

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Evandro Ares de Araújo

Caracterização estrutural e funcional de uma xiloglucanase de
Xanthomonas campestris

São Carlos

2013

Evandro Ares de Araújo

Caracterização estrutural e funcional de uma xiloglucanase de
Xanthomonas campestris

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov e Rubens Bernardes Filho

Versão Original

São Carlos

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A663ce

Araújo, Evandro Ares de.

Caracterização estrutural e funcional de uma xiloglucanase de *Xanthomonas campestris* / Evandro Ares de Araújo. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

92 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Bactérias. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Evandro Ares de Araújo

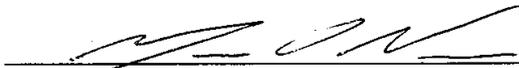
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 25/07/2013

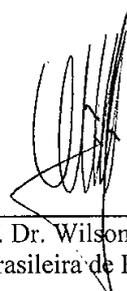
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Igor Polikarpov (Orientador)
(Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho")



Prof. Dr. Wilson Malagó Junior
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

À minha mãe, Maria, por ser uma mulher forte e sem igual. Ao meu pai, José, por sua simplicidade e dedicação à família.

AGRADECIMENTOS

Aos Prof. Dr. Igor Igor Polikarpov e Rubens Bernardes Filho, por terem aceitado me orientar;
ao Professor Igor por todo o apoio sempre reservado a mim;

À miha mãe, Maria, em nome da qual agradeço a todos meus familiares;

Aos técnicos do Grupo de Biotecnologia Molecular Maria, Lívia, Josimar e João. Agradeço grandemente à Lívia por sua atenção e constante ajuda nas dúvidas de biologia molecular;

Ao professor Paulo Daniel (DF-UFSCar), com quem aprendi um pouco de Mecânica Estatística;

À Universidade de São Paulo e a Universidade Federal Federal de São Carlos, por me possibilitarem toda a estrutura necessária à minha pesquisa;

Ao Atílio, Marco Antonio, Antonio e Renata, por sempre estarem comigo quando precisei. Particularmente agradeço sem medidas ao Atílio por aceitar a tarefa nada fácil de ensinar biologia molecular para uma pessoa que nada sabia;

Aos professores e atuais amigos com quem sempre pude contar em todos os aspectos, Akira, Lilian, Mauro e Claudio. Ao Claudio agradeço por sua presença constante, como também pelo incentivo e amizade perene.

Ao Mário Murakami, por ser sempre atencioso nas vezes que pudemos discutir cristalografia;

À André e Fábio (CTBE);

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto;

Aos colegas da sala 15: Atilio, Marco, Bachega, Antonio, Maluf, Jademilson, Vanessa e André. Aos colegas do laboratório: Ana, Caio, Amanda Bernardes, Amanda Câmara, Reginaldo, Segato, Marcelo, Ivani, Ivan, Cesar, Thaís. Em nome desses agradeço aos outros que por ventura não lembrei aqui.

Aos professores Dulce Helena, João Renato, Mário Neto, Julio Zukerman-Schpector e Igeez Caracelli;

À Marcos Buckeridge e Amanda de Souza;

Ao LNLS, LNBio e CTBE pela infraestrutura para realização dos experimentos;

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“Um galo sozinho não tece uma manhã:
ele precisará sempre de outros galos.
De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro; de um outro galo
que apanhe o grito de um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
os fios de sol de seus gritos de galo,
para que a manhã, desde uma teia tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos (...).”
João Cabral de Melo Neto (1920-1999).

RESUMO

DE ARAUJO, E. A. **Caracterização estrutural e funcional de uma xiloglucanase de *xanthomonas campestris***. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

Xiloglucanases (Xghs) são enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal pela modificação do polissacarídeo xiloglucano. *Xanthomonas campestris* (*Xcc*) é uma bactéria fitopatogênica que produz um grande número de hidrolases de glicosídeos (GH) e apenas uma GH da família 74. Uma xiloglucanase *Xcc*-Xgh da família GH 74 foi clonada e expressa de forma heteróloga em *E. coli*. A enzima recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade Ni-NTA e separação por exclusão molecular. Essa enzima tem maior estabilidade funcional na temperatura 40 °C e pH 5,3; é específica para a hidrólise de xiloglucano e sua atividade específica determinada foi 9,31U/mg. Por meio de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foi possível determinar para duas diferentes construções desta enzima, uma com mutação e outra sem mutação, as curvas de estabilidade térmica diferentes para cada uma delas; isso reforça a estreita relação entre estrutura e função da presente enzima. Após a cristalização, conjuntos de dados de difração foram coletados para a enzima na forma apo e dois complexos com glicose na resolução máxima de 2,0, 2,1 e 2,7 Å, respectivamente. Os dados foram indexados no sistema cristalino hexagonal, com os parâmetros de célula unitária $a=b=153,4$ Å e $c=84,9$ Å. Os resultados do escalonamento indicam que os cristais pertencem ao grupo espacial $P6_1$ ou o seu enantiômero $P6_5$. A determinação estrutural por substituição molecular deixou claro que o verdadeiro grupo espacial é $P6_1$. Os ligantes de glicose obtidos por “soaking” com glicose pura e produtos da hidrólise de xiloglucano podem estar correlacionados com a atividade catalítica desta enzima. A determinação da estrutura tridimensional, como também os resultados funcionais, contribuem para a compreensão da maquinaria molecular das enzimas membros da família GH 74 e lança novas perspectivas estruturais sobre o modo de ação das xiloglucanases em polissacarídeos de xiloglucano.

Palavras-chave: Xiloglucanases, *Xanthomonas campestris*, Enzimas.

ABSTRACT

DE ARAUJO, E. A. **Structural and functional characterization of a xyloglucanase from *Xanthomonas campestris***. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

Xyloglucanases (Xghs) are important enzymes involved in xyloglucan modification and degradation. *Xanthomonas campestris* (Xcc) is a phytopathogenic bacterium which produces a large number of glycosyl hydrolases (GH), but has only one family 74 GH (Xcc-Xgh). A Xcc-Xgh xyloglucan-specific *endo*- β -1,4-glucanase from family GH74 has been cloned from the *Xanthomonas campestris* by expression cloning in *E. coli*. The recombinant enzyme was purified by resin another Ni-NTA column and gel permeation chromatography. The recombinant Xcc-Xgh is stable at pH of 5.3 and temperature below 40°C; the specific activity this enzyme were determined such as 9.31U/mg protein. This enzyme was purified and crystallized. Diffraction datasets were collected for native enzyme and its two complexes with glucose at maximum resolution of 2.0, 2.1 and 2.7 Å, respectively. Data were indexed in the hexagonal crystalline system with unit-cell parameters a=b=153.4 and c=84.9 Å. Data scaling indicated that crystals belong to either space group P6₁ or its enantiomorph P6₅. Translation search in molecular replacement calculations solved the space group ambiguity (P6₁) and the structure refinement is currently in progress. That elucidation of the three-dimensional structure by SAXS and Crystallography of this enzyme will increase our understanding of structure–function relationships of the GH74 family members and might provide new structural insights about xyloglucanases mode of action on xyloglucan polysaccharides.

Keyword: Xyloglucanase, *Xanthomonas campestris* ., Enzyme.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PAREDE CELULAR DE PLANTAS MOSTRANDO A ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE LIGNINAS, CELULOSE E HEMICELULOSE NA MATRIZ DA PAREDE CELULAR DE VEGETAIS. ADAPTADO (PARK; COSGROVE, 2012). EM VERMELHO É MOSTRADO A HEMICELULOSE, EM FORMA DE “BASTÃO” É MOSTRADO A CELULOSE E EM CINZA A LIGNINA..... 29
- FIGURA 2- ESTRUTURA BÁSICA DO XILOGLUCANO BASEADA EM CÓDIGO DE LETRAS. NESTA FIGURA, SÃO MOSTRADAS AS PRINCIPAIS RAMIFICAÇÕES DO XILOGLUCANO TOMANDO COMO REFERÊNCIA A CADEIA PRINCIPAL DE GLICOSE. ENDOGLUCANASES, INCLUINDO GH 74, TÍPICAMENTE CLIVAM A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA DO RESÍDUO DE GLICOSE NÃO RAMIFICADO (SETA) GERANDO OLIGOSSACARÍDEOS. AS FORMAS MAIS COMUNS NO CASO DO XILOGLUCANO DA SEMENTE DE TAMARINDO INCLUEM XXXG (X = 0, Y = 0, R = H), XLXG (X = 1, Y = 0, R = H), XXLG (X = 0, Y = 1, R = H) E XLLG (X = 1, Y = 1, R = H), ENQUANTO QUE PARA AS DICOTILEDÔNEAS É XXFG (X = 0, Y = 1, R = FUCOSE). ADAPTADO (MARTINEZ-FLEITES ET AL., 2006)..... 31
- FIGURA 3- DESENHO DO MODELO DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA, NA QUAL O XILOGLUCANO (FIOS FINOS) LIGA-SE À SUPERFÍCIE DAS MICROFIBRILAS DE CELULOSE (BARRAS GROSSAS), FORMANDO UMA MATRIZ DE SUPORTE DA CÉLULA VEGETAL. O SEMICÍRCULO (PARTE SUPERIOR ESQUERDA) EM AMARELO REPRESENTA AS ENZIMAS XILOGLUCANASES. RETIRADO (PARK; COSGROVE, 2012). 35
- FIGURA 4 - MODELO HIPOTÉTICO DA AÇÃO DAS XILOGLUCANASES RETRATADO COMO O ENTRELAÇAMENTO DE GLUCANOS (EM PRETO) DESORDENADOS ÀS MICROFIBRILAS (VERMELHO) E O RESPECTIVO ALONGAMENTO DA PAREDE. RETIRADO (PARK; COSGROVE, 2012)..... 36
- FIGURA 5 - RELAÇÃO DOS TIPOS DE ENVELAMENTOS ESTRUTURAL DESCRITOS PARA AS ENZIMAS CARACTERIZADAS COMO XILOGLUCANASES. RETIRADO (GILBERT; STÅLBRAND; BRUMER, 2008). ... 36

| | |
|--|----|
| FIGURA 6 – ENOVELAMENTO CARACTERÍSTICO DA FAMÍLIA GH 74. EM A TEM-SE UMA VISÃO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DESTAS ENZIMAS. EM A E EM B TEM-SE A ESTRUTURA DE GH74 COM UM HEPTASSACARÍDEO NO SEU SÍTIO ATIVO. NA FIGURA À ESQUERDA É MOSTRADO A DISPOSIÇÃO DO HEPTASSACARÍDEO DE XILOGLUCANO QUANDO INTERAGE COM O SÍTIO CATALÍTICO; NA FIGURA CENTRAL É MOSTRADO QUE ESSE HEPTASSACARÍDEO É CLIVADO INTERNAMENTE NO RESÍDUO DE GLICOSE NÃO RAMIFICADO; À DIREITA É MOSTRADO, AINDA, ESSE MESMO HEPTASSACARÍDEO NO SÍTIO CATALÍTICO DA GH74 MOSTRANDO QUE O OLIGOSSACARÍDEO DE FATO FICA ENTRE OS DOIS DOMÍNIOS QUE FAZEM A INTERFACE CATALÍTICA. RETIRADO (MARTINEZ-FLEITES ET AL., 2006)..... | 38 |
| FIGURA 7 – FIGURAS A E B MOSTRAM A SUPERFÍCIE DAS GH 74 COM A REGIÃO DO SÍTIO ATIVO INTERAGINDO COM O SUBSTRATO. EM A UMA TÍPICA ENDOXILOGLUCANASE, EM B UMA TÍPICA EXOXILOGLUCANASE. RETIRADO DE (MARTINEZ-FLEITES ET AL., 2006). EM AZUL É MOSTRADO O HEPTASSACARÍDEO DE XILOGLUCANO LIGADO NO SÍTIO CATALÍTICO DA ESTRUTURA DAS GH 74 OBTIDAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X. EM VERMELHO É MOSTRADO A REGIÃO PREDITA COMO RESPONSÁVEL PELA AÇÃO EXOXILOGLUCANASE..... | 39 |
| FIGURA 8 - ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA “SIGNALP 4.0”. EM “A” A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS COM 751 RESÍDUOS COM PEPTÍDEO SINAL E EM “B” SEM PEPTÍDEO SINAL..... | 51 |
| FIGURA 9 – ALINHAMENTO MOSTRANDO REGIÕES MAIS CONSERVADAS EM ALGUMAS GH 74 EM A, B E C..... | 53 |
| FIGURA 10 – ALINHAMENTO MOSTRANDO REGIÃO NÃO CONSERVADA EM CERTAS GH 74 EM TERMOS DE IDENTIDADE SEQUENCIAL ENTRE ALGUNS REPRESENTANTES DA FAMÍLIA GH 74. | 53 |
| FIGURA 11 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANASE DE <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> XCC-XGH (T1_A). NO SENTIDO DA ESQUERDA PARA A DIREITA, TEM-SE: O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (M), O EXTRATO DE PROTEÍNAS ANTES DA INDUÇÃO (1), O EXTRATO DE PROTEÍNAS APÓS A INDUÇÃO (2), PÉLETE DA LISE CELULAR (3), SOBRENADANTE DA LISE CELULAR (4), PORÇÃO NÃO LIGADA À RESINA DE | |

NÍQUEL – VOID (5), LAVAGEM DA PORÇÃO LIGADA À RESINA DE NÍQUEL COM 10 MM DE IMIDAZOL (6), ELUIÇÃO COM 100 MM DE IMIDAZOL (7), ELUIÇÃO COM 200 MM DE IMIDAZOL (8) E ELUIÇÃO COM 300 MM DE IMIDAZOL (9); AS COLUNAS DE 10 A 18 EQUIVALEM ÀS COLUNAS DE 1 A 9. A COLUNA “M” ESTÃO OS MARCADORES DE PESO MOLECULAR ALBUMINA BOVINA (66KDA), OVOALBUMINA (45KDA), GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (36KDA), ANIDRASE CARBÔNICA (29KDA), TRIPSINOGENIO DE PÂNCREAS BOVINO (24KDA), INIBIDO DE TRIPSINA DE SOJA(20,1KDA) E A-LACTALBUMINA DE LEITE BOVINO (14,2KDA) 55

FIGURA 12 - GEL FILTRAÇÃO DE CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO DA XCC-XGH SUPERDEX 75 HILOAD 10/30. EM “A” SÃO MOSTRADAS AS FRAÇÕES DO PICO DO CROMATOGRAMA. EM “B”, COLUNA “M” ESTÃO OS MARCADORES DE PESO MOLECULAR ALBUMINA BOVINA (66KDA), OVOALBUMINA (45KDA), GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (36KDA), ANIDRASE CARBÔNICA (29KDA), TRIPSINOGENIO DE PÂNCREAS BOVINO (24KDA), INIBIDO DE TRIPSINA DE SOJA(20,1KDA) E A-LACTALBUMINA DE LEITE BOVINO (14,2KDA). NA COLUNA 1, TEMOS A PROTEÍNA XCC-XGH ANTES DA CLIVAGEM E NA COLUNA 2 APÓS A CLIVAGEM. 56

FIGURA 13- PAINEL DE SUBSTRATOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE RELATIVA DE XCC-XGH PARA A CONSTRUÇÃO T2. 58

FIGURA 14- ESPECTROS DE ELETROFORESE CAPILAR PROVENIENTES DA HIDRÓLISE DE HEPTA-(XXXG), OCTA (XXLG), NONASSACARÍDEO (XLLG) DE XILOGLUCANO E DO CARBOIDRATO DE XILOGLUCANO. 60

FIGURA 15 – CRISTAIS DE XCC-XGH OBTIDOS DURANTE A CONDIÇÃO INICIAL DE CRISTALIZAÇÃO (A) E DEPOIS DA OTIMIZAÇÃO (B). 62

FIGURA 16 – PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X PARA TODOS OS CONJUNTOS DE DADOS COLETADOS. EM A, PARA A PROTEÍNA APO, EM B PARA O CONJUNTO GLICOSE (A) E C PARA O CONJUNTO GLICOSE (B). 63

FIGURA 17 – DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN PARA A ESTRUTURA DE XCC-XGH APO. OS PONTOS EM ROSA INDICAM OS RESÍDUOS QUE ESTÃO FORA DAS REGIÕES PERMITIDAS NO DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN. 65

FIGURA 18 – DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN PARA A ESTRUTURA DE XCC-XGH COMPLEXADO COM GLICOSE (A). OS PONTOS EM ROSA INDICAM OS

| | |
|--|----|
| RESÍDUOS QUE ESTÃO FORA DAS REGIÕES PERMITIDAS NO DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN. | 66 |
| FIGURA 19 – DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN PARA A ESTRUTURA DE XCC-XGH COMPLEXADO COM GLICOSE (B). OS PONTOS EM ROSA INDICAM OS RESÍDUOS QUE ESTÃO FORA DAS REGIÕES PERMITIDAS NO DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN | 67 |
| FIGURA 20 - MODELO CRISTALOGRAFICO DA PROTEÍNA XCC-XGH. IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PRESENTES NO MODELO. A, MODELO CRISTALOGRAFICO EM “CARTOON” E SUPERFÍCIE. B, MODELO CRISTALOGRAFICO EM SUPERFÍCIE E EM VERMELHO A REGIÃO DE SÍTIO CATALÍTICO. | 68 |
| FIGURA 21 - MODELO CRISTALOGRAFICO DA PROTEÍNA XCC-XGH (EM VIOLETA). ALINHAMENTO ESTRUTURAL COM 1SQJ (EM AMARELO). EM A TEM-SE O ALINHAMENTO ESTRUTURAL MOSTRADO O “EXOLOOP” (EM VERMELHO) ENTRE XCC-XGH E 1SQJ. EM B TEM-SE O ALINHAMENTO ENTRE XCC-XGH E 1SQJ COMPARANDO O “EXOLOOP” DE 1SQJ COM O “LOOP” DE XCC-XGH. OS NÚMEROS INDICAM A POSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS. | 69 |
| FIGURA 22 – EM A TEM-SE O ALINHAMENTO ESTRUTURAL COM XCC-XGH E 2CN2 MOSTRANDO A REGIÃO DE SÍTIO ATIVO DAS XILOGLUCANASES DA FAMÍLIA DAS GH 74. A, EM VIOLETA XCC-XGH, EM AMARELOS 2CN2 E EM VERMELHO OS “LOOPS” DE 2CN2 QUE MAIS SE DESTACAM EM RELAÇÃO AOS “LOOPS” DE XCC-XGH. B E C, COMPARAÇÃO DOS “LOOPS” DE XCC-XGH EM RELAÇÃO À 2CN2. OS NÚMEROS INDICAM A POSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS. | 70 |
| FIGURA 23 - ESTRUTURA DE XCC-XGH. EM A É MOSTRADO À ESQUERDA O RESÍDUO CATALÍTICO ASP 77 E À DIREITA O SEGUNDO RESÍDUO CATALÍTICO ASP 466. EM B É MOSTRADO QUE ESSES RESÍDUOS ESTÃO DIRECIONADOS PARA A REGIÃO DO SÍTIO ATIVO QUE ACOMODA O SUBSTRATO. EM C VÊ-SE O ALINHAMENTO SEQUÊNCIAL ENTRE XCC-XGH, 1SQJ E 2CN2. | 71 |
| FIGURA 24 - ESTRUTURA DE XCC-XGH COMPLEXADA COM GLICOSE. EM A, À ESQUERDA, TEM-SE UMA VISÃO GERAL DA LOCALIZAÇÃO DA GLICOSE NA MOLÉCULA DE PROTEÍNA COMO RESULTADO DO EXPERIMENTO DE | |

“SOAKING” POR GLICOSE 1M, À DIREITA É MOSTRADA A LOCALIZAÇÃO DA GLICOSE OBTIDA POR “SOAKING” USANDO O PRODUTO DE HIDRÓLISE DA AÇÃO DA XCC-XGH SOBRE XILOGLUCANO. EM B MOSTRA-SE AS COORDENAÇÕES DA GLICOSE EM RELAÇÃO A ALGUNS RESÍDUOS: À ESQUERDA O RESULTADO DO COMPLEXO XCC-XGH (A) E À DIREITA O RESULTADO DO COMPLEXO XCC-XGH (B). EM VERDE CLARO TEM-SE A FIGURA DE XCC-XGH (B) E EM ROSA TEM-SE A FIGURA DE XCC-XGH (A)... 72

FIGURA 25 - CURVAS DAS INTENSIDADES DE ESPALHAMENTO PARA A PROTEÍNA XCC-XGH EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. EM PRETO, TEM-SE O ESPALHAMENTO A 1 MG/ML; EM VERMELHO, TEM-SE O ESPALHAMENTO À 5 MG/ML E; EM AZUL, TEM-SE O ESPALHAMENTO À 13 MG/ML..... 74

FIGURA 26 – A, CURVAS DAS INTENSIDADES DE ESPALHAMENTO PARA A PROTEÍNA XCC-XGH EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ANALISADAS PELO GRÁFICO DE KRATKY; EM PRETO, TEM-SE O ESPALHAMENTO À 13 MG/ML; EM VERMELHO, TEM-SE O ESPALHAMENTO À 1 MG/ML E; EM AZUL, TEM-SE O ESPALHAMENTO À 5 MG/ML. B, CURVAS DAS INTENSIDADES DE ESPALHAMENTO PARA UMA PROTEÍNA EM ESTADOS CONFORMACIONAIS DISTINTOS: EM AZUL VÊ-SE O GRÁFICO DE KRATKY CARACTERÍSTICO PARA PROTEÍNAS TOTALMENTE ENOVELADAS, EM PRETO PARA PARCIALMENTE E EM VERMELHO PARA DESENOVELADAS (PUTNAM *ET AL.*, 2007). 74

FIGURA 27 - FUNÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DAS DISTÂNCIAS A PROTEÍNA XCC-XGH EM SOLUÇÃO..... 75

FIGURA 28 – SOBREPOSIÇÃO DAS INTENSIDADES COMPARANDO OS AJUSTES E MUDANÇAS DOS MODELOS GERADOS PELO DAMMIN E GASBOR REFERENTE À INTENSIDADE EXPERIMENTAL DA PROTEÍNA XCC-XGH EM SOLUÇÃO. 76

FIGURA 29 - SOBREPOSIÇÃO DO MODELO *AB INITIO* OBTIDO COM O PROGRAMA DAMMIN USANDO O MODELO CRISTALOGRAFICO DE XCC- XGH. 76

FIGURA 30 - GRÁFICO DE KRATKY DA PROTEÍNA MUTADA..... 77

FIGURA 31 - GRÁFICO DE KRATKY DA PROTEÍNA SEM MUTAÇÕES..... 78

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 OCORRÊNCIA DE HEMICELULOSE NAS PAREDES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS DE PLANTAS. QUANTIDADE DE POLISSACÁRIDO NA PAREDE (% M/M). A - NÚMEROS SÃO VALORES TÍPICOS; VALORES REAIS VARIAM ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES E TIPOS DE TECIDO. B E -, AUSENTE OU MENOR; +, PRESENTE, MAS OS DADOS QUANTITATIVOS NÃO ESTÃO DISPONÍVEIS. ADAPTADO (SCHELLER; ULVSKOV, 2010) | 30 |
| TABELA 2 - PRIMERS DESENHADOS PARA AS CONSTRUÇÕES DA GH74 DE <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> | 43 |
| TABELA 3 - TABELA 3 - PROPRIEDADES DA XCC-XGH E COMPARAÇÃO COM OUTRAS XILOGLUCANASES MEMBROS DA FAMÍLIA GH 74..... | 59 |
| TABELA 4 - DADOS CRISTALOGRAFICOS E DE PROCESSAMENTO DA PROTEÍNA XCC-XGH. OS DADOS ENTRE PARÊNTESES SE REFEREM À ÚLTIMA CAMADA DE RESOLUÇÃO..... | 63 |
| TABELA 5 - DADOS DE REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS..... | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i> |
| CAZy | <i>Carbohydrate-Active enZymes Database</i> |
| $D_{máx}$ | Dimensão máxima de uma proteína |
| B.N.L | <i>Brookhaven National Laboratory</i> |
| ExPASy | <i>Expert Protein Analysis System</i> |
| I | Intensidade de espalhamento de raios-X |
| IPTG | Isopropil-tio-B-D-galactopiranosídeo |
| LB | Luria-Bertani |
| L.N.L.S | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron |
| MM, M | Massa molecular |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| $p(r)$ | Função de distribuição de distâncias de centros espalhadores de raios-X |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| pI | Ponto isoelétrico |
| q | Módulo do vetor de espalhamento de raios-X |
| R_g | Raio de giro |
| SAXS | Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo, do inglês <i>Small angle X-ray scattering</i> |
| Xcc | <i>Xanthomonas campestris</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 27 |
| 1.1 Panorama Geral..... | 27 |
| 1.2 Material da Biomassa Vegetal..... | 28 |
| 1.3 Celulose..... | 29 |
| 1.4 Lignina..... | 29 |
| 1.5 Hemicelulose..... | 30 |
| 1.6 Xiloglucano..... | 31 |
| 1.7 Hidrolases de glicosídeos..... | 32 |
| 1.8 Celulases..... | 33 |
| 1.9 Hemicelulases..... | 33 |
| 1.10 Hidrolases de glicosídeos da família 74..... | 34 |
| 1.11 Xiloglucanases..... | 35 |
| 1.12 Modos de ação mais conhecidos..... | 36 |
| 1.13 Classificação estrutural..... | 37 |
| 1.14 Organismo <i>Xanthomonas campestris</i> | 40 |
| 2 Objetivos..... | 41 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 43 |
| 3.1 Análises por Bioinformática..... | 43 |
| 3.2 Amplificações gênicas..... | 43 |
| 3.3 Expressão e Purificação..... | 44 |
| 3.4 Caracterizações Bioquímica e Biofísica..... | 45 |
| 3.4.1 Ensaio de Atividades..... | 45 |
| 3.4.2 Eletroforese Capilar..... | 46 |
| 3.4.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)..... | 47 |
| 3.4.4 Cristalização e coleta de conjuntos de dados..... | 49 |
| 3.4.5 Determinação estrutural, Refinamento e Validação do Modelo..... | 50 |
| 4. Resultados e Discussão..... | 50 |
| 4.1 Análises por Bioinformática..... | 50 |
| 4.2 Amplificações gênicas..... | 54 |
| 4.3 Expressão e purificação..... | 54 |
| 4.4 Caracterizações Bioquímica e Biofísica..... | 57 |
| 4.4.1 Ensaio de Atividades..... | 57 |

| | |
|--|----|
| 4.4.2 Eletroforese Capilar | 60 |
| 4.4.3 Cristalização e coleta de conjuntos de dados | 62 |
| 4.4.4 Determinação estrutural, Refinamento e Validação do Modelo | 63 |
| 4.4.5 Modelo cristalográfico da proteína Xiloglucanase de <i>Xhantomonas campestris</i> | 67 |
| 4.4.6 Modelo cristalográfico da proteína Xiloglucanase complexado com Glicose e localização das mutações | 72 |
| 4.4.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)..... | 73 |
| 5. Conclusões | 79 |
| 7 Referências..... | 83 |

1. Introdução

1.1 Panorama Geral

Enzimas são biomoléculas que catalisam reações químicas específicas de grande importância em muitos campos da bioquímica e ciências da vida. São de grande interesse para a indústria biotecnológica, como também a de fármacos (ALCÁNTARA *et al.*, 2013). Enzimas são moléculas biológicas de diversificadas funções para a manutenção das reações e na maior parte das vezes especializadas para uma determinada reação (NAM *et al.*, 2012).

Quanto à sua obtenção, têm sido isoladas e purificadas a partir de microrganismos, animais e plantas, entre os quais os microrganismos representam a fonte mais comum de enzimas por causa da sua grande diversidade, viabilidade da cultura e facilidade de manipulação genética (ZHANG; KIM, 2010). É claro que isso depende em muito da finalidade de uso das enzimas.

No caso específico de enzimas que agem sobre a parede celular de plantas degradando-a, busca-se entender quais os mecanismos moleculares específicos usados para tal ação. A degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal é de grande importância nas indústrias de papel e têxtil, como também na produção do etanol de segunda geração; a degradação enzimática da parede celular de plantas tem recebido maior atenção recentemente em grande parte para elucidar as suas características estruturais e funcionais (DE VRIES; VISSER, 2001).

Certamente o entendimento estrutural das enzimas se deve, em grande, aos avanços da Cristalografia de raios-X. Os avanços iniciais nesta área se deram em grande parte pelos trabalhos pioneiros sobre a arquitetura da mioglobina (KENDREW *et al.*, 1960) e hemoglobina (PERUTZ *et al.*, 1960), como também a elucidação da estrutura 3D da dupla hélice do DNA (WATSON; CRICK, 1953). Além disso, o entendimento da radiação síncrotron e a construção de grandes Síncrotrons foram (e ainda são!) fundamentais para a determinação e elucidação de macromoléculas (MASSOVER, 2007). Particularmente, o Brasil atualmente projetou a construção de uma nova fonte de luz síncrotron, Sirius, com melhor desempenho que alguns dos melhores Síncrotron do mundo como Diamond - Reino Unido e SOLEIL – França (WADE, 2013; LIU *et al.*, 2013), o que certamente colocará a ciência brasileira em maior destaque no cenário internacional, principalmente na área de cristalografia de macromoléculas com a construção de estações experimentais voltadas para a difração de monocristais.

A importância desta técnica é validada pela quantidade de algumas dezenas de trabalhos laureados com Nobel nas mais diversas áreas da ciência (Física, Química, Biologia, Medicina), como mais recentemente por Kobilka (2012); Ramakrishnan, Steitz, e Yonath (2009); Kornberg (2006); Mackinnon (2003) e Walker (1997), (BOGAN, 2013).

Recentemente, os avanços mais promissores estão voltados ao espalhamento de raios-X em nanocristais (no inglês: X-ray free electron laser-XFEL), (SCHROER et al., 2008). Essa nova tecnologia tem as vantagens de superar os danos da radiação da amostra, permitindo uma abordagem à temperatura ambiente, além de os padrões de difração de micro ou nanocristais individuais serem obtidos quase em tempo real, principalmente no caso de moléculas que são difíceis de cristalizar e, portanto, é uma técnica que já se tornou muito valiosa para a cristalografia de macromoléculas (BARTY et al., 2011).

Focando a análise de proteínas e outros materiais biológicos em solução, o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (sigla em Inglês, SAXS) tem sido fundamental para a análise da estrutura da matéria condensada e suas aplicações em macromoléculas biológicas (SVERGUN; KOCH, 2002). Historicamente foi usado para medir o tamanho de moléculas, mas com o tempo, evoluiu como sendo uma técnica versátil na caracterização e quantificação das forças que governam o comportamento das biomoléculas em solução, com grande impulso devido ao uso da radiação Síncrotron, bem como dos recursos computacionais para interpretar as medidas de SAXS (FISCHER et al., 2009; SIMON, 2007).

1.2 Material da Biomassa Vegetal

A matéria vegetal oriunda dos processos de fotossíntese das plantas está relacionada com o acúmulo de carbono na biosfera Terrestre. Esse material vegetal denominado biomassa tem como constituinte básico açúcares que formam uma complexa rede na matriz da parede celular. Entretanto, para obter esses açúcares em suas formas monoméricas, é preciso a compreensão em escala molecular dos mecanismos físicos e químicos que permitem a disponibilização desse material da parede celular de vegetais (DING et al., 2012).

Quanto à diversidade, a biomassa é o principal componente seco da parede celular da planta, sendo constituído por celulose, hemicelulose e lignina, embora a proporção de cada um destes constituintes dependa fortemente do tipo e origem da planta nas proporções médias (m/m): 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e lignina 5-30% (JÄGER; BÜCHS, 2012). Esses materiais são reservas naturais e renováveis de estoque de carbono disponível na natureza.

1.3 Celulose

A celulose é um biopolímero de cadeia linear formado por uma “espinha” dorsal de resíduos de glicose unidas por ligações tipo β -1,4-glicosídicas, onde cada cadeia de celulose tem uma extremidade redutora e uma extremidade não redutora (KLEMM et al., 2005). As cadeias de celulose individuais são montadas em unidades maiores chamadas fibrilas elementares ou protofibrilas, as quais são organizadas em microfibrilas (JÄGER; BÜCHS, 2012). A ordem de disposição das microfibrilas leva à formação de uma estrutura altamente organizada e cristalina, porém, nem sempre a celulose tem uma forma completamente cristalina e, neste caso, passa a formar regiões amorfas em diversos graus e proporções (LYND et al., 2002). O conjunto de microfibrilas dá origem a uma estrutura macrofibrilar que é incorporada na matriz de hemicelulose e lignina para estabilizar a parede celular (GAÑÁN et al., 2007), Figura 1.

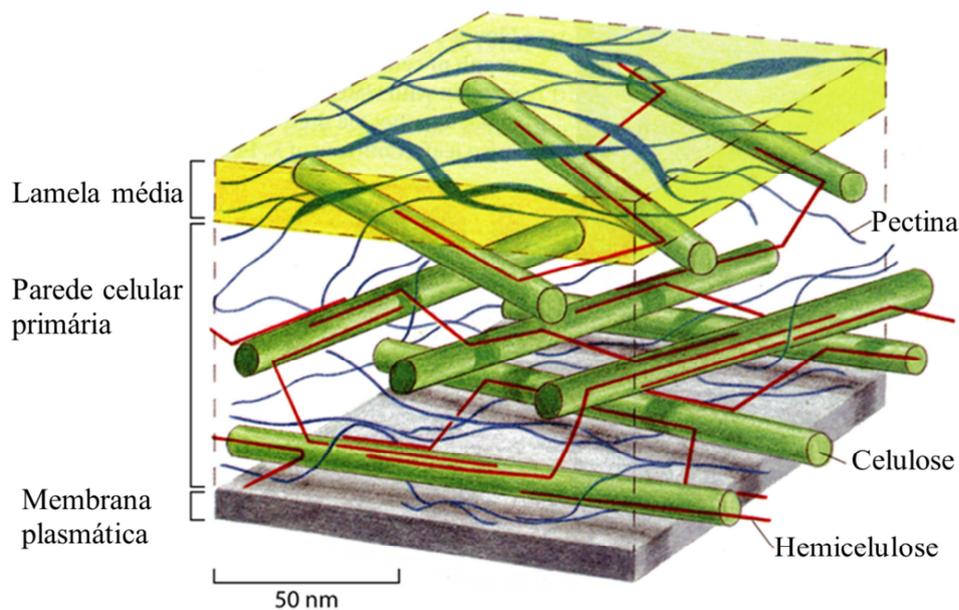


Figura 1: Organização estrutural da parede celular de plantas mostrando a organização estrutural entre ligninas, celulose e hemicelulose na matriz da parede celular de vegetais. Adaptado (PARK; COSGROVE, 2012). Em vermelho é mostrado a hemicelulose, em forma de “bastão” é mostrado a celulose e em cinza a lignina.

1.4 Lignina

Além do material celulósico e hemicelulósico, a lignina é um biopolímero com a função de aumentar a resistência da estrutura da parede celular. Funciona como uma barreira à ação de celulases e hemicelulases, mas pode ser removida pela ação de ligninases e

peroxidases, de modo a deixar as estruturas de celulose e hemicelulose susceptíveis para que possa ocorrer a sua hidrólise (LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

1.5 Hemicelulose

Outro componente da parede celular vegetal é a hemicelulose. Este é um polissacarídeo amorfo que depende da espécie da planta em particular quanto à diversidade na composição; seus polissacarídeos mais frequentes, quando hidrolisados, produzem: pentoses (D-xilose e L-arabinose); hexoses (D-galactose, D-glicose e D-manose) e ácido glucurônico (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Em termos de disposição espacial, a hemicelulose envolve as microfibrilas individuais e, desta maneira, junto com a lignina e celulose, confere estabilidade mecânica ao complexo formado e também impede a degradação das células da planta por agentes químicos e biológicos (DING et al., 2012; HAYASHI, 1989). A tabela 1 resume a ocorrência dos principais polissacarídeos hemicelulósicos da parede celular primária e secundária em algumas espécies de plantas.

Tabela 1 Ocorrência de hemicelulose nas paredes primárias e secundárias de plantas. Quantidade de polissacarídeo na parede (% m/m). a - Números são valores típicos; valores reais variam entre as diferentes espécies e tipos de tecido. b e -, ausente ou menor; +, presente, mas os dados quantitativos não estão disponíveis. Adaptado (SCHELLER; ULVSKOV, 2010)

| Polissacarídeos (%) | Parede de Dicotiledôneas (coníferas) | | Parede de Gramíneas | | Parede de Gimnospermas | |
|----------------------------|--------------------------------------|------------|---------------------|------------|------------------------|------------|
| | Primária | Secundária | Primária | Secundária | Primária | Secundária |
| Xiloglucano | 20–25 | Menor | 2–5 | Menor | 10 | –b |
| Glucuronoxilano | – | 20–30 | – | – | – | – |
| Glucuronoarabinoxilano | 5 | – | 20–40 | 40–50 | 2 | 5–15 |
| (Gluco)manano | 3–5 | 2–5 | 2 | 0–5 | – | – |
| Galactoglucomanano | – | 0–3 | – | – | +b | 10–30 |
| β -(1→3,1→4)-glucano | Ausente | Ausente | 2–15 | Menor | Ausente | Ausente |

Dentre os polissacarídeos de maior ocorrência da hemicelulose, além do xilano e glucomanano, o xiloglucano (XG) é um dos principais constituintes presentes nas paredes celulares de algumas plantas, principalmente na parede primária.

1.6 Xiloglucano

Presente principalmente em plantas superiores, 20-25%, e em pequenas quantidades, 2-5%, em gramíneas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010), como é o caso do bagaço da cana de açúcar, os xiloglucanos (XGs) representam grande importância como constituintes da parede celular de vegetais. Está relacionado com a arquitetura celular da matriz “celulose-hemicelulose-lignina”, sendo fundamental no crescimento de plantas superiores (HAYASHI, 1989). Na matriz da parede celular, os xiloglucanos formam uma rede complexa que interage com as microfibrilas de celulose, o que confere rigidez e a capacidade de extensão da parede celular de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006).

Estruturalmente, os XGs têm uma cadeia principal linear constituída por glicoses ligadas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) com hetero-ramificações (CARPITA; GIBEAUT, 1993; PENG et al., 2012), Figura 2. As ramificações podem ser de unidades de xilose, xilose-galactose ou xilose-galactose-fucose, dependendo da espécie vegetal (PARK; COSGROVE, 2012).

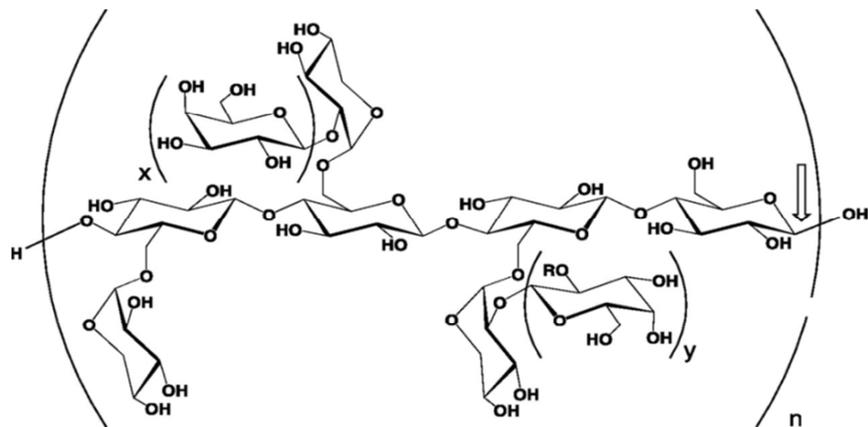


Figura 2- Estrutura básica do xiloglucano baseada em código de letras. Nesta figura, são mostradas as principais ramificações do xiloglucano tomando como referência a cadeia principal de glicose. Endoglucanases, incluindo GH 74, tipicamente clivam a ligação glicosídica do resíduo de glicose não ramificado (seta) gerando oligossacarídeos. As formas mais comuns no caso do xiloglucano da semente de Tamarindo incluem XXXG ($x = 0, y = 0, R = H$), XLXG ($x = 1, y = 0, R = H$), XXLG ($x = 0, y = 1, R = H$) e XLLG ($x = 1, y = 1, R = H$), enquanto que para as dicotiledôneas é XXFG ($x = 0, y = 1, R = \text{Fucose}$). Adaptado (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006).

A nomenclatura usual para denotar os xiloglucanos quando hidrolisados em seus oligossacarídeos consiste em tomar cada glicose da cadeia principal identificando-a de forma adequada de acordo com o último monossacarídeo ligado nesta: G se não estiver ligada a outro monossacarídeo, X se estiver ligada à xilose, L se a xilose estiver ligada a uma galactose e, F se esta galactose tenha uma fucose e, assim por diante (FRY et al., 1993).

Certamente os xiloglucanos são muito interessantes seja pelo aspecto estrutural, sua biossíntese e modificação enzimática, morfogênese da parede celular vegetal; quanto pelas suas aplicações tecnológicas na indústria farmacêutica, indústria de alimentos, indústria de papel, indústria têxtil, indústria agropecuária; aplicações biomédicas; como também na modificação da fibra de celulose, e principalmente na produção de biocombustíveis de segunda geração (MISHRA; MALHOTRA, 2009).

No entanto, para obter os constituintes da matéria lignocelulósica em polímeros mais simples, é necessário desagregar (desfazer) a intrincada e coesa matriz da parede celular vegetal. Essa ação pode ser realizada por agentes biológicos para a conversão à açúcares monoméricos. Uma abordagem que vem se mostrando promissora é o uso de enzimas denominadas hidrolases de glicosídeos (GHs) como agentes promotores da despolimerização da biomassa, as quais podem ser obtidas de variados microrganismos, tais, como bactérias e fungos.

1.7 Hidrolases de glicosídeos

A superfamília das hidrolases de glicosídeos (EC 3.2.1.-) abrange enzimas que apresentam notável diversidade funcional e estrutural. Mais notadamente, são caracterizadas por hidrolisar a ligação glicosídica entre dois ou mais hidratos de carbono ou entre um hidrato de carbono e uma porção de não hidrato (HENRISSAT; TEERI; WARREN, 1998). A nomenclatura usual dessas enzimas é baseada na especificidade por determinado substrato e, ocasionalmente, sobre o seu mecanismo molecular; por outro lado, essa classificação não reflete as características estruturais destas enzimas porque toma como base as semelhanças sequenciais dos aminoácidos e a análise dos agrupamentos hidrofóbicos (HENRISSAT, 1991). Até o momento, essas enzimas são divididas em mais de 130 famílias com sequências gênicas depositadas, na maior parte dos casos, no banco de dados de proteínas que agem sobre carboidratos - CAZy - (no inglês “Carbohydrate-Active Enzyme database”), que inclui as celulasas e hemicelulasas, as quais podem possuir o domínio catalítico e o módulo de ligação a carboidratos - CBMs (HIMMEL et al., 2007; CANTAREL et al., 2009).

1.8 Celulases

As celulases são diferenciadas de outras hidrolases de glicosídeos pela sua capacidade de degradar o material celulósico (LYND et al., 2002). Mecanicamente, são divididas em três grandes grupos de enzimas: endoglucanases (EC 3.2.1.4); exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1.21).

As endoglucanases (EC: 3.2.1.4) são classificadas nas famílias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44,45, 48 e 51. O grupo das exoglucanases é constituído por celobioidrolase e glucanoidrolase. As celobioidrolases I e II (EC: 3.2.1.91) pertencem às famílias GH 7 (CBHI) e 6 (CBHII), respectivamente, enquanto a glucanoidrolase (EC: 3.2.1.74) pertence às famílias GH 1 e 3. A terceira classe, β -glucosidase (EC: 3.2.1.21), por sua vez, são classificadas nas famílias GH 1, 3, 9, 30 e 116 (HENRISSAT, B., DAVIES, 2000).

As endoglucanases agem internamente nas regiões amorfas do polímero de celulose liberando como produto principal da hidrólise diversos oligossacarídeos com novos terminais redutores e não redutores; já as β -glucosidases promovem a hidrólise dos substratos solúveis celodextrinas e celobiose à glicose (LYND et al., 2002).

A CBHI é uma enzima que hidrolisa as cadeias β -1,4-ligações de celulose a partir de sua extremidade de redução, enquanto que a CBHII cliva as ligações β -glicosídicas por um mecanismo de inversão e, principalmente, a partir do final da extremidade não redutora (PENTTILÄ et al., 1988; DIVNE et al., 1998).

Essas enzimas são constituídas por um domínio catalítico central (CCD) conectado, em alguns casos, a um domínio de ligação à celulose - CBM (TOMME et al., 1988). O domínio catalítico da CBHI e CBHII tem em sua estrutura um “túnel” (cilíndrico) formado por “loops” (DIVNE et al., 1994; KLEYWEGT et al., 1997), no qual o substrato é acomodado na hidrólise. Nas estruturas de endoglucanases existe uma fenda aberta para ligação ao substrato (KLEYWEGT et al., 1997). Essa diferença estrutural entre exoglucanase e endoglucanase, indica que os modos de ação nos substratos são ditados pela forma de seus sítios ativos (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

1.9 Hemicelulases

Além das celulases, as hemicelulases são enzimas que promovem a degradação da parede celular das plantas. As hemicelulases mais estudadas até o momento são,

principalmente, xilanases (EC 3.1.1.73), mananases (EC 3.2.1.25), arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) xiloglucanases (EC 3.2.1.151) (CANTAREL et al., 2009).

Quanto à estrutura, as hemicelulases são normalmente proteínas modulares e, em algumas vezes, apresentam módulos funcionais, tais como CBMs, além dos seus domínios catalíticos; são pertencentes a mais de 20 diferentes famílias de GHs (1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 16, 26, 27, 36, 39, 43, 44, 51, 52, 53, 54, 57, 62, 67 e 74), (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SHALLOM; SHOHAM, 2003).

1.10 Hidrolases de glicosídeos da família 74

As hidrolases de glicosídeos da família 74 (GH 74) são enzimas com variados modos de ação sobre polissacarídeos: endoglucanase (EC 3.2.1.4); celobioidrolase específica para terminais finais de oligoxiloglucano (EC 3.2.1.150); xiloglucanase (EC 3.2.1.151) (<http://www.enzyme-database.org/GH74>). Estas enzimas têm sido encontradas em plantas, fungos e bactérias.

Estudos funcionais indicam que essa família de GHs hidrolisam as ligações de vários β -1,4-glucanos, com maior atividade relativa para xiloglucano e também oligossacarídeos deste (CHHABRA; KELLY, 2002; HASPER et al., 2002), exceto a Cel74 de *Thermotoga marítima* com baixa atividade para xiloglucano (CHHABRA; KELLY, 2002). Nesse sentido, a literatura atual destas enzimas indica uma variedade de mecanismos de ação quanto à degradação dos materiais da parede celular, embora as características estruturais da família GH 74 não sejam ainda bem compreendidas quanto à especificidade por xiloglucano.

Até o momento, apenas três estruturas de xiloglucanases da família GH 74 foram determinadas em resolução atômica. A variedade de ação dessas enzimas é um fato interessante tendo em vista que as respostas para isso, possivelmente, estejam relacionadas aos aspectos estruturais. Entretanto, algumas endoglucanases de redução específica de terminais de xiloglucano têm sido encontradas com nenhuma atividade comparadas com outras β -glucanases (GRISHUTIN et al., 2004; PAULY et al., 1999), o que justifica maior investigação da ação enzimática desta família, especialmente olhando para o binômio “estrutura-função”.

1.11 Xiloglucanases

No modelo clássico de parede celular de vegetais, as xiloglucanases, juntamente com as expansinas, agem no afrouxamento da parede celular (KAEWTHAI et al., 2013). De acordo com os modelos atuais para a degradação da parede primária de plantas (Figura 3), as xiloglucanases hidrolisam o xiloglucano ligado à celulose promovendo a exposição da celulose a agentes que a hidrolisam (COSGROVE; JARVIS, 2012).

Os trabalhos relatam que as xiloglucanases se encontram, particularmente, nas GHs das famílias 5, 12, 16, 44 e 74 (GILBERT; STÅLBRAND; BRUMER, 2008). Algumas GHs presentes nas famílias GH 5 (GLOSTER et al., 2007), GH 12 (YOSHIZAWA et al., 2012), GH 16 (BAUMANN et al., 2007) e GH 74 (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006) são específicas para xiloglucano e/ou oligoxiloglucano, enquanto outras têm ação catalítica agonista entre xiloglucano e outros substratos, como é o caso da GH 44 de *Clostridium thermocellum* (ARIZA et al., 2011). As famílias que apresentam atividade pouco específica quanto à ação catalítica sobre o xiloglucano são principalmente as GH 5 e GH 12 (CHEN et al., 2012; YOSHIZAWA et al., 2012).

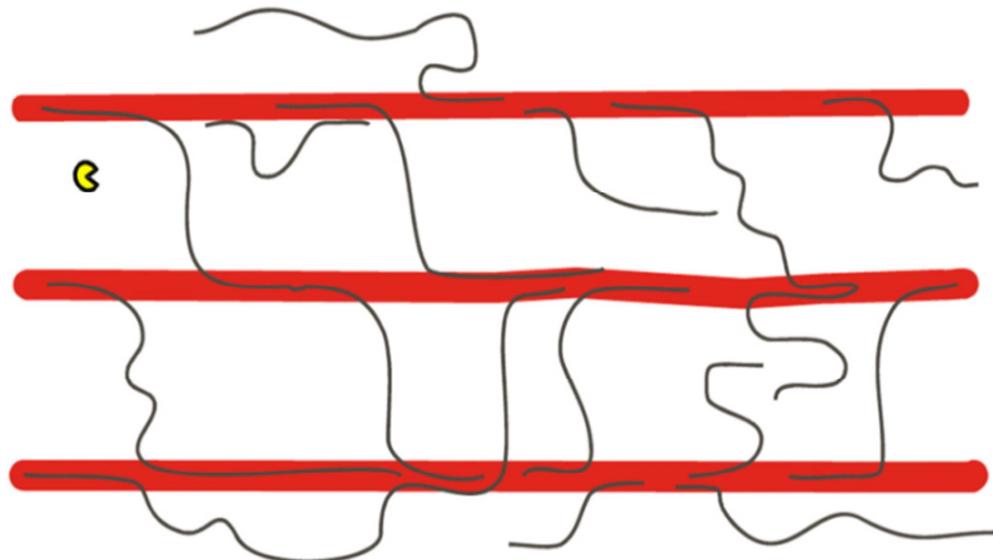


Figura 3- Desenho do modelo da parede celular primária, na qual o xiloglucano (fios finos) liga-se à superfície das microfibrilas de celulose (barras grossas), formando uma matriz de suporte da célula vegetal. O semicírculo (parte superior esquerda) em amarelo representa as enzimas xiloglucanases. Retirado (PARK; COSGROVE, 2012).

Essa ação das xiloglucanases sobre a parede celular provoca o afrouxamento na matriz da parede celular e o conseqüente aumento da área de atuação para outras enzimas, Figura 4.

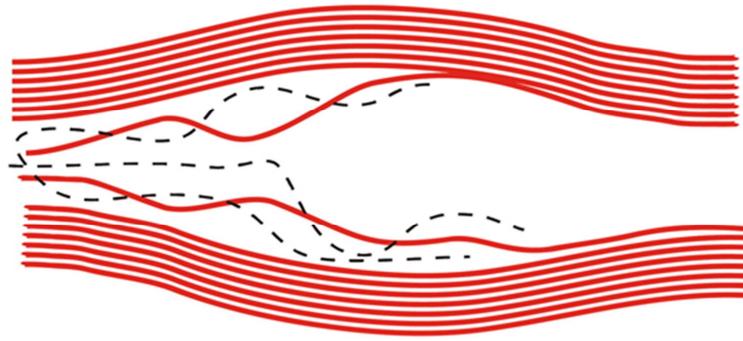


Figura 4 - Modelo hipotético da ação das xiloglucanases retratado como o entrelaçamento de glucanos (em preto) desordenados às microfibrilas (vermelho) e o respectivo alongamento da parede. Retirado (PARK; COSGROVE, 2012).

Com isso, há o aumento da capacidade de extensão e dos efeitos de alongamento da parede, semelhante aos incorporados pelas expansinas na parede vegetal (MCQUEEN-MASON; COSGROVE, 1995).

Em termos estruturais, essas enzimas reservam alguma similaridade na estrutura secundária entre si, já que todas têm enovelamento tipo folhas- β , Figura 5.

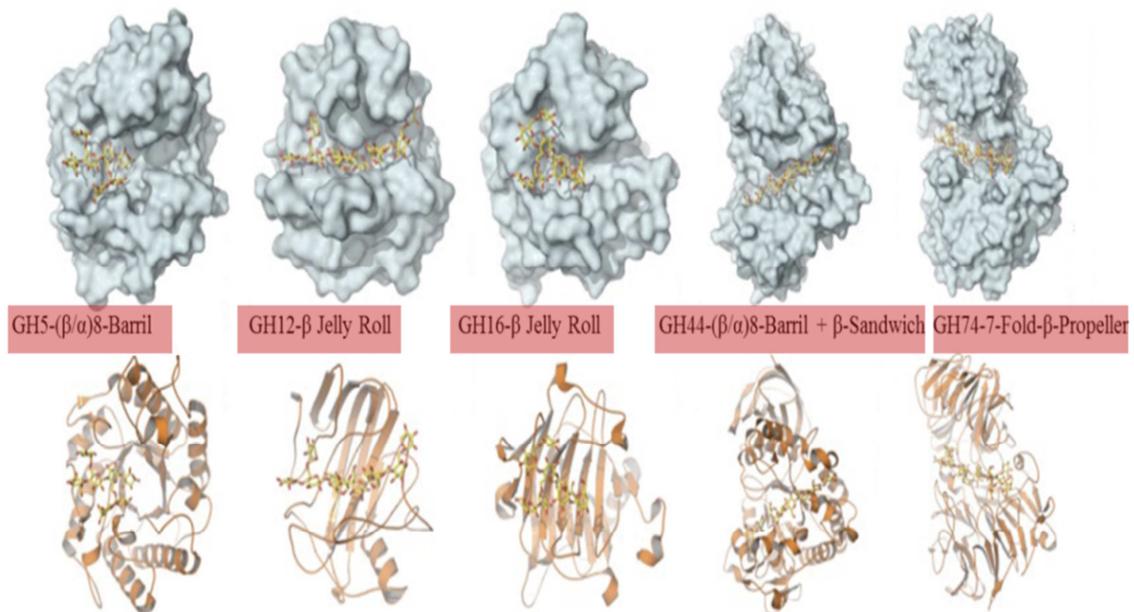


Figura 5 - Relação dos tipos de enovelamentos estruturais descritos para as enzimas caracterizadas como xiloglucanases. Retirado (GILBERT; STÅLBRAND; BRUMER, 2008).

1.12 Modos de ação mais conhecidos

Os modos de ação das GH 74 recentemente têm sido motivo de discussões acerca da especificidade enzimática deste grupo quanto à maneira de hidrolisar o polissacarídeo xiloglucano. Até o momento, foi relatado que as GH 74 agem como exoxiloglucanases e

endoxiloglucanases; como endoxiloglucanases, as GHs 74 têm sido reportadas tendo ação contra xiloglucano à maneira das endoglucanases clássicas, como também de forma endoprocessiva; já as exoxiloglucanase agem de forma similar às celobiohidrolases.

Tipicamente, as GH 74 que agem como endoenzimas, clivam internamente a ligação glicosídica do xiloglucano no resíduo de glicose não ramificado, originando como produtos “clássicos” XXXG, XLXG/XXLG e XLLG oligossacarídeos; então, como resultado desta hidrólise, as GH 74 que processam o xiloglucano de uma forma “endo” acabam liberando quatro tipos de resíduos de glicose cada vez que atacam o carboidrato (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006).

Por outro lado, algumas GH 74 têm preferência por depolimerizar os oligossacarídeos de xiloglucano, as quais são anotadas como celbiohidrolases ou oligoxiloglucanases porque reconhecem especificamente as extremidades redutoras de oligossacarídeos de xiloglucano e liberam dois segmentos de resíduos de glicose a partir destas extremidades (YAOI et al., 2009); os produtos de hidrólise mais clássicos são do tipo GG, XG, ou LG.

Embora já se tenham informações tanto estruturais quanto funcionais, ainda não se compreende bem a ação destas GHs. Uma proposta, embora especulativa, para o mecanismo de ação seria que durante a hidrólise as enzimas podem atuar no xiloglucano de modo “endo” e depois da hidrólise da ligação interna, uma parte do polímero dividido deixa o local do sítio ativo, enquanto a outra é hidrolisada processivamente (GRISHUTIN et al., 2004), o que pode justificar a padrão de hidrólise de algumas destas GH 74.

As informações obtidas sobre o tipo de produtos liberados na hidrólise das GH 74 sobre xiloglucano e seus derivados fornecem pistas da especificidade de substrato e o modo de ação. De fato, o conhecimento das bases moleculares e estruturais serve de guia para “mapear” a ação enzimática e hidrolítica.

1.13 Classificação estrutural

Classicamente, todas as estruturas das enzimas GH 74 consistem de dois domínios formados pela repetição dos motivos “folhas- β ”, formando um bolsão que acomoda o substrato e faz uma interface de clivagem com os resíduos catalíticos no meio deste (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006; YAOI; MITSUISHI, 2004). Essa interface entre os dois domínios fica exposta ao solvente, sendo a maior responsável pela interação com o substrato e localização de alguns resíduos de importância catalítica (Figura 6).

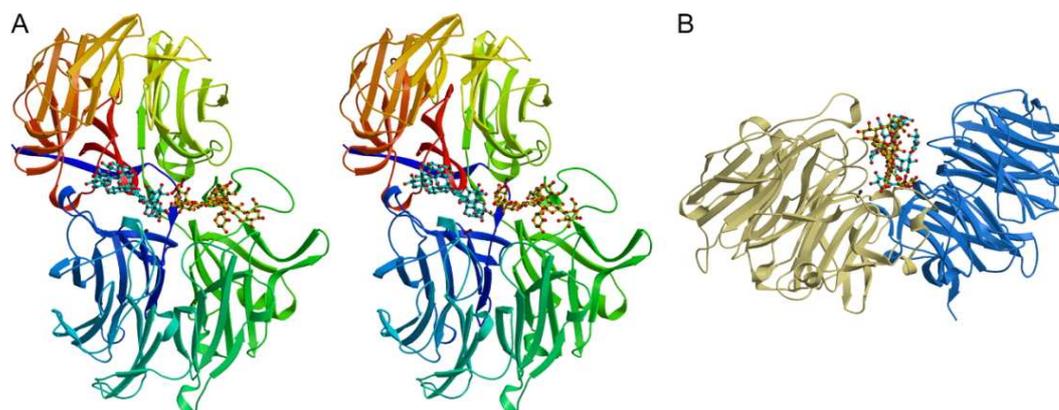


Figura 6 – Enovelamento característico da família GH 74. Em A tem-se uma visão das principais estruturas secundárias destas enzimas. Em A e em B tem-se a estrutura de GH74 com um Heptassacarídeo no seu sítio ativo. Na figura à esquerda é mostrado a disposição do heptassacarídeo de xiloglucano quando interage com o sítio catalítico; na figura central é mostrado que esse heptassacarídeo é clivado internamente no resíduo de glicose não ramificado; à direita é mostrado, ainda, esse mesmo heptassacarídeo no sítio catalítico da GH74 mostrando que o oligossacarídeo de fato fica entre os dois domínios que fazem a interface catalítica. Retirado (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006).

A topologia global das GH 74, tomando como base as estruturas disponíveis até a presente data, é extremamente conservada quanto ao enovelamento tipo β -hélice. Por outro lado, as regiões mais flexíveis se encontram nos “loops”; é justamente nos “loops” que pode estar a diversidade de ação das GH 74. As estruturas disponíveis para acesso livre estão depositadas no banco de dados de proteínas – PDB (no inglês *Protein Data Bank*) são: uma de *Clostridium thermocellum* F7/YS (2CN2 e 2CN3), (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006), outras duas de *Geotrichum sp.* M128 (1SQJ e 3AOF), (YAOI et al., 2009: 2007).

Martinez-Fleites e colaboradores (2006) usando cristalografia de raios-X demonstraram que o sítio catalítico da endoxiloglucanase tem uma grande superfície em forma de fenda formada na maior parte por “loops” que ligam as folhas β em ambos os domínios. Destacaram também que alguns destes “loops” (Tyr206-Asp217, Thr291-Asn298, e Asp524-Asp527) estão desordenados na estrutura apo, enquanto que na complexada com heptassacarídeo estas regiões de alguma forma ficam ordenadas e interagem com o ligante. Neste mesmo trabalho foi possível identificar dois resíduos de Aspartato como tendo uma possível função de ácido e base (Asp480 e Asp70, respectivamente), os quais se localizam na fenda que responde pelo sítio ativo onde a mutação de qualquer um destes resíduos para Alanina, resulta na total falta de atividade.

Sobre o modo de ação das GH 74 semelhantes à celobioidrolases, Yaoi e colaboradores (2004: 2009) demonstraram que a preferência por oligossacarídeos de xiloglucano está relacionada diretamente com a presença de um “exoloop” (Gly375-His385), região em vermelho na figura 7B. Neste sentido, esse “loop” causa impedimentos

“mecânicos” para a acomodação da enzima no meio do substrato. A retirada deste “loop” da exoenzima produziu hepta, nona e octassacarídeo, tal qual a xiloglucanase de *Clostridium thermocellum* (Figura 7), quando a hidrólise foi feita sobre xiloglucano.

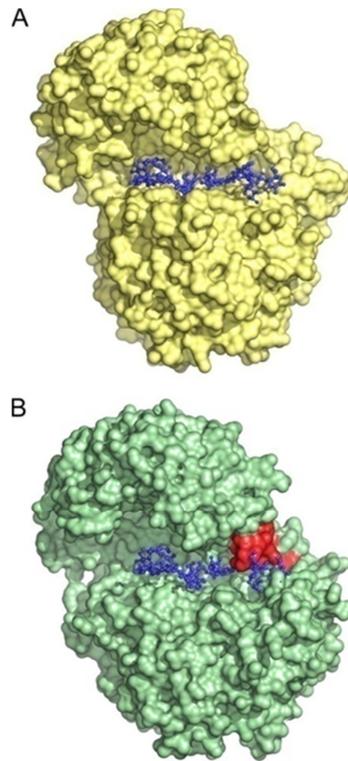


Figura 7 – Figuras A e B mostram a superfície das GH 74 com a região do sítio ativo interagindo com o substrato. Em A uma típica endoxiloglucanase, em B uma típica exoxiloglucanase. Retirado de (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006). Em azul é mostrado o heptassacarídeo de xiloglucano ligado no sítio catalítico da estrutura das GH 74 obtidas por difração de raios-X. Em vermelho é mostrado a região predita como responsável pela ação exoxiloglucanase.

Portanto, essa região flexível é responsável pela exo ação de algumas enzimas e sua deleção acarreta a perda de especificidade pela clivagem de oligoxiloglucano a partir de suas extremidades reduzidas, resultando no modo de ação semelhante às endoxiloglucanases; também foi possível identificar os resíduos de aminoácidos catalíticos (Asp35 e Asp465) em posições equivalentes às de 2CN3, ambos localizados nas mesmas posições dos domínios N e C – terminal (YAOI et al., 2009).

Mesmo com alguns trabalhos relatados na literatura sobre a função das GH 74, ainda não se sabe exatamente o porquê de a diversidade de a ação ser tão pronunciada em uma família com poucos representantes. Ainda, não foram relatados quais são de fato os resíduos que promovem a catálise do xiloglucano. Assim, de um ponto de vista estrutural, este é um grupo de enzimas pouco estudado.

Somando-se a isso, a busca por enzimas hemicelulósicas é de fato um dos grandes desafios na rota tecnológica para a produção de etanol de segunda geração, particularmente de

organismos bacterianos por conferirem maior rendimento e facilidade na obtenção de enzimas.

1.14 Organismo *Xanthomonas campestris*

O gênero *Xanthomonas* é um grupo diversificado e economicamente importante de bacterianas fitopatogênicas, as quais pertencem à subdivisão Proteobacteria (DA SILVA et al., 2002). As bactérias Xanthomonadales são grandemente conhecidas por provocarem uma variedade de doenças em mais de 400 plantas de valor agro-econômico, incluindo tomate, repolho, pimenta, banana, arroz, uva, pêssigo, ameixa, amêndoa, café e outras (NAUSHAD; GUPTA, 2013). *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc) é uma bactéria Gram-negativa capaz de sintetizar uma grande variedade de enzimas extracelulares que hidrolisam os diferentes tipos de substratos, bem como produz o exopolissacarídeo xantana com larga aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia (TAO et al., 2012). Além disso, é causadora da podridão negra, doença que afeta as plantas crucíferas com sintomas que incluem clorose marginal das folhas e escurecimento do tecido vascular culminado com a necrose (VICENTE; HOLUB, 2013).

Analisando os dados de sequências genômica de *X. campestris* estirpe ATCC33913 no CAZy (CANTAREL et al., 2009), o gene Xcc1752 (GenBank: NP_637119.1) foi identificado. Este gene foi anotado no CAZy como uma possível celulase (81,14 kDa) pertencente às GH 74.

Tendo em vista os recentes aumentos de genes depositados no CAZy para diversas famílias de GHs, dos quais apenas cerca de 3% das proteínas têm caracterização bioquímica, enquanto que a informação estrutural tridimensional está disponível apenas para 0,3% destas enzimas, entende-se que determinar as propriedades bioquímicas e estruturais dessas enzimas que degradaram a parede da planta contribui para entender a biologia da desconstrução da parede celular, como também para a compreensão das relações estrutura-função destas enzimas (GILBERT, 2010). Aqui, propusemo-nos a determinar a estrutura tridimensional Xcc-Xgh para que a sua caracterização estrutural contribua com o aumento de informações sobre estruturas de GH 74, podendo fornecer “insights” sobre a base molecular e modo de ação de xiloglucanases bacterianas em polissacarídeos de xiloglucano.

2 Objetivos

Os objetivos principais deste projeto de pesquisa incluem:

- Clonar, expressar e purificar a xiloglucanase (*Xcc-Xgh*) de *Xanthomonas campestris*;
- Estudar os aspectos bioquímicos, biofísicos e enzimáticos da *Xcc-Xgh*;
- Analisar a estrutura da proteína a baixa resolução, em solução, usando espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), e a alta resolução determinada por cristalografia de raios-X e;
- Análise da relação estrutura–função desta enzima.

3. Materiais e Métodos

3.1 Análises por Bioinformática

A partir de uma busca prévia por nosso grupo de pesquisa foi identificada a sequência gênica Xcc_1752 de *Xanthomonas campestris* e cepa ATCC 33913 (Xcc-Xgh). O programa BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) é um algoritmo desenvolvido para alinhar sequências de nucleotídeos ou aminoácidos de acordo com a similaridade existente entre as sequências (ALTSCHUL et al., 1994), foi utilizado para conhecer a homologia entre Xcc_1752 e os demais genes depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), como também usamos o ClustalW para os alinhamentos múltiplos (LARKIN et al., 2007).

Ainda analisamos possíveis peptídeos sinal (PETERSEN et al., 2011) e domínios transmembrana (BAGOS; LIAKOPOULOS; HAMODRAKAS, 2006). Além disso, foram verificados, por cálculo teórico, os parâmetros físico-químicos da proteína, como a massa molecular, ponto isoelétrico (pI) e coeficiente de extinção molar (280 nm) usando o ProtParam (“Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server,” [s.d.]).

3.2 Amplificações gênicas

Utilizando o programa GENE RUNNER (versão 3.05, Hasting Software Inc), desenhamos oligonucleotídeos específicos para a amplificação gênica da proteína Xcc-Xgh usando sítios para enzimas de restrição (NdeI, XhoI e SacI), como também para o sistema de Clonagem Independente de Ligase- do inglês LIC – (ESCHENFELDT et al., 2009); esses dois sistemas de clonagens foram utilizados para aumentar as chances de obter a enzima com maior ganho de expressão e solubilidade. As análises de bioinformática sugeriam as regiões de clivagem para a retirada do peptídeo sinal e transmembrana, auxiliando no planejamento das construções (tabela 2).

Tabela 2 - Primers desenhados para as construções da GH74 de *Xanthomonas campestris*

| Nome da Primer Forward (5'→3') | Primer Reverso (5'→3') | Número de truncagem | de Resíduos (AA) |
|--|--|---------------------|------------------|
| T1_A AGAGCTCATGGCCACGTCCGGG CCCTACCAG | ACTCGAGCTATCATCTCGGATCGCCG TAGAAAATGC | 711 | |
| T1_B ACATATGGCCACGTCCGGGCC TACCAGTG | ACTCGAGCTATCATCTCGGATCGCCG TAGAAAATGC | 711 | |
| T2 CAGGGCGCCATGGCCACGTCCG GGC | GACCCGACGCGGTTATCTCGGATCGC CGTAG | 711 | |

Todas as amplificações foram realizadas a partir do DNA genômico e os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Para amplificar o gene, usamos o método de reação em cadeia da Polimerase (PCR) com ciclos de temperatura de anelamento. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% com brometo de etídio em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato pH 8,0, 0,2 mM EDTA) e os fragmentos purificados usando o kit *Wizard® SV Gel Clean-Up System* (PROMEGA). A quantificação do DNA purificado foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

O gene amplificado usando os primers com sítios para enzimas de restrição foi clonado em pTZ57R/T (Fermentas, EUA) e confirmado por digestão com enzimas de restrição NdeI/SacI; em seguida foi subclonado nos vetores plasmidiais de expressão pSMT3 (fornecido gentilmente por Lawrence Shapiro, Columbia University - EUA) e pET28a (Novagen) (SAMBROOK, JOSEPH, SAMBROOK, 2001).

No caso do sistema LIC, usamos o vetor de expressão pETM-11/LIC (DÜMMLER; LAWRENCE; DE MARCO, 2005). Essas clonagens foram feitas em colaboração com o Pós-Doutorando Cesar Camilo Moisés (USP). Ainda, o DNA genômico foi gentilmente cedido pelo estudante de doutorado Flávio Rodolfo Rosseto (USP).

Por fim, foram feitas três truncagens no gene *Xcc_1752* de *Xanthomonas campestris* foram delimitadas pensando na obtenção da proteína solúvel em mais de uma construção para minimizar as dificuldades de cristalização: T1_A foi desenhada com o sítio de clivagem pela enzima SacI; T1_B para a enzima de restrição NdeI; Para o reverso de T1_A e T1_B, a enzima de restrição foi a XhoI. A construção T2 foi desenhada para clonagem em sistema LIC.

3.3 Expressão e Purificação

A expressão dos clones foi realizada em *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen) e em *E. coli* BL 21(Novagen). As estirpes cresceram por 4 horas à temperatura de 37 °C e expressaram na temperatura de 18°C durante 20 horas a 180 rpm, após terem atingido a densidade ótica ($D.O_{595nm}$) de pelo menos 0,5.

Os testes de expressão foram realizados a fim de obter as melhores condições em que a proteína é expressa. Para isso, fez-se um pré-inóculo para cada estirpe (um para BL 21 e um para Rosetta) em meio LB para cada clone, com volume final de 100 mL.

Ao ser atingida a $D.O_{595nm}$ à 37°C e 180 rpm, passados 20 minutos à 20 °C, adicionou-se, então, o indutor IPTG (isopropil- β -1-D-tiogalactopiranosido) com concentração final de 1mM. Após o tempo de indução, as culturas foram centrifugadas a 6000 rpm e o material celular estocado à -20 °C. As células foram ressuspensas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, NaCl 300 mM) e lisadas por ultrassom (sonicação). Em seguida, centrifugou-se a 15000 rpm para remover restos de células.

O sobrenadante foi equilibrado contra 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl e 20 mM de tampão de imidazol usado para a purificação por resina de afinidade Ni-NTA (Qiagen) e proteína de interesse foi eluída em gradiente de 100-300 mM de imidazol.

A proteína eluída foi dialisada em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, NaCl 150 mM e, em seguida, incubada por 24 horas com ubiquitina-protease como uma proteína específica (ULP1) para remover o His-tag; para os clones com pET-M11 a proteína foi incubada por 24 horas com TEV protease (JENNY; MANN; LUNDBLAD, 2003; TERPE, 2003). A mistura resultante foi carregada novamente em resina Ni-NTA, de onde foi coletada como produto não ligado à resina. As frações contendo a proteína alvo foram concentradas e carregadas na coluna cromatográfica Superdex 75 HiLoad 10/30 de separação por exclusão molecular (GE Healthcare), pré-equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 150 mM, utilizando o sistema ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare Life Sciences) para remover agregados e as impurezas da proteína de interesse.

A pureza final da amostra foi avaliada por gel SDS-PAGE 15% corado com Azul Brilhante de Coomassie (LAEMMLI, 1970). A concentração da proteína foi determinada utilizando NanoDrop espectrofotômetro (ThermoScientific).

3.4 Caracterizações Bioquímica e Biofísica

3.4.1 Ensaio de Atividades

Os experimentos enzimáticos para determinar a atividade específica da *Xcc-Xgh* purificada foram realizados incubando-se a proteína purificada em diferentes substratos celulósicos e hemicelulósicos (DAMÁSIO et al., 2012), os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou Megazyme. O tampão usado foi acetato de amônio (50 mM) em pH 5 e temperatura de 40 °C durante 24 horas. A hidrólise de vários polissacarídeos por *Xcc-Xgh* foi quantificada utilizando o método colorimétrico “3,5-dinitrosalicylic acid” (DNS) (Miller, 1959) e a absorbância monitorada colorimetricamente a 540 nm com cada reação em triplicata

(GHOSE, 1987) utilizando leitor de microplacas “Infinite® 200 PRO” (TECAN). Estes ensaios foram realizados no sistema de pipetagem automatizado “epMotion® 5075” (Eppendorf) (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas) em colaboração com o Jovem-Pesquisador Dr André Damazio (CTBE).

De posse do melhor substrato de ação desta enzima, fez-se a determinação do pH ótimo de ação em soluções de tampão 40 mM acetato de amônio com diferentes valores de pH num range de 2,0 a 10,0 em tampão ABF (Acetato de sódio, Ácido acético, Fosfato de potássio monobásico e Borato de sódio) com diluições apropriadas e correção de pH com HCl-NaOH. Ainda fez-se o gradiente térmico em termociclador a fim de obter o perfil de temperatura num intervalo de 20 a 70 °C e posterior determinação da atividade específica contra o substrato que a enzima teve melhor ação hidrolítica (NINIO, 1975; ZHANG; LYND, 2004; IBATULLIN et al., 2008). O Cálculo da atividade específica foi realizado levando em conta a definição de unidade de atividade enzimática sendo a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de açúcar reduzido por minuto a partir do substrato (VYNOHRADOVA, 1978).

Todos estes parâmetros foram avaliados com a enzima a 0,2 mg/mL. A mistura de ensaio enzimático (100 μL) continha 10 μL de enzima e a concentração de substrato de 10mg/mL, com repetições em triplicatas.

3.4.2 Eletroforese Capilar

A separação e identificação de carboidratos complexos requer o uso de técnicas altamente sensíveis à detecção dos diferentes constituintes da mistura. Nesse sentido, a eletroforese capilar tem sido muito útil. Além disso, é uma alternativa ao uso das técnicas de cromatografia, como também é de fácil manobra instrumental e experimental.

Essa técnica se mostra extremamente promissora e eficiente quando utilizada na análise de mono e oligossacarídeos em geral (OEFNER; CHIESA, 1994). A separação é feita em tubos capilares com dimensões da ordem de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento; esses tubos contêm uma solução de eletrólito condutor, os quais são submetidos a um campo elétrico (SUZUKI; HONDA, 2003).

As principais vantagens do uso da eletroforese capilar em relação a outros métodos de eletroforese são principalmente: relação entre a área superficial interna e volume, dissipação eficiente do calor gerado por efeito Joule, campos elétricos com elevada magnitude para

permitir a separação de forma eficiente e, elevada resolução temporal nas análises, tendo como resultado o mapeamento de oligossacarídeos (CAMPA et al., 2006; FRANCO CAIRO et al., 2011).

No presente trabalho, os oligossacarídeos de xiloglucano (hepta, octa e nonassacarídeo) e xiloglucano foram marcados com APTS (8-aminopireno-1,3,6-ácido trissulfônico) (Megazyme) por aminação redutiva (NARAN; PIERCE; MORT, 2007). As reações enzimáticas foram realizadas como descrito para a atividade enzimática com os substratos xiloglucano, hepta/octa/nonassacarídeos de xiloglucano, exceto para APTS-isoprimeverose. A eletroforese capilar de zona foi realizada no equipamento P/ACE MQD (Beckman Coulter - Indianapolis, IN, USA) com detecção de fluorescência induzida por laser (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol-CTBE, Campinas). Um capilar de sílica fundida (TSP050375, Polymicro Technologies - Phoenix, AZ, EUA), com diâmetro interno de 50 μm e comprimento de 31 cm foi usado como coluna de separação para os oligossacarídeos. As condições de eletroforese foram de 10 mA com kV/70-100, com tampão de corrida de 0,1 M de fosfato de sódio (pH 2,5) e temperatura controlada a 20 °C. O capilar foi lavado com 1 M de hidróxido de sódio, seguido por tampão de corrida para evitar contaminações. APTS-Oligômeros marcados foram excitados a 488 nm e as emissões foram coletadas através de filtro com banda de 520 nm. Por causa dos pequenos volumes de eletroforese capilar combinado com pequenas variações na força de tampão, os tempos de retenção variaram ligeiramente. A informação obtida a partir do comportamento da eletroforese foi utilizada para a identificação dos produtos formados na hidrólise. Este experimento foi realizado em colaboração com o Jovem-Pesquisador André Damazio.

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

A coleta dos dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para três concentrações da solução protéica de Xcc-Xgh foram realizadas na linha SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP). Foram utilizados comprimento de onda $\lambda = 0.148$ nm, detector bidimensional (2D) “MarCCD”, distância amostra-detector de 1495,45 mm, com intervalo de transferência de momento de $0.015 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.35 \text{ \AA}^{-1}$.

As curvas de espalhamento foram analisadas utilizando o programa FIT2D (HAMMERSLEY et al., 1997), normalizando os dados pela intensidade do feixe e multiplicando-se pela absorção da amostra. Para obter a curva de espalhamento final,

subtraiu-se o espalhamento da solução tampão da curva de espalhamento da solução de proteína.

Usando a extrapolação de Guinier definida pela Equação 1 é possível obter informações valiosas sobre a arquitetura molecular das partículas em solução. Essa relação é definida da seguinte maneira:

$$I(q) = I(0)e^{-\left(\frac{Rg}{3}\right)^2 q^2} \quad 1$$

onde temos $I(q)$ (Equação 1) sendo a intensidade de espalhamento, $I(0)$ a intensidade com o ângulo de espalhamento tendendo a zero, Rg o raio de giração das partículas e que ($q = 4\pi \sin \theta / \lambda$) o módulo do vetor espalhamento (KOZIN; SVERGUN, 2001). Usando outra metodologia, o programa GNOM (KOCH; VACHETTE; SVERGUN, 2003) foi utilizado para obter a curva de distribuição de distâncias $p(r)$ e o diâmetro máximo D_{\max} da molécula de proteína:

$$P(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_{D_{\max}=0}^{D_{\max}} dq(qr)I(q)\text{sen}(qr) \quad 2$$

O algoritmo usado por este programa faz a transformada inversa de Fourier a partir de perfis de intensidade medidos para gerar a função de distribuição de distância $p(r)$ e outros parâmetros físicos das partículas em solução. A $p(r)$ indica a distribuição dos vetores interatômicos de uma molécula com um determinado comprimento, o que permite o cálculo de Rg levando em conta a curva de espalhamento experimental.

O SAXS proporciona uma medida da compacidade de proteínas globulares, refletidas no Rg e D_{\max} . Uma forma de observar o quão globular e flexível uma proteína pode ser, é fazer um gráfico de Kratky tomando $I(q)q^2$ versus $I(q)$ (ORTHABER; BERGMANN; GLATTER, 2000). À medida que a região de alta resolução tende a ser constante em função de $I(q)q^2$, menor é a flexibilidade da molécula. Essa análise permite distinguir se a proteína está numa conformação compacta ou mais flexível e neste último caso a flexibilidade pode estar relacionada a uma estrutura menos globular, fornecendo pistas sobre os estados de enovelamento parcialmente e/ou total da macromolécula (HAMMEL, 2012).

A partir do modelo cristalográfico da enzima em estudo, foram possíveis os cálculos da função de espalhamento teórica, utilizando o programa CRY SOL (SVERGUN;

BARBERATO; KOCH, 1995). Os modelos *ab initio* de baixa resolução foram gerados utilizando os programas DAMMIN (SVERGUN, 1999) e GASBOR (SVERGUN; PETOUKHOV; KOCH, 2001).

O modelo *ab initio* médio de *dummy*-átomos foi sobreposto com o modelo cristalográfico utilizando o programa SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001). Por seguinte, a massa molecular da proteína foi estimada usando o programa SAXS MoW (FISCHER et al., 2009).

3.4.4 Cristalização e coleta de conjuntos de dados

A condição inicial de cristalização foi obtida usando o sistema robotizado “Honeybee” do Laboratório Robotizado de Cristalização de Proteínas (Robolab-LNLS, Campinas, Brasil), utilizando 480 diferentes condições de reservatório de Hampton Research (Laguna Niguel, Califórnia, EUA) kits, Crystal Screen I & II, Wizard I & II and Salt Rx, com a solução protéica a $42 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 20 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl a 50 mM.

O método de cristalização utilizado foi o da difusão de vapor do tipo gota-sentada aplicando 1 μL da solução protéica a 1 μL da solução de cristalização teste em placas de 96 poços (Hampton Research).

Foram obtidos três conjuntos de dados de difração: (1) cristal da proteína *Xcc-Xgh* (conjunto apo) em 15% da solução crioprotetora etileno-glicol congelado à $-173 \text{ }^\circ\text{C}$, (2) cristal de *Xcc-Xgh* complexado com glicose utilizando o método de “soaking” em uma solução crioprotetora contendo 1M de glicose e (3) de *Xcc-Xgh* complexado com o produto da hidrólise do xiloglucano utilizando o método de “soaking”.

Os conjuntos de dados de difração de raios-X para os cristais da proteína na forma apo e complexada com glicose foram coletados na linha para macromoléculas MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, Brasil), utilizando um comprimento de onda de $1,48 \text{ \AA}$ (GUIMARÃES et al., 2009). Um total de 360 imagens cobrindo uma faixa de oscilação de 180° foram coletados com detector MARCCD-225 (MAR Research). O conjunto de dados para o cristal complexado com o produto de hidrólise foi obtido no “Laboratório Nacional de Luz Síncrotron Brookhaven” (Estados Unidos) na linha de luz X4A, equipada com o detector “CCD ADSC Quantum-4”. Nas situações descritas a temperatura de coleta foi mantida em $-173 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.5 Determinação estrutural, Refinamento e Validação do Modelo

Os conjuntos de dados de difração foram processados usando o programa XDS (KABSCH, 2010) e reduzidos com o programa SCALA do pacote CCP4 (EVANS, 2006; WINN et al., 2011). O programa POINTLESS (EVANS, 2006) foi utilizado para examinar as simetrias cristalográficas; o conteúdo de moléculas na unidade assimétrica foi estimado utilizando o coeficiente de Mathews (MATTHEWS, 1968) e possíveis operações de twin foram estimadas com o programa “phenix.xtriage” (ZWART, P. H., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., ADAMS, 2005) do pacote PHENIX (ADAMS et al., 2010).

Para o faseamento, usou-se o programa Phaser (MCCOY, 2007) aplicando o método de substituição molecular-MR (do inglês “molecular replacement”) (ROSSMANN, 1990) usando como modelo de fases a estrutura PDB id 2CN3 com identidade sequencial de 39% com a proteína de estudo *Xcc-Xgh*. A solução obtida foi modificada manualmente com o programa Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) e as posições atômicas corrigidas por ciclos de refinamento com o programa PHENIX (ADAMS et al., 2010).

Os modelos cristalográficos obtidos neste trabalho estão em processamento final com os aspectos estereoquímicos em validação por meio do MolProbity (CHEN et al., 2010) para posterior inserção no PDB (BERMAN; HENRICK; NAKAMURA, 2003). O alinhamento estrutural entre os modelos cristalográficos, as imagens das estruturas tridimensionais foram obtidos com o programa PyMOL (“The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.” [s.d.]).

4. Resultados e Discussão

4.1 Análises por Bioinformática

Por uma análise gênica do genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (ATCC33913) no CAZy (CANTAREL et al., 2009), foi encontrado o gene *Xcc_1752* codificador para uma possível celulase não caracterizada (GenBank: NP_637119.1 e NCBI-GeneID: 999024). Esse gene está anotado como tendo 2256 pares de bases e 751 resíduos de aminoácidos, com massa molecular teórica de 81,14 kDa obtida usando o “PROTPARAM” (WILKINS et al., 1999). Mesmo as espécies do gênero *Xanthomonas* são grandes produtoras de enzimas hemicelulases (http://www.cazy.org/GH74_bacteria.html), na análise do genoma

das espécies de *Xanthomonas* depositadas e os genes anotados no CAZy, encontra-se apenas um gene previsto como GH 74 (“CAZy - Bacteria,” [s.d.]).

Analisando a sequência de aminoácidos do gene *Xcc_1752*, é encontrada uma região como um possível precursor para peptídeo sinal na extremidade amino-terminal entre os resíduos de aminoácidos 1 a 37, com sítio de clivagem entre os resíduos 37 e 38 (NIELSEN et al., 1997; PETERSEN et al., 2011), (Figura 8 (a)). Isso foi possível com o uso do programa “SignalP 4.0”, onde a região identificada com predição para peptídeo sinal foi excluída.

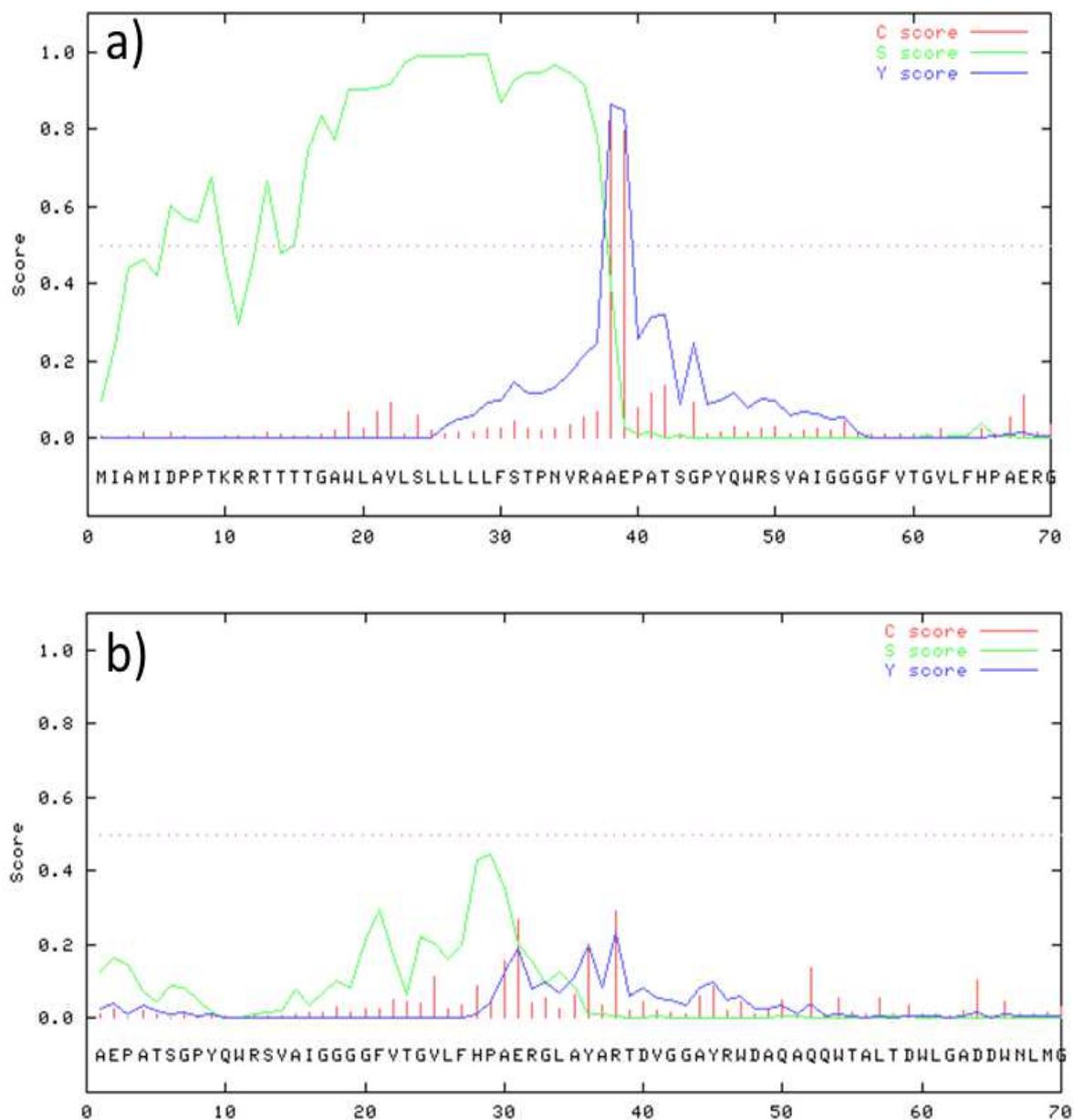


Figura 8 - Arquivo de saída do programa “SignalP 4.0”. Em “a” a sequência de aminoácidos com 751 resíduos com peptídeo sinal e em “b” sem peptídeo sinal.

Na maior parte das proteínas que são exportadas, o peptídeo de sinal é clivado durante o processo de secreção (LEVERSEN et al., 2009), atuando como sinal de orientação da proteína. No presente trabalho, a sequência de aminoácidos inteira serviu como arquivo de entrada no programa "SignalP 4.0", o que indicou um possível sítio de clivagem para o peptídeo sinal entre os resíduos 37 a 38, como pode ser visto na Figura 8 (a). Essa região foi retirada e a região contendo os resíduos 38 a 751 foi novamente submetida à análise pelo programa "SignalP 4.0", onde obteve-se como resultado a figura 8 (b). Como parâmetros de análises, utiliza-se o "S score" da ordem de 0,5 para os casos negativos para peptídeo sinal. Portanto, da Figura 8, apreende-se que a predição para peptídeo sinal é da ordem de 0,95.

Peptídeo sinal de bactérias Gram-positivas é consideravelmente mais longo do que de outros organismos, enquanto nas bactérias gram-negativas os peptídeos sinal variam de 1 a 50 resíduos de aminoácidos, com ocorrência maior para Leu e Ala nos procariotos e Leu, Val, Ala, Phe e Ile nos eucariotos como regiões de clivagem (NIELSEN et al., 1997; PETERSEN et al., 2011). Neste caso particular, a clivagem foi predita entre duas Ala.

No caso de proteínas expressas em *E. coli* tem sido relatado que a presença de sequências de peptídeo sinal leva à desestabilização termodinâmica, reduzindo a atividade e aumentando a propensão para agregação de proteínas recombinantes, indicando que além de o peptídeo sinal atuar no endereçamento, ainda é capaz de modular a estabilidade e agregação das proteínas (SINGH et al., 2013).

Além de peptídeo sinal, esta enzima apresenta um domínio predito como transmembrana entre os resíduos 38 a 40 (LARKIN et al., 2007; KROGH et al., 2001) predito pelo programa "TMHMM Server v. 2.0" ("TMHMM Server, v. 2.0," [s.d.]), com o qual identificamos essa região.

Com o "ProtParam tool", fez-se a análise da estrutura primária, bem como a massa molecular (76791,3 Da), o número de aminoácidos (711), o coeficiente de Extinção teórico mensurado a 280 nm (178300) e o ponto isoelétrico teórico (6,34). O valor do ponto isoelétrico teórico de 6,34 pode indicar que a proteína tende a maior estabilidade em pHs mais básicos em torno de 7 e 8. Isso está em acordo com outras enzimas da mesma classe, como reportado para a xiloglucanase de *Paenibacillus* sp. Strain KM21 (YAOI et al., 2005), de *Clostridium thermocellum* (ZVERLOV et al., 2005) e a Xiloglucanase de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (ENKHBAATAR et al., 2012).

Em termos de sequências primárias, algumas GH 74 têm regiões com elevado grau de conservação (Figura 9) e também regiões com baixa conservação (Figura 10). Os representantes das GH 74 têm origem, neste caso, tanto em fungos quanto em bactérias.

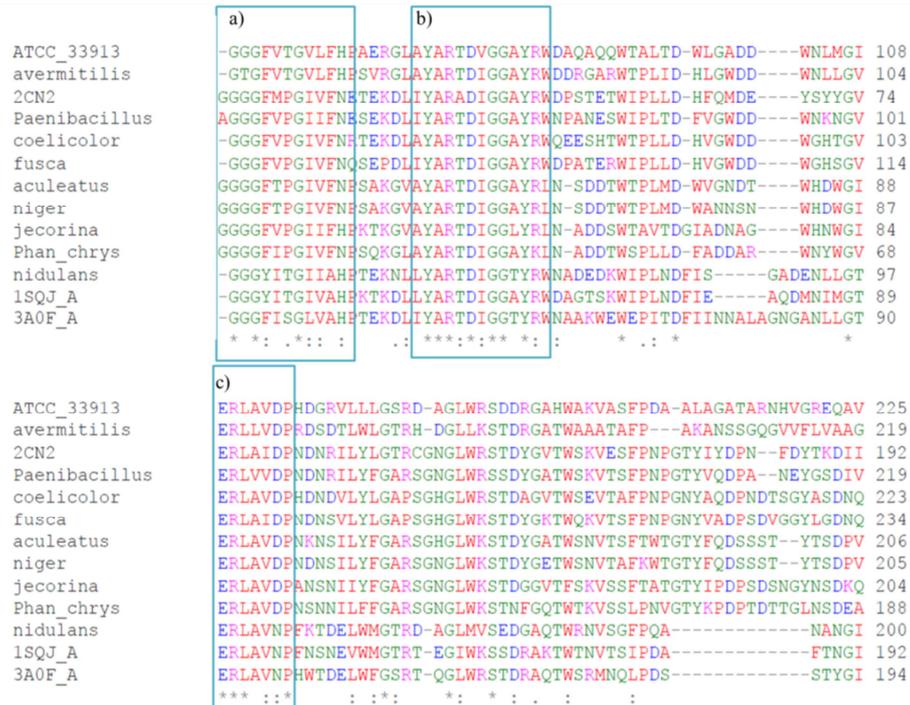


Figura 9 – Alinhamento mostrando regiões mais conservadas em algumas GH 74 em a, b e c.

O alinhamento foi realizado tomando como referência a sequência de aminoácidos da proteína Xcc-Xgh (ATCC_33913) referente a outras GHs de diferentes organismos: GH 74 de *Clostridium thermocellum* (2CN2), *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces avermitilis*, *Paenibacillus* sp. KM21, *Aspergillus aculeatus* F-50, *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus niger* CBS 120.49 / N400, *Geotrichum* sp. M128 (1SQJ_A e 3A0F_A), *Phanerochaete chrysosporium* K-3 e *Trichoderma reesei* QM6A (Jecorina).

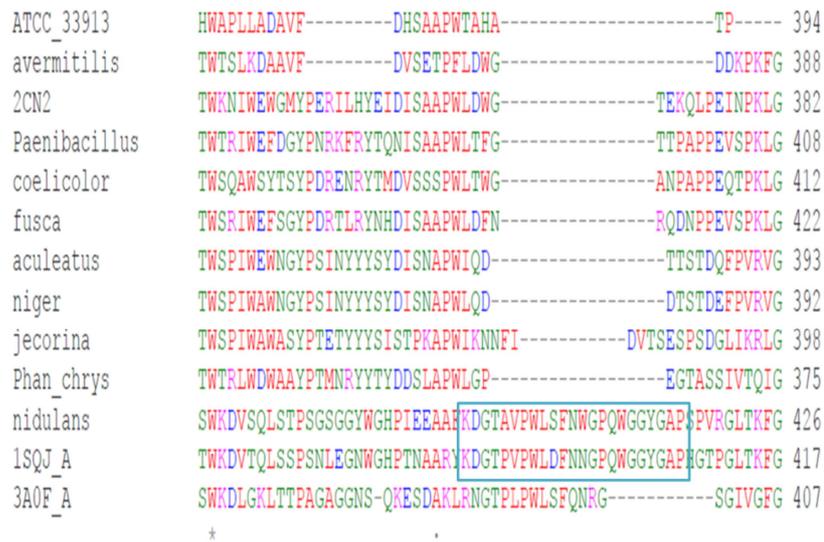


Figura 10 – Alinhamento mostrando região não conservada em certas GH 74 em termos de identidade sequencial entre alguns representantes da família GH 74.

Isso é mais bem entendido com o alinhamento múltiplo (LARKIN et al., 2007) dos representantes desta família que já foram caracterizados. Na Figura 9 (“a, b e c”) são mostrados os resíduos mais conservados. Existem diferenças marcantes entre algumas destas enzimas (Figura 10). Um fato curioso é a conservação de mais de 12 resíduos das GH 74 de *Aspergillus nidulans* e *Geotrichum* sp. M128, os quais não aparecem nas outras proteínas. Mais adiante falar-se-á a respeito desta região conservada em certas GH 74.

No alinhamento global, percebe-se que algumas das GH 74 têm grande relação entre si, como nos casos entre *Clostridium thermocellum* e *Paenibacillus* sp. KM21, *Aspergillus aculeatus* F-50 e *Aspergillus niger* CBS 120.49 /N400, *Geotrichum* sp. M128 e *Aspergillus nidulans* FGSC A4.

4.2 Amplificações gênicas

As clonagens (pTZ57/T) e subclonagens (pSMT3, pET-28a e pET-M11) , como descrito no item materiais e métodos, foram bem sucedidas. Todos os produtos ligados em vetores de clonagem ou subclonagem foram transformados em células de propagação *Escherichia coli* DH5 α (Novagen) químico-competentes via choque térmico (SAMBROOK, JOSEPH, SAMBROOK, 2001) com confirmação por restrição dos sítios de clonagem usando enzimas específicas. Por fim, os plasmídeos do gene clonado foram transformados nas cepas BL21 e Rosetta de *E. coli*.

O DNA dos clones foi sequenciado na Universidade de Campinas (Unicamp, Brasil) pelo método de Sanger e o resultado analisado pelo programa ContigExpress (Invitrogen). Para as construções T1_B e T2 (tabela 2) não houve mutações no processo de clonagem. Entretanto, para a construção T1_A (tabela 2) ocorreram duas mutações pontuais. Essas mutações naturalmente foram inseridas pela Taq DNA polimerase e produziram as mutações Gly226Arg e Val338Met. Esse erro está associado uma taxa da ordem de 10^5 a 10^7 por base inserida inespecificamente (FAZEKAS, ARON J., STEEVES, ROYCE, NEWMASER, 2010).

4.3 Expressão e purificação

Todas as construções citadas anteriormente (tabela 2) apresentaram fração solúvel. Entretanto, a truncagem que apresentou maior solubilidade foi a T1_A, como pode ser visto

na Figura 11. No entanto, na indução por 4 horas a 37 °C não se obteve resultados satisfatórios, tendo em vista que a proteína não apresentou solubilidade (dados não mostrados). As construções clonadas em pET-M11 e pET-28a apresentaram menor fração solúvel que a construção clonada em pSMT3. Assim, os resultados indicados nas figuras 11 e 12 são referentes à construção T1_A.

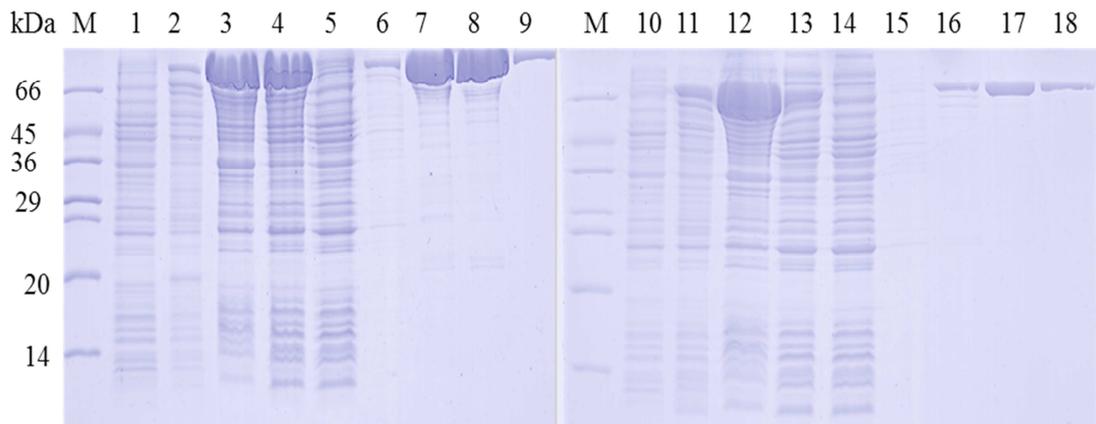


Figura 11 - Expressão e purificação da Xiloglucanase de *Xanthomonas campestris* Xcc-Xgh (T1_A). No sentido da esquerda para a direita, tem-se: o marcador de massa molecular (M), o extrato de proteínas antes da indução (1), o extrato de proteínas após a indução (2), pélete da lise celular (3), sobrenadante da lise celular (4), porção não ligada à resina de Níquel – Void (5), lavagem da porção ligada à resina de Níquel com 10 mM de imidazol (6), eluição com 100 mM de imidazol (7), eluição com 200 mM de imidazol (8) e eluição com 300 mM de imidazol (9); as colunas de 10 a 18 equivalem às colunas de 1 a 9. A coluna “M” estão os marcadores de peso molecular albumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24kDa), inibido de tripsina de soja(20,1KDa) e α -lactalbumina de leite bovino (14,2kDa)

Na Figura 11 as colunas de 1 a 9 são referentes à expressão de Xcc-Xgh em Rosetta e as colunas de 10 a 18 são referentes à expressão em BL21. Nota-se, claramente, que a Xcc-Xgh é significativamente solúvel nas duas células de expressão. Entretanto, vê-se que bactéria *E. coli* Rosetta produziu maior fração solúvel da proteína. Nota-se que a massa molar da proteína está acrescida do Tag (Sumo) na figura 11, indicando que a proteína Xcc-Xgh (76,79 kDa+13.8 kDa-Sumo) interage com a resina Ni-NTA *super flow* (Quiagen), de modo que as frações eluídas apresentam baixa quantidade de contaminantes, como pode ser visto nas colunas 7,8,9 e 16,17,18 da figura 11.

Após a dialise seguida de clivagem por ubiquitina-protease específica (ULP1) à 4 °C , removeu-se a His-tag fusionada (SUMO) de T1_A. A mistura resultante foi carregada novamente em resina Ni-NTA e Xcc-Xgh sem His-tag foi coletada. Na Figura 12 (“b”), em 1 temos a fração da proteína antes da clivagem e em 2 após a clivagem (76,79 kDa), onde se verifica que após a clivagem, passada na resina de Níquel, tem-se a proteína quase pura.

Contudo, à medida que essa amostra foi concentrada, alguns contaminantes ficaram evidentes; para a eliminação destes contaminantes, foi necessário a utilização da cromatografia por exclusão molecular, onde os resultados da aplicação desta técnica podem ser vistos nas figuras 12.

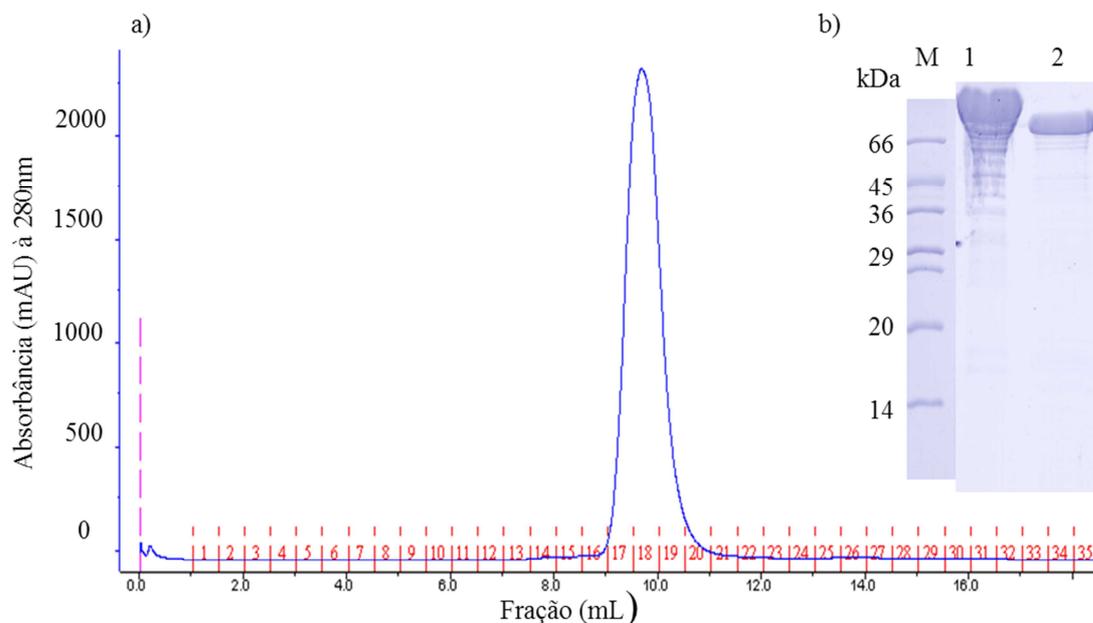


Figura 12 - Gel Filtração de Cromatografia por exclusão de tamanho da *Xcc-Xgh* Superdex 75 HiLoad 10/30. Em “a” são mostradas as frações do pico do cromatograma. Em “b”, coluna “M” estão os marcadores de peso molecular albumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24kDa), inibido de tripsina de soja(20,1kDa) e α -lactalbumina de leite bovino (14,2kDa). Na coluna 1, temos a proteína *Xcc-Xgh* antes da clivagem e na coluna 2 após a clivagem.

As frações contendo a proteína alvo foram carregadas em uma coluna cromatográfica de exclusão por tamanho Superdex 75 HiLoad 10/30 (GE Healthcare) pré-equilibrada (20 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 150 mM), e utilizando o sistema ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare Life Sciences), pôde-se remover os agregados e as impurezas da proteína de interesse. Isso pode ser mais bem visto na Figura 12. Na cromatografia por exclusão molecular, a solução de proteína apresenta um alto grau de pureza, como visto na Figura 12 (“a”). Mesmo essa proteína tendo massa molecular (MM) 76,7 kDa, não fez diferença usar a Superdex 75 HiLoad 10/30 ou a 200 HiLoad 10/30. O pico de absorvância indica a fração em que a proteína sai da coluna, como se observa nas frações de 0 a 10 mL.

As frações pós cromatografia foram avaliadas quanto ao grau de pureza por SDS-PAGE 15% corado com Azul Brillhante de Coomassie (LAEMMLI, 1970), onde as amostras de proteína mostraram grau de pureza da ordem de 95%. A concentração final foi determinada

por medição da absorção a 280 nm, utilizando NanoDrop espectrofotômetro (ThermoScientific).

As frações dos picos do cromatograma de exclusão molecular para essa proteína (figura 12a), mostram que a massa aparente da proteína é da ordem de 76,78 kDa. O alto grau de pureza indica que a amostra encontra-se em condições para as caracterizações biofísicas necessárias e testes funcionais.

Após a purificação final, proteína total quantificada resultante da expressão de um litro de cultura de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen) a 20°C pós clivagem teve o rendimento de 20mg por litro de cultura.

4.4 Caracterizações Bioquímica e Biofísica

4.4.1 Ensaio de Atividades

A chave para o entendimento dos reais mecanismos que as GH 74 usam para hidrolisar xiloglucano e/ou seus derivados está ligado a determinar a maneira que estas enzimas processam seus substratos, seja do ponto de vista bioquímico ou estrutural. Tem-se relatado que a complexidade dos modos de ação depende, principalmente, das regiões mais desordenadas como os “loops”. Mesmo com pouco mais de 13 enzimas desta família já caracterizadas quanto à sua função principal, pouco se sabe realmente sobre a especificidade das GH 74, principalmente as xiloglucanases, quanto à habilidade de degradar polissacarídeos de xiloglucano nos moldes clássicos de endo ou exo atividades.

Inicialmente, para determinar a especificidade da enzima um ensaio sobre diversos substratos foi realizado. Na figura 13 observa-se a atividade relativa da enzima Xcc-Xgh sobre os substratos deste experimento. A reação de hidrólise consistiu de 40 µL de substrato a 10 mg/mL em 50 µL de tampão acetato de amônio 50 mM (pH 5), e 10 µL de enzima a 0,2 mg/mL para 24 horas de reação. Nota-se que a maior atividade foi para xiloglucano sendo a atividade dos demais substratos normalizada em relação a este.

Para as construções T1_A e T1_B, não foi observada qualquer atividade enzimática e para a T2 observou-se alta atividade sobre xiloglucano representado na figura 13. Ainda não sabemos o que causou esse comportamento para estas construções. Sugerimos que para T1_B, a His-Tag impede o acesso do xiloglucano ao sítio ativo e para T1_A as mutações causaram mudanças estruturais que não permitem à enzima digerir o xiloglucano.

Ainda é possível observar a baixa atividade de, aproximadamente, 3% para carboximetilcelulose (CMC) e 2,5% para avicel. Sendo este comportamento enzimático esperado para xiloglucanases específicas, que são denominadas como xiloglucanases verdadeiras.

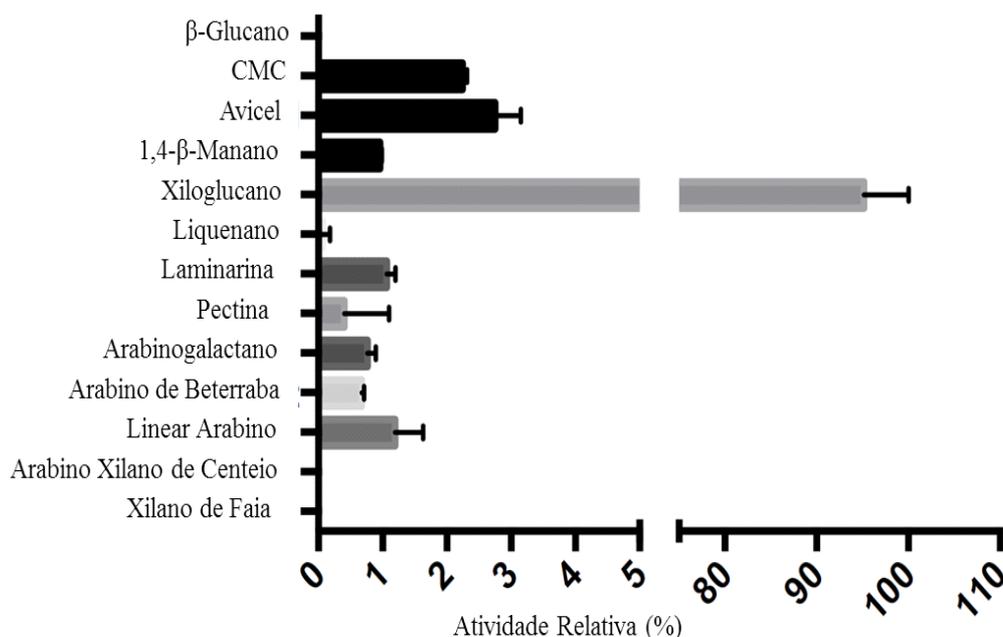


Figura 13- Painel de substratos para avaliar a atividade relativa de Xcc-Xgh para a construção T2.

Nesse sentido, tem sido reportado que a maioria das enzimas GH 74 caracterizadas bioquimicamente são específicas para xiloglucanos/oligossacarídeos de xiloglucano (TAKUYA ISHIDA, 2010). Por outro lado, uma GH da família 74 foi caracterizada funcionalmente como tendo baixa atividade relativa para xiloglucano, aproximadamente 20% (CHHABRA; KELLY, 2002). Todavia, os casos mais clássicos de ação das GH 74 são: específicas endo-β-1,4-glucanase (XEG), e hidrolases de xiloglucano (Xgh) que apresentam endoatividade em xiloglucano da semente de tamarindo (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006); celobiohidrolases-OXG- RCBH-(ISHIDA et al., 2007) e biohidrolase de xiloglucano-OREX-específicas apenas em oligossacarídeos de xiloglucano (BAUER et al., 2005).

Dentre essas enzimas já caracterizadas, xiloglucanases da família 74 são ativas em temperatura de 40 a 60 °C e com pH ótimos variando de 4,5 a 6,7 (BAUER et al., 2005; DESMET et al., 2007; ICHINOSE et al., 2012). No caso de Xcc-Xgh, fez-se os ensaios de pH e temperatura conforme descrito na seção 3.4.1. A Tabela 3 mostra os resultados da enzima em termos de sua dependência referente ao pH, temperatura e atividade específica.

Tabela 3 - Tabela 3 - Propriedades da Xcc-Xgh e comparação com outras xiloglucanases membros da família GH 74.

| Enzima | Família GH | Temperatura(s) ótima(s) | pH(s) ótimo (s) °C | U/mg | Fonte |
|--------------------------------------|------------|-------------------------|--------------------|-------|--|
| <i>X. campestris</i> Xcc-Xgh | 74 | 42 °C | 5,3 | 9,31 | Presente estudo |
| <i>AspergillusNidulans</i> | | 42 °C | 3 | 7 | (BAUER <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Aspergillusniger</i> EglC | | 55°C | 4,5 | 19 | (HASPER <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Geotrichum</i> XEG | 74 | 50°C | 5,5 | 68 | (YAOI; MITSUISHI, 2004) |
| <i>Trichodermareesei</i> XEG | 74 | 40 °C | 5,3 | 45±5 | (GRISHUTIN <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Paenibaciullus</i> sp. KM21 XEG74 | 74 | 70 °C | 6.5 | 44 | (YAOI <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Thermobifida fusca</i> | | 50 °C | 7,5 | 12,2 | (IRWIN <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>Clostridium thermocellum</i> | 74 | 75 °C | 6,2 | 295±4 | (ARTINEZ-FLEITES <i>et al.</i> , 2006; ZVERLOV <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Streptomycescoelicolor</i> A3(2) | 74 | 50°C | 6,0 | NF | (ENKHBAATAR <i>et al.</i> , 2012) |

NF: Dados não fornecidos pelo autor (es).

Na tabela 3 apresentamos um panorama das propriedades da Xcc-Xgh e de outras xiloglucanases membros da família GH 74, como pH, temperatura e atividade específica. Mesmo essas enzimas sendo provenientes de organismos distintos (fungos e bactérias), alguns parâmetros mantem-se próximos entre as várias representantes das GH 74. A melhor atividade da Xcc-Xgh foi determinada para valores de pH entre 5 e 7. Este intervalo de pH característico foi observado para outras enzimas da família GH 74, como pode ser identificado na tabela 3 (YAOI *et al.*, 2005; IRWIN *et al.*, 2003; ENKHBAATAR *et al.*, 2012; MARTINEZ-FLEITES *et al.*, 2006; ZVERLOV *et al.*, 2005).

Notamos ainda que, a atividade específica de xiloglucanases varia de centenas a poucos unidades de medida. Para a xiloglucanase de *Clostridium thermocellus* foi de 295U/mg e para a de estudo foi de 9,31. Mas de forma geral, a baixa atividade específica parece ser uma característica comum ao maior número destas enzimas caraterizadas até o momento. Contudo, estes parâmetros são de difícil comparação direta, uma vez que os métodos de quantificação na maior parte dos casos não são os mesmos.

Os resultados obtidos para a enzima de *Xanthomonas campestris* (Xcc-Xgh) são da mesma ordem de grandeza ao de outras xiloglucanases. Porém, o aprimoramento do método de quantificação bem como a utilização de outros métodos para a quantificação do açúcar redutor faz-se necessário para a comparação com os dados disponíveis na literatura.

4.4.2 Eletroforese Capilar

Tendo em vista que as enzimas GH da família 74 têm maneiras distintas de clivar os oligos de xiloglucano, como também o polímero inteiro, utilizamos esta técnica para identificar os produtos liberados na hidrólise, Figura 14.

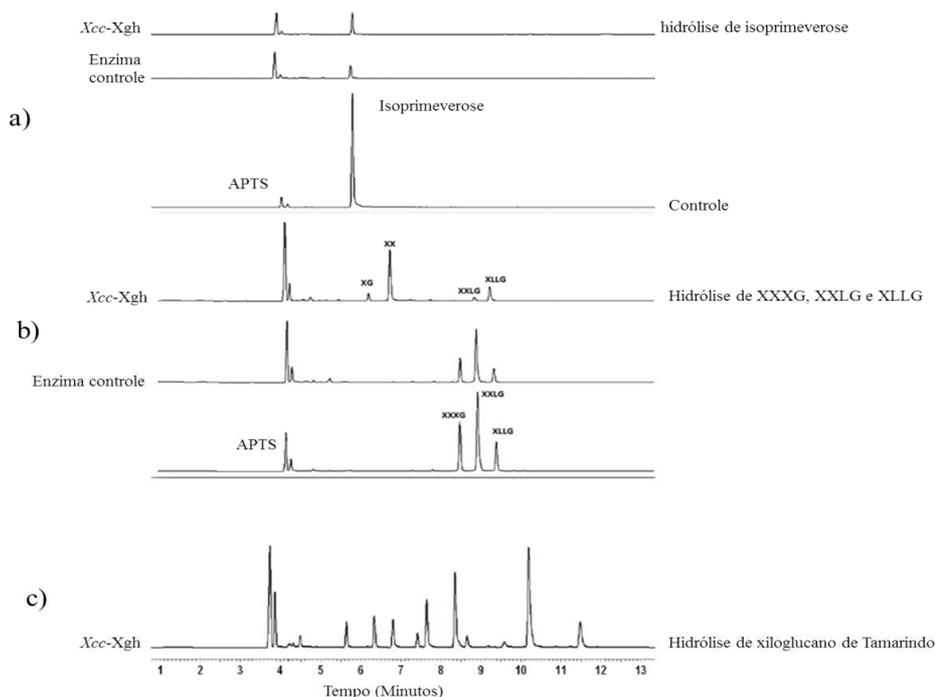


Figura 14- Espectros de Eletroforese Capilar provenientes da Hidrólise de hepta-(XXXG), octa (XXLG), nonasaccharídeo (XLLG) de Xiloglucano e do carboidrato de Xiloglucano.

Na Figura 14, tem-se em “a” a hidrólise de isoprimeverose pela *Xcc-Xgh* e por outras enzimas a fim de verificar se há contaminação por alfa-xilosidase; a enzima controle é uma endoxiloglucanase conhecida quanto ao seu padrão de hidrólise (dados não publicados). Isoprimeverose é um dissacarídeo [α -D-xilopiranosil-(1,6)-D-glicopiranosose] que majoritariamente compõe a estrutura de xiloglucanos, representando 75% de resíduos tipo α -(1,6)-D-xilose ligados aos resíduos de glicose na arquitetura geral do xiloglucano; em geral, a ação de xiloglucanases sobre o xiloglucano produz fragmentos de xiloglucano (hepta-a nonasaccharídeos) e oligossacarídeos mais pequenos, tais como isoprimeverose (CHAILLOU et al., 1998); algumas α -xilosidases atuam nesses oligossacarídeos de xiloglucano e/ou isoprimeverose clivando as ligações α -xilósídicas, como a do isoprimeverose (SAMPEDRO et al., 2010; CHAILLOU et al., 1998). No caso de xiloglucanos que apresentam contaminação por essas enzimas há a clivagem dos resíduos que apresentam as ramificações do tipo α -(1,6)-

D-xilose. Isso representam um problema quando pretende-se analisar o padrão de hidrólise das enzimas xiloglucanases.

Em “b” tem-se a hidrólise de hepta-(XXXG), octa (XXLG) e nonassacarídeo (XLLG), como também o xiloglucano. A enzima *Xcc-Xgh* hidrolisa XXXG em dímeros, no entanto, não hidrolisa XXLG e XLLG. Em “c” tem-se a hidrólise de xiloglucano por *Xcc-Xgh*, no qual não é possível identificar quais são os produtos formados pela análise do padrão de hidrólise. Nos oligossacarídeos com ramificações de galactose (XXLG e XLLG) a enzima *Xcc-Xgh* não apresentou ação catalítica, sugerindo que na presença dessas ramificações, *Xcc-Xgh* perde o poder de hidrólise. Esse comportamento é curioso por conta de as exoenzimas agirem dessa forma.

O modo de ação das GH 74 tem sido reportado na literatura como um fato extremamente interessante do ponto de vista da estrutura e função. Como descrito na introdução, há dois modos principais destas enzimas hidrolisarem o xiloglucano: como endoenzimas (endoxiloglucanase) e como exoenzimas (exoxiloglucanases).

As endoxiloglucanases hidrolisam o xiloglucano principalmente em oligossacarídeos do tipo XXXG, XLXG (ou XXLG) e XLLG, clivando a ligação glicosídica dos resíduos de glicose não ramificados (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006; ICHINOSE et al., 2012). Como resultado do mecanismo usado por estas enzimas, tem-se a liberação de quatro resíduos de glicose a partir da cadeia central do XG. No caso de as misturas de oligossacarídeos de xiloglucano possuírem ramificações de galactose, são liberados apenas os produtos XXXG e a mistura XLXG/XXLG/XLLG (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006). No caso de endoxiloglucanases hidrolisando XXXG são produzidos XX e XG (YAOI et al., 2007). Já as exoxiloglucanases têm preferência por clivar oligossacarídeos de xiloglucano pelas extremidades redutoras, uma propriedade única que confere a essas enzimas a característica de liberar dois resíduos de glicose a partir destas extremidades, sendo a clivagem da ligação glicosídica entre duas unidades de glicose ramificadas (YAOI et al., 2007). Essa capacidade de clivar os substratos desta maneira é sugerida como sendo por conta de um “loop” (Gly375-His385, em 1SQJ) que confere exoatividade a essas enzimas (YAOI et al., 2004).

Na hidrólise de XXXG por *Xcc-Xgh* tem-se a liberação do produto XX e XG. Por outro lado, o motivo de não ocorrer a clivagem de oligossacarídeos com ramificação de galactose, o qual é uma característica das exoxiloglucanases, não ficou entendido. Essa é uma questão que merece maior investigação e, por eletroforese capilar, não é possível concluir se a enzima *Xcc-Xgh* é uma exo ou endo xiloglucanase.

4.4.3 Cristalização e coleta de conjuntos de dados

A solução proteica de *Xcc-Xgh* à 42mg/mL (T1_A em tampão 50 mM de NaCl, 20 mM tris e pH 8) foi submetida a várias condições de cristalização de maneira automatizada até obtenção favorável em 100 mM de cacodilato de sódio pH 6,5, 200 mM de cálcio e 18% (m/v) de polietileno glicol 8000. A forma macroscópica dos cristais obtidos se assemelhava a um chuveiro de cristais do tipo agulha (Figura 15 A), os quais seriam de difícil aplicação a experimentos de difração de raios-X. Variando a condição inicial quanto a concentração e aplicando o método de difusão da gota suspensa foram obtidos cristais melhor formados com um dia de equilíbrio aplicando a proteína à 20 mg/mL (Figura 15 B).

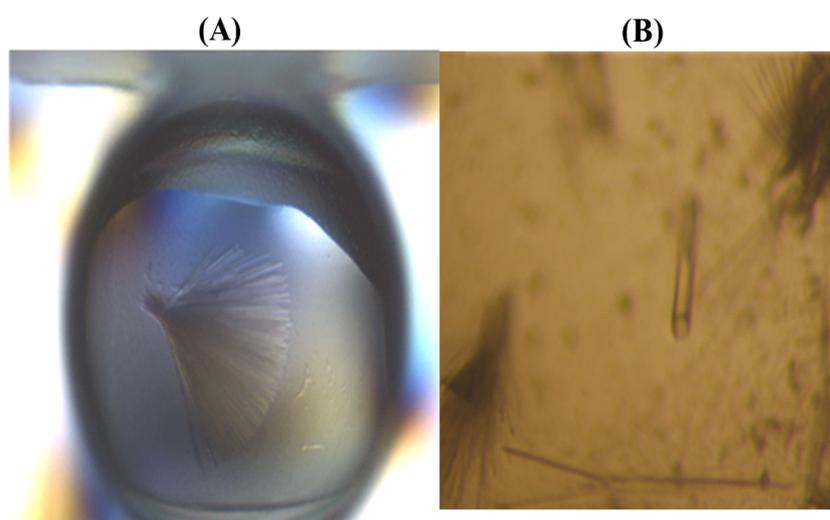


Figura 15 – Cristais de *Xcc-Xgh* obtidos durante a condição inicial de cristalização (A) e depois da otimização (B).

Os conjuntos de dados de difração foram coletados a partir de um cristal de proteína nativa crio-protetido à -173 °C (100 K) e sua resolução máxima estendida até 2,0 Å (conjunto apo). O segundo conjunto de dados de difração da enzima complexada com glicose (conjunto glicose (a)) obtida por “soakin” usando glicose a 1M, foi coletado a 2,1 Å de resolução. O terceiro conjunto de dados de difração foi coletado a 2,7 Å de resolução (tabela 4), onde o produto da hidrólise de *Xcc-Xgh* sobre xiloglucano foi usado como soaking para obtenção de oligossacarídeos no sítio ativo desta enzima (conjunto glicose (b)). Na Figura 16, mostramos o padrão de difração para os conjuntos de dados coletados.

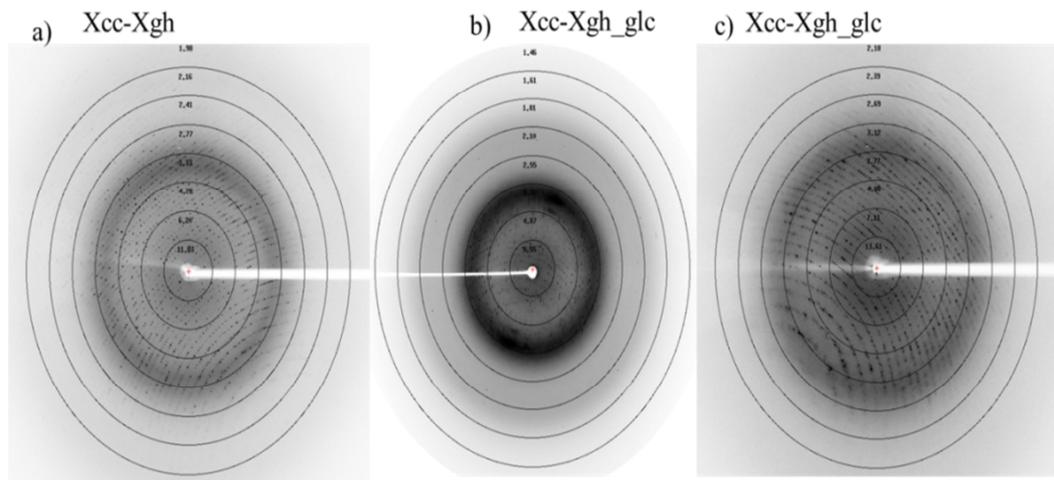


Figura 16 – Padrão de Difração de raios-X para todos os conjuntos de dados coletados. Em a, para a proteína apo, em b para o conjunto glicose (a) e c para o conjunto glicose (b).

4.4.4 Determinação estrutural, Refinamento e Validação do Modelo

Os resultados da indexação, integração e escalonamento dos conjuntos de dados coletados estão sumarizados na tabela 4. Estes conjuntos foram resolvidos levando em consideração as sugestões canônicas de processamento de dados cristalográficos de macromoléculas, tais, como R_{merge} e $\langle I/\sigma(I) \rangle$ (KARPLUS; DIEDERICHS, 2012; BRÜNGER, 1992; EVANS, 2012).

Tabela 4 - Dados Cristalográficos e de processamento da proteína Xcc-Xgh. Os dados entre parênteses se referem à última camada de resolução.

| | Apo | Complexada com glicose (a) | Complexada com glicose (b) |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Fonte | LNLS-MX2 | LNLS-MX2 | BNL-X4A |
| Comprimento de onda (Å) | 1,45 | 1,45 | 0,98 |
| Grupo espacial | P6₁ | P6₁ | P6₁ |
| a = b (Å) | 153,43 | 150,53 | 151,72 |
| c (Å) | 84,92 | 84,20 | 85,29 |
| Unidade assimétrica | 1 | 1 | 1 |
| Resolução (Å) | 19,7-2,0 | 42,5-2,1 | 43,81-2,71 |
| Número de reflexões | 837436 | 149921 | 69376 |
| Número de reflexes únicas | 76752 | 55997 | 29052 |
| R_{merge} (%) | 6,5 (28,6) | 7,1 (72,4) | 8,7 (44,3) |
| $\langle I/\sigma(I) \rangle$ | 26,86 (9,08) | 29,1 (1,5) | 21,92 (3,52) |
| Completeza (%) | 99,8 (100) | 99,3 (100) | 95,4 (85,9) |
| Multiplicidade | 10,9 (10,7) | 2,7 (2,6) | 7,25 |

No escalonamento dos conjuntos de dados foram obtidos um total de 837436, 149921 e 69376 reflexões, sendo 76752, 55997, 29052 as reflexões únicas para o conjunto na forma “apo”, complexada com glicose (a) e complexada com glicose (b), respectivamente. Isso resultou no valor de R_{merge} da ordem de 50,0% na última faixa de resolução e conjuntos de dados processados com o máximo possível de completude nesta mesma faixa de resolução, como indicado na Tabela 4.

Os cristais com os ligantes apresentaram ligeira diferença nas dimensões da célula unitária (Tabela 4) quando comparados com o cristal não complexado, sugerindo o impacto do ligando na rede cristalina.

Assumindo a presença de uma molécula por unidade assimétrica, o conteúdo de solvente nos cristais foi estimado como 50,0% do volume total, com base no coeficiente de Matthews. O escalonamento dos dados sugeriu o grupo pontual P6 e os enantiômeros P6₁ ou P6₅, o que pôde ser resolvido no processo de substituição molecular utilizando a estrutura cristalográfica da enzima homóloga de *Clostridium thermocellum* F7/YS, código PDB 2CN2 (MARTINEZ-FLEITES et al., 2006), que claramente P6₁ é o grupo espacial correto. O ajuste das fases experimentais via processamento de refinamento manual encontra-se em fase de finalização (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados de refinamento das estruturas.

| | Complexo com Glicose (a) | Apo | Complexo com Glicose (b) |
|-------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| Final R_{work} | 0,170 | 0,175 | 0,212 |
| Final R_{free} | 0,209 | 0,204 | 0,246 |
| Ligante | 1 | 0 | 1 |
| r.m.s.d | | | |
| Ligações (Å) | 0,007 | 0,007 | 0,008 |
| Ângulos (°) | 1,200 | 1,198 | 1,312 |
| Análise de Ramachandran | | | |
| Regiões favorecidas (%) | 94,8 | 94,9 | 92,6 |
| Regiões permitidas | 4,7 | 4,3 | 6,4 |
| Outliers (%) | 0,3 | 0,6 | 0,8 |

Os mapas de densidade eletrônica mostram claramente as cadeias laterais, a correta orientação das mesmas e os ligantes reforçando o êxito do faseamento obtido. Como consequência, os modelos preliminares de refinamento possuem valores de R_{work} e R_{free} que são aceitáveis tomando como média as estruturas depositadas na mesma faixa de resolução, os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 5. Durante o refinamento, foi possível observar uma clara evolução nos mapas de densidade eletrônica em consequência dos ajustes

de fases. Os pesos impostos para manter a estereoquímica padrão do modelo durante o refinamento foram satisfatórios, resultando em valores aceitáveis para os R_{work} e R_{free} , como também para os valores de *rmsd* dos comprimentos de ligações e ângulos de ligação mostrados na tabela 5. Usando o diagrama de Ramachandran para o modelo estudado aqui, podem-se ver graficamente os resíduos que estão fora das regiões permitidas (Figuras 17, 18 e 19).

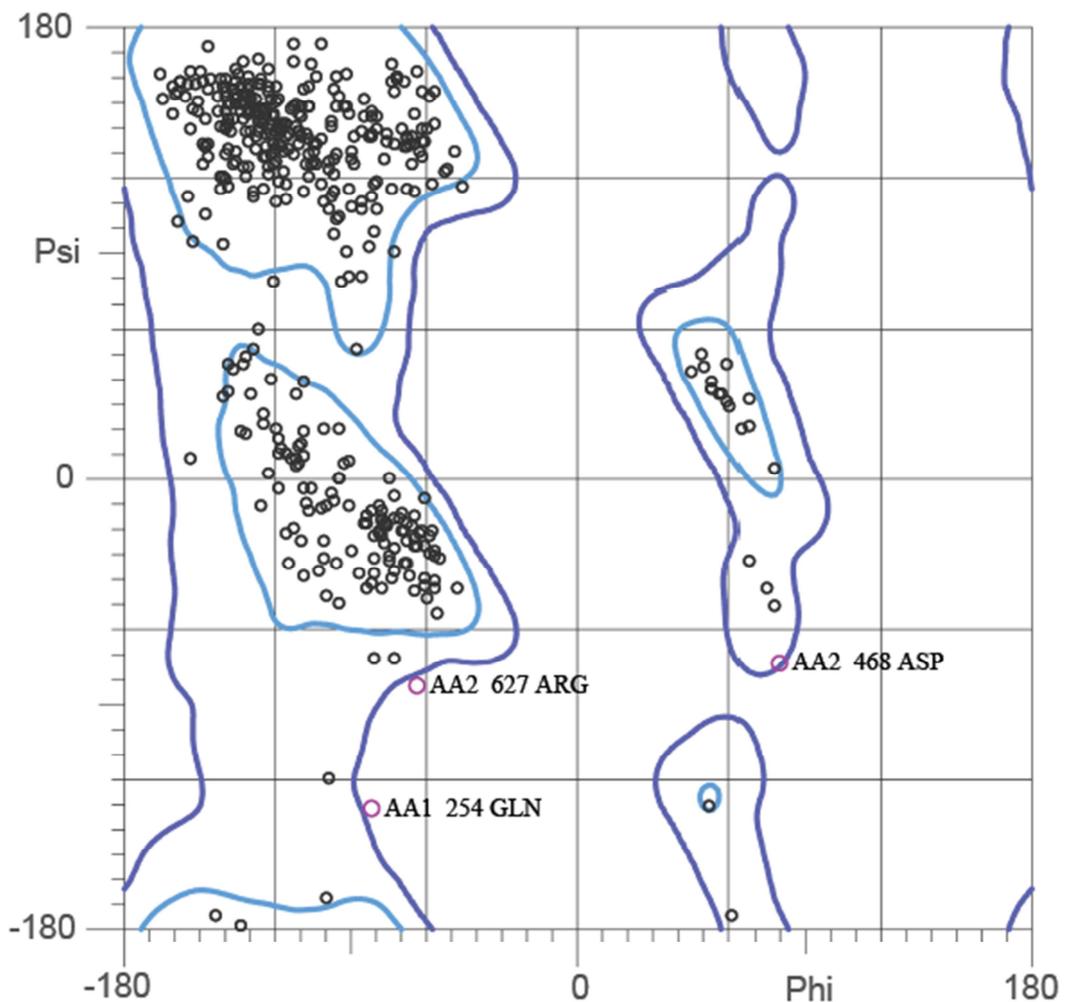


Figura 17 – Diagrama de Ramachandran para a estrutura de Xcc-Xgh apo. Os pontos em rosa indicam os resíduos que estão fora das regiões permitidas no diagrama de Ramachandran.

A análise de Ramachandran para os valores dos ângulos ϕ (Phi) e ψ (Psi), ainda não está de acordo com os valores esperados para estruturas com esta resolução, como pode ser observado na tabela 5 e pelos diagramas de Ramachandran para os modelos apo, complexado com glicose (a) e complexado com glicose (b). O gráfico de Ramachandran foi realizado tanto pelo Molprobaty, como também pelo Procheck (LASKOWSKI et al., 1993). Em todos os casos, ficou evidente que alguns resíduos estão fora da região permitida.

Esses resíduos estão localizados em “loops” nas estruturas e a modelagem destes se torna uma tarefa árdua por conta de o mapa de densidade eletrônica não estar bem definido nestas regiões.

No caso da estrutura apo, três resíduos de aminoácidos apresentam maior problema quanto à análise de Ramachandran. Esses aminoácidos são a glutamina 254, o Aspartato 468 e Arginina 627. Observando a posição desses resíduos, verifica-se que os mesmos se encontram em região de “loop” e, possivelmente, por conta disso a modelagem não tenha sido satisfatória.

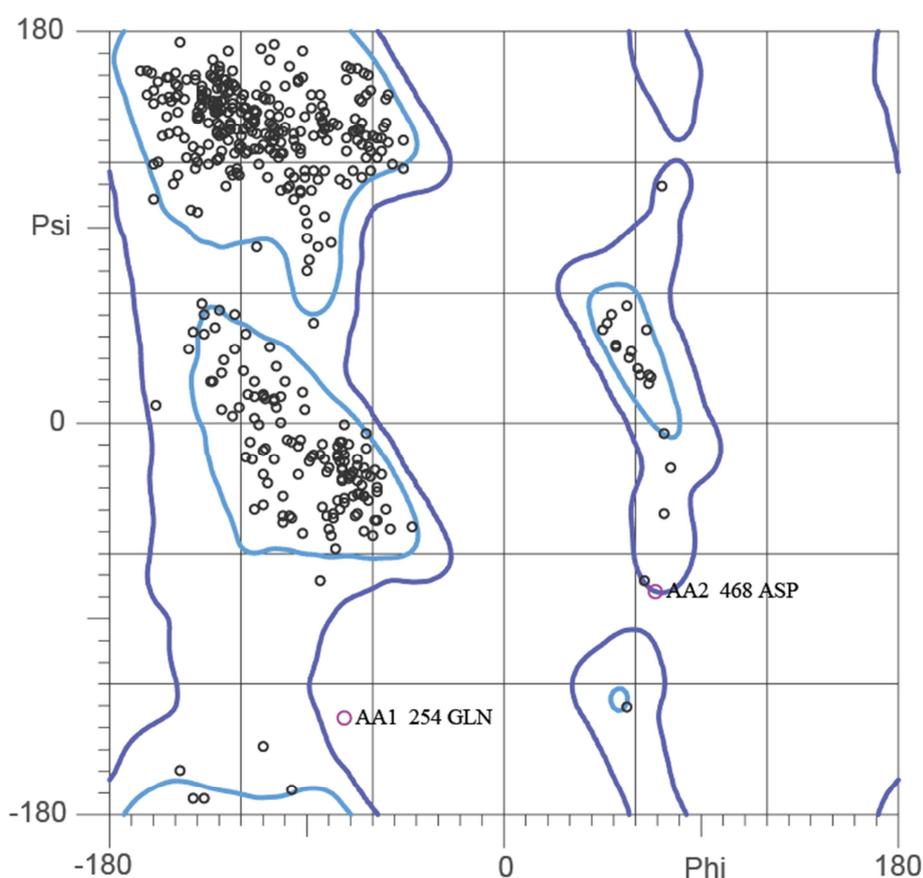


Figura 18 – Diagrama de Ramachandran para a estrutura de *Xcc-Xgh* complexado com glicose (a). Os pontos em rosa indicam os resíduos que estão fora das regiões permitidas no diagrama de Ramachandran.

Para o modelo complexado com glicose (a) (Figura 18) são encontrados dois resíduos fora da região permitida por Ramachandran. Novamente a glutamina 254, mas neste o Aspartato 468 precisa ser mais bem modelado, a fim de representar a região em questão com estatística mais criteriosa no modelo cristalográfico final.

Já para o modelo complexado com glicose (b), anteriormente mencionada como sendo oriunda do produto da ação desta enzima sobre o xiloglucano, são observados quatro resíduos

fora da região permitida pela análise de Ramachandran. Isso é justificável, por conta de este modelo está em fase inicial de refinamento.

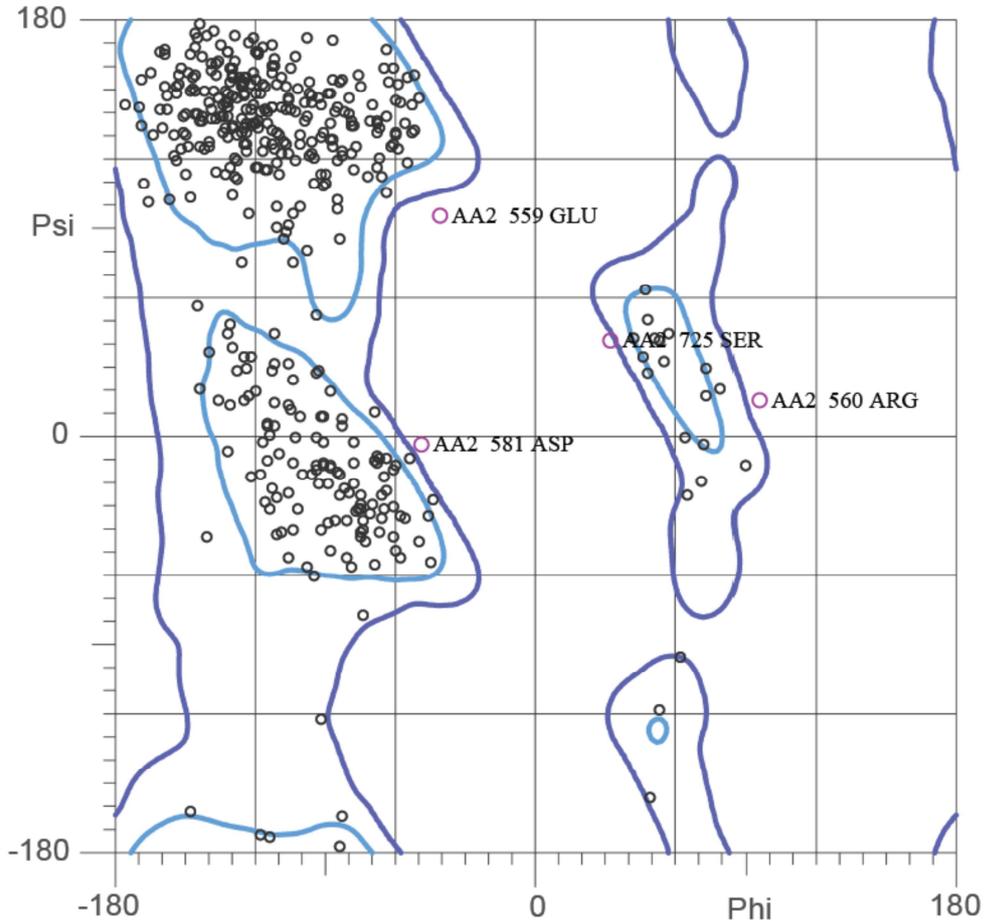


Figura 19 – Diagrama de Ramachandran para a estrutura de Xcc-Xgh complexado com glicose (b). Os pontos em rosa indicam os resíduos que estão fora das regiões permitidas no diagrama de Ramachandran

Mas no geral, os mapas obtidos nestas resoluções dão conta de fornecer detalhes importantes das três estruturas obtidas. Nas quais, em duas delas incluem: uma molécula de glicose com coordenação suficiente para concluir que se trata de um ligante importante em termos funcionais. As cadeias laterais internas apresentam em geral, melhor definição, para as regiões que formam as folhas- β características destas estruturas na família GH74.

4.4.5 Modelo cristalográfico da proteína Xiloglucanase de *Xhantomonas campestris*

Aqui apresentamos o terceiro modelo cristalográfico de uma xiloglucanase da Família GH 74 (Figura 20 A e B), sendo de uma proteína bacteriana e o primeiro da superfamília

Xanthomonadales. Estruturalmente essa proteína é composta por dois domínios, nos quais a interface que os separa forma um bolsão característico que fica em contato com o solvente.

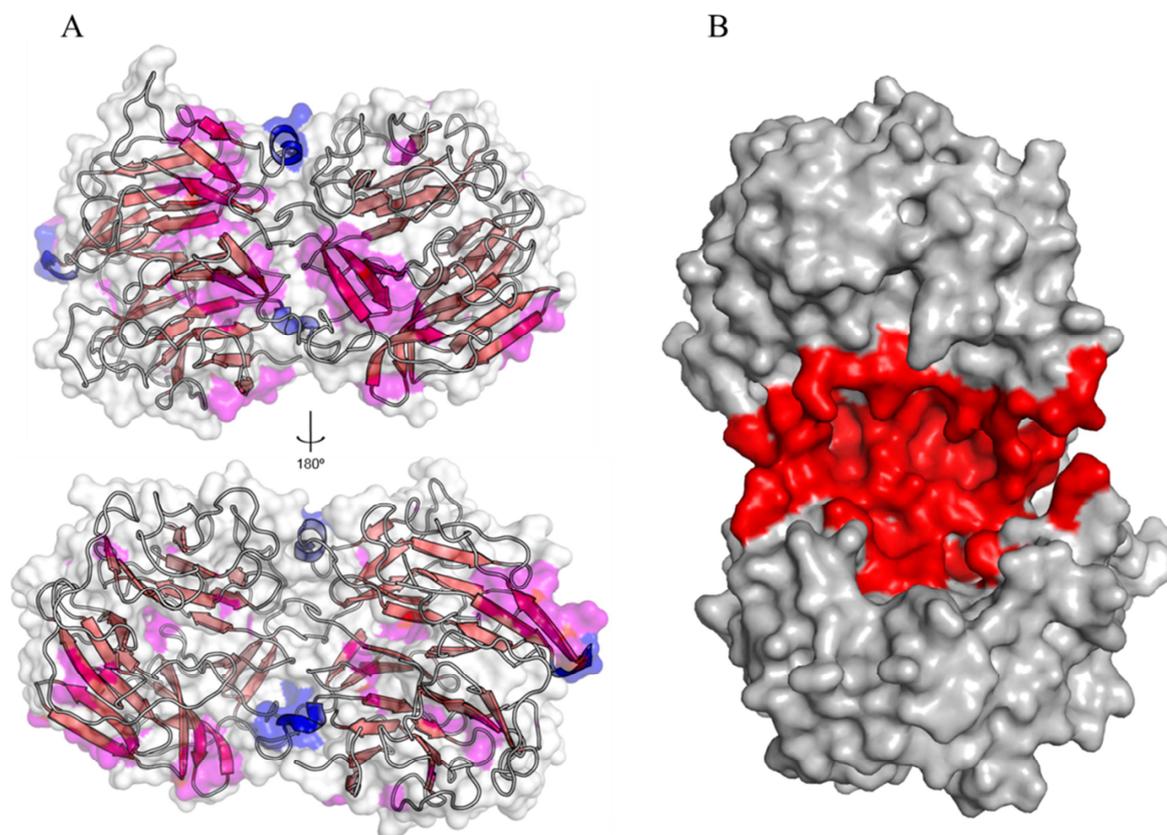


Figura 20 - Modelo cristalográfico da proteína *Xcc-Xgh*. Identificação das principais estruturas secundárias presentes no modelo. A, modelo cristalográfico em “cartoon” e superfície. B, modelo cristalográfico em superfície e em vermelho a região de sítio catalítico.

Do ponto de vista estrutural, os únicos membros da família GH 74 publicado até o momento são as xiloglucanases de *Geotrichum* sp. M128-(OXG-RCBH) e a de *Clostridium thermocellum*, nas quais a estrutura consiste de dois domínios com folhas- β como estrutura secundária predominante, aonde o centro catalítico é formado pela interface destes dois domínios. A topologia global de *Xcc-Xgh* é, portanto, muito semelhante às outras duas com todos os elementos de estrutura secundária muito similar. Não surpreendentemente, a maior divergência estrutural é encontrada nos “loops” que ligam as arquiteturas do tipo β -hélices. Essas regiões são importantes para a atividade das GH 74 (YAOI et al., 2009).

Utilizando o programa PDBsum geneate (“PDBsum Generate,” [s.d.]) pode-se determinar os principais elementos de estrutura secundária da presente molécula: 14 folhas- β (“ β -sheets”) e 97 voltas- β (“ β -turns”).

As diferenças mais marcantes entre a proteína do presente trabalho e as demais já estudadas por cristalografia estão nas conformações adotadas pelos “loops” comparados por alinhamento estrutural com 2CN2 e 1SQJ, o que pode contribuir significativamente à especificidade para o substrato. Estes detalhes estruturais são mostrados na Figura 21.

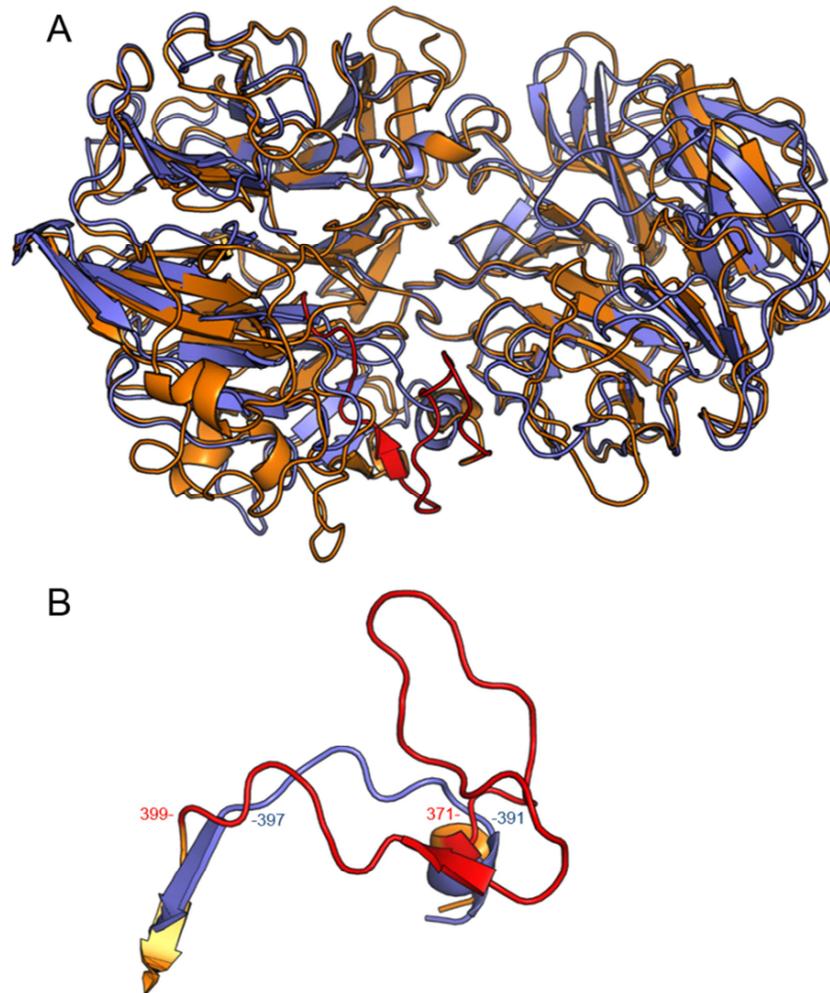


Figura 21 - Modelo cristalográfico da proteína *Xcc-Xgh* (em violeta). Alinhamento estrutural com 1SQJ (em amarelo). Em A tem-se o alinhamento estrutural mostrado o “exoloop” (em vermelho) entre *Xcc-Xgh* e 1SQJ. Em B tem-se o alinhamento entre *Xcc-Xgh* e 1SQJ comparando o “exoloop” de 1SQJ com o “loop” de *Xcc-Xgh*. Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos.

Como já comentado anteriormente, esse “exoloop” (Gly375–His385) confere à xiloglucanase a especificidade por substrato e ainda determina a preferência hidrolítica. De uma maneira mais pontual, foi sugerido que esta região determina se as xiloglucanases vão hidrolisar o substrato como uma endoenzima ou como uma exoenzima. Entretanto, o mecanismo usado pelas enzimas para realizar tal processo ainda não foi esclarecido.

A região da estrutura que responde como sítio é imediatamente aparente como uma região de ligação do substrato que se encontra numa fenda aberta, formando um sulco entre a interseção dos dois domínios, Figura 22.

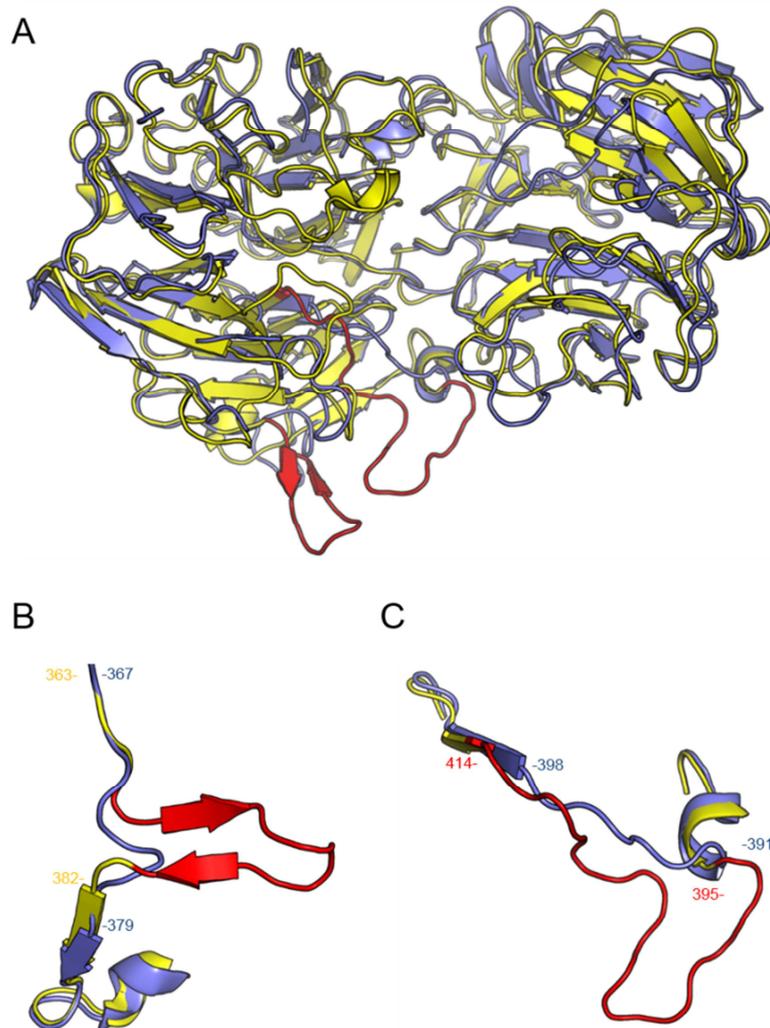


Figura 22 – Em a tem-se o alinhamento estrutural com *Xcc-Xgh* e 2CN2 mostrando a região de sítio ativo das xiloglucanases da família das GH 74. A, em violeta *Xcc-Xgh*, em amarelo 2CN2 e em vermelho os “loops” de 2CN2 que mais se destacam em relação aos “loops” de *Xcc-Xgh*. B e C, comparação dos “loops” de *Xcc-Xgh* em relação à 2CN2. Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos.

Essa diferença estrutural entre exoglucanase e endoglucanase, indica que os modos de ação nos substratos são ditados pela forma de seus sítios ativos. Endoglucanases com seus sítios ativos livres podem se ligar e agir no meio das cadeias dos xiloglucanos, enquanto que as exoglucanases agem pelas extremidades terminais destes substratos.

Foi demonstrado que a supressão de um dos “loops” da superfície que cobre o sítio ativo da CBHI faz aumentar a característica “endolítica” destas exoenzimas (MEINKE et al., 1995). Esta descoberta mostra que a estrutura cristalina da endoglucanase Cel6B de *H. insolens* (DAVIES et al., 2000) está relacionada com outras celobioidrolases homologas pela redução na superfície de um único “loop”. Para o caso da xiloglucanases de *Geotrichum* sp. M128 (OXG-RCBH) (YAOI et al., 2007) foi demonstrado que a supressão do “exoloop”, correspondendo à região dos resíduos Gly375–His385, retirou a característica “exolítica”

destas exoenzimas, conferindo à mesma o aumento da ação “endolítica”. Isso fornece fortes evidências de que as estruturas de “loops” ditam os modos de ação destas enzimas da Família GH74.

Somando a isso, os resíduos catalíticos sugeridos por MARTINEZ-FLEITES e colaboradores (2006), foram localizados na presente estrutura em região de “loops” com posições Asp77 (base) e Asp 466 (ácido), onde é possível ver que cada resíduo está licalizado nos domínios distintos que convergem para a acomodação do substrato no sítio ativo (Figura 23).

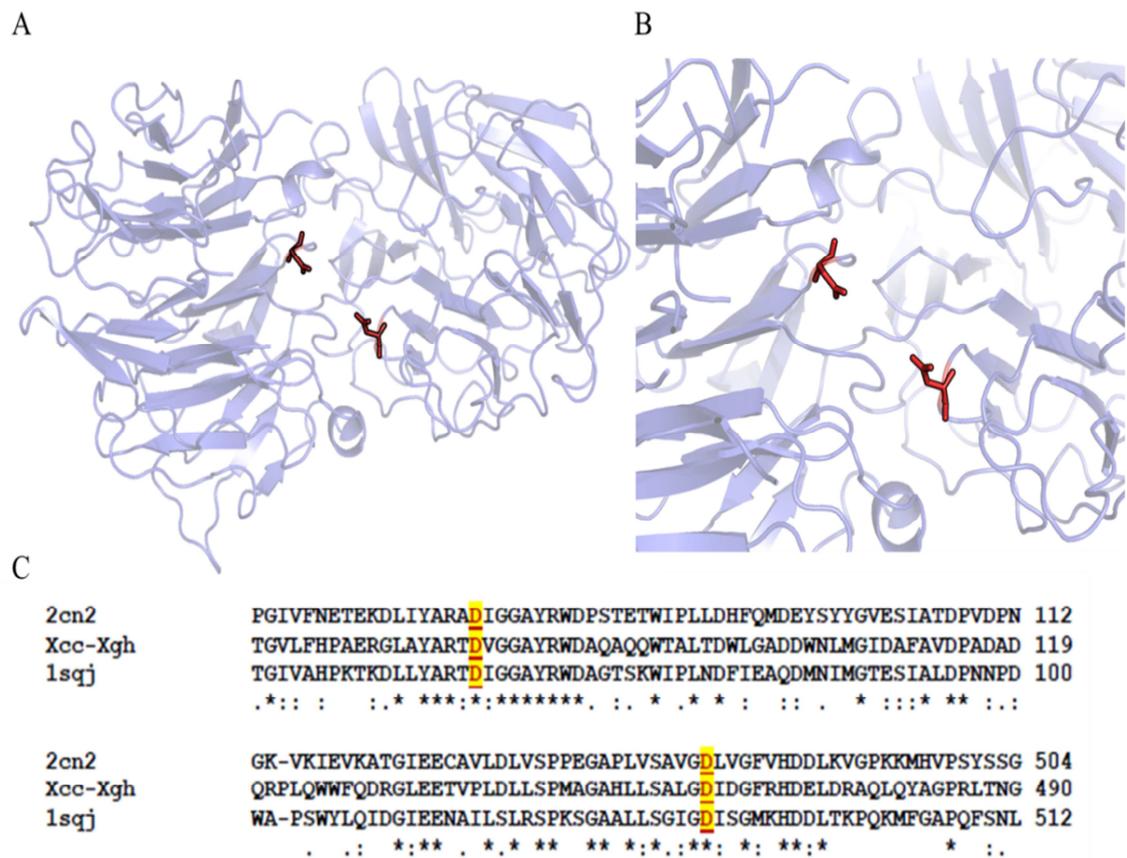


Figura 23 - estrutura de Xcc-Xgh. Em A é mostrado à esquerda o resíduo catalítico Asp 77 e à direita o segundo resíduo catalítico Asp 466. Em B é mostrado que esses resíduos estão direcionados para a região do sítio ativo que acomoda o substrato. Em C vê-se o alinhamento sequencial entre Xcc-Xgh, 1sqj e 2cn2.

Os resíduos Aspartato são bem conservados na maioria das GH 74 que foram alinhadas com Xcc-Xgh neste trabalho. Destacado em amarelo na Figura 23 (C), é mostrado o resultado das estruturas primária de 2cn2 e 1sqj em relação a Xcc-Xgh evidenciando a conservação dos resíduos catalíticos já sugeridos como ácido e base na hidrólise enzimática.

4.4.6 Modelo cristalográfico da proteína Xiloglucanase complexado com Glicose e localização das mutações

Analisando os mapas de densidade eletrônica, as evidências apontam para o fato de as glicoses complexadas em *Xcc-Xhg* têm um forte significado funcional e estrutural. Isso é confirmado pela coordenação das mesmas na estrutura, como pode ser visto na Figura 24.

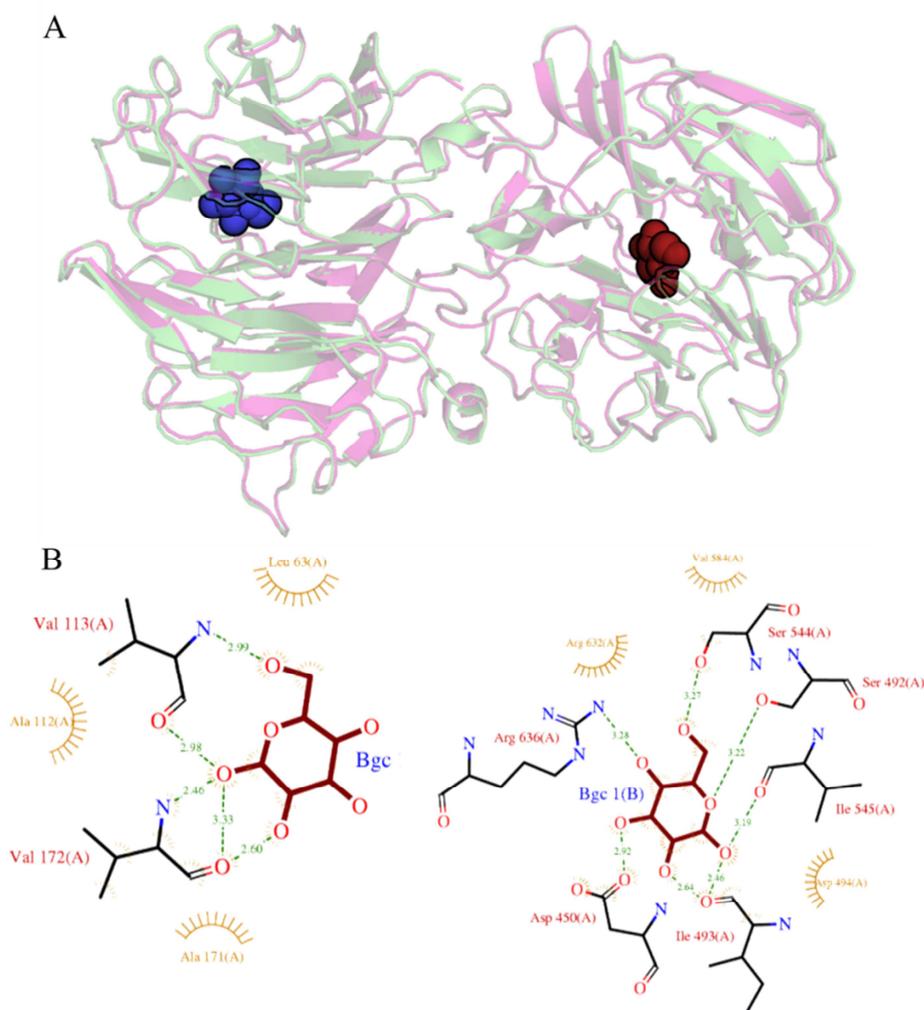


Figura 24 - Estrutura de *Xcc-Xgh* complexada com glicose. Em A, à esquerda, tem-se uma visão geral da localização da glicose na molécula de proteína como resultado do experimento de “soaking” por glicose 1M, à direita é mostrada a localização da glicose obtida por “soaking” usando o produto de hidrólise da ação da *Xcc-Xgh* sobre xiloglucano. Em B mostra-se as coordenações da glicose em relação a alguns resíduos: à esquerda o resultado do Complexo *Xcc-Xgh* (a) e à direita o resultado do complexo *Xcc-Xgh* (b). Em verde claro tem-se a figura de *Xcc-Xgh* (b) e em rosa tem-se a figura de *Xcc-Xgh* (a).

Nessa figura, os ligantes nas moléculas foram introduzidos por “soak”. No complexo *Xcc-Xgh* (a) foi usado como ligante uma solução de glicose pura altamente concentrada. No outro caso fez-se a hidrólise do xiloglucano. No primeiro caso a interação se dá entre a glicose

e os resíduos Val113 e Val172. No segundo caso há um maior número de interação com a glicose: Arg636, Asp450, Ser544 e Ser492, Ile 493 e Ile545. Ainda no caso do complexo *Xcc-Xgh* obtido com o produto de hidrólise, a densidade eletrônica é pouco conclusiva e, portanto, continua sendo modelado.

Do ponto de vista funcional, o comportamento desta enzima frente à possibilidade de o produto liberado na hidrólise modular a ação enzimática ainda não foi esclarecido. Por tanto, o conhecimento, em escala atômica, da interação enzima e o produto gerado por sua ação, pode fornecer pressupostos valiosos para entender a função enzimática a nível molecular.

Por outro lado, ainda não foi possível determinar o afeito das mutações sobre a estrutura de *Xcc-Xgh* por conta de ainda não termos resolvido a estrutura da construção com atividade. Sabe-se, entretanto, que essas mutações causaram as trocas Gly226Arg e Val338Met. Todavia, a troca Gly226Arg está em uma folha- β , enquanto a troca Val338Met está em uma região de “loop” em contato com a fenda catalítica mencionada em trabalhos anteriores para outras GH74. Assim, sugere-se que de algum modo essas mutações sejam desfavoráveis para a ação catalítica e, por consequência, podem contribuir para a falta de atividade da proteína (construção T1_A), indicando que a especificidade por substratos e o modo de ação destas enzimas são regulados por detalhes particulares de sua estrutura tridimensional e não somente pela sua arquitetura global (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

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

Os experimentos de espalhamento a baixo ângulo (SAXS) foram realizados para determinar o comportamento enzimático em solução da proteína *Xcc-Xgh*. Aqui relatamos os resultados do espalhamento de baixo em solução dos parâmetros raio de giro, diâmetro máximo, $p(r)$ e envelope. Ainda, para analisar a perda de globularidade, fez-se e desnaturação térmica variando a temperatura de 20 a 60 °C. As curvas de espalhamento da proteína *Xcc-Xgh* em solução foram obtidas expondo as amostras ao feixe de raios-X durante 300 segundos fazendo duplicadas de cada medida para avaliar possíveis danos causados pela radiação. Nos experimentos de espalhamento, a concentração das amostras foi de 13mg/mL, 5mg/mL e 1mg/mL. Na estabilidade térmica foram usadas amostras na concentração de 1 mg/mL. Na Figura 25, é mostrado o resultado do espalhamento da proteína em concentrações distintas. Isso é necessário quando desejamos que as moléculas em solução tenham o comportamento similar a de um sistema monodisperso ideal (KIRILENKO; SEDJO, 2007)(JACQUES et al., 2012).

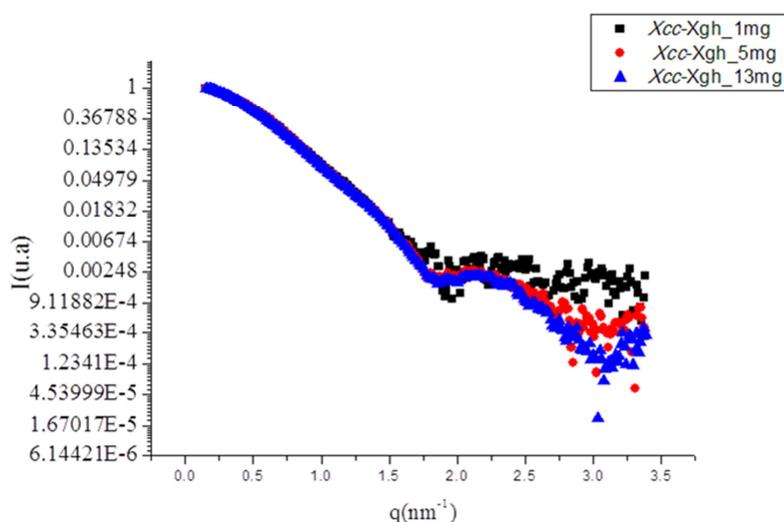


Figura 25 - Curvas das intensidades de espalhamento para a proteína *Xcc-Xgh* em diferentes concentrações. Em preto, tem-se o espalhamento a 1 mg/mL; em vermelho, tem-se o espalhamento à 5 mg/mL e; em azul, tem-se o espalhamento à 13 mg/mL.

A normalização das curvas de intensidade medidas para cada concentração não mostrou diferenças na região de baixa resolução. Por esse motivo, acredita-se que não houve erro nas medidas por efeito de concentração. Além de analisar a região de baixa resolução, também foi visto o quão globular é a proteína fazendo o gráfico de Kratky e mapeando a taxa de decaimento de $1/q$.

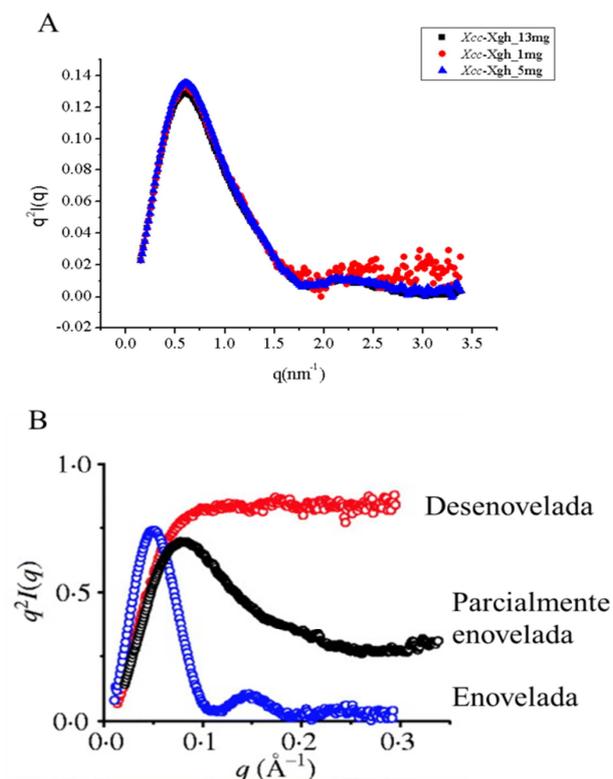


Figura 26 – A, curvas das intensidades de espalhamento para a proteína *Xcc-Xgh* em diferentes concentrações analisadas pelo gráfico de Kratky; em preto, tem-se o espalhamento à 13 mg/mL; em vermelho,

tem-se o espalhamento à 1 mg/mL e; em azul, tem-se o espalhamento à 5 mg/mL. B, curvas das intensidades de espalhamento para uma proteína em estados conformacionais distintos: em azul vê-se o gráfico de Kratky característico para proteínas totalmente enoveladas, em preto para parcialmente e em vermelho para desenoveladas (PUTNAM *et al.*, 2007).

Aqui, fazendo essa análise, verificou-se que as moléculas têm alto grau de globularidade. Isso é esperado para um representante das GH 74 em função da conservação do enovelamento destas proteínas pelo alinhamento da sequência primária e estrutural das proteínas com código PDB 2CN2 e 1SQJ. Não foi observado indícios de agregação das amostras. Outra forma de conferir se há agregados na amostra é fazer a aproximação de Guinier na curva de espalhamento para ver os pontos que não se ajustam na região de baixa resolução, além de obter, ainda, o raio de giro R_g . Neste caso, obtemos um raio de giro da proteína em questão igual a $(31,85 \pm 0,5) \text{ \AA}$.

Tendo essas condições satisfeitas, fez-se a Transformada Inversa de Fourier e implementada no programa Gnom para gerar a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o diâmetro máximo D_{\max} das partículas em solução. Como resultado, o raio de giro R_g das moléculas de proteína é $(31,96 \pm 0,01) \text{ \AA}$ e diâmetro máximo de $(90 \pm 4) \text{ \AA}$. Pela avaliação da função de distribuição de distâncias $p(r)$, Figura 27, sugere-se que a proteína tem apenas um domínio globular. Proteínas globulares muitas vezes adotam conformações mais alargadas no perfil da função $p(r)$ com picos únicos, enquanto proteínas com multidomínios têm picos múltiplos (PUTNAM *et al.*, 2007).

Pelo SaxsMow, obtivemos a massa molecular de 74,2 KDa com desvio relativo de 3,5% da massa esperada pela sequência de aminoácidos. O raio de giro foi de $(30, 35 \pm 0,02) \text{ \AA}$. Como conclusão desta análise, vê-se que a proteína em solução se apresenta como monômero. Essa evidência é a mais aceitável tendo em conta que nas estruturas obtidas por cristalografia de raios-X existem dois domínios característicos desta família de proteínas.

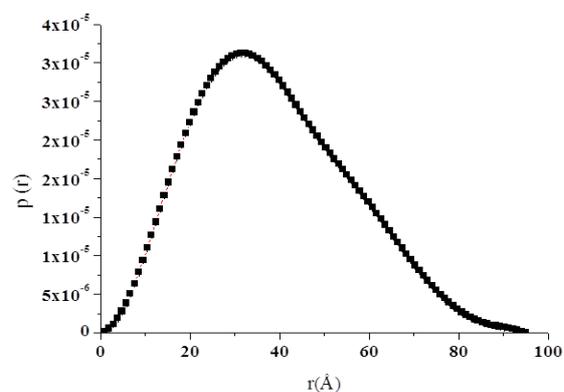


Figura 27 - Função de distribuição das distâncias a proteína Xcc-Xgh em solução.

Essa afirmativa pode ser provada pela determinação do modelo *ab initio* de dummy átomos (programa DAMMIN) e pelo programa GASBOR. O resultado desta modelagem pode ser visto analisando o ajuste da intensidade obtida experimentalmente e pelos programas Dammin e Gasbor, Figura 28.

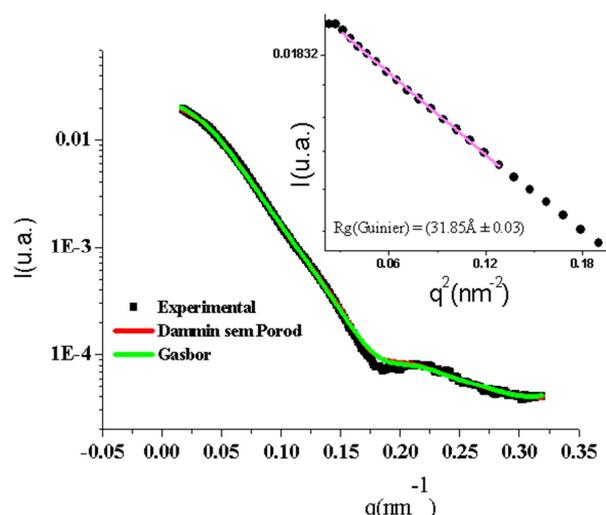


Figura 28 – Sobreposição das intensidades comparando os ajustes e mudanças dos modelos gerados pelo DAMMIN e GASBOR referente à intensidade experimental da proteína Xcc-Xgh em solução.

Após os modelos *ab initio* serem gerados, um modelo médio foi sobreposto ao modelo obtido por difração de raios-X utilizando o programa SUPCOMB20. O ajuste no volume do envelope dos modelos de *dummy*-átomos pelo modelo cristalográfico é validado pelo encaixe das regiões flexíveis (“loops”), Figura 29.

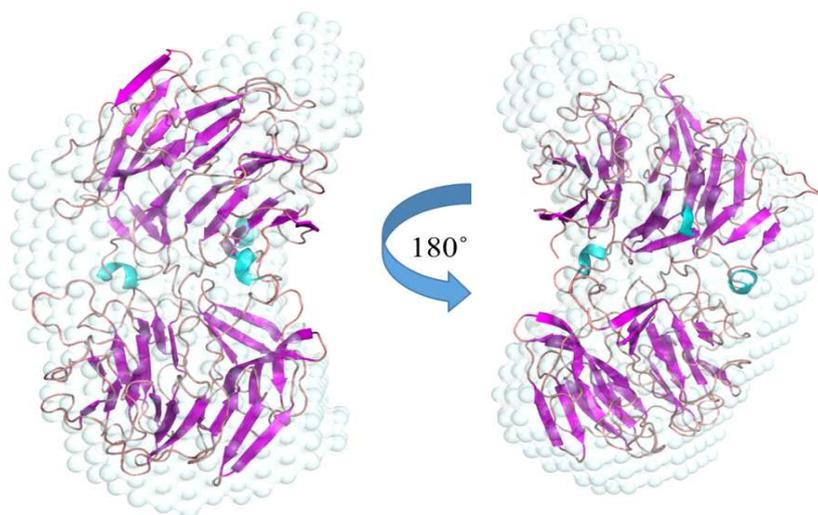


Figura 29 - Sobreposição do modelo *ab initio* obtido com o programa DAMMIN usando o modelo cristalográfico de Xcc- Xgh.

Até agora foi visto que essa xiloglucanase é específica para xiloglucano e que a construção T1_A não tem atividade, por outro lado a T2 é fortemente catalítica para esse substrato. A possível razão para tal comportamento, é devido às mutações pontuais ocorridas no processo de amplificação gênica. Assim, para entender mais sobre o comportamento físico e a dinâmica em solução, fez experimento de desnaturação térmica para a proteína em sua forma ativa e na sua forma inativa. A Figura 30 mostra o perfil de desnaturação para a proteína não ativa e para a proteína com atividade sobre xiloglucano.

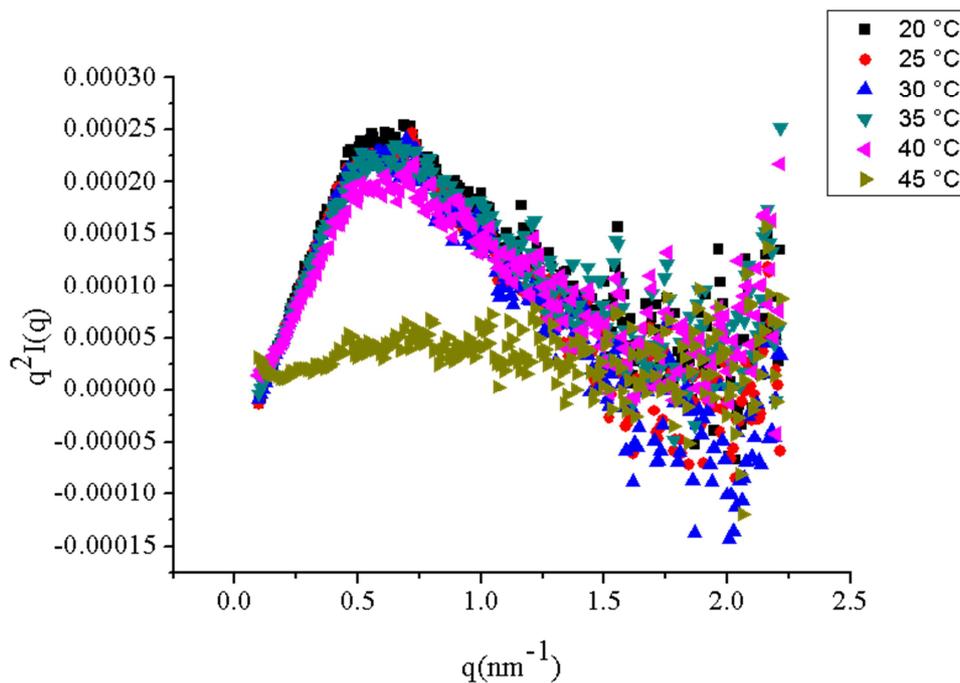


Figura 30 - Gráfico de Kratky da proteína mutada.

Analisando o comportamento térmico da enzima *Xcc-Xgh* quanto à sua perda de globularidade pelo efeito do aumento de temperatura de 20 a 45 °C, vemos que a construção que apresentou mutação é estável até 35 °C. A partir de 40 °C há uma leve mudança no estado conformacional e em 45 °C a perda do estado enovelado.

Já para essa enzima na construção com atividade (T2), (Figura 31), vemos que não há mudanças no perfil de Kratky quando a temperatura aumenta de 20 a 40 °C. As alterações da globularidade acontecem a partir de 45 °C e é evidente o desenovelamento com a proteína na temperatura de 55 °C.

A diferença de comportamento na perda de globularidade reflete o desarranjo da estrutura terciária da enzima. Neste caso, a construção com atividade é claramente mais estável com o aumento da temperatura. Isso indica que de algum modo as mutações foram as responsáveis por tais modificações.

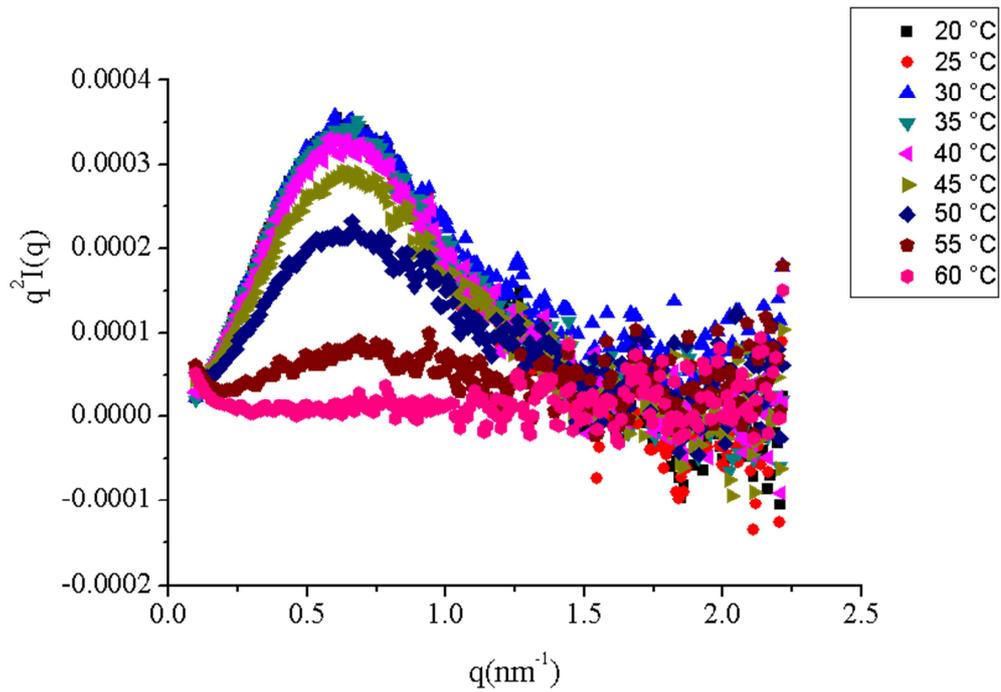


Figura 31 - Gráfico de Kratky da proteína sem mutações.

Esses resultados de SAXS ajudam a corroborar os resultados funcionais quanto a temperatura de melhor atividade ser de 42°. Isso reforça a confirmação da estreita relação entre estrutura e função enzimática.

5. Conclusões

A partir do emprego de técnicas de clonagem isolamos o gene de uma nova xiloglucanase da família GH 74 provinda do organismo *Xanthomonas campestris*. Desenvolvemos um protocolo eficiente para expressão e purificação desta proteína, o que permitiu sua caracterização funcional e estrutural.

Quanto à caracterização funcional, identificamos que a nova xiloglucanase da família GH 74 é uma enzima específica para xiloglucano, com atividade específica similar a outras enzimas desta família. A sua especificidade por xiloglucano indica que essa enzima tem maior poder de penetração no material lignocelulósico, de modo a expor as microfibrilas de celolose com maior eficiência.

Quanto à caracterização estrutural, utilizando da técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, obtivemos o envelope molecular da proteína estudada. Somando a isso, de posse de duas construções diferentes da xiloglucanase em estudo, uma com atividade sobre o substrato e outra sem atividade (possivelmente devido às mutações!), obtivemos curvas de estabilidade térmica diferentes para cada uma, reforçando com isso a relação estreita entre estrutura para a mesma.

A partir da técnica de cristalografia, obtivemos um modelo estrutural para a xiloglucanase estudada, sendo o mesmo constituído por dois domínios. Estes domínios fazem a interface do sítio ativo com o substrato. A partir deste modelo identificamos diversos “loops” responsáveis pela acomodação do substrato. Além disso, utilizando da técnica de “soaking” com glicose e produto da hidrólise de xiloglucano, obtivemos monômeros de glicose em regiões distintas do modelo estrutural da proteína, o que pode estar correlacionado com a atividade catalítica da mesma.

Portanto, a determinação do modelo tridimensional desta enzima, como também os resultados funcionais, contribuem para a compreensão da maquinaria molecular das enzimas membros da família GH 74 e lança novas perspectivas sobre o modo de ação das xiloglucanases.

6. Perspectivas

Diante dos resultados e conclusões aqui delineados, para maior esclarecimento a respeito da estrutura e função da enzima *Xcc-Xgh* pretendemos realizar futuramente os seguintes experimentos:

- ❖ Fazer testes cinéticos;
- ❖ Fazer mutações na proteína ativa levando em conta as mudanças de aminoácidos da proteína não ativa;
- ❖ Se possível, fazer biblioteca de mutantes;
- ❖ Determinar o mecanismo de reação;
- ❖ Cristalizar a proteína a mutada como também a ativa na presença de oligossacarídeos de xiloglucano;
- ❖ Por fim, fazer dinâmica molecular.

7 Referências

- ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 213–21, fev. 2010.
- ALCÁNTARA, R. et al. The EBI enzyme portal. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D773–80, jan. 2013.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Issues in searching molecular sequence databases. **Nature genetics**, v. 6, n. 2, p. 119–29, fev. 1994.
- ARIZA, A. et al. Structure and activity of *Paenibacillus polymyxa* xyloglucanase from glycoside hydrolase family 44. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 39, p. 33890–900, 30 set. 2011.
- BAGOS, P. G.; LIAKOPOULOS, T. D.; HAMODRAKAS, S. J. Algorithms for incorporating prior topological information in HMMs: application to transmembrane proteins. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 189, jan. 2006.
- BARTY, A. et al. Self-terminating diffraction gates femtosecond X-ray nanocrystallography measurements. **Nature Photonics**, v. 6, n. 1, p. 35–40, 18 dez. 2011.
- BAUER, S. et al. Cloning, expression, and characterization of an oligoxyloglucan reducing end-specific xyloglucanobiohydrolase from *Aspergillus nidulans*. **Carbohydrate research**, v. 340, n. 17, p. 2590–7, 12 dez. 2005.
- BAUMANN, M. J. et al. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. **The Plant cell**, v. 19, n. 6, p. 1947–63, jun. 2007.
- BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. **Nature structural biology**, v. 10, n. 12, p. 980, dez. 2003.
- BOGAN, M. J. X-ray free electron lasers motivate bioanalytical characterization of protein nanocrystals: serial femtosecond crystallography. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 7, p. 3464–71, 2 abr. 2013.
- BRÜNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472–475, 30 jan. 1992.
- CAMPA, C. et al. Overview on advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates: a tabulated review. **Electrophoresis**, v. 27, n. 11, p. 2027–50, jun. 2006.
- CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D233–8, jan. 2009.

- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 3, n. 1, p. 1–30, jan. 1993.
- CAZy - Bacteria**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/b96.html>>. Acesso em: 8 jul. 2013.
- CHAILLOU, S. et al. Cloning, Sequence Analysis, and Characterization of the Genes Involved in Isoprimeverose Metabolism in *Lactobacillus pentosus*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 9, p. 2312–2320, 1 maio. 1998.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, jan. 2010.
- CHEN, Z. et al. Tracing determinants of dual substrate specificity in glycoside hydrolase family 5. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25335–43, 20 jul. 2012.
- CHHABRA, S. R.; KELLY, R. M. Biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel74 with and without a carbohydrate binding module (CBM). **FEBS letters**, v. 531, n. 2, p. 375–80, 6 nov. 2002.
- DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–63, 23 maio. 2002.
- DAMÁSIO, A. R. L. et al. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1824, n. 3, p. 461–7, mar. 2012.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 6, p. 578–95, jan. 2009.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853–859, set. 1995.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure (London, England : 1993)**, v. 3, n. 9, p. 853–9, 15 set. 1995.
- DAVIES, G. J. et al. Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 angstrom resolution. **Biochemical Journal**, v. 207, n. 1, p. 201–207, 2000.
- DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 4, p. 497–522, table of contents, dez. 2001.
- DESMET, T. et al. An investigation of the substrate specificity of the xyloglucanase Cel74A from *Hypocrea jecorina*. **The FEBS journal**, v. 274, n. 2, p. 356–63, jan. 2007.

DING, S.-Y. et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6110, p. 1055–60, 23 nov. 2012.

DIVNE, C. et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5171, p. 524–8, 22 jul. 1994.

DIVNE, C. et al. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Journal of molecular biology**, v. 275, n. 2, p. 309–25, 16 jan. 1998.

DÜMMLER, A.; LAWRENCE, A.-M.; DE MARCO, A. Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in *E. coli* using a modular set of vectors. **Microbial cell factories**, v. 4, n. 1, p. 34, jan. 2005.

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. 2126–32, dez. 2004.

ENKHBAATAR, B. et al. Identification and characterization of a xyloglucan-specific family 74 glycosyl hydrolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 2, p. 607–11, 15 jan. 2012.

ESCHENFELDT, W. H. et al. A family of LIC vectors for high-throughput cloning and purification of proteins. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 498, p. 105–15, jan. 2009.

EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 62, n. Pt 1, p. 72–82, 14 jan. 2006.

EVANS, P. Biochemistry. Resolving some old problems in protein crystallography. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6084, p. 986–7, 25 maio. 2012.

FAZEKAS, ARON J., STEEVES, ROYCE, NEWMASER, S. G. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. **BioTechniques**, v. 48, n. 4, p. 277–285, 2010.

FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101–109, 1 dez. 2009.

FRANCO CAIRO, J. P. L. et al. Functional characterization and target discovery of glycoside hydrolases from the digestome of the lower termite *Coptotermes gestroi*. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 50, jan. 2011.

FRY, S. C. et al. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 1, p. 1–3, set. 1993.

GAÑÁN, P. et al. Elucidation of the fibrous structure of *Musaceae* mature rachis. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 131–139, 1 ago. 2007.

- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GILBERT, H. J.; STÅLBRAND, H.; BRUMER, H. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 338–48, jun. 2008.
- GLOSTER, T. M. et al. Characterization and three-dimensional structures of two distinct bacterial xyloglucanases from families GH5 and GH12. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 26, p. 19177–89, 29 jun. 2007.
- GRISHUTIN, S. G. et al. Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1674, n. 3, p. 268–81, 1 nov. 2004.
- GUIMARÃES, B. G. et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of synchrotron radiation**, v. 16, n. Pt 1, p. 69–75, 27 jan. 2009.
- HAMMEL, M. Validation of macromolecular flexibility in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS). **European biophysics journal : EBJ**, v. 41, n. 10, p. 789–99, out. 2012.
- HAMMERSLEY, A. P. et al. Calibration and application of an X-ray image intensifier/charge-coupled device detector for monochromatic macromolecular crystallography. **Journal of synchrotron radiation**, v. 4, n. Pt 2, p. 67–77, 1 mar. 1997.
- HASPER, A. A. et al. EglC, a New Endoglucanase from *Aspergillus niger* with Major Activity towards Xyloglucan. v. 68, n. 4, p. 1556–1560, 2002.
- HAYASHI, T. Xyloglucans in the Primary Cell Wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 139–168, 28 jun. 1989.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **The Biochemical journal**, v. 280 (Pt 2, p. 309–16, 1 dez. 1991.
- HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS letters**, v. 425, n. 2, p. 352–4, 27 mar. 1998.
- HENRISSAT, B., DAVIES, G. J. Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 124, n. 4, p. 1515–1519, 1 dez. 2000.
- HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5813, p. 804–7, 9 fev. 2007.
- IBATULLIN, F. M. et al. Kinetic analyses of retaining endo-(xylo)glucanases from plant and microbial sources using new chromogenic xylogluco-oligosaccharide aryl glycosides. **Biochemistry**, v. 47, n. 29, p. 7762–9, 22 jul. 2008.

- ICHINOSE, H. et al. Characterization of an endo-processive-type xyloglucanase having a β -1,4-glucan-binding module and an endo-type xyloglucanase from *Streptomyces avermitilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 22, p. 7939–45, 15 nov. 2012.
- IRWIN, D. C. et al. Cloning, expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 14, p. 3083–3091, 26 jun. 2003.
- ISHIDA, T. et al. Substrate recognition by glycoside hydrolase family 74 xyloglucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **The FEBS journal**, v. 274, n. 21, p. 5727–36, nov. 2007.
- JACQUES, D. A. et al. Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 68, n. Pt 6, p. 620–6, 17 jun. 2012.
- JÄGER, G.; BÜCHS, J. Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 9, p. 1122–36, out. 2012.
- JENNY, R. J.; MANN, K. G.; LUNDBLAD, R. L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. **Protein expression and purification**, v. 31, n. 1, p. 1–11, set. 2003.
- KABSCH, W. XDS. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 125–32, fev. 2010.
- KAEWTHAI, N. et al. Group III-A XTH genes of *Arabidopsis* encode predominant xyloglucan endohydrolases that are dispensable for normal growth. **Plant physiology**, v. 161, n. 1, p. 440–54, jan. 2013.
- KARPLUS, P. A.; DIEDERICHS, K. Linking crystallographic model and data quality. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6084, p. 1030–3, 25 maio. 2012.
- KENDREW, J. C. et al. Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. **Nature**, v. 185, n. 4711, p. 422–7, 13 fev. 1960.
- KIRILENKO, A. P.; SEDJO, R. A. Climate change impacts on forestry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19697–702, 11 dez. 2007.
- KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 44, n. 22, p. 3358–93, 30 maio. 2005.
- KLEYWEGT, G. J. et al. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. **Journal of molecular biology**, v. 272, n. 3, p. 383–97, 26 set. 1997.

KOCH, M. H.; VACHETTE, P.; SVERGUN, D. I. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 36, n. 2, p. 147–227, maio. 2003.

KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, n. 1, p. 33–41, 1 fev. 2001.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567–80, 19 jan. 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 21, p. 2947–8, 1 nov. 2007.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 21, p. 2947–8, 1 nov. 2007.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEVERSEN, N. A. et al. Evaluation of signal peptide prediction algorithms for identification of mycobacterial signal peptides using sequence data from proteomic methods. **Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 2375–2383, 23 abr. 2009.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 41, p. 455–96, 28 jan. 1990.

LIU, L. et al. Sirius: A 5BA Low-Emittance Lattice with Superbends for the New Brazilian Synchrotron Light Source. **Synchrotron Radiation News**, v. 26, n. 3, p. 34–38, maio. 2013.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 1 set. 2002.

MARTINEZ-FLEITES, C. et al. Crystal structures of *Clostridium thermocellum* xyloglucanase, XGH74A, reveal the structural basis for xyloglucan recognition and degradation. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24922–33, 25 ago. 2006.

MASSOVER, W. H. Radiation damage to protein specimens from electron beam imaging and diffraction: a mini-review of anti-damage approaches, with special reference to synchrotron X-ray crystallography. **Journal of synchrotron radiation**, v. 14, n. Pt 1, p. 116–27, jan. 2007.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491–497, abr. 1968.

- MCCOY, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 63, n. Pt 1, p. 32–41, jan. 2007.
- MCQUEEN-MASON, S. J.; COSGROVE, D. J. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. **Plant physiology**, v. 107, n. 1, p. 87–100, jan. 1995.
- MEINKE, A. et al. Enhancement of the endo-beta-1,4-glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4383–4386, 1995.
- MISHRA, A.; MALHOTRA, A. V. Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 45, p. 8528, 10 nov. 2009.
- NAM, H. et al. Network context and selection in the evolution to enzyme specificity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1101–4, 31 ago. 2012.
- NARAN, R.; PIERCE, M. L.; MORT, A. J. Detection and identification of rhamnogalacturonan lyase activity in intercellular spaces of expanding cotton cotyledons. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 50, n. 1, p. 95–107, abr. 2007.
- NAUSHAD, H. S.; GUPTA, R. S. Phylogenomics and molecular signatures for species from the plant pathogen-containing order xanthomonadales. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55216, jan. 2013.
- NIELSEN, H. et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–6, jan. 1997.
- NINIO, J. Kinetic amplification of enzyme discrimination. **Biochimie**, v. 57, n. 5, p. 587–595, jul. 1975.
- OEFNER, P. J.; CHIESA, C. Capillary electrophoresis of carbohydrates. **Glycobiology**, v. 4, n. 4, p. 397–412, ago. 1994.
- ORTHABER, D.; BERGMANN, A.; GLATTER, O. SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. **Journal of Applied Crystallography**, v. 33, n. 2, p. 218–225, 1 abr. 2000.
- PARK, Y. B.; COSGROVE, D. J. A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. **Plant physiology**, v. 158, n. 4, p. 1933–43, 1 abr. 2012.
- PAULY, M. et al. A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. **Glycobiology**, v. 9, n. 1, p. 93–100, jan. 1999.
- PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, jan. 2012.

PENTTILÄ, M. E. et al. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 63, n. 1, p. 103–112, mar. 1988.

PERUTZ, M. F. et al. Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. **Nature**, v. 185, n. 4711, p. 416–422, 13 fev. 1960.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785–6, jan. 2011.

Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. Disponível em: <<http://web.expasy.org/tagident/tagident-doc.html>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

PUTNAM, C. D. et al. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 40, n. 03, p. 191–285, 1 ago. 2007.

ROSSMANN, M. G. The molecular replacement method. **Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography**, v. 46 (Pt 2), p. 73–82, 1 fev. 1990.

SAMBROOK, JOSEPH, SAMBROOK, D. W. R. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3rd. ed. [s.l: s.n.].

SAMPEDRO, J. et al. Lack of α -xylosidase activity in *Arabidopsis* alters xyloglucan composition and results in growth defects. **Plant physiology**, v. 154, n. 3, p. 1105–15, 1 nov. 2010.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263–89, 4 jan. 2010.

SCHROER, C. et al. Coherent X-Ray Diffraction Imaging with Nanofocused Illumination. **Physical Review Letters**, v. 101, n. 9, p. 090801, 29 ago. 2008.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–28, jun. 2003.

SIMON, J.-P. Contribution of synchrotron radiation to small-angle X-ray scattering studies in hard condensed matter. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. s1, p. s1–s9, 20 jan. 2007.

SINGH, P. et al. Effect of Signal Peptide on Stability and Folding of *Escherichia coli* Thioredoxin. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63442, jan. 2013.

SUZUKI, S.; HONDA, S. Miniaturization in carbohydrate analysis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p. 3577–82, nov. 2003.

SVERGUN, D.; 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** International Union of Crystallography, , 1 dez. 1995. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?li5001>>. Acesso em: 17 jun. 2013

SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. **Current opinion in structural biology**, v. 12, n. 5, p. 654–60, out. 2002.

TAKUYA ISHIDA. **Studies on recognition mechanism for branched polysaccharides in family 55 and 74 glycoside hydrolases**. [s.l: s.n.].

TAO, F. et al. Genome sequence of *Xanthomonas campestris* JX, an industrially productive strain for Xanthan gum. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4755–6, set. 2012.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523–33, jan. 2003.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC. Disponível em: <<http://www.pymol.org/citing>>. Acesso em: 14 jun. 2013.

TMHMM Server, v. 2.0. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>>. Acesso em: 8 jul. 2013.

TOMME, P. et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 170, n. 3, p. 575–81, 4 jan. 1988.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 1, p. 2–18, 11 jan. 2013.

VYNOHRADOVA, R. P. [Units of enzyme activity]. **Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal**, v. 71, n. 2, p. 96–9, 1978.

WADE, L. Latin America. In quest for synchrotron, Brazil tests homespun ingenuity a second time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6131, p. 419, 26 abr. 2013.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–8, 25 abr. 1953.

WILKINS, M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 112, p. 531–52, jan. 1999.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 67, n. Pt 4, p. 235–42, 18 abr. 2011.

YAOI, K. et al. Tandem repeat of a seven-bladed beta-propeller domain in oligoxyloglucan reducing-end-specific cellobiohydrolase. **Structure (London, England : 1993)**, v. 12, n. 7, p. 1209–17, jul. 2004.

YAOI, K. et al. Cloning and characterization of two xyloglucanases from *Paenibacillus* sp. strain KM21. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7670–8, dez. 2005.

YAOI, K. et al. The structural basis for the exo-mode of action in GH74 oligoxyloglucan reducing end-specific cellobiohydrolase. **Journal of molecular biology**, v. 370, n. 1, p. 53–62, 29 jun. 2007.

YAOI, K. et al. The crystal structure of a xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Geotrichum* sp. M128 xyloglucanase reveals a key amino acid residue for substrate specificity. **The FEBS journal**, v. 276, n. 18, p. 5094–100, set. 2009.

YAOI, K.; MITSUISHI, Y. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression of a xyloglucan endoglucanase from *Geotrichum* sp. M128. **FEBS letters**, v. 560, n. 1-3, p. 45–50, 27 fev. 2004.

YOSHIZAWA, T. et al. Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18710–6, 25 maio. 2012.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. **Marine drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920–34, jan. 2010.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 30 dez. 2004.

ZVERLOV, V. V et al. Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: xyloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. **Microbiology (Reading, England)**, v. 151, n. Pt 10, p. 3395–401, 1 out. 2005.

ZWART, P. H., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., ADAMS, P. D. Xtriage and Fest: automatic assessment of X-ray data and substructure structure factor estimation. **CCP4 newsletter**, v. 43, p. 27–35, 2005.