

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

Jean Borges Bertoldo

**Caracterização bioquímica de uma lipase recombinante de
Staphylococcus xylosus e detecção dos mecanismos estruturais
envolvidos em sua termotolerância**

Florianópolis
08 de Fevereiro de 2010

Jean Borges Bertoldo

**Caracterização bioquímica de uma lipase recombinante de
Staphylococcus xylosus e detecção dos mecanismos estruturais
envolvidos em sua termotolerância**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi
Co-orientador: Dr. Javier Vernal

Florianópolis
08 de fevereiro de 2010

*Aos meus pais e minha
esposa, por participarem
dessa jornada rumo ao
conhecimento ...*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela presença constante nas entrelinhas da minha vida;
- Ao amigo e professor Dr. Hernán Terenzi, pela orientação amigável, confiança e pelo incentivo contínuo ao questionamento científico, pelo qual se adquire o real conhecimento;
- Ao amigo e também orientador Dr. Javier Vernal, pelo companheirismo, atenção e por sempre estar pronto para ajudar não importando a hora nem o momento;
- Aos amigos de bancada, Camila, Gabriela, Priscila, Carol, Angela, Franciele, Tiago, Gi, que propiciaram alegrias, descobertas e infinitos minutos de debates acirrados. Pessoas que deixam experiências de vida que contribuem sempre para o aperfeiçoamento pessoal;
- Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela disponibilidade de excelentes professores e de ensino de qualidade;
- A Universidade Federal de Santa Catarina, pelos recursos, espaço físico, e pelo atendimento solícito às necessidades acadêmicas;
- Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e suporte, sem os quais seria extremamente difícil a conclusão desse trabalho;
- Aos meus pais Luiz e Nádia e avós João e Maria Valentina, por me incentivarem e participarem de mais uma meta cumprida em minha vida;

- A minha esposa e companheira, Franciele S.O. Bertoldo, pelo apoio, amizade, respeito e amor que me acompanharam durante todo o percurso desse trabalho

*"A mente que se abre a
uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho
original."*

Albert Einstein

BERTOLDO, J.B. **Caracterização bioquímica de uma lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e detecção dos mecanismos estruturais envolvidos em sua termotolerância.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

As lipases são enzimas altamente versáteis que catalisam reações químicas com diversos substratos em diferentes condições e possuem características tanto bioquímicas quanto estruturais que lhes conferem resistência e termotolerância, além de serem empregadas em vários bioprocessos industriais como na produção de alimentos e biocombustíveis. A lipase de *S. xylosus* (AF208229) foi recentemente isolada e inicialmente caracterizada por nosso grupo de pesquisa e colaboradores. Essa proteína possui uma alta homologia e identidade estrutural com diversas outras lipases da família I.5, e apresenta atividade enzimática sobre *p*-nitrofenil-ésteres. Apesar de ser considerada uma enzima moderadamente termoestável e ter atividade enzimática sobre diferentes ésteres, o mecanismo de ação catalítica ainda permanece desconhecido, e principalmente, os mecanismos estruturais envolvidos em sua estabilização térmica nunca foram descritos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente a lipase recombinante AF208229 de *S. xylosus* recentemente clonada e expressa heterologicamente, e investigar os possíveis mecanismos envolvidos em sua termotolerância por meio de análises de espectroscopia de dicroísmo circular (DC). Nesse trabalho a lipase de *S. xylosus* (AF208229) foi expressa e purificada, submetida a ensaios enzimáticos em três temperaturas (25°C, 37°C e 42°C), e três pH (7,0, 8,0 e 9,0), sua especificidade catalítica foi analisada utilizando-se diferentes *p*-nitrofenil-ésteres como substratos (de 2 a 18 carbonos) e sua termoestabilidade foi acompanhada durante 10, 20 e 30 minutos em 95°C. Para as análises espectroscópicas, a enzima foi submetida a um tratamento de remoção de íons (produzindo-se a *apo* enzima) e sua atividade enzimática e sua termotolerância foram reavaliadas. Por fim o espectro de dicroísmo circular (DC) da *apo* e da *holo*_enzima foram analisados em diferentes condições. Os resultados obtidos apresentam pela primeira vez o perfil estrutural e os mecanismos de estabilidade

térmica dessa lipase. O perfil de DC da *holo_enzima* foi avaliado nas mesmas temperaturas descritas para os ensaios enzimáticos, bem como sua capacidade de re-enovelamento. O perfil de DC e a capacidade de re-enovelamento também foram observados para a *apo_enzima*. O efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} foram avaliados nos ensaios enzimáticos da *apo_enzima*, na sua termotolerância, no seu perfil de DC e na sua capacidade de re-enovelamento. Observou-se que a *holo_enzima* apresenta sua maior atividade em pH 9,0 e 42°C, que tem preferência por substratos de cadeias curtas (pNP-acetato, 2 carbonos) e que retém 77% de sua atividade enzimática após 10 minutos de tratamento térmico (95°C). A *holo_enzima* é capaz de se re-enovelar, readquirindo sua conformação estruturalmente estável e ativa. A *apo_enzima* também é capaz de se re-enovelar após o tratamento térmico, porém perde quase totalmente sua atividade. Observou-se que na presença do íon Zn^{2+} a *apo_enzima* se re-enovelou e reteve sua atividade enzimática. Com base nesses resultados poderia afirmar-se que a lipase de *S. xylosus* (AF208229) é uma metaloenzima dependente de zinco e que esse íon possivelmente localizado em um motivo estrutural rico em α -hélices próximo ao ativo site.

Palavras-chave: Termoestabilidade, dicroísmo circular, lipases, metaloproteínas

BERTOLDO, J.B. **Caracterização bioquímica de uma lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e detecção dos mecanismos estruturais envolvidos em sua termotolerância.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Lipases are highly versatile enzymes, which catalyze many chemical reactions with different substrates in different conditions. These enzymes have particular biochemical and structural characteristics which promote stability and thermal resistance. Besides, they are used by industries, i.e: food technology, detergents and biofuels. *S. xylosus* lipase (AF208229) was recently isolated and characterized by our group. This enzyme shares a high homology with other lipases among I.5 lipases family and has activity on *p*-nitrophenyl esters. Although considered a moderated thermostable lipase, its catalytic function remains unclear and its structural mechanisms for thermal stabilization have never been described. This work assessed the enzymatic activity of the recombinant lipase from *S. xylosus* in three different temperatures (25°C, 37°C and 42°C) and pH (7.0, 8.0 and 9.0), and the thermostability (incubation at 95°C for 10, 20 and 30 minutes). In order to investigate the mechanism involved in enzymatic activation, the enzyme was submitted to an ion removal treatment (to obtain an *apo*-enzyme) and its activity and thermotolerance were evaluated in the presence and absence of Zn²⁺ and Ca²⁺. The structural profile of *apo*-enzyme and *holo*-enzyme were assessed by circular dichroism (CD) at different conditions in the presence and in the absence of metal cofactors as: Zn²⁺ and Ca²⁺. These results represent the first insights on *S. xylosus* lipases secondary structure and its mechanism for thermal stabilization. *S. xylosus* lipase (AF208229) was more active in pH 9.0, 42°C with specificity for short-chain substrates (pNP-acetate C2). In addition, this enzyme was able to maintain 77% of its activity after a thermal treatment (95°C for 10 min) and to refold to its stable conformation. *apo*-enzyme showed the same ability to refold as seen to *holo*-enzyme, but was not able to keep its activity after thermal treatment, which indicate the need of metal for its activity stabilization. Interesting, in the presence of Zn²⁺ the *apo*-enzyme was able to acquire a more stable conformation after thermal treatment and still keep residual activity.

These results propose that *S. xylosus* lipase (AF208229) is a metalloenzyme which uses Zn^{2+} as its metal coordinating, and the Zn^{2+} is possibly located in α -helical rich motif close to the active site.

Key-words: thermostability, circular dichroism, lipases, metalloproteins

SUMÁRIO

1 Revisão Bibliográfica.....	17
1.1 Biocatalisadores	17
1.2 Lipases	19
1.2.1 Características estruturais das lipases	20
1.2.2 Mecanismo de ação enzimática.....	21
1.3 Lipases do gênero <i>Staphylococcus</i>	24
1.4 Cofatores metálicos e a relação entre estabilidade estrutural e função enzimática.....	27
1.4.1 Cofatores metálicos em lipases	28
1.5 Lipase de <i>Staphylococcus xylosus</i>	30
2 Objetivos.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 Materiais e Métodos.....	34
3.1 Análise bioinformática e modelagem molecular.....	34
3.2 Expressão e purificação.....	34
3.3 Determinação da massa molecular da lipase recombinante	36
3.4 Confirmação da identidade através de espectrometria de massa. 36	
3.5 Determinação da atividade lipolítica.....	36
3.6 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade lipolítica	37
3.7 Especificidade por substrato	37
3.8 Ensaio de termoestabilidade.....	38
3.9 Produção da <i>apo</i> _enzima e avaliação dos cofatores metálicos Zn ²⁺ e Ca ²⁺ na atividade lipolítica	38

3.10 Espectroscopia de dicroísmo circular (DC)	39
3.10.1 Perfis de desnaturação térmica e química	39
3.10.2 Efeitos dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na estabilidade estrutural	40
3.10.3 Influência dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na termotolerância estrutural	40
3.10.4 Efeito dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na desnaturação química da <i>apo_enzima</i>	41
4 Resultados	42
4.1 Modelo tridimensional da lipase de AF 208229 de <i>S. xylosus</i> ...	42
4.2 Expressão e purificação da lipase recombinante AF208229 de <i>S. xylosus</i>	45
4.3 Determinação da massa molecular da lipase com cauda de histidina	46
4.4 Confirmação da identidade da lipase de <i>S. xylosus</i>	47
4.5 Atividade lipolítica	48
4.5.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade lipolítica	48
4.5.2 Especificidade de substratos	51
4.5.3 Efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na atividade lipolítica e na termotolerância da <i>apo_enzima</i>	52
4.6 Elementos estruturais secundários e perfil de dicroísmo circular (DC) da lipase de <i>S. xylosus</i>	53
4.6.1 Desnaturação térmica e química da <i>holo_enzima</i>	55
4.6.2 Efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na estabilidade estrutural	59
4.6.3 Influência dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na aquisição da conformação termotolerante	61
4.6.4 Efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na desnaturação química da <i>apo_enzima</i>	64

5 Discussão.....	67
7 Considerações Finais.....	71
6 Referências.....	72

Lista de Figuras

- Figura 1:** Mecanismo de ação enzimática das lipases. Adaptado de Reis et al (2009)..... 23
- Figura 2:** Precursor protéico da lipase SHL mostrando regiões de clivagem (resíduos) dos peptídeos.....25
- Figura 3:** (SHyL) Sítio de ligação do Ca^{2+} mostrando as cadeias laterais dos aminoácidos da cavidade catalítica26
- Figura 4:** Lipase de *Geobacillus thermocatenulatus* mostrando os sítios de coordenação a Zn^{2+} e os resíduos que o compõem.....29
- Figura 5:** Alinhamento de sequências de aminoácidos das formas maduras das lipases AF208229 (DSM20266) e AF701336.....30
- Figura 6:** Modelo tridimensional da lipase de *S. xylosus*. Modelo construído com o software PyMOL (DELANO, 2002).....43
- Figura 7:** Aproximação da cavidade catalítica mostrando a tríade catalítica conservada entre as lipases. Modelo construído com o software PyMOL (DELANO, 2002).....44
- Figura 8:** Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e desnaturantes da lipase recombinante de *S. xylosus*.....466
- Figura 9:** Cromatografia de exclusão molecular da lipase recombinante de *S. xylosus*.....47

Figura 10: Atividade específica da lipase de <i>S. xylosus</i> em difer pH e temperaturas.....	
Figura 11: Termoestabilidade da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i>	50
Figura 12: Especificidade por substratos apresentada pela lipase de <i>S.</i> <i>xylosus</i>	51
Figura 13: Espectros de dicroísmo circular da lipase de <i>S. xylosus</i> em 25°C.....	54
Figura 14: Perfil de dicroísmo circular da <i>holo</i> _lipase de <i>S. xylosus</i> em diferentes temperaturas.....	55
Figura 15: Curva sigmoideal de Boltzmann mostrando o ponto médio de desnaturação (T_m) da <i>holo</i> _enzima em relação a temperatura.....	56
Figura 16: Perfil de dicroísmo circular da <i>holo</i> _lipase de <i>S. xylosus</i> (25°C) e (95°C).....	57
Figura 17: Perfil de dicroísmo circular do renovelamento da <i>holo</i> _lipase de <i>S. xylosus</i>	58
Figura 18: Comparação entre a desnaturação química e térmica sofrida pela lipase de <i>S. xylosus</i>	59
Figura 19: Perfil de dicroísmo circular da <i>apo</i> _lipase de <i>S. xylosus</i> em diferentes condições.....	60
Figura 20: Perfil de dicroísmo circular da <i>holo</i> _lipase de <i>S. xylosus</i> submetida ao tratamento de remoção de íons.	61
Figura 21: Recuperação do conteúdo de α -hélices apresentado pela lipase de <i>S. xylosus</i> em diferentes condições.....	62
Figura 22: Perfil de dicroísmo circular da renaturação da <i>apo</i> _lipase de <i>S. xylosus</i> em diferentes condições.....	63

Figura 23: Perfil de dicroísmo circular da desnaturação química da *apo*_lipase de *S.xylosus*.....65

Figura 24: Quantificação do conteúdo de α -hélices reduzido após o tratamento térmico na presença e na ausência dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} 66

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Biocatalisadores

A pesquisa e o desenvolvimento de metodologias para a conservação dos recursos energéticos não renováveis tem se tornado essencial, direcionando a atenção dos pesquisadores para a produção de novas alternativas para a demanda energética mundial, dentre elas, a criação de proteínas recombinantes por meio da biologia molecular. Nas últimas duas décadas foram obtidos grandes avanços na compreensão das interações estruturais e funcionais das proteínas. Foram estudados seus mecanismos de estabilidade em soluções aquosas e não aquosas, as relações entre mobilidade conformacional, integridade estrutural e atividade e a especificidade de substrato, utilizando vários métodos moleculares avançados, que incluem cristalografia, difração circular, mutagenese sítio dirigida e evolução *in vitro* (HALLING, 2000, KAZLAUSKAS, 2000, BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002, KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Esse conhecimento direcionou as pesquisas para o desenvolvimento de um catalisador biológico ideal, que é considerado em termos bioquímicos como o capaz de obter número máximo de *turnover* (k_{cat}) e apresentar uma constante máxima de eficiência catalítica (k_{cat}/k_M). Entretanto, do ponto de vista dos bioprocessos, cada um destes é limitado por uma série de condições, que são ditadas por propriedades específicas do substrato, dos produtos e da própria reação de bioconversão. A produção de um biocatalisador de grande magnitude ainda é obstruída por fatores termodinâmicos, propriedades dos reagentes e produtos, em particular solubilidade, pH e temperatura, determinantes na criação de um bioprocessos (BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002).

Sob o paradigma do processo ideal, a pré-seleção de condições ótimas pode substituir as limitações impostas sobre o biocatalisador e uma variedade de tecnologias contribui para essa pré-seleção. A chave desse processo é definida na escolha do catalisador a ser usado, escolhendo entre um organismo livre ou enzimas isoladas segundo

características específicas como taxa de crescimento do organismo e níveis de expressão das enzimas (RANGANATHAN, et al., 2008).

Em relação às enzimas, considerando que o objetivo primário de qualquer biotransformação industrial é o alto grau de conversão de substrato em produto no mínimo de tempo possível, o *turnover* de uma proteína representa um fator chave no conceito de um bom catalisador. Como muitas enzimas estão envolvidas em vias metabólicas específicas e seletivas, a atividade intrínseca ou o *turnover* depende fundamentalmente da natureza e do mecanismo da reação catalisada (BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002).

Uma enzima em particular pode catalisar a reação de bioconversão desejada mas com um k_{cat} baixo, o que para uma aplicação prática precisa ser melhorado. E este melhoramento é possível utilizando-se técnicas como mutação sítio dirigida e evolução *in vitro* (SHANKLIN, 2000). Embora as características de *turnover* de enzimas tipicamente usadas em bioconversões variem largamente, altos valores de *turnovers* são característicos na maioria dos processos biocatalíticos comerciais. Em um processo operacional de biocatálise o *turnover* pode ser influenciado não apenas geneticamente, mas também pelo microambiente da enzima e especificamente pela forma pela qual a biocatálise é formulada e aplicada. Essas condições possuem uma influência considerável sobre o *turnover* máximo exibido por um biocatalisador. Modificações frequentemente resultam em valores baixos de k_{cat} que são atribuídos a efeitos como variações na flexibilidade da proteína e nas propriedades alostéricas (conformacionais), diminuição da acessibilidade ao sítio ativo da enzima (estérico) e mudanças no microambiente causado pela atração ou exclusão de moléculas de água, íons e solutos (BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002).

A temperatura em um processo biocatalítico é frequentemente influenciada por fatores relativos à reação do que ao catalisador, tais como: solubilidade do substrato/produto ou a necessidade de redução de reações laterais. Dados cinéticos sugerem que a temperatura de reação necessita ser precisamente selecionada, porém essa seleção é sempre dificultada pela estabilidade do biocatalisador (BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002). Felizmente, o processo de evolução biológica promoveu o surgimento de um amplo espectro de biocatalisadores

termoestáveis nativos, enzimas que são derivadas de organismos extremófilos que podem reter atividade acima de 100°C. A seleção de uma enzima de um apropriado grupo termoestável pode minimizar requerimentos subsequentes de um processo, principalmente pela estabilização molecular do biocatalisador. Outras propriedades bioquímicas também devem ser levadas em conta, tais como a afinidade e especificidade da enzima pelo substrato, características essas que estão intimamente ligadas às vias metabólicas nas quais a enzima atua. As enzimas lipolíticas oferecem muitas dessas vantagens (SHIMADA et al., 2002, BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002, NIE et al., 2006).

1.2 Lipases

As lipases são enzimas encontradas na maioria dos organismos e pertencem à classe das hidrolases (E.C.3.1.1), essas enzimas hidrolisam preferencialmente triacilgliceróis em ácidos graxos, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol (CARRIERE et al., 1994) e também são conhecidas como triacilglicerol-acil-hidrolases. Os lipídeos constituem uma grande parte da biomassa da terra e as enzimas lipolíticas possuem um importante papel na transformação desses compostos insolúveis. As lipases podem clivar ou modificar a ligação éster-carboxil dos lipídeos e seus derivados, produzindo primariamente ácidos graxos (KHARE et al., 2000). Também estão envolvidas na mobilização de lipídios entre células de um organismo, bem como no seu transporte de um organismo a outro (BEISSON et al., 2000). Além de sua atividade hidrolítica sobre os triglicérides, as lipases catalisam esterificações, interesterificações, acidólises, alcoólises e aminólises. Essas enzimas usualmente exibem quimio-seletividade, regio-seletividade e enantioseletividade, características que as tornam biocatalisadores extremamente versáteis (KADEMI et al., 2005).

As lipases têm emergido como um dos grupos de biocatalisadores com maior potencial para aplicações industriais, podendo ser utilizadas tanto *in situ* no metabolismo de lipídeos quanto *ex situ* em processos biotecnológicos específicos (PANDEY et al., 1999). Alguns trabalhos têm revelado que essas enzimas têm surgido como peças chave na biotecnologia moderna, devido a sua variada

aplicabilidade, tais como nas indústrias de alimentos, de detergentes, farmacêutica e na química industrial (JAEGER; EGBERT, 1999). As lipases estão envolvidas na síntese de biopolímeros e na produção de fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e biocombustíveis (JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008).

1.2.1 Características estruturais das lipases

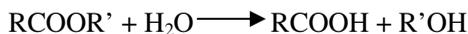
As lipases são constituídas em geral por um único domínio, e todas elas adquirem uma organização estrutural comum, chamado motivo estrutural α/β -hidrolase (OLLIS et al., 1992). O sítio ativo das lipases contém a tríade catalítica Ser-His-Asp comum a maioria das serino-hidrolases onde a serina é o aminoácido nucleofílico, a histidina o aminoácido com cadeia lateral básica e o aspartato ou glutamato o aminoácido com cadeia lateral ácida (JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008). Essa sequência canônica existe em proteínas com diferentes tipos de conformação, entre elas, tripsina e subtilisina, e serve como um exemplo típico de evolução convergente (HOLMQUIST, 2000).

O acesso a tríade catalítica é protegido por uma junção de elementos estruturais secundários móveis, onde a flexibilidade intrínseca desses elementos determina o estado ativo (aberto) e inativo (fechado) da enzima. O mecanismo de abertura de muitas lipases é explicado pela movimentação desses elementos secundários, que se conformam por meio da atração/repulsão do microambiente. A abertura da estrutura de cobertura confere à enzima o estado conformacional ativo e possibilita ao substrato o acesso à cavidade catalítica. O sítio de ligação ao substrato é localizado no interior de um bolsão com resíduos polares próximos ao topo de uma folha beta, que é uma característica estrutural típica de enzimas da família das α/β -hidrolases. O tamanho e a geometria do sítio de ligação ao substrato determinam a especificidade pelo substrato (PLEISS et al., 1998, ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000, van KAMPEN et al., 2001, TYNDALL et al., 2002, TIESINGA et al., 2007, ERICSSON et al., 2008).

1.2.2 Mecanismo de ação enzimática

As duas principais categorias de reações de catálise nas quais as lipases estão envolvidas são classificadas como (GANDHI, 1997):

i Hidrólise



ii Síntese

As reações nessa categoria ainda podem ser subdivididas em:

(a) Esterificação



(b) Interesterificação



(c) Alcoólise



(d) Acidólise



As três últimas reações descritas acima são agrupadas em um único termo denominado transesterificação. A alta versatilidade e dinâmica das lipases fazem dessas enzimas excelentes biocatalisadores, reconhecidos em diversos ramos da indústria biotecnológica. Essas enzimas são também consideradas carbóxi-esterases por agirem em longas cadeias de acil-glicérides (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006, REIS et al., 2009).

O mecanismo envolvido durante a lipólise é mostrado na figura 1. No primeiro passo, a serina é ativada por meio da deprotonação, na qual resíduos de aspartato e histidina são necessários (figura 1a). Conseqüentemente a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina é

aumentada, de tal maneira que o resíduo ataca o grupo carbonil do substrato formando um intermediário acil-enzima (figura 1b). A presença de um ambiente polar (*oxianion*) contribui para a estabilização da distribuição de cargas e a redução do estado energético do intermediário tetraédrico. A etapa de deacilação mostrado na figura 1c é controlado pela eletronegatividade das moléculas presentes na interface. Nesse processo, o nucleófilo (H_2O , monoglicéride) ataca a enzima acilada liberando o produto e regenerando o sítio catalítico (REIS et al., 2009).

As lipases demonstram vários graus de seletividade de substrato, essas enzimas são capazes de catalisar reações químicas envolvendo um amplo espectro de substratos, porém as taxas de reação variam largamente dependendo da estrutura das moléculas do substrato. O exemplo mais típico é o da lipase de *Geotrichum candidum* que reage principalmente com ácidos graxos na configuração *cis*-9. Duas forças determinam a seletividade por ácidos graxos e álcoois das lipases, o impedimento estérico e as interações hidrofóbicas (REIS et al., 2009).

Devido a tais características, as lipases ainda podem ser agrupadas de acordo com sua regioseletividade no que diz respeito às cadeias acil dos triglicérides *sn*-1,3. A discussão sobre o funcionamento do mecanismo de hidrólise das lipases tem sido focada tanto no modelo do substrato quanto no modelo da enzima.

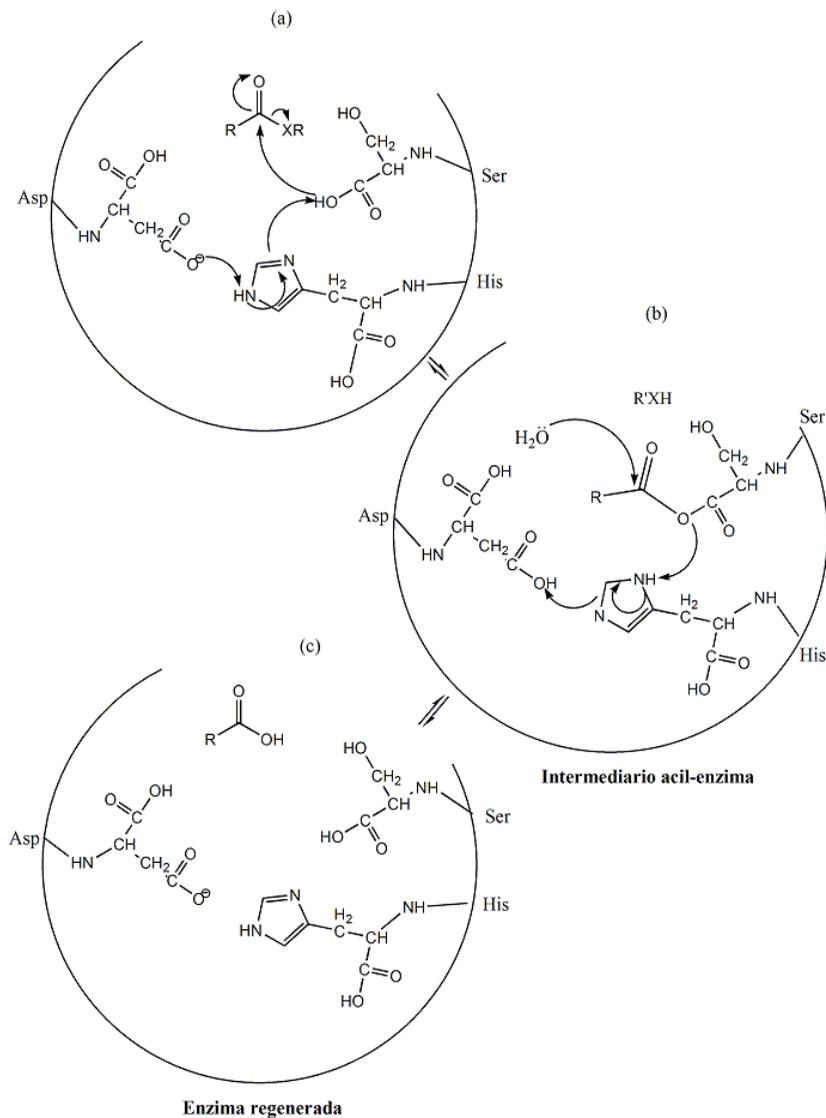


Figura 1: Mecanismo de ação enzimática das lipases. Baseado em Reis e colaboradores (2009)

O modelo do substrato enfatiza que o aumento da viabilidade do substrato é devido à orientação dos grupos funcionais na presença da interface. Enquanto que o modelo da enzima assume que o aumento da atividade catalítica se origina das mudanças conformacionais sofridas pela enzima quando adsorvida na interface água-lipídio (ZYGmund; DEREWENDA, 1995).

Ainda assim, o mecanismo de ativação interfacial não é aceito como única explicação para a atividade catalítica das lipases. Assume-se também que o grande espectro de reações catalisadas por essas enzimas é devido a peculiaridades estruturais que são características de enzimas que pertencem à família das α/β -hidrolases. Os membros dessa família são caracterizados por possuir oito folhas- β conectadas por α -hélices que formam o motivo estrutural $\alpha/\beta/\alpha$ e na maioria deles as folhas- β são paralelas. Além disso, as proteínas que pertencem a essa família divergiram de um ancestral comum que possuía uma ampla especificidade catalítica (HOTELIER et al., 2004).

1.3 Lipases do gênero *Staphylococcus*

Dentro do gênero *Staphylococcus* existem lipases que podem ou não apresentar o mecanismo de ativação interfacial. A importância das lipases de *Staphylococcus* spp. resulta da significância no metabolismo de lipídios e seu envolvimento no processo de patogênese (MOSBAH et al., 2005). O potencial dessas lipases no processo de biocatálise é baseado nos padrões enzimáticos de régio- e enantioespecificidade, na sua ampla especificidade catalítica e na sua habilidade de não apenas hidrolisar, mas também sintetizar componentes de ácidos graxos (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000).

A primeira sequência gênica descrita na literatura que codifica uma lipase foi a do gene *shl* de *Staphylococcus hyicus* em 1985 (figura 2). Análises moleculares revelaram que esta enzima possui uma massa molecular aproximada de 46 kDa.. Após confirmações tornou-se evidente que a lipase SHL era expressa como um precursor de 631 resíduos com um peptídeo sinal de aproximadamente 38 aminoácidos e

um pró-peptídeo de 207 aminoácidos que, após seu processamento gera a lipase madura de 396 aminoácidos (ROSENSTEIN; GOTZ, 2000).



Figura 2: Precursor proteico da lipase SHL mostrando as regiões de clivagem. (SP) peptídeo sinal; (PP) pró-peptídeo; (MP) peptídeo maduro. (adaptado de ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000)

Uma comparação da sequência primária da SHL com outras lipases de *Staphylococcus* revelou uma organização molecular muito semelhante dessas proteínas. Todas as lipases deste gênero bacteriano são traduzidas em uma pré-pro-enzima com um peptídeo sinal de 35 a 38 aminoácidos acompanhado por uma pró-sequência de 207 a 231 aminoácidos e processado em uma forma madura de 383 a 396 aminoácidos. Um alinhamento múltiplo das estruturas primárias demonstra uma região conservada dentro de um motivo estrutural G-X-S-X-G que é semelhante em todas as lipases do gênero *Staphylococcus* (JAEGER et al., 1999, ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000, TIESINGA et al., 2007).

Dentre outras características as lipases também podem apresentar domínios de ligação a íons como Ca^{2+} (figura 3), que participam da regulação de sua atividade. Recentemente foi proposto que o íon Ca^{2+} está envolvido na estabilização da estrutura tridimensional da enzima durante a catálise (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000, TIESINGA et al., 2007).

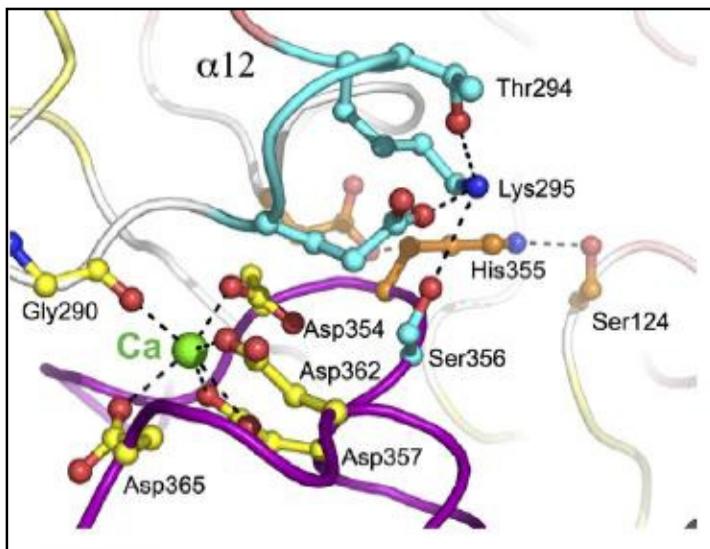


Figura 3: (SHL) Sítio de ligação do íon Ca^{2+} mostrando as cadeias laterais dos aminoácidos da cavidade catalítica interagindo com o íon, demonstrando a direta ação do Ca^{2+} na atividade enzimática da lipase de *S. hyicus* (adaptado de TIESINGA et al., 2007)

1.4 Cofatores metálicos e a relação entre estabilidade estrutural e função enzimática

As proteínas usam a ligação com metais para desenvolver uma variedade de funções tais como a catálise enzimática, a sinalização celular, o controle dos processos de oxirredução e a estabilização estrutural. Aproximadamente 40% das proteínas atualmente conhecidas possuem cofatores metálicos (DUDEV; LIM, 2008). Alguns cofatores metálicos apresentam características únicas como tamanho, estrutura simples, habilidade em receber elétrons, carga positiva, esfera de coordenação flexível, afinidade ligante-específica, estado de valência variável, configuração eletrônica dos spins e alta mobilidade. Entre outros os cátions Zn^{2+} e Ca^{2+} são os mais encontrados em lipases bacterianas (TYNDALL et al., 2002, CHOI et al., 2005, TIESINGA et al., 2007, CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009).

Esses cofatores metálicos foram selecionados por meio de um longo processo evolutivo baseado em suas propriedades bioquímicas únicas e sua biodisponibilidade (WILLIAMS, 1997). Entre suas principais características os cofatores metálicos agem principalmente na estabilização estrutural através de duas vias conhecidas: alguns se ligam na cadeia polipeptídica recém sintetizada e a auxiliam no enovelamento e outros se complexam em cavidades bem estruturadas em proteínas já enoveladas (WILSON; APIYO; WITTUNG-STAFSHEDE, 2004). O mecanismo de complexação de cofatores metálicos é influenciado por características químicas do metal como: camadas de valência, o raio iônico e a habilidade de receber elétrons (DUDEV; LIM, 2008).

Muitas proteínas empregam um metal específico para a manutenção de sua atividade, em proteínas como as lipases o metal é utilizado na estabilização estrutural em temperaturas elevadas, possibilitando interações específicas entre os elementos estruturais secundários que facilitam a conformação ativa da enzima (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). Algumas enzimas possuem sítios binucleares de ligação a metais em suas estruturas globais. Geralmente esses metais são ligados por carboxilato, água ou hidroxila e participam em várias reações catalíticas. Na maioria dos casos, um dos sítios apresenta menor afinidade por metais do que outro, e geralmente pode ser substituído por outro metal termodinamicamente mais favorável. A

diminuição da afinidade de um dos centros de ligação também se deve às propriedades de menor doação de carga do ligante (DUDEV; LIM, 2008).

Assim como o cofator nativo geralmente estabiliza a estrutura da metaloproteína, um cofator metálico não nativo pode desestabilizar inteiramente a estrutura da proteína resultando em seu mau funcionamento. Por exemplo, a microglobulina β_2 humana é solúvel em condições fisiológicas mas na presença de Cu^{2+} , um metal não nativo presente em algumas membranas de hemodiálise, forma fibrilas amilóides, causando falha renal em pacientes que fazem hemodiálise a longo prazo (FLOEGE; EHLERDING, 1996).

1.4.1 Cofatores metálicos em lipases

As lipases utilizam centros metálicos para manter sua conformação ativa e os domínios de ligação funcionam como facilitadores das interações eletrostáticas e ligações hidrogênio feitas entre os resíduos laterais que compõem o sítio de ligação. Geralmente a complexação metálica é entropicamente favorável, pois previamente moléculas de água que se aderem ao metal ($\text{Me}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}$) em solução são liberadas quando o íon se liga à proteína, atingindo o equilíbrio energético. Os sítios de ligação estão estrategicamente localizados na superfície das enzimas, e são compostos principalmente por resíduos negativamente carregados, como aspartato e glutamato que são aproximados durante o enovelamento natural da cadeia polipeptídica. Na cadeia polipeptídica uma série de ligações cruzadas é feita entre o metal e os resíduos laterais que tornam por fim a estrutura global da enzima mais firme e mais estável. A ausência da complexação do metal no sítio de ligação leva a um acúmulo de cargas negativas que tendem a se retrair aumentando as interações de repulsão eletrostática que aumentam a instabilidade da proteína enovelada (CHAKRABORTY; RAJ, 2008, INVERNIZZI et al., 2009).

A maioria das lipases apresenta domínios de ligação a cátions divalentes como Ca^{2+} (AMADA et al., 2001, SABRI et al., 2009) e Zn^{2+}

(TYNDALL et al., 2002, CHOI et al., 2005, CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009) e algumas apresentam sítios binucleares que apresentam tanto Zn^{2+} quanto Ca^{2+} complexados em suas estruturas (TIESINGA et al., 2007).

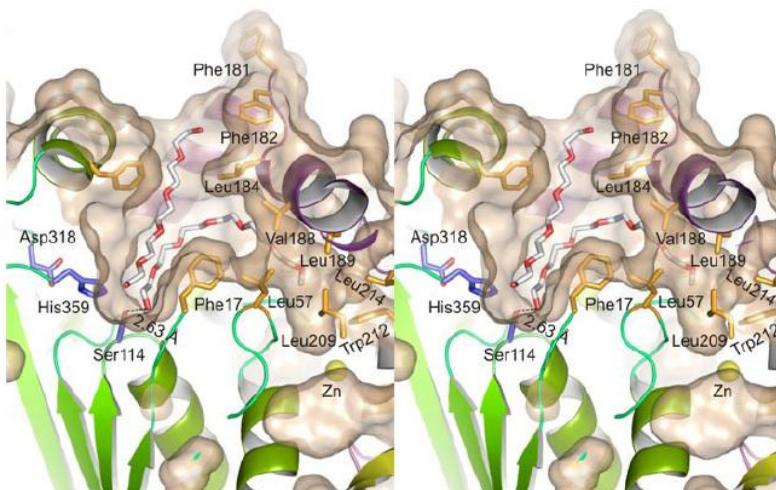


Figura 4: Lipase de *Geobacillus thermocatenulatus* mostrando o sítio de coordenação a Zn^{2+} e os resíduos que o compõem, usados na estabilização do substrato (Adaptado de Carrasco-López et al., 2009)

Lipases como a de *G. thermocatenulatus* (BTL2) e de *S. hyicus* (SHL) apresentam sítios binucleares de ligação a metais, onde preferencialmente um dos sítios tem maior afinidade por um cofator e o segundo sítio age como estabilizador. No caso de haver o ataque a um dos centros metálicos, preferencialmente o sítio com menor afinidade torna-se uma armadilha para substâncias que tendem a substituir os cofatores metálicos (figura 4) e assim o centro com maior afinidade permanece protegido do ataque (TIESINGA et al., 2007, DUDEV; LIM, 2008, CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009).

1.5 Lipase de *Staphylococcus xylosus*

Atualmente dois genes codantes para lipases de *S. xylosus* são encontradas na literatura: a lipase (AF701336) descrita por Mosbah e colaboradores (2005) e a lipase AF208229 descrita por Rosenstein e Gotz (2000). As duas enzimas compartilham 53% de homologia (figura 5). A lipase (AF701336) foi obtida do *S. xylosus* isolado de resíduos de empresas de óleo.



Figura 5: Alinhamento de seqüências de aminoácidos das formas maduras das lipases AF208229 (DSM20266) e AF701336. Caixas em preto indicam a posição onde os aminoácidos são idênticos nas duas proteínas. Caixas em cinza indicam os resíduos similares nas duas proteínas. Os triângulos fechados indicam a Ser, Asp e His que formam a tríade catalítica. Os traços representam os *gaps* introduzidos no processo de alinhamento. Números que indicam a posição dos aminoácidos estão no final e cada linha. (Adaptado de Mosbah e colaboradores (2005).

A lipase AF701336 foi previamente descrita por Mosbah e colaboradores (2005), essa lipase exibe preferência por pH alcalino (8,5) e temperatura moderadamente alta (45°C), além disso essa enzima difere das outras lipases por não possuir atividade interfacial e não necessitar de cátions divalentes como o Ca^{2+} para manutenção de sua estabilidade estrutural. Ainda foi capaz de manter 50% de atividade residual após um tratamento térmico a 60°C durante 15 minutos.

A lipase AF208229 descrita por Rosenstein e Gotz (2000) nunca foi expressa e caracterizada. Recentemente Fiorentini e colaboradores (2009) isolaram *S. xylosus* de produtos fermentados de carne, e observaram atividade lipolítica em todas as cepas testadas. Em produtos fermentados de carne são encontradas diversas espécies de *Staphylococcus* sendo *S. xylosus* uma das mais comuns. Essa bactéria é responsável pela decomposição de peróxidos, estabilização da coloração e formação do sabor devido à presença de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Sendo assim considerada importante na fermentação desses produtos (MOROT –BIZOT, et al., 2003, IACUMIN et al., 2006).

As lipases são enzimas amplamente usadas na indústria, devido a características bioquímicas como ampla especificidade de substrato e características estruturais como resistência térmica (JAEGER: EGBERT, 2002, TYNDALL et al., 2002), porém esses mecanismos são pouco estudados. A compreensão de tais mecanismos envolvidos na estabilidade estrutural e aquisição da conformação ativa dessas enzimas tornam-se extremamente relevantes quando o objetivo é a obtenção de um biocatalisador robusto e versátil. Nosso grupo (BROD et al., 2010) recentemente amplificou e clonou um fragmento codante da lipase AF208229 que apresentou, 99% de homologia com a lipase descrita por Rosenstein e Gotz (2000). A expressão, purificação, caracterização bioquímica e estrutural da lipase AF208229 são objetivos desse trabalho.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar bioquimicamente a lipase recombinante AF208229 de *Staphylococcus xylosus* e avaliar os mecanismos envolvidos na estabilidade estrutural, bem como o efeito de cofatores na termotolerância e na atividade enzimática.

2.2 Objetivos Específicos

- Executar um múltiplo alinhamento e uma busca em banco de dados de proteínas por uma sequência com alta identidade estrutural para construção do modelo tridimensional da lipase de *S. xylosus* (AF208229)
- Expressar a proteína clonada em vetor de expressão pET14b e purificar a enzima por meio de cromatografia líquida de afinidade por metal imobilizado (IMAC), seguida por cromatografia líquida de exclusão molecular (SEC);
- Confirmar a identidade da proteína através de fragmentação trípica seguida de detecção de massa dos peptídeos resultantes, através de técnicas de espectrometria de massa;
- Determinar a atividade lipolítica em diferentes substratos, bem como diferentes pHs e diferentes temperaturas;
- Testar a resistência térmica nas condições catalíticas de melhor atividade;
- Avaliar o efeito dos cofatores metálicos divalentes Ca^{2+} e Zn^{2+} na atividade lipolítica;
- Avaliar e quantificar o conteúdo de elementos secundários da lipase de *S. xylosus* através de dicroísmo circular;

- Avaliar e quantificar os efeitos estruturais da desnaturação térmica e química através do dicroísmo circular;
- Avaliar o efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na relação estrutura-função e estabilidade térmica da lipase de *S. xylosus* através do dicroísmo circular;

3 Materiais e Métodos

3.1 Análise bioinformática e modelagem molecular

A sequência de aminoácidos da enzima foi comparada com o banco de dados de sequências não redundantes depositado no NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) usando-se o algoritmo BLAST no modo BLASTp (ALTSCHUL et al., 2005), o modelo tridimensional foi obtido utilizando-se o software Swiss PdbViewer 5.0 (GUEX; PEITSCH, 1997) baseado na estrutura com maior identidade de sequência aminoacídica encontrada com o algoritmo BLAST, e a representação do modelo tridimensional foi obtida usando-se o software PyMOL (DELANO, 2002) usando o arquivo PDB com maior identidade.

3.2 Expressão e purificação

O vetor de expressão pET14b (Novagen®) contendo o gene codificante da lipase AF208229 de *S. xylosus* obtido pelo grupo da Professora Dr. Ana Caralina Maisonnave Arisi do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina e usado para transformar a cepa BL21(DE3) pLysS de *Escherichia coli*. Células bacterianas contendo o plasmídeo *pET14b_lip* foram inoculadas em tubo falcon contendo 10 mL de meio Luria-Bertani (LB broth) suplementados com 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de cloranfenicol. As culturas deixadas em crescimento durante 16 horas a 37°C foram transferidas para frascos de 1 L contendo 250 mL do mesmo meio de crescimento e mantidos a 37°C até atingirem uma densidade óptica DO₆₀₀ de 0,8 unidades de absorbância (AU). O indutor de expressão isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado ao meio na concentração final de 1 mM. Diferentes condições de indução foram testadas, duas temperaturas (30° e 37°C) e dois períodos de indução (5h e 18h). Após a indução, as células bacterianas foram centrifugadas (3000 g, 15 minutos, 4°C) e o *pellet* bacteriano resultante foi lavado uma vez com tampão A (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) e depois

homogeneizado com tampão B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) e inibidor de protease (PMSF na concentração final de 40 µg. mL⁻¹). As células foram submetidas a tratamento com ultrassom durante 7 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos em cada ciclo. No próximo passo, o sobrenadante da solução foi separado do restante celular através de centrifugação (10000 g, 20 minutos, 4°C) para obtenção do extrato protéico bruto. O sobrenadante contendo a lipase de *S. xylosus* com cauda de histidina foi injetado em uma coluna de afinidade com metal imobilizado (Hitrap® GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão B e conectada a um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (ÄKTA purifier® GE Healthcare). A lipase recombinante foi eluída por meio de um gradiente de imidazol de 60 mM a 500 mM em tampão B e frações de 1 mL foram coletadas. A enzima purificada foi submetida a diálise por 24 h em tampão C (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0). A eficiência da purificação e a determinação da massa molecular aparente da proteína foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em géis contendo 10% (w/v) de poliacrilamida de acordo com os protocolos usados pelo sistema Mini-PROTEAN® da Bio-Rad. A concentração de proteína foi determinada usando um kit (Bio-Rad protein assay) com BSA como padrão.

3.3 Determinação da massa molecular da lipase recombinante

A massa molecular aproximada em solução da lipase recombinante foi estimada em triplicata através de cromatografia líquida de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 Prep Grade (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão B e calibrada com os seguintes padrões de massa molecular: BSA (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). A proteína foi eluída no mesmo tampão.

3.4 Confirmação da identidade através de espectrometria de massa

A identidade da lipase recombinante de *S. xylosus* foi confirmada por espectrometria de massa. Amostras puras da lipase foram preparadas em água ultrapura utilizando filtros com membranas polares (Amicon Ultra, MILLIPORE) e liofilizadas à vácuo em concentrador (Eppendorf Concentrator 5301). Em seguida foram enviadas para Embrapa CENARGEN em Brasília onde foram analisadas pelo Prof. Dr. Carlos Bloch em espectrômetros ESI Ion Trap HCT Ultra ETD II (Bruker Daltonics) e Nano ESI Q-TOF Synapt HDMS (Waters Co.).

3.5 Determinação da atividade lipolítica

Os testes enzimáticos foram realizados de acordo com Maia e colaboradores (2001) usando-se o *p*-nitrofenil acetato (pNPC₂) como substrato. A produção do *p*-nitrofenol foi continuamente monitorada no comprimento de onda de 410 nm em um leitor de microplacas (Microplate spectrophotometer TECAN Infinite Series M200) por 60 minutos em um volume final de 300 µL. Para a preparação do substrato, uma solução estoque de 8 mM de pNPC₂ foi preparada em *iso*-propanol e dissolvida em 50 mM de tampão (Tris-HCl, pH 8,0) na concentração final de 1 mM de *p*-nitrofenil acetato. Em seguida 270 µL da solução do substrato foi adicionada a 30 µL da solução de proteína (19,67 µM). A

absortividade molar do *p*-nitrofenol foi experimentalmente determinada como $18.015,43 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como o montante de enzima que libera 1 nmol de *p*-nitrofenol por minuto.

3.6 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade lipolítica

O efeito do pH foi investigado testando-se a atividade enzimática da lipase em três pHs diferentes (7,0, 8,0 e 9,0). Os tampões utilizados para os teste de pH foram: PIPES (50 mM pH, 7,0), Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) e CHES (pH 9,0). As reações foram preparadas misturando-se o tampão apropriado com a solução estoque de 8 mM de pNPC₂ até a concentração final de 1 mM de substrato. As reações foram iniciadas adicionando-se 30 μL da enzima (25 μg) em 270 μL da solução do substrato. Para investigar o efeito da temperatura, essas reações foram testadas a 25°C, 37°C e 42°C em um leitor de microplacas (TECAN infinite Series M200) como descrito acima. A absortividade molar do substrato foi obtida experimentalmente para cada pH: pH 7,0 ($9.554,33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), pH 8,0 ($18.015,43 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e pH 9,0 ($18.669,31 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.7 Especificidade por substrato

A especificidade pelo substrato da lipase de *S. xylosus* foi avaliada usando-se diversos *p*-nitrofenil ésteres (pNPC₂, pNPC₄, pNPC₁₀, pNPC₁₂, pNPC₁₄, pNPC₁₆, pNPC₁₈). Uma solução estoque (8mM) para cada *p*-nitrofenil éster foi preparada em *iso*-propanol. Os substratos foram emulsificados na concentração final de 1 mM em tampão CHES 50 mM, pH 9,0 contendo 1,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de goma arábica e 4,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TRITON X-100. A reação consistiu na mistura de 270 μL do substrato emulsificado em 30 μL da solução de proteína (19,7 μM). As reações foram feitas a 42°C em um leitor de microplacas (TECAN Infinite Series M200) como descrito acima.

3.8 Ensaio de termoestabilidade

A termoestabilidade da lipase recombinante de *S. xylosus* foi avaliada incubando-se a solução contendo a enzima em banho-maria a 95°C. Alíquotas foram coletadas após 10, 20 e 30 minutos de incubação e os testes de atividade foram executados a 42°C, pH 9,0 (CHES, 50 mM) de acordo com o item 3.5 usando-se o *p*-nitrofenil acetato como substrato.

3.9 Produção da *apo_enzima* e avaliação dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na atividade lipolítica

A enzima nativa foi dialisada contra tampão contendo 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 usando-se uma membrana de celulose para diálise modelo D92277 – 100FT (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, EUA) para obter-se uma lipase livre de íons em sua estrutura (*apo_enzima*). A atividade enzimática da *apo_enzima* foi determinada espectrofotometricamente em 42°C e pH 9,0 (CHES 50 mM) com o leitor de microplacas descrito acima, na presença e na ausência de 1 mM de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) ou 1 mM de cloreto de cálcio ($CaCl_2$). Os efeitos desses dois cofatores divalentes na resistência térmica da *apo_enzima* foram também investigados. A *apo_enzima* foi incubada a 95°C em banho-maria por 15 minutos e sua atividade enzimática foi determinada em 42°C pH 9,0 (CHES 50 mM) na presença de 1 mM de sulfato de zinco ou 1 mM de cloreto de cálcio de acordo com o item 3.5.

3.10 Espectroscopia de dicroísmo circular (DC)

Uma amostra da lipase pura (15 μM), confirmada por SDS-PAGE, foi dialisada em tampão de DC contendo 20 mM de NaH_2PO_4 e 20 mM de NaCl pH 7,4. As análises espectroscópicas foram executadas em um espectropolarímetro (JASCO J-815) equipado com uma unidade controladora de temperatura e um acessório de fluorescência. Todas as medidas foram feitas em uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico com os seguintes parâmetros: 50 nm/min para velocidade de escaneamento; 2 segundos para tempo de resposta; 2 nm para largura de banda do feixe de luz e coleta de dados a cada 0,1 nm). Cada espectro coletado representa a soma e a média de 5 escaneamentos na faixa de comprimento de onda de 195 nm à 280 nm.

3.10.1 Perfis de desnaturação térmica e química

A desnaturação térmica foi avaliada através de dados de dicroísmo circular. Espectros foram coletados a cada aumento gradativo (2,5°C) de temperatura. A desnaturação foi observada e calculada através da diminuição do sinal de DC em 222 nm. A desnaturação química foi obtida através da incubação de amostras da lipase em tampão de DC contendo concentrações seriadas de uréia (2, 4, 6 e 8 M). A desnaturação foi observada e calculada pela diminuição do sinal de DC em 222 nm. A concentração de proteína foi de 13,8 μM em todos os experimentos. Os cálculos de desnaturação foram executados com as equações de Woody (1995) e Choi e colaboradores (2005), respectivamente. O conteúdo relativo de α -hélice foi obtido assumindo-se a percentagem obtida no espectro da enzima nativa a 25°C como 100%.

3.10.2 Efeitos dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na estabilidade estrutural

Um amostra da *holo_enzima* (15 μ M) foi submetida a reação de remoção de íons em tampão contendo 10 mM de EDTA. Após a remoção de íons a *apo_enzima* foi dialisada novamente para a retirada do EDTA, para prevenir a interferência do quelante no sinal de DC. O efeito da presença e da ausência dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na estabilidade estrutural da *apo_enzima* foi avaliado por meio do acompanhamento do aumento do sinal de DC em 222 nm, e pelo escaneamento do sinal de DC nos comprimentos de onda que vão de 195 nm a 280 nm a 42°C.

3.10.3 Influência dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na termotolerância estrutural

Uma solução da *apo_enzima* (15 μ M) em tampão (NaH_2PO_4 50 mM pH 7,4) foi incubada em banho-maria a 95°C durante 10 minutos e a renaturação foi acompanhada por meio do aumento gradual do sinal de DC em 222 nm, assim como a conformação estrutural foi avaliada pelo escaneamento dos comprimentos de onda entre 195 nm e 280 nm, na presença e na ausência de 100 μ M de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) ou cloreto de cálcio ($CaCl_2$), respectivamente.

3.10.4 Efeito dos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} na desnaturação química da *apo_enzima*

Uma solução da *apo_enzima* (15 μ M pH 7,4) foi incubada em 4,5 M de uréia durante 10 minutos. Após a incubação a amostra foi avaliada por dicroísmo circular. Espectros foram coletados antes da incubação com uréia, após a incubação com uréia e após a incubação com uréia na presença e na ausência de 100 μ M de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) ou cloreto de cálcio ($CaCl_2$), respectivamente.

4 Resultados

4.1 Modelo tridimensional da lipase de AF 208229 de *S. xylosus*

A estrutura primária da lipase AF 208229 foi comparada com o banco de dados NCBI usando o algoritmo BLAST, no modo Blastp (ALTSCHUL et al., 2005). Foram encontradas diversas seqüências que compartilham identidade com a seqüência de aminoácidos da lipase AF208229. Porém, a seqüência de aminoácidos que codifica uma lipase utilizada para a construção do modelo tridimensional da enzima foi da bactéria *S. hyicus* (PDB 2HIH). Essa lipase é uma das únicas lipases bacterianas que possui sua estrutura tridimensional resolvida e que compartilha a maior identidade estrutural com a lipase AF208229 (57%) diferente das outras seqüências encontradas. Observa-se baseado na similaridade e na homologia de regiões conservadas que as lipases divergiram de um ancestral comum que possuía uma atividade hidrolítica sobre uma diversidade de substratos (OLLIS et al., 1992). Baseado nessa afirmação sabe-se que a tríade catalítica das lipases é composta pelos resíduos Ser-His-Asp, (figura 6) que está localizada na junção entre uma folha- β e um *loop*, sendo a serina o aminoácido nucleofílico responsável pelo ataque ao substrato (BRADY et al., 1990, OLLIS et al., 1992, HOLMQUIST, 2000).

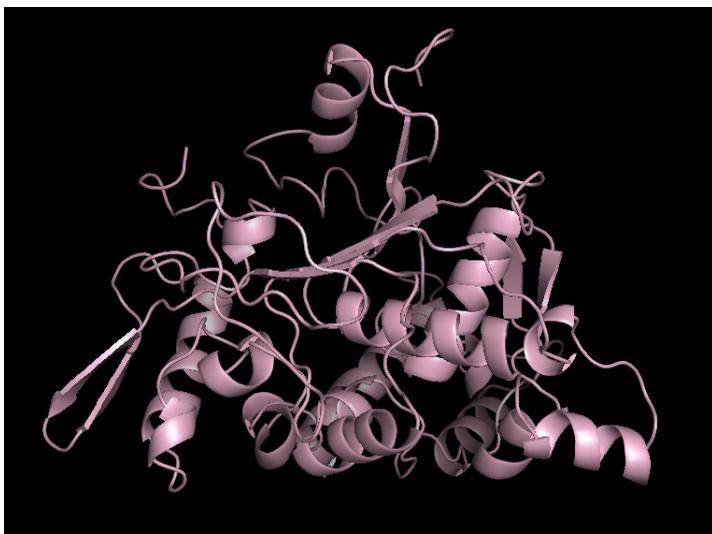


Figura 6: Modelo tridimensional da lipase de *S. xylosus*. Modelo construído com o software PyMOL (DELANO, 2002)

O modelo estrutural da lipase AF208229 foi construído baseado na estrutura tridimensional da lipase de *S. hyicus* (PDB 2HIH) (figura 6).



Figura 7: Aproximação da cavidade catalítica mostrando a tríade catalítica conservada entre as lipases. Modelo construído com o software PyMOL (DELANO, 2002)

4.2 Expressão e purificação da lipase recombinante AF208229 de *S. xylosus*

Células de *Escherichia coli* da cepa BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o plasmídeo *pET14b_lip*. Foram testados diferentes períodos de indução (5 e 18 h), bem como diferentes temperaturas (30 e 37°C). Foi observado que a melhor condição de indução foi 5 horas e a melhor temperatura 30°C. A lipase recombinante contendo uma cauda de poli-histidina fusionada na extremidade N-terminal foi purificada a partir do lisado bacteriano por meio da cromatografia líquida de afinidade por metal imobilizado em uma coluna Hitrap® conectada a um sistema AKTA (GE Healthcare). A proteína recombinante ligada à coluna de afinidade foi eluída com um gradiente de imidazol de 60 mM a 500 mM em um volume de 50 mL. A lipase recombinante AF208229 foi eluída na concentração de 150 mM de imidazol entre o volume 23 e 27 mL do gradiente. O imidazol foi removido por diálise, pois se sabe que este interfere na atividade enzimática quando é utilizado o *p*-nitrofenil-acetato como substrato. O gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelou uma banda de aproximadamente 42 kDa altamente pura. (figura 8). O rendimento médio de purificação da lipase AF208229 foi de 22 mg de proteína por litro de cultivo.

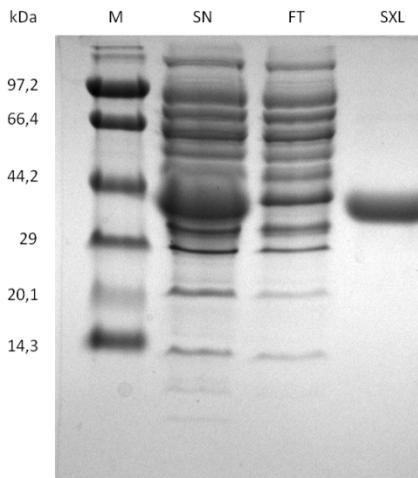


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e desnaturantes da lipase recombinante de *S. xylosus*; M: marcador de peso molecular; SN: extrato protéico total; FT: proteínas que não se ligaram a coluna de afinidade; SXL: lipase recombinante AF208229 de *S. xylosus* mostrando uma banda de aproximadamente 42 kDa.

4.3 Determinação da massa molecular da lipase com cauda de histidina

No gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da lipase com cauda de histidina foi observado uma banda única de aproximadamente 42 kDa. A mobilidade eletroforética dessa lipase foi consistente com sua massa molecular calculada teoricamente (42,9 kDa) para a proteína recombinante. De acordo com os perfis de eluição da cromatografia de exclusão molecular (SEC) com marcadores de massa moleculares conhecidos observou-se que a lipase recombinante de *S. xylosus*, eluída em 86,16mL (figura 9) entre o volume de eluição da anidrase carbônica (29 kDa) e da BSA (66 kDa), é um monômero de aproximadamente 42 kDa.

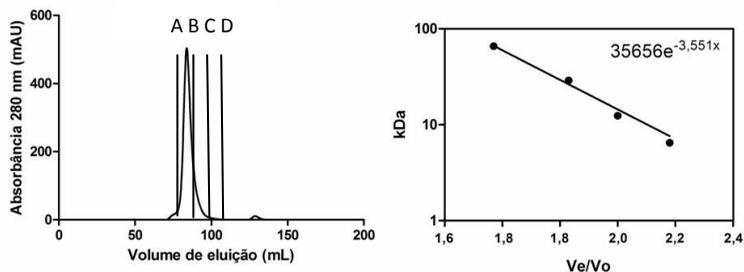


Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular da lipase recombinante de *S. xylosus* em uma coluna Superdex 200 prep grade (GE Healthcare); (Painel A): Linhas verticais (A-D) representam os marcadores de peso molecular usados para a calibração da coluna. (A) BSA (66 kDa, 80,21 mL); (B) anidrase carbônica (29 kDa, 92,21 mL); (C) citocromo C (12,4 kDa, 99,68 mL) e (D) aptotina (6,5 kDa, 107, 9 mL). (Painel B); Curva de calibração da coluna Superdex 200 16/60 prep grade

4.4 Confirmação da identidade da lipase de *S. xylosus*

A identidade da lipase recombinante de *S. xylosus* foi confirmada de acordo com os dados de fragmentação trípica analisada por espectrometria massa (Anexo 1).

4.5 Atividade lipolítica

A atividade da lipase recombinante foi monitorada espectrofotometricamente por meio da produção do *p*-nitrofenol resultante da hidrólise do *p*-nitrofenol-acetato (pNPC₂) em 410 nm. A enzima pura apresentou uma atividade específica de 6,6 U.mg⁻¹ a 42°C, pH 9,0 (figura 10) para o pNPC₂ e 3,2 U.mg⁻¹ para pNPC₄. Um valor consideravelmente baixo quando comparado com as lipases SWL1 de *S. warneri* (34 U.mg⁻¹) (VAN KAMPEN et al., 2001), SHL de *S. hyicus* (132 U.mg⁻¹) e SAL de *S. aureus* (252 U.mg⁻¹) usando o pNPC₄ como substrato (VAN KAMPEN et al., 1999).

4.5.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade lipolítica

Três valores de pH foram testados (7,0, 8,0 e 9,0) e três temperaturas (25°C, 37°C e 42°C) usando pNPC₂ como substrato com o objetivo de determinar o pH e a temperatura ideal para a atividade lipolítica da lipase (AF208229). A enzima demonstrou ter atividade enzimática na faixa de pH de 7,0 a 9,0, porém a melhor atividade encontrada foi em pH 9,0 (6,6 U.mg⁻¹), bem como a melhor temperatura 42°C. Após o tratamento térmico em 95°C durante 10 minutos a enzima foi capaz de manter 77% de sua atividade inicial. (figura 11).

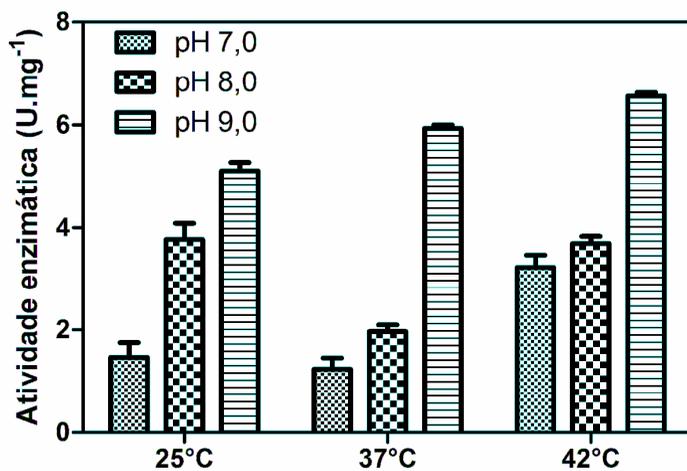


Figura 10: Atividade enzimática da lipase de *S. xylosus* em diferentes pHs e temperaturas. Todos os grupos apresentam o significância entre si, $p < 0,001$, exceto nos pH 7,0 e 8,0 em 42°C (ANOVA, Teste Tukey)

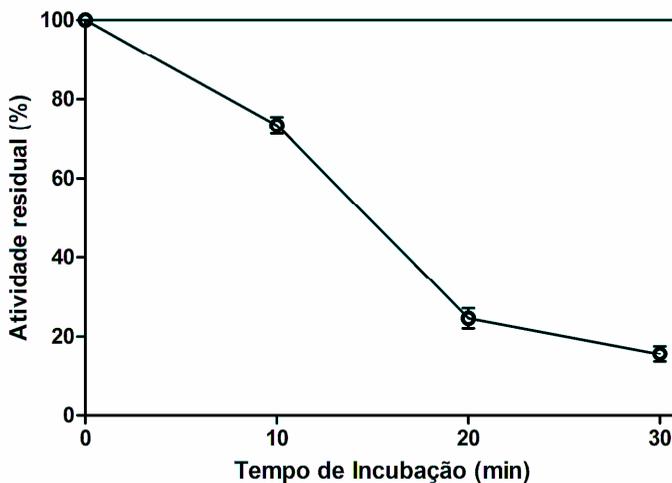


Figura 11: Termoestabilidade da lipase recombinante de *S. xylosus*. A enzima foi incubada em banho-maria a 95°C durante 10, 20 e 30 minutos. Após o tratamento térmico, a atividade enzimática foi medida em 42°C pH 9,0 usando o *p*-nitrofenil-acetato como substrato. A atividade enzimática foi expressa em % representando a atividade máxima de 6,6 U.mg⁻¹ como 100%

4.5.2 Especificidade de substratos

A especificidade pelo substrato da lipase AF208229 de *S. xylosus* foi avaliada usando diversos *p*-nitrofenil ésteres como substrato para os testes enzimáticos nas condições ótimas (pH 9,0, 42°C) (*p*-nitrofenil-acetato, *p*-nitrofenil-butirato, *p*-nitrofenil-decanoato, *p*-nitrofenil-laurato, *p*-nitrofenil-miristato, *p*-nitrofenil-palmitato, e *p*-nitrofenil-estearato) (figura 12). A lipase AF208229 de *S. xylosus* demonstrou maior atividade em substratos de cadeia curta, pois usando-se o pNPC₂ como substrato a enzima apresentou maior atividade (6,6 U.mg⁻¹) enquanto que por substratos de cadeia longa, como o pNPC₁₈ sua atividade foi consideravelmente baixa (0,20 U.mg⁻¹).

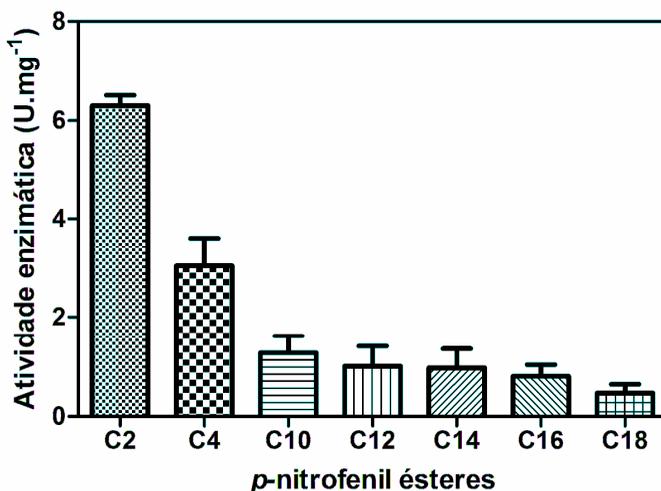


Figura 12: Especificidade por substratos apresentada pela lipase de *S. xylosus*. Hidrólise medida para o *p*-nitrofenil acetato (C2), *p*-nitrofenil butirato (C4), *p*-nitrofenil decanoato (C10), *p*-nitrofenil laurato (C12), *p*-nitrophenyl miristato (C14), *p*-nitrofenil palmitato (C16) e *p*-nitrofenil estearate (C18). O *p*-nitrofenil acetato apresenta diferenças significativas ($p < 0,001$, ANOVA, Teste Tukey) em comparação a todos os outros ésteres, assim como o butirato, os ésteres de 10 à 18 carbonos não apresentaram diferenças significativas entre si

4.5.3 Efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na atividade lipolítica e na termotolerância da *apo_enzima*

A lipase recombinante nativa chamada de *holo_enzima* foi dialisada em tampão contendo um agente quelante (EDTA) o qual possui valores de K_{eq} de 16,5 para o Zn^{2+} e 10,7 para o Ca^{2+} (SKOOG, 2006) com o intuito de retirar os possíveis íons complexados em sua estrutura global produzindo a *apo_enzima*. A finalidade do teste foi observar se os cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} , íons mais encontrados em lipases do gênero *Staphylococcus*, estão associados ou não com a atividade lipolítica dessa enzima. Os testes enzimáticos foram feitos nas condições ótimas de atividade (pH 9,0, 42°C). Observou-se que na ausência de íons metálicos divalentes a atividade lipolítica da lipase AF208229 foi reduzida para 66,67% quando comparada com a *holo_enzima*. Quando a *apo_enzima* foi submetida ao tratamento térmico (95°C, 15 minutos) sua atividade foi quase completamente perdida (3,03%), enquanto que nas mesmas condições a *holo_enzima* ainda apresentava 42,41% de atividade residual. Este comportamento é um forte indício da necessidade de um cofator para a manutenção da atividade e resistência térmica da *apo_enzima*. Quando a *apo_enzima* foi incubada com 100 μ M de sulfato de zinco, sua atividade foi aumentada em 10,6 % quando comparada com a mesma enzima na ausência do Zn^{2+} em solução. A adição de íon Ca^{2+} não afetou a atividade lipolítica da *apo_enzima*. Depois do tratamento térmico a *apo_enzima* na presença do Zn^{2+} em solução ainda reteve 27,27% de sua atividade, diferente do que aconteceu com a mesma enzima na ausência do metal, onde sua atividade foi quase totalmente perdida (3,03%)

Tabela 1: Atividade relativa da lipase recombinante de *S. xylosus* em diferentes condições (%).

Proteína	Nativa	Renaturada
<i>holo_enzima</i>	100	42,41 ± 2,1
<i>apo_enzima</i>	66,67 ± 1,7	3,03 ± 0,9
<i>apo_enzima</i> + Zn ²⁺	77,27 ± 1,6	27,27 ± 2,3
<i>apo_enzima</i> + Ca ²⁺	28,78 ± 2,7	13,63 ± 3,3

A atividade de 6,6 U.mg⁻¹ demonstrada pela *holo_enzima* nativa em 42°C pH 9,0 foi assumida como 100%. A atividade das proteínas renaturadas foi obtida após o tratamento térmico em 95°C por 15 minutos na presença e na ausência de 1 mM de Sulfato de Zinco (Zn²⁺) e 1 mM de Cloreto de Cálcio (Ca²⁺)

4.6 Elementos estruturais secundários e perfil de dicroísmo circular (DC) da lipase de *S. xylosus*

A lipase de *S. xylosus* apresentou um perfil de dicroísmo circular típico de proteínas ricas em α -hélices com picos de transição eletrônica nos comprimentos de onda 208 nm e 222 nm (KELLY; JESS; PRICE, 2005). A deconvolução usando o algoritmo CDSSTR (WHITMORE; WALLACE, 2004) do espectro da lipase AF208229 coletado em 25°C sugere um conteúdo total de α -hélices de 44%, o que é característico de enzimas que pertencem ao grupo de proteínas com motivo estrutural α - β - α (HOTELIER et al., 2004) (figura 13). A lipase AF208229 ainda exibe pequenas mudanças no perfil de DC durante a transição de temperatura de 25°C para 42°C indicando perda de α -hélices (figura 14), tais mudanças podem indicar uma estabilização estrutural na aquisição da conformação mais ativa. As lipases mostram movimentos flexíveis em suas estruturas helicoidais durante a aquisição de suas conformações estáveis (TIESINGA et al., 2007, CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009).

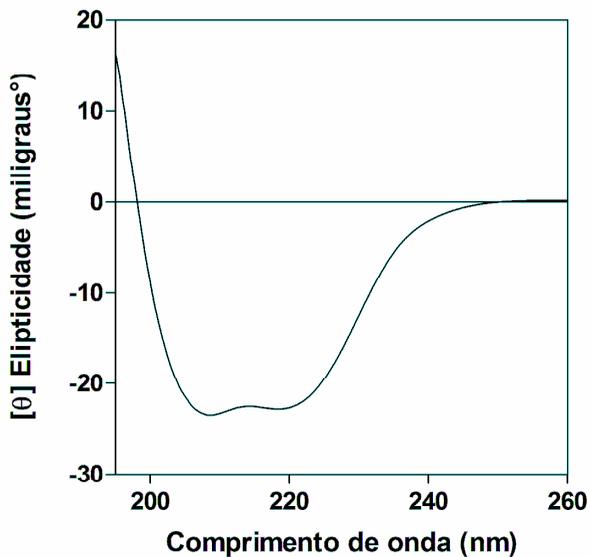


Figura 13: Perfil de dicroísmo circular da lipase de *S. xylosus* em 25°C; exibindo dois picos de transição eletrônica a 208 nm e 222 nm. Perfil típico de proteínas que exibem grande quantidade de α -hélices (44%), e que pertencem a classe dos motivos estruturais α - β - α (HOTELIER et al, 2004)

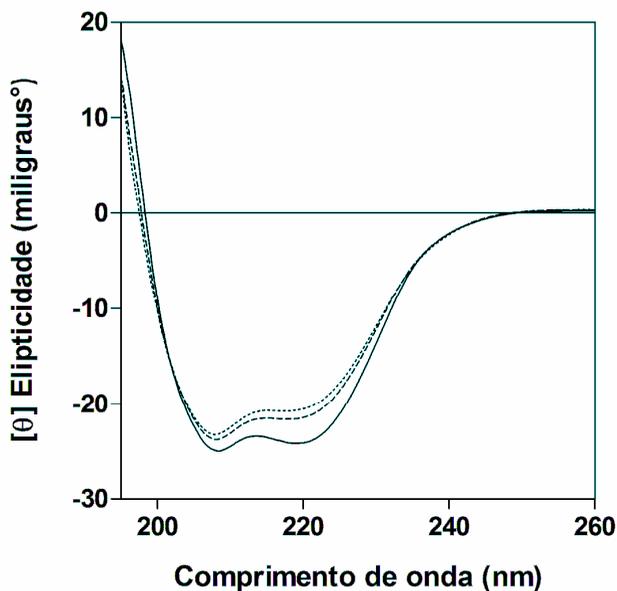


Figura 14: Perfil de dicroísmo circular da lipase de *S. xylosus* em diferentes temperaturas; 25°C (linha sólida), 37°C (linha tracejada), 42°C (linha pontilhada). Esses espectros indicam movimentos helicoidais sofridos pela lipase de *S. xylosus* durante a aquisição de sua conformação energeticamente estável frente ao aumento da entropia do sistema.

4.6.1 Desnaturação térmica e química da *holo_enzima*

A desnaturação térmica analisada pela diminuição do sinal de DC em 222 nm, revelou um T_m de 55,9°C (figura 15) para a *holo_enzima*, esse dado pôde ser correlacionado com o perfil de DC da lipase a 95° (figura 16) onde ambos demonstraram que a *holo_enzima* não é completamente desnaturada (52,33% do conteúdo de α -hélices permanece inalterado).

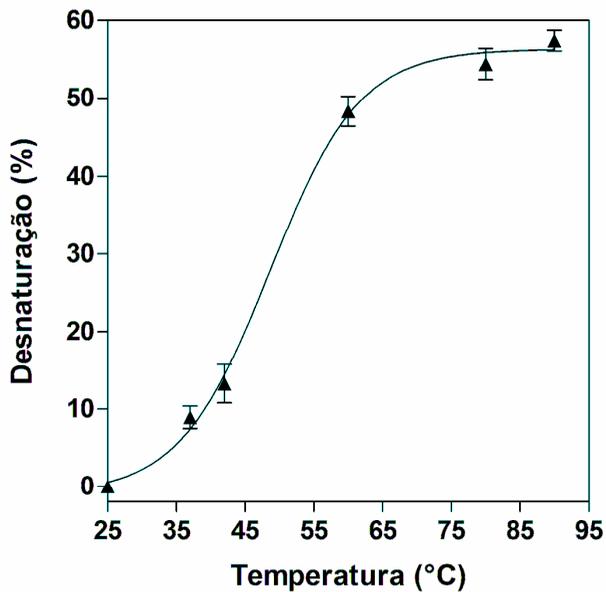


Figura 15: Curva sigmoideal de Boltzmann mostrando o ponto médio de desnaturação (T_m) da *holo*-enzima em relação a temperatura.

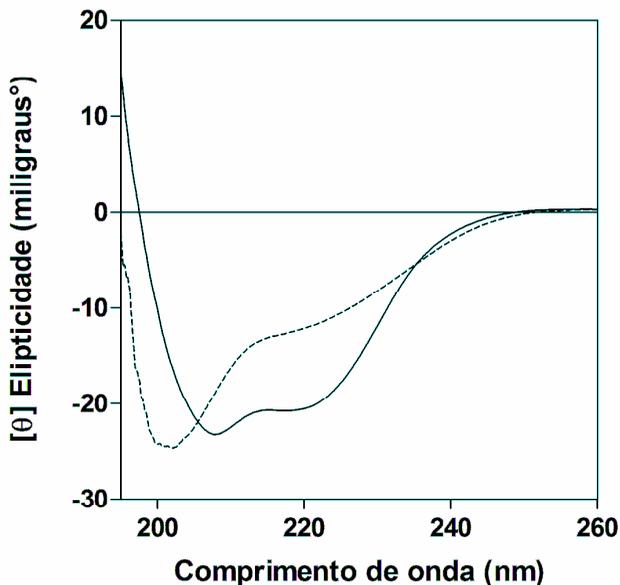


Figura 16: Perfil de dicroísmo circular da lipase de *S. xylosus*; 25°C (linha sólida), 95°C (linha tracejada).

Adicionalmente a *holo_enzima* é capaz de se renaturar, recuperando 86,36% de seu conteúdo de α -hélices (figura 16) após 10 minutos em 95°C. Os dados de desnaturação química revelaram que apenas quando a enzima foi incubada com uma concentração de uréia acima de 4,5 M a mesma adquiriu uma conformação desordenada e a partir dessa concentração houve uma drástica redução no conteúdo total de α -hélices (figura 18).

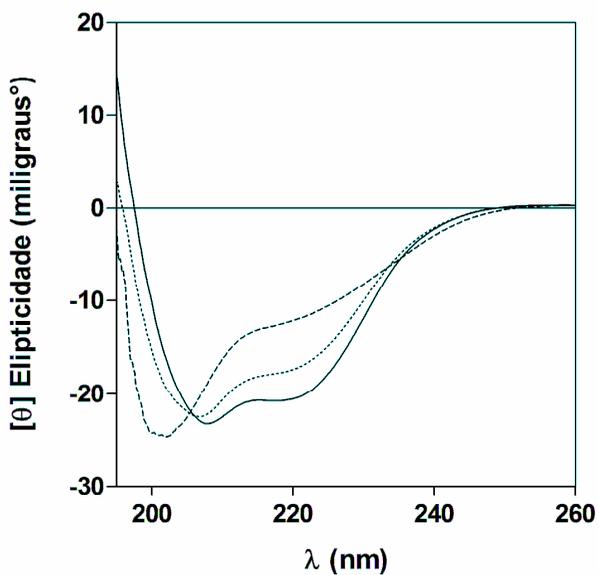


Figura 17: Perfil de dicroísmo circular do re-enovelamento da lipase de *S. xylosus*; 42°C nativa (linha sólida), 95°C desnaturada (linha tracejada), 42°C re-enovelada (linha pontilhada). Dados indicam a capacidade da lipase de *S. xylosus* em retornar a sua conformação nativa.

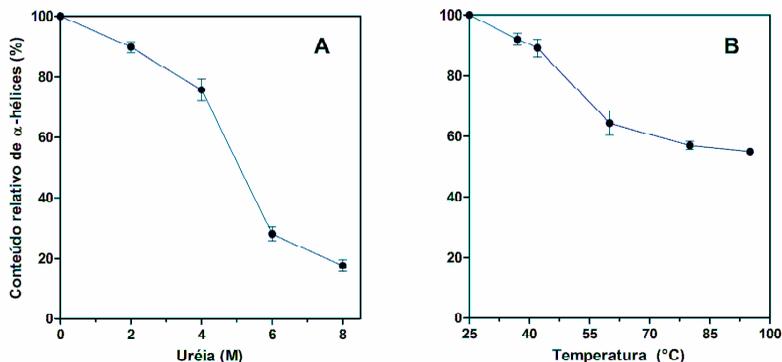


Figura 18: Comparação entre a desnaturação química e térmica sofrida pela lipase de *S. xylosus*. Desnaturação química com uréia em várias concentrações. *holo_enzima* incubada por 10 minutos em cada concentração (painel A), desnaturação térmica em várias temperaturas. *holo_enzima* incubada por 10 minutos em cada temperatura. (painel B). Dados indicam que apenas a desnaturação química provoca maiores perdas no conteúdo de α -hélices da lipase. Cálculos feitos segundo equação descrita por Woody (1995).

4.6.2 Efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na estabilidade estrutural

Uma série de tratamentos de remoção de íons por diálise usando EDTA foram executados com o intuito de averiguar o efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na termotolerância estrutural da lipase de *S. xylosus*. A *apo_enzima* adquire uma conformação desordenada, demonstrada pelo deslocamento hipsocrômico do pico negativo de 208 nm, (KELLY; JESS; PRICE, 2005) em 42°C, enquanto a *holo_enzima* nas mesmas condições apenas adquire a mesma conformação em 60°C (figura 20). Após a titulação com cálcio observou-se que o perfil de DC da *apo_enzima* permaneceu inalterado, enquanto na titulação com zinco detectou-se um pequeno aumento na quantidade de α -hélices (figura 19).

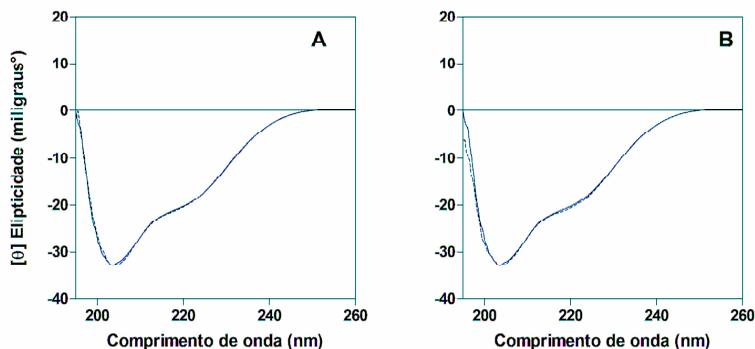


Figura 19: Perfil de dicroísmo circular da *apo*_lipase AF208229 de *S. xylosus* (15 μ M) em diferentes condições a 42°C; *apo*_enzima na presença de Ca²⁺ (painel A), *apo*_enzima na presença de Zn²⁺ (painel B). As linhas sólidas representam a *apo*_enzima sem a presença dos íons em 42°C em ambos os espectros. E as linhas tracejadas mostram a *apo*_enzima na presença dos respectivos íons indicados pelos painéis.

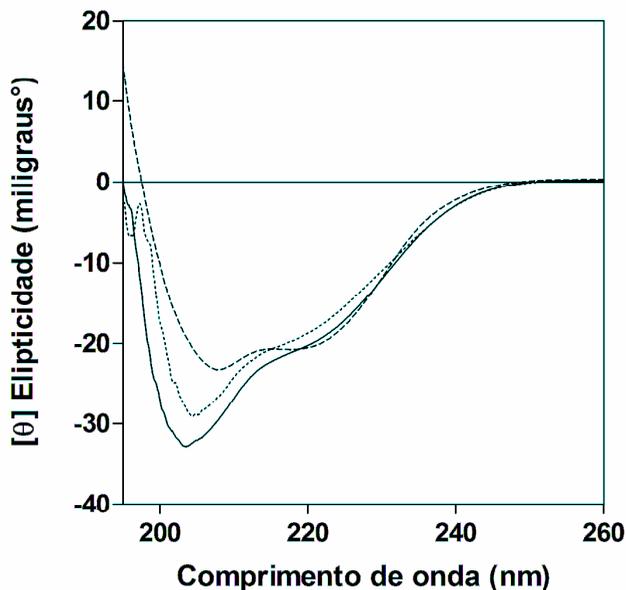


Figura 20: Perfil de dicroísmo circular da lipase de *S.xylosus* submetida ao tratamento de remoção de íons; *holo_enzima* em 60°C (pontilhada), *apo_enzima* em 42°C (linha sólida), *holo_enzima* em 42°C (linha tracejada).

4.6.3 Influência dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na aquisição da conformação termotolerante

A *apo_enzima* foi submetida ao tratamento térmico em banho-maria a 95°C e o perfil de DC do re-enovelamento foi observado na presença e na ausência dos cofatores metálicos com o intuito de averiguar se esses íons estão envolvidos na termotolerância da lipase de *S. xylosus*. Observa-se que a *apo_enzima* possui a mesma capacidade de se re-enovelar demonstrada pela *holo_enzima*, porém não reteve atividade após o tratamento térmico (tabela 1). Na presença do Ca^{2+} a *apo_enzima* recuperou a mesma quantidade de α -hélices vista para a

mesma enzima nas mesmas condições sem a presença do metal. Entretanto, na presença do Zn^{2+} a *apo_enzima* foi capaz de recuperar 11% a mais de α -hélices do que *apo_enzima* (figura 21), aproximando-se muito do perfil de renaturação apresentado pela *holo_enzima*. Além disso, a *apo_enzima* na presença do Zn^{2+} conseguiu adquirir uma conformação mais estável, detectada pelo aumento do sinal de DC em 222 nm (figura 22).

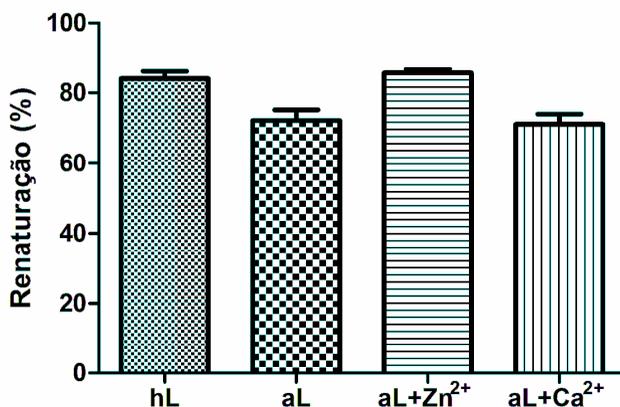


Figura 21: Recuperação do conteúdo de α -hélices apresentado pela lipase de *S. xylosus* em diferentes condições; *holo_enzima* (hL), *apo_enzima* (aL), *apo_enzima* na presença de 100 μ M de sulfato de zinco (aL+Zn²⁺), *apo_enzima* na presença de 100 μ M de cloreto de cálcio (aL+Ca²⁺). Os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA seguido do Teste Turkey com p valor de

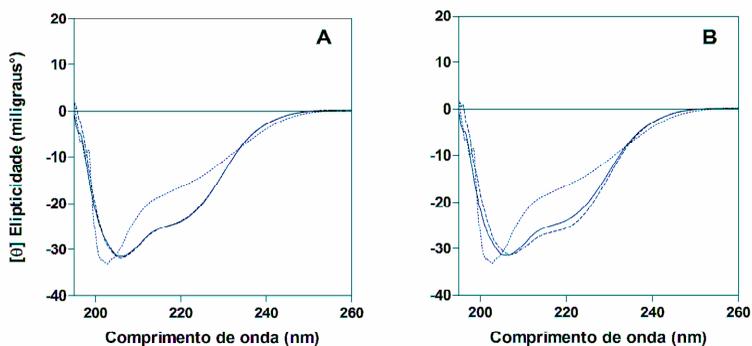


Figura 22: Perfil de dicroísmo circular da renaturação da apo_lipase de *S. xylosus*; (Painel A) apo_enzima renaturada a 25°C (linha sólida), apo_enzima renaturada na presença de 100 μ M de cloreto de cálcio (linha tracejada), apo_enzima termicamente desnaturada 95°C (linha pontilhada). (Painel B) apo_enzima renaturada a 25°C (linha sólida), apo_enzima renaturada na presença de 100 μ M de sulfato de zinco (linha tracejada), apo_enzima desnaturada termicamente 95°C (linha pontilhada).

4.6.4 Efeito dos cofatores metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} na desnaturação química da *apo_enzima*

A *apo_enzima* foi incubada em tampão contendo 4,5 M de uréia durante 10 minutos e o efeito dos cofatores metálicos na estabilização estrutural frente ao desnaturante químico foi avaliado através do escaneamento do sinal de DC a partir de 195 nm até 280 nm. As quantificações foram obtidas por meio da observação da perda de sinal de DC em 222 nm. O espectro coletado após a incubação com uréia revelou uma desnaturação aguda e a enzima exibiu um perfil DC desordenado. Quando incubada na presença de 100 μ M de cloreto de cálcio o perfil de DC não sofreu alterações, apresentando a mesma conformação desordenada mostrada pela *apo_enzima* depois do tratamento com o agente desnaturante. Entretanto, quando incubada com 100 μ M de sulfato de zinco o perfil de DC foi completamente diferente, observou-se que *apo_enzima* na presença do Zn^{2+} em solução manteve seu perfil de DC típico de α -hélices não sofrendo uma interconversão para uma forma desordenada como aconteceu com a mesma *apo_enzima* na presença do Ca^{2+} em solução (figura 23). O que se pôde perceber é que o Zn^{2+} em solução promoveu uma proteção dos elementos estruturais secundários, fato ainda corroborado pelos cálculos de quantificação onde na presença desse íon o conteúdo total de α -hélices foi levemente diminuído, enquanto na presença do Ca^{2+} em solução houve uma redução severa (figura 24).

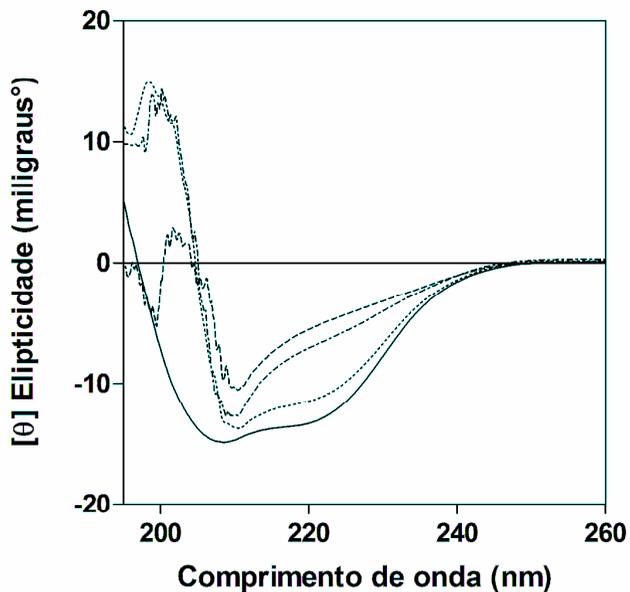


Figura 23: Perfil dicróismo circular da desnaturação química da apo_lipase de *S. xylosus*; apo_enzima antes do tratamento com uréia (linha sólida), apo_enzima após o tratamento com uréia (linha tracejada), apo_enzimadepois do tratamento com uréia na presença do Ca²⁺ em solução (linha tracejada e pontilhada), apo_enzima depois do tratamento com uréia na presença do Zn²⁺ em solução.

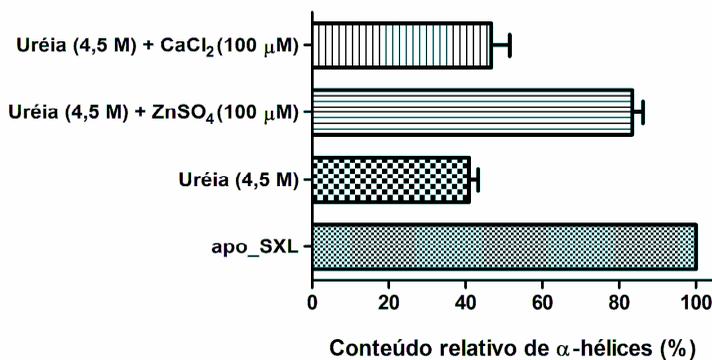


Figura 24: Quantificação do conteúdo de α -hélices após o tratamento químico na presença e na ausência dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} . Os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA seguido do Teste Tukey com p valor < 0,001.

5 Discussão

Os resultados desse trabalho descrevem a primeira caracterização bioquímica da lipase AF208229 e a primeira caracterização estrutural de lipases de *S. xylosus*. Trabalhos envolvendo a lipase AF701336 também de *S. xylosus* já foram anteriormente publicados (MOSBAH et al., 2005, 2006). As duas enzimas apesar de compartilharem apenas 53% de homologia, apresentam preferências de pH e temperatura semelhantes. A lipase AF701336 tem sua melhor atividade enzimática em pH 8,5 a 45°C, e a lipase AF208229 em pH 9,0 a 42°C. Porém a lipase AF208229 apresentou alta tolerância quando exposta a 95°C, retendo 77% de sua atividade residual após 10 minutos de tratamento térmico (BROD et al., 2010), enquanto a lipase AF701336 apenas manteve 50% de sua atividade após 15 minutos em um tratamento térmico de 60°C (MOSBAH et al., 2005). Mosbah e colaboradores em um trabalho posterior (2007) demonstraram que a mutação Gly311Leu foi capaz de alterar a termoestabilidade da enzima AF701336 levando-a a conservar sua atividade após uma hora de tratamento térmico em 50°C. Ou seja, uma única mutação foi capaz de mudar o perfil de resistência térmica dessa enzima. Tyndall e colaboradores (2002) descreveram que enzimas termoestáveis adquirem seus melhores estados de conformação em altas temperaturas, uma vez que esse grupo de proteínas apresenta uma alta flexibilidade em seus elementos estruturais secundários. O aumento na atividade em 42°C da enzima AF208229 pode ser relacionado com esse comportamento, baseado no fato que a essa enzima exibe flexibilidade estrutural (figura 14). Além disso, também possui a habilidade de se re-novelar mesmo após sofrer um choque térmico agudo de 95°C durante 10 minutos. Resultados similares foram descritos por Chandrayan, Dhaunta e Guptsarma (2008) e Bielen e colaboradores (2008) com a lisofosfolipase de *Pirococcus furiosus* e uma aril-esterase de *Streptomyces coelicolor*, respectivamente. A lisofosfolipase de *P. furiosus* apresentou uma desnaturação mais aguda apenas acima de 85°C, porém não foi capaz de se renaturar e a aril-esterase de *S. coelicolor* demonstrou uma desnaturação completa já em 66°C. Ambas as enzimas exibem atividade lipolítica.

Os resultados apresentados nesse trabalho revelaram que a lipase AF208229 de *S. xyloso* não é totalmente desnaturada quando submetida ao tratamento térmico a 95°C e ainda apresenta uma alta habilidade de retornar a seu estado nativo a 42°C. Os perfis de DC da renaturação da lipase AF208229 em conjunto com os dados de atividade enzimática revelaram que essa enzima não apenas consegue se renovar como conservar aproximadamente 43% de sua atividade inicial após 15 minutos de tratamento térmico a 95°C (tabela 1) (figura 17). Esse comportamento pode ser relacionado com a flexibilidade estrutural da lipase AF208229, pois provavelmente essa enzima, como muitas outras lipases, move uma estrutura de cobertura (lid) expondo uma série de resíduos não polares localizados ao redor do sítio ativo, o que facilita a estabilização do substrato e favorece o ataque pelo resíduo nucleofílico ao substrato (TYNDALL et al., 2002, CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). Ainda mais, esses resultados podem também ser correlacionados com a alta quantidade de resíduos de arginina presentes na estrutura global da lipase AF208229. Sabe-se que esses resíduos estão envolvidos na formação e na estabilização de pontes salinas e por sua vez contribuem para a estabilização estrutural em temperaturas elevadas (GATTI-LAFRANCONI et al., 2008). Enzimas com estabilidade termodinâmica e resistência térmica como a lipase AF208229 de *S. xyloso* têm atraído atenção para sua aplicação em processos industriais, já que essas características fazem dessas lipases excelentes biocatalisadores, podendo ser usadas em processos como produção de biocombustíveis, alimentos e detergentes (RANGANATHAN, et al., 2008).

Características estruturais também definem a habilidade dessa enzima na catálise de seus substratos. Carrasco-López e colaboradores (2009) descreveram que essa habilidade é devida a flexibilidade estrutural demonstrada por essas enzimas, que por sua vez, pode ser adquirida pela complexação de cofatores metálicos como Zn^{2+} e Ca^{2+} presentes na estrutura global dessas proteínas. Esses íons contribuem para a estabilização dos elementos estruturais secundários durante a aquisição da estrutura terciária, através de interações específicas como ligações hidrogênio que possibilitam a formação de rearranjos em prol da melhor conformação ativa em temperaturas elevadas. Muitas lipases do gênero *Staphylococcus* são coordenadas por íons como o Zn^{2+} (CHOI et al., 2005) e Ca^{2+} (AMADA et al., 2001, TYNDALL et al., 2002, TIESINGA et al., 2007), ou ainda possuem sítios binucleares de ligação

a metais (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). Esses íons estão ligados a estabilização estrutural e manutenção da atividade em relação a aquisição da conformação termodinamicamente estável (CHOI et al., 2005). Os resultados apresentados nesse trabalho revelaram que a lipase nativa AF 208229 necessita de íons para sua estabilização, pois na presença do agente quelante seu perfil de DC e sua atividade foram afetados e que apenas o Zn^{2+} em solução foi capaz de interagir com estruturas α -helicoidais dessa enzima. Tanto os dados de desnaturação térmica (figura 18) quanto os dados de desnaturação química (figura 23) indicaram que o Zn^{2+} agiu favorecendo o aumento de α -hélices. Levando em consideração esse fator, é possível experimentalmente afirmar que a lipase de *S. xylosus* possui motivos estruturais de ligação ao Zn^{2+} que facilitam o renovelamento e agem promovendo interações interespecíficas entre os resíduos próximos ao sítio de ligação mantendo a estabilidade funcional e estrutural da proteína frente a temperaturas elevadas. Em concordância com esses resultados, os dados enzimáticos descritos neste trabalho revelaram que o íon Zn^{2+} provavelmente atua na estabilização de estruturas helicoidais envolvidas no mecanismo de ação enzimática (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009), já que na ausência do metal, apesar de a proteína conseguir se re-renovelar, ela não foi capaz de se manter ativa (tabela 1). Mosbah e colaboradores (2005) obtiveram resultados diferentes com a lipase AF701336, uma vez que, essa enzima não apresentou a necessidade do Ca^{2+} para manutenção de sua atividade.

Esse trabalho corrobora a hipótese que a lipase AF208229 de *S. xylosus* é uma metaloenzima que utiliza o Zn^{2+} como cofator metálico de coordenação para sua termoestabilidade, uma vez que o íon Ca^{2+} não foi capaz de proteger as estruturas helicoidais contra a desnaturação química e ainda não apresentou interferência da atividade enzimática, (tabela 1) (figura 23.). O íon Ca^{2+} no contexto desse trabalho pode ser considerado o cofator não nativo da lipase. Cofatores não nativos podem desestabilizar totalmente a estrutura global de uma proteína levando ao seu mau funcionamento e agregação. Como por exemplo, o a microglobulina- $\beta 2$ humana é solúvel em condições ambiente, porém na presença do Cu^{2+} , um metal não nativo presente em membranas de hemodiálise forma fibrilas amilóides, causando falha renal (FLOEGE; EHLERDING, 1996). A ligação do Cu^{2+} a microglobulina induz a transição para formas desordenadas. Especificamente, a complexação do Cu^{2+} adiciona duas cargas a mais um resíduo de histidina específico localizado no motivo estrutural de ligação, esse excesso de carga força o

agrupamento de moléculas de H₂O no interior do sítio de ligação que por sua vez competem com os resíduos presentes no bolsão por melhores contatos de ligação ao íon. Essas interações inespecíficas desestabilizam toda a rede de ligações hidrogênio ao redor do motivo. Por fim uma série de resíduos hidrofóbicos é exposto ao solvente, em resposta a isso a proteína sofre mudanças estruturais específicas com o intuito de proteger esses resíduos do solvente, porém a presença do metal não nativo impossibilita o sucesso do re-enovelamento acelerando a formação de intermediários não estáveis inespecíficos, que por fim induzem a agregação (DUDEV; LIM, 2008). Baseado nesse fato, o Zn²⁺ pode ser considerado o metal nativo, justamente pela influência positiva descrita na atividade e principalmente na estabilização estrutural observada na lipase AF208229 de *S. xylosus*. A escolha do Zn²⁺ pode ser devido a vários fatores, que incluem desde a biodisponibilidade do metal no meio e principalmente pelas características químicas do elemento como: raio iônico, eletroafinidade, entre outros. Além do mais, é possível deduzir que o motivo de ligação ao Zn²⁺ está localizado em uma mistura de elementos secundários α -helicoidais próximos do sítio ativo da enzima devido a sua ação no aumento e na produção de estruturas helicoidais (figura 22 e 23). O íon Zn²⁺ pode ainda ser considerado um forte receptor de elétrons e pode facilitar as interações interespecíficas entre os resíduos que formam o sítio ativo favorecendo a estabilização estrutural e a aquisição da conformação termodinamicamente estável (DUDEV; LIM, 2008).

7 Considerações Finais

- A lipase AF208229 possui o domínio canônico G-X-S-X-G presente na maioria das lipases
- Possui atividade em temperatura moderadamente alta e em pH alcalino;
- Possui especificidade por substratos de cadeia curta;
- É capaz de manter aproximadamente 77% de sua atividade inicial após 10 minutos de tratamento térmico em 95°C;
- A *apo_enzima* sofreu uma redução (66,67%) em sua atividade e após 15 minutos de tratamento térmico a 95°C foi quase totalmente inativada (3,03%);
- Na presença do Zn^{2+} a *apo_enzima* recuperou 10,6% a mais de atividade (77,27%) e após 15 minutos de tratamento térmico a 95°C ainda manteve aproximadamente 27,3% de atividade;
- A *apo_enzima* tem a habilidade de se re-novelar parcialmente, porém apenas na presença do Zn^{2+} exibe o mesmo perfil de re-novelamento visto na *holo_enzima* e é capaz de manter atividade
- O Zn^{2+} atuou como agente protetor contra a uréia, impedindo a desnaturação de α -hélices;
- A lipase AF208229 de *Staphylococcus xylosus* pode ser considerada uma metaloenzima que utiliza Zn^{2+} como cofator metálico para sua estabilização estrutural/funcional após choque térmico.

6 Referências

ALTSCHUL, S.F.; WOOTTON, J.C.; GERTZ, E.M.; AGARWALA, R.A.; SCHAFFER, M. A.A.; YU, Y.K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5101–5109, 2005.

AMADA, K.; KWON, H.J.; HARUKI, M.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Ca²⁺-induced folding of a family I.3 lipase with repetitive Ca²⁺ binding motifs at the C-terminus. **FEBS Letters**, vol. 509, p. 17-21, 2001.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 2, p. I33–53, 2000.

BIELEN, A.; ETKOVIC´, H.C.; LONG, P.F.; SCHWAB, H. M.; VUJAKLIJA, A.D. The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. **Biochimie**. vol. 91, p. 390-400, 2008.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767–770, 1990.

BROD, F.C.A.; PELISSER, M.R.; BERTOLDO, J.B.; VERNAL, J.; BLOCH JR, C.; TERENCEZ, H; ARISI, A.C.M. Heterologous expression and purification of a heat tolerant *Staphylococcus xylosus* lipase. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 110-119, 2010.

BURTON, S.G.; COWAN, D.A.; WOODDLEY, J.M. The search for the ideal biocatalyst. **Nature**, vol. 20, p. 37-46, 2002.

CARRASCO-LÓPEZ, C.; GODOY, C.; DE LAS RIVAS, B.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; HERMOSO, A. Activation of Bacterial Thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 4365–4372, 2009.

CARRIERE, F. THIRSTRUP, K.; HJORTH, S.; BOEL, E. Cloning of the classical guinea pig pancreatic lipase and comparison with the lipase related protein. **FEBS Letters**, v. 338, p. 63–68, 1994.

CHAKRABORTY, K.; RAJ, R.P. An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, v. 109, p. 727-736, 2008.

CHANDRAYAN, S.K.; DHAUNTA, N.; GUPTASARMA, P. Expression, purification, refolding and characterization of a putative lysophospholipase from *Pyrococcus furiosus*: Retention of structure and lipase/esterase activity in the presence of water-miscible organic solvents at high temperatures. **Protein Expression and Purification**, v. 59, p. 327–333, 2008.

CHOI, W.C.; KIMB, M.H.; ROC, H.S.; RYUD, S.R.; OHB, T.K.; LEE, J.K.. Zinc in lipase 11 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability. **FEBS Letters**, v. 579, p. 3461–3466, 2005.

DEREWENDA, Z.S. A twist in the tale of lipolytic enzymes. **Nature**, v. 2 n. 5, p. 1-3, 1995.

DUDEV, T.; LIM, C. Metal Binding Affinity and Selectivity in Metalloproteins: Insights from computational studies. **Annual Reviews in Biophysics**, v. 37, p. 97-116, 2008.

ERICSON, D.J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANSDTROM, A.G.; BACKWALL, J.E.; MOWBRAY, S.L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119, 2008.

FIORENTINI, A.M.; SAWITZKI, M.C.; BERTOL, T.M.; BROD, F.C.A, PELISSER, M.G.; ARISI, A.C.M.; SANT'ANNA, E.S. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 737-746, 2009.

FLOEGE, J.; EHLERDING, G. β 2-microglobulin-associated amyloidosis. **Nephron**, v. 72, p. 9-26, 1996.

GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

HALLING, P.J. Biocatalysis in low-water media: understanding the effects of reaction conditions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 74-80, 2000.

HASAN, F.; ALI, S.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HOLMQUIST, M. AlphaBeta-Hydrolase-fold enzymes structures, functions and mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, p. 209-235, 2000.

HOTELIER, T.; RENAULT, L.; COUSIN, X.; NEGRE, V.; MARCHOT, P.; CHATONNET, A. ESTHER, the database of the $\alpha\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins. **Nucleic. Acids. Research**, v. 32, p. D145-D147, 2004.

IACUMIN, L.; COMI, G.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. **Meat Science**, v. 74, p. 281-288, 2006.

INVERNIZZI, E.; PAPALEO, G.; GRANDORI, R.; DE GIOIA, L.; LOTTI, M. Relevance of metal ions for lipase stability: structural rearrangements induced in the *Burkholderia glumae* lipase by calcium depletion. **Journal of Structural Biology**, no prelo.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 390-397, 2002

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457-470, 2008.

KADEMI, A.; DANIELLE, L.; AJAIN, H. Lipases, in: PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. (Eds). **Enzyme Technology**. India: Asiatech Publishers. p. 297–318, 2005.

KAZLAUSKAS, R.J. Molecular modelling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations and opportunities. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 81–88, 2000.

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119–139, 2005.

KHARE, S.K.; NABETANI, H.; NAKAJIMA, M. Lipase catalyzed interesterification reaction and their industrial applications. **Industry**, v. 19, p. 29–35, 2000.

MAIA, M.D.D.; HEASLEY, A.; CAMARGO DE MORAIS, M.M.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR, M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23–27, 2001.

MOROT-BIZOT, S.; TALON, R.; LEROY-SETRIN, S. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 55, p. 279–286, 2003.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 282–291, 2005.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y. Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosum* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 516-523, 2006.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; HORCHANI, H.; GARGOURI, Y. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosum* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 31-39, 2007.

NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, W. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 142-147, 2006.

OLLIS, D.L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J.L.; VERSCHUEREN, K.H.G.; GOLDMAN, A. The $\alpha\beta$ hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, p. 197-211, 1992.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology: a review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PLEISS, J.; FISHER, M.; SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the sessile fatty acid binding site. **Chemical Physics of Lipids**, v. 93, p. 67-80, 1998.

RANGANATHAN, S.V.; NARASINHAM, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**, v. 82, p. 1005-1014, 2000.

SABRI, S; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; LEOW, T.C.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Secretory expression and characterization of a highly Ca²⁺-activated thermostable L2 lipase. *Protein Expression and Purification*, no prelo.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

TIESINGA, J.J.W.; VAN POUDEROYEN, G.; NARDINI, M.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W. Structural basis of phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. **Journal of Molecular Biology**, v. 371, p. 447-456, 2007.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal-W — improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TYNDALL, J.D.A.; SINCHAIKUL, S.; GILMORE, L.A.F.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M.D. Crystal structure of a thermostable lipase

from *Bacillus stearothermophilus* P1. **Journal of Molecular Biology**, v. 323, p. 859-869, 2002.

Van KAMPEN, M.D.; VERHEIJ, H.M.; EGMOND, M.R. Modifying the substrate specificity of staphylococcal lipases. **Biochemistry**, v. 38, p. 9524-9532, 1999.

Van KAMPEN, M.D.; ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1544, p. 229-241, 2001.

WILLIAMS, R.J.P. The natural selection of the chemical elements. *Cell Molecular Life Science*, v. 53, p. 816–29, 1997.

WILSON, C.J.; APIYO, D.; WITTUNG-STAFSHEDE, P. Role of cofactors in metalloprotein folding. **Q. Reviews in Biophysics**, v. 37, p. 285–314, 2004.

WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W668–W673, 2004.

WOODY, R.W. Circular dichroism, **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 34-71, 1995.

ANEXOS

Anexo 1: Sequência de aminoácidos da lipase AF208229 de *S. xylosus*. Peptídeos identificados por LC/MS são mostradas nas caixas cinzas e sublinhadas

MGGSHHHHHSSGLVPAGSHMLEQGQYKNQDPILVHGFNGFTDDINPAVLAH
YWGGDKLNIRQDLESNGYETYEASVGALSSNYDRAVELYYYIKGGTVDYGAA
HAEKYGHERYGKTYEGVYKDWQPGKKVHLVAHSMGGQTVRQLEELLRNGN
QEEIEYQKEHGGEISPLFQGNNDNMVNSITTIGTPHNGTHAADALGNEAIVRQL
AFDYAKFKGNKNSKVDGFGQWGLKQREGETYAQYVQRVQNSGLWKTEDNG
FYDLTREGAAKLNKNTSLNPNIYKTYTGESTRPTLFGNQKSDVNLFLPFTVTG
NVIGKAAEKEWRENDGLVSTISSQHPFNQAFIEATDEVKKGVWQVTPIKHGWD
HVDFVGDSTDSNHPTE