



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

Angelica Rodrigues de Souza

Caracterização estrutural e biofísica de duas proteínas relacionadas:
 β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e α -L-arabinofuranosidase
termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1

São José do Rio Preto
2012

Angelica Rodrigues de Souza

Caracterização estrutural e biofísica de duas proteínas relacionadas:
 β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e α -L-arabinofuranosidase
termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Área de Concentração - Biofísica e Bioquímica de Proteínas com ênfase em Cristalografia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Dr. Mário Tyago Murakami
Co-orientadora: Dr^a. Camila Ramos dos Santos

São José do Rio Preto
2012

Souza, Angelica Rodrigues de.

Caracterização estrutural e biofísica de duas proteínas relacionadas: β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e α -L-arabinofuranosidase termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1 / Angelica Rodrigues de Souza. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

97 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mário Tyago Murakami

Co-orientador: Camila Ramos dos Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. β -1,3-1,4-glicanase. 2. α -L-arabinofuranosidase termoestável. 3. cristalografia de raios-X. 4. Estrutura. 5. Caracterização biofísica I. Murakami, Mário Tyago. II. Santos, Camila Ramos. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título

CDU – 577.112

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

Angelica Rodrigues de Souza

Caracterização estrutural e biofísica de duas proteínas relacionadas:
 β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e α -L-arabinofuranosidase
termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Área de Concentração - Biofísica e Bioquímica de Proteínas com ênfase em Cristalografia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Dr. Mário Tyago Murakami
UNESP – São José do Rio Preto / (LNBio)
Orientador

Dr. Roberto Ruller
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - (CTBE)

Prof. Dr. José Ramon Abrego
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
17/Fevereiro/2012

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial os meus pais, Hélio e Angela, ao meu irmão, Helton, e a minha sobrinha, Maria Eduarda, por estarem sempre do meu lado, pelo carinho, atenção e amor.

AGRADECIMENTOS

Como agradecer? É como pedir desculpas... Tarefa difícil, mas com muito valor. Eu hoje, mais forte, mais mulher, mais estudada, rrsrs... Acredito que existem pessoas que passam pelas nossas vidas com missões pré-determinadas. Alguns chegam, passam e vão ficando, outras chegam e se vão. Eu hoje tenho por dever agradecer cada uma dessas pessoas que estiveram comigo em algum momento e que fizeram parte da minha história.

Em primeiro lugar, a toda minha família; as minhas amigas da época do colégio, de ontem, de hoje e de sempre, estas sempre digo que posso ficar dias, semanas ou meses sem vê-las, como já ficamos, mas sempre que nos reencontramos a sensação é como se fosse igual a todas as vezes em que estivemos juntas; as minhas amigas de trabalho, do Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Dept. de Química/IBILCE, pelo apoio e dedicação; as novas amigadas que conquistei no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio): Andréia, Andrey, Aline, Carla, Camila, Daniel, Gilvani, Joice, Priscila, Renatinha e Tatiana, obrigada pela ajuda, por facilitar minha passagem pelo laboratório, pelas instruções e ensinamentos; e em especial obrigada ao meu orientador Mário Tyago Murakami, pela oportunidade de conhecer e fazer parte de uma equipe tão grandiosa e importante para o desenvolvimento da ciência em nosso país, obrigada pelo comprometimento e suporte.

A CAPES pela bolsa de estudo e apoio financeiro concedido.

E a Deus, por me dar a vida, por ter pessoas tão especiais ao meu lado, por me amparar e me confortar quando precisei, obrigada por me dar forças para concluir essa etapa, em que certamente será construído um novo fim.

“... e não há ninguém com espírito sem preconceitos,
que consiga estudar qualquer criatura viva, por
mais humilde que seja, sem se deixar entusiasmar
por sua maravilhosa estrutura e propriedades”.

Charles Darwin

RESUMO

Esta dissertação aborda o estudo de duas proteínas, uma β -1,3-1,4-glicanase (EC 3.2.1.73) de *Bacillus subtilis* 168 (liquenase) e outra α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) da família GH51 de *Thermotoga petrophila* RKU-1, ambas com potenciais aplicações biotecnológicas. A liquenase é responsável pela catálise da clivagem de β -D-glicanas unidas por ligações tipo 1,3 e 1,4, por outro lado a arabinofuranosidase de estudo é responsável pela hidrólise de resíduos α -1,2, α -1,3 e α -1,5-L-arabinofuranosil e age em combinação com outras enzimas para despolimerização de arabinose em polissacarídeos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo realizar estudos estruturais e biofísicos dessas duas proteínas com o intuito de obter informações moleculares importantes que pudessem contribuir para utilização das mesmas em processos biotecnológicos, como o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica por exemplo. Desta forma, foi verificado que a liquenase apresenta massa molecular de 28 kDa, mostra um enovelamento típico de membros da família GH16 com estrutura β -jelly e mostrou uma termotolerância reduzida, abaixo de 50°C. Por outro lado, a arabinofuranosidase é uma enzima termofílica com massa molecular de 57 kDa e com a presença de dois domínios: um domínio catalítico com enovelamento barril (α/β) e um domínio C-terminal β -sanduíche, que possui um motivo β -hairpin único para arabinofuranosidases encontradas no gênero *Thermotoga*. Desta forma, foi possível concluir que a liquenase de estudo é uma enzima monomérica e que sua reduzida termotolerância limita sua aplicação em processos industriais acima de 50°C. Desta forma, esta é uma candidata a estudos de engenharia de proteínas. E com relação a arabinofuranosidase, possui uma estrutura hexamérica, quando em solução, e sua elevada estabilidade térmica sugere que esta é uma forte candidata a futuras aplicações industriais.

Palavras-chave: β -1,3-1,4-glicanase, α -L-arabinofuranosidase termoestável, cristalografia de raios-X, estrutura, caracterização biofísica.

ABSTRACT


*This paper describes two proteins, β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73) from Bacillus subtilis 168 (lichenase) and α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) family GH51 from Thermotoga petrophila RKU-1, both with potential biotechnological applications. The lichenase is responsible for cleavage of β -D-glucans joined by linkages type 1.3 and 1.4, on the other hand arabinofuranosidase is responsible for the hydrolysis of α -1.2, α -1.3 and α -1.5-L-arabinofuranosyl radicals and acts synergistically with others enzymes for arabinose depolymerization of polysaccharides. Therefore, this study aimed to perform structural and biophysical studies of these two proteins in order to obtain important molecular information that could help biotechnological processes by application of these enzymes, such as the pretreatment of lignocellulosic biomass. Thus, it was found that the lichenase molecular mass was 28 kDa and showed a typical folding members of the family GH16 with structure β -jelly and showed a reduced thermotolerance, below 50°C. Moreover, arabinofuranosidase, a thermophilic enzyme, showed molecular mass of 57 kDa and displayed two domains: a folding barrel with the catalytic domain (α/β) and a C-terminal domain β -sandwich, which had a motif β -hairpin unique for arabinofuranosidases found in the genus *Thermotoga*. Therefore, it was concluded that the lichenase is a monomeric enzyme and that its reduced thermotolerance feature limits its application in industrial processes, above 50°C. So, this is a candidate for future studies of protein engineering. Regarding the arabinofuranosidase, revealed a hexameric structure, when in solution, and its high thermal stability suggests that this is a strong candidate for future industrial applications.*

Keywords: *β -1,3-1,4-glucanase, thermostable α -L-arabinofuranosidase, X-ray crystallography, structure, biophysical characterization.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Morfologia da parede celular vegetal. Adaptado de US Department of Energy Genome Programs (http://genomics.energy.gov).....	24
Figura 2	Representação da xilana vegetal e os sítios de clivagem por enzimas. Adaptado de WOOD et al. (1192).....	27
Figura 3	Estrutura representativa (a) cadeias de celulose e (b) regiões amorfas e cristalinas da celulose.....	28
Figura 4	Representação esquemática de um sistema celulolítico, com destaque para os sítios de maiores atividades das enzimas celulolíticas.	29
Figura 5	Mecanismo geral de (a) Retenção e (b) Inversão das glicosidases.	32
Figura 6	Cromatograma obtido a partir da purificação da β -1,3-1,4-glicanase por cromatografia de afinidade.....	57
Figura 7	Gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) obtido após purificação por afinidade.....	58
Figura 8	Cromatograma obtido a partir da purificação da β -1,3-1,4-glicanase por cromatografia de exclusão molecular.....	59
Figura 9	Gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) obtido após purificação por exclusão molecular.....	59
Figura 10	Espectro CD na região do UV distante da proteína β -1,3-1,4-glicanase.....	60
Figura 11	Espectro de CD monitorado a 218 nm (A) Desnaturação química com Guanidina monitorada por CD (■) e fluorescência (□). (B) Desnaturação térmica em diferentes pHs.....	62
Figura 12	Análise da β -1,3-1,4 glicanase por SAXS. (A) Curva de espalhamento experimental (o) e curva de espalhamento	

	calculado (—) do modelo. (B) Sobreposição da estrutura cristalina no envelope do modelo obtido pelos dados de SAXS.....	63
Figura 13	Fotomicrografia do cristal da β -1,3-1,4-glicanase de <i>B. subtilis</i>	64
Figura 14	Estrutura cristalina da β -1,3-1,4-glicanase de <i>B. subtilis</i> . (A) Representação em <i>cartoon</i> da estrutura (B) Superfície eletrostática. (C) Canal do sítio ativo.....	67
Figura 15	Cromatograma obtido a partir da purificação da α -L-arabinofuranosidase por Cromatografia de Afinidade.....	76
Figura 16	Cromatograma obtido a partir da purificação da α -L-arabinofuranosidase por cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 16/60.....	77
Figura 17	Gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) obtido a partir de dois passos de purificação da TpAraF, pura.....	77
Figura 18	Espectro de CD na região do UV distante da proteína recombinante α -L-arabinofuranosidase pura.....	78
Figura 19	Fotomicrografia do cristal da α -L-arabinofuranosidase de <i>T. petrophila</i> RKU-1.....	79
Figura 20	Estrutura de uma α -L-arabinofuranosidase de <i>T. petrophila</i> . (A) Representação em desenho dos dois domínios da proteína, que consiste de um barril (α/β) e um domínio C-terminal com dobramento na forma de β -sandwich. (B) Resíduos do sítio ativo destacando a presença de resíduos F378 do domínio acessório. (C) Potencial da superfície eletrostática. (D) Superposição da estrutura da enzima de estudo com outras α -L-arabinofuranosidase da família GH51.....	82
Figura 21	Alinhamento das sequências de aminoácidos de α -L-arabinofuranosidases de diferentes espécies mostrando que o motivo β -hairpin é único para espécies de <i>Thermotoga</i> .	

	<p>  (sequência β-wing)..... 83 </p>	
Figura 22	<p> Oligomerização da α-L-arabinofuranosidase verificada por SAXS. (A) Curva de espalhamento e função de distribuição $p(r)$. (B) Representação em desenho do hexâmero cristalográfico traçado dentro do envelope de SAXS..... 84 </p>	
Figura 23	<p> Espectro de UV distante para a α-L-arabinofuranosidase em diferentes concentrações salinas (0 - 3 M) de NaCl..... 85 </p>	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das famílias dentro dos clãs (< http://www.cazy.org/GlycosideHydrolases.html >).....	31
Tabela 2	Dados do DLS: raio hidrodinâmico (r) e polidispersividade (IP).....	64
Tabela 3	Estatística do processamento de dados e refinamento cristalográfico.....	65
Tabela 4	Estatística do processamento de dados e refinamento cristalográfico.....	80
Tabela 5	Influência da concentração salina na alteração da homogeneidade estrutural da TpAraF.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABFases	Arabino furanosidases
A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
BG	B-glicana
CAMI	Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
cm	Centímetros
C	Concentração Molar
CD	<i>Circular Dicroism</i>
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
C _M	Concentração Denaturante
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EC	<i>Enzyme Comission</i>
F	Faraday
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GAX	Glicuronoarabinoxilana
GH	<i>Glycosidic Hydrolases</i>
ITFE	<i>Intrinsic Tryptophan fluorescence emission</i>
IPTG	Isopropil-tio- β -galactosídeo
IP	Polidispersividade
IUBM	<i>International Union of Molecular Biology</i>
kDa	Kilo Dalton
K	Kelvin
L	Litro
l	Caminho Óptico da Cubeta
LB	Luria Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
mm	Mili Metro

m _D	Cooperatividade do desdobramento
MN	Manana
M	Molar
mM	Mili Molar
mL	Mililitro
mV	Mili Volt
mim	Minuto
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
nm	Nanômetro
ON	<i>Over night</i>
OD	<i>Optical density</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride or Phenylmethylsulfonyl</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
p/v	Parte por Volume
r	Raio hidrodinâmico
R _{free}	Indicador de qualidade do modelo
R _{factor}	Indicador de qualidade do modelo
R.M. S.D.	<i>Root Mean Square Deviation</i>
R _{merge}	Indicador de qualidade do modelo
R _g	Raio de giro
rpm	Rotações Por Minuto
s	Segundo
SAXs	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
TEMED	<i>N, N, N', N' - Tetramethylethylenediamine</i>
T _M	Temperatura de <i>Melting</i>
TpAraF	Arabinofuranosidase de <i>T. petrophila</i>
UV	Ultra violeta

VIS	Visível
v/v	Volume por Volume
XyG	Xiloglicana
Xyl	Xilose

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
θ	Gama – Elipticidade molar residual
Δ	Delta / Variação
ΔG	Variação da Energia Livre de Gibbs
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
%	Porcentagem
Å	Angstrom
ϵ	Epsilon
σ	Sigma
μ	Micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	22
2.1	BIOENERGIA	22
2.2	MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	23
2.3	HEMICELULOSE E CELULOSE	25
2.4	GLICOSIDASES OU HIDROLASES GLICOSÍDICAS	30
2.4.1	Endo-β-1,3-1,4-Glicanase (Liquenase)	33
2.4.2	Endo-β-1,3-1,4-Glicanase (Liquenase) de <i>Bacillus subtilis</i>	34
2.4.3	α-L-Arabinofuranosidase	34
2.4.4	α-L-Arabinofuranosidase de <i>Thermotoga petrophila</i>	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVOS GERAIS	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
	CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DE UMA B-1,3-1,4-GLICANASE (LIQUENASE) DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 168	38
4(A)	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	39
4.1	TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO	39
4.2	EXPRESSÃO E EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DA FRAÇÃO CELULAR (LISE)	40
4.3	PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	42
4.3.1	Primeiro Passo: Cromatografia de Afinidade	42
4.3.2	Segundo Passo: Cromatografia de Exclusão Molecular	44
4.4	GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS- PAGE)	45
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	47

4.6	DIÁLISE	47
4.7	DICROÍSMO CIRCULAR – CD	48
4.7.1	Desnaturação Térmica e Química	49
4.8	FLUORESCÊNCIA	51
4.9	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ - DLS	52
4.10	ESPALHAMENTO DE LUZ A BAIXO ÂNGULO - SAXS	53
4.11	ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO	54
4.12	COLETA DE DADOS	55
4.13	DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA POR SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR	56
4.14	REFINAMENTO E ANÁLISE DA ESTRUTURA	56
5(A)	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1	PURIFICAÇÃO DA β -1,3-1,4-GLICANASE	57
5.2	DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	60
5.2.1	Desnaturação Química (CD e Fluorescência) e Térmica (CD)	61
5.3	DETERMINAÇÃO DO ENVELOPE MOLECULAR DA β -1,3-1,4-GLICANASE DE <i>B. SUBTILIS</i>	63
5.4	ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO, AQUISIÇÃO DOS DADOS E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA LIQUENASE	64
5.5	DESCRIÇÃO DA ESTRUTURA	66
 CAPÍTULO 2 – ESTRUTURA DE UMA α-L-ARABINOFURANOSIDASE TERMOESTÁVEL (GH51) DE <i>THERMOTOGA PETROPHILA</i> RKU-1		68
4(B)	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	69
4.1	EXPRESSÃO E EXTRAÇÃO DA α -L-ARABINOFURANOSIDASE DA FRAÇÃO CELULAR (LISE)	69
4.2	PURIFICAÇÃO DA α -L-ARABINOFURANOSIDASE	70
4.3	CRISTALIZAÇÃO, DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA, REFINAMENTO E ANÁLISE DA ESTRUTURA	72

4.4	ESPALHAMENTO DE LUZ A BAIXO ÂNGULO – SAXS	73
4.5	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ – DLS	73
4.6	DICROÍSMO CIRCULAR – CD	74
5(B)	RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
5.1	PURIFICAÇÃO DA α -L-ARABINOFURANOSIDASE	76
5.2	CRISTALIZAÇÃO, AQUISIÇÃO DOS DADOS E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA	79
5.3	DESCRIÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA	80
5.4	SAXS	83
5.5	ESTABILIDADE DA PROTEÍNA POR CD E DLS	85
6	CONCLUSÕES	
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

APÊNDICES 97

ARTIGO 1 – BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF A β -1,3-1,4-GLUCANASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* 168

ARTIGO 2 – STRUCTURE OF A NOVEL THERMOSTABLE GH51 α -L-ARABINOFURANOSIDASE FROM *THERMOTOGA PETROPHILA* RKU-1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A preocupação com impacto ambiental aliada a necessidade da ampliação da capacidade produtiva de etanol tem incentivado o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, a partir da hidrólise dos polímeros da parede celular vegetal até seus açúcares monoméricos, e posterior fermentação. Entretanto, a utilização desta tecnologia encontra alguns entraves tecnológicos e econômicos, pois é significativamente mais cara que o produzido por fermentação direta dos açúcares da cana (Demirbas, 2008; Demirbas, 2009; Balat & Balat, 2009). Esta tecnologia enquadra-se no conceito de biorrefinaria (Castro & Pereira Jr., 2010) e trata-se de um processo que demanda de um *input* maior de estudos e tecnologia para ser disponibilizado. Acredita-se que o maior gargalo seja a produção em escala comercial de enzimas hidrolíticas e microorganismos selecionados e, ou modificados geneticamente (Buckeridge et al., 2010). Neste sentido, este trabalho relata a utilização de duas enzimas: uma endo- β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* e uma α -L-Arabinofuranosidase termoestável de *T. petrophila*, produzida por advento da tecnologia do DNA recombinante.

As endo- β -1,3-1,4-glicanases (E.C. 3.2.1.73) são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 precedidas de ligações β -1,3 em ligações mistas de 1,3-1,4- β -glicanas, produzindo trissacarídeos e tetrassacarídeos (Anderson & Stone, 1975; Abel et al., 2001). Por outro lado, as α -L-Arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) catalisam a hidrólise do grupo terminal não redutor de arabinofuranose, arabinoxilanas e arabinogalactanas, liberando resíduos arabinofuranosil (Kaji, 1984).

Ambas as enzimas possuem uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, com principal destaque para a inclusão destas no coquetel enzimático para hidrólise de matéria prima lignocelulósica, para melhorar a liberação de açúcares fermentáveis na produção de biocombustíveis. Portanto, este trabalho tem como objetivo prover estudos estruturais e biofísicos destas enzimas com o intuito de acrescentar informações imprescindíveis para utilização das mesmas em processos agroindustriais e engenharia racional.

Neste sentido, como as enzimas estudadas possuem aplicações relacionadas, logo esta tese foi dividida em: uma única Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivo, sendo a parte específica, ou seja Metodologia, Resultados e Conclusões divididas em dois capítulos distintos, fazendo referência aos artigos publicados como consequência deste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioenergia

Os biocombustíveis mais comuns são o etanol de milho, trigo, cana e beterraba e o biodiesel de sementes oleaginosas. Ambos são produzidos a partir de culturas alimentares que requerem alta qualidade das terras agrícolas para o crescimento (Demirbas, 2009; Demirbas, 2010). Nesse sentido, o Brasil e os EUA são países pioneiros na produção de bioetanol, produzido predominantemente a partir de cana-de-açúcar e milho, respectivamente (Budney & Sotero, 2007; Renewable Fuels Association, 2008).

Os biocombustíveis podem ser classificados de acordo com os tipos de tecnologias empregadas para sua produção como: de primeira e segunda geração. Em relação ao etanol, o chamado de primeira geração, é o obtido a partir da fermentação alcoólica da sacarose da cana de açúcar ou do amido do milho. No entanto, o problema é que com o aumento da demanda de etanol com o advento da tecnologia FLEX, novos hectares de terras de cana plantada são necessários, o que gera a problemática “alimentação versus combustível”: um dilema sobre o desvio de terras agrícolas para produção de biocombustíveis em detrimento do abastecimento alimentar. Nesse sentido, uma fonte alternativa de biomassa é necessária, como o uso de “subprodutos” como fonte de açúcares para a fermentação alcoólica. A segunda geração refere-se à produção de etanol a partir de açúcares produzidos pela hidrólise do bagaço. O processo convencional utiliza solventes ácidos ou básicos para “afrouxar” e quebrar os polímeros da parede celular vegetal liberando mono e oligossacarídeos fermentáveis, e o processo mais atual utiliza enzimas específicas para promover a hidrólise. Porém, além dos custos dos produtos químicos empregados existe a produção colateral de resíduos químicos (Buckeridge et al., 2010).

No momento, a expectativa é que a combinação de técnicas na hidrólise deverá render um processo ainda mais eficiente e para isso, é necessário um *input* maior de estudos e tecnologia para ser disponibilizado. Acredita-se que o maior gargalo neste processo seja a

produção em escala comercial de enzimas hidrolíticas e microorganismos selecionados e/ou modificados para essa finalidade (Buckeridge et al., 2010).

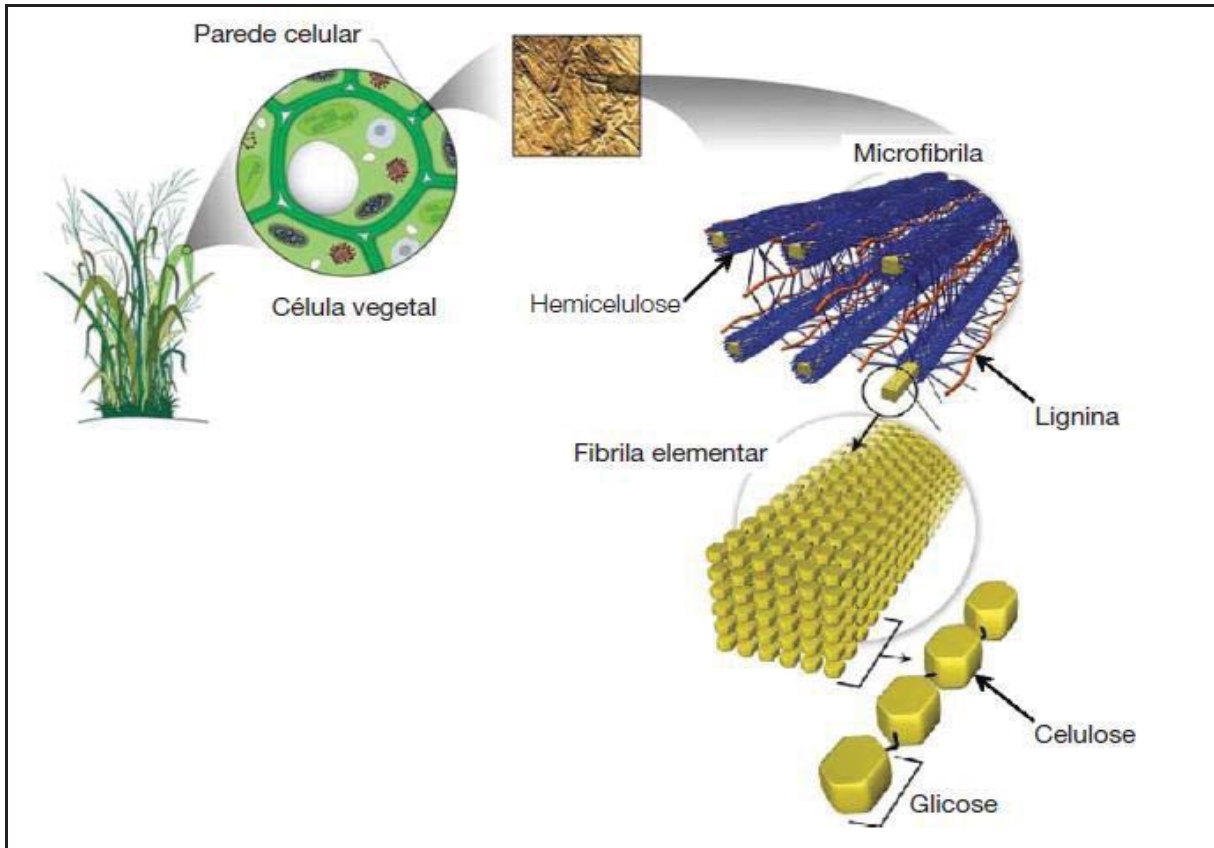
2.2. Material lignocelulolítico

A biomassa lignocelulósica é constituída por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, unidas entre si por ligações covalentes formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (Jeffries, 1990). Internamente, as fibrilas da fração celulósica, um polissacarídeo composto por moléculas de D-glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas, estão alinhadas paralelamente, de tal modo a formar uma fibra. Nesta porção ocorre a completa expulsão de moléculas de água tornando a microfibrila extremamente longa e resistente.

A segunda fração, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada, formada, principalmente, por blocos de pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila (Szengyel, 2000; Ramos, 2003). As hemiceluloses permitem uma interação fraca entre uma fibra e outra, formando uma rede. O domínio celulose-hemicelulose fica imerso em um domínio formado por pectinas, que são açúcares altamente ramificados (Buckeridge et al., 2008).

Por fim, a lignina, um polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis (Higuchi, 1982), cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A Figura 1 ilustra as frações da parede celular vegetal.

Figura 1- Morfologia da parede celular vegetal.



Adaptado de US Department of Energy Genome Programs (<<http://genomics.energy.gov>>).

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (Szengyel, 2000). Os materiais agroindustriais destacam-se pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado. O bagaço de cana-de-açúcar, dentre as biomassas consideradas, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados para a bioconversão em etanol, pois apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem (Pandey & Soccol, 2000; Badhan et al., 2007). Segundo dados do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), na safra 2008/2009 o Brasil processou aproximadamente 570 milhões de toneladas de cana e produziu 160 milhões de toneladas de bagaço (CTC, 2011).

O combustível gerado a partir de biomassa representa a maior exploração de energias renováveis globalmente. Nesse sentido, para satisfazer as demandas atuais e futuras, a produção de etanol a partir da fermentação da biomassa lignocelulósica é uma opção viável, que não compete com o fornecimento de alimentos. O processo compreende as seguintes etapas chave: pré-tratamento, hidrólise das hemiceluloses, hidrólise da celulose, fermentação dos açúcares a etanol, separação dos resíduos de lignina, recuperação e concentração do etanol.

De forma geral, do processo de remoção do amido e de açúcar gera-se um subproduto de baixo valor comercial agregado, o material lignocelulósico, que possui remanescentes de amido e de sacarose. Desta forma, o desafio chave para o uso desta biomassa com êxito para a produção de bioetanol é a hidrólise dos polissacarídeos em açúcares monoméricos de uma forma economicamente viável para que estes açúcares possam então ser fermentados por levedura a etanol (Hinz et al., 2009).

Dentre essas etapas, a de pré-tratamento continua a ser uma das principais barreiras comerciais, pois pode representar até um terço dos custos totais de produção de etanol. Atualmente, o etanol produzido a partir de material lignocelulósico é mais caro que o produzido a partir da fermentação direta dos açúcares. Consequentemente, investimentos em pesquisa nessa área ainda são necessários para que o processo torne-se viável do ponto de vista econômico (Demirbas, 2008; Demirbas, 2009; Balat & Balat, 2009).

2.3. Hemicelulose e celulose

As hemiceluloses são genericamente definidas como heteropolissacarídeos não amiláceos e não celulósicos, que podem ser extraídos da parede celular dos vegetais superiores (Fengel & Weneger, 1989; Sjostrom, 1992). São polissacarídeos solúveis em reagentes alcalinos, de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Representam cerca de 30 a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, correspondendo em torno de 40% do peso seco da biomassa vegetal (Coughan et al., 1993; Uhlig, 1998; Ferreira-Filho, 2004). As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com

a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação (Ramos, 2003).

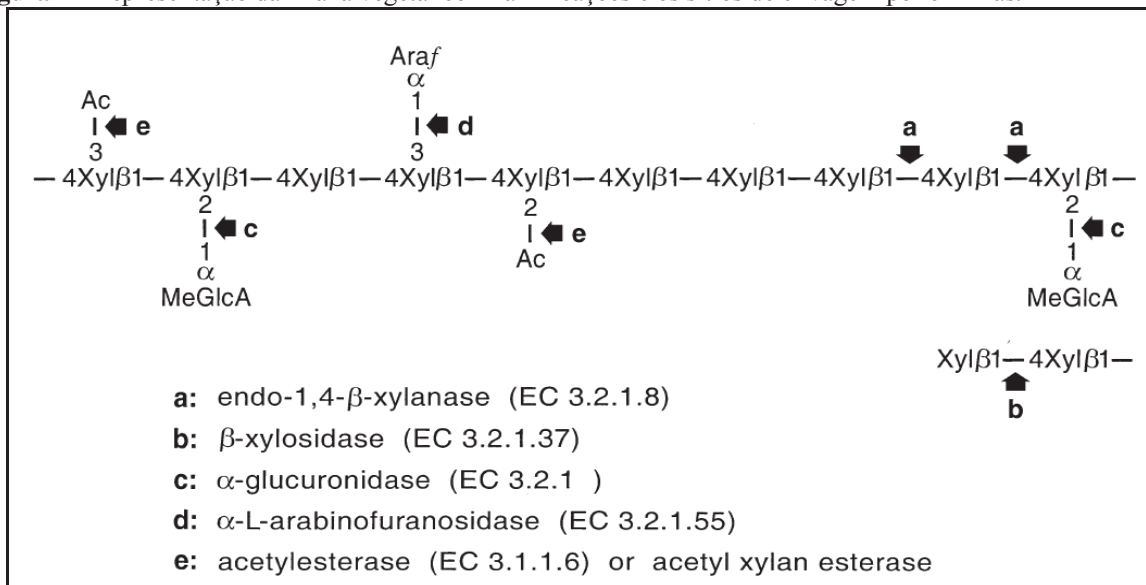
Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, sendo, portanto mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas. Entre a celulose, a lignina e as hemiceluloses ocorrem interações covalentes e não covalentes, as quais são importantes para adesão e coesão das fibras, manutenção da integridade da parede celular vegetal e proteção da celulose contra o ataque de celulases (Prade, 1995; Uffen, 1997; Beg et al., 2001).

A hemicelulose consiste de vários monossacarídeos polimerizados, incluindo carboidratos de cinco carbonos (xilose e arabinose), carboidratos de seis carbonos (galactose, glicose e manose), ácido 4-O-metil glicurônico e resíduos de ácido galacturônico. A unidade mais abundante na hemicelulose, em vegetais lenhosos, é a xilose, que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4. A hemicelulose é bastante hidrofílica, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa (Yang & Wyman, 2008). Além disso, é classificada geralmente de acordo com os resíduos de açúcar presentes na molécula, como: D-galactana, D-xilana, L-arabinana e está frequentemente associada aos polissacarídeos pécticos (Collins et al., 2005). As ramificações e as cadeias laterais presentes na estrutura das hemiceluloses interagem facilmente com a celulose, conferindo estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003). A variedade de ligações químicas e de ramificações, assim como presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas distintas conformações (Jacobsen & Wyman, 2000).

As principais hemiceluloses encontradas em plantas são as xiloglicanas (XyG), as glicuronoarabinoxilanas (GAX) e as mananas (MN). Em todos os casos, há uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente, que pode ser ramificada com diferentes monossacarídeos (Silva, 2005). De fato, pode-se dizer que todas as hemiceluloses ocorrem em todas as espécies, mas em diferentes proporções. Uma exceção são as ditas glicanas de ligação mista ou β -glicanas (BG) que são compostos de uma cadeia não ramificada de glicose com ligações β -1,4, interrompida regularmente com ligações β -1,3. Esta é uma hemicelulose que ocorre principalmente em plantas do grupo da ordem Poales, do qual a cana de açúcar faz parte, porém, sabe-se que está presente também em líquens (uma associação de fungos e algas) (Buckeridge et al., 2004).

Nesse sentido, a hidrólise completa da hemicelulose requer a atuação de várias enzimas que atuam cooperativamente, sendo que a combinação dessas enzimas irá depender da composição da biomassa a ser degradada. De forma geral, o sistema requerido para a hidrólise da hemicelulose inclui: 1) endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações glicosídicas internas na cadeia de xilana, 2) 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que catalisam a hidrólise de xilooligossacarídeos, a partir das extremidades não redutoras da cadeia de xilana liberando xilose, 3) endo-1,4- β -D-mananases (EC 3.2.1.78), que clivam ligações internas na cadeia de manana, 4) 1,4- β -D-manosidases (EC 3.2.1.25), que clivam manooligossacarídeos em manose, e 5) enzimas que removem os grupos substituintes laterais (ramificações), como α -D-galactosidases (EC 3.2.1.22), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glicuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (Beg et al., 2001; Shallom & Shoham, 2003), como mostrado na Figura 2, que ilustra as enzimas responsáveis pela degradação de uma hemicelulose ramificada.

Figura 2 - Representação da xilana vegetal com ramificações e os sítios de clivagem por enzimas.

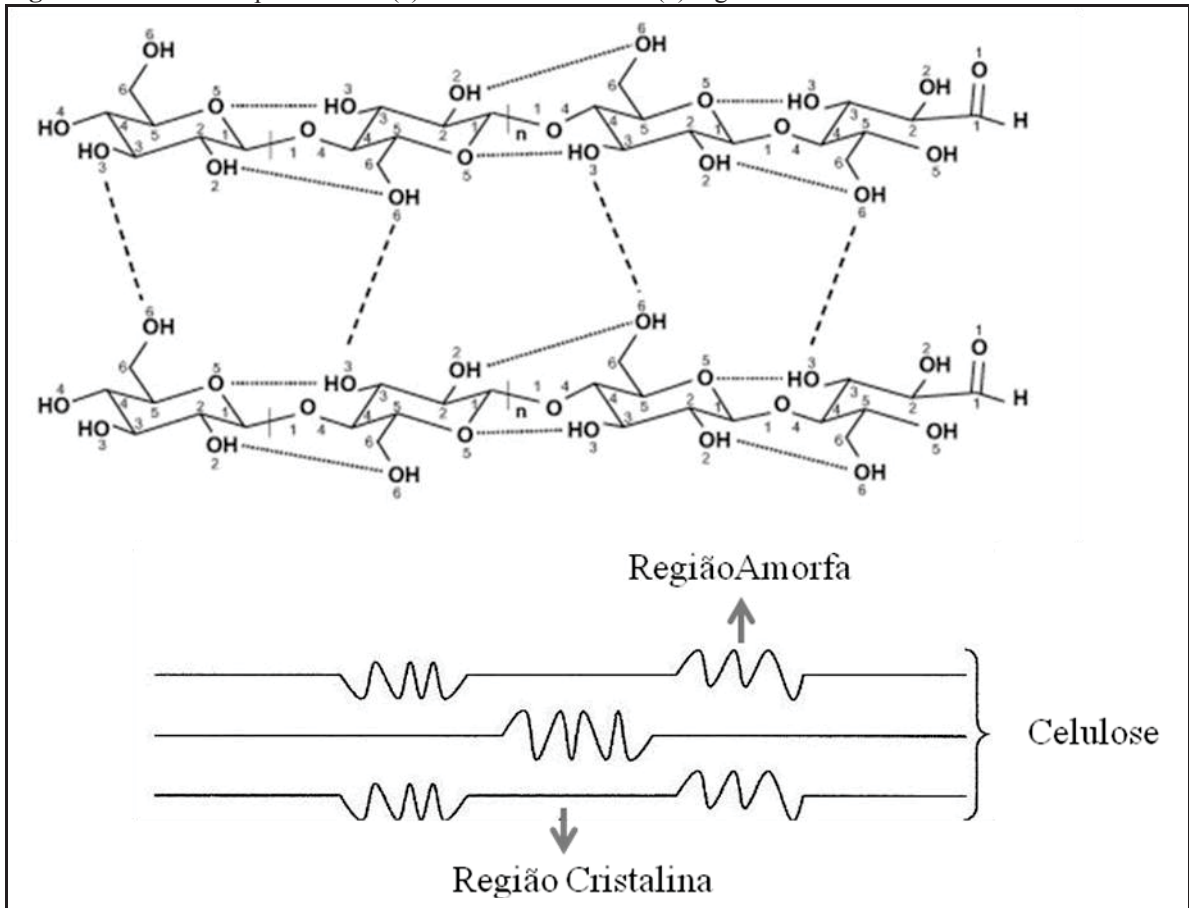


Adaptado de WOOD et al. (1992).

A celulose é o polímero natural e biodegradável mais abundante no planeta. É o principal constituinte da parede celular das plantas (cerca de 33% do peso da planta). A celulose é classificada como um homopolissacarídeo linear, não ramificado que pode possuir de 10 a 15 mil unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4) (Nelson e Cox, 2006; Somerville et al., 2004). Dentre suas principais características destacam-se sua

insolubilidade em água e o predomínio de regiões ordenadas (cristalinas) na maior parte do comprimento do polímero, com regiões desordenadas amorfas também presentes (Stone e Scallan, 1965). A Figura 3, abaixo, ilustra um esquema da estrutura deste polímero.

Figura 3 – Estrutura representativa (a) cadeias de celulose e (b) regiões amorfas e cristalinas da celulose.



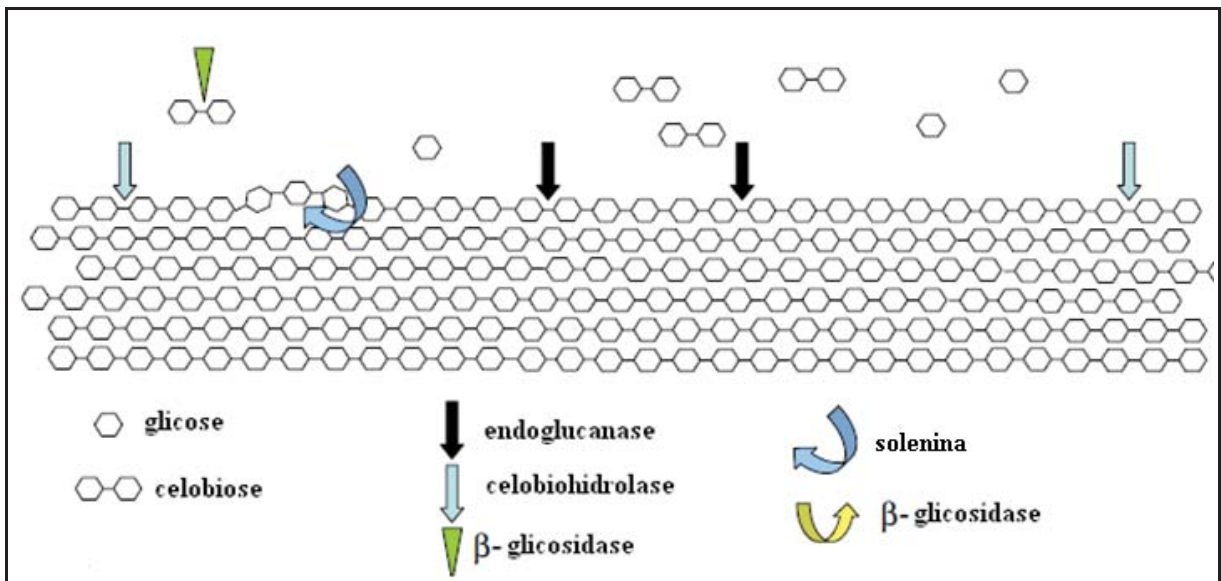
Fonte: Adaptado de FESTUCCI-BUSELLI et al, 2007.

As regiões ordenadas impedem a penetração de moléculas de água. O acesso limitado a essas regiões dificulta o acesso de celulasas, tornando apenas as moléculas de celulose situadas na superfície suscetíveis à ação enzimática. Desta forma, as celulasas precisam adsorver a superfície da celulose antes da hidrólise, promovendo a desordem molecular das regiões empacotadas e expondo as cadeias de celulose enterradas enquanto elas permanecem molecularmente inalteradas (Coughlan, 1985).

Por outro lado, a degradação da celulose é processada por ação sinérgica do complexo celulolítico. Inicialmente, as endocelulasas catalisam aleatoriamente a degradação das ligações internas da região amorfa da cadeia polimérica da celulose, liberando celu-

oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e celobiose. A ação desta primeira enzima libera oligossacarídeos com terminais livres para a ação da exocelulase. Esta por sua vez catalisa a quebra sequencial da segunda ligação glicosídica a partir da extremidade não redutora da molécula de celulose produzindo celobiose. Esta é por sua vez hidrolisada a glicose por ação da celobiase (Coughlan, 1985). A Figura 4, a seguir, ilustra a ação de todas essas enzimas e os sítios de clivagem.

Figura 4 – Representação esquemática de um sistema celulolítico, com destaque para os sítios de maiores atividades das enzimas celulolíticas.



Fonte: Adaptado de ARO et al, 2005.

Uma das mais emergentes aplicações das enzimas dos complexos descritos acima é a hidrólise de biomassas, em que as matérias-primas de origem lignocelulósica podem ser convertidas em unidades de glicose ou xilose, por ação enzimática. Posteriormente, os produtos das etapas anteriores podem ser convertidos em uma imensa gama de produtos, como o etanol produzido pelo processo de fermentação por ação de leveduras, em que ocorre a transformação da glicose e da xilose a etanol (Olofsson et al., 2008).

2.4. Glicosidases ou hidrolases glicosídicas

As hidrolases compreendem aproximadamente 75% do total de enzimas comercializadas. Com as glicosidases, incluindo: celulasas, amilases e hemicelulasas, são o segundo maior grupo, após as proteases (Bhat, 2000). As hidrolases glicosídicas (E.C. 3.2.1.X), ou glicosidases são enzimas chave no metabolismo de carboidratos. A nomenclatura dessas enzimas segue o padrão da NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) (1984), levando em consideração a especificidade ao substrato e ocasionalmente o mecanismo molecular. No caso das glicosidases (EC 3.2.1.X), os 3 primeiros dígitos indicam que estas enzimas hidrolisam ligações O-glicosil e S-glicosil, sendo que o X indica sua especificidade ao substrato e às vezes o mecanismo molecular, este varia de 1 até 170. No entanto, tal classificação não está necessariamente relacionada com suas características estruturais (Henrissat, 1991).

A classificação das hidrolases glicosídicas em famílias está baseada em suas similaridades seqüenciais de aminoácidos e tem sido proposto há alguns anos. No momento, existem mais de 125 famílias catalogadas no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*) (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) e este número continua crescendo à medida que novas seqüências glicosídicas são identificadas.

Devido ao aumento do número de estruturas de glicosidases resolvidas e o fato do envelhecimento das proteínas serem bem mais conservados que suas seqüências foi possível melhorar as estratégias de comparação e assim, dividir algumas famílias em clãs (Henrissat & Bairoch, 1996). Atualmente, 14 diferentes clãs têm sido propostos (GH-A a GH-N), com a maioria desses englobando de duas a três famílias, com exceção do clã GH-A que abrange 17 famílias (Collins et al., 2005), como mostrado na Tabela 1.

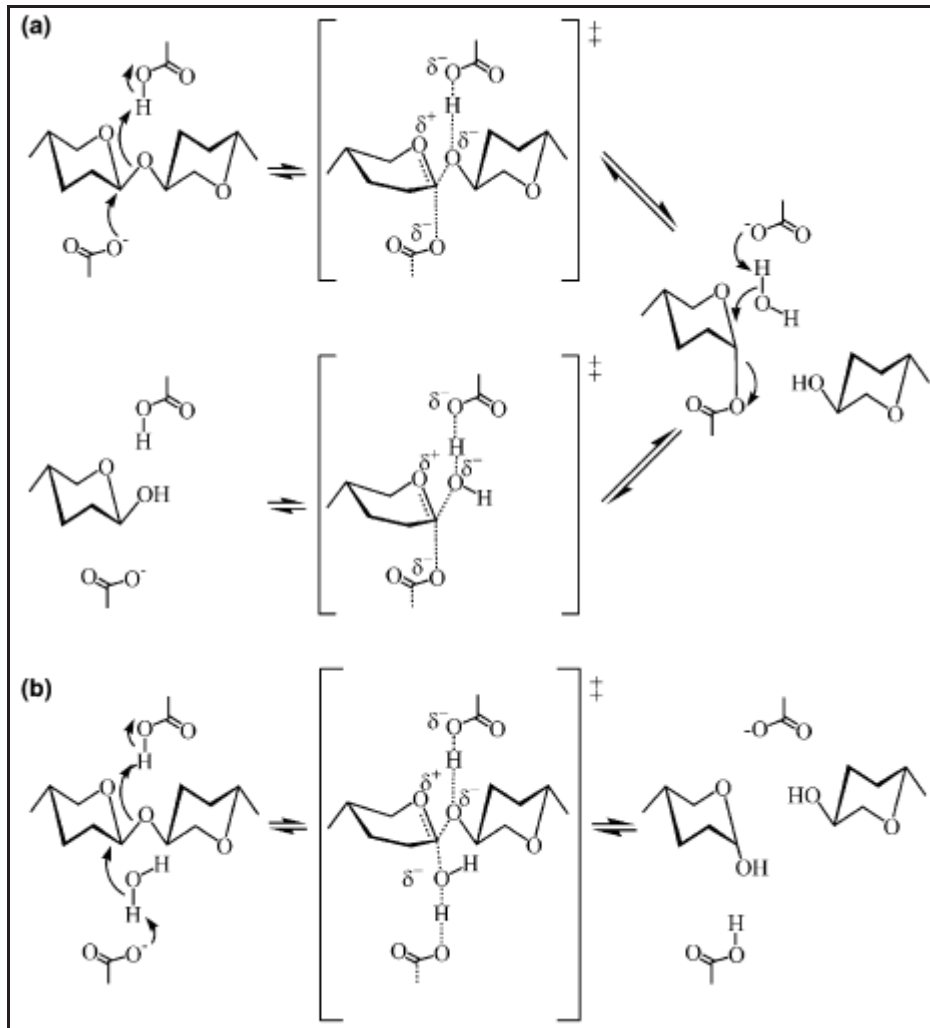
Tabela 1 - Classificação das famílias dentro dos clãs (http://www.cazy.org/Glycoside_Hydrolases.html).

Clãs	Estrutura	Família
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	1,2,5,10,17,26,30,35,39,42,50,51,53,59,72,79,86,113
GH-B	β -jelly roll	7, 16
GH-C	β -jelly roll	11, 12
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	27, 31, 36
GH-E	6-fold β -propeller	33,34,83,93
GH-F	5-fold β -propeller	43,62
GH-G	$(\alpha/\alpha)_6$	37, 63
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	13,70,77
GH-I	$\alpha + \beta$	24,46,80
GH-J	5-fold β propeller	32,68
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	18,20,85
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	15,65
GH-M	$(\alpha/\alpha)_6$	8,48
GH-N	β - helix	28,49

GH: glycoside hydrolases families.

De forma geral, com relação ao mecanismo de catálise, as glicosidases são separadas em duas classes distintas: aquelas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas com inversão da configuração do centro anomérico e aquelas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração do centro anomérico (Collins et al., 2005). O mecanismo para essas duas classes são mostrados a seguir na Fig.5.

Figura 5 - Mecanismo geral de (a) Retenção e (b) Inversão das glicosidases. A figura foi preparada com CS Chemdraw Ultra version 6.0.



Adaptado de Rye & Withers (2000).

O mecanismo de inversão opera via deslocamento direto do grupo liberando molécula de água, enquanto o mecanismo de retenção opera via duplo deslocamento envolvendo a formação de um intermediário (enzima-carboidrato). Apesar destas diferenças é válido ressaltar que ambas as classes utilizam um mecanismo de catálise ácida, nos quais dois resíduos de aminoácidos ácidos estão envolvidos no sítio ativo. Nas enzimas de inversão, um resíduo ácido atua como um ácido e o outro como base geral, enquanto nas outras atua como um nucleófilo e um grupo de saída (Sinnott, 1990; Collins et al., 2005).

2.4.1. Endo- β -1,3-1,4-glicanase (Liquenase)

Endo- β -1,3-1,4-glicanases, também chamadas de liquenases (E.C. 3.2.1.73) são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 precedidas de ligações β -1,3 em ligações mistas de 1,3-1,4- β -glicanas, que são os componentes polissacarídicos da parede celular das plantas superiores, produzindo trissacarídeos e tetrassacarídeos em diferentes proporções (Anderson e Stone, 1975; Abel et al., 2001).

Até o momento, de acordo com CAZy (<http://www.cazy.org>), as liquenases estão distribuídas em 11 diferentes famílias das hidrolases glicosídicas: 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 26 e 61, sendo que as β -1,3-1,4-glicanases bacterianas são tipicamente membros da família GH16 das hidrolases glicosídicas. De acordo com a IUBM os seguintes nomes são comumente utilizados para designar endo- β -1,3-1,4-glicanases: liqueninase, β -(1,4)-D-glicana 4-glicanohidrolase; 1,3;1,4- β -glicana endohidrolase; 1,3;1,4- β -glicana 4-glicanohidrolase; 1,3-1,4- β -D-glicana 4-glucanohidrolase e (1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicana 4-glicanohidrolase.

Liquenases têm sido aplicadas como enzimas industriais na produção de cerveja e aditivos para alimentação animal (Anderson e Stone, 1975). Em alimentos para animais, especialmente para frangos e suínos, a adição da preparação enzimática com liquenases melhora a digestibilidade da dieta e reduz os problemas sanitários (Celestino et al., 2006).

β -glicanas são constituintes abundantes da parede celular da cana de açúcar (Carpita, 1996), e desta forma, a inclusão de β -1,3-1,4-glicanases no coquetel de hidrólise tem sido proposto para melhorar a liberação de açúcares fermentáveis de matérias-primas lignocelulósicas na produção de biocombustíveis (Pauly & Keegstra, 2008).

Recentemente, Menon et al. (2011) relatou pela primeira vez a possibilidade de β -glicanas servirem como substrato potencial para a produção de biocombustível utilizando liquenase de organismo alcalotermofílico, *Thermomonospora sp.* para redução de β -glicanas a açúcares simples.

2.4.2. Endo- β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis*

Endo- β -1,3-1,4-glicanases têm sido encontradas em vários membros da família Bacillaceae como *Bacillus subtilis* (Hinchliff, & Wendy, 1995), *B. amyloliquefaciens* (Clark et al., 1978), *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. halodurans* (Akita et al., 2005), *B. circulans* (Bang et al., 1999), e *B. polymyxa* (Gosalbes et al., 1991). As liquenases encontradas nestes microrganismos possuem massa molecular em torno de 25-35 kDa, com pI na faixa de 7,5-9,0 e pH ótimo na faixa de 6-7,5. O sítio ativo contém um motivo de aminoácidos conservados “EIDIEF”, em que os dois resíduos de ácido glutâmico (E) estão envolvidos no mecanismo de hidrólise do tipo ácido/base (Abel et al., 2001).

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva comumente encontrada em solo (Madigan & Martinko, 2005) e possui formato cilíndrico (Nakano & Zuber, 1998). Esta bactéria não é classificada como um patógeno humano, porém contamina alimentos raramente causando intoxicação alimentar (Ryan, 2004). Este microrganismo é altamente favorável a manipulação genética e, portanto, tornou-se organismo modelo para estudos laboratoriais e produção de diversas enzimas com aplicações industriais.

Nesse contexto, uma das hidrolases glicosídicas alvo do projeto é a β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* 168, na qual visamos caracteriza-lá biofísica e estruturalmente provendo informações que são imprescindíveis para sua utilização em processos agroindustriais e engenharia racional.

2.4.3. α -L-Arabinofuranosidase

As α -L-Arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) são hemicelulases que catalisam a hidrólise de resíduos α -L-arabinofuranosil na extremidade não redutora α -1,2, α -1,3 e α -1,5 e conseqüentemente, liberam resíduos arabinofuranosil de diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos incluindo arabinana, arabinogalactanas e heteroxilanas (Kaji, 1984). Existem uma variedade de organismos produtores de ABFases, porém os produtores mais ativos são o *Thermoascus aurantiacus* e várias espécies de *Bacillus* (Karimi & Ward 1989). Alguns

nomes comumente empregados são: arabinosidase, α -arabinosidase, α -L-arabinosidase, α -arabinofuranosidase, arabinofuranosidase, α -L-arabinofuranosídeo hidrolase, L-arabinosidase, α -L-arabinanase e α -N-arabinofuranosidase e α -L-Arabinofuranosidase (CAZy, 2011).

Até o momento, de acordo com CAZy, as ABFases estão distribuídas em 6 diferentes famílias das hidrolases glicosídicas: 3, 10, 43, 51, 54 e 62, com base na similaridade sequencial de aminoácidos, tendo os membros de cada família características específicas quanto ao tipo de substrato, padrão de ação, mecanismo de reação (Pitson et al., 1996; Vincent et al., 1997; Gielkens et al., 1997; Matsuo et al., 2000; Harvey et al., 2000) e estrutura tridimensional (Zverlov et al., 1998).

Resíduos L-arabinosil são amplamente distribuídos em algumas hemiceluloses, tais como arabinana, arabinoxilana, goma arábica e arabinogalactana. Assim, as ABFases são enzimas acessórias envolvidas na liberação de arabinose e arabinofuranose destes substratos (Saha, 2000). Essas enzimas são parte do sistema xilanolítico microbiano necessário para a quebra completa de arabinoxilanas (Bachmann & McCarthy, 1991). Desta forma, estas são utilizadas sinergicamente com outras hidrolases glicosídicas, em muitos processos agroindustriais, incluindo o aumento da digestibilidade da ração animal, deslignificação da polpa, aumento do aroma do vinho e clarificação de sucos (Saha, 2000). Essas enzimas têm atraído a atenção devido ao seu potencial de aplicação na redução da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis (Sheehan & Himmel, 1999; Poutanen, 1989; Flipphi et al., 1994).

Beldman et al. (1997) classificou as ABFases em três tipos (A, B ou C) dependendo do modo de ação e especificidade ao substrato. ABFases do tipo A degradam preferencialmente α -1,5-L-arabinofurano-oligossacarídeos em monômeros de arabinose e são inativas para ligações arabinosil presentes em polissacarídeos (Komae et al., 1982; Weinstein & Albersheim, 1979). Em contraste, ABFases do tipo B mostram atividade desramificadora de resíduos de L-arabinose em cadeias de arabinana e arabinoxilana (Rombouts et al., 1988). O terceiro tipo, C, são chamadas de L-arabinofuranohidrolases e são especificamente ativas em ligações arabinosídicas em arabinoxilanas de aveia, trigo e cevada (Kormelink et al., 1991; Van Laere et al., 1997).

2.4.4. α -L-Arabinofuranosidase de *Thermotoga petrophila*

Thermotoga petrophila RKU-1 é uma bactéria hipertermofílica isolada do reservatório de óleo de Kubiki, em Niigata, Japão, que tem crescimento ótimo a 80°C (Takahata et al., 2001). Este organismo produz duas α -L-arabinofuranosidasas: uma com 484 resíduos de aminoácidos (número de acesso no *GenBank* – ABQ46651) e a outra com 644 resíduos (número de acesso no *GenBank* – ABQ46653), ambas pertencem a família 51 das hidrolases glicosídicas (GH51). Neste trabalho, a proteína alvo foi a enzima termoestável α -L-arabinofuranosidase de *T. petrophila* RKU-1 (TpAraf) com 484 resíduos de aminoácidos. As α -L-arabinofuranosidasas termoestáveis são necessárias para muitas aplicações industriais conduzidas a temperaturas elevadas, resultando no aumento da velocidade de reação, redução do risco de contaminação e elevada solubilidade do substrato (Beguin e Aubert, 1994).

Estudos anteriores promoveram a caracterização biofísica e funcional de TpAraf, realizados por Santos et al. (2011). Desta forma, sabemos que esta proteína possui massa molecular de aproximadamente 57 kDa, ótima atividade a 65°C e pH 6, e permanece ativa por várias horas a 90°C. Portanto, este trabalho de Mestrado também tem interesse em promover estudos estruturais e biofísicos da proteína alvo, por meio de técnicas de cristalografia de raios X, SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo) e técnicas espectroscópicas, visto que por se tratar de uma proteína termoestável, esta tem considerável interesse industrial.

É importante ressaltar que as duas enzimas relatadas acima, uma arabinofuranosidase de *Thermotoga petrophila* RKU-1 e uma liquenase de *Bacillus subtilis* 168, foram enzimas alvo para desenvolvimento do projeto de mestrado, e que este estudo é bastante interessante uma vez que ambas podem atuar sinergicamente em diversos processos industriais.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivos a caracterização estrutural e biofísica de uma β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e de uma α -L-arabinofuranosidase termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Expressão do gene *bgIS* que codifica a enzima β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 em *Escherichia coli*, purificação da proteína recombinante sob condições de alta pureza e a caracterização biofísica e estrutural da proteína (DLS, SAXS, CD e ITFE).
- ✓ Resolução da estrutura cristalográfica de α -L-arabinofuranosidase de *Thermotoga petrophila* RKU-1 termoestável da família GH51 das hidrolases glicosídicas por cristalografia de raios X; determinação do envelope protéico por SAXS e investigação da estabilidade por técnicas espectroscópicas: CD e DLS.

CAPÍTULO 1

Este capítulo tem por objetivo descrever os estudos biofísicos e estruturais (procedimentos experimentais e resultados) realizados com a proteína β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168, que foi publicado na revista *Process Biochemistry*.

Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glicanase from *Bacillus subtilis* 168

Furtado, P. G.^a; Ribeiro, L. F.^a; Santos, C. R.^b; Tonoli, C. C.^b; Souza, A. R.^c; Oliveira, R. R.^b; Murakami, M. T.^b; Ward, R. J.^d. *Process Biochemistry*, 46 (2011) 1202–1206.

(a)Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP, Universidade de São Paulo, SP, Brazil; (b)Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil; (c)Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE); (d)Departamento de Química, FFCLRP-USP, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

4(A). PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Transformação por eletroporação

O clone do gene que codifica a proteína β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 foi construído em vetor de clonagem pET28a, pelo grupo de pesquisa do Departamento de Química, FFCLRP-USP, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto e alíquota do material foi gentilmente cedido para nosso grupo de pesquisa, o que tornou possível a execução do projeto. Desta forma, uma alíquota do DNA plasmidial foi utilizada para transformação pela técnica de eletroporação.

Materiais e métodos:

- DNA plasmidial,
- Linhagem BL21 (DE3) competentes de *Escherichia coli*,
- Eletroporador – *GenePulser* (Biorad),
- Cubeta de eletroporação,
- *Shaker* com temperatura e agitação controladas,
- Centrifuga *ependord* modelo 5415D,
- Placas de petri estéreis,
- Meio de cultivo LB:
 - 1 % triptona,
 - 0,5 % de extrato de levedura,
 - 1 % de NaCl p/v
- LB-ágar:
 - 1% triptona,
 - 0,5% extrato de levedura,
 - 1% NaCl,

2% Agar p/v

- Antibióticos: Canamicina e cloranfenicol na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$,
- Fluxo laminar.

Em um fluxo estéril, uma alíquota de 2 μL DNA da construção plasmidial contendo o gene foi adicionada às células de expressão BL21 (DE3) de *E. coli* e transferidas para a cubeta de eletroporação. O eletroporador foi ajustado e a cubeta foi submetida a um pulso (2,5 mV e 10 F). Em seguida, no fluxo estéril, 1 mL de meio LB foi adicionado na cubeta, o volume total da transformação foi transferido para um tubo de 1,5 mL e este foi mantido a 1h sob agitação contínua de 200 rpm, a 37°C . Após esse período a amostra foi centrifugada a 4000 xg por 10 min, o sobrenadante foi quase totalmente descartado e as células ressuspendidas em aproximadamente 100 μL de meio LB restantes. Essas células foram plaqueadas em meio seletivo contendo canamicina e cloranfenicol ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubado em estufa a 37°C , *overnight*.

4.2. Expressão e extração da proteína da fração celular (lise)

A expressão em sistema heterólogo da proteína de estudo foi realizada em células de expressão BL 21 (DE3).

Materiais e métodos:

- Meio de cultivo HDM:
25 g.L^{-1} extrato de levedura,
15 g.L^{-1} triptona,
10mM MgSO_4
- Tubos de cultivo estéreis,
- Antibióticos: canamicina e cloranfenicol $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$,

- Incubadora com temperatura e agitação controladas,
- Centrifuga *Sorvall* modelo RC 26 Plus,
- Solução de IPTG (isopropil-tio- β -galactosídeo – *Invitrogen*) a 1 M,
- Tampão lise: 100mM HEPES pH 7,5, 1mM PMSF, 300mM NaCl, 20mM imidazol e 1% (v/v) Triton X100,
- Lisozima (1M),
- Inibidores de protease: PMSF (1M)
- Sonicador *VirSonic*,

Uma colônia transformada contendo o plasmídeo de interesse, pET28a-bglS, foi inoculada em frascos erlenmeyers de 1L, com 200 ml de meio HDM, sendo mantido a 37°C e 200 rpm de agitação, até que a turvação do meio, absorvância em 600 nm atingisse valores na faixa de 0,6-0,8. Em seguida, o indutor de expressão, IPTG, foi adicionado para uma concentração final de 0,4 mM. Para a expressão em larga escala foram utilizados vários erlenmeyers de 1L contendo o meio HDM.

Após a indução por período de quatro horas, a cultura foi centrifugada a 4000 xg, por quinze minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, toda a fração celular foi coletada e ressuspensa no tampão de lise: 100mM tampão HEPES, pH 7,5, 1mM PMSF, 300mM NaCl, e 1% (v/v) Triton X100. Após ressuspensão, foi adicionado lisozima ($5\mu\text{l.mL}^{-1}$ de tampão) ao volume de células, e esta foi mantida por 30 min em banho de gelo para posterior sonicação, em sonicador *VirSonic*, numa amplitude de 60%, com 15 s de sonicação e intervalos de parada de 30s para ruptura das células e conseqüentemente, liberação da proteína de interesse. Desta forma, a solução resultante foi centrifugada a 10000 xg a 4°C, por 35 min para precipitação das células. Em seguida, o sobrenadante foi utilizado para a etapa de purificação, descrita a seguir.

4.3. Purificação

No caso deste estudo, a proteína foi purificada por duas etapas de cromatografia líquida em sistema FPLC como descrito a seguir.

4.3.1. Cromatografia de Afinidade - Primeiro passo de purificação

A cromatografia de afinidade é uma técnica utilizada frequentemente para purificar proteínas, com alto grau de pureza, a partir de uma mistura molecular complexa. Esta técnica utiliza uma matriz insolúvel que é covalentemente ligada a um ligante específico, que pode ser um análogo de substrato de uma enzima, por exemplo, que irá ligar-se a uma proteína específica. No caso deste estudo, os metais de transição: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} podem coordenar com alguns aminoácidos, tais como histidina, cisteína e triptofano, por exemplo, o que por sua vez originou o nome de Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (CAMI). A proteína de interesse foi modificada de forma a conter uma cauda de 6xHis com alta afinidade ao Níquel. A remoção das proteínas adsorvidas ao metal é feita de diversas formas, por gradiente de imidazol, gradiente de pH ou por gradiente salino. De forma geral, o mecanismo para a remoção das proteínas adsorvidas dá-se por competição, ou seja, a interação entre imidazol, ou íons H^+ , e ou sal, com o substrato ligado deve ser maior que a interação entre o metal e a proteína. Neste estudo, após a sonicação e respectiva centrifugação do lisado foi realizado o primeiro passo de purificação da seguinte forma:

Materiais e Métodos:

- Coluna: Ni-NTA (*Promega – Madison, USA*), em resina *Hitrap Chelating HP*
- FPLC: *GE Pharmacia AKTA Purifier*

- Tampão A: 100 mM HEPES pH 7,5 + 1mM PMSF + 300 mM de NaCl, + 5 mM benzamidina + 1% (v/v) Triton X100 + 20 mM imidazol.
- Tampão B: HEPES 100 mM pH 7,5 + 1mM PMSF + 300 mM de NaCl, + 5 mM benzamidina + 1% (v/v) Triton X100 + 300 mM imidazol.
- Fluxo de injeção da amostra: 0,5 mL.min⁻¹
- Fluxo de lavagem e eluição: 1 mL.min⁻¹

Essa etapa da purificação foi realizada utilizando-se coluna comercial de Ni-NTA que consiste em uma coluna empacotada com 5 mL de agarose ligada covalentemente a íons de níquel. A purificação processou-se integralmente em sistema cromatográfico de baixa pressão (FPLC) à temperatura ambiente e a eluição monitorada em detector UV-VIS a 280 nm. Inicialmente a coluna foi lavada com água para retirada do excesso de íons metálicos ligados a ela, em seguida, a coluna foi equilibrada com tampão A, numa vazão de 1mL.min⁻¹. Então, a amostra protéica foi inserida no super-looping, que por sua vez manteve-se conectado ao sistema. Posteriormente, a amostra foi injetada na coluna cromatográfica previamente equilibrada, numa vazão de 0,5 mL.min⁻¹ e em seguida, a coluna foi lavada com tampão A, num fluxo de 1 mL.min⁻¹ para que as proteínas não adsorvidas a coluna fossem eluídas totalmente. A remoção das proteínas adsorvidas ao metal foi feita em etapas, com aumento linear da concentração de imidazol no tampão de lavagem (B). O volume eluído foi coletado no coletor de frações em tubos eppendorfs, e as alíquotas das frações referentes aos picos visualizados no cromatograma, analisadas posteriormente por SDS-PAGE para certificar sobre a pureza da amostra, como descrito no item 4.4.

Após análise do gel, as frações correspondentes a atividade de liquenase foram concentradas a 4 °C utilizando o concentrador Ultrafree CL – 15 kDa (Millipore) a uma rotação de 4000 xg, até atingir um volume final de aproximadamente 1 mL e quantificadas como descrito no item 4.5.

4.3.2. Cromatografia de Exclusão molecular – Segundo passo de purificação

Este método baseia-se na separação das proteínas por tamanho. Esta técnica utiliza uma matriz inerte, porém porosa. Sendo assim, moléculas pequenas penetram os poros da matriz, enquanto que as moléculas grandes são eluídas primeiramente. Essa etapa é importante para garantir a homogeneidade estrutural da amostra, o que aumenta a chance de cristalização, uma vez que separa diferentes estados oligoméricos da mesma proteína.

Materiais e métodos:

- coluna: *Superdex 75 16/60* de 120 mL (*Amershan Biosciences*)
- FPLC: *GE Pharmacia AKTA Purifier*
- Tampão de eluição: 20 mM tampão HEPES pH 7,5, 1mM PMSF, 100 mM de NaCl, 2 mM CaCl₂,
- Fluxo: 0,5 mL.min⁻¹

Essa etapa da purificação foi realizada utilizando-se uma coluna Superdex 75 16/60 que consiste em uma coluna contendo 120 mL de agarose e dextran. Este processo foi realizado em sistema FPLC de baixa pressão, à temperatura ambiente, e a eluição monitorada em detector UV-VIS a 280 nm. Inicialmente, a coluna foi lavada com água para retirada do álcool 20%, posteriormente equilibrada com tampão F num fluxo de 0,8 mL.min. Então, a solução concentrada foi inserida no *looping* de 1 mL, conectado ao sistema, e em seguida a amostra protéica foi eluída num fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. O volume eluído foi coletado em tubo de 1,5 mL e as alíquotas das frações, referentes aos picos visualizados no cromatograma, analisadas posteriormente por SDS-PAGE, como descrito no item 4.4. Em seguida, as frações correspondentes a atividade de liquenase foram concentradas a 4°C utilizando o concentrador Ultrafree CL – 15 kDa (Millipore) a uma rotação de 4000 xg e posteriormente quantificadas, como descrito no item 4.5, abaixo.

4.4. Gel de poliacrilamida desnaturante - SDS-PAGE

As análises eletroforéticas foram realizadas utilizando SDS-PAGE a 13%, segundo Laemmli (1970), com modificações. Esta técnica baseia-se no princípio de que as proteínas altamente carregadas devido à presença do composto aniônico SDS, sob um campo elétrico migra na malha do gel de forma dependente do seu tamanho. Assim a separação das proteínas ocorre devido à diferença na massa molecular da proteína, sendo que as malhas do gel atuam como uma peneira molecular. Desta forma, as proteínas menores percorrem maior distância no gel enquanto que as maiores percorrem menor distância .

Materiais e Métodos:

- Aparato de eletroforese da *Bio-Rad* (cuba, fonte, placas de vidro),
- Solução de gel separador 13%:
 - 2,08 mL de acrilamida/ bis-acrilamida (30%; 0,8%),
 - 1,88 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,8,
 - 50 µL SDS,
 - 0,97 mL de água,
 - 25 uL de persulfato de amônio 10%,
 - 4 uL de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina)
- Solução do gel de empilhamento 5%:
 - 200 µL de acrilamida/ bis-acrilamida (30%; 0,8%),
 - 62 µL de Tris-HCl 1M, pH 6,8,
 - 12,5 µL de SDS,
 - 0,96 mL de água,
 - 12,5 µL de persulfato de amônio a 10%,
 - 1 ul de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina)
- Tampão de amostra 3X:
 - 2,4 mL de Tris-HCl pH 6.8,
 - 3 mL de SDS 20 %,

- 3 mL de glicerol,
- 0,006 g de azul de bromofenol,
- 1,6 mL de β -mercaptoethanol,
- Água para um volume final de 10 mL
- Tampão de corrida:
 - 3,02 g de Tris,
 - 18,6 g de Glicina,
 - 10 mL de SDS 10%,
 - Água para volume final de 1L
- Solução de *Comassie Blue* R-250:
 - 0.25g coomassie brilliant blue R-250,
 - 100 mL de uma solução 45% metanol e 10% ácido acético,
- Solução descorante:
 - 45 % (v/v) de etanol,
 - 10 % (v/v) ácido acético.

As soluções do gel de empilhamento e do gel separador foram preparadas no momento da montagem do gel. A completa polimerização das malhas do gel ocorreu após período de 30 min. Enquanto isso, as amostras foram preparadas, aquecidas a 95°C, por 5 min. A seguir, a cuba foi montada e na mesma foi adicionado tampão de corrida para passagem da corrente. Então, as amostras foram aplicadas nos poços do gel de empilhamento. A corrida de eletroforese foi realizada por aproximadamente duas horas, à temperatura ambiente, numa voltagem de 120 V. Em seguida, o gel de poliacrilamida foi colocado em uma solução de *coomassie-blue* R-250 para coloração por um período de aproximadamente 1 a 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de corante foi removido sob aquecimento do gel num forno microondas em recipiente específico contendo água, até o aparecimento das bandas de proteínas.

4.5. Quantificação

Materiais e métodos:

- Espectrofotômetro *Jasco V-530*,
- Cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico,
- Amostra protéica.

A concentração foi determinada através da medida de absorbância da proteína em solução em espectrofotômetro *Jasco V-530*, a 280 nm. Os espectros de absorbância foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 340-200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Inicialmente, foi obtido o espectro do tampão (branco) em que a proteína encontrava-se em solução após a purificação e em seguida, obteve-se o espectro da proteína. Posteriormente, foi feita a correção, ou seja, foi descartado o efeito do tampão na curva da proteína.

Assim, a concentração molar (C) da proteína foi obtida por meio da equação de Lambert-Beer, como mostrado abaixo:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot l \cdot C$$

Em que A_{280} é a absorbância medida a 280 nm, l é o caminho óptico da cubeta (cm) e ϵ é o coeficiente de extinção molar teórico ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), obtidos com auxílio do programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>).

4.6. Diálise

A diálise é uma técnica largamente utilizada em proteínas. Através desta é possível trocar o tampão presente na solução de proteína por outro mais adequado para determinado experimento. A membrana possui pequenos poros nos quais apenas os sais são deslocados, sendo que a proteína fica retida do outro lado da membrana.

Materiais e Métodos:

- Membrana de diálise: poro 10-12 kDa, Spectra/Por (*Spectrum*),
- Tampão específico para determinado experimento.

A solução foi colocada em membrana de diálise, sendo mantida sempre a 4°C e sob agitação suave para que ocorresse o deslocamento do tampão.

4.7. Dicroísmo Circular – CD

A técnica de CD é um tipo de espectroscopia que faz uso da luz circularmente polarizada e é largamente utilizada para estudos biofísicos em sistemas biológicos, tais como para moléculas quirais, como proteínas. Esta técnica oferece informações sobre a estrutura secundária da proteína e tem sido bastante utilizada em estudos estruturais. Apesar de menos informativa quanto a detalhes estruturais, o baixo custo, pequena quantidade de material e menor restrição quanto ao estado físico da amostra, fazem com que esta seja intensamente utilizada em Biofísica.

Materiais e métodos:

- Espectropolarímetro *Jasco J-810* (*Jasco Inc.* - Tokyo, Japan),
- Controlador de temperatura *Peltier PFD-425S*,
- Amostra de proteína pura,
- Cubeta de quartzo com 2 mm de caminho óptico,
- Centrifuga *ependord* modelo 5415D,
- Agentes desnaturantes (8M, *Sigma* - St. Louis, USA).

As análises de dicroísmo circular (CD) foram realizadas utilizando espectropolarímetro *Jasco J-810* (*Jasco Inc.* - Tokyo, Japan), no qual possui um controlador

de temperatura acoplado, *Peltier PFD-425S*, e realizando deconvolução espectral (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>). O programa Spectra manager (*JASCO*) foi utilizado para registro dos dados coletados. As condições experimentais utilizadas para obtenção dos espectros de dicroísmo circular foram: velocidade de 50 nm/min, resolução de 0,5 nm, intervalo de coleta de dados de 4s, na faixa de 190 a 260 nm, com acumulações de seis espectros. Antes das medidas, todas as amostras foram centrifugadas a 14000 xg por 10 minutos.

Inicialmente, para verificar o conteúdo de estrutura secundária, utilizou-se proteína pura a 0,1 mg.mL⁻¹ em 10 mM tampão fosfato, pH 6.0 e o espectro de CD obtido a 25°C. A contribuição do solvente foi eliminada subtraindo seu espectro daquele obtido da proteína. Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) foram convertidos em elipticidade molar residual por meio da expressão dada (Adler et al., 1973):

$$\Theta = \frac{CD(mdeg)}{l(mm)C(M)aa},$$

em que CD é a elipticidade medida (mdeg), l é o caminho óptico (mm), C é a concentração molar (M) e aa é o número de resíduos de aminoácidos da proteína. Os dados obtidos foram graficados utilizando-se o programa ORIGIN 8.0.

4.7.1. Desnaturação Térmica e Química

Experimentos de desnaturação térmica e química por CD foram realizados com o objetivo de verificar a estabilidade da proteína, frente a variações das condições do meio, por meio da perda de sinal de CD.

Materiais e métodos:

- Espectropolarímetro Jasco J-810 (*Jasco Inc.* - Tokio, Japan),

- Espectro fluorímetro (*Varian Cary*, USA),
- Cubeta quartzo 2 mm
- Proteína pura
- Agente desnaturante: Cloreto de Guanidina (8M, *Sigma* – St. Louis, USA),
- Controlador de temperatura *Peltier PFD-425S*.

As análises com agente desnaturante químico foram realizadas utilizando-se dois métodos, o primeiro por CD e o outro por ITFE, como será elucidado posteriormente. Primeiramente, a amostra de proteína a $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão Hepes 5x diluído, pH 7,5, 100 mM NaCl e 2 mM CaCl_2 foi incubada por 1h a 20°C em concentrações crescentes de guanidina: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 M, e posteriormente analisadas por CD e por ITFE.

O desnovelamento térmico foi analisado apenas pela técnica de dicroísmo circular (CD) com a proteína pura a $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em diferentes soluções tampão: citrato de sódio 20 mM (pH 4 e pH 5); 20 mM tampão fosfato (pH 6 e pH 7). Desta forma, as alíquotas foram submetidas a um aumento gradual de temperatura (20°C a 90°C), com incremento de 5°C .

Mudanças no sinal de CD foram monitoradas a 218 nm para os experimentos de desnaturação química e térmica. Mudanças no espectro de CD e de fluorescência, por desnaturação química, descrito em (4.8.) foram utilizadas para estimar a Energia livre de Gibbs do desnovelamento ($\Delta\text{GH}_2\text{O}$) e a cooperatividade do desdobramento (m_D), por extrapolação linear, como demonstrado a seguir.

De acordo com Greenfield (2006), uma reação de desnaturação do tipo:



em que, $[\text{P}_N]$ é a concentração de proteína nativa, $[\text{P}_D]$ é a concentração de proteína desnovelada, $[\text{Den}]$ é a concentração de desnaturante, K é a constante de equilíbrio da reação do desnovelamento, F_N é a fração de proteína nativa e F_D é a fração de proteína desnovelada, logo:

$$[\text{P}_T] = [\text{P}_N] + [\text{P}_D] \quad (\text{I})$$

$$F_N = [\text{P}_N]/[\text{P}_T] \text{ e } F_D = [\text{P}_D]/[\text{P}_T] \quad (\text{II})$$

$$F_N + F_D = 1 \quad \text{(III)}$$

$$K = [D]/[N] = F_D/F_N \quad \text{(IV)}$$

$$\Delta G_D = -RT \ln(K_D) \quad \text{(V)}$$

$$\Delta G_D = \Delta G_{H_2O} + m_D * [Den] \quad \text{(VI)}$$

4.8. Fluorescência

Na espectroscopia de fluorescência, uma amostra é irradiada com luz UV e detecta-se a radiação emitida (VIS) pela amostra submetida à iluminação. .

Neste caso, o experimento de desnaturação química por fluorescência foi realizado com o intuito de analisar e comparar os dados termodinâmicos com os dados obtidos da desnaturação química por CD.

Materiais e métodos:

- Espectrofluorímetro (*Varian Cary*, USA),
- Cubeta quartzo de 10 mm de caminho óptico,
- Proteína a 0,4 mg.mL⁻¹
- Agente desnaturante: Cloreto de Guanidina (8M, *Sigma* – St. Louis, USA),

Paralelamente, após leitura em CD, a amostra foi analisada em um fluorímetro, observando-se mudanças da emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (ITFE). Assim, a amostra foi excitada com luz no comprimento de onda de 295 nm e espectro de emissão coletada na faixa de 300-400 nm, utilizando fenda de 0,5 nm e os espectros foram registrados por 1s com incremento de 1 nm.

4.9. Espalhamento dinâmico de Luz – DLS

A técnica de DLS é uma das ferramentas diagnósticas mais úteis, simples, rápida e sensível para cristalização de proteínas. Caracteriza-se como uma técnica não invasiva, sendo necessário pequeno volume de amostra (30 – 80 μL). O equipamento mede a intensidade de espalhamento de luz pelas moléculas na solução, isto é, o coeficiente de difusão translacional, o raio hidrodinâmico da molécula (r) e permite verificar a homogeneidade da amostra, pois proteínas com distribuição monodispersas ou homogêneas possuem alta probabilidade de produzir cristais.

De forma geral, os dados obtidos do DLS analisados são a polidispersividade (IP) e raio hidrodinâmico (r) de uma amostra polimérica. Estes dados são de elevada importância para estudos estruturais e biofísicos. A IP está associada com a “largura” da curva de distribuição de massa molar. O ideal é que a IP seja a menor possível, de forma geral valores inferiores a 20% são considerados bons resultados. Por outro lado, o r (nm) da proteína oferece uma medida do raio médio do sistema molecular em estudo, tratado como uma esfera hipotética (sistema globular). Este dado indica possíveis estados oligoméricos da molécula. O ideal é que este valor seja o menor possível, pois é um bom indicativo de que a amostra seja homogênea e adequada para estudos biofísicos e estruturais.

Materiais e Métodos:

- Equipamento *DynaPro MS/X* (Wyatt Technology Corporation - Santa Barbara, USA),
- *Software Dynamics V6.3.40*,
- Enzima 1,3-1,4- β -glicanase pura,
- Cubeta de quartzo, com caminho óptico de 10 mm.

Experimentos de DLS foram realizados com a proteína pura, numa concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em equipamento *DynaPro MS/X*, comprimento de onda de 830 nm, 30 mW de potência, a 20°C. Foram feitas 50 medidas, com 10s de corrida cada e os

experimentos foram repetidos com 30 min de intervalo para checar a estabilidade da amostra. Os dados hidrodinâmicos foram determinados usando o programa *Dynamics V6.3.40*.

4.10. Espalhamento de Luz a baixo ângulo – SAXS

A técnica de SAXS fornece informações estruturais com dimensões características que variam de 10 a algumas centenas de Ångström através do raio de giro (R_g) e forma da molécula por cálculos de reconstrução 3D ab initio. Esta ferramenta tem se tornando muito poderosa em complemento a cristalografia fornecendo dados sobre oligomerização e alterações conformacionais.

Materiais e métodos

- Linha de luz D02A – SAXS2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS),
- Proteína pura (4 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹),
- Software FIT2D (Hammersley, copyright 1987 - 2005).

Os dados de SAXS foram obtidos na linha de luz D02A – SAXS2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil, usando comprimento de onda de 1,48 Å e um detector bidimensional, com arranjo CCD (MARCCD, USA), de 165 mm. A distância do detector para a amostra foi de 1068,04 mm e os dados na faixa de 0,19 nm⁻¹ para 2,5 nm⁻¹ foram coletados usando proteína pura nas concentrações de 4 e 10 mg.mL⁻¹, em tampão 20mM HEPES-HCl, pH 7,5. Exposições de 600 s foram feitas com intuito de diminuir o efeito da indução da radiação na proteína. Além disso, dados do tampão foram coletados antes e depois dos dados da amostra para fazer a correção do solvente e normalização do espalhamento.

A análise dos dados bidimensionais e integração das contagens sobre a região detectada, para obtenção da curva de espalhamento unidirecional foi realizada com auxílio do

programa FIT2D (Hammersley, copyright 1987 - 2005). Por meio de programas computacionais como DAMMIN e GASBOR (Svergun e Stuhrmann, 1991; Svergun et al., 2001), um modelo de baixa resolução da forma da proteína pode ser obtido, complementando assim os dados estruturais determinados por cristalografia.

4.11. Ensaios de cristalização

Os testes de cristalização foram realizados pelo método da matriz esparsa, utilizando-se diferentes condições disponíveis no Robolab.

Materiais e métodos

- Proteína pura a $47,5 \text{ mg.mL}^{-1}$
- Kits iniciais de cristalização,
- Robô *HoneyBee 963* (*Genomic Solutions Inc. - Ann Arbor, MI, USA*),
- Sala climatizada à 18°C .

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados com a 1,3-1,4- β -glicanase numa concentração de $47,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2mM CaCl₂, pH 7.5. A técnica utilizada foi a de difusão de vapor em gota suspensa (*sitting drop*) utilizando o robô *HoneyBee 963* (*Genomic Solutions Inc. - Ann Arbor, MI, USA*). As gotas foram preparadas pela mistura de 0,5 μL de enzima, com igual volume da solução mãe, 80 μL da solução do reservatório e mantidas a 18°C . Os testes iniciais foram realizados utilizando os kits comerciais: *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* (*Hampton Research*), *Wizard Screens I e II* (*Emerald BioStructures*) e *Personal Structure Screens 1 e 2* (*Molecular Dimensions*).

4.12. Coleta de dados

Materiais e métodos

- Cristais,
- *Loop* de nylon
- Linha W01B-MX2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Após o crescimento dos cristais alguns foram escolhidos e coletados, com o auxílio de *loops* de nylon (*Hampton Research*) e analisados. Esses cristais foram mantidos em gotas de 1 μL contendo 25% (v/v) de solução de glicose (1,7 M) e 75% (v/v) da solução-mãe. Em seguida, os cristais foram rapidamente congelados e mantidos sob um fluxo constante de nitrogênio gasoso a temperatura de 100 K. O fluxo de nitrogênio gasoso ajuda a minimizar os danos causados pela radiação ionizante, e a solução crioprotetora serve para impedir a formação de cristais de gelo durante o resfriamento do cristal.

Os dados de difração de raios X foram coletados utilizando radiação síncrotron, na linha W01B-MX2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil. O comprimento de onda da fonte de radiação foi definido em 1.548 Å e o detector utilizado foi o MARCCD (165 mm). Foram coletadas 180 imagens a uma distância cristal-detector de 80 mm, cada imagem de difração foi coletada em um intervalo de 1° com tempo de exposição de 30 s. Os dados foram indexados, integrados, reduzidos e escalonados utilizando os programas DENZO e SCALEPACK, implementados no pacote HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997).

4.13. Determinação da Estrutura pelo Método de Substituição Molecular

Materiais e métodos

- Proteína homóloga depositada no banco de dados PDB (ID: 1GBG),
- Software AMoRe (Navaza, 1994).

O método de Substituição Molecular é aplicado quando a proteína estudada apresenta alta homologia com outras proteínas, cuja estrutura já tenha sido determinada. Este procedimento é baseado na observação de que macromoléculas homólogas na sua seqüência possuem um enovelamento muito similar. Assim a posição do modelo molecular dentro do cristal é determinada pelas funções rotação R e translação T que move o modelo de uma posição inicial de referência, para a posição atual, especificada pelos vetores atômicos (r).

A estrutura da 1,3-1,4- β -glicanase foi resolvida por técnicas de substituição molecular com o Programa AMoRe (Navaza, 1994), utilizando como modelo de busca as coordenadas atômicas de uma β -1,3-1,4-glicanase de *B. licheniformis* (PDB: 1GBG) (Han et al., 1995).

4.14. Refinamento e análise da Estrutura

Materiais e métodos

- Softwares específicos: REFMAC5 (Murshudov et al., 1997), COOT (Emsley & Cowtan, 2004), ARP/wARP (Perrakis et al., 1999), PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

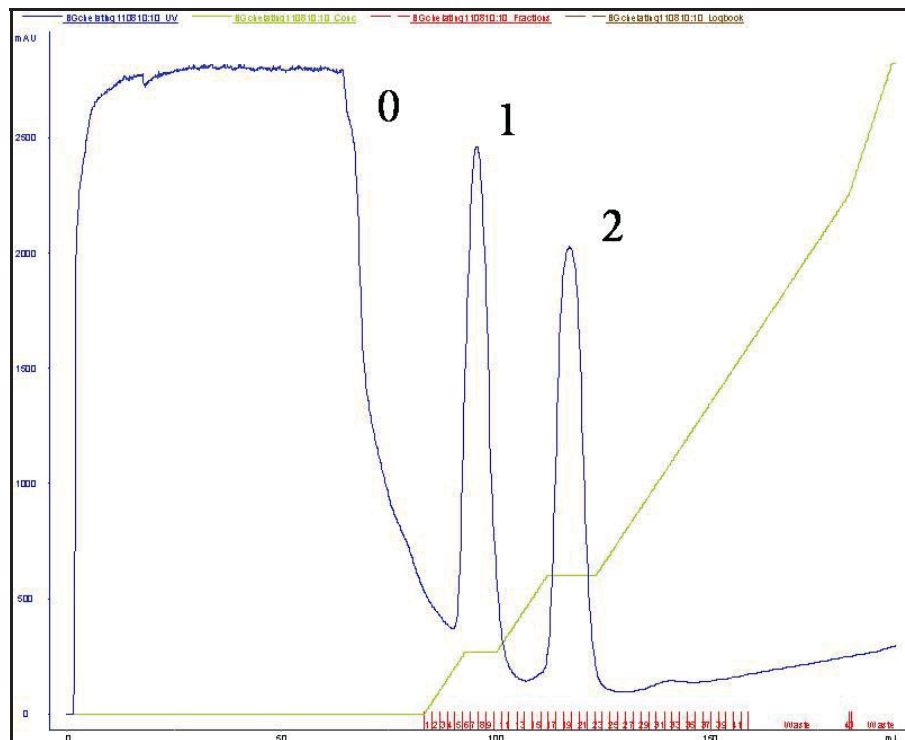
Fatores térmicos isotrópicos posicionais e individuais foram refinados utilizando o programa REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) incorporado no pacote CCP4 (CCP4, 1994). Os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc da proteína modelo foram examinados e ajustados manualmente após cada ciclo de refinamento utilizando o programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004). As moléculas de água foram incorporadas nos ciclos finais utilizando o programa ARP/wARP (Perrakis et al., 1999). A qualidade estereoquímica global do modelo final foi analisada pelo programa PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

5(A).RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Purificação da β -1,3-1,4-glicanase

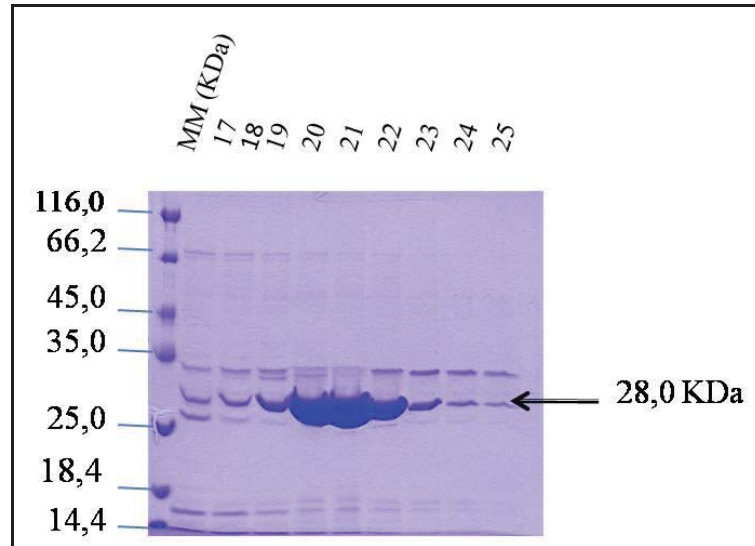
A β -1,3-1,4-glicanase foi purificada com dois passos cromatográficos. O primeiro passo de purificação (Afinidade) resultou na separação da amostra em três frações (0, 1, 2). O primeiro pico (**pico 0**) consiste na injeção da amostra na coluna, lavagem da coluna com 5 volumes de coluna com tampão sem imidazol e posterior eluição das proteínas que não se ligaram a resina. Em seguida, iniciou-se o gradiente de imidazol para eluição das proteínas que se adsorveram com menor afinidade (**pico 1**) e aquelas que se adsorveram com maior afinidade a resina (**pico 2**). A proteína de estudo (liquenase) foi eluída no segundo pico, como pode ser visto na Figura 6, abaixo.

Figura 6 - Cromatograma obtido a partir da purificação da β -1,3-1,4-glicanase por cromatografia de afinidade em *Hitrap Chelating HP*. 0, 1, 2: picos da eluição. Azul: Absorbância medida a 280 nm, Verde: Concentração de imidazol (gradiente), Vermelho: frações eluídas.



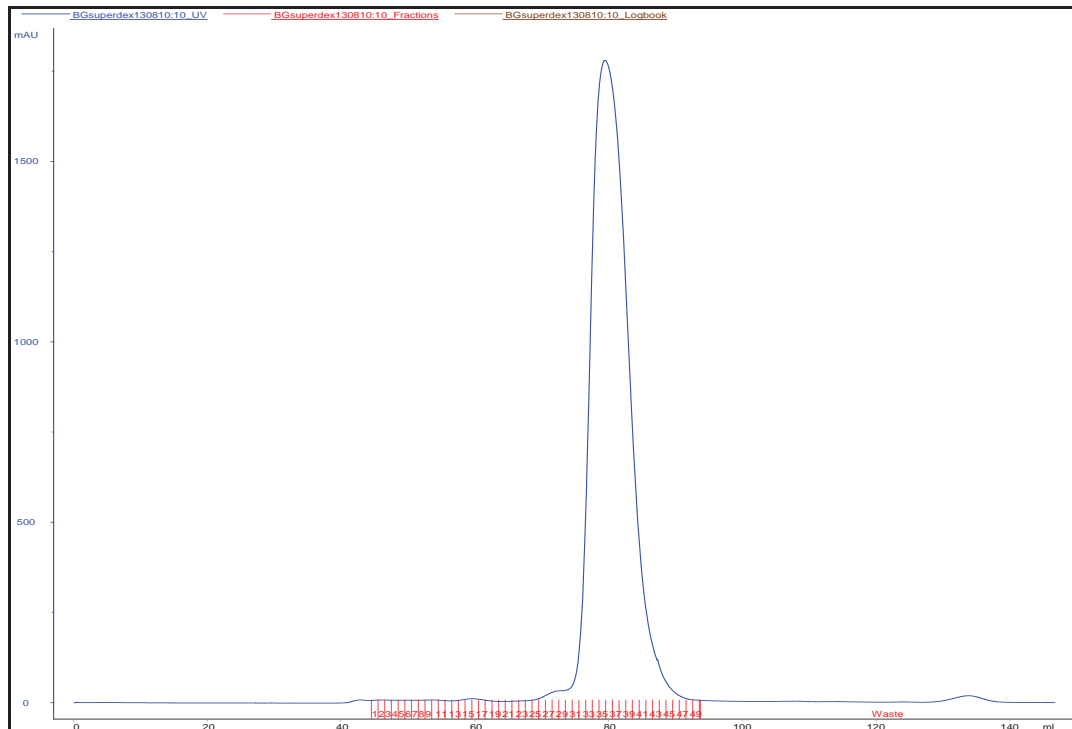
Em seguida, alíquotas das frações eluídas no segundo pico (17 a 25) foram aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) para visualização da pureza da proteína de estudo após primeiro passo de purificação (Figura 7).

Figura 7 - Gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) obtido após purificação por afinidade. 17-25: alíquotas das frações eluídas do segundo pico na afinidade. MM: marcador molecular (*Fermetas*) (kDa).



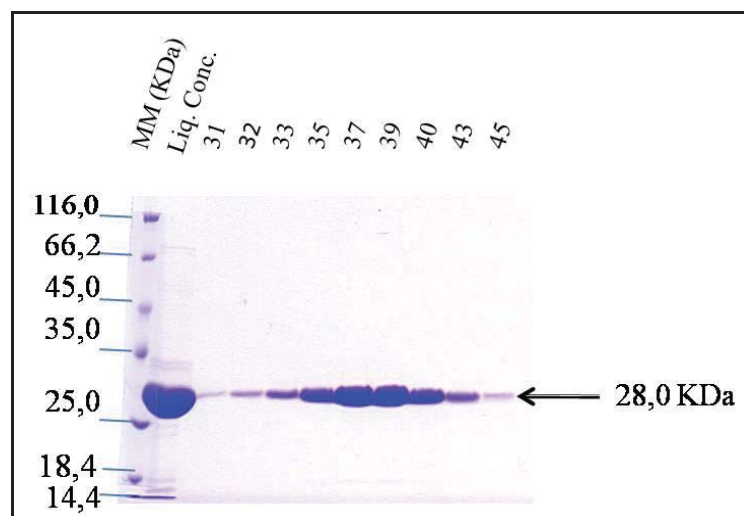
O segundo passo da purificação foi uma cromatografia de exclusão molecular em resina Superdex 75 16/60. Inicialmente, as frações mais puras do pico 2 foram concentradas em tubos concentradores até volume de 1 mL para a injeção na coluna superdex. Anteriormente a injeção, a coluna foi equilibrada com tampão de eluição. A exclusão molecular foi utilizada para eliminar possíveis contaminantes que permaneceram após o primeiro passo de purificação e aumentar o grau de pureza da proteína. Por outro lado, para efeito de estudos biofísicos e estruturais a exclusão é também uma técnica utilizada para garantir a homogeneidade estrutural da amostra. Esta etapa da purificação resultou em apenas um pico, como mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Cromatograma obtido a partir da purificação da β -1,3-1,4-glicanase por cromatografia de exclusão molecular em Superdex 75 16/60. **Azul**: Absorbância medida a 280 nm, **Vermelho**: Frações da eluição, **Preto**: Volume eluído.



Em seguida, alíquotas das frações eluídas do pico de maior intensidade (31, 32, 33, 35, 37, 39, 40, 43 e 45) foram aplicadas em gel desnaturante SDS-PAGE (13%) para verificar a pureza da proteína após a última etapa de purificação (Figura 9).

Figura 9 - Gel desnaturante de poliácridamida SDS-PAGE (13%) obtido após purificação por exclusão molecular. 31- 45: alíquotas das frações eluídas. MM: marcador de massa molecular (*Fermentas*) (kDa). Liq. Conc.: Liquenase pura e concentrada.

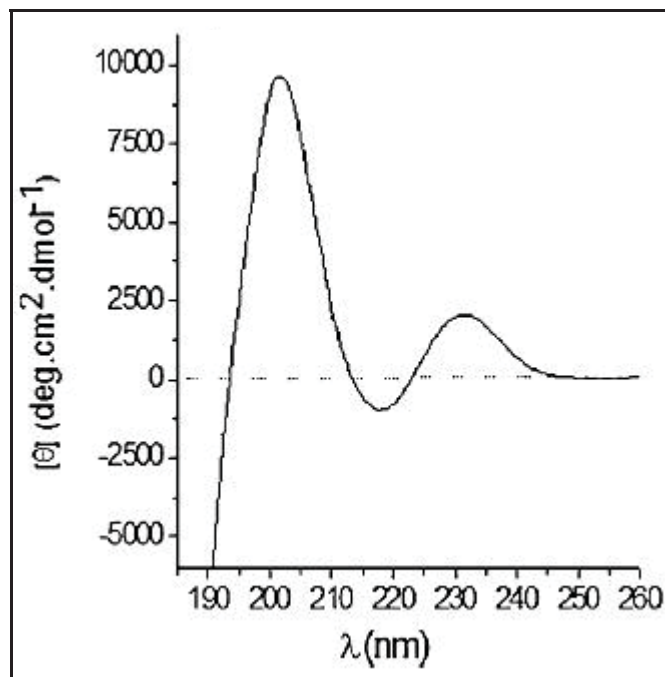


Desta forma, é possível verificar que após dois passos de purificação a proteína encontra-se em elevado grau de pureza como visualizado no gel acima. Posteriormente, as frações do pico de maior intensidade foram coletadas e concentradas para um volume menor.

5.2. Dicroísmo circular – CD

Após a purificação, a proteína β -1,3-1,4-glicanase foi analisada por dicroísmo circular, com o intuito de verificar o conteúdo de estrutura secundária da amostra. Desta forma, o espectro mostrou um pico positivo em 200 nm e um pico negativo na faixa de 215-220 nm, como mostrado na Figura 10, o que indica que a proteína possui estrutura predominante de folhas- β .

Figura 10 - Espectro CD na região do UV distante da proteína β -1,3-1,4-glicanase em 10 mM tampão fosfato pH 6,0.



Além disso, um pico positivo foi observado na faixa de 230 nm e a análise da estrutura cristalográfica, como discutido posteriormente, mostrou que a fenda de ligação ao substrato é rica em resíduos de aminoácidos aromáticos (Trp). As distâncias e orientações desses resíduos aromáticos estão dentro das restrições do acoplamento eletrônico e foi sugerido então que a banda observada em 230 nm é derivada das transições Bb desses resíduos de Trp (Grishina e Woody, 1994). Uma banda similar foi observada por uma β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus macerans* (Hahn et al., 1995).

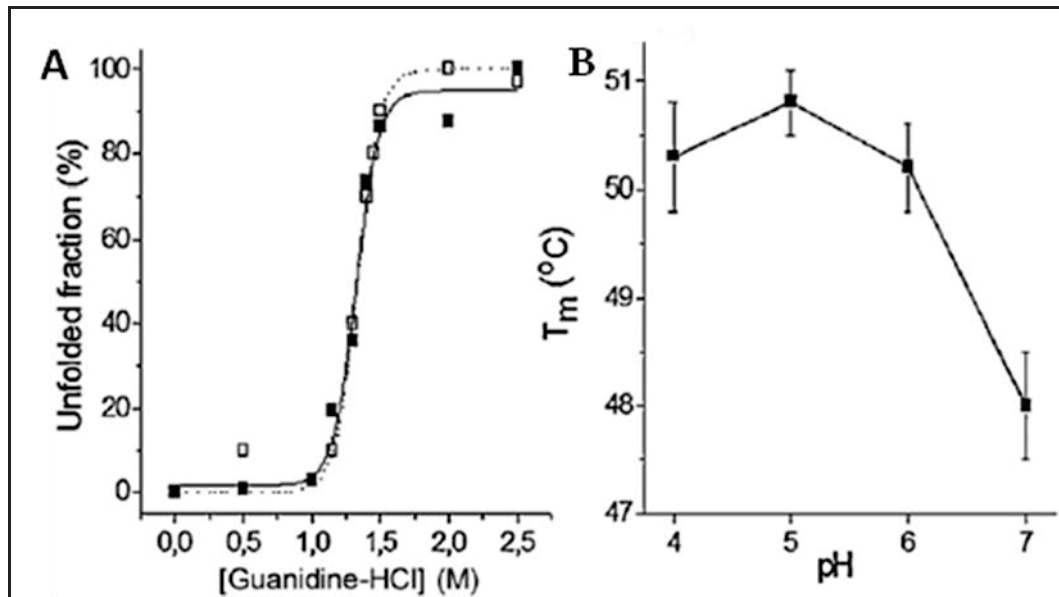
5.2.1. Desnaturação Química (CD e Fluorescência) e Térmica

Os espectros de CD em UV distante (190 - 260 nm) foram realizados para analisar a estabilidade térmica e química, frente à variação de temperatura (20°C a 90°C) e a variação da concentração de cloreto de guanidina (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 M).

As curvas de desnaturação química da enzima medidas por CD e ITFE possuem perfis muito semelhantes (Figura 11A), mostrando que as transições nas estruturas secundária e terciária são concomitantes e que apresentaram um formato sigmoideal, que por sua vez indica uma transição cooperativa, com a perda da estrutura secundária.

Com relação aos testes de desnaturação térmica em diferentes pHs, revelaram que as T_{Ms} , ou seja, a temperatura na qual 50% das moléculas estão desnoveladas em solução, variou de um mínimo de 48°C em pH 7 até um máximo de aproximadamente 51°C em pH 5, como mostrado na Figura 11B. A reversibilidade da desnaturação térmica foi verificada pelo resfriamento da amostra desnaturada após aquecimento, porém foi verificado que a enzima β -1,3-1,4-glicanase não era capaz de renaturar.

Figura 11 - Espectro de CD monitorado a 218 nm (A) Desnaturação química com Guanidina monitorada por CD (■) e fluorescência (□) e o ajuste das duas curvas (sólida e pontilhada, respectivamente). *Unfolded fraction*: fração desnovelada. (B) Desnaturação térmica em diferentes pHs. T_M : Temperatura de *Melting*.



Dos resultados obtidos da desnaturação química foi possível verificar que a proteína possui baixa estabilidade na presença do agente desnaturante, com uma concentração denaturante (C_M) de 1,3 M, em ambos os experimentos (CD e ITFE), ou seja, a concentração na qual 50% das moléculas protéicas estão desnoveladas. Além disso, os dados de $\Delta G(H_2O)$ e m_D foram estimados para ambos os experimentos e os dados obtidos para energia livre do desdobramento foram respectivamente, 9,1 e 9,6 kcal.mol⁻¹ e para cooperatividade do desdobramento de 6,9 e 7,2 kcal.mol⁻¹.M⁻¹, respectivamente.

Desta forma, foi possível verificar que de acordo com a literatura, os valores obtidos para $\Delta G(H_2O)$ e m_D para β -1,3-1,4-glicanase, nos experimentos de desnaturação química, possui uma estabilidade intermediária quando comparada com as enzimas de *Bacillus amyloliquefaciens* (5 kcal.mol⁻¹) e *B. macerans* (13 kcal.mol⁻¹) (Keitel et al., 1994). Além disso, estudos mostraram que uma glicanase híbrida H (A16-M), em que o aminoácido 16 da sequência da glicanase de *B. macerans* foi substituído por uma região correspondente da enzima de *B. amyloliquefaciens* mostrou um aumento da estabilidade com $\Delta G(H_2O)$ de 14 e 15 kcal.mol⁻¹ quando complexado com íons Na⁺ e Ca²⁺, respectivamente (Keitel et al., 1994) confirmando que o *loop* N-terminal em β -1,3-1,4-glicanases, com e sem histidina, de bactérias contribuem para a termoestabilidade (Welfle et al., 1996). Por outro lado, comparações da

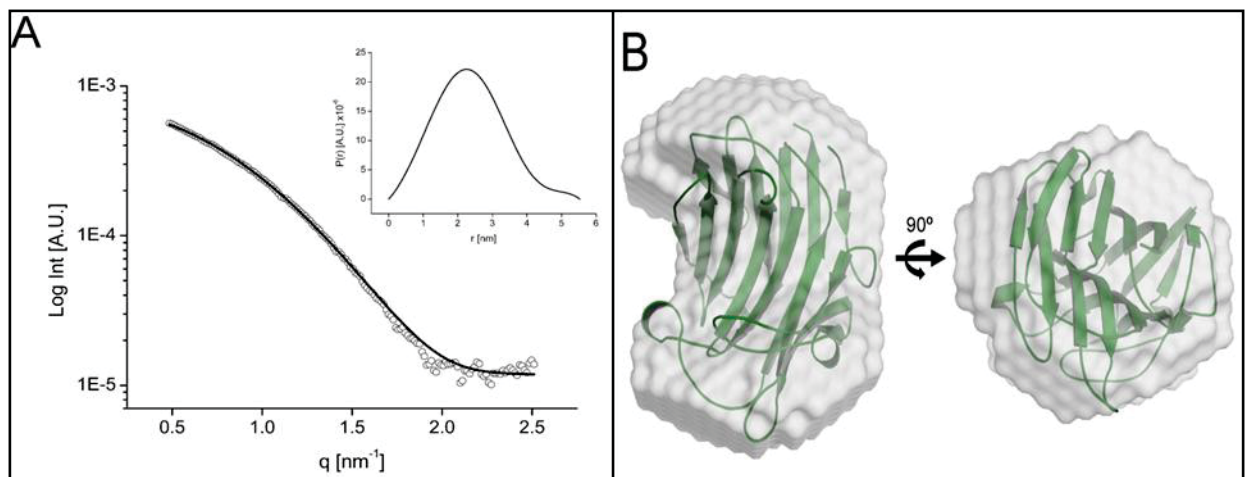
sequência de aminoácidos de β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* (Genbank: NP 391786.1), *B. amyloliquefaciens* (ABY71827.1) e *B. macerans* (AAO66468.1) mostraram que todas as três enzimas continham substituições em ambas regiões N e C-terminais (Planas, 2000), sendo que as posições dessas substituições não formam *clusters* na estrutura tridimensional, o que pode indicar que os determinantes estruturais da estabilidade térmica são dispersas por toda a proteína.

5.3. Determinação do envelope molecular de β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis*

Os experimentos de SAXS e DLS foram realizados com o intuito de obter informações a respeito do estado oligomérico e dimensões da proteína em estudo.

A análise da curva de espalhamento e a função distribuição $p(r)$ mostrou que a proteína possui uma dimensão máxima de 55 Å e raio de giro (R_g) de 17.9 ± 0.02 Å, que está de pleno acordo com os valores calculados a partir da estrutura cristalina, como será descrito em seções posteriores. Além disso, um modelo a baixa resolução da forma da proteína também foi construído como mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Análise da β -1,3-1,4 glicanase em 20 mM tampão HEPES pH 7,5, por SAXS. (A) Curva de espalhamento experimental (o) e curva de espalhamento calculado (—) do modelo. (B) Sobreposição da estrutura cristalina no envelope do modelo obtido pelos dados de SAXS.



Por outro lado, com os experimentos de DLS obteve-se o raio hidrodinâmico (r) da proteína e a polidispersividade da amostra (IP), Tab. 2.

Tabela 2 - Dados do DLS: raio hidrodinâmico (r) e polidispersividade (IP).

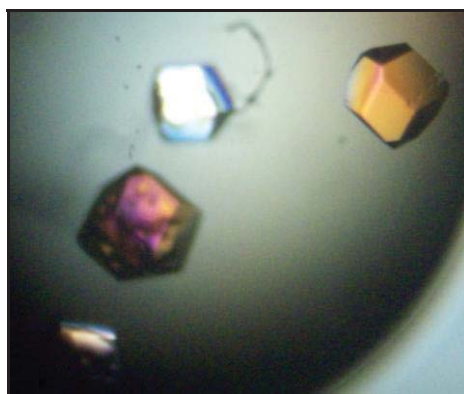
Item	r (nm)	IP (%)	Massa (%)
Pico 1	1,9	12,6	100%

Os dados obtidos da análise de DLS corroboraram com os dados obtidos no SAXS e indicaram um raio hidrodinâmico de 19 Å. Desta forma, todos os resultados indicaram um estado monomérico para a proteína β -1,3-1,4-glicanase em solução e concluiu-se que a proteína apresenta-se estruturada e monodispersa, possuindo grande potencial de cristalização.

5.4. Ensaio de cristalização, aquisição dos dados e determinação da estrutura

Cristais da β -1,3-1,4-glicanase com dimensões máximas de 200 μm e formato tetragonal cresceram na condição contendo 0,1M bis-tris propano pH 7,0, 1M de sulfato de lítio, como mostrado na Figura 12.

Figura 13 - Fotomicrografia do cristal da β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* obtido na condição com 0,1M bis-tris propano pH 7,0; 1M de sulfato de lítio.



Os cristais da β -1,3-1,4-glicanase pertencem ao grupo espacial $P4_32_12$, com parâmetros de dimensão celular de: $a = b = 103.76$, $c = 102.10$ (Å). O cristal difratou até 2,20 Å de resolução, e a estrutura foi determinada pelo método de substituição molecular,

sendo utilizada a estrutura da β -1,3-1,4-glicanase de *B. licheniformis* (PDB: 1GBG) como modelo de busca para resolução do problema de fases.

Com as etapas de refinamento o residual cristalográfico convergiu para 24.9% e Rfree 29.2%. O modelo final consiste de 238 resíduos de aminoácidos, apresentando valores de R.M.S.D. de 0,023 Å e 1,895°, para o comprimento e ângulos de ligação, respectivamente, sendo a média do fator de temperatura de 37.9 Å², Tabela 3. Todos os resíduos foram encontrados na região permitida do gráfico de Ramachandran, com 98,1% dos resíduos posicionados na região favorável do gráfico.

Tabela 3- Estatística do processamento de dados e refinamento cristalográfico.

<i>Coleção de dados</i>	
Fonte de radiação	LNLS – W01B-MX2
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1.458
Detector	MarCCD 225 mm
Grupo especial	<i>P</i> ₄ <i>3</i> <i>2</i> <i>1</i> <i>2</i>
Parâmetros da célula unitária (Å, °)	a = b = 103.76, c = 102.10
Resolução (Å)	2.20 (2.28-2.20)
Nº reflexões observadas	81641
Nº reflexões únicas	27968 (2582)
Completeza (%)	96.6 (90.9)
Multiplicidade	3.1 (2.6)
R _{merge} (%)	7.7 (37.2)
I/σ(I)	13.2 (2.6)
<i>Refinamento</i>	
R _{factor} /R _{free}	24.9/29.2
Média do fator B (Å ²)	37.9
R.M.S.D. do comprimento de ligação de átomos ideais (Å)	0.023
R.M.S.D. do ângulo de ligação de átomos ideais (°)	1.895
<i>Ramachandran Plot (Molprobit)</i>	
Regiões Favoráveis (%)	98.1
Regiões Permitidas (%)	1.9
Regiões não-permitidas (%)	0
Código PDB	3O5S

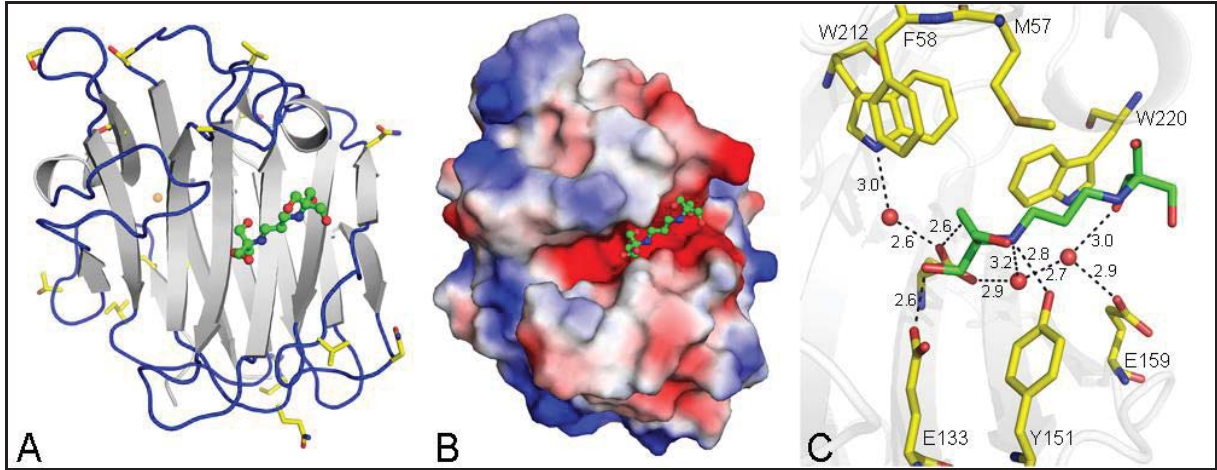
5.5. Descrição da estrutura

A estrutura da proteína é constituída por duas curvaturas: folhas- β antiparalelas e justapostas, consistindo de 7 e 8 fitas, respectivamente. Essas folhas- β encontram-se arranjadas de modo a formar um domínio molecular compacto, no formato concavo, com amplo canal de ligação ao substrato (Figura 14A). O sítio ativo é composto por um canal estendido, sendo a entrada do canal constituído por *loops* superfícies e hélices- α , enquanto a base do canal é formada por folhas- β .

Como esperado para hidrolases glicosídicas, o sítio ativo de β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* apresenta um canal carregado negativamente, cercado por resíduos aromáticos (Figura 14B). Uma molécula de bis-tris-propano foi encontrada na fenda do sítio ativo, formando ligações de hidrogênio com o nucleófilo Glu133 (2,62Å), o catalisador ácido Glu137 (2,56Å), Tyr151 (2,83Å) e moléculas de água mediando interações com Asn210, Asn56, Asn149, Gln147 e Glu159 (Figura 14C). Do lado oposto do sítio ativo, um íon de cálcio, Figura 14A, foi coordenado por átomos de oxigênio no *backbone* da carbonila por Pro37, Gly73, Asp235, um oxigênio carboxilado da Asp235 e duas moléculas de água, como observado previamente na proteína homóloga de *B. licheniformis* (Han et al., 1995). Esses aminoácidos estão localizados no *loop* β -1 e β -2, *loop* β -3 e β -4 e na fita- β 15, mostrando que o efeito de estabilização do cálcio é devido ao cross-linking dessa região.

Superposições da estrutura de β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* com a proteína ortóloga de *B. licheniformis* indicou uma similaridade no arranjo tridimensional, resultando num R.M.S.D. de cadeia de 0,38 Å. Por outro lado, essas duas proteínas possuem uma identidade de resíduos de aminoácidos de 91%. Surpreendentemente, os resíduos Cys60 e Cys89 não formam pontes dissulfeto na estrutura de *B. subtilis*, apesar de agentes não redutores terem sido usados durante processo de purificação da proteína e cristalização

Figura 14 - Estrutura cristalina da β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis*. **(A)** Representação em *cartoon* da estrutura mostrando resíduos diferentes da proteína homóloga de *B. licheniformis* em amarelo, molécula de bis-tris-propano em verde e íon cálcio em vermelho. **(B)** Superfície eletrostática colorida de acordo com a carga, vermelha (-) e azul (+). **(C)** Canal do sítio ativo mostrando interações entre a molécula de bis-tris-propano (verde), resíduos de proteína (amarelo) e moléculas de água (vermelho).



CAPÍTULO 2

Este capítulo tem por objetivo descrever de forma detalhada os estudos biofísicos e estruturais (procedimentos experimentais e resultados) realizados com a proteína α -L-arabinofuranosidase de *Thermotoga petrophila* RKU-1, publicado na revista *Protein Science*.

Structure of a novel thermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1

Souza, T. A. C. B.¹; Santos, C. R.¹; **Souza, A. R.**² Oldiges, D. O.¹; Ruller, R.³; Prade, R. A.⁴; Squina, F. M.³; Murakami, M. T.¹ *Protein Science*, 20 (2011) 1632-1637

1-Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil; **2**- Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE); **3**-Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil; **4**-Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma.

4(B).PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Expressão e extração da α -L-arabinofuranosidase da fração celular (lise)

Para expressão da proteína α -L-arabinofuranosidase de *T. petrophila* RKU-1, foram seguidos os protocolos descritos em Santos et al., 2011.

Materiais e métodos:

- DNA plasmidial de pET28a/TpAraF,
- Linhagens BL21(DE3)DSlyD-PRARE2 competentes de *E. coli*,
- Antibióticos Canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Cloranfenicol ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$),
- Eletroporador – *GenePulser* (Biorad) – 2,5 mV e 10 F,
- Placas de petri com meio LB-ágar estéreis,
- Frascos de 2L para expressão com meio LB estéril,
- IPTG (1M),
- Tampão de lise: 20mM fosfato de sódio, pH 7,5, 500mM NaCl, 5 mM imidazol, 1mM benzamidina e 5mM PMSF
- Lisozima (1M)
- Inibidor de protease
- Sonicador *VirSonic*

O DNA plasmidial de pET28a/TpAraF contendo o gene de interesse foi transformado em células BL21(DE3)DSlyD-PRARE2 de *E. coli*, pela técnica de eletroporação, como descrito no item 4.2.(A). O produto da transformação foi plaqueado em meio LB-ágar com antibióticos Canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Cloranfenicol ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e mantidos em *ON* a 37°C para crescimento das células transformadas.

Posteriormente, uma colônia transformada contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em frascos erlenmeyers com 100 mL de meio LB autoclavado, mais 100 μ L de antibiótico canamicina e de cloranfenicol. Esse foi mantido em *ON* a 37°C e 200 rpm. A super expressão foi feita com 4 L de meio LB distribuídos em 8 erlenmeyers de 2 L, com 500 ml de LB cada, mais os antibióticos descritos acima e 3% (v/v) do inóculo. Os frascos de expressão foram mantidos em shaker a 37°C, sob agitação de 200 rpm até que a absorbância medida a 600 nm atingisse valor na faixa de 0,8 - 1,0. Em seguida, a expressão foi induzida com indutor artificial de expressão, IPTG para concentração final de 0,5 mM, e mantidos por 4 h a 30°C.

Após a indução por período de quatro horas, a cultura foi centrifugada a 4000 $\times g$, por quinze minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, toda a fração celular foi coletada e ressuspensa no tampão de lise, citado acima. Após ressuspensão, foi adicionado lisozima (5 μ L.mL⁻¹ de tampão) ao volume de células, e esta foi mantida por 30 min em banho de gelo para posterior sonicação, em sonicador *VirSonic*, numa amplitude de 60%, com 15 s de sonicação e intervalos de parada de 30s para ruptura das células e consequentemente, liberação da proteína de interesse. Desta forma, a solução resultante foi centrifugada a 10000 $\times g$ a 4°C, por 35 min para precipitação das células e em seguida, o sobrenadante foi utilizado para a etapa de purificação, descrita a seguir.

4.2. Purificação da α -L-arabinofuranosidase

Para purificação da proteína α -L-arabinofuranosidase de *T. petrophila* RKU-1, foram seguidos os protocolos descritos em Santos et al., 2011.

Materiais e métodos:

- FPLC (*GE Pharmacia AKTA Purifier*),

- Coluna Ni-NTA (1ml),
- Coluna superdex 200 (16/60),
- Soluções tampão para afinidade:

Tampão A: 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM benzamidina e 5 mM PMSF; **Tampão B:** 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 1 mM benzamidine e 5 mM PMSF

- Solução tampão para exclusão molecular: 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, com 150 mM de NaCl, 1 mM benzamidine e 5 mM PMSF.

A purificação da TpAraF foi feita em sistema FPLC, sob baixa pressão, e processou-se em duas etapas. O primeiro passo de purificação foi realizado por meio da técnica de cromatografia de afinidade, como descrito no item 4.3.1.(A), em coluna Ni-NTA (1mL). Inicialmente, a remoção das proteínas não adsorvidas a coluna foi realizada num fluxo de 1 mL.min⁻¹ em Tampão A, em seguida, a eluição das proteínas adsorvidas processou-se sob gradiente linear de imidazol (Tampão B), sob mesmo fluxo. O segundo passo de purificação foi feito por meio da técnica de cromatografia por exclusão molecular, como descrito no item 4.3.2.(A), em solução tampão de fosfato, como na etapa anterior, porém com 150 mM de NaCl, em coluna superdex 200 (16/60), num fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, a temperatura ambiente.

Após purificação, a proteína foi posteriormente analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (13%), como descrito no item 4.4.(A), dialisadas, como descrito no item 1.6.(A), utilizando Membrana de diálise 10-12 kDa, *Spectra/Por (Spectrum)* em 20 mM tampão Fosfato de sódio, pH 7,5 e posteriormente quantificadas, como descrito no item 4.5.(A), utilizando o coeficiente de extinção molar teórico de 94,115 M⁻¹.cm⁻¹ fornecido pelo *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>).

4.3. Cristalização, determinação da estrutura, refinamento e análise da estrutura

Materiais e métodos:

- Proteína em uma concentração de $6,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, com 150 mM NaCl,
- Linha W01B-MX2, no laboratório de Luz Síncrotron (LNLS).

Os ensaios de cristalização foram iniciados em estudo anterior, descrito por Santos et al. (2011) utilizando os kits iniciais de cristalização: *Hampton Research* (SaltRX e Crystal Screens I e II), *Emerald BioSystems* (Precipitant Synergy e Wizard I e II) e *Qiagen/Nextal* (PACT e JCSG+), como descrito no item 4.11.(A), sendo 544 condições testadas. A técnica utilizada foi a de difusão de vapor em gota sentada, como descrito no item 4.11.(A), com a proteína em uma concentração de $6,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, com 150 mM NaCl. Para isto, 1 μL de proteína e 1 μL da solução do reservatório foram pipetadas sobre a lamínula. Os dados de difração de raios X foram coletados como descrito no item 4.12.(A), utilizando radiação síncrotron, na linha W01B-MX2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil. Posteriormente, os dados foram indexados, integrados, reduzidos e escalonados usando o pacote HKL2000.

A estrutura de TpAraF foi resolvido pelo método de substituição molecular, como descrito no item 4.13.(A), usando o programa BALBES e as coordenadas atômicas de uma α -L-arabinofuranosidase de *Geobacillus stearothermophilus* T6 (PDB ID: 1PZ3).

O modelo foi examinado e ajustado manualmente baseado no mapa de densidade eletrônica $2\text{Fo}-\text{Fc}$ e $\text{Fo}-\text{Fc}$, usando programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004). O refinamento da estrutura foi realizado, como descrito no item 4.14.(A), utilizando o programa REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) e a qualidade do modelo final foi avaliada usando programa MOLPROBITY (Chen et al., 2010).

4.4. Espalhamento de raios X a baixos ângulos – SAXS

Materiais e Métodos:

- Proteína em uma concentração de $6,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, com 150 mM NaCl,
- Linha D02A – SAXS2, no laboratório e Luz Síncrotron (LNLS).

Os dados de SAXS foram obtidos na linha de luz D02A – SAXS2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil, como descrito no item 4.10.(A). A amostra de proteína a $6,7 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi preparada em 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,5, 150 mM NaCl e centrifugada a 20000 xg por 10 min. As medidas de SAXS foram feitas na temperatura ótima de catálise da TpAraF, a 65°C. Exposições de 600 s foram registradas. Espalhamento de fundo foi subtraído do padrão de espalhamento da proteína, que foi então normalizado e corrigido. Ajuste dos dados experimentais e avaliação da função de distribuição $p(r)$ foram realizados utilizando o programa GNOM (Svergun, 1992). O envelope de baixa resolução da TpAraF foi determinado usando modelagem *ab initio* como implementado no programa DAMMIN (Svergun, 1999). Um modelo médio foi gerado, a partir de várias corridas usando o conjunto de programas DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003).

4.5. Espalhamento dinâmico de luz – DLS

Os experimentos de DLS foram realizados como descrito no item 4.9.(A). O objetivo deste experimento foi verificar a homogeneidade da proteína frente ao aumento da força iônica do meio.

Materiais e Métodos:

- Proteína TpAraF (2 mg.mL⁻¹),
- Solução estoque NaCl (5 M).

Experimentos de DLS foram realizados com a proteína pura, numa concentração na cubeta de aproximadamente 1 mg.mL⁻¹ a 25°C, em concentrações crescentes de solução salina (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 M). Desta forma, 70 µl da mistura foi adicionada na cubeta e cem medidas foram obtidas, com 2,5 s de intervalo para cada concentração salina testada.

4.6. Dicroísmo Circular – CD

As análises de CD foram processadas assim como descrito no item 4.7.(A). Este teste foi realizado com o intuito de verificar se havia alguma alteração da estrutura secundária da proteína sob influência de elevada força iônica no meio.

Materiais e métodos:

- Amostra proteína pura (2 mg.mL⁻¹),
- Cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico,
- Solução NaCl estoque (5 M).

Inicialmente, a concentração da proteína foi ajustada para 0,2 mg.mL⁻¹, em seguida os testes de CD foram processados em diferentes concentrações salinas (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 M).

Desta forma, as condições experimentais utilizadas para obtenção dos espectros de dicroísmo circular foram: velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹, resolução de 0,5nm, intervalo de coleta de dados de 4s, na faixa de 190 nm a 260nm, com acumulações de vinte espectros, proteína pura (2 mg.mL⁻¹) em 20 mM tampão fosfato, pH 7,5 a 25°C, numa

concentração final de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a voltagem monitorada até um máximo de 700 mV. Para cada corrida, foi feito um controle, sem a proteína, e os dados do controle subtraídos do primeiro.

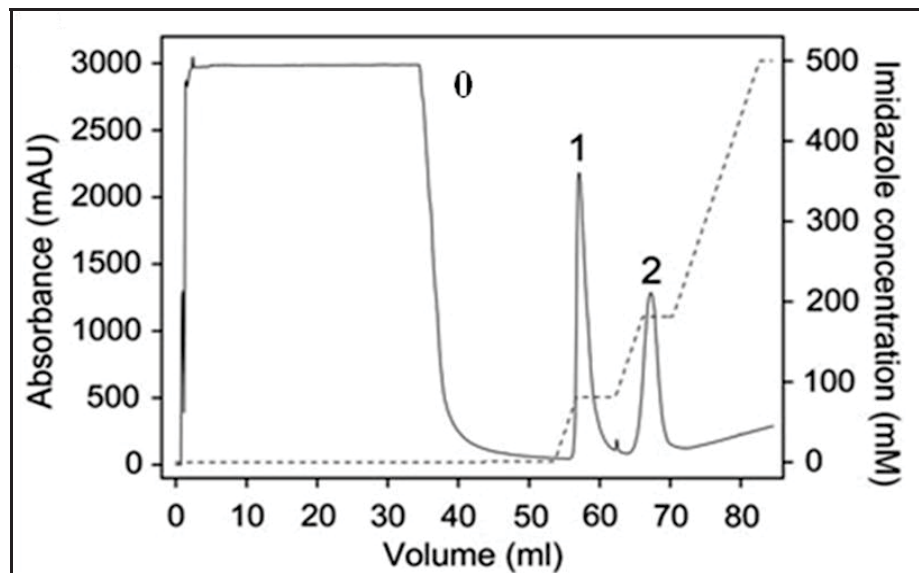
Posteriormente os dados obtidos na leitura de CD (mdeg) para cada uma das corridas foram convertidos em elipticidade molar residual (θ), como descrito no item 4.7.(A) e os valores graficados com auxílio do *software Origin 8.0*

5(B).RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação da α -L-arabinofuranosidase

Após produção da proteína em larga escala, o material obtido foi purificado para eliminação de contaminantes. Desta forma, a TpAraF foi purificada com dois passos cromatográficos. O primeiro passo de purificação (Afinidade) resultou na separação da amostra em três picos protéicos (0, 1, 2), como mostrado na Figura 14. O primeiro pico (pico 0) consiste na injeção da solução enzimática na coluna, lavagem da coluna com 5 volumes de coluna e posterior eluição das proteínas que não se ligaram a resina. Em seguida, iniciou-se o gradiente de imidazol para eluição das proteínas que se adsorveram com menor afinidade (pico 1) e aquelas que se adsorveram com maior afinidade a resina (pico 2). A TpAraF foi eluída no segundo pico. A Figura 15 ilustra o cromatograma obtido após cromatografia de afinidade.

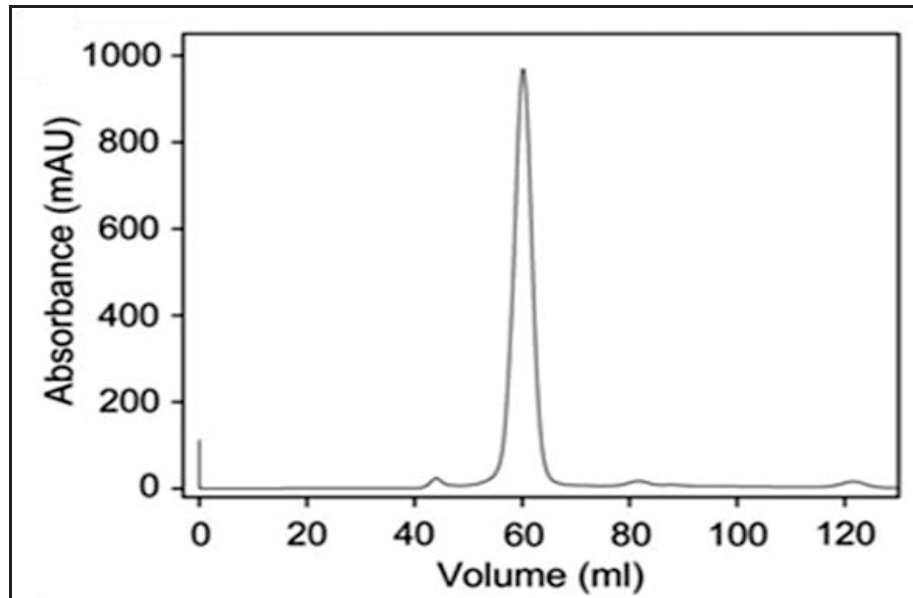
Figura 15 - Cromatograma obtido a partir da purificação da TpAraF por Cromatografia de Afinidade em coluna *HiTrap Chelating HP* 1 ml. (—) Absorbância medida a 280 nm, (---) Gradiente linear de imidazol. (0, 1, 2) picos da eluição.



Em seguida, todas as frações correspondentes ao segundo pico foram concentradas até volume menor (1 mL) e encaminhadas ao segundo passo de purificação. Este processou-se em coluna Superdex 200 16/60. As frações foram eluídas em 20 mM tampão fosfato de sódio, pH

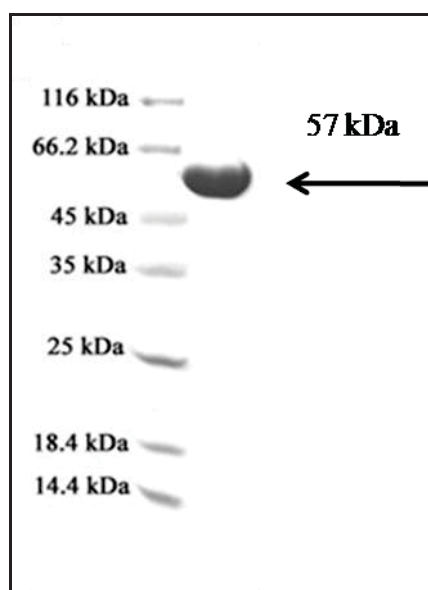
7,5 e 150 mM NaCl, num fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e um pico mais intenso foi detectado no cromatograma, Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma obtido a partir da purificação da TpAraf por cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 16/60. (—): Absorbância medida a 280 nm.



Após execução dos passos estabelecidos por Santos e colaboradores (2011), as frações do pico mais intenso foram coletadas e uma alíquota da proteína pura foi utilizada para detecção da pureza da TpAraf em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 13% (Figura 17).

Figura 17 - Gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) obtido a partir de dois passos de purificação da TpAraf, sendo a linha 1 referente ao marcador de massa molecular (*Fermentas*) (kDa) e a linha 2 a TpAraf.

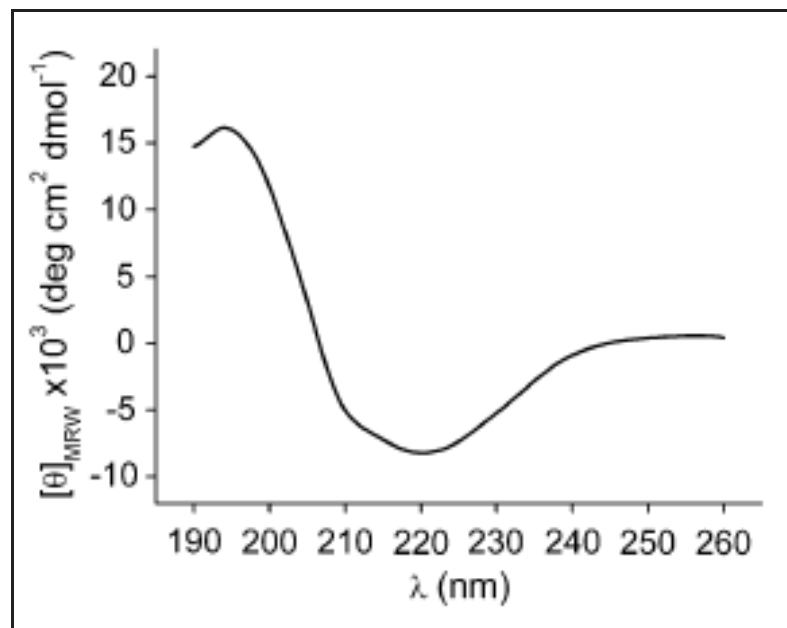


Desta forma, é possível verificar que após dois passos de purificação a proteína encontra-se em elevado grau de pureza. Posteriormente, a solução protéica foi concentrada para um volume menor e quantificada.

Em seguida, uma alíquota da TpAraF pura, a 3 μM em 10 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,0 foi utilizada para certificar a cerca do conteúdo de estrutura secundária nativa da proteína em solução em experimento de CD por deconvolução espectral, usando *Dichro Web Server*, numa faixa do UV distante (190-260 nm) em cubeta de 1 mm, como descrito por Santos et al., 2011.

Assim, dois picos característicos foram detectados, um positivo em 194 nm e um negativo em 220 nm, como mostrado na Figura 18, abaixo. Os dados resultaram em uma estrutura secundária contendo 19% de hélice- α , 33% de folha- β e 48% de *random coil*.

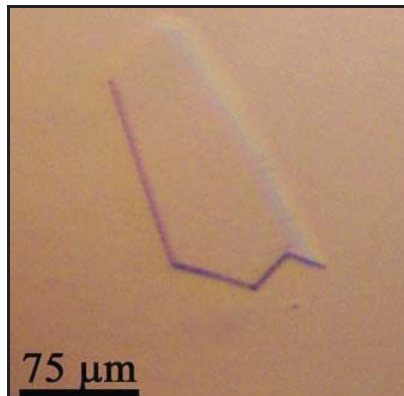
Figura 18 - Espectro de CD na região do UV distante da proteína recombinante TpAraF em tampão Fosfato de sódio pH 7,0.



5.2. Cristalização, aquisição dos dados e determinação da estrutura

Após etapa de refinamento, foram obtidos cristais de TpAraF em 100 mM bis-Tris pH 5,5, 200 mM acetato de amônio, 40% (v/v) MPD e 1% (v/v) dioxano, com dimensões aproximadas de 150 x 75 x 20 μm , como mostrado na Figura 19.

Figura 19 - Fotomicrografia do cristal da TpAraF de *Thermotoga petrophila* RKU-1, em 100 mM bis-Tris pH 5,5, 200 mM acetato de amônio, 40% (v/v) MPD e 1% (v/v) dioxano.



Dados de difração mostraram que os cristais de TpAraF pertencem ao grupo espacial $P2_1$ com parâmetros da célula unitária de $a = 105,95$, $b = 187,29$ e $c = 180,87$ \AA , e $\beta = 90, 87^\circ$. O cristal difratou até 3,1 \AA de resolução e a estrutura determinada pelo método de substituição molecular, utilizando as coordenadas atômicas da α -L-arabinofuranosidase de *G. stearothermophilus* T6 (PDB ID: 1PZ3) para resolução do problema de fases.

Com as etapas de refinamento o residual cristalográfico convergiu para 19,5% e R_{free} 26,8%. O modelo final apresenta uma excelente estereoquímica, com valores de R.M.S.D. de 0,010 \AA e $1,389^\circ$, para o comprimento e ângulos de ligação, respectivamente, sendo a média do fator de temperatura de 45,6 \AA^2 (Tabela 4). A maioria dos resíduos (90,6%) foi encontrado na região favorável do gráfico de Ramachandran, 8% posicionados na região permitida e o residual de 1,3% na região não permitida do diagrama de Ramachandran.

Tabela 4 - Estatística do processamento de dados e refinamento cristalográfico.

<i>Coleção de dados</i>	
Fonte de radiação	W01B-MX2, LNLS
Comprimento de onda (Å)	1,459
Grupo espacial	P 2 ₁
Parâmetros da célula unitária (Å , °)	a = 105,95; b = 187,29; c = 180,87; β = 90,87
Resolução (Å)	29.87–3.10 (3.15–3.10)
Número de reflexões únicas	137,752 (13,341)
Multiplicidade	3,1 (2,9)
Completeza (%)	97,0 (89,5)
<I/σ>	7,4(2,4)
R _{merge} (%)	12,4 (45,4)
Coefficiente de Matthews	(Å ³ .Da ⁻¹) 2,7
Solvente correspondente (%)	54,7
<i>Refinamento do modelo</i>	
Código PDB	3S2C
Número de cadeias na proteína	12
Número de moléculas de água	433
Rfator (%)	19,5
Rfree (%)	26,8
R.M.S.D. comprimento da ligação ideal (Å)	0.010
R.M.S.D. do ângulo ideal (°)	1,389
B-factor (Å ²)	45.6
<i>Diagrama de Ramachandran</i>	
Regiões favoráveis (%)	90.6
Regiões permitidas (%)	8.0
Regiões não permitidas (%)	1,3

5.3. Descrição da estrutura cristalográfica

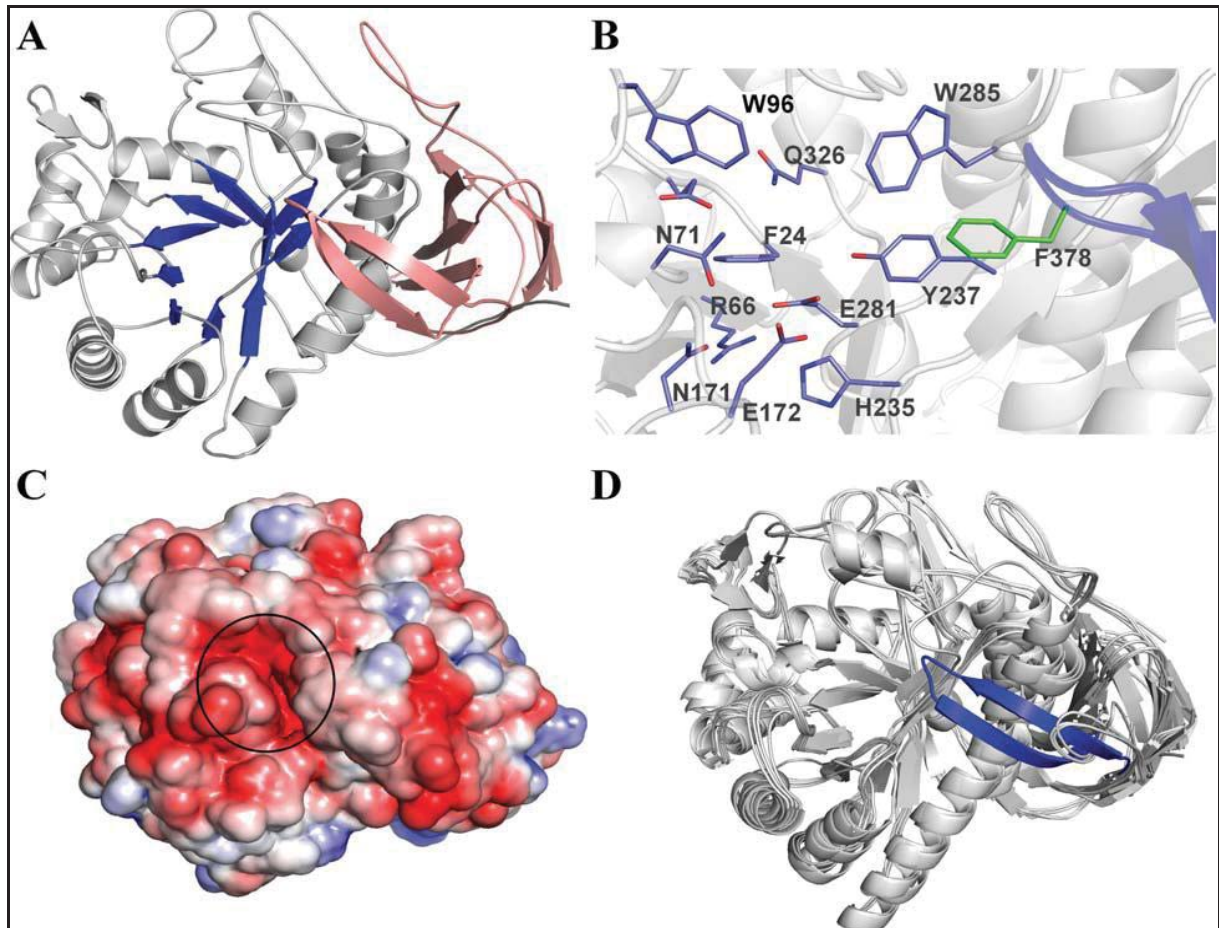
A estrutura de TpAraF consiste de 484 resíduos de aminoácidos, distribuídos em uma estrutura quaternária hexamérica com total de 12 cadeias, sendo seis posicionadas em cada hexâmero e enoveladas em dois domínios: um domínio catalítico com arquitetura barril (α/β) e um domínio C-terminal do tipo β -sandwich (Figura 20A).

Entre as ABFases da família GH51 com estrutura tridimensional conhecida (Hovel et al., 2003; Taylor et al., 2006; Paes et al., 2008), o domínio catalítico na forma de barril (α/β) (resíduos 1-359) é conservado. Os resíduos chave no sítio ativo das ABFases (GH51) foram determinados (Hovel et al., 2003) e esses resíduos (F24, E26, R66, N71, W96, N171, H235,

Y237, E281, W285 e Q326, de acordo com a numeração de TpAraF) são conservados em TpAraF (Figura 20B).

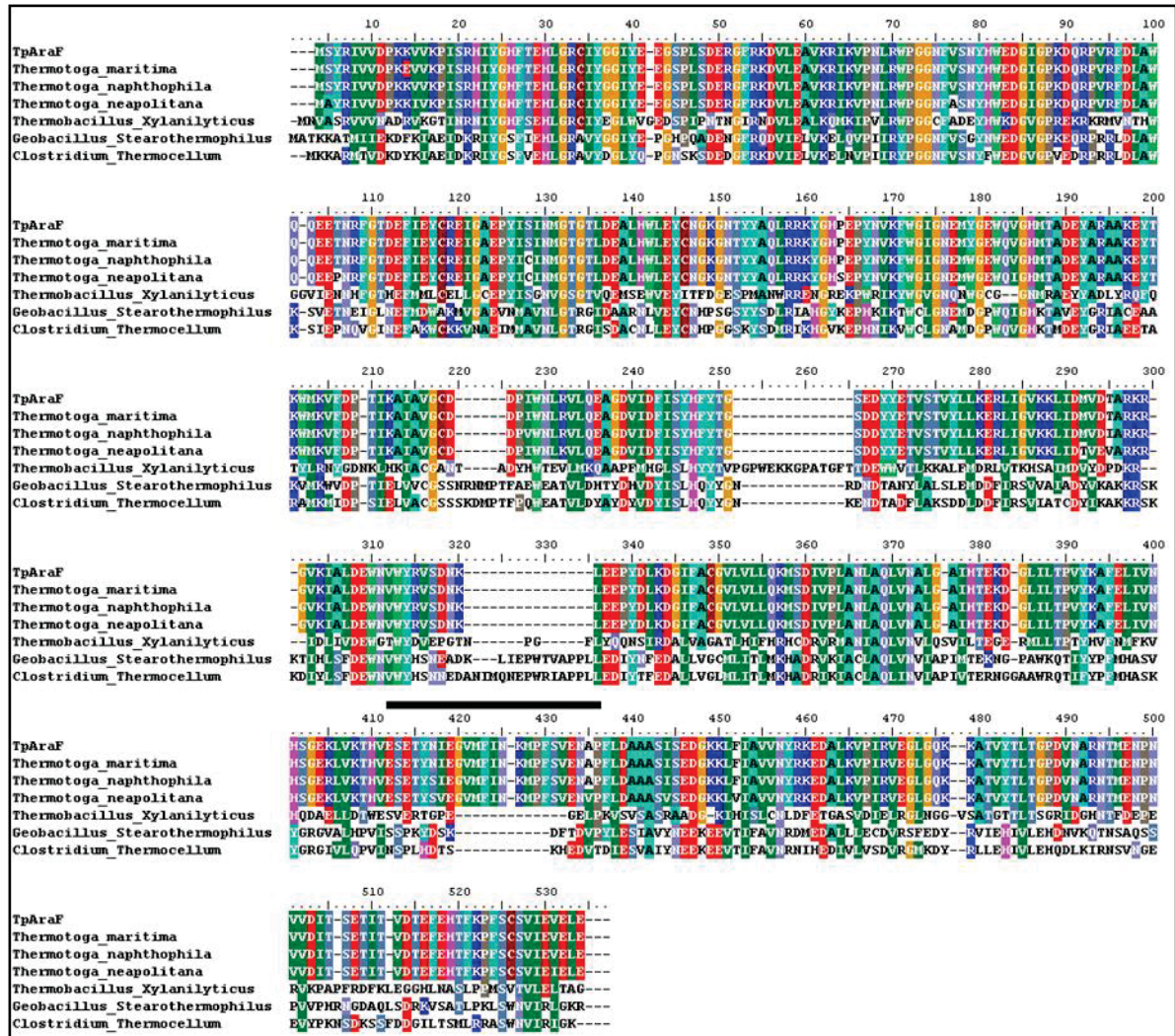
A análise do potencial eletrostático da superfície mostrou uma superfície carregada negativamente ao redor do sítio ativo, Figura 20(C), que é altamente povoada por resíduos ácidos e é estritamente necessária para o reconhecimento do substrato. Apesar da alta conservação do domínio catalítico e dos resíduos envolvidos na catálise, TpAraF contém um motivo β -*hairpin* inserido entre as fitas β 1 e β 2 do domínio acessório que não é observado em outras ABFases da família GH51, com estruturas conhecidas, Figura 20(D). Este motivo é estabilizado por contatos hidrofóbicos com domínio catalítico parental e modifica o sítio ativo em volume e formato. Desta forma, este longo motivo β -*hairpin* posiciona o resíduo F378 na entrada do sítio ativo formando com outros resíduos aromáticos (W96, Y174, W177, Y237 e W285) o sítio de ligação ao carboidrato, Figura 20(B).

Figure 20 - Estrutura de uma α -L-arabinofuranosidase de *T. petrophila* (TpAraF). (A) Representação em desenho dos dois domínios da TpAraF, que consiste de um barril (α/β) (cinza, folhas- β em azul) fusionados a um domínio C-terminal com dobramento na forma de β -sandwich (em rosa). (B) Resíduos do sítio ativo da TpAraF (átomos de carbono em azul), destacando a presença de resíduos F378 (átomos de carbono em verde) do domínio acessório. (C) Potencial da superfície eletrostática de TpAraF. As cores em vermelho, branco e azul indicam cargas superficiais negativa, neutra e positiva. O círculo indica o bolsão do sítio ativo. (D) Superposição da estrutura de TpAraF com outras AraFs da família GH51. O único motivo β -hairpin é mostrado em azul.



Por fim, o alinhamento da sequência da TpAraF com outras três ABFases da família GH51 de *G. stearothermophilus* (PDB ID: 1PZ3), *C. Thermocellum* (PDB ID: 2C7F) e *T. xylanolyticus* (PDB ID: 2VRK) foi feito com auxílio do programa Bioedit e mostrou que este motivo β -hairpin é único para o gênero *Thermotoga* sugerindo uma característica exclusiva nestes organismos (Figura 21).

Figura 21 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de ABFases de diferentes espécies mostrando que o motivo β -hairpin é único para o gênero de *Thermotoga*. ██████████ (sequência β -wing).



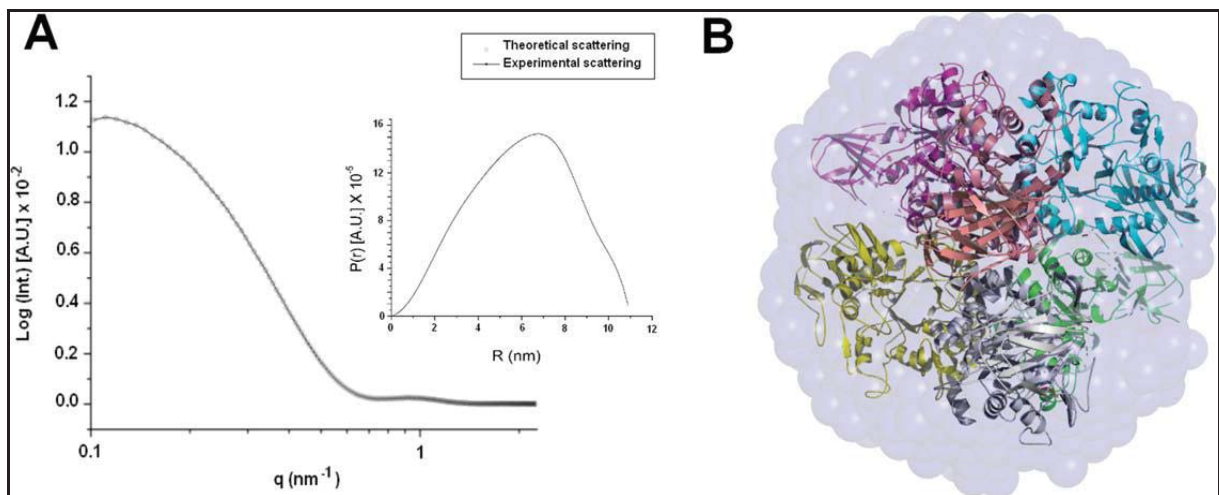
5.4. SAXS

As medidas de SAXS foram realizadas com o intuito de obter informações detalhadas a cerca da dimensão da proteína em solução e posterior comparação com os dados obtidos por cristalografia. Além disso, as medidas de SAXS também foram realizadas para avaliar a oligomerização da proteína à temperatura ideal para catálise.

A curva de espalhamento e a função distribuição $p(r)$ estão exibidas na Figura 22, e foram calculados pelo GNOM (Svergun, 1992). Além disso, um modelo de baixa resolução da forma da proteína também foi determinado.

Estas análises revelaram que a proteína possui raio R_g de $4,55 \pm 0,01$ nm e dimensão de 117 Å de diâmetro, que corroborou com os dados obtidos por cristalografia. Além disso, o envelope de baixa resolução de TpAraF foi determinado usando o programa DAMMIN (Svergun, 1999), como mostrado na Figura 22 (B). Uma média do modelo foi gerada a partir de várias corridas usando o conjunto de programas DAMAVER (Volkov e Svergun 2003). Desta forma, a curva de espalhamento teórica calculada a partir de dados cristalográficos, obtidas com auxílio do programa CRY SOL (Svergun et al., 1995) mostrou ser muito similar com os dados experimentais obtidos a partir de SAXS, Figura 22 (A), apoiando a hipótese do hexâmero observado por dados de cristalografia (Hovel et al., 2003; Taylor et al., 2006; Paes et al., 2008).

Figura 22 - Oligomerização de TpAraF verificada por SAXS. (A) Curva de espalhamento e função de distribuição $p(r)$ a 65°C. (B) Representação em desenho do hexâmero cristalográfico (em colorido) sobreposto no envelope de SAXS (superfície transparente).



A estrutura da TpAraF pode ser vista como um dímero de trimeros, similar ao que foi visto por outras ABFases (GH51) (Hovel et al., 2003; Taylor et al., 2006; Paes et al., 2008). Cada subunidade faz múltiplos contatos intermoleculares com outras três subunidades do hexâmero, que por sua vez é a base estrutural para a elevada tolerância térmica da unidade biológica (hexâmero). A somatória de todas as interfaces intermoleculares resultam em uma área de 2.400 \AA^2 que é coerente com a estabilidade experimental observada por Santos et al. (2011), em experimento de estabilidade térmica. Neste foi verificado que a TpAraF possui temperatura ótima de 65°C para atividade enzimática e demonstrou ser muito estável com aproximadamente 100% da sua atividade residual após 20 h a 90°C. Desta forma, os resíduos

chave envolvidos na estabilização do hexâmero são H77, E99, D132, N146, Y148, E176, H181, E186, R189, K192, E193, K196, E255, K261, K262 e K363.

Embora as interfaces intermoleculares sejam conservadas entre as ABFases da família GH51 de *G. stearothermophilus*, *T. xylanilyticus*, *C. Thermocellum*, os resíduos envolvidos na oligomerização de TpAraF são predominantemente polares e participam na formação de pontes de hidrogênio e pontes salinas, que por sua vez são consideradas essenciais para a estabilidade térmica.

5.5. Verificação da estabilidade da proteína por CD e DLS

Com o intuito de investigar a estabilidade da TpAraF frente a elevada força iônica do meio, dois experimentos foram realizados: CD e DLS em diferentes concentrações salinas (0 a 3 M) de NaCl. A Figura 23 ilustra o gráfico obtido da análise por CD e a Tabela 5 mostra os dados obtidos da análise de DLS para as mesmas condições testadas.

Figura 23 - Espectro de UV distante para a TpAraF em diferentes concentrações salinas (0 - 3 M) NaCl.

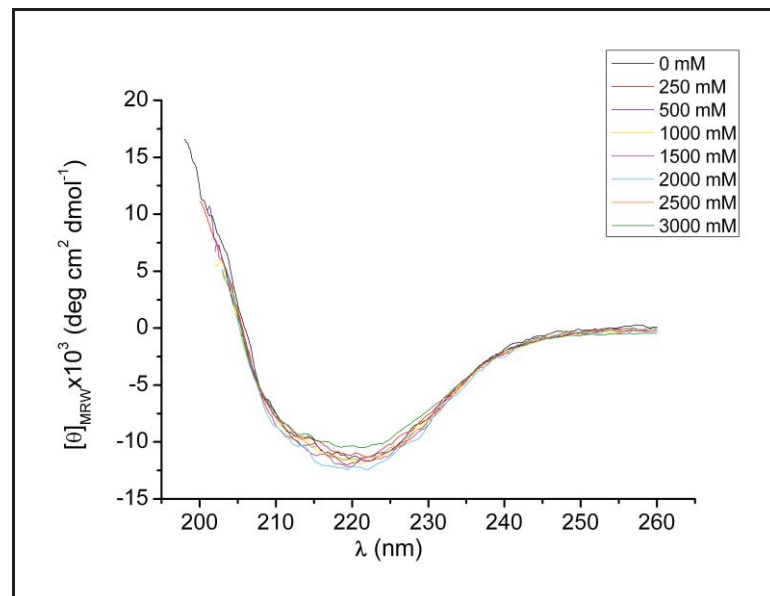


Tabela 5 - Influência da concentração salina na alteração da homogeneidade estrutural da TpAraF.

Concentrações NaCl testadas (M)	Alteração r (nm) e IP(%)
0,25	Não houve
0,5	Não houve
1,0	Não houve
1,5	Não houve
2,0	Não houve
2,5	Não houve
3,0	Não houve

Tais resultados mostraram que a proteína manteve-se estável mesmo em condições extremas de elevada força iônica. Assim, não houve nenhuma alteração da estrutura secundária e quaternária e que assim apesar da contribuição das interações eletrostáticas na oligomerização, a elevada concentração salina não foi o suficiente para promover a desestabilização do hexâmero.

Estes resultados sugerem que o hexâmero de TpAraF é biologicamente relevante, primeiramente observado na estrutura cristalina e depois confirmado em experimentos de SAXS, CD e DLS, pois manteve-se intacto e ativo ainda em condições extremas, indicando que o hexâmero é de ocorrência natural e necessário para a função enzimática adequada.

6. CONCLUSÕES

Como relação a primeira proteína de estudo, a estrutura cristalográfica da β -1,3-1,4-glicanase de *B. subtilis* 168 foi determinada a 2,20 Å de resolução e revelou que sua estrutura é composta de um domínio molecular compacto constituído predominantemente de folhas- β , como indicado no espectro de CD, com dois picos característicos deste tipo de estrutura secundária. Esta estrutura canônica exibe arquitetura conhecida como *jelly-roll*, típica para as hidrolases glicosídicas da família GH16. Os resultados dos estudos biofísicos realizados, SAXS e DLS, corroboraram indicando um estado monomérico para a proteína β -1,3-1,4-glicanase em solução.

O estudo de desnaturação térmica da proteína monitorado por CD, revelou que a mesma possui pH ótimo igual a 5 com T_M de 51°C. Estes valores estão próximos as condições ótimas de hidrólise em pH igual a 6 e temperatura igual a 50°C. Por outro lado, o estudo de

desnaturação química monitorado por CD e fluorescência, revelou que a proteína possui uma C_M (concentração denaturante) de 1,3 M de cloreto de guanidina, que por sua vez é uma concentração relativamente baixa. Além disso, os dados obtidos de energia livre de desnovelamento indicaram uma estabilidade intermediária para proteína de estudo.

De modo geral, conclui-se que a β -1,3-1,4-glicanase possui baixa estabilidade frente a temperaturas elevadas e embora esta tenha grande potencial biotecnológico, a reduzida termotolerância pode ser um fator limitante para processos industriais em que ocorrem a temperaturas superiores a 50°C. Desta forma, estes resultados indicam que a proteína de estudo é uma candidata para estudos de engenharia de proteínas visando aumento de estabilidade estrutural.

Com relação à segunda proteína de estudo, a estrutura cristalográfica da α -L-arabinofuranosidase de *Thermotoga petrophila* RKU-1 foi determinada a 3,1 Å de resolução e revelou que esta possui uma estrutura quaternária hexamérica. A subunidade é composta por dois domínios: um domínio catalítico na forma de barril (α/β) e um domínio C-terminal tipo β -sandwich. Além disso, foi verificado que a TpAraF possui em seu domínio acessório um motivo β -hairpin que não é comumente encontrado em outras ABFases da família GH51 com estrutura determinada. Este motivo possui um elo de contato com o domínio catalítico por meio de interações hidrofóbicas e posiciona o resíduo F378 na entrada do sítio ativo formando com outros resíduos aromáticos o sítio de ligação a carboidratos. Por alinhamento da sequência de aminoácidos da TpAraF com AraFs de outras espécies foi possível verificar que este motivo é único para o gênero *Thermotoga*, o que por sua vez determina uma característica exclusiva da espécie. No mesmo sentido, os dados da curva de espalhamento obtidos por SAXS a 65°C, corroboraram com os resultados obtidos por cristalografia, apoiando a hipótese de que a estrutura quaternária da proteína é um hexâmero.

Por fim, com relação aos motivos da estabilidade da TpAraF, os estudos de CD e DLS realizados para verificar a influência da força iônica do meio na estabilidade da proteína, mostraram que mesmo em elevadas concentrações salinas não houve alteração da estrutura secundária da proteína, assim como não houve modificação na oligomerização da mesma.

Assim, estes dados mostraram que a α -L-arabinofuranosidase de *Thermotoga petrophila* RKU-1 é altamente estável em condições extremas de temperatura e elevada concentração salina, o que é bastante importante em processos industriais. Processos realizados em temperaturas elevadas há menos riscos de contaminação e maior velocidade de

transformação dos produtos em reagentes, por exemplo, e isto é altamente desejado para proteínas com aplicações industriais. Desta forma, conclui-se que a TpAraF é uma proteína promissora para aplicação em setor industrial devido sua termoestabilidade.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, M.; PLANAS, A.; CHRISTENSEN, U. Presteady-state kinetics of Bacillus 1,3–1,4-beta-glucanase: binding and hydrolysis of a 4-methylumbelliferyl trisaccharide substrate. *Biochemical Journal*, v. 357, p. 195–202, 2001.
- ADLER, A. J.; GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods in Enzymology*, v. 27, p. 675-735, 1973.
- AKITA, M.; KAYATAMA, K.; HATADA, Y.; ITO, S.; HORIKOSHI, K. A novel β -glucanase gene from Bacillus halodurans C-125. *FEMS Microbiology Letters*, n. 248, v. 1, p. 9-15, 2005.
- ANDERSON, M. A.; STONE, B. A. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Letters*, v. 52, p. 202-207, 1975.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 719–739, 2005.
- BACHMANN, S. L.; MCCARTHY, A. J. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of Thermomonospora fusca. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 2121-30, 1991.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus Myceliophthora sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*, v. 86, p. 2273-82, 2009.
- BANG, M. L.; VILLADSEN, I.; SANDAL, T. Cloning and characterization of an endo- β -1,3(4)-glucanase and an aspartic protease from Phaffia rhodozyma CBS 6938. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. 215-222, 1999.

- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 326–338, 2001.
- BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Letters*, v. 13, p. 25-58, 1994.
- BELDMAN, G.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F.; DE RUITER, G. A.; SILIHA, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of arabinans by arabinanases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Polymers*, v. 20, p. 159-68, 1997.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BUCKERIDGE, M. S.; RAYON, C.; URBANOWICZ, B.; TINÉ, M. A. S.; CARPITA, N. C. Mixed linkage (1-3),(1-4)-beta-D-glucans of grasses. *Cereal Chemistry*, n. 81, v. 1, p. 115-127, 2004.
- BUCKERIDGE, M. S.; SILVA, G. B.; CAVALARI, A. A. Parede Celular. In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. Fisiologia Vegetal, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 165-181, 2008.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P., 2010. As rotas para o etanol celulósico. Departamento de Botânica – IBUSP. Jouro, 2010 (<http://mundodacana.blogspot.com/2010/08/as-rotas-para-o-etanol-celulosico-no.html>), acessado em julho de 2011.
- BUDNEY, D.; SOTERO, P. Brazil Institute Special Report: the Global Dynamics of Biofuels. *Brazil Institute of the Woodrow Wilson Center*, n.3, 2007.
- CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 445-476, 1996.
- CASTRO, A., M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CAZy: (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>), acessado em julho de 2011.
- CELESTINO, K. R.; CUNHA, R. B.; FELIX, C. R. Characterization of a beta-glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry*, n. 7, v. 23, 2006.
- CCP4: Collaborative Computational Project Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallography*. D 50, p. 760–763, 1994.
- CD: (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>)

- CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallography D Biology Crystallography*, v. 66, p. 12-21, 2010.
- CLARK, D. R.; JOHNSON, J.; CHUNG, K. H.; KIRKWOOD, S. Purification, characterization, and action-pattern studies on the endo-(1 linked to 3) β -D-glucanase from *Rhizopus arrhizus*. *Carbohydrate Research*, v. 61, p. 457-477, 1978.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 2, p. 3-13, 2005.
- COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FERREIRA-FILHO, E. X.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKÁ, M.; HUGHES, M. M (1993). Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: COUGHLAN, M. P., HAZLEWOOD, G. P. (Eds). Hemicelluloses and hemicellulases. London: Portland Press, p. 29-51, 1993.
- COUGHLAN, M. P. Russell, G.E., editor. Newcastle-upon-Tyne: Interscience. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: *Biotechnology and genetic engineering reviews*. v. 3, p. 37-109, 1985.
- CTC:(http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=366&Itemid=1315), acessado em: setembro de 2011.
- DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage*, v. 49, p. 2106-16, 2008.
- DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. *Applied Energy*, v. 86, p. S108-17, 2009.
- DEMIRBAS A. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Convers Manage*, v. 50, p. 2239-49, 2009.
- DEMIRBAS, A. H. Biofuels for future transportation necessity. *Energy Education Science & Technology*, Part A, v. 26, p. 13-23, 2010.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, 2004.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERREIRA-FILHO, E. X. Xilanases. In: Suraia, S., Pietro, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, p. 137-148, 2004.

- FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.19, n.1 , p. 1-13 , 2007
- FLIPPPI, M. J. A., VISSER, J., VAN DER VEEN, P., DE GRAAFF, L. H. Arabinase gene expression in *Aspergillus niger*: indications for co-ordinated gene expression. *Microbiology*, v. 140, p. 2673-2682, 1994.
- GIELKENS, M. M. C.; VISSER, J.; DE GRAAF, L. H. Arabinoxylan degradation by fungi: characterisation of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Current Genetics*, v. 31, p. 22-29, 1997.
- GOSALBES, M. J.; PEREZ-GONZALEZ, J. A.; GONZALEZ, R.; NAVARRO, A. Two β -glucanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: Molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase. *Journal Bacteriology*, v. 173, p. 7705-7710, 1991.
- GRISHINA, I. B.; WOODY, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discussions*, p. 245-62, 1994.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature protocols*, v. 1, n. 6, p. 2557-2535, 2006.
- HAHN, M.; OLSEN, O.; POLITZ, O.; BORRIS, R.; HEINEMANN, U. Crystal-structure and site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4-beta-B-glucanase. *Journal of Biological Chemistry*, n. 7, v. 270, p. 3081-3088, 1995.
- HAMMERSLEY, A., (Copyright 1987-2005), Program FIT2D v.12.077, ESRF, Grenoble, France, (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>).
- HARVEY, A. J.; HRMOVA, M.; DE GORI, R.; VARGHESE, J. N.; FINCHER, G. B. Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. *Proteins*, v. 41, p. 257-269, 2000.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, v. 280 (Pt 2), p. 309-316, 1991.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, v. 316 (Pt 2), p. 695-696, 1996.
- HIGUCHI, T. "Biodegradation of Lignin: Biochemistry and Potential Applications". *Experientia*, v. 38, p. 159-166, 1982.

- HINCHLIFF, E.; WENDY, G., B. Expression of the cloned endo- β -1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, v. 8, p. 471-475, 1995.
- HINZ, S. W. A.; POUVREAU, L.; JOOSTEN, R.; BARTELS, J.; JONATHAN, M. C.; WERY, J.; SCHOLS, H. A. Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1. *Journal of Cereal Science*, v. 50, p. 318-323, 2009.
- HOVEL, K.; SHALLOM, D.; NIEFIND, K.; BELAKHOV, V.; SHOHAM, G.; BAASOV, T.; SHOHAM, Y.; SCHOMBURG, D. Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 α -L-arabinofuranosidase. *EMBO Journal*, v. 22, p. 4922-4932, 2003.
- IUBMB: (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>), 1984. acessado em agosto de 2011.
- JACOBSEN, S. E., WYMAN, C. E. Cellulose and hemicelluloses hydrolysis models for application to current and novel pretreatment process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, p. 81-96, 2000.
- JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, v. 1, p. 163-176, 1990.
- KAJI, A. α -L-Arabinofuranosidase. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*, v. 42, p. 383-94, 1984.
- KARIMI, S., WARD, O. P. J. Comparative study of some microbial arabinan-degrading enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 4, p. 173-180, 1989.
- KEITEL, T.; MELDGAARD, M.; HEINEMANN, U. Cation binding to a *Bacillus* (1,3-1,4)-beta-glucanase. Geometry, affinity and effect on protein stability. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, v. 222, p. 203-214, 1994.
- KOMAE, K., KAJI, A., SATO, M. An α -l-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. *Agricultural Biology and Chemistry*, 46, 1899-1905, 1982.
- KORMELINK, F. J. M.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F., WOOD, T. M.; VORAGEN, A. G. J. Purification and characterization of an (1,4)- β -d-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 753-758, 1991.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LASKOWSKI, R. A.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *Journal of Molecular Biology*, n. 4, v. 231, p. 1049-1067, 1993.

- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall, 2005.
- MATSUO, N.; KANEKO, S.; KUNO, A.; KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I. Purification, characterization and gene cloning of two alpha-L-arabinofuranosidases from streptomyces chartreusis GS901. *Biochemistry Journal*, v. 346, p. 9-15, 2000.
- MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, n. Pt 3, v.53, p. 240-255, 1997.
- NAKANO, M. M., ZUBER, P. "Anaerobic growth of a "strict aerobe" (Bacillus subtilis)". *Annual Review of Microbiology*, v. 52, p. 165-190, 1998.
- NAVAZA, J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica*, 1994.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 4 ed. Editora Sarvier, 2006.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology Biofuels*. v. 1, p. 7, 2008.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, v. 276, p. 307-326, 1997.
- PAES, G.; SKOV, L. K.; O'DONOHUE, M. J.; RE'MOND, C.; KASTRUP, J. S.; GAJHEDE, M.; MIRZA, O. The structure of the complex between a branched pentasaccharide and Thermobacillus xylanilyticus GH-51 arabinofuranosidase reveals xylan-binding determinants and induced fit. *Biochemistry*, v. 47, p. 7441-7451, 2008.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 59, p. 12-22, 2000.
- PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal*, v. 54, p. 559-568, 2008.
- PERRAKIS, A.; MORRIS, R.; LAMZIN, V. S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Structural Biology*, n. 5, v. 6, p. 458-463, 1999.
- PITSON, S. M.; VORAGEN, A. G. J.; BELDMAN, G. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. *FEBS Letters*, v. 398, p. 7-11, 1996.
- PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1543, p. 361-382, 2000.

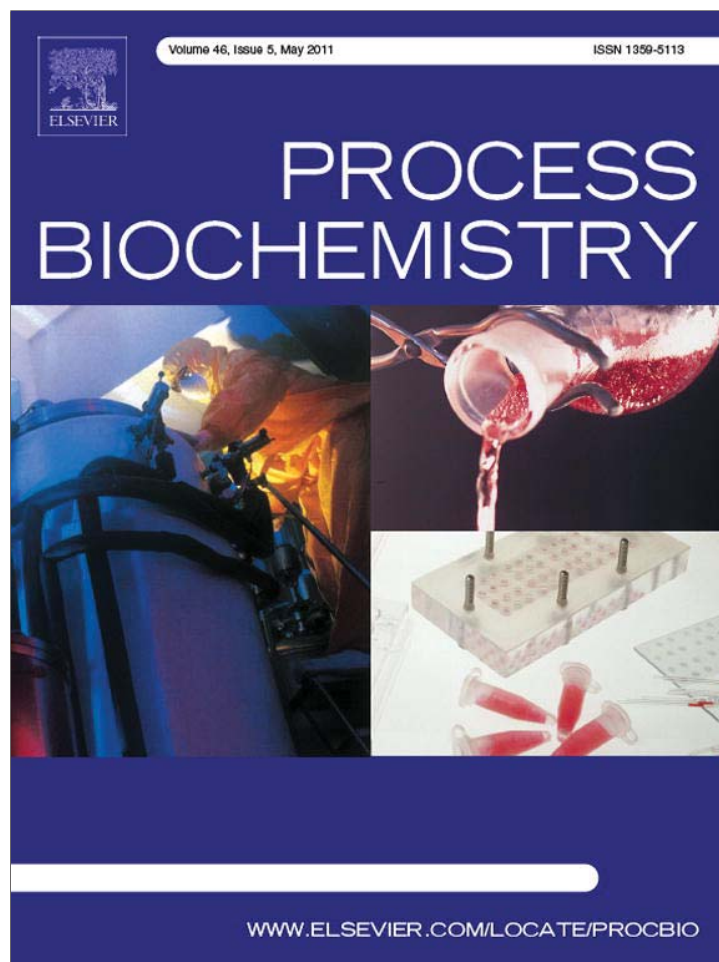
- POUTANEN, K. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *Journal Biotechnology*, v. 7, p. 271-82, 1989.
- PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, Newcastle, v. 13, p. 101-131, 1995.
- PtParam*: (<http://ca.expasy.org>), acessado em agosto de 2011.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863-871, 2003.
- Renewable Fuels Association. Changing the Climate: Ethanol Industry Outlook, 2008
- ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, A. G. J.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M. F.; GERAERDS, C. C. J. M.; SCHOLS, H. A.; PILNIK, W. The arabinanases of *Aspergillus niger*-purification and characterisation of two α -l-arabinofuranosidases and an endo-1,5- α -l-arabinanase. *Carbohydrate Polymers*, v. 9, p. 25-47, 1988.
- RYAN, K. J. Staphylococci. In: Ryan KJ, Ray CG, editors. *Sherris medical microbiology an introduction to infectious diseases*. 4th ed. New York: McGraw Hill, p. 261-71, 2004.
- RYE, C.S.; WITHERS, S.G. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 4, p. 573-580, 2000.
- SAHA, B. C. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, Research review paper. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 403-423, 2000.
- SANTOS, C. R.; SQUINA, F. M.; NAVARRO, A. M.; OLDIGES, D. P.; LEME, A. F. P.; RULLER, R.; MORT, A. J.; PRADE, R.; MURAKAMI, M. T. Functional and biophysical characterization of a hyperthermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila*. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 131-137, 2011.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 219-228, 2003.
- SHEEHAN, J.; HIMMEL, M. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for Bioethanol. *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 817-827, 1999.
- SILVA, G., B.. A importância da parede celular para a filogenia das Pteridofitas. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica de São Paulo, 2005.
- SINNOTT, M. L. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, v. 90, p. 1171-1202, 1990.

- SJOSTROM, E. Wood chemistry fundamentals and applications. 2 ed. Califórnia: Academic Press, p. 293, 1992.
- SOMERVILLE, C., BAUER, S., BRININSTOOL, G., FACETTE, M., HAMANN, T., MILNE, J., OSBORNE, E., PAREDEZ, A., PERSON, S., RAAB, T., VORMERK, S., YOUNGS, H. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 2004.
- STONE, J.E.; SCALLAN, A.M. Effect of component removal upon the porous structure of the cell wall of wood. *Journal Polymer Science Part C*, v. 11, p. 13–25, 1965.
- SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*, v. 25, p. 495–503, 1992.
- SVERGUN, D. I.; STUHRMANN, H. B. New developments in direct shape determination from small-angle scattering. 1. Theory and model calculations. *Acta Crystallographica*. v. 47 p.736-744, 1991.
- SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL - a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, v. 28, p. 768-773, 1995.
- SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal*, v. 76, p. 2879-2886, 1999.
- SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering. *Biophysical Journal*, v. 80, p. 2946-2953, 2001.
- SZENGYEL, Z. Ethanol from wood: Cellulase enzyme production. 2000. 61 f. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.
- TAKAHATA, Y.; NISHIJIMA, M.; HOAKI, T.; MARUYAMA, T. *Thermotoga petrophila* sp. nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51 p. 1901-1909, 2001.
- TAYLOR, E. J.; SMITH, N. L.; TURKENBURG, J. P.; D'SOUZA, S.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry Journal*, v. 395, p. 31-37, 2006.
- UFFEN, R. L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 19, p. 1-6, 1997.

- UHLIG, H. Industrial enzymes and their applications. New York: Johnm Wiely & Sons, p. 89-95, 1998.
- US Department of Energy Genome Programs (<http://genomics.energy.gov>), acessado em Julho de 2011.
- VAN LAERE, K. M. J.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinofuranosyl residues from double substituted xylose units in arabinoxylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, p. 231-235, 1997.
- VINCENT, P.; SHARECK, F.; DUPONT, C.; MOROSOLI, R.; KLUEPFEL, D. New alpha-L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme. *Biochemistry Journal*, v. 322, p. 845-852, 1997.
- VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, p. 860-864, 2003.
- WEINSTEIN, L.; ALBERSHEIM, P. Purification and Partial Characterization of a Wall-degrading Endo-Arabanase and an Arabinosidase from *Bacillus subtilis*. *Plant Physiology*, v. 63, p. 425-432, 1979.
- WELFLE, K.; MISSELWITZ, R.; POLITZ, O.; BORRISS, R.; WELFLE, H. Individual amino acids in the N-terminal loop region determine the thermostability and unfolding characteristics of bacterial glucanases. *Protein Science*, v. 5, p. 2255-2265, 1996.
- WOOD, T. M.; CASTANARES, A.; SMITH, D. C.; MCCRAE, S. I.; BROWN, J. A. Xylan-degrading enzyme systems of the fungi *Aspergillus awamori* and *Penicillium pinophilum*: studies on the isolation of over-producing mutant strains and aspects of the enzymology. In: Visser J, Beldman G, Kusters-Van Someren MA, Voragen AG J, editors. Xylans and Xylanases. Amsterdam, The Netherlands: *Elsevier Science Publishers*, p. 187-202, 1992.
- YANG, B.; WYMAN, C. E. Characterization of the Degree of Polymerization of Xylooligomers Produced by Flowthrough Hydrolysis of Pure Xylan and Corn Stover with Water, v. 99, p. 5756, 2008.
- ZVERLOV, V. V.; LIEBL, W.; BACHLEITNER, M.; SCHWARZ, W. H. Nucleotide sequence of *arfB* of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of alpha-L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases. *FEMS Microbiology Letters*, v. 164, p. 337-343, 1998.

APÊNDICES

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

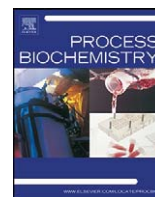
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Short communication

Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168

Gilvan Pessoa Furtado^a, Lucas Ferreira Ribeiro^a, Camila Ramos Santos^b, Celisa Caldana Tonoli^b, Angelica Rodrigues de Souza^b, Renata Rocha Oliveira^b, Mario Tyago Murakami^b, Richard John Ward^{c,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil

^c Departamento de Química, FFCLRP-USP, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2010

Received in revised form 26 January 2011

Accepted 27 January 2011

Keywords:

Bacillus subtilis β -1,3-1,4-Glucanase

Kinetics

X-ray crystallography

Chemical denaturation

ABSTRACT

β -1,3-1,4-Glucanases (E.C. 3.2.1.73) hydrolyze linked β -D-glucans, such as lichenan and barley β -glucan. Recombinant β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli* and purified by Ni-NTA chromatography exhibited optimum activity at 50 °C and pH 6.0. The catalytic half-life at 60 °C decreased from 90 to 5 min when the enzyme was incubated in the presence and absence of Ca^{2+} respectively. The kinetic parameters of lichenan hydrolysis were 2695, 3.1 and 1220 for V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), K_m (mg mL^{-1}) and K_{cat} (s^{-1}), respectively. Analysis by DLS, AUC and SAXS demonstrated the enzyme is monomeric in solution. Chemical denaturation monitored by ITFE and far-UV CD yielded $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ values of 9.6 and 9.1 kcal/mol, respectively, showing that the enzyme has intermediate stability when compared with other *Bacillus* β -1,3-1,4-glucanases. The crystal structure shows the anti-parallel jelly-roll β -sheet conserved in all GH16 β -1,3-1,4-glucanases, with the amino acid differences between *Bacillus* sp. enzymes that are likely determinants of stability being distributed throughout the protein.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

β -1,3-1,4-D-Glucans are abundant linear polysaccharides present in the cell walls of cereal endosperm, representing up to 5.5% dry weight of grains and 75% of the carbohydrates in barley endosperm [1]. They are formed from β -D-glucosyl residues linked by β -1,3 and β -1,4 glycosidic bonds where the proportion of β -1,3 linkages varies between 25 and 30% [2]. A mixed linkage β -glucan is also found in the lichen *Cetraria islandica* in which the proportion of β -1,3 and β -1,4 linkages is approximately 1:1 [3].

Bacterial β -1,3-1,4-glucanases (EC 3.2.1.73; lichenase) are members of the glycosyl hydrolase family 16 (GH16), and specifically cleave the β -1,4-glycosidic linkage adjacent to 3-O-substituted glucopyranose residues. The enzymatic depolymerisation of β -glucan releases mainly tri- and tetrasaccharides, and the enzyme has no detectable effect on β -1,4-D-glucan, carboxymethylcellulose or on β -1,3-D-glucans (laminaran) [4]. β -1,3-1,4-Glucanases have potential in several industrial applications. Exogenous β -1,3-1,4-glucanases have been used to reduce

the viscosity of complex barley β -glucans during the mashing process in the brewing industry and can also improve the β -glucan digestibility in poultry and swine feed stuffs [5,6]. β -Glucans are abundant cell wall constituents of sugarcane [7], and the inclusion of β -1,3-1,4-glucanases in hydrolase cocktails has been proposed to improve the release of fermentable sugars from lignocellulosic feedstocks in biofuel production [8].

Bacillus spp. are a rich source of β -1,3-1,4-glucanases, and the enzyme has previously been isolated from *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* and *Bacillus halodurans* [9]. These lichenases have molecular masses of 25–30 kDa, showing basic isoelectric points (pI 7.5–9.0) and neutral pH optima (6–7.5). The active site contains a conserved amino acid motif “EIDIEF”, in which the two glutamic acid residues are involved in an acid/base and nucleophile hydrolysis mechanism [10]. Here we report the cloning of the *bglS* gene, which encodes the β -1,3-1,4-glucanase from *B. subtilis* strain 168, together with the heterologous expression in *Escherichia coli* and the biochemical and structural characterization of the enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of the *bglS* gene

Genomic DNA was extracted from overnight cultures of *B. subtilis* 168 (ATCC 23857) by the Triton-prep method [11], and used as a template to amplify the *bglS* coding sequence (GeneID: 937470) by PCR with primers 5'-CCTTAAGCTTGCTAGCCAAACAGGTGGATCGTTTTTGA-3' (forward) and 5'-

Abbreviations: Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; DNS, dinitrosalicylic acid; DLS, dynamic light scattering; AUC, analytical ultracentrifugation; SAXS, small angle X-ray scattering; ITFE, intrinsic tryptophan fluorescence emission; CD, circular dichroism.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3875; fax: +55 16 3602 3848.

E-mail address: rjward@fmrp.usp.br (R.J. Ward).

TATATTGCAGCAGGATCTTCACATTTGG-3' (reverse). Restriction sites for *Hind*III and *Nhe*I (forward) and *Bam*HI (reverse) are underlined. The PCR product was digested with *Hind*III and *Bam*HI (Fermentas – Vilnius, Lithuania) and ligated into the corresponding sites of the pT7T3-18U vector (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). The *bg*I5 coding sequence was subcloned into the pET28a(+) plasmid (Novagen, Madison, WI, USA) using *Nhe*I and *Bam*HI cleavage sites, to create the vector pET28a-*bg*I5. The correct construct was confirmed by dideoxy nucleotide sequencing.

2.2. Protein expression and purification

E. coli BL21 (DE3) transformed with pET28a-*bg*I5 were grown to an OD₆₀₀ of 0.6 in 1 L shake flasks containing 200 mL HDM medium (25 g L⁻¹ yeast extract, 15 g L⁻¹ tryptone and 10 mM MgSO₄). After 4 h induction with IPTG, cells were pelleted and transferred to 10 mL of lysis buffer (100 mM HEPES pH 7.5, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole and 1% (v/v) Triton X100). After disruption by sonication, cell debris was removed by centrifugation, and the supernatant was applied to a nickel affinity column (Promega – Madison, USA) and the protein was purified according to the manufacturer's recommendations, using 20 mM and 300 mM of imidazole in wash and elution buffers respectively. The eluted protein was visualized by SDS-PAGE and protein concentration was determined by the Bradford method [12].

2.3. Enzyme assays and biochemical characterization

β -1,3-1,4-Glucanase activity was assayed by reducing sugar release from lichenan substrate (MP Biomedical – Solon, USA) using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [13]. The assay mixture (0.5% (w/v) lichenan, 50 mM MES, pH 6.0) was incubated with enzyme for 10 min and the reaction was stopped by the addition of the DNS reagent. Reducing sugar release was quantified by measuring the A₅₄₀, and comparing to a glucose standard. All assays were performed in triplicate. One activity unit (U) was the amount of enzyme releasing 1 μ mol of reducing sugar from lichenan per minute, and specific activity the activity units per milligram of enzyme.

The optimal temperature was determined by incubating the reaction mixture for 10 min at pH 6.0 at temperatures from 20 °C to 70 °C. For determination of the heat stability, the purified enzyme fractions (1 μ M) were dialyzed against buffers containing 20 mM HEPES pH 7.0 either with or without 5 mM CaCl₂. The dialyzed enzyme samples were incubated at 60 °C and aliquots were withdrawn after regular time intervals and immediately cooled on ice. Residual activities were determined using the DNS assay. The effect of pH on activity was determined at 50 °C in 50 mM buffers over the pH range of 4–9 (acetate buffer – pH 4–5; MES – pH 5.5–6.5; MOPS – pH 7–7.5; Tris-HCl – pH 8–9). For kinetic parameter determination, purified enzymes (20 nM) were incubated at 50 °C with different concentrations of lichenan (0.1–1%) diluted in 50 mM MES pH 6.0. Kinetic data were determined using SigrafW software [14].

2.4. Crystallization, X-ray data collection and structure determination

Protein crystallization was performed using the vapor-diffusion method with a HoneyBee 963 robot (Genomic Solutions Inc. – Ann Arbor, MI, USA). Sitting drops were prepared by mixing 0.5 μ L of β -1,3-1,4-glucanase at 47.5 mg mL⁻¹ (in 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.5) with an equal volume of mother liquor and were equilibrated against 80 μ L of the solution at 18 °C. Crystals with maximum dimensions of 200 μ m grew in 0.1 M bis-tris propane pH 7.0, 1 M lithium sulfate. A single crystal was placed in a 1 μ L drop containing 25% (v/v) of glucose solution (1.7 M), 75% (v/v) of mother liquor and left to evaporate for 4 min at 25 °C. The crystal was then flash-cooled in a 100 K nitrogen gas stream. Crystals treated in this way diffracted to 2.0 Å resolution. X-ray diffraction data were collected at the W01B-MX2 beamline (Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil) [15]. A total of 39 images were collected with an oscillation angle of 1°. Data were indexed, integrated and scaled using the HKL2000 package [16].

The structure was determined by molecular replacement [17] using the atomic coordinates of the β -1,3-1,4-glucanase from *B. licheniformis* (PDB: 1GBG) [18] as the search model. The structure was refined by cycles of manual model building based on inspection of 2F_o-F_c and F_o-F_c maps using the program COOT [19] together with maximum-likelihood isotropic restrained refinement using the program REFMAC5 [20]. Water molecules were manually added at final stages. Stereochemistry of the models was analyzed with the program Molprobity [21]. The atomic coordinates for the *B. subtilis* β -1,3-1,4-glucanase were deposited in the PDB database as entry code 3055.

2.5. Determination of molecular dimensions

Small angle X-ray scattering (SAXS) data were collected on the D02A/SAXS2 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory using a wavelength of 1.48 Å and a 165 mm MarCCD detector for data collection. The sample-to-detector distance was set to 1068.04 mm, and data in the range from 0.19 nm⁻¹ to 2.5 nm⁻¹ were collected using protein samples at 4, 6 and 10 mg mL⁻¹ in 20 mM HEPES-HCl buffer, pH 7.5. Exposures of 600 s were recorded to minimize radiation-induced protein

damage, and buffer baselines for solvent correction were collected both before and after sample data collection. Background scattering was subtracted from the protein scattering pattern and then normalized. Fitting of the experimental data was as previously described [22].

Dynamic light scattering (DLS) experiments were carried out at 20 °C at 1.0 and 10 mg mL⁻¹ protein concentrations using a DynaPro MS/X (Wyatt Technology Corporation – Santa Barbara, USA) apparatus at 830 nm with the laser output power at 30 mW. Five measurements per second were made for each 10 s run, and experiments were repeated at 30 min intervals to check sample stability. Hydrodynamic parameters were determined using the software Dynamics V6.3.40 supplied with the apparatus.

Analytical ultracentrifugation (AUC) was performed at protein concentrations of 5, 10 and 15 μ M in 20 mM HEPES-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl and 2 mM CaCl₂ at 144,400 \times g and 293 K in an XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter Inc., Brea, CA, USA) equipped with a UV-vis optics for recording at 280 nm, using an An50Ti rotor and 12 mm double-sector centrepieces. Sedimentation coefficient distributions were calculated by least-squares boundary modeling of sedimentation velocity data using the c(s) method [23], and *s*-values were corrected to standard conditions (water, 20 °C and infinite protein dilution) with the SEDNTERP program [24].

2.6. CD spectroscopy

Far-UV CD spectra of β -1,3-1,4-glucanase recombinant proteins were measured between 190 and 260 nm in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0 at 25 °C with a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Inc. – Tokyo, Japan) using 2 mm path-length cuvettes and a protein concentration of 0.1 mg mL⁻¹. A total of six spectra were collected, averaged and corrected by subtraction of a buffer blank.

2.7. Chemical and thermal denaturation

Chemical unfolding was measured from the changes in secondary and tertiary structures by CD (circular dichroism) and ITFE (intrinsic tryptophan fluorescence emission) respectively. Protein samples at 0.4 mg mL⁻¹ were mixed with guanidine hydrochloride (8 M solution, Sigma – St. Louis, USA) to final denaturant concentrations between 0 and 2.5 M and incubated for 1 h at 20 °C. Changes in the CD and ITFE spectra were used to estimate the Gibbs free energy of unfolding (ΔG_{H_2O}) and unfolding cooperativity (*m_D*, the slope describing the dependence of ΔG_{H_2O} on the denaturant concentration) assuming a two-state unfolding model for a monomer as previously described [25].

3. Results and discussion

3.1. Expression of heterologous BglS

The *bg*I5 gene was successfully expressed as a soluble protein in *E. coli* BL21 (DE3) (Fig. S1A) and protein purification by Ni-affinity chromatography produced protein at a concentration of 0.36 mg mL⁻¹, with 7-fold purification with a yield of 71%. Protein fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE and a single protein band was observed after the final purification step (Fig. S1B), indicating that the expressed protein is homogeneous and has a molecular weight of 28 kDa, including the additional His-tag sequence (of 2.5 kDa) added to the N-terminus from the pET28a vector.

3.2. Biochemical and kinetic properties of the recombinant enzyme

Biochemical parameters of the recombinant β -1,3-1,4-glucanase were determined using lichenan as substrate. Fig. 1A and B shows that the enzyme presents an optimum pH and temperature of 6.0 and 50 °C, respectively. Thermostability assays demonstrated that the enzyme retained less than 40% of its activity after 10 min incubation at 60 °C in the absence of Ca²⁺ (Fig. 1C). The optimum pH was similar to that previously observed by Qiao et al. [26] for the β -1,3-1,4-glucanase from *B. subtilis* MA139, which shows 93% of amino acid sequence identity with the enzyme used in the present study. In contrast, the optimum temperature of activity for the *B. subtilis* MA139 enzyme was 40 °C. The β -1,3-1,4-glucanase used in our work showed similar pH and temperature optima as the recombinant *Bacteroides succinogenes* glucanase expressed in *E. coli* [27].

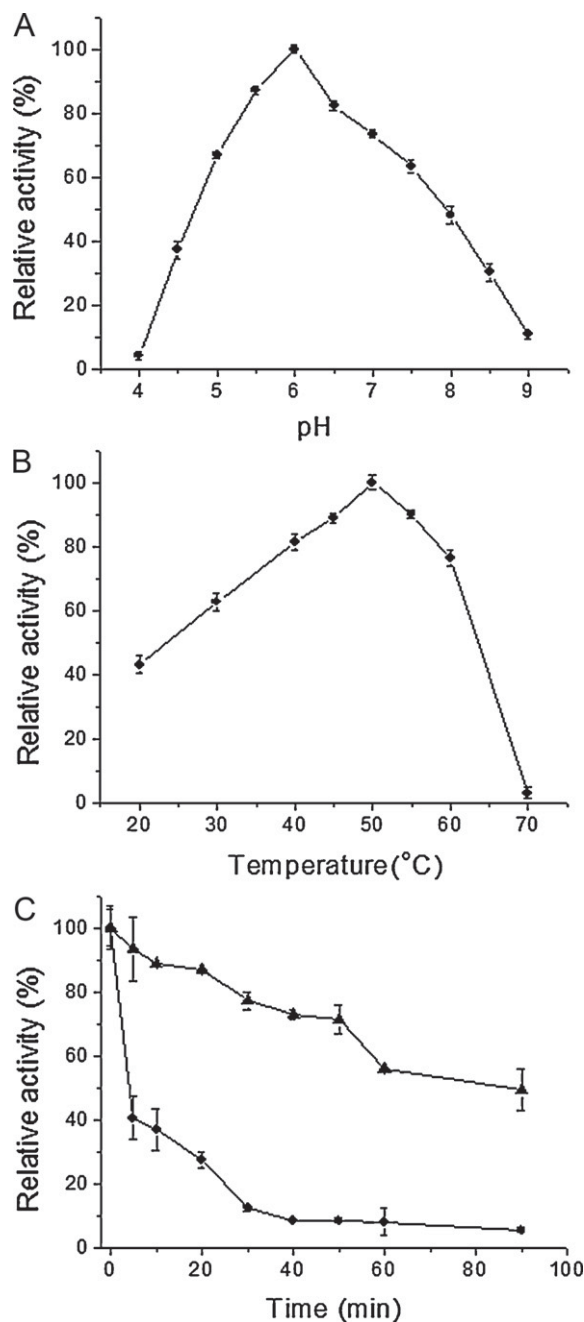


Fig. 1. Effects of pH (A) and temperature (B) on relative activity of recombinant β -1,3-1,4-glucanase. (C) Thermal inactivation of purified recombinant enzyme (1 μ M) at 60 °C in the absence (●) and presence (▲) of 5 mM CaCl_2 . Samples were withdrawn at intervals up to 90 min and residual activity were measured. Assays were performed in triplicate by DNS method using lichenan as substrate.

The β -1,3-1,4-glucanase from *B. subtilis* 168 showed low tolerance to incubation at 60 °C (Fig. 1C) in the absence of Ca^{2+} , and this limited thermotolerance is a common feature of bacterial and fungal β -1,3-1,4-glucanases [5,28]. The presence of calcium ions in the medium significantly increases the thermotolerance of the enzyme such that a 50% of the activity is lost after 90 min incubation at 60 °C (Fig. 1C). This result is in agreement with previous results which have demonstrated the importance of Ca^{2+} ions for the stabilization of β -1,3-1,4-glucanases [29]. Hybrid glucanases in which part of the primary sequence of the enzyme is replaced by a related sequence of the orthologous enzyme from another microorganism also demonstrate enhanced thermostability, probably by maximiz-

ing short-range interactions such as hydrogen bonding between the N-terminus and the core of the molecule [30].

The calculated kinetic parameters of the purified enzyme against the lichenan substrate were 2695 ± 317 ; 3.1 ± 0.37 and 1222 ± 144 for V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), K_{m} (mg mL^{-1}) and K_{cat} (s^{-1}), respectively. The calculated value for catalytic efficiency ($K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) was $394.2 \text{ mL mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$. These values are similar to those observed for other *Bacillus* lichenases [9].

3.3. Crystal structure of the *B. subtilis* 168 β -1,3-1,4-glucanase

The structure of β -1,3-1,4-glucanase was solved by molecular replacement methods and refined to an R_{factor} of 24.9% and R_{free} of 29.2% (Table S1). All residues are found in the allowed region of Ramachandran plot, with the majority (98.1%) in favored regions. The protein structure presents two juxtaposed curved anti-parallel β -sheets, consisting of 7 and 8 strands respectively, forming a single compact globular domain containing a broad substrate-binding channel (Fig. 2A). The active site comprises an extended surface cleft whose walls are formed by surface loops and α -helical elements with β -strands constituting the base. Superposition of the *B. subtilis* β -1,3-1,4-glucanase structure with *B. licheniformis* orthologue indicates a very similar three-dimensional arrangement (main-chain atom r.m.s.d. of 0.38 Å). Although these two proteins share 91% amino acid identity, surprisingly Cys60 and Cys89 do not form a disulfide bridge in the *B. subtilis* β -1,3-1,4-glucanase structure, even though no reducing agents were used during protein purification and crystallization.

The active site cleft of the enzyme presents a negatively charged crevice surrounded by a number of aromatic residues (Fig. 2B). A single molecule of bis-tris-propane was found in the active-site cleft, forming hydrogen bonds with the nucleophile Glu133 (2.62 Å), the acid catalyst Glu137 (2.56 Å), Tyr151 (2.83 Å) and water mediated hydrogen bonds with Asn210, Asn56, Asn149, Gln147, Glu159 (Fig. 2C). On the opposite face of the active site, a single calcium ion (Fig. 2A) was coordinated by backbone carbonyl oxygen atoms from Pro37, Gly73, Asp235, a carboxylate oxygen of Asp235 and two water molecules, as previously observed in the *B. licheniformis* homologue [18]. These amino-acids are located in the β 1- β 2 loop, in the β 3- β 4 loop and in the β 15 strand respectively, showing that the stabilizing effect of the calcium stabilization is due to cross-linking of these regions.

3.4. Lichenase oligomeric state

The oligomeric state of the enzyme was assessed by SAXS, DLS and AUC. Analysis of SAXS data revealed a maximum dimension of 55 Å and a radius of gyration of 17.9 ± 0.02 Å, and revealed a molecular shape that is fully consistent with the crystal structure in which the active site cleft is clearly visible (Fig. S2). DLS and AUC also corroborated the SAXS results indicating a hydrodynamic radius of 19 Å and molecular weight of 28.6 kDa, respectively. All results therefore indicate a monomeric state for the β -1,3-1,4-glucanase in solution.

3.5. Circular dichroism

The far-UV CD spectrum of the purified enzyme at pH 6.0 shows bands at 200 nm (positive) and 215–200 nm (negative) (Fig. 3A), and is consistent with the high β -sheet content observed in the crystal structure. A positive band around 230 nm was also observed and the crystal structure of the enzyme shows the substrate binding cleft is rich in aromatic residues, and that Trp212 forms non-covalent contacts with both Trp62 and Trp220. The distances and orientations between these 3 tryptophan residues are within the constraints for electronic coupling, and we suggest that the 230 nm

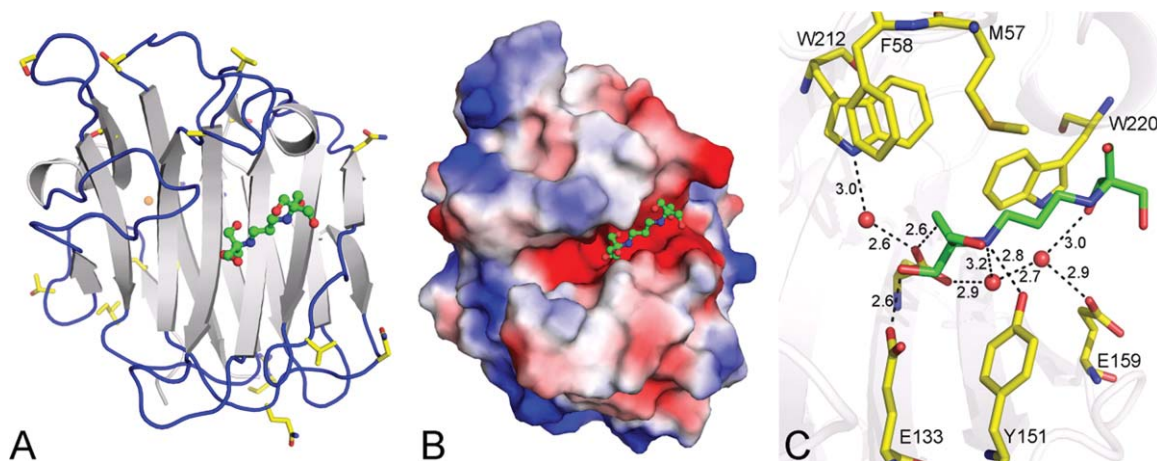


Fig. 2. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* β -1,3–1,4 glucanase. (A) Cartoon representation of the structure showing residues differing from *B. licheniformis* homologue in yellow, bis-tris-propane molecule in green and the calcium ion as a red sphere. (B) Electrostatic surface colored by charge, from red (–) to blue (+). (C) Active site cleft showing interactions between bis-tris-propane molecule (green), protein residues (yellow) and water molecules (red spheres). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

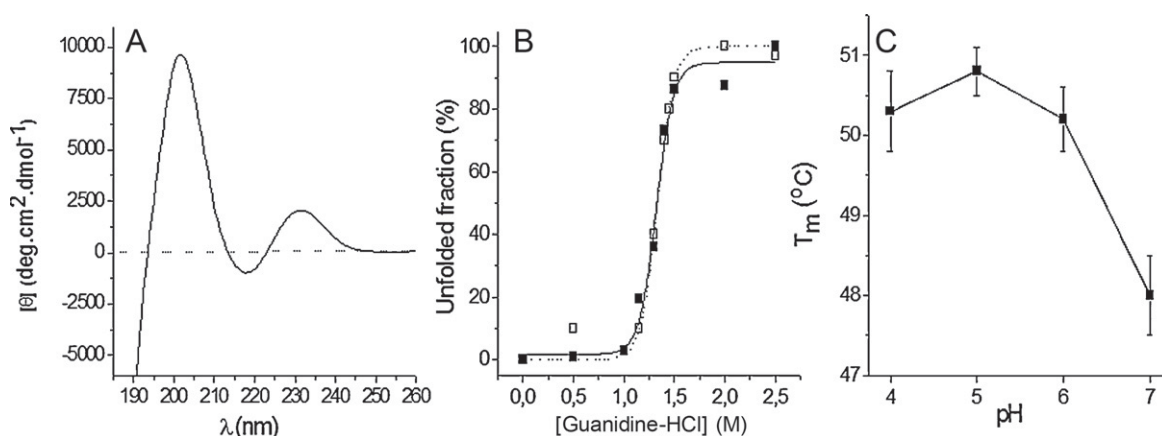


Fig. 3. (A) Far-UV CD spectra of purified β -1,3–1,4-glucanase. The spectrum was collected at a protein concentration of 0.1 mg mL^{−1} in 2 mm path cuvettes. (B) Chemical denaturation by guanidine hydrochloride monitored by CD (closed squares) and fluorescence (open squares) and the fitted curves for each case (solid and dotted lines, respectively). (C) Thermal denaturation in different pHs, analyzed by CD at 218 nm; the T_m corresponds to temperature at which 50% of enzyme is denatured.

band observed in the far-UV CD spectrum is derived from the B_{β} transition of these tryptophan residues [31]. A similar band was observed for *Bacillus macerans* β -1,3–1,4-glucanase [32], in which the relative positions of all three Trp residues are conserved in the three-dimensional structure.

3.6. Chemical and thermal denaturation

The chemical denaturation curves of the enzyme measured by CD and ITFE show very similar profiles (Fig. 3B), showing that the transitions in the secondary and tertiary structures are concomitant. This result is consistent with a two-state unfolding process of the single domain monomeric protein with no unfolding intermediates. Thermodynamic stability estimates for the β -1,3–1,4-glucanase (ΔG_{H_2O}) from the CD and ITFE chemical denaturation data are 9.1 and 9.6 kcal/mol with m_D values of 6.9 and 7.2 kcal/mol/M, respectively. The protein shows a relatively low stability in the presence of chaotropic agents with the guanidine concentration resulting in 50% unfolding of 1.3 M in both the CD and ITFE experiments. The thermal stability of the protein was assessed at different pHs (Fig. 3C), which reveals that the T_m (the temperature at which 50% of the protein is unfolded) varied from 48.0 °C at pH 7 to a maximum of 50.8 °C at pH 5. The values of ΔG_{H_2O} show an intermediate stability of the *B. subtilis*

β -1,3–1,4-glucanase compared to the enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens* (5 kcal/mol) and *B. macerans* (13 kcal/mol) [29]. A hybrid glucanase H(A16-M), in which the 16 N-terminal amino acid of the *B. macerans* glucanase was replaced by corresponding region of *B. amyloliquefaciens* enzyme, shows the higher stability with a ΔG_{H_2O} of 14 and 15 kcal/mol, when complexed with Na⁺ and Ca²⁺ respectively [29], confirming that the N-terminal loop in bacterial β -1,3–1,4-glucanases contributes to the structural determinants of thermostability [33]. Comparison of the β -1,3–1,4-glucanase amino acid sequences from *B. subtilis* (Genbank No. NP_391786.1), *B. amyloliquefaciens* (ABY71827.1) and *B. macerans* (AAO66468.1) shows that although all three enzymes show substitutions both in the N-terminal and C-terminal regions [9], the positions of these substitutions do not form clusters in the 3D-structure, which may indicate that the structural determinants of thermal stability are dispersed throughout the protein.

4. Conclusions

The structure of a β -1,3–1,4-glucanase from *B. subtilis* 168 shows the canonical jelly-roll architecture typical of the GH16 glycohydrolases, and the results of SAXS, DLS and AUC experiments have confirmed that the enzyme is monomeric in solution. Biochemical characterization revealed catalytic properties similar to those of

other bacterial β -1,3-1,4-glucanases, and shows a reduced stability at higher temperatures. Although the β -1,3-1,4-glucanase shows a high biotechnological potential, the reduced thermotolerance may limit applications to processes at temperatures below 50 °C. These results indicate that the enzyme is a candidate for protein engineering studies to improve the catalysis at higher temperatures.

Acknowledgements

The financial support of CNPq (grants 574002/2008-1 [RJW], 307795/2009-8 [RJW], 481889/2009-4 [RJW] and 478059/2009-4 [MTM]), and FAPESP (grants 2008/57908-6 [RJW], 2007/01623-0 [GPF], 2007/01615-8 [LFR] and 2010/51890-8 [MTM]) and PRP-USP is acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.procbio.2011.01.037.

References

- [1] McCleary BV. Purification of (1 → 3), (1 → 4)-beta-D-glucan from barley flour. *Methods in Enzymology* 1988;160:511–4.
- [2] Buckeridge MS, Vergara CE, Carpita NC. The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1 → 3), (1 → 4)-beta-D-glucan in maize. Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 1999;120:1105–16.
- [3] Wood PJ, Weisz J, Blackwell BA. Structural studies of (1 → 3), (1 → 4)-beta-D-glucans by C(13)-nuclear magnetic-resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry* 1994;71:301–7.
- [4] McCleary BV. Lichenase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology* 1988;160:572–5.
- [5] Celestino KR, Cunha RB, Felix CR. Characterization of a beta-glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry* 2006;7:23.
- [6] Li S, Sauer WC, Huang SX, Gaber VM. Effect of beta-glucanase supplementation to hullless barley or wheat soybean meal diets on the digestibilities of energy, protein, beta-glucans, and amino acids in young pigs. *Journal of Animal Science* 1996;74:1649–56.
- [7] Carpita NC. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1996;47:445–76.
- [8] Pauly M, Keegstra K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal* 2008;54:559–68.
- [9] Planas A. Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1543:361–82.
- [10] Abel M, Planas A, Christensen U. Presteady-state kinetics of *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase: binding and hydrolysis of a 4-methylumbelliferyl trisaccharide substrate. *Biochemical Journal* 2001;357:195–202.
- [11] Ruller R, Rosa JC, Faca VM, Greene LJ, Ward RJ. Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5alpha under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2006;43:9–15.
- [12] Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248–54.
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959;31:426–8.
- [14] Leone FA, Baranauskas JA, Furriel RPM, Borin IA. SigrافW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2005;33:399–403.
- [15] Guimaraes BG, Sanfelici L, Neuenschwander RT, Rodrigues F, Grizolli WC, Raulik MA, et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. *Journal of Synchrotron Radiation* 2009;16:69–75.
- [16] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Part A* 1997;276:307–26.
- [17] Vagin A, Teplyakov A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography* 1997;30:1022–5.
- [18] Hahn M, Pons J, Planas A, Querol E, Heinemann U. Crystal-structure of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase at 1.8 angstrom resolution. *FEBS Letters* 1995;374:221–4.
- [19] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 2004;60:2126–32.
- [20] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 1997;53:240–55.
- [21] Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 2010;66:12–21.
- [22] Santos CR, Tonoli CC, Trindade DM, Betzel C, Takata H, Kuriki T, et al. Structural basis for branching-enzyme activity of glycoside hydrolase family 57: structure and stability studies of a novel branching enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Proteins* 2011;79:547–57.
- [23] Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical Journal* 2000;78:1606–19.
- [24] Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM, Pelletier SL. *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1992.
- [25] Bortoletto RK, Ward RJ. A stability transition at mildly acidic pH in the alpha-hemolysin (alpha-toxin) from *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* 1999;459:438–42.
- [26] Qiao JY, Dong B, Li YH, Zhang B, Cao YH. Cloning of a beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009;152:334–42.
- [27] Erfle JD, Teather RM, Wood PJ, Irvin JE. Purification and properties of a 1,3-1,4-beta-D-glucanase (lichenase, 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 1988;255:833–41.
- [28] Chen H, Li XL, Ljungdahl LG. Sequencing of a 1,3-1,4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *Journal of Bacteriology* 1997;179:6028–34.
- [29] Keitel T, Meldgaard M, Heinemann U. Cation binding to a *Bacillus* (1,3-1,4)-beta-glucanase. Geometry, affinity and effect on protein stability. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 1994;222:203–14.
- [30] Politz O, Simon O, Olsen O, Borriess R. Determinants for the enhanced thermostability of hybrid (1-3,1-4)-beta-glucanases. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 1993;216:829–34.
- [31] Grishina IB, Woody RW. Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discussions* 1994:245–62.
- [32] Hahn M, Olsen O, Politz O, Borriess R, Heinemann U. Crystal-structure and site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4-beta-B-glucanase. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:3081–8.
- [33] Welfle K, Misselwitz R, Politz O, Borriess R, Welfle H. Individual amino acids in the N-terminal loop region determine the thermostability and unfolding characteristics of bacterial glucanases. *Protein Science* 1996;5:2255–65.

Protein Science Journal

Copy of e-mail Notification

Protein Science Published by Wiley-Blackwell

Dear Author,

YOUR PAGE PROOFS ARE AVAILABLE IN PDF FORMAT; please refer to this URL address
<http://115.111.50.156/jw/retrieval.aspx?pwd=5fd094242880>

Login: your e-mail address

Password: 5fd094242880

The site contains 1 file. You will need to have Adobe Acrobat Reader software to read these files. This is free software and is available for user downloading at <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>.

This file contains:

Adobe Acrobat Users - NOTES tool sheet

Reprint Order Information

Page Charge Information

Color Reproduction Form

Conflict of Interest Statement

A copy of your page proofs for your article

Please read the page proofs carefully and:

- 1) indicate changes or corrections in the margin of the page proofs;
- 2) answer all queries
- 3) proofread any tables and equations carefully;
- 4) check that any special characters have translated correctly.

Special Notes:

We strongly encourage you to return your corrections electronically to proprod@wiley.com. If you would prefer to fax your corrections, please send them to 1-201-748-6052.

Your prompt attention to and return of page proofs is crucial to faster publication of your work. Thank you for your cooperation.

Return to:

Protein Science Journal

Copy of e-mail Notification

Tyrone Prescod, Production Editor

E-mail: proprod@wiley.com

If you experience technical problems, please contact wileysupport@kwglobal.com.

If you have any questions regarding your article, please contact me. PLEASE ALWAYS INCLUDE YOUR ARTICLE NO. (11-0152.R1) WITH ALL CORRESPONDENCE.

This e-proof is to be used only for the purpose of returning corrections to the publisher.

Sincerely,

Tyrone Prescod, Production Editor

Phone: 201-748-8898 fax: 201-748-6052

E-mail: proprod@wiley.com



111 RIVER STREET, HOBOKEN, NJ 07030

*****IMMEDIATE RESPONSE REQUIRED*****

Your article will be published online via Wiley's EarlyView® service (www.interscience.wiley.com) shortly after receipt of corrections. EarlyView® is Wiley's online publication of individual articles in full text HTML and/or pdf format before release of the compiled print issue of the journal. Articles posted online in EarlyView® are peer-reviewed, copyedited, author corrected, and fully citable via the article DOI (for further information, visit www.doi.org). EarlyView® means you benefit from the best of two worlds--fast online availability as well as traditional, issue-based archiving.

Please follow these instructions to avoid delay of publication.

READ PROOFS CAREFULLY

- This will be your only chance to review these proofs. **Please note that once your corrected article is posted online, it is considered legally published, and cannot be removed from the Web site for further corrections.**
- Also note that the volume and page numbers shown on the proofs are for position only.

ANSWER ALL QUERIES ON PROOFS (Queries for you to answer are attached as the last page of your proof.)

- Mark all corrections directly on the proofs. Note that excessive author alterations may ultimately result in delay of publication and extra costs may be charged to you.

CHECK FIGURES AND TABLES CAREFULLY

- Check size, numbering, and orientation of figures.
- All images in the PDF are downsampled (reduced to lower resolution and file size) to facilitate Internet delivery. ----- These images will appear at higher resolution and sharpness in the printed article.
- Review figure legends to ensure that they are complete.
- Check all tables. Review layout, title, and footnotes.

RETURN

- PROOFS**
- CONFLICT OF INTEREST FORM**
- COLOR REPRODUCTION FORM**
- PAGE CHARGE FORM**

RETURN WITHIN 48 HOURS OF RECEIPT VIA FAX TO TYRONE PRESCOD, 201-748-6052

QUESTIONS ?

Production Editor, Tyrone Prescod
Phone: 201-748-8898 fax: 201-748-6052
E-mail: proprod@wiley.com
Please refer to journal acronym and article production number

Softproofing for advanced Adobe Acrobat Users – NOTES tool

NOTE: ADOBE READER FROM THE INTERNET DOES NOT CONTAIN THE NOTES TOOL USED IN THIS PROCEDURE.

Acrobat annotation tools can be very useful for indicating changes to the PDF proof of your article. By using Acrobat annotation tools, a full digital pathway can be maintained for your page proofs.

The NOTES annotation tool can be used with either Adobe Acrobat 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Other annotation tools are also available in Acrobat 6.0, but this instruction sheet will concentrate on how to use the NOTES tool. Acrobat Reader, the free Internet download software from Adobe, DOES NOT contain the NOTES tool. In order to softproof using the NOTES tool you must have the full software suite Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0 installed on your computer.

Steps for Softproofing using Adobe Acrobat NOTES tool:

1. Open the PDF page proof of your article using either Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Proof your article on-screen or print a copy for markup of changes.
2. Go to Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 6.0) or Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 7.0) check “Always use login name for author name” option. Also, set the font size at 9 or 10 point.
3. When you have decided on the corrections to your article, select the NOTES tool from the Acrobat toolbox (Acrobat 6.0) and click to display note text to be changed, or Comments/Add Note (in Acrobat 7.0).
4. Enter your corrections into the NOTES text box window. Be sure to clearly indicate where the correction is to be placed and what text it will effect. If necessary to avoid confusion, you can use your TEXT SELECTION tool to copy the text to be corrected and paste it into the NOTES text box window. At this point, you can type the corrections directly into the NOTES text box window. **DO NOT correct the text by typing directly on the PDF page.**
5. Go through your entire article using the NOTES tool as described in Step 4.
6. When you have completed the corrections to your article, go to Document/Export Comments (in Acrobat 6.0) or Comments/Export Comments (in Acrobat 7.0). Save your NOTES file to a place on your harddrive where you can easily locate it. **Name your NOTES file with the article number assigned to your article in the original softproofing e-mail message.**
7. **When closing your article PDF be sure NOT to save changes to original file.**
8. To make changes to a NOTES file you have exported, simply re-open the original PDF proof file, go to Document/Import Comments and import the NOTES file you saved. Make changes and reexport NOTES file keeping the same file name.
9. When complete, attach your NOTES file to a reply e-mail message. Be sure to include your name, the date, and the title of the journal your article will be printed in.



Additional reprint purchases

Should you wish to purchase additional copies of your article, please click on the link and follow the instructions provided:

<https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=PRO>

Corresponding authors are invited to inform their co-authors of the reprint options available.

Please note that regardless of the form in which they are acquired, reprints should not be resold, nor further disseminated in electronic form, nor deployed in part or in whole in any marketing, promotional or educational contexts without authorization from Wiley. Permissions requests should be directed to mail to: permissionsus@wiley.com

For information about 'Pay-Per-View and Article Select' click on the following link: wileyonlinelibrary.com/aboutus/ppv-articleselect.html



111 River Street
 Hoboken, NJ 07030
 E-mail: proprod@wiley.com
 Fax: 201-748-6052

PAGE CHARGE FORM

Please complete and return this form with your page proofs.

Journal: *Protein Science*

Article Number: _____ Authors: _____

Authors are required to pay \$40.00 per page for the first 5 printed pages and \$60.00 per page thereafter. Please calculate your page charge based on the number of pages in the enclosed page proofs.

	Rate	
First Five Pages (\$40 X 5 pp)	\$200.00	\$200.00
Additional Pages _____ X	\$60.00	\$
		\$ _____ Total

Please confirm acceptance of this charge by signing below.

Signature: _____
 Date: _____

Fill in the billing name and address in the space provided if your payment does not accompany this form.

BILL TO:
 Name: _____ MC VISA AMEX Other: _____
 Credit Card #: _____
 Address: _____ Signature: _____
 _____ Expiration Date: _____

PLEASE SEND BACK WITH PAGE PROOFS OR FAX TO: Wiley-Blackwell, 111 River St., Hoboken, NJ 07030. Telephone: (201) 748-8898, Fax (201) 748-6052; **ATTENTION: Tyrone Prescod.**

Thank you in advance for your prompt reply!



COLOR REPRODUCTION IN YOUR ARTICLE

Color figures were included with the final manuscript files that we received for your article. Because of the high cost of color printing, we can only print figures in color if authors cover the expense.

Please indicate if you would like your figures to be printed in color or black and white. Color images will be reproduced online in Wiley *InterScience* at no charge, whether or not you opt for color printing.

Failure to return this form will result in the publication of your figures in black and white.

JOURNAL _____ VOLUME _____ ISSUE _____

TITLE OF MANUSCRIPT _____

MS. NO. _____ NO. OF COLOR PAGES _____ AUTHOR(S) _____

NOTE: Protein Society members receive 1 page of free color. Additional pages paid at rate of \$350 per printed page.

No. Color Pages	Color Charges	No. Color Pages	Color Charges	No. Color Pages	Color Charges
1	350	5	1750	9	3150
2	700	6	2100	10	3500
3	1050	7	2450	11	3850
4	1400	8	2800	12	4200

Please contact the Production Editor for a quote if you have more than 12 pages of color

Please print my figures in black and white

Please print my figures in color \$ _____

***International orders must be paid in currency and drawn on a U.S. bank*

Please check one: Check enclosed Bill me Credit Card

If credit card order, charge to: American Express Visa MasterCard

Credit Card No _____ Signature _____ Exp. Date _____

BILL TO: Name _____ **Purchase Order No.** _____

Institution _____ Phone _____

Address _____

_____ Fax _____

_____ E-mail _____

Conflict of Interest Statement

To be signed by all authors after acceptance of paper.

For all accepted manuscripts, editorials, and letters please answer the following questions for each author.

1. Are the author's university, institutional and corporate affiliations included in the paper/letter? Yes ___ No ___

2. Are all the applicable sources of funding for the project included in the paper/letter?
Yes ___ No ___

3. For each author, is the answer to any of the following questions "yes"?

a. Have you received a financial contribution from a company or organization that might benefit (or lose) financially from the results, conclusions or discussion presented in your paper/letter? Have you received funds for research (other than that listed in acknowledgment 2 above)? (examples below)

- royalties
- patent (or patent pending)
- a fee for consulting
- a fee for speaking
- funds for a member of your staff
- a fee for recruitment of research subjects or participants
- funding for travel

Yes* ___ No ___

b. Do you own stocks, shares or have options in a company or organization that might benefit (or lose) financially from the results, conclusions, or discussion presented in your paper/letter?

Yes* ___ No ___

c. Do you have any other competing financial interests to disclose?

Yes* ___ No ___

*If yes, please draft and attach a conflict of interest statement that might be published as a footnote with the article. For example, "KR has been paid a consulting fee by XYZ Company."

Although we are emphasizing financial disclosure, each author may choose to disclose other potential conflicts, which could include an academic association or antagonism with someone whose interest might be affected by your publication, membership in a special interest group whose interests might be affected by your paper, or other strong convictions that might have affected what you wrote.

Declaration of other potential conflicts: _____

Name (print) _____ Date _____

Signature _____ (Additional pages for co-authors as needed)

Article Title _____

(Adapted from Johnston, K. W., & Rutherford, R. B. (1999). Disclosure of competition of interest. *Journal of Vascular Surgery*, 30, 200-202)

PROTEIN STRUCTURE REPORTS

Structure of a novel thermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1

Tatiana A.C.B. Souza,¹ Camila R. Santos,¹ Angelica R. Souza,¹
Daiane P. Oldiges,¹ Roberto Ruller,² Rolf A. Prade,³ Fabio M. Squina,²
and Mario T. Murakami^{1*}

¹Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil

²Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil

AQ1 ³Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma

Received 19 May 2011; Accepted 1 July 2011

DOI: 10.1002/pro.693

Published online 00 Month 2011 proteinscience.org

Abstract: α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) participate in the degradation of a variety of L-arabinose-containing polysaccharides and interact synergistically with other hemicellulases in the production of oligosaccharides and bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels. In this work, the structure of a novel thermostable family 51 (GH51) α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1 (TpAraF) was determined at 3.1 Å resolution. The TpAraF tertiary structure consists of an (α/β)-barrel catalytic core associated with a C-terminal β -sandwich domain, which is stabilized by hydrophobic contacts. In contrast to other structurally characterized GH51 AraFs, the accessory domain of TpAraF is intimately linked to the active site by a long β -hairpin motif, which modifies the catalytic cavity in shape and volume. Sequence and structural analyses indicate that this motif is unique to *Thermotoga* AraFs. Small angle X-ray scattering investigation showed that TpAraF assembles as a hexamer in solution and is preserved at the optimum catalytic temperature, 65°C, suggesting functional significance. Crystal packing analysis shows that the biological hexamer encompasses a dimer of trimers and the multiple oligomeric interfaces are predominantly fashioned by polar and electrostatic contacts.

Keywords: glycosyl hydrolase family 51; thermostable α -L-arabinofuranosidase; structure; oligomerization; *Thermotoga petrophila* RKU-1

Abbreviations: AraFs, α -L-arabinofuranosidases; CD, circular dichroism; DLS, dynamic light scattering; GH51, glycosyl hydrolase family 51; R_g , gyration radius; SAXS, small angle X-ray scattering; TpAraF, α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1. Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Accession number: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (PDB entry **3S2C**).

Tatiana A.C.B. Souza and Camila R. Santos contributed equally to this work.

AQ6 Grant sponsors: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; US Department of Energy

*Correspondence to: Mario T. Murakami, Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro, 10000, Campinas-SP, Brazil, 13083-970. E-mail: mario.murakami@lnbio.org.br

Introduction

Hemicellulose and pectin are polymers that account for 25–35% of all lignocellulosic biomass.¹ L-arabino-syl residues are widely distributed as side chains of these polymers and participate in plant cell wall crosslinking affecting form and function of hemicelluloses and pectins.² L-arabinofuranoside substitution is also observed in xylans and the presence of these modified side chains restricts enzymatic hydrolysis by xylanases and pectinases.^{3–5} The α -L-arabinofuranosidases are complementing enzymes that catalyze the hydrolysis of terminal nonreducing α -1,2-, α -1,3-, and α -1,5-L-arabinofuranosyl residues^{1,4,6} and act in combination with other enzymes to depolymerize arabinose-containing polysaccharides.^{6–9}

Enzymatic hydrolysis of polysaccharides has been successfully used in several industrial processes^{5,10} including pulp and paper bleaching,^{11,12} production of oligosaccharides,¹³ and pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production.^{4,14} The ability of extremophilic enzymes to maintain their function under extreme conditions plays a key role in organism survival at physically or geochemically extreme environments and is of great importance for biotechnological processes, in which harsh conditions are required.¹⁵ Moreover, elevated temperatures result in higher reaction velocities, reduced risk of contamination and enhanced substrate solubility,¹⁶ thus, highlighting

the advantages of the use of thermostable enzymes in industrial processes.

Thermotoga petrophila (*T. petrophila*) RKU-1 is a hyperthermophilic bacterium isolated from the Kubiki oil reservoir in Japan¹⁷ whose thermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase was functionally characterized.¹⁸ TpAraF displays an optimal activity at 65°C, pH 6.0 and remains active for several hours at 90°C.¹⁸ Herein, we have structurally characterized TpAraF using X-ray crystallography, small angle X-ray scattering (SAXS) and spectroscopy, providing data regarding protein stability, oligomerization and describing a unique motif in TpAraF, which modifies the active-site pocket.

Results and Discussion

β -hairpin motif modifies the active site of *Thermotoga* GH51 AraFs

The structure of TpAraF was solved at 3.1 Å resolution (Table 1) by molecular replacement method using the atomic coordinates of the α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6 (PDB ID: 1PZ3).¹⁹ TpAraF comprises 484 amino acid residues folded into two domains: a catalytic domain with the frequently encountered (α/β)-barrel architecture and a C-terminal domain with a β -sandwich fold (Fig. 1A). Among GH51 α -L-arabinofuranosidases (GH51 AraFs) with known three-dimensional

T1

AQ2

F1

Table 1. Data Collection and Refinement Statistics

	Data collection
Beamline	W01B-MX2, LNLS
Wavelength (Å)	1.459
Space group	P 2 ₁
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 105.95, b = 187.29, c = 180.87, \beta = 90.87$
Resolution range (Å)	29.87–3.00 (3.11–3.10)
No. of unique reflections	137,752 (13,341)
Multiplicity ^a	3.1 (2.9)
Completeness (%)	97.0 (89.5)
$\langle I/\sigma \rangle$	7.4 (2.0)
R_{merge}^b (%)	12.4 (45.4)
Matthews coefficient (Å ³ .Da ⁻¹)	2.7
Corresponding solvent (%)	54.7
Model refinement	
Protein data bank ID	3S2C
Number of protein chains	12
Number of water molecules	433
R_{work}^c (%)	19.5
R_{free} (%)	26.8
R.m.s.d. from ideal bond lengths (Å)	0.010
R.m.s.d. from ideal angles (°)	1.389
Average B-factor (Å ²)	45.6
Ramachandran plot	
Most favored regions (%)	90.6
Allowed regions (%)	8.0
Disallowed regions (%)	1.3

^a Values for the outermost resolution shell are given in parentheses.

^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of the i th observation of reflection hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average over all observations of reflection hkl .

^c $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$, where F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure-factor amplitudes, respectively. R_{free} is R_{work} calculated using 5% of the data that were omitted from refinement.

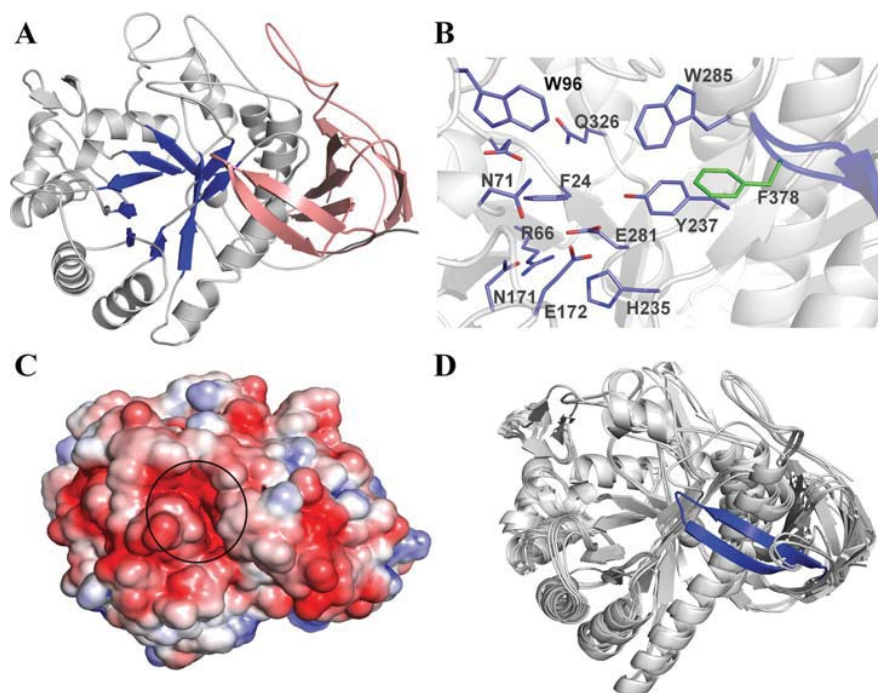


Figure 1. The structure of the GH51 α -L-arabinofuranosidase from *T. petrophila* (TpAraF). **(A)** Cartoon representation of the two-domain architecture of TpAraF, which consists of a (α/β)-barrel domain (gray; β -strands highlighted in blue) fused to a C-terminal domain with a β -sandwich fold (pink). **(B)** Active-site residues of TpAraF (carbon atoms in blue) highlighting the presence of the residue F378 (carbon atoms in green) from the accessory domain. **(C)** Surface electrostatic potential of TpAraF. The colors red, white, and blue indicate negative, neutral, and positive charges, respectively. The circle indicates the active-site pocket. **(D)** Superposition of TpAraF structure on GH51 AraFs from *G. stearothermophilus* (PDB ID: 1PZ3), *C. Thermocellum* (PDB ID: 2C7F) and *T. xylanilyticus* (PDB ID: 2VRK). The β -hairpin motif, unique to *Thermotoga* sp., is shown in blue.

AQ5

structure,^{19–21} the (α/β)-barrel domain (residues 1–359) is conserved. The key residues found in the active site of GH51 AraFs have already been determined¹⁹ and those residues (F24, E26, R66, N71, W96, N171, E172, H235, Y237, E281, W285, and Q326; TpAraF numbering) are fully conserved in TpAraF (Fig. 1B). Analysis of the electrostatic surface distribution showed a negatively charged surface around the active site (Fig. 1C) that is highly populated by acidic residues and is strictly required for substrate recognition.

Despite the high conservation of the catalytic domain and the residues involved in the catalysis, TpAraF contains an insertion of a β -hairpin motif between the β 1 and β 2 elements of the accessory domain that is not observed in other GH51 AraFs with known structures (Fig. 1D). This motif is stabilized by a number of hydrophobic contacts with the parental catalytic domain and modifies the active site in volume and shape. Notably, the long β -hairpin delivers the residue F378 at the entrance of the active site forming with other aromatic gate-keepers (W96, Y174, W177, Y237, and W285) the carbohydrate-binding site (Fig. 1B). Interestingly, sequence alignment showed that this insertion is unique to *Thermotoga* suggesting an exclusive evolutionary feature

in these organisms (Supporting Information, Fig. S1 and Table S1).

***TpAraF* is a hexamer under optimum temperature for catalysis**

Twelve molecules of TpAraF were found in asymmetric unit that corresponds to two hexamers. Since the TpAraF crystallographic structure suggests a hexameric quaternary structure, SAXS measurements at 65°C were performed to evaluate the biological assembly under optimum temperature for catalysis. The experimental SAXS curve and pair-distance distribution function $p(r)$ for TpAraF are displayed in Figure 2 and were calculated by GNOM.²² The gyration radius (R_g) calculated from SAXS is 4.55 ± 0.01 nm and agrees with the crystallographic hexamer.

The low-resolution envelope of TpAraF was determined using the program DAMMIN.²³ An averaged model was generated from several runs using the suite of programs DAMAVER.²⁴ The theoretical scattering curve, calculated from the crystallographic hexamer (CRY SOL program²⁵), showed to be very similar to the experimental SAXS data supporting the observed hexamer.^{19–21}

F2
AQ3

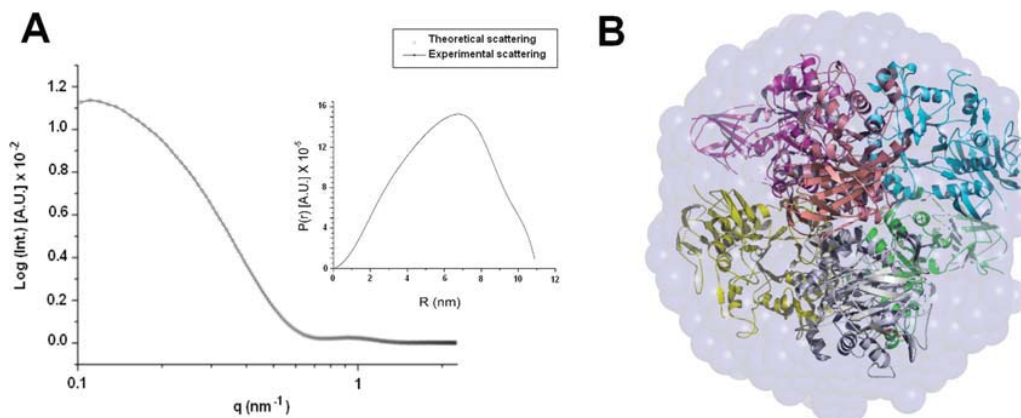


Figure 2. Oligomerization of TpAraF. **(A)** Scattering curve and pair-distance distribution function $p(r)$ (inset) for TpAraF at 65°C. **(B)** Cartoon representation of the crystallographic hexamer (colored by subunits) fitted into the SAXS envelope (transparent surface).

The crystallographic hexamer is $\sim 117 \text{ \AA}$ in diameter and can be viewed as a dimer of trimers, similar to what was observed with other GH51 AraFs.^{19–21} Each subunit makes multiple intermolecular contacts with other three subunits of the hexamer, which is the structural basis for high thermal tolerance of the biological assembly. Each intermolecular interface comprises $\sim 700 \text{ \AA}^2$ that is relatively small and cannot be attributed as stable; however, taking into account all interfaces they result in $\sim 2,400 \text{ \AA}^2$, which is coherent with the experimental observed stability. The key residues involved in hexamer stabilization are H77, E99, D132, N146, Y148, E176, H181, E186, R189, K192, E193, K196, E255, K261, K262, and K363 (Supporting Information, Figure S2). Although the intermolecular interfaces are conserved among GH51 AraFs from *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermobacillus xylanilyticus* (*T. xylanilyticus*), and *Clostridium thermocellum* (*C. Thermocellum*), the residues involved in the oligomerization of TpAraF are predominantly polar and participate in the formation of salt bridges and hydrogen bonds, which are considered essential for thermal stability (Supporting Information, Table S2).

Since the hexameric assembly is stabilized by salt bridges and hydrogen bonds, TpAraF stability was investigated by dynamic light scattering (DLS) and circular dichroism (CD) spectroscopy in the presence of different concentrations of NaCl (0, 1, 2, and 3 M). Far-UV CD spectra showed that TpAraF remains folded in all tested conditions with no significant loss in the secondary structure contents (Supporting Information, Fig. S3). DLS data indicate that the size distribution profile of TpAraF remains the same in all tested conditions (data not shown) and thus, despite the large contribution of electrostatic interactions in the oligomerization, high salt concentrations do not destabilize the hexamer. These

results strongly suggest that the TpAraF hexamer is biologically relevant, first observed in the crystal structure and later confirmed with SAXS, CD, and DLS as remaining intact and active in solution even under high salt conditions and temperature, indicating that the hexamer is a natural occurrence and necessary for proper enzymatic function. It remains to be determined how six catalytic centers act on hydrolyzing arabinofuranosidic bonds on branched arabinoxylan molecules.

Material and Methods

Protein expression and purification

TpAraF was expressed and purified as previously described.¹⁸ Briefly, *Escherichia coli* BL21(DE3) Δ -SlyD cells harboring plasmid pRARE2 were transformed with pET28a/TpAraF plasmid and plated in selective solid LB medium. Induction was performed with 0.5-mM IPTG at 30°C for 4 h. Harvested cells were resuspended in lysis buffer (20-mM sodium phosphate pH 7.5, 500-mM NaCl, 5-mM imidazole, 1-mM benzamidine and 5-mM PMSF) and lysed by sonication. The soluble fraction was further submitted to nickel-affinity and size-exclusion chromatographies. The purified TpAraF was analyzed by SDS-PAGE and protein concentration was determined at 280 nm using the molar extinction coefficient ($94,115 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

SAXS measurements

SAXS data were collected at the D02A/SAXS2 beamline (Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil). The radiation wavelength was set to 1.48 Å and a 165-mm MarCCD detector was used to record the scattering patterns. Protein samples were prepared in 20-mM sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 150-mM NaCl. Before X-ray exposure,

the samples were centrifuged at 20,000 g for 10 min. SAXS measurements were carried out at the optimum temperature for catalysis (65°C). Frames with exposure time of 600 s were recorded. Background scattering was subtracted from the protein scattering pattern, which was then normalized and corrected. Experimental data fitting and evaluation of the pair-distance distribution function $p(r)$ were performed using the program GNOM.²² The low-resolution envelope of TpAraF was determined using ab initio modeling as implemented in the program DAMMIN.²³ An averaged model was generated from several runs using the suite of programs DAMAVER.²⁴ The low-resolution model and the atomic coordinates were superimposed using the program SUPCOMB.²⁶

Crystallization, structure determination, and refinement

Crystals of TpAraF were grown in 100-mM bis-Tris pH 5.5, 200-mM ammonium acetate, 40%(v/v) MPD and 1%(v/v) dioxane and submitted to X-ray diffraction at the W01B-MX2 beamline (Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil) as previously mentioned.¹⁸ Data were indexed, integrated, merged, and scaled using the HKL2000 package.²⁷ TpAraF structure was solved by molecular replacement method using the program BALBES²⁸ and the atomic coordinates of the α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6 (PDB ID: 1PZ3).¹⁹ The model was examined and manually fitted based on the 2Fo-Fc and Fo-Fc electron density maps using the program COOT.²⁹ Isotropic restrained refinement was performed using the program REFMAC5.³⁰ Model quality was assessed using MOLPROBITY.³¹ Data collection and refinement statistics are shown in Table 1.

References

- Saha BC (2000) Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18:403–423.
- de Vries RP, Visser J (2001) Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:497–522.
- Rahman AKMS, Kato K, Kawai S, Takamizawa K (2003) Substrate specificity of the alpha-L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. *Carbohydr Res* 338:1469–1476.
- Saha BC, Bothast RJ (1998) Purification and characterization of a novel thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol* 64:216–220.
- Shallom D, Belakhov V, Solomon D, Gilead-Gropper S, Baasov T, Shoham G, Shoham Y (2002) The identification of the acid-base catalyst of alpha-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. *FEBS Lett* 514:163–167.
- Sozzi GO, Greve LC, Prody GA, Labavitch JM (2002) Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate alpha-L-Arabinofuranosidase activities in anti-sense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiol* 129:1330–1340.
- Margolles-Clark E, Tenkanen M, Nakari-Setälä T, Penttilä M (1996) Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 62:3840–3846.
- Spagna G, Barbagallo RN, Casarini D, Pifferi PG (2001) A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme Microb Technol* 28:427–438.
- Takao M, Akiyama K, Sakai T (2002) Purification and characterization of thermostable endo-1,5-alpha-L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 68:1639–1646.
- Rye CS, Withers SG (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 5:73–80.
- Gomes J, Gomes II, Terler K, Gubala N, Ditzelmüller G, Steiner W (2000) Optimisation of culture medium and conditions for alpha-L-Arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Enzyme Microb Technol* 27:414–422.
- Mai V, Wiegel J, Lorenz WW (2000) Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase-arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Gene* 247:137–143.
- Rémond C, Plantier-Royon R, Aubry N, Maes E, Bliard C, O'Donohue MJ (2004) Synthesis of pentose-containing disaccharides using a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase. *Carbohydr Res* 339:2019–2025.
- Saha BC (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:279–291.
- Friedrich AB, Antranikian G (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl Environ Microbiol* 62:2875–2882.
- Béguin P, Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 13:25–58.
- Takahata Y, Nishijima M, Hoaki T, Maruyama T (2001) *Thermotoga petrophila* sp. nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1901–1909.
- Santos CR, Squina FM, Navarro AM, Oldiges DP, Leme AFP, Ruller R, Mort AJ, Prade R, Murakami MT (2011) Functional and biophysical characterization of a hyperthermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila*. *Biotechnol Lett* 33:131–137.
- Hövel K, Shallom D, Niefind K, Belakhov V, Shoham G, Baasov T, Shoham Y, Schomburg D (2003) Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 alpha-L-arabinofuranosidase. *EMBO J* 22:4922–4932.
- Taylor EJ, Smith NL, Turkenburg JP, D'Souza S, Gilbert HJ, Davies GJ (2006) Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, AraF51, from *Clostridium thermocellum*. *Biochem J* 395:31–37.
- Paës G, Skov LK, O'Donohue MJ, Rémond C, Kastrup JS, Gajhede M, Mirza O (2008) The structure of the complex between a branched pentasaccharide and *Thermobacillus xylanilyticus* GH-51 arabinofuranosidase reveals xylan-binding determinants and induced fit. *Biochemistry* 47:7441–7451.
- Svergun DI (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Cryst* 25:495–503.

AQ4

23. Svergun DI (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* 76:2879–2886.
24. Volkov VV, Svergun DI (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Cryst* 36:860–864.
25. Svergun DI, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRY SOL - a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* 28:768–773.
26. Kozin MB, Svergun DI (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Cryst* 34:33–41.
27. Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 276:307–326.
28. Long F, Vagin AA, Young P, Murshudov GN (2008) BALBES: a molecular-replacement pipeline. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64:125–132.
29. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126–2132.
30. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240–255.
31. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:12–21.



Author Proof

AQ1: Please check whether all the affiliations are OK as typeset.

AQ2: Please identify any Protein Data Bank (PDB) identification codes referenced within your article so that the codes can be linked to the FirstGlance in Jmol in the final published online version of your article. PDB ID codes referenced in the main text, figure captions and/or tables should be highlighted for easy identification.

AQ3: Please spell out GNOM and PMSF.

AQ4: Please provide volume number for Ref. 10.

AQ5: Please note that it is the policy of this journal to charge authors for the additional cost of reproducing color figures in the printed version of the journal. Authors wishing to have figures printed in color in the journal need to fill out the enclosed color reproduction form.

AQ6: Please check whether the grant information is OK as typeset.



Author Proof