

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE ENGENHARIA DE PROTEÍNAS NA MODIFICAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DE ENZIMAS LIGNOCELULÓSICAS

KETHLIN DE QUADROS FERREIRA¹; RAFAEL WOLOSKI²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas – kethlin04@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelwoloski@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização da biomassa lignocelulósica na produção de biocombustíveis tem um enorme potencial para contribuir para a crescente demanda mundial por fontes de energia renováveis (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018). Para a produção de biocombustíveis, os polissacarídeos que compõem a parede celular devem ser hidrolisados; porém, a hidrólise enzimática é a que mais agrega no custo de produção do bioetanol (ADEN; FOUST, 2009). Por serem substrato-específicas e sensíveis à temperatura e pH, a prospecção de novas celulasas que permita diminuir o custo econômico é de grande interesse. Geralmente, o processo ocorre entre 40-50°C, tem baixas taxas de hidrólise, produção de açúcares, e facilmente ocorre contaminação bacteriana (PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Sendo o custo um dos maiores impasses para a substituição efetiva dos combustíveis fósseis, uma das alternativas é a utilização de enzimas termoestáveis no processo de hidrólise (VIKARI et al., 2007). Enzimas termoestáveis mantêm sua atividade catalítica em altas temperaturas e geralmente são resistentes à desnaturação e proteólise (KUMAR; NUSSINOV, 2001). Entretanto, um dos maiores problemas do uso de enzimas extremófilas funcionalizadas é o estabelecimento de condições de produção ideais, como hospedeiro, abordagens de transformação e vetores de expressão. Abordagens de engenharia de proteínas surgem então como uma alternativa na produção de enzimas termoestáveis para o uso em processos industriais, especialmente aqueles com foco na produção de biocombustíveis. Engenharia de proteínas é uma abordagem que visa mudar a sequência de aminoácidos nativa de uma proteína a fim de introduzir uma nova propriedade ou melhorar uma função já existente (ARNOLD, 1993). Essa alteração normalmente consiste em substituir, remover ou alterar um ou mais aminoácidos da proteína. Tendo isso em vista, o objetivo deste estudo foi aplicar técnicas de engenharia de proteínas em uma celulasase que compõe o coquetel de desconstrução de biomassa, visando sua termoestabilidade.

2. METODOLOGIA

Na primeira etapa do projeto foi criada uma *pipeline* de engenharia de proteínas combinando *design* semi-razional e racional para melhora da termoestabilidade. Primeiramente, é realizada a limpeza do alvo (co-fatores, águas, ligantes), através da ferramenta PyMol. A seguir, os aminoácidos a serem mutados foram selecionados utilizando a ferramenta FRESCO. Com a lista de aminoácidos a serem mutados, dois programas foram utilizados para realizar as mutações: FoldX, e Ddg Monomer do pacote Rosetta. Ambos programas modificam de forma pontual e aleatória, medindo a estabilidade da nova proteína

através de campo de força. Em seguida foi realizada a aplicação de *Backrub* que usa Simulações de Monte Carlo para analisar a adaptação do *backbone* da estrutura da proteína a mudanças nas cadeias laterais, que demonstra se as mutações previstas como estabilizantes pelos programas serão “aceitas” pela estrutura da proteína. A aplicação *Sequence Tolerance* foi utilizada nos resultados da análise de *backrub*, que indica quais aminoácidos são tolerados pela proteína sem perder sua função.

Devido à falta de informação quanto a termoestabilidade do alvo, simulações de dinâmica molecular foram feitas para descobrir se o alvo era termófilo ou mesófilo. Duas simulações foram feitas, uma em 300K (26,85 °C) e outra em 400K (126,85 °C). Fora a temperatura, os sistemas foram construídos com o mesmo número de átomos, solvente e pressão. Foram utilizados o campo de força CHARMM36 e foi utilizado como critério análise de RMSF, raio de giro e acesso ao solvente. Após esses passos, a proteína alvo foi escolhida para aplicação da *pipeline* e realizada a dinâmica molecular para estimar a termoestabilidade do alvo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como entrada para a *pipeline*, a estrutura do alvo teve todas as águas e cofatores removidos. Um círculo com raio de 10 Angstroms foi definido com o ligante como o seu centro, sendo definidos como parte do sítio ativo e subsequentemente removidos da lista de aminoácidos a serem modificados. Dos 313 aminoácidos da proteína madura, 74 resíduos foram eliminados do processo, sobrando 239 resíduos para mutagênese.

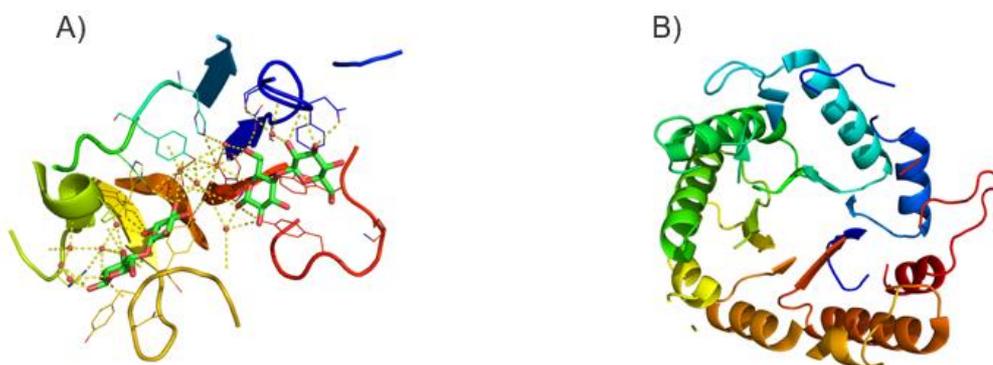


Figura 1: A) Representação gráfica dos aminoácidos não selecionados para a abordagem de mutação, assim como os ligantes utilizados para o estabelecimento do raio de exclusão de 10 Angstroms. B) Todos os aminoácidos da proteína que tiveram sua mutação permitida por estarem longe o suficiente do sítio ativo

Após terminados os processos de mutação em ambos os softwares, foi necessário escolher quais os mutantes que apresentaram melhor estabilidade. Para isso, usa-se um cutoff de energia, selecionando mutações que tenham um valor de energia abaixo desse valor. No software FoldX, um cutoff de -5 foi utilizado, enquanto no software Rosetta ddG, um cutoff de -10 foi usado, principalmente por conta da maior sensibilidade desse programa. Na Tabela 1 estão descritas as

informações de output de cada programa, assim como o número de mutações abaixo do cutoff geradas.

Tabela 1 – Mutações realizadas por cada programa, com ponto de corte e mutações que causam mudança de energia abaixo do *cutoff*.

Programa	Mutações	Cutoff	Abaixo do <i>cutoff</i>
FoldX	4541	-5.00	100
Rosetta	4541	-10.00	390

Das 4541 mutações obtidas, 490 foram selecionadas para a abordagem de Backrub do Rosetta. Calculando a movimentação do backbone para descobrir se as mutações seriam aceitas ou rejeitadas pela proteína. Entretanto, apesar de as estruturas terem sido geradas com sucesso e o processo ter sido executado, não foi possível inferir nenhum tipo de informação a partir desta análise, visto que não foi possível gerar o perfil energético da proteína nativa para conseguir comparar com as proteínas mutadas. Apesar disso, os resultados não foram desperdiçados, visto que foram utilizados na abordagem seguinte. A análise final de dinâmica molecular da proteína vai analisar a proteína em 3 temperaturas diferentes, em um intervalo de 1 nanosegundo. Tanto as análises de Área Acessível por Solvente, Raio de Giro e Root Mean Square Fluctuation podem ser vistos na Figura 2, que mostram o início de desenovelamento de uma proteína mesofílica submetida a temperaturas altas.

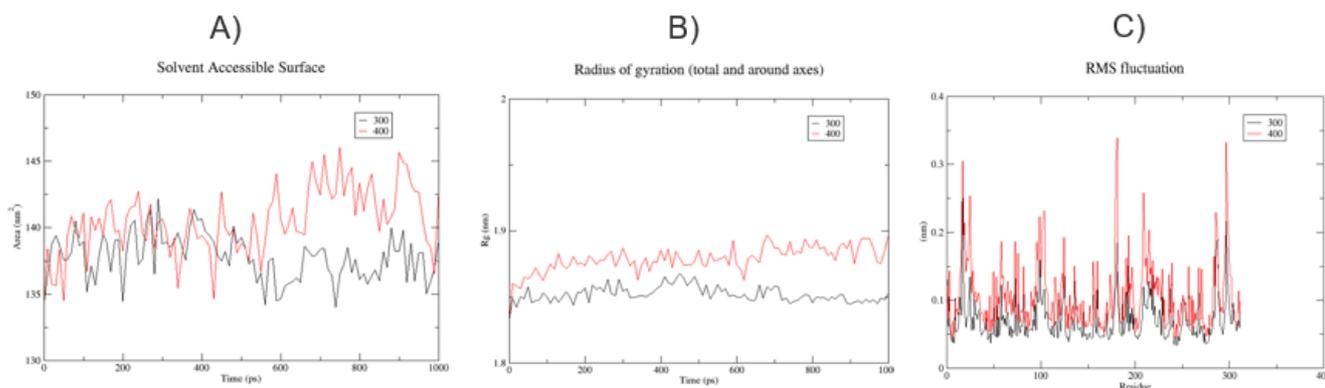


Figura 2: A) Área acessível por solvente da Celulase 5A, nas temperaturas de 300K (Preto) e 400K (Vermelho); B) Raio de Giro da Celulase 5A, nas temperaturas de 300K (Preto) e 400K (Vermelho); Análise de *Root Mean Square Fluctuation* de cada resíduo da proteína nas temperaturas de 300K (Preto) e 400K (Vermelho).

As proteínas foram submetidas à aplicação de Sequence Tolerance, que gerou o perfil de tolerância de sequência da estrutura. Foi feito o perfil somente dos resíduos que tiveram um valor abaixo do cutoff estabelecido pelos programas FoldX e Rosetta_ddG, já que somente o perfil de mutação desses resíduos que eram de interesse. Após todas essas etapas, foram obtidos 17 resíduos possíveis de mutação, ao combinar os dados de energia das mutações e resíduos preferenciais na abordagem estrutural de tolerância da sequência. A Tabela 2 contém a lista de todos os resíduos que serão testados in vitro.

Posição	AA Nativo	AA Mutante	Energia
0	Histidina	Glicina	-11,33
19	Lisina	Isoleucina	-19,154

24	Fenilalanina	Glicina	-5,938
67	Glutamina	Treonina	-12,782
69	Glicina	Glutamina	-6,116
74	Serina	Alanina	-15,062
115	Arginina	Isoleucina	-10,142
116	Arginina	Leucina	-7,069
126	Alanina	Triptofano	-17,573
149	Glicina	Lisina	-6,304
193	Lisina	Valina	-12,247
225	Glutamina	Alanina	-10,226
241	Lisina	Tirosina	-10,824
261	Glicina	Metionina	-5,301
267	Glutamato	Alanina	-15,288
303	Prolina	Alanina	-10,276
309	Serina	Alanina	-15,753

Tabela 2 – Lista de aminoácidos que foram aceitos para a mutação, contendo sua posição na sequência, o aminoácido mutado e o mutante e a energia predita da mutação.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode se concluir que um número razoável de mutantes foi obtido através da combinação de várias técnicas. A partir disso, as mutações serão testadas in vitro para comprovar a termoestabilidade predita pela bioinformática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEN, A.; FOUST, T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 535–545, 12 ago. 2009.

ARNOLD, F. H. Engineering proteins for nonnatural environments. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 9, p. 744–9, jun. 1993.

KUMAR, S.; NUSSINOV, R. How do thermophilic proteins deal with heat? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1216–1233, ago. 2001.

PASSOS, D. DE F.; PEREIRA, N.; CASTRO, A. M. DE. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60–66, 1 dez. 2018.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, set. 2006.

VIIKARI, L. et al. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. In: **Biofuels**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. v. 108p. 121–145.