

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Modelagem molecular, expressão heteróloga, purificação e caracterização da enzima xilanase GH11 de *Bacillus pumilus*

Felipe Cardoso Ramos¹, Vinícius de Godoi Contessoto², Vinícius Martins de Oliveira², Letícia Maria Zanphorlin¹, Vitor Barbanti Pereira Leite² e Roberto Ruller¹

¹Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)
Campinas (SP) - CEP 13083-100 (cfelip2@gmail.com, leticia.zanphorlin@bioetanol.org.br,
roberto.ruller@bioetanol.org.br)

²Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) -
Departamento de Física
São José do Rio Preto (SP) - CEP 15054-000 (viniciusmo@sjrp.unesp.br, vinicius@sjrp.unesp.br, vleite@sjrp.unesp.br)

RESUMO

No presente trabalho, realizamos a predição estrutural por homologia da xilanase GH11 de *Bacillus pumilus* (XLBp) a partir da estrutura da GH11 de *Bacillus subtilis* B230 (PDB 1IGO), a qual apresentou 88% de identidade com a enzima alvo. Além disso, foi feita a expressão heteróloga, purificação e caracterização preliminar da XLBp. A enzima recombinante foi expressa em células de *Escherichia coli* e purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose. A caracterização bioquímica da enzima foi realizada empregando o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e permitiu determinar os valores ótimos de pH (5,5) e temperatura (60 °C) da XLBp. Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos em pH 5,5 e 7,4, e indicaram que a enzima é composta principalmente por folhas β , como esperado para a família GH11. A temperatura de desnaturação térmica (T_m) da XLBp foi de aproximadamente 50 °C, nos dois valores de pH avaliados.

Palavras-chave: *Bacillus pumilus*, xilanase GH11, expressão e purificação, dicroísmo circular, modelagem por homologia

INTRODUÇÃO

Enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas são denominadas de glicosídeo hidrolases (GHs) e possuem um sistema de classificação estrutural que compreende atualmente 133 famílias (GH1-133), organizadas em 14 diferentes clãs (Lombard et al., 2014). A maioria das GHs possuem ação sobre mais de um tipo de substrato, mas as da família GH11, denominadas de xilanases “verdadeiras”, são altamente específicas para xilana, o componente predominante da hemicelulose de plantas monocotiledôneas comelinídeas como a cana-de-açúcar (Scheller & Ulvskov, 2010). A xilana de cana é um heteropolímero formado por uma cadeia principal de 1,4- β -xilana parcialmente acetilada, com ramificações de ácido α -glicurônico e α -arabinofuranose sendo, por isso, denominada também de glicoarabinoxilana (GAX).

Vários microrganismos presentes no ambiente são produtores de xilanases, as quais possuem uma série de aplicações biotecnológicas. As xilanases são geralmente empregadas na clarificação de sucos, na fabricação de pães e na indústria de rações (Paës, Berrin, & Beaugrand, 2012). Essa vasta gama de aplicações faz das xilanases GH11 uma das enzimas mais estudadas atualmente, esses trabalhos exploram principalmente o potencial da enzima em agir na conversão da hemilignocelulose para a produção de etanol 2G e subprodutos de alto valor agregado derivados da GAX como, por exemplo, a xilose e os oligoxilosacarídeos (Deutschmann & Dekker, 2012).

No presente trabalho, realizamos a modelagem por homologia, expressão heteróloga em *Escherichia coli*, purificação e caracterização inicial da xilanase GH11 de *Bacillus pumilus* (XLBp), uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada no solo (Qu & Shao, 2011). Relatamos aqui, análises envolvendo dicróismo circular (CD) e modelagem estrutural ainda não descritas na literatura para a XLBp que, até o presente momento, não possui estrutura tridimensional determinada experimentalmente. Pretendemos assim, contribuir para o conhecimento a respeito da enzima, visando sua caracterização e posterior aplicação biotecnológica, da mesma forma como foi realizado para outras xilanases GH11 em nosso grupo (Ruller et al., 2014).

MATERIAL E MÉTODOS

Modelagem por Homologia - A modelagem por homologia da enzima XLBp foi realizada através do programa Modeller 9.14 (Eswar et al., 2006). Para a seleção da estrutura molde, foram identificadas primeiramente as estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB) com homologia para a XLBp. A seguir, a estrutura molde foi selecionada com base na identidade de sequência e semelhança estrutural com a proteína alvo. Foi feito então o alinhamento bidimensional entre as duas sequências, seguido da construção de modelos tridimensionais para a enzima XLBp. Os modelos gerados foram posteriormente avaliados com base no valor de RMSD e análise do gráfico de Ramachandran, obtido utilizando-se o pacote de validação PROCHECK, disponível em <http://deposit.rcsb.org/validate/>.

Expressão e Purificação - A sequência de interesse contendo o gene da XLBp foi ligada ao vetor de expressão pET28a, o plasmídeo circularizado foi então usado para transformar linhagens de *E. coli* Arctic Express (Agilent Technologies®). A expressão recombinante da XLBp foi realizada em 500 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido na presença de canamicina (30 ng/mL), a incubação se deu a 37 °C e agitação de 250 rpm até as células atingirem a densidade ótica (DO) entre 0,6 e 0,8, ponto em que as condições foram alteradas para 180 rpm e 16° C, seguindo-se da indução com IPTG a 0,5 mM e incubação por mais 21 horas. Ao final desse processo, as células foram coletadas através de centrifugação, ressuspensas em tampão fosfato 25 mM pH 7,4 e armazenadas a -24 °C. Para extração da enzima, as células foram tratadas com lisozima (0,8 mg/mL) e inibidor de protease PMSF (0,1 mM) antes de serem sonicada e centrifugadas a 12000 rpm. A purificação da XLBp a partir do sobrenadante obtido na etapa anterior foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose, utilizando o purificador AKTA FPLC (GE Healthcare®). As amostras da etapa de expressão e purificação foram analisadas através de SDS-PAGE ou teste de atividade em xilana de faia (Sigma®).

Caracterização Bioquímica - O pH ótimo da enzima foi determinado a 50 °C no intervalo de 3,0 a 10,0 e a temperatura de maior atividade da XLBp foi mensurada entre 20 e 70 °C em pH 5,5 (pH ótimo). A atividade da enzima XLBp foi mensurada através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), o volume total de reação empregado foi de 100 µL, contendo 50 µL de xilana de faia 5 mg/mL (0,5 %) em água, 45 µL de tampão citrato/fostato/glicina a 0,1 M, e 5 µL de enzima (0,3 mg/mL). Em ambos os experimentos o tempo de reação foi de 20 min, ao final do qual foram adicionados 100 µL de DNS à mistura, seguindo-se da fervura a 99 °C e quantificação da absorbância a 540 nm. Avaliamos ainda a influência de cátions mono e divalentes, bem como de EDTA, sobre a atividade da XLBp nas condições ótimas. Os cátions avaliados foram Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, K⁺, Na⁺, Mn²⁺, Li⁺ e Co²⁺, todos a uma concentração final de 10 mM, a mesma para o EDTA.

Caracterização Biofísica - As análises de dicróismo circular (CD) foram realizadas utilizando espectrofotômetro JASCO® J-815, os espectros foram o resultado da média de 20 acumulações obtidos no intervalo de comprimento de onda de 200 a 260 nm, utilizando uma cubeta de caminho óptico de 0,1 cm, velocidade de escaneamento de 100 nm min⁻¹, largura de banda de 1 nm e tempo de resposta de 0,5 s. A concentração de enzima empregada foi de 0,2 mg/mL em tampão citrato/fostato/glicina a 0,1 M. A temperatura de desnaturação térmica (T_m) da XLBp foi determinada mensurando-se a variação na elipticidade molar residual a 218nm induzida pelo

aumento de temperatura, de 20 a 90 °C, empregando uma taxa de aquecimento de 1 °C min⁻¹. As leituras de espectro de CD e cálculo de T_m foram realizadas em pH 5,5 e 7,4.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em relação à predição estrutural, a XLBp apresentou alta identidade de sequência com as xilanases GH11 de *Bacillus subtilis* B230 (88%) e *Bacillus agaradhaerens* (71%), correspondentes às estruturas 1IGO (2,2 Å) e 1H4G (1,1 Å), respectivamente. A estrutura 1IGO foi selecionada como molde pois, apesar de possuir resolução inferior, sua identidade estrutural com a XLBp é significativamente maior em relação a 1H4G. Como esperado, de acordo com o espectro de CD obtido, as estruturas preditas apresentaram o dobramento de β -sanduíche, característico de xilanases GH11 (Figura 1C). O modelo de homologia selecionado mostrou boa sobreposição à proteína molde, o valor de RMSD obtido a partir do alinhamento tridimensional entre a XLBp e a estrutura 1IGO, foi de 0.156 Å. A análise do gráfico de Ramachandran apontou que 94,3% dos resíduos encontram-se em conformações favoráveis em relação aos ângulos Φ e Ψ .

A análise de SDS-PAGE (Figura 1B) permitiu concluir que as células de *E. coli* Arctic Express foram capazes de expressar a enzima XLBp quando induzidas com IPTG 0,5 mM a 16°C, além de confirmar a presença da XLBp nas frações referentes ao último pico da cromatográfica por afinidade (Figura 1A). Além disso, a utilização da linhagem Arctic Express permitiu a obtenção de uma quantidade suficiente de proteína na forma solúvel. A partir dos ensaios enzimáticos foi possível concluir que o pH ótimo da XLBp é 5,5 e sua temperatura ótima é aproximadamente 60 °C. Em relação aos ensaios envolvendo a adição de íons e EDTA, nenhum cátion mono ou bivalentes mostrou aumentar significativamente a atividade da enzima, ao contrário, vários deles mostraram inibir a XLBp, da mesma forma que o EDTA.

O espectro de CD da enzima, tanto em pH 5,5 quanto em pH 7,4, apontou um mínimo em 218 nm (Figura 1D), corroborando que a estrutura secundária da XLBp é constituída principalmente por folhas β , o que está de acordo com o dobramento de β -sanduíche das GH11. A temperatura de desnaturação térmica (T_m) da enzima foi de 50,9 °C em pH 5,5 (Figura 1C) e 47,6 °C em pH 7,4, mais de 10 °C abaixo da temperatura de maior atividade (60 °C), de maneira que análises futuras serão necessárias para explicar tal deslocamento.

CONCLUSÕES

A modelagem por homologia da XLBp usando a xilanase GH11 de *B. subtilis* B230 (PDB 1IGO) como molde permitiu obter um modelo com boa sobreposição estrutural e qualidade estereoquímica. A partir desse estudo, foi possível também estabelecer um protocolo de expressão e purificação para a enzima xilanase GH11 de *B. pumilus* (XLBp), empregando a linhagem de *E. coli* Arctic Express e método de cromatografia por afinidade em coluna de níquel-sefarose, por meio do qual foi possível obter uma quantidade suficiente de enzima para os testes de caracterização bioquímica e biofísica realizados aqui. Através dos ensaios bioquímicos foi possível obter os valores ótimos de pH (5,5) e temperatura da enzima (60 °C), bem como avaliar a sua atividade na presença de cátions e EDTA a 10 mM. No presente trabalho descrevemos a primeira caracterização biofísica por CD da XLBp, a qual corroborou que a enzima possui, de fato, o dobramento de β -sanduíche. A temperatura de desnaturação térmica (T_m) da XLBp foi de aproximadamente 50 °C, nos dois pH analisados, 5,5 e 7,4, ocorrendo um deslocamento de 10 °C para mais em relação à temperatura de máxima atividade, algo que pretendemos investigar mais profundamente em experimentos futuros.

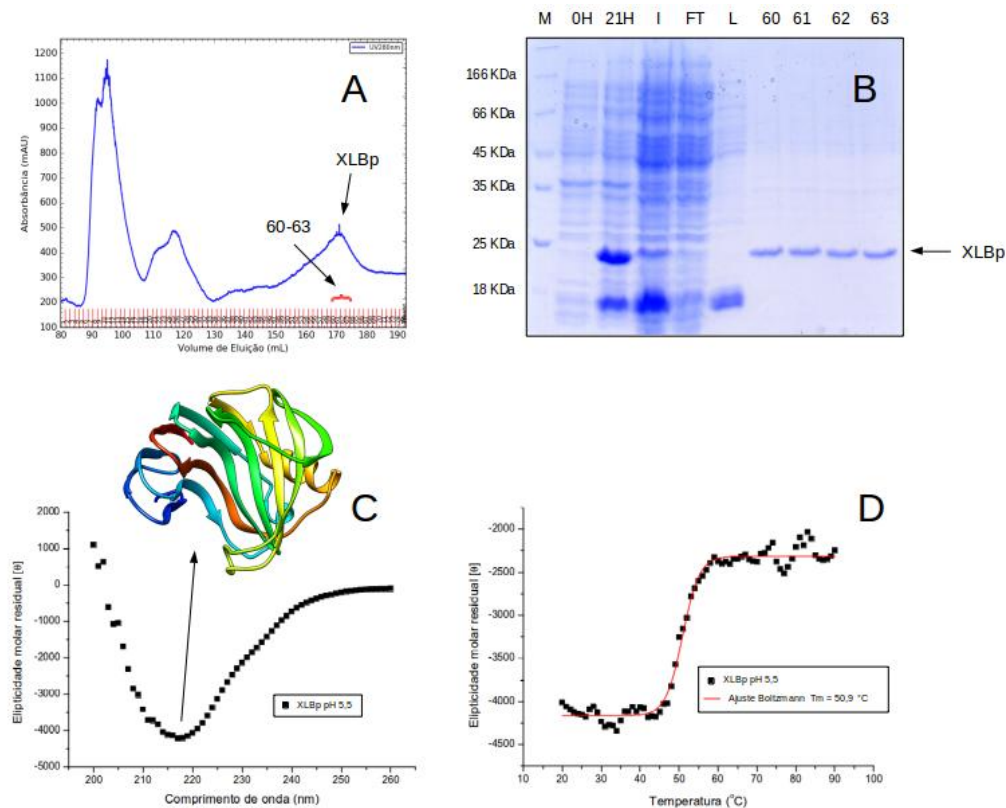


Figura 1. Análises estruturais e de cromatografia realizadas para a XLBp. (A) Gráfico de cromatografia de afinidade mostrando o pico correspondente à XLBp. (B) Análise em gel SDS-PAGE da expressão e purificação da XLBp (M: marcador; 0H: antes da indução com IPTG; 21H: 21 horas depois da indução; I: amostra injetada na coluna de purificação; FT: fração não retida pela coluna ou *flow through*; L: fração desligada da coluna após lavagem; 60, 61, 62 e 63: frações da cromatografia correspondentes à XLBp). (C) Perfil de CD em pH 5,5 com mínimo em aproximadamente 218 nm e estrutura modelo da XLBp gerada por homologia, formada principalmente por folhas β . (D) Gráfico de desnaturação térmica da XLBp em pH 5,5, mostrando o valor de T_m (50,9 °C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Deutschmann, R., & Dekker, R. F. H. (2012). From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1627–1640.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. a, Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., ... Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*, 11(6), 1052-1065.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 490–495.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Paës, G., Berrin, J., & Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases : Structure / function / properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, 30(3), 564–592.
- Qu, W., & Shao, W. (2011). Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. *Biotechnology letters*, 33(7), 1407–16.
- Ruller, R., Alpointi, J., Deliberto, L. A., Machado, C. B., & Ward, R. J. (2014). Concomitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/thermophilic enzyme. *Protein Engineering, Design & Selection*, 27(8), 255–262.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263–289.