

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 04/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Angelica Rodrigues de Souza

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo
Thermoascus aurantiacus, expressa em *E. coli*, por evolução
dirigida e desenho racional: Produção, purificação, caracterização
bioquímica e biofísica da enzima

São José do Rio Preto
2018

Angelica Rodrigues de Souza

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo
Thermoascus aurantiacus, expressa em *E. coli*, por evolução
dirigida e desenho racional: Produção, purificação, caracterização
bioquímica e biofísica da enzima

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Aplicada, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: FAPESP – Processo:
2011/22461-4

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
Orientador externo: Jeffrey Mertens
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe
Gonçalves Torres
Colaborador: Dr. Roberto Ruller

São José do Rio Preto
2018

Souza, A. R.

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo *Thermoascus aurantiacus*, expressa em *E. coli*, por evolução dirigida e desenho racional : produção, purificação, caracterização bioquímica e biofísica da enzima / Angelica Rodrigues de Souza. -- São José do Rio Preto, 2018
117 f. : il.

Orientador: Roberto da Silva

Orientador: Jeffrey Mertens

Coorientador: Fernando Araripe Gonçalves Torres

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Fungos termofílicos. 4. Xilanases. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Angelica Rodrigues de Souza

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo
Thermoascus aurantiacus, expressa em *E. coli*, por evolução
dirigida e desenho racional: Produção, purificação, caracterização
bioquímica e biofísica da enzima

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Aplicada, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), campus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: FAPESP – Processo:
2011/22461-4

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Roberto Ruller
Pesquisador Doutor – CTBE/IBILCE

Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez
Professor Adjunto (Livre Docente em Bioquímica) – IBILCE/UNESP

Dra. Leticia Maria Zanphorlin Murakami
Pesquisadora Doutora – CTBE

Prof.^a Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres
Professora Titular – USP/LORENA

São José do Rio Preto
04 de março de 2016

AGRADECIMENTOS

Com amor naquilo que escolhemos ser e fazer, tudo se faz, tudo se cria, tudo se transforma. Não me vejo tendo traçado outro caminho, ainda que nos momentos mais difíceis, com inúmeras repetições de experimentos para comprovar o resultado obtido...

Falar de todo o trajeto até aqui percorrido seria longo, mas agradecer as pessoas pelas quais cruzaram minha caminhada não. Então aqui vai meu muito obrigada para minha professora Marta da época do parquinho, que me alfabetizou antes mesmo da primeira série; a Professora Vilma por ajudar a despertar amor pelas ciências; aos professores do colégio por me ensinarem a persistir, mesmo quando com máxima dificuldade, na migração da escola pública para particular no ensino médio; aos professores de cursinho; aos professores de minha formação na faculdade, e ao meu orientador (Roberto da Silva) pela confiança depositada em mim; ao co-orientador (Fernando A. G. Torres) pelo aceite na parceria do trabalho e co-orientação. Agradeço a todos pela confiança. Na minha família devo um agradecimento mais que especial a minha MÃE, a minha maior incentivadora de tudo isso!!! Esse título é dela também, pois quando muitos diziam “Ela tem dificuldades” ela traduzia em gestos que me diziam “Vai que você consegue”. Mãe obrigada por me fazer ser assim... otimista e batalhadora sempre. A todos meu muito obrigada.

A FAPESP pelo financiamento a Pesquisa com a aprovação financeira do trabalho (2011-22461-4).

Ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA-Rio Preto), ao Laboratório de Biotecnologia de Leveduras (UnB) e ao Professor Araripe por me receber na UnB.

Ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos por me receber durante período de Pesquisa no Exterior, em especial aos orientadores externos pela colaboração: Jeffrey Mertens, Mike Cotta e Michael Bowman.

E a Deus pela minha vida, pela força da transformação diária e na busca por aprendizado e melhorias.

RESUMO

A proposta inicial deste trabalho foi o melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo *T. aurantiacus* (XynA_Ta), expressada em *S. cerevisiae* (XynA_Sc), a partir da construção anteriormente obtida em *P. pastoris* (xynA_Pp). Contudo, a reduzida expressão de XynA_Sc, aliada a duas mutações de aminoácidos, motivaram a reclonagem do gene de xynA_Ta em *E. coli* (xynA_Ec). O **Capítulo 1** descreve o estudo da produção e caracterização de XynA_Sc, XynA_Pp e XynA_Ec, anterior as correções das mutações. Estas exibiram ótimos de expressão com 650, 5,8 e 815 U.mL⁻¹, após 96 h e de atividade em pH 5-5,5 e 65-70 °C. XynA_Ec destacou-se com ampla faixa de estabilidade, de 40 a 85 °C, após 1h, e XynA_Pp mostrou 100% de atividade em pH 6-8, após 24 h. XynA_Sc e XynA_Pp apresentaram forte ativação em solventes orgânicos. A XynA_Sc foi inibida em concentrações superiores a 20 mg.mL⁻¹ de substrato. O **Capítulo 2** apresenta resultados da obtenção da forma nativa (corrigida) (XynAc_Ec) e de onze mutantes por MSD. Todas linhagens foram expressas, purificadas e fatores bioquímicos auxiliaram na seleção dos três mais termoresistentes. Estes foram caracterizados, juntamente com XynAc_Ec, frente a fatores biofísicos (CD) e estruturais (por homologia - 1TUX-PDB). Destaque para o mutante H209N com maior termoestabilidade, atividade catalítica e T_m de 71,3 °C. O aumento na estabilidade térmica foi relacionado ao incremento de hélices curtas, pontes salinas e a carga positiva no core catalítico (trabalho publicado). O **Capítulo 3** apresenta resultados da combinação *in silico* dos três mutantes termoestáveis, com base em dados estruturais (homologia - 1TUX-PDB). Q158R / H209N / N257D exibiu maior conteúdo de interações salinas e menor RMSF. Portanto, XynA_Pp, XynA_Ec e H209N são enzimas potenciais para aplicação em bioprocessos; e estudos *in silico* sugerem que mutante Q158R / H209N / N257D seja obtido *in situ*.

Palavras-chave: endo-xilanase, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *E. coli*, termoestabilidade, mutantes.

ABSTRACT

The initial purpose of this work was the improvement of xylanase thermal stability of fungus *T. aurantiacus* (*XynA-Ta*), expressed in *S. cerevisiae* (*XynA-Sc*) from the building previously obtained in *P. pastoris* (*xynA-Pp*). However, the reduced expression of *XynA-Sc*, combined with two mutations of amino acids, led to the recloning *xynA-Ta* gene in *E. coli* (*XynA-Ec*). **Chapter 1** describes the study of the production and characterization of *XynA-Sc*, *XynA-Pp* and *XynA-Ec*, previous mutation corrections. These showed great expression with 650, 5.8 and 815 U.mL⁻¹, after 96 h and activity at pH 5-5.5 and 65-70 °C. *XynA-Ec* displayed wide stability range from 40 to 85 °C, after 1h, and *XynA-Pp* showed 100% activity at pH 6-8, after 24 h. *XynA-Sc* and *XynA-Pp* exhibited stronger activation in organic solvents. The *XynA-Sc* was inhibited by concentrations greater than 20 mg.mL⁻¹ of substrate. **Chapter 2** describes the native correction (*XynAc-Ec*) and construction of eleven mutant obtained by the MSD. All strains were expressed, purified and biochemical factors helped in the selection of the three most heat resistant. These were characterized, along with *XynAc-Ec*, by biophysical (CD) and structural factors (homology - 1TUX-PDB). H209N mutant displayed higher thermal stability, catalytic activity and T_m of 71.3 °C. The increase in thermal stability was related to short helices content, salt bridges, and the positive charge in the catalytic core (published work). **Chapter 3** presents results of *in silico* combination of the three thermostable mutants, based on structural data (homology - 1TUX-PDB). Q158R / H209N / N257D showed higher content of bridges interactions and lower RMSF. Therefore, *XynA-Pp*, *XynA-Ec* and H209N are potential enzymes for applied bioprocesses; and studies *in silico* suggest that mutant Q158R / H209N / N257D should be obtained *in situ*.

Keywords: endo-xylanase, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *E. coli*, thermalstability, mutants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química geral da xilana e ação das enzimas do complexo hemicelulolítico.....	22
Figura 2 – Representação estrutural da endo-xilanase de <i>T. aurantiacus</i> , com enovelamento do tipo barril TIM (α/β) ₈ por visão lateral ao longo do barril.....	25
Figura 3 – Mapa do vetor de expressão pET-28a.....	30
Figura 4 – Mapa físico do vetor Y1PGK-1.....	34
Figura 5 – Mapa do vetor pPIC9.....	37
Figura 6 – Esquema representativo de técnicas de engenharia de proteínas. (a): Desenho racional – mutação sítio dirigida (SDM) . (b): Evolução dirigida – epPCR e DNA shuffling.....	41
Capítulo 1	
Figura 1 – Múltiplo alinhamento de seqüências de aminoácidos das construções de pPIC9xil, yPGKxil e pET32xil contra os modelos do GenBank (AF127529.2) e do PDB (1TUX) do fungo <i>T. aurantiacus</i>	66
Figura 2 – Cromatograma de XynA_Sc purificada por cromatografia de troca ar realizada em sistema FPLC ÄKTApurifier (GE Helthcare).....	69
Figura 3 – (A) Cromatogramas de XynA-Pp purificada por cromatografia de troca aniônica realizada em sistema FPLC ÄKTApurifier (GE Helthcare) e gel SDS-PAGE 12% das frações eluídas.....	70
Figura 4 – Purificação de XynA_Ec após etapa de afinidade (gel da esquerda) e gel filtração (gel da direita). XEc: xil_Ec após gel filtração e concentração em tubos vivaspin.....	71
Figura 5 – A análise de SDS-PAGE 12% de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp recombinantes purificadas. (A) Gel SDS-PAGE revelado por EZBlue e coloração com prata. (B) Gel SDS-PAGE com xilana 1%. (C) Zimograma para XynA_Tau.....	72
Figura 6 – Condições de armazenamento das xilanases recombinantes após 24 h de incubação.....	73
Figura 7 – Efeito do pH e da temperatura na atividade xilanolítica de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp.....	74
Figura 8 – Estabilidade de pH e temperatura sobre XynA_Ec, XynA_Pp e XynA_Sc.....	75
Figura 9 – Gráficos de Michaelis-Menten das xilanases variando-se a concentração	

de xilana beechwood (0,5 – 20 mg.mL⁻¹) em ensaio de atividade xilanolítica realizado a 65 °C pH 5-5,5, durante 5 min de reação para XynA_Sc, XynA_Ec e XynA_Pp.....80

Capítulo 2:

Figure 1 – pH stability profile. -●- xynAc; -■- Q158R; -▼- H209N; and -Δ- N257D.....102

Figure 2 – Secondary structure of XynA and its mutants after purification. (Inset), SDS-PAGE analysis of the endo-xylanase variants after the purification and concentration steps.....102

Figure 3 – Model structure of XynA (WT) built by MODELLER based on the PDB ID code 1TUX. Mutants Q158R, N257D and H209N are highlighted.....103

Figure 4 – Models of XynA (WT) and its mutants. A. Before the simulation. B. After the simulation of 50 ns in water with NaCl (100 mM) at 338 K103

Supplementary Material

Figure S1 – Multiple alignment of TaXyn10 amino acid sequence (GenBank: AF127529.1) and PDB structure model (1TUX) highlighting the eleven mutation sites studied in the present work.107

Figure S2 – RMSF per aminoacid residue of XynA and its mutants in 100 mM NaCl solution, at 338K.....108

Figure S3 – Distribution of the surface charge potential in the substrate binding active site region of XynAc (A) and its mutants Q158R (B), H209N (C) and N257D (D).....108

Capítulo 3:

Figura 1 – RMSF por resíduos dos modelos dos mutantes em solução com NaCl (100 mM) a 338K.....114

Figura 2 – Distribuição do potencial de carga superficial no sítio de ligação ao substrato dos mutantes (A) Q158R/H209N (B) Q158R/N257D, (C) H209N/N257D (D) Q158R/H209N/N257D.....115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais objetivos descritos para cada uma das construções em estudo.....	19
Tabela 2 – Reações de bioconversões e aplicações de hidrolases termoestáveis...	20
Tabela 3 – Algumas cepas de <i>E. coli</i> mais frequentemente utilizadas para produção de proteínas heterólogas e seus fatores chave.....	29
Capítulo 1:	
Tabela 1 – Pares de oligonucleotídeos usados na reação de amplificação/sequenciamento.....	57
Tabela 2 – Efeito dos íons metálicos, quelante, surfactantes e solvente na atividade de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp.....	77
Capítulo 2:	
Table 1 – Oligonucleotide pairs used for plasmid construction and site-directed mutagenesis.....	104
Table 2 – Total protein content, specific activities in the optimum temperature and ideal pH and temperature for all the enzyme variants constructed in this work.....	105
Table 3 – Residual activities of XynA (WT) and the best mutant enzymes at 70 °C and 75 °C and some of their structural features <i>T_m</i> values were monitored by the MRE signal at 220 nm.....	105
Capítulo 3:	
Tabela 1 – Fatores estruturais dos mutantes de XynAc_Ec. Número de ligações Salinas e hélices curtas após 50 ns de simulação em água com NaCl (100 mM), a 338 K, e conteúdo de estrutura secundária relativo a cada mutante.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
AOX	Álcool oxidase
AR	Atividade residual
B-merc	Beta mercaptoetanol
CAP	Proteína receptora
CAZy	Carbohydrate active enZYmes
CD	Circular dichroism
CEN.PK2	Cepa de expressão de <i>S. cerevisiae</i>
DP	Desvio padrão
epPCR	Error-prone PCR
FT	<i>Flow-Through</i>
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GHs	Hidrolases glicosídicas
GS115	Cepa de expressão de <i>P. pastoris</i>
GST	Gene da Glutathione S-transferases
HIS	Histidina
HIS4	Gene marca auxotrófica Histidinol desidrogenase 4
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Quilodálon
K_m	Constante de Michaelis Menten
Kan	Kanamicina
MBP	Gene da Myelin Basic Protein
<i>LacI</i>	Lactose-inducible lac operon transcriptional repressor
LEU2	Gene marca auxotrófica Leucina 2
MSD	Mutação sítio dirigida
Mut^s	Fenótipo denominado
RMSF	<i>Root-mean-square fluctuation</i>
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
URA3	Gene marca auxotrófica Uracila 3
NA	Não aplicado
Ori	Origem de replicação
T_m	Temperatura de melting

T7	Sequência terminadora
PDB	Protein data bank
pET32axil	Plasmídeo do gene de xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em vetor de <i>E. coli</i>
PGKpp	Região promotora do vetor constitutivo de <i>S. cerevisiae</i> (yPGK1)
PGKtt	Região terminadora do vetor constitutivo de <i>S. cerevisiae</i> (yPGK1)
pPIC9xil	Plasmídeo do gene de xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em vetor de <i>P. pastoris</i>
V_{max}	Velocidade Máxima
yPGKxil	Plasmídeo do gene de xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em vetor de <i>S. cerevisiae</i>
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosomes</i>
X	Sequência promotora em <i>S. cerevisiae</i>
XOs	Xilooligossacarídeos
XTa	Xilanase de <i>T. aurantiacus</i>
XynA_Tau	Xilanase de <i>T. aurantiacus</i>
XynA_Ec	Xilanase expressa em <i>E. coli</i>
XynAc_Ec	Xilanase corrigida expressa em <i>E. coli</i>
xynAc_Ec	Gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> corrigido
xynA_Ec	Gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em <i>E. coli</i>
XynA_Pp	Xilanase expressa em <i>P. pastoris</i>
xynA_Pp	Gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em <i>P. pastoris</i>
2μ	<i>Plasmídeo natural.</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Enzimas termoestáveis	19
3.1.1. Hidrolases Glicosídicas termoestáveis.....	20
3.1.1.1. Endo-xilanases e mecanismo de hidrólise enzimática.....	21
3.2. Estrutura da endo-β-1,4-xilanases de <i>T. aurantiacus</i> (XynA_Ta) e fatores relacionados à sua termoestabilidade	24
3.3. Sistema microbiano para a clonagem e expressão heteróloga de enzimas termoestáveis	25
3.3.1. Bactéria como sistema de expressão heteróloga.....	26
3.3.2. Fungo como sistema de expressão heterólogo.....	32
3.3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema de expressão heteróloga.....	32
3.3.2.2. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão heterólogo.....	35
3.4. Melhoramento genético de enzimas	40
4. CONCLUSÕES	42
5. REFERÊNCIAS	42
Capítulo 1:	52
1. INTRODUÇÃO	54
2. METODOLOGIA	56
2.1. Obtenção e construções dos plasmídeos recombinantes de xilanase do fungo termofílico <i>Thermoascus aurantiacus</i> (Xil_Tau) em vetor constitutivo de <i>Pichia pastoris</i>, vetor episomal de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, yPGK, e de <i>Escherichia coli</i>, pET32a	56
2.2. Sequenciamento das construções de xilanases	57
2.3. Expressões das xilanases recombinantes	58
2.3.1. Em cepa GS115 de <i>P. pastoris</i>	58
2.3.2. Em cepa CEN.PK2 de <i>S. cerevisiae</i>	58
2.3.3. Em cepa Rosetta-gami de <i>E. coli</i>	59
2.4. Pré-tratamento do extrato bruto, purificações e proteína total	60
2.4.1. Xilanases recombinantes (XynA_Sc e XynA_Pp).....	60

2.4.2. Xilanase recombinantes (Xyna_Ec).....	61
2.5. Atividade xilanolítica.....	62
2.6. SDS-PAGE e Zimograma de endo-xilanase.....	62
2.7. Determinação de fatores bioquímicos das xilanases recombinantes.....	63
2.7.1. Condições de armazenamento das xilanases recombinantes.....	63
2.7.2. Especificidade ao substrato.....	63
2.7.3. pH e temperatura ótimos e de estabilidade.....	63
2.7.4. Efeito de íons metálicos, não metálicos, quelantes, solventes orgânicos e surfactantes na atividade das endo-xilanases.....	64
2.7.5. Parâmetros cinéticos para as xilanases recombinantes.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
3.1. Sequenciamento das construções de yPGKxil, pPIC9xil e pET32xil.....	65
3.2. Expressão das linhagens de xilanase recombinantes em <i>P. pastoris</i>, <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i>.....	67
3.3. Purificação das xilanases recombinantes de estudo.....	68
3.4. Zimograma para xilanases recombinantes.....	71
3.5. Determinação de fatores bioquímicos das xilanases recombinantes.....	73
3.5.1. pH e temperatura ótimo e de estabilidade.....	74
3.5.2. pH e temperatura de estabilidade.....	75
3.5.3. Efeito de íons, agente quelante, surfactante e detergente sob as xilanases recombinantes.....	77
3.5.4. Cinética enzimática.....	79
4. CONCLUSÕES.....	81
5. REFERÊNCIAS.....	81
Capítulo 2:.....	86
1. INTRODUCTION.....	88
2. MATERIAL AND METHODS.....	89
2.1. <i>Cloning of the gene xynA_TA.....</i>	89
2.2. <i>Site-directed mutagenesis.....</i>	89
2.3. <i>Heterologous expression, enzyme purification and quantification.....</i>	90
2.4. <i>Biochemical, biophysical and structural properties of XynA (WT) and mutants.....</i>	91
2.4.1. <i>Effects of temperature and pH on xylanase activity and stability.....</i>	91
2.4.2. <i>Spectroscopic analyses.....</i>	91

2.4.3. <i>Molecular modeling and Molecular dynamics simulation of XynA and its thermostable mutants in solution</i>	92
3. RESULTS AND DISCUSSION	93
3.1. <i>Expression and Purification of XynA and the mutants</i>	93
3.2. <i>Biochemical properties of XynA and the mutants</i>	93
3.3. <i>Spectroscopic analyses</i>	94
3.4. <i>Molecular modeling and Molecular dynamics simulation</i>	95
3.5. <i>Influence of other structural features upon XynA thermostability</i>	96
4. CONCLUSIONS	96
5. ACKNOWLEDGEMENTS	97
6. REFERENCES	97
Capítulo 3:	109
1. INTRODUÇÃO	111
2. METODOLOGIA	112
2.1. Modelagem molecular e dinâmica molecular da xynAc e seus mutantes	112
3. RESULTADOS	113
4. CONCLUSÕES	116
5. REFERÊNCIAS	116

1. INTRODUÇÃO

As endo-1,4- β -xilanases são enzimas responsáveis pela hidrólise da cadeia interna da xilana, o principal componente da hemicelulose, produzindo unidades menores de xilobiose e xilooligossacarídeos. A habilidade das endoxilnases hidrolisar xilana, destacaram-nas como importante enzima para aplicações industriais no tratamento da biomassa residual, branqueamento de papel e produção de xilooligossacarídeos com importantes funções prebióticas. Portanto, dependendo da aplicação final destas enzimas, necessita-se de xilanases capazes de tolerar ambientes extremos, como elevada temperatura ou pH extremamente ácidos e básicos. No entanto, nem sempre estas enzimas possuem naturalmente estas características.

O aumento na produção de enzimas e o melhoramento de características bioquímicas podem ser obtidos por meio de estratégias moleculares, também denominado de tecnologia de DNA recombinante e engenharia de proteína. Dentre estas, destacam-se a produção de proteínas recombinantes heterólogas, melhoramento genético por desenho racional ou mutação sítio dirigida (MSD); e evolução de enzimas por reação da cadeia de polimerase propenso a erros (epPCR) e embaralhamento de DNA, o qual originou-se do inglês DNA *shuffling*. De acordo com a característica desejada os mutantes são selecionados e estudados para melhor compreensão do seu potencial biológico.

Neste sentido, este projeto de Doutorado objetivou inicialmente o melhoramento genético do gene da endoxilanase do fungo *T. aurantiacus* (XynA_Ta) por epPCR apenas. O gene de xilanase clonado em *P. pastoris* (xynA_Pp) foi doado por grupo de pesquisa de Biotecnologia de Leveduras, no qual aluna de mestrado (Fernanda Franco) desenvolveu projeto de clonagem e expressão em cepa de *P. pastoris*, anterior ao trabalho de estudo. Acreditava-se inicialmente que a clonagem e expressão de XynA_Tau em *S. cerevisiae* seria interessante devido ao fato de que o vetor episomal de *Saccharomyces* possui o plasmídeo natural 2 μ , o qual confere também uma origem de replicação em *E. coli*, diferindo-se do vetor de *Pichia*. Este último plasmídeo foi utilizado como molde para amplificação e clonagem em *S. cerevisiae* (XynA_Sc), seguido de etapa de melhoramento por epPCR.

Problemas relativos a reduzida expressão de XynA_Sc, aliado a presença de dois sítios de mutações na sequência de aminoácidos (N60D e A221V) da mesma,

indicaram que realizar estudo de mutação a partir de um gene naturalmente “mutado” poderia conduzir a um estudo difícil de ser analisado devido a dificuldades de comparações dos dados. Portanto, estas linhagens de *xynA_Pp* e *xynA_Sc* foram posteriormente expressas durante este trabalho, sendo o protocolo de expressão de *xynA_Sc* estabelecido e o de *XynA_Pp* executado como determinado em trabalho anterior. *XynA_Pp* não havia sido purificada, o que motivou estudo de purificação desta linhagem juntamente com a linhagem deste trabalho, *XynA_Sc*. Tratavam-se de construções que carregavam naturalmente estes sítios de mutações, mas com perfis completamente diferentes de expressão. Portanto, estudos de purificação e caracterização bioquímica das linhagens de *XynA_Sc* e *XynA_Pp* são apresentados neste trabalho, uma vez que a caracterização da enzima nativa era um dos objetivos do projeto inicial.

Posteriormente, o gene da xilanase foi clonado em *E. coli* (*XynA_Ec*), com as bases corrigidas por MSD, o qual originou a xilanase nativa corrigida (*xynAc_Ec*). Este foi utilizado posteriormente para outras onze reações de MSD e dois *rounds* de epPCR. Mutantes foram caracterizados frente a condições bioquímicas distintas, dos quais mutantes termoestáveis obtidos por MSD foram selecionados e tiveram dados biofísicos e estruturais coletados por CD e modelagem molecular. Diante das dificuldades encontradas no trabalho de expressão em *S. cerevisiae*, dada a facilidade de trabalho com *E. coli*, tempo reduzido para expressão, elevado nível de expressão e de enzima pura, estes três mutantes e a nativa foram utilizados para continuação do trabalho de Doutorado, sendo estudos, *in silico*, de combinação destes três materiais genéticos representativos dos termoestáveis foram conduzidos para seleção de mutantes potenciais para estudos *in situ*.

Com relação aos mutantes em *E. coli* selecionados, objetivou-se caracterizar as construções frente a fatores bioquímicos, biofísicos e estruturais, assim como prover estudos *in silico* a partir da combinação dos mutantes pré-selecionados, com intuito de facilitar etapas posteriores de combinação destes materiais genéticos, contribuindo para economia tempo na bancada e gastos desnecessários com reagentes. Por outro lado com as construções em levedura, objetivou-se comparar os dados bioquímicos das duas linhagens *XynA_Pp* e *XynA_Sc* contra a nativa em *E. coli*, *XynA_Ec*, com a mesma mutação, e checar o efeito de modificação pós-traducional das construções em levedura, comparadas a de bactéria. Trata-se de um

4. CONCLUSÕES

Estes dados coletados mostraram-se bastante satisfatórios, pois foram revelados fortes fatores estruturais relacionados a estabilidade das xilanases mutagênicas. De forma geral, todas as estruturas apresentaram um expressivo aumento no conteúdo de interações salinas, Q158R/ H209N/N257D mostrou maior estabilidade durante toda a simulação com baixas flutuações e de forma geral, todos apresentaram conteúdo de carga positivo ou neutro. Portanto, estes dados nos sugerem que estas combinações (*in silico*) revelaram construções que podem apresentar melhoria na termoestabilidade, considerando-se os fatores aqui investigados. Portanto, estas linhagens são possivelmente enzimas potenciais para estudos *in situ*, justificando futuro investimento financeiro e de tempo na obtenção dos mesmos.

5. REFERÊNCIAS

AKASAKO, A.; HARUKI, M.; OOBATAKE, M.; KANAYA, S. Conformational stabilities of Escherichia coli RNase HI variants with a series of amino acid substitutions at a cavity within the hydrophobic core. The Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 30, p. 18686–18693, 1997.

AUERBACH, G.; OSTENDORP, R.; PRADE, L.; et al. Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima: the crystal structure at 2.1 Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization. Structure, v. 6, n. 6, p. 769–781. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00078-1, 1998.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of Chemical Physics, v. 81, n. 8, p. 3684–3690. doi: 10.1063/1.448118, 1984.

COSTANTINI, S.; COLONNA, G.; FACCHIANO, A. M. ESBRI: A web server for evaluating salt bridges in proteins. Bioinformatics, v. 3, n. 3, p. 137–138. Retrieved February 16, 2016, , 2008.

COTA, J.; OLIVEIRA, L. C.; DAMÁSIO, A. R. L.; CITADINI, A. P.; HOFFMAM, Z. B.; ALVAREZA, T. M.; CODIMA, C. A.; LEITE, V. B. P.; PATORE, G.; NETOD, M. O.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; SQUINA, F. Assembling a xylanase–lichenase chimera through all-atom molecular dynamics simulations. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, v.1834, 8, p. 1492–1500, 2013.

ELCOCK, A. H. The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *Journal of Molecular Biology*, v. 284, n. 2, p. 489–502. doi: 10.1006/jmbi.1998.2159, 1998.

FREEDMAN, R. B. Proteins: Structures and molecular properties. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 10, n. 2, p. 82. doi: 10.1016/0968-0004(85)90239-7, 1985.

KARPLUS, M. & MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology* 9, 646–652 (2002).

NATESH, R.; BHANUMOORTHY, P.; VITHAYATHIL, P. J.; et al. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Molecular Biology*, v. 288, n. 5, p. 999–1012. doi: 10.1006/jmbi.1999.2727, 1999.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1656–1676. doi: 10.1002/jcc.20090, 2004.

PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, p. btt055. doi: 10.1093/bioinformatics/btt055, 2013.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, n. 3, p. 779–815. doi: 10.1006/jmbi.1993.1626, 1993.

STEINBACH, P. J. & BROOKS, B. R. Protein hydration elucidated by molecular dynamics simulation. *PNAS* 90, 9135–9139 (1993).

WHITFORD, P. C. ET AL. An all-atom structure-based potential for proteins: Bridging minimal models with all-atom empirical forcefields. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 75, 430–441 (2009).

WOOLFSON, D. N. Core-directed protein design. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 11, n. 4, p. 464–471. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00234-7, 2001.