

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPOS DE BOTUCATU**

Marcel Rodrigues Ferreira

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo aplicado a caracterização de enzimas
celulolíticas com potencial na transformação enzimática da biomassa

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP.

Botucatu, novembro de 2014.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPOS DE BOTUCATU**

Marcel Rodrigues Ferreira

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo aplicado a caracterização de enzimas
celulolíticas com potencial na transformação enzimática da biomassa

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Bociências,
Campus de Botucatu, UNESP.

Orientador Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto

Botucatu, novembro de 2014.

Sumário

1.Introdução.....	8
1.1 Glicosídeo hidrosilases.....	8
1.1.1 β -1,3-glucanases – GH16.....	8
1.2 Superóxido dismutase - SOD.....	9
2. Justificativa.....	10
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1 GH16.....	11
3.1.1 Clonagem, expressão e purificação.....	11
3.2 SOD.....	12
3.2.1 Clonagem, expressão e purificação de SOD de <i>Coptotermes gestroi</i>	12
3.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	13
3.3.1 Realização dos experimentos.....	13
3.3.2 Análise dos dados de SAXS.....	14
3.3.3 Modelagem <i>ab initio</i> dos dados de SAXS.....	14
3.3.4 Comparação dos dados de SAXS com as estruturas de alta resolução.....	15
4. Resultados e Discussão.....	15
4.1 GH16.....	15
4.1.1 Expressão das enzimas.....	15
4.1.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	16
4.1.3 Comparação dos dados de SAXS com as estruturas de alta resolução disponíveis.	17
4.2 Superóxido dismutase (SOD).....	20
4.2.1 Superóxido dismutase descoberta, clonagem e caracterização do gene.....	20
4.2.2 Purificação da Superóxido dismutase.....	20

4.2.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	21
5. Conclusões.....	25
6. Referências Bibliográficas.....	25

Lista de Figuras

- Figura 1: Análise SDS -PAGE de GH16 após a cromatografia de afinidade e de exclusão de tamanho. M - marcador de peso molecular. 16
- Figura 2: (A) Curva experimental de SAXS da GH16 e ajuste com curvas simuladas. Dados experimentais a 1 mg/mL (círculos abertos), monômero PDB 3ILN (linha contínua), dímero PDB 3ILN (linha tracejada). Inseto contendo análise Guinier. (B) curvas função de distribuição de distâncias $p(r)$ para os dados mencionados em (A). . 17
- Figura 3: Interface do servidor SAXSmow (www.if.sc.usp.br/~saxs) GH16 demonstrando a presença de monômeros em solução..... 18
- Figura 4: Superposição de GH16 ‘ab initio’ DAM e estrutura cristalográfica monomérica GH16 PDB ID 3ILN. O modelo do centro e o modelo da direita são rotacionados 90° em relação ao eixo y e rotacionados 90° em relação ao eixo x, respectivamente 19
- Figura 5: Identificação de CgSOD1 em *Coptotermes gestroi* dígestome. A análise de SDS-PAGE de frações de cromatografia antes de LC-MS / MS. M = escada, IEX4-20 = Ion fração cromatografia de troca e GFA2-38 = Gel fração cromatografia de filtração. 20
- Figura 6: Análise SDS-PAGE de frações de cromatografia IMAC CgSOD1 purificação. M = escada, FL = fluxo contínuo, as pistas 25 mM de imidazol 200 mM..... 21
- Figura 7: Gráficos de Porod-Debye e Kratky indicando alta flexibilidade na amostra. Dados antes e depois do procedimento da subtração da constante de Porod de valor $3,1744 \times 10^5$ 22
- Figura 8: (A) Curva experimental de SAXS da SOD e ajuste com curvas simuladas. Dados experimentais a 5 mg/mL (círculos abertos), PDB ID 3L9Y (linha vermelha), modelo ‘ab initio’ dammin (linha preta). Inseto contendo análise Guinier. (B)) curvas

função de distribuição de distancias $p(r)$, para os dados mencionados em (A) normalizadas levemente deslocadas para a esquerda.	22
Figura 9: Interface do servidor SAXSmoW (ww.if.sc.usp.br/~saxs). Dados de SOD demonstrando a presença de dímeros em solução.	23
Figura 10: Superposição do modelo ‘ab initio’ DAM e estrutura cristalográfica PDB ID 3L9Y. O modelo do centro e o modelo da direita são rotacionados 90° em relação ao eixo x e rotacionados 90° em relação ao eixo y, respectivamente.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados obtidos através do tratamento com pacote ATSAS e SAXSmoW webtool.	19
Tabela 2: Parâmetros estruturais de SOD.....	24

RESUMO DO RELATÓRIO

β -1,3-glucanases (GH16) e Superóxido dismutase (SOD) são enzimas com aplicação potencial em processos biotecnológicos, com grande interesse em seus estudos da possibilidade de aplicação desde a indústria alimentícia até a produção de biocombustíveis. Estas enzimas foram estudadas utilizando espalhamento de raios-X a baixo ângulo. GH16 e SOD foram caracterizadas como monômero e dímero, respectivamente. Através de modelos '*ab initio*' foi possível identificar a forma e a organização das enzimas. Este trabalho contou com a colaboração da pesquisadora Dra. Thabata Maria Alvarez do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) e do doutorando João Paulo Lourenço Franco Cairo do CTBE.

1.Introdução

1.1 Glicosídeo hidrosilases

Glicosídeo Hidrosilases (GHs) são um grupo de enzimas de grande importância para o metabolismo de carboidratos (Henrissat, 1991), e, portanto, são enzimas-chave para processos biotecnológicos, tais como a produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas vegetais (Li et al, 2009), a indústria de papel e celulose (Juturu e Wu, 2012) e melhoria da qualidade dos alimentos (Zheng et al, 2011).

Recentes avanços em técnicas de sequenciamento de DNA levaram a uma explosão na quantidade de dados de sequenciamento do genoma disponíveis e tal fenômeno tem proporcionado uma fonte inesgotável de glicosídeo hidrolases (GHs) a serem caracterizadas utilizando ferramentas da biologia estrutural. Mesmo que as enzimas possam ser classificadas entre as famílias de GHs definidas no banco de dados Cazy (enzimas Carboidratos-ativos) (Cantarel et al,2009), métodos computacionais são incapazes de distinguir especificidades de substrato de enzimas pertencentes a uma mesma família. Neste sentido, a caracterização bioquímica e estrutural de um grande número de glicosídeo hidrosilases recentemente identificados a partir de diferentes famílias representam ferramentas promissoras para compreender características e mecanismos de hidrólise de hidratos de carbono molecular.

1.1.1 β -1,3-glucanases – GH16

Entre as GHs, β -1,3-glucanases são um grupo de enzimas que atuam na hidrólise de polissacárideos com ligações 1,3- β -ligações, tais como, 1,3- β -glucana presente em paredes de células fúngicas (Hong e Meng , 2003); ligação mista β -glucanas que atuam mantendo a estrutura da parede celular da planta e, como um polissacarídeo de armazenamento de energia, em plantas da ordem Poales (Iakiviak et al, 2011); liquenano uma ligação mista- β -glucana em líquenes (Kawai et al, 2006) e a laminarina,

um polissacarídeo de glicose de armazenamento de energia, encontrada em algas castanhas (Cota et al, 2011). Este grupo de enzimas é amplamente distribuído entre as bactérias, os fungos e plantas superiores (Gueguen et al, 1997). Enquanto as endo- β -1,3-glucanases bacterianas foram classificadas em 16 famílias de glicosídeo hidrolases, os de origem eucarionte classificaram-se em 17 famílias de glicosídeo hidrolases (Gueguen et al, 1997).

1.2 Superóxido dismutase - SOD

Coptotermes gestroi é classificado como um cupim inferior, pertencente à família Rhinotermitidae (Kirton e Brown 2003), que foi introduzida no Brasil no início do século passado. *Termites* são considerados os menores e mais eficientes biorreatores de decomposição de madeira na terra (Brune, 1998). O digestoma do cupim pode degradar 90% da biomassa lignocelulósica ingerida (Katsumata et al. 2007). Anteriormente pesquisas mostraram evidências de que cupins e sua microbiota intestinal simbiótica produzem além de celulases, hemicelulases e ligninases, um conjunto de pró-oxidante, anti-oxidante e enzimas de desintoxicação (PAD). Estas enzimas, como a catalase, superóxido dismutase, p450, glutathione s-transferase e aldo-ceto redutase podem agir sinergicamente com enzimas carboidrato-ativas ajudando a liberar açúcares simples fermentáveis a partir de suas dietas lenhosas (Franco Cairo et al 2011;. Sethi et al 2013.).

Um deste complemento, provavelmente envolvidos no processo de degradação da biomassa, é a enzima superóxido dismutase (SOD). Alguns estudos sugeriram previamente que a presença de enzimas tais como superóxido dismutase e catalases no proteoma dos organismos envolvidos na desconstrução de biomassa indica a produção

de radicais de oxigênio pelo organismo, e estes radicais são os que podem estar envolvidos na desconstrução da lignina (D'Haeseleer et al. de 2013).

Superóxido dismutases são enzimas que catalisam a dismutação de superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio. SOD é onipresente para todas as formas de vida. Quatro tipos diferentes de centros metálicos foram detectados em SOD, dividindo esta família em Cu/Zn-, Ni-, Mn-, Fe- SOD. Cu-/Zn SOD é geralmente homodimérica e está presente em diversas localidades nos diferentes organismos (Bafana et al. 2011).

2. Justificativa

β -1,3-glucanase têm aplicação potencial em processos biotecnológicos, devido ao fato de que eles atuam numa variedade de polissacarídeos naturais que contêm 1,3- β -ligações, o que resulta na liberação de oligossacarídeos com bioativo e propriedades prebióticas (Pang et al, 2005; Giese et al, 2010). Estas enzimas também podem ser adicionadas a rações animais, a fim de aumentar a digestão e a liberação de nutrientes (Brufau et al, 2006). Outra área potencial de aplicação de β -1,3-glucanases é na indústria alimentar, particularmente na produção de bebidas, tais como cerveja e vinho, evitando filtro de prematura incrustação assim facilitando a filtração (Bamforth, 2009; Humbert-Goffard et al, 2004).

Já a SOD tem atraído interesse de pesquisa, devido a certas propriedades bioquímicas extraordinárias. Em primeiro lugar, o mecanismo de transferência de elétrons entre o substrato e o local ativo da enzima é considerado como tendo atingido a perfeição, e a taxa catalítica é apenas limitada por difusão (Perry et al., 2010). Em segundo lugar, a enzima de algumas fontes mostra estabilidade incomum para ureia, ciclos de congelamento e descongelamento, altas temperaturas e refrigeração prolongada (Sanchez-Moreno et al, 1989; Lin et al 2002; Schafer e Kardinahl 2003).

Portanto, nosso objetivo é caracterizar biofísicamente as enzimas descritas acima, tendo como alvo a utilização destas enzimas em aplicações biotecnológicas. Para isso, utilizaremos neste trabalho principalmente a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo.

3. Materiais e Métodos

3.1 GH16

3.1.1 Clonagem, expressão e purificação.

A sequência foi identificada após triagem funcional de uma biblioteca metagenômica derivada do solo de um campo de cana de açúcar, como descrito anteriormente (Alvarez, 2013). A clonagem ocorreu em pET28a (Novagen), utilizando os sítios de restrição NdeI e BamHI, o qual transporta uma sequência que codifica uma fusão de 6 × His no N-terminal da proteína expressa.

Após a confirmação por sequenciamento, o plasmídeo de expressão pET28a (+) –GH16 foi transformado em células competentes *E.coli* Origami 2 para a expressão da proteína. Depois, foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0,5 mM para induzir a expressão e a temperatura foi mantida a 30 °C. Depois de 4 horas de indução, as células foram colhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl e 5 mM de imidazol). A suspensão foi sonicada após o tratamento com 0,5 mg / ml de lisozima e 50 µg / mL de DNase I. A solução foi centrifugada a 10.000 g durante 30 min e o sobrenadante foi submetido a 5 ml de HiTrap™ Chelating HP coluna (GE Healthcare). A cromatografia foi realizada utilizando um gradiente de imidazol não-linear de 5 a 0,5 M com 20 volumes de coluna.

Para obter uma amostra homogênea, a amostra foi ainda submetida a uma gel filtração em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), que foi previamente equilibrada com um tampão de fosfato 20 mM (pH 7,4) com NaCl 50 mM. A glicosídeo

hidrosilase GH16 purificada foi ainda analisada por SDS-PAGE sob condições redutoras. A concentração de proteína foi determinada por absorvância a 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar para o polipeptídeo deduzido a partir do gene (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.2 SOD

3.2.1 Clonagem, expressão e purificação de SOD de *Coptotermes gestroi*.

A análise metatranscriptômica de cupim *C. gestroi* foi realizada recentemente (Franco Cairo et al., 2014). A codificação completa da sequência de superóxido dismutase (CgSOD1), também identificada no *C. gestroi*, foi amplificada a partir do seu cDNA através de reação de polimerização em cadeia (PCR) (Franco Cairo et al., 2011) utilizando dois iniciadores de nucleotídeos (direto 5'TATAGCTAGCATGCCGATAAAAGCTGTATGTGTTC3'; reverso 5'TATAGGATCCTTAGATCTTAGCAATCCCACCAC3'), onde a sequência sublinhada indica o local de reconhecimento das enzimas de restrição. O produto de PCR foi recuperado após eletroforese em agarose e digerido com as enzimas NheI e BamHI, de acordo com as instruções do fabricante. Finalmente, o produto de PCR de digestão foi ligado entre os sítios NheI e BamHI do vetor pET-28 (a) (Novagen) tratado com as mesmas duas enzimas, permitindo a inserção de uma sequência de 6X-His Tag em posição N-terminal. Depois de clonagem e sequenciamento, a caracterização genética foi realizada em plataformas Protparam, SignalP e SecretomeP.

Células competentes ArcticExpress foram transformadas com o plasmídeo pET28a / CgSOD1 e plaqueadas em meio LB sólido seletivo contendo Kanamicina (50 $\mu\text{g mg}^{-1}$). As células a partir de uma única colônia foram cultivadas em meio LB-Kanamicina (na mesma concentração anterior) durante 16 h a 37 °C e 200 rpm. Depois disso, esta cultura foi diluída em 800 ml de meio fresco de LB-Kanamicina e cultivadas

a 30° C e 200 rpm durante 4 horas. Posteriormente, a temperatura e rotação foram reduzidas para 12° C e 120 rpm. Após uma hora de aclimatação, CuCl₂ foi adicionado a uma concentração final de 2,5 mmol L⁻¹, e a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de 1 mmol L⁻¹ de IPTG. Após 24 h, as células foram colhidas em 8500G.

As células foram ressuspensas em tampão de lise (fosfato 20 mmol L⁻¹ de sódio pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 5 mmol L⁻¹ de imidazol, 80 µg de lisozima mL⁻¹ e 5 mmol L⁻¹ de PMSF). Lise celular foi realizada em banho de gelo por um processador ultra-sônico (7 pulsos de 10 s em 500 W; VC750 Ultrasonic Processor, Sonics Vibracell). Sobrenadante de SOD foi purificado por cromatografia utilizando um sistema AKTA FPLC (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, EUA) utilizando uma coluna de 5 mL HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) carregada com Ni₂⁺ seguido de Superdex 200 10/300 GL coluna (GE Healthcare), de acordo com Mandelli et al (2013).

3.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

3.3.1 Realização dos experimentos

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo nas concentrações de 1 e 5 mg/mL para GH16 e 5 mg/mL para a SOD, foram realizados na linha de luz SAXS2 do LNLS utilizando detector bidimensional CCD (MarResearch, EUA). As medidas foram realizadas utilizando comprimento de onda $\lambda = 1,48 \text{ \AA}$, com uma distância amostra-detector de 1200 mm, resultando em um vetor de espalhamento q , definido por $q = 4\pi\text{sen}\theta/\lambda$ (2θ é o ângulo de espalhamento). As amostras de GH16 foram preparadas num tampão de fosfato 20 mM e NaCl 50 mM a pH 7,4, enquanto para as amostras de SOD foi utilizado um tampão de fosfato 20 mM a pH 6,0. Os dados foram normalizados pela intensidade do feixe incidente e corrigidos pela absorção das

amostras e resposta do detector. O espalhamento do tampão foi subtraído dos padrões de SAXS de cada proteína e as imagens foram integradas utilizando o programa Fit2D (Hammersley, 1996). Por fim, as curvas foram escalonadas pela concentração das proteínas.

3.3.2 Análise dos dados de SAXS

Após integração, os dados foram escalonados pela concentração utilizando o pacote Primus (Konarev *et al.*, 2003). A função de distribuição de distância, $p(r)$ e o diâmetro máximo, D_{max} foram determinados utilizando o pacote Gnom (Svergun *et al.*, 1992). O raio de giro, R_g (uma medida global do tamanho e forma do complexo molecular), foi obtido através de dois procedimentos independentes, a partir da equação de Guinier (Guinier e Fournet, 1955) e pelo método indireto de transformada de Fourier também utilizando o pacote Gnom. A massa molecular (MM) foi calculada utilizando procedimento implementado na webtool SAXSMoW (Fischer *et al.*, 2010). O procedimento desenvolvido para calcular a massa molecular de proteínas e conseqüentemente o estado de oligomerização não necessita de dados de SAXS em escala absoluta e nem da medida de proteína padrão para comparação.

3.3.3 Modelagem *ab initio* dos dados de SAXS

Modelos de átomos *dummy* (DAMs) foram calculados a partir das curvas de SAXS de SCGH16 utilizando procedimento '*ab initio*' implementado no pacote Gasbor (Svergun *et al.* 2001). Já para a SOD foram gerados utilizando o programa Dammin (Svergun *et al.*, 1999), devido a alta flexibilidade da proteína. O pacote Crysol (Svergun, 1995) foi utilizado para gerar a curvas de espalhamento simulada dos DAMs. A determinação do R_g e o D_{max} foram realizados com o mesmo pacote.

3.3.4 Comparação dos dados de SAXS com as estruturas de alta resolução

As curvas experimentais de SAXS de GH16 foram comparadas com curva simulada de SAXS obtida a partir da estrutura de alta resolução obtida por cristalografia a partir de “*Rhodothermus marinus*”. O PDB ID:3ILN possui identidade sequencial de 48% com GH16. Para a SOD foi utilizado um modelo por homologia a partir do PDB ID: 3L9Y, obtida por cristalografia a partir de “*silkworm Bombyx mori*”, com identidade sequencial de 73%. O pacote Crysol (Svergun *et al.*, 1995) foi utilizado para simulação das curvas de SAXS. O parâmetro de ajuste entre os dados experimentais e teóricos (χ) é definido da seguinte forma:

$$\chi^2 = \frac{1}{N_q} \left[\frac{I^{Experimental}(q) - I^{Teórico}(q)}{\zeta(q)} \right]^2$$

onde N_q é o número total de pontos experimentais, $I^{experimental}$ e $I^{Teórico}(q)$ são as intensidades experimentais e teóricas do vetor de espalhamento q , respectivamente, e $\zeta(q)$ é o desvio padrão dos valores das intensidade experimentais. O pacote Supcomb (Svergun *et al.*, 2001) foi utilizado para a sobreposição dos modelos DAM e de alta resolução. As figuras da sobreposição dos modelos foram geradas no programa PyMOL (Delano, 2002).

4. Resultados e Discussão

4.1 GH16

4.1.1 Expressão das enzimas

A proteína contendo 6xHis no terminal N, foi superexpressa com sucesso na fração citoplasmática de *E. coli* Origami2 (DE3), após a indução por IPTG a 0,5mM durante 4 horas.

Os passos de purificação de proteínas incluindo afinidade por Ni_2^+ e exclusão por tamanho, resultou em uma amostra altamente purificada adequada para ensaios biofísicos. A pureza da proteína, após ambos os passos de purificação, foi confirmada por SDS-PAGE sob condições redutoras (figura 1).

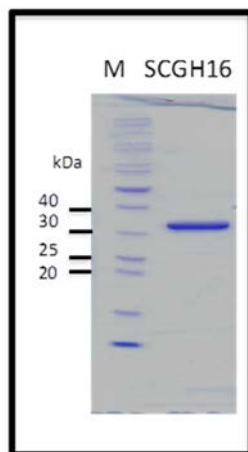


Figura 1: Análise SDS -PAGE de GH16 após a cromatografia de afinidade e de exclusão de tamanho. M - marcador de peso molecular.

4.1.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Aplicando a aproximação de Guinier da curva de espalhamento ($qR_g < 1,3$) obtém-se um raio de giro par as concentrações 1 mg/mL e 5 mg/ml, respectivamente igual a 19,6 Å (Figura 2A inserto) e 21,3 Å, respectivamente. Devido à diferença na região de Guinier entre as duas curvas (efeito de concentração) (dados não mostrados) e, conseqüentemente, em seus valores de R_g , as análises posteriores foram realizadas utilizando dados de SAXS coletados a partir de amostras de 1 mg/mL. Estes valores estão de acordo com aqueles obtidos pelo Gnom ($19,40 \pm 0,024$) Å.

4.1.3 Comparação dos dados de SAXS com as estruturas de alta resolução disponíveis.

O pacote Crysol foi usado para simular as curvas de SAXS do PDB ID 3ILN monômero, 3ILN dímero e do modelo "*ab initio*", parâmetros como a R_g e D_{max} foram também calculados (Tabela 1). O PDB ID 3ILN, que tem uma maior semelhança com a sequência de GH16 (48%), tem duas conformações: monômero e dímero. O monômero PDB ID 3ILN apresenta um parâmetro χ menor (1,964), o que indica um melhor ajuste ao experimental dados que o dímero PDB ID 3ILN (24,639).

A função de distribuição de distâncias $p(r)$ da GH16 é bem centrada e se ajusta ao modelo monomérico. Com $D_{max} = 60 \pm 5 \text{ \AA}$ para GH16(Figura 2B).

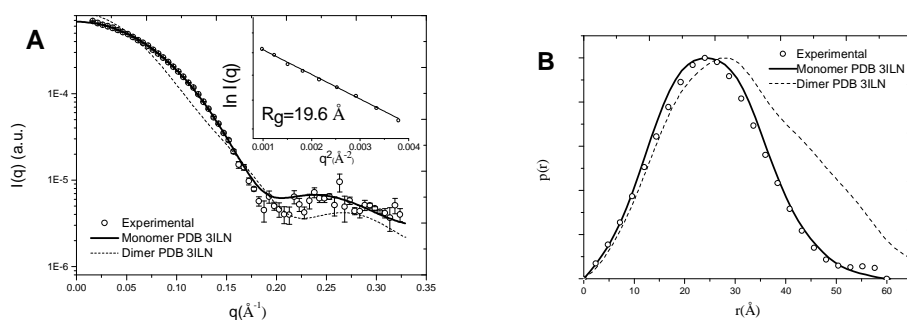


Figura 2: (A) Curva experimental de SAXS da GH16 e ajuste com curvas simuladas. Dados experimentais a 1 mg/mL (círculos abertos), monômero PDB 3ILN (linha contínua), dímero PDB 3ILN (linha tracejada). Inseto contendo análise Guinier. (B) curvas função de distribuição de distancias $p(r)$ para os dados mencionados em (A).

Usando o servidor SAXSMoW (Fischer et al., 2010), foi possível estimar a massa molecular de GH16 como sendo de 27,7 kDa. Estes valores indicam a predominância de monômeros em solução e o erro relativo para a massa molecular

teórica de 7,7% (Figura 3). Os valores obtidos com o SAXSmoW estão de acordo com os resultados do parâmetro χ .

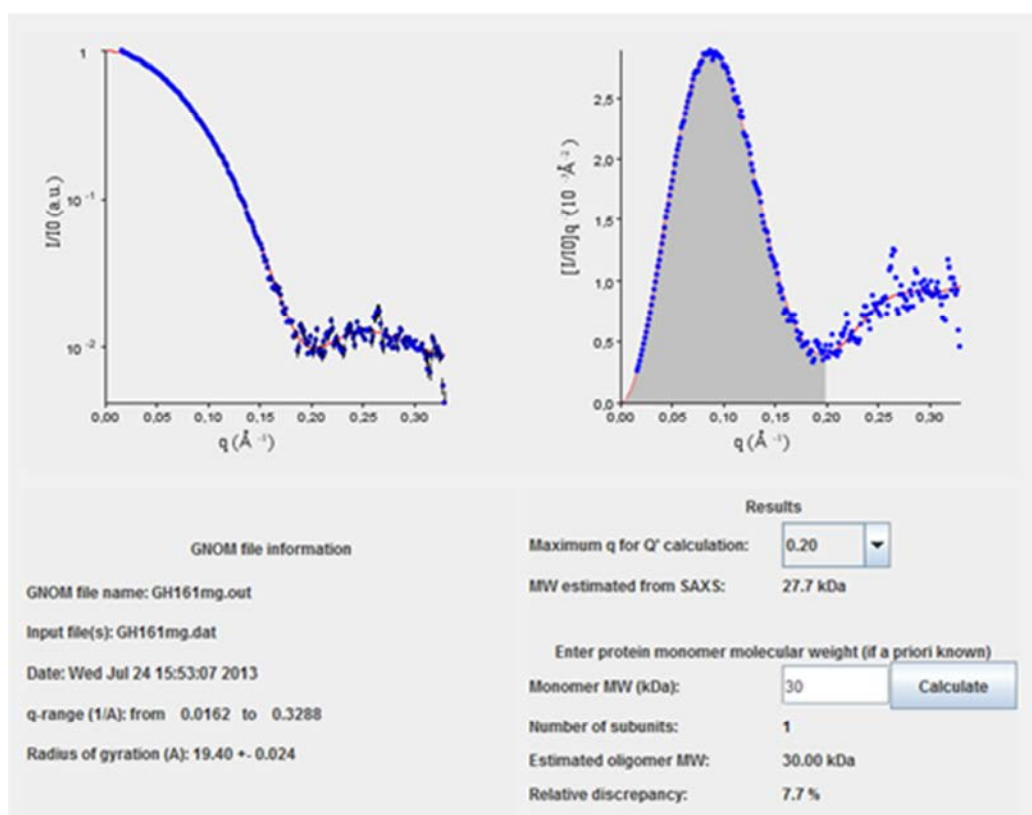


Figura 3: Interface do servidor SAXSmoW (ww.if.sc.usp.br/~saxs) GH16 demonstrando a presença de monômeros em solução.

Segundo *Bleicher et al* (2011), o dímero não é susceptível de ser encontrado em solução, como indicado pelas estimativas teóricas do ganho de energia livre de solvatação sobre a formação de interface para cada conjunto obtido utilizando o servidor PISA (Krissinel, E.; Henrick, K. 2007). Este dado vem em encontro aos resultados apresentados neste trabalho.

O modelo '*ab initio*', foi gerado com o pacote Gasbor sem nenhuma restrição de simetria (Svergun et al.,2001). Resolução do modelo SAXS é dada pela Resolução = $2\pi/q_{\max}$, neste caso, a resolução do modelo '*ab initio*' é igual a 19,10 \AA .

Modelos tridimensionais de dummy átomos (DAMs) da GH16 foram determinados a partir das curvas de SAXS (Figura 4).

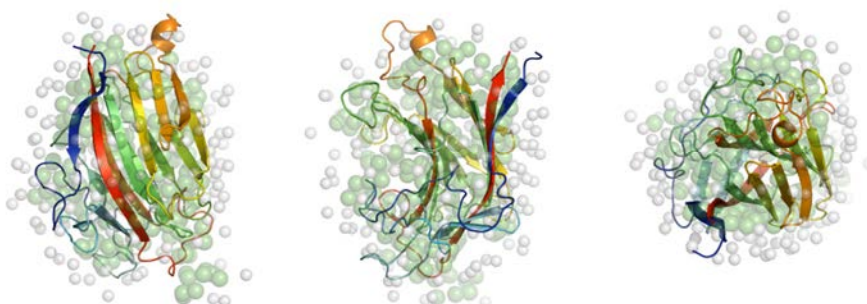


Figura 4: Superposição de GH16 ‘ab initio’ DAM e estrutura cristalográfica monomérica GH16 PDB ID 3ILN. O modelo do centro e o modelo da direita são rotacionados 90° em relação ao eixo y e rotacionados 90° em relação ao eixo x, respectivamente

Tabela 1: Dados obtidos através do tratamento com pacote ATSAS e SAXSMoW webtool.

Parâmetros	Experimental/1mg	3ILN monômero	3ILN dímero	Gasbor ‘ <i>ab initio</i> ’*
R_g (Å)	19,6 Guinier 19,4 Gnom	19,38	24,65	-
$D_{máx}$ (Å)	60	60,68	96,35	-
MW (kDa)	27,7(SAXSMoW)	27,3	46,2	-
Resolução (Å)	19,11	-	-	19,10
χ	-	1,964	24,639	1,901

4.2 Superóxido dismutase (SOD)

4.2.1 Superóxido dismutase descoberta, clonagem e caracterização do gene

Em primeiro lugar, nós utilizamos o extrato bruto da cromatografia de *C. gestroi* etapas para tentar identificar no Cazymes (Franco Cairo et al., 2011) e enzimas PAD utilizando LC-MS / MS. Identificamos a superóxido dismutase de número fracionário GFA2-38 com uma banda exclusiva do SDS-PAGE (figura 5).

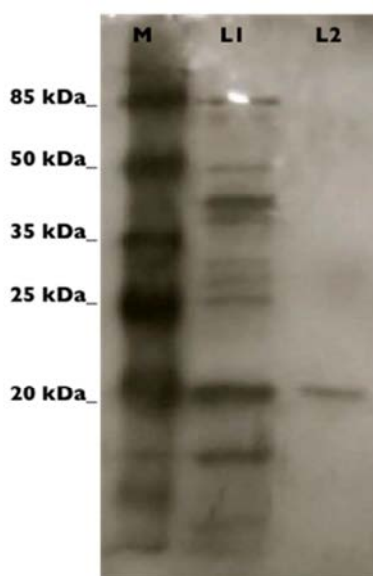


Figura 5: Identificação de CgSOD1 em *Coptotermes gestroi* digestome. A análise de SDS-PAGE de frações de cromatografia antes de LC-MS / MS. M = escada, IEX4-20 = Ion fração cromatografia de troca e GFA2-38 = Gel fração cromatografia de filtração.

4.2.2 Purificação da Superóxido dismutase

Após a indução de IPTG, as proteínas recombinantes foram efetivamente expressa usando o Arctic Express (*E. coli* BL21 DE3). Os passos de purificação de proteínas inclui cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) (figura 6) e cromatografia de exclusão de tamanho. A purificação da SOD rendeu aproximadamente 8 mg de enzima purificada por mL. A SOD purificada apresentou uma única banda de cerca de 20 kDa, na análise de SDS-PAGE.

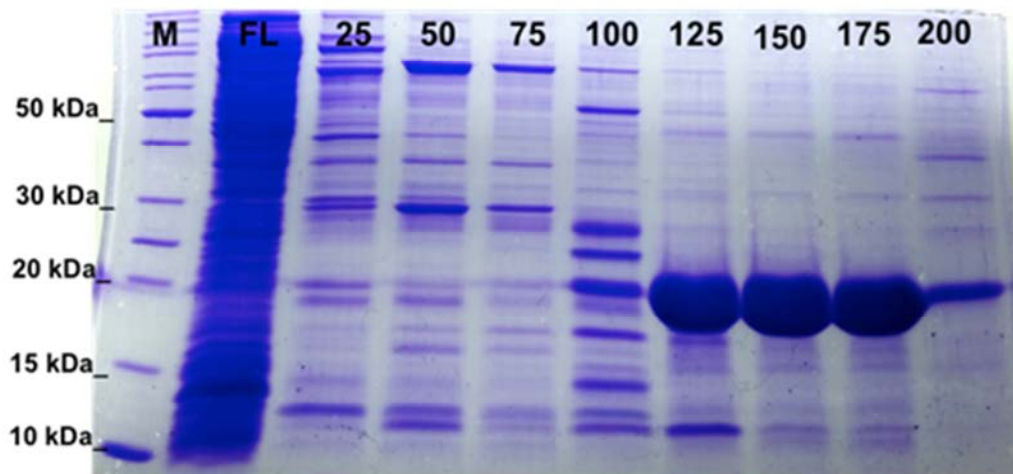


Figura 6: Análise SDS-PAGE de frações de cromatografia IMAC CgSOD1 purificação. M = escada, FL = fluxo contínuo, as pistas 25 mM de imidazol 200 mM.

4.2.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

O R_g foi obtido por dois métodos distintos, utilizando a equação de Guinier (Guinier e Fournet, 1955) (figura 8, inserto) e pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado no programa Gnom (Svergun, 1992), onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o $D_{máx}$ das proteínas.

Durante a análise da SOD constatou-se que a amostra possuía uma alta flexibilidade, por isso as análises de Porod-Debye e Kratky foram realizadas (figura 7). A constante de Porod foi determinada com o valor de $3,1744 \times 10^5$ e foi subtraída dos dados para as análises subsequentes.

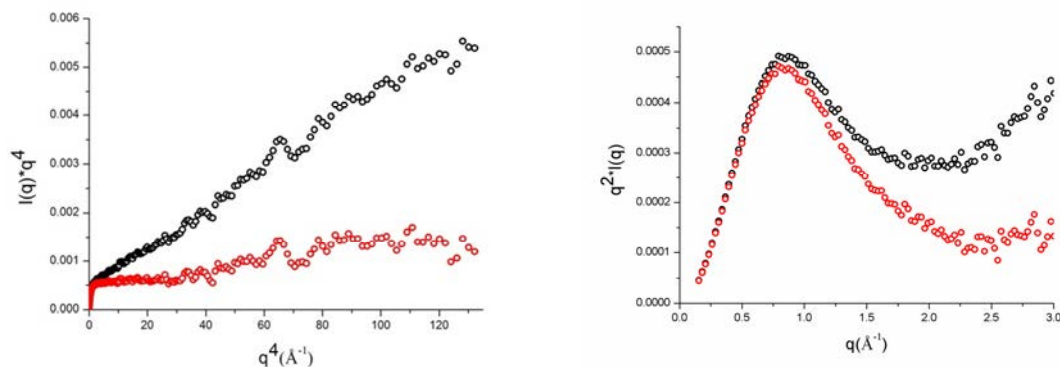


Figura 7: Gráficos de Porod-Debye e Kratky indicando alta flexibilidade na amostra. Dados antes e depois do procedimento da subtração da constante de Porod de valor $3,1744 \times 10^5$.

Aplicando a aproximação de Guinier na curva de espalhamento ($qR_g < 1,3$) obtemos um raio de giro da SOD igual a 21,1 Å, respectivamente. Estes valores estão de acordo com aqueles obtidos pelo Gnom de $(21,30 \pm 0,033)$ Å.

A função de distribuição de distâncias $p(r)$ s da SOD é um pouco deslocadas para esquerda, demonstrando o caráter alongado das partículas. Sendo $D_{\text{máx}} = 65 \pm 5$ Å. As $p(r)$ não contém parte negativa no eixo das abscissas, o qual indica ausência de efeitos de interferência produzidas por correlações espaciais inter-partículas (figura 8B).

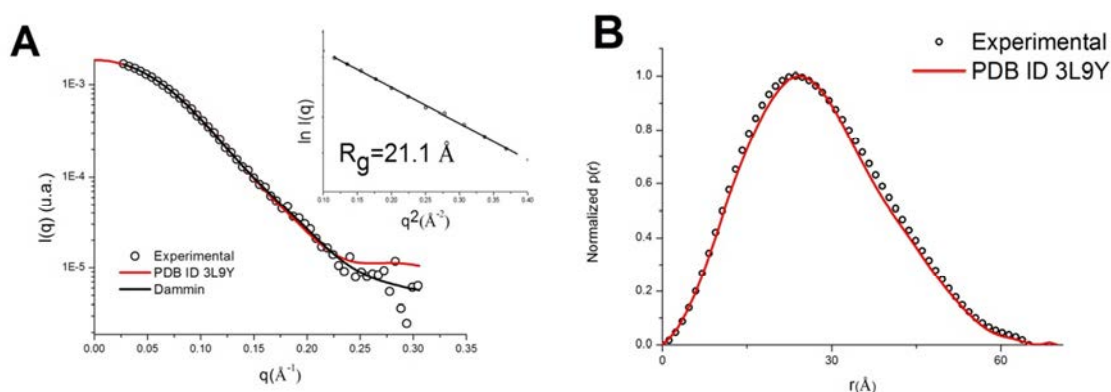


Figura 8: (A) Curva experimental de SAXS da SOD e ajuste com curvas simuladas. Dados experimentais a 5 mg/mL (círculos abertos), PDB ID 3L9Y (linha vermelha), modelo 'ab initio' dammin (linha preta). Inseto contendo análise Guinier. (B) curvas função de distribuição de distancias $p(r)$, para os dados mencionados em (A) normalizadas levemente deslocadas para a esquerda.

Utilizando o servidor SAXSMoW (Fischer et al., 2010) foi possível estimar a massa molecular da SOD como sendo de 31,60 kDa. Estes valores indicam a predominância de dímeros em solução sendo o erro relativo para a massa molecular teórica 4,7% (Figura 9).

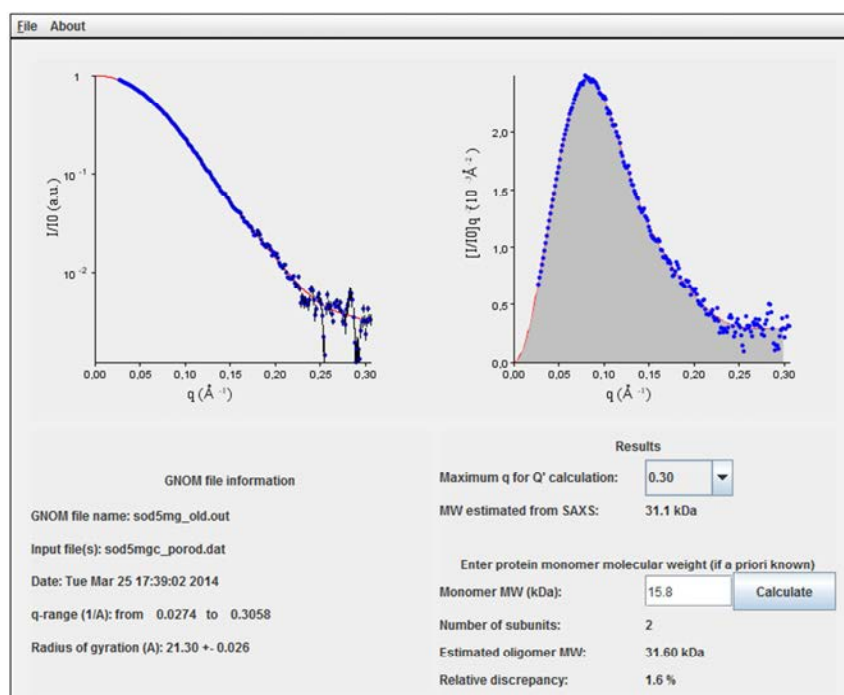


Figura 9: Interface do servidor SAXSMoW (www.if.sc.usp.br/~saxs). Dados de SOD demonstrando a presença de dímeros em solução.

A partir dos dados de SAXS foram obtidos modelos ab initio de átomos dummy utilizando o programa Dammin (Svergun et al., 1999). Para verificar a unicidade do modelo, simulações independentes partindo de diferentes parâmetros iniciais e sem imposição de simetria foram realizadas, chegando a resultados consistentes, para a SOD (figura 10). O programa Dammin também calcula e subtrai a constante de Porod, cujo valor calculado foi de $3,275 \times 10^{-5}$.

A curva de espalhamento experimental sobre a curva simulada do modelo de átomos dummy se sobrepõe de maneira bem condizente (figura 8A). A curva de espalhamento simulada das coordenadas dos modelos de átomo dummy e de alta resolução foi calculada utilizando o programa Crysol (tabela 2)

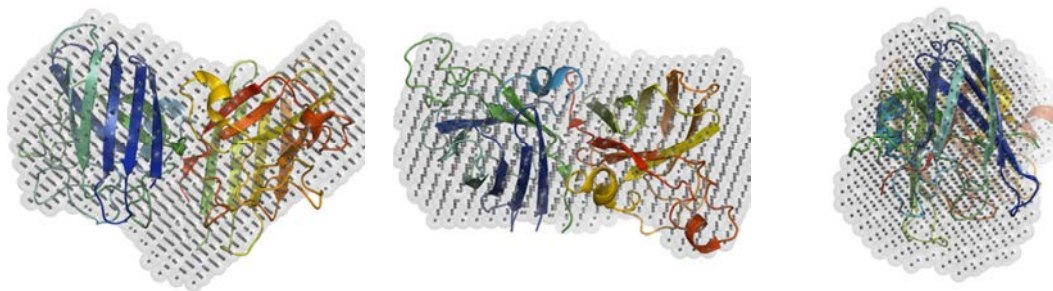


Figura 10: Superposição do modelo ‘ab initio’ DAM e estrutura cristalográfica PDB ID 3L9Y. O modelo do centro e o modelo da direita são rotacionados 90° em relação ao eixo x e rotacionados 90° em relação ao eixo y, respectivamente

Tabela 2: Parâmetros estruturais de SOD.

Parâmetros	5mg	Modelo ‘ab initio’ Dammin	Crysol
$R_g(\text{Å})$	21,1(Guinier) 21,30(Gnom)	-	20,19
$D_{\max}(\text{Å})$	65	-	71,57
MW SaxsmoW (kDa)	30,1	-	-
Resolução(Å)	18,52	18,52	-
χ	-	1,387	2,238

5. Conclusões

As enzimas GH16 e SOD foram clonadas e expressas com sucesso, a purificação foi extremamente satisfatória. GH16 e SOD se mostraram estáveis em solução em concentrações que variam de 1 mg/mL, formando monômeros e dímeros em solução, respectivamente. Os envelopes moleculares das enzimas foram obtidos demonstrando a forma e obtendo parâmetros estruturais como D_{max} e R_g . A determinação do estado de oligomerização e a forma das enzimas obtidas por SAXS são de extrema importância na caracterização funcional devido as condições experimentais próximas ao estado nativo das proteínas.

6. Referências Bibliográficas

Alvarez T.M., Goldbeck R., Santos C.R., Paixão D.A.A., Gonçalves T.A., et al. (2013) Development and Biotechnological Application of a Novel Endoxylanase Family GH10 Identified from Sugarcane Soil Metagenome. *PLoS ONE* 8(7): e70014. doi:10.1371/journal.pone.0070014.

Bafana, A., Dutt, S., Kumar, S. and Ahuja, O.S. (2011) Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit Rev Biotechnol* 31, 65–76.

Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*, 50, 117-131, 2000.

Bleicher, Molecular Basis of the Thermostability and Thermophilicity of Laminarinases: X-ray Structure of the Hyperthermostable Laminarinase from

Rhodothermus marinus and Molecular Dynamics Simulations, **J. Phys. Chem. B** 2011, 115, 7940–7949

Boonmee, A., Srisomsap, C., Karnchanatat, A. and Sangvanich, P. (2011) Biologically active proteins from *Curcuma comosa* Roxb. Rhizomes. **J Med Plants Res** 5, 5208–5215.

Brotman, Y.; Briff E.; Viterbo A.; Chet, I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiology**, 147, 779-789, 2008.

Brune, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. **Trends Biotechnol** 16:16-21.

Brufau, J; Francesch, M; Perez-Vendrell, AM. The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, 2006, Vol. 86(11), pp.1705-1713.

CAZypedia, (2012). http://www.cazypedia.org/index.php/Main_Page

Cantarel ,B.L; Coutinho,P.M.; Rancurel,C.; Bernard,T.; Lombard,V.; Henrissat,B.

The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.**Nucleic Acids Res.**, 37 (2009), pp. D233–238

Christophe L.; Rigottier-Gois, L.; Holmstrøm, K.; Rajilic, M.; Vaughan, E.E.; de Vos, W.M.; Collins, M.D.; Thiel, R.; Namsolleck, P.; Blaut, M.; Doré. J. Colonic

microbiota signatures across five northern European countries. **Appl. Environ. Microbiol**, 71, 4153–4155, 2005.

Cosgrove, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, 407, 321-326, 2000.

Cota, J; Alvarez TM; Citadini AP; Santos CR; de Oliveira Neto M, Oliveira RR, Pastore GM, Ruller R, Prade RA, Murakami MT, Squina FM. Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo- β -1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011, Vol. 406(4), pp. 590-594.

Ventura, M.; Fitzgerald G.F.; van Sinderen, D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. **Int J Food Microbiol**, 149, 4-18, 2011

Cupples, C. G., Miller, J. H.; Huber, R. E. Determination of the roles of Glu-461 in beta-galactosidase (*Escherichia coli*) using site-specific mutagenesis. **J Biol Chem** 265, 5512-5518, 1990.

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>, 2002.

D'haeseleer, P., Gladden, J.M., Allgaier, M., Chain, P.S.G., Tringe, S.G., Malfatti, S.A., Aldrich, J.T., Nicora, C.D., Robinson, E.W., Pas̃a-Tolic, L., Hugenholtz, P., Simmons, B.A., Singer, S.W. (2013) Proteogenomic Analysis of a Thermophilic Bacterial Consortium Adapted to Deconstruct Switchgrass. **PLoS ONE** 8(7): e68465.

Fischer, H.; Oliveira Neto, M.; Napolitano, H.B.; Craievich, A.F.; Polikarpov, I. The molecular weight of proteins in solution can be determined from a single SAXS measurement on a relative scale. **J. Appl. Cryst.**, 43, 101-109, 2010.

Franco Cairo, J.P., Leonardo, F.C., Alvarez, T.M., Ribeiro, D.A., Buchli, F., Costa-Leonardo, A.M., Carazzolle, M.F., Costa, F.F., Paes Leme, A.F., Pereira, G.A., Squina, F.M., (2011) Functional characterization and target discovery of glycoside hydrolases from lower termite *Coptotermes gestroi* digestome. **Biotechnol. Biofuels**. 4: 50.,

Giese, EC; Barbosa, AM; Dekker, RFH. Pathways to bioactive oligosaccharides: biological functions and potential applications. In: ITO, R.; MATSUO, Y. Handbook of carbohydrate polymers: development, properties and applications. New York: **Nova Science Publishers**, 2010, pp. 279-309.

Gueguen Y, Voorhorst WG, van der Oost J, de Vos WM. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, 1997, Vol. 272(50), pp. 31258-31264.

Guinier, A.; Fournet, G. Small angle scattering of Xrays. Translated by Walker, C.B. and Yudowitch, K.L. New York: John Wiley & Sons, 1955.

Hammersley, A. P.; Svensson, S. O.; Hanfland, M.; Fitch, A. N.; Hausermann, D. Two-Dimensional Detector Software: From Real Detector to Idealised Image or Two-Theta Scan. **High Pressure Research**, 14, 235-248, 1996.

Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, 1991, Vol. 280(Pt 2), pp. 309-316.

Hong TY; Meng M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, Vol. 61 (5-6), pp. 472-478.

Hoskins, L.C.; Agustines, M.; McKee, W.B.; Boulding, E.T.; Kriaris, M.; Niedermeyer, G. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. **J Clin Invest**, 75, 944-53, 1985.

Huber, R. E.; Kurz, G.; Wallenfels, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and tranagalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**, 15, 1994-2001, 1976

Iakiviak M, Mackie RI, Cann IKO. Functional Analyses of Multiple Lichenin-Degrading Enzymes from the Rumen Bacterium *Ruminococcus albus* 8. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, Vol. 77(21), pp. 7541–7550.

Jacobson, R. H.; Zhang, X. J.; DuBose, R. F.; Matthews, B. W. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. **Nature**, 369, 761-766. 1994.

Johannes. S.; Andreas, B.; Andrei N.L. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, 33, 244-248, 2005.

Kaplan, H.; Hutkins, R. W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Appl Environ Microbiol**, 66, 2682-2684, 2000.

Katsumata, K., Jin, Z., Hori, K., Iiyama, K., 2007. Structural changes in lignin of tropical woods during digestion by termite, *Cryptotermes brevis*. **J.Wood Sci.** 53, 419-426.

Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, Kitaoka M, Samejima M. Hydrolysis of β -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- β -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, Vol. 71 (6), pp 898-906.

Kim, E.S.; Lee, H.J.; Bang, W.G.; Choi, I.G.; Kim, K.H. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, 102, 1342-1353, 2009.

Kirton, L. and Brown, V. (2003) The taxonomic status of pest species of *Coptotermes* in Southeast Asia: resolving the paradox in the pest status of the termites, *Coptotermes gestroi*, *C. havilandi* and *C. travians* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology** 42:43-63.

Kozin MB, Svergun DI (2001) Automated matching of high and low-resolution structural models. **J Appl Crystallogr** 34:33–41

Krissinel, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J. Mol. Biol.** 2007, 372, 774–797.

Li, LL, McCorkle, SR, Monchy, S, Taghavi, S. and van der Lelie, D. Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. **Biotechnology for Biofuels**, 2:10, 2009.

Lin MW, Lin MT, Lin CT. (2002). Copper/zinc-superoxide dismutase from lemon cDNA and enzyme stability. **J Agric Food Chem** 50: 7264–7270.

McQueen-Mason, S.; Durachko, D. M.; Cosgrove, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **Plant Cell**, 4, 1425-33, 1992.

Maksimainen, M.; Hakulinen, N.; Kallio, J.M.; Timoharju, T.; Turunen, O.; Rouvinen J. Crystal structures of *Trichoderma reesei* beta-galactosidase reveal conformational changes in the active site. **J Struct Biol.**, 174, 156-163 2010.

Mandelli, F.; Franco-Cairo, J. P. L.; Citadini, A. P. S.; Büchli, F.; Alvarez, T. M.; Oliveira, R. J.; Leite, V. B. P.; Paes-Leme, A. F.; Mercadante, A. Z.; Squina, F. M. (2013) The characterization of a thermostable and cambialistic superoxide dismutase from *Thermus filiformis*. **Lett Appl Microbiol.** 57, 40-46.

Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem** 47, 469–474.

Palframan, R.J.; Gibson, G.R.; Rastall, R.A. Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. **Curr Issues Intest Microbiol**, 4, 71-75, 2003.

Pang Z, Otaka K, Maoka T, Hidaka K, Ishijima S, Oda M, Ohnishi M. Structure of beta-glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2005, Vol. 69 (3), pp. 553-558.

Park, A.R.; Oh, D.K. Galacto-oligosaccharide production using microbial B-Galactosidase: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, 85, 1279-1286, 2010.

Petoukhov, M.V., Franke, D., Shkumatov, A.V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D.T., Konarev, P.V. and Svergun, D.I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, 2012, Vol. 45, pp. 342-350.

Petoukhov, M.V.; Svergun, D.I. Global rigid body modelling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. **Biophys. J.**, 89, 1237-1250, 2005.

Placier, G.; Watzlawick, H.; Rabiller, C.; Mattes, R. Evolved beta-galactosidases from *Geobacillus stearothermophilus* with Improved Transgalactosylation Yield for Galacto-Oligosaccharide Production. **Applied and Environmental Microbiology**, 75, 6312-6321, 2012.

Sampedro, J.; Cosgrove, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, 6, 242.1-242.12, 2005.

Sanchez-Moreno M, Garcia-Ruiz MA, Sanchez-Navas A, Monteoliva M. (1989). Physico-chemical characteristics of superoxide dismutase in *Ascaris suum*. **Comp Biochem Physiol B** 92: 737–740.

Schafer G, Kardinahl S. (2003). Iron superoxide dismutases: structure and function of an archaic enzyme. **Biochem Soc Trans** 31: 1330–1334.

Sethi, A., Slack, J.M., Kovaleva E.S., Buchman, G.W., Scharf, M.E. (2013) Lignin-associated metagene expression in a lignocellulose-digesting termite. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43: 91e101.

Skálová ,T.; Dohnálek, J.; Spiwok, V.; Lipovová, P.; Vondrácková, E.; Petroková H.; Dusková, J.; Strnad, H.; Králová, B.; Hasek, J. Cold-active β -Galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 Forms Compact 660 kDa Hexamers: Crystal Structure at 1.9 Å Resolution. **J. Mol. Biol.** 353, 282–294, 2005.

Slovakova, L.; Duskova, D.; Marounek, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidumbacterium pseudolongum*. **Lett Appl Microbiol**, **35**, 126-30, 2002.

Svergun, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J. Appl. Cryst.** **25**, 495-503, 1992.

Svergun, D.; Barberato, C.; Koch, M.H.J. CRY SOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates., **J. Appl. Cryst.**, **28**, 768-773, 1995.

Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys J.** 2879-2886, 1999.

Svergun, D.I.; Petoukhov, M.V.; Koch, M.H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. **Biophys. J.**, **80**, 2946-2953, 2001.

Van Laere, K.M.; Hartemink, R.; Bosveld, M.; Schols, H.A.; Voragen, A.G. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. **J Agric Food Chem**, **48**, 1644-52, 2000.