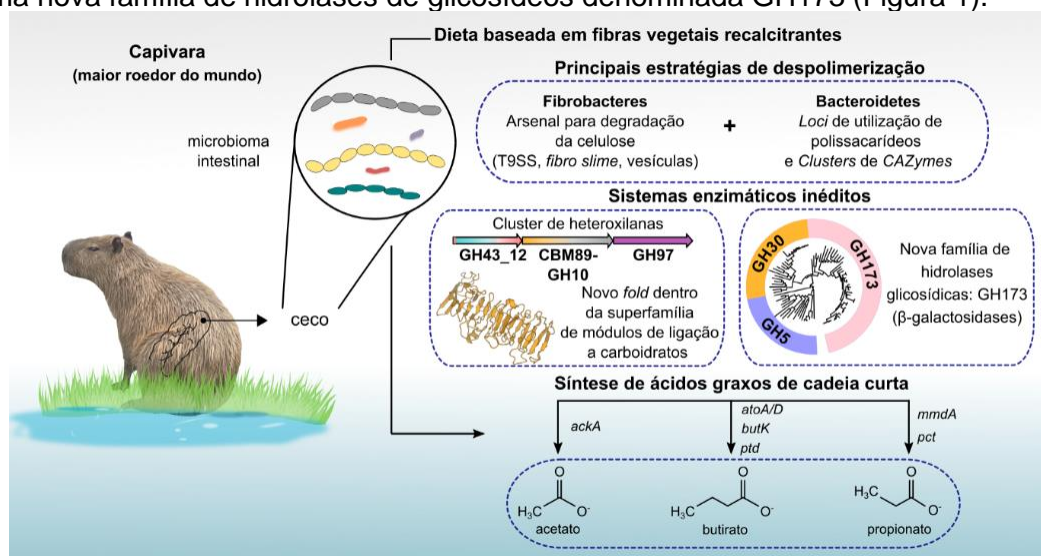


Figura 1. Representação esquemática da comunidade microbiana intestinal da capivara e as estratégias enzimáticas envolvidas na despolicarização e na conversão de polissacarídeos dietéticos em ácidos graxos de cadeia curta.

ESTADO DA ARTE

Pesquisas de prospecção enzimática para a identificação e caracterização de novas enzimas microbianas com a habilidade de despolimerizar carboidratos complexos podem permitir que estratégias enzimáticas inéditas sejam descobertas. Com isso, pode-se aumentar o espectro de enzimas industrialmente relevantes para aplicações em diferentes bioprocessos.

Os membros fundadores da família GH173 apresentam atividade de β -galactosidase. Essa atividade enzimática é amplamente utilizada na indústria de alimentos e bebidas em reações de hidrólise da lactose para produção de produtos lácteos para intolerantes à lactose e melhoria das propriedades sensoriais de alimentos e em reações de transgalactosilação para a síntese de compostos oligossacarídeos prebióticos [6].

Até o momento, nenhum membro da família GH173 foi caracterizado estruturalmente e, portanto, as bases moleculares para o mecanismo de catálise e especificidade são ainda desconhecidas. Assim, o presente projeto visa explorar de forma abrangente e minuciosa a diversidade funcional e estrutural de membros representativos da nova família GH173. Através de uma abordagem multidisciplinar, esperamos contribuir para o melhor entendimento dessa família de enzimas, no que diz respeito às funções, modos de ação e reconhecimento de substrato, mecanismos catalíticos e contextos genômicos. Após esse estudo bioquímico e estrutural, os membros da família GH173 poderão ter seu papel biológico esclarecido no contexto microbiano e serem avaliados quanto as aplicações biotecnológicas e industriais.

OBJETIVOS

Esse projeto de iniciação científica faz parte de um grande projeto de doutorado (FAPESP 2022/09386-8) e tem como objetivo principal investigar as especificidades de substrato, os mecanismos e os modos de ação de membros da família GH173 já selecionados, bem como de enzimas presentes nos contextos genômicos dos alvos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar por meio de técnicas cromatográficas as enzimas selecionadas;
- Dissecar a especificidade de substratos apresentada pelas enzimas;
- Determinar os parâmetros de atividade ótima (pH e temperatura) e curvas de saturação para os possíveis substratos identificados;
- Realizar ensaios de cristalização das proteínas na presença e ausência de substratos;
- Determinar a estrutura tridimensional das enzimas e dos complexos enzima-substrato;
- Analisar as estruturas obtidas, correlacionando com os resultados funcionais obtidos.

METODOLOGIA

As proteínas recombinantes serão expressas em vetores de expressão do tipo pET-28a(+), que adiciona uma cauda de poli-histidina (6xHis) no N-terminal da proteína recombinante e permite que a purificação dos alvos seja realizada por cromatografia de afinidade. 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 utilizando o coeficiente extinção molar de cada proteína.

Os ensaios funcionais para determinar a especificidade de substrato apresentada pelas enzimas será realizado usando uma ampla gama de substratos poliméricos naturais, além de substratos sintéticos, totalizando mais de 100 substratos, disponíveis no laboratório. O método de detecção de atividade poderá ser direto, no caso dos substratos sintéticos derivados do 4-nitrofenol que absorvem a 400 nm ou indireto, no caso dos substratos naturais, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) para quantificar o açúcar redutor gerado pela hidrólise enzimática. Uma vez identificada a atividade enzimática, será investigada a influência da temperatura e do pH na reação e na sequência a curva de saturação será utilizada para determinar os parâmetros cinéticos frente a cada substrato identificado.

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 serão baseados em kits comerciais e realizados no Robolab/CNPem que conta com três robôs, para o preparo de soluções, preparo das placas de cristalização e captura de imagens. 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 semeadura e kit de aditivos (Additive Screen – Hampton Research, 96 soluções). Os dados de difração de raios X serão coletados nas instalações do SIRIUS (CNPem).

REFERÊNCIAS

- [1] GARRON, M. L., & HENRISSAT, B. (2019). The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current Opinion in Chemical Biology*, 53, 82–87.
- [2] DRULA, E., et al. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D571–D577.
- [3] VUONG, T. V., & WILSON, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 195–205.
- [4] NEUMANN, A. P., MCCORMICK, C. A., & SUEN, G. (2017). Fibrobacter communities in the gastrointestinal tracts of diverse hindgut-fermenting herbivores are distinct from those of the rumen. *Environmental Microbiology*, 19(9), 3768–3783.
- [5] CABRAL, L., et al. (2022). Gut microbiome of the largest living rodent harbors unprecedented enzymatic systems to degrade plant polysaccharides. *Nature Communications*, 13(1), 1–16.
- [6] VERA, C., et al. (2020). Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1868(1), 140271.