

Caracterização dos sítios ativos de um par mesofílico-termofílico de xilanases da família 11. Um estudo das ligações de hidrogênio intramoleculares por simulação molecular.

Davi Serradella Vieira (PG), Léo Degreuve (PQ)

Universidade de São Paulo - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Depto de Química.
Avenida dos Bandeirantes 3900, CEP: 14040-901

Palavras Chave: *resíduos catalíticos, termoestabilidade, dinâmica molecular, ligações de hidrogênio intramoleculares.*

Introdução

Xilanases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações β -1,4 da cadeia principal da xilana um dos principais polisacarídeos do complexo hemicelulósico das paredes celulares dos vegetais. A termoestabilidade e a especificidade pela xilana são responsáveis pelo grande interesse biotecnológico e comercial que as xilanases têm atraído. O objetivo do trabalho é caracterizar a região catalítica de um par mesofílico-termofílico de xilanases buscando uma relação atividade/termoestabilidade. Para tanto, uma análise das ligações de hidrogênio (LH) será utilizada. As xilanases mesofílica e termofílica estudadas são as produzidas pelos organismos *Bacillus circulans* (XBC) e *Thermomyces lanuginosus* (XTL), respectivamente. Critérios geométricos foram usados para detecção das LH intramoleculares. Os parâmetros usados para o critério geométrico foram: (1) distância $R_{HB} < 0.24\text{nm}$; (2) ângulo $A?H\cdots B > 110^\circ$; (3) Fração de ocorrência, $Fr > 20\%$. As simulações foram realizadas numa faixa de temperatura de 25 à 80°C utilizando dinâmica molecular. O programa utilizado para as simulações por dinâmica molecular foi o GROMACS 3.2.1¹ com campo de força GROMOS96-43a1², parametrizado especificamente para biomoléculas, tempo de integração de 2fs e raio de corte fixado em 1.5nm.

Resultados e Discussão

As LH foram divididas em 3 grupos, LH BB (backbone-backbone), LH BS (backbone-side chain) e LH SS(side chain-side chain). No caso da XBC, os resíduos de importância catalítica, descritos na literatura³, são: os resíduos Glu78 e Glu172 que atuam como nucleófilo e catalisador ácido/base respectivamente, o resíduo Arg112, um conjunto de seis tirosinas Tyr65, Tyr69, Tyr79, Tyr80, Tyr166 e Tyr174 e os triptofanos Trp9, Trp71 e Trp129. Na XTL, os resíduos de importância catalítica, descritos na literatura⁴ são: os resíduos Glu86 e Glu178 que atuam como nucleófilo e catalisador ácido/base respectivamente, o resíduo Arg122, um conjunto de cinco tirosinas Tyr73, Tyr77, Tyr88, Tyr172 e Tyr180, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

o triptofano Trp18 e a glutamina Gln136. Experimentalmente, observou-se que os resíduos dos centros catalíticos dos peptídeos estudados são altamente conservados caracterizando estas regiões

como anfipáticas. O diferencial destas regiões é o emaranhado de LH altamente estáveis de 25 até 70°C formado pelos resíduos de importância catalítica. As LH BB que apresentam Fr em cerca de 90% são as maiores responsáveis pela estabilidade da estrutura secundária da região. No caso da XTL, um número maior de LH BS e SS foram detectados nessa região, em relação à XBC. Os resíduos Glu86, Glu178, Tyr73, Tyr77, Tyr88 e Tyr172 participam constantemente nas LH BS e SS, principalmente nas SS. As LH SS ocorrem em maior número e com frações de ocorrência consideravelmente maiores na XTL do que na XBC como, por exemplo, as LH entre os pares Tyr73-Glu178 e Tyr77-Glu86. Pode-se dizer que as LH SS entre Tyr73-Glu178 e Tyr77-Glu86 são altamente estáveis durante a simulação e resistentes ao aumento da temperatura. Na xilanase XBC, fato semelhante ocorre para os resíduos Tyr65 e Glu172.

Conclusões

As LH SS são menos frequentes que as LH BB porém são capazes de manter as cadeias laterais com uma certa rigidez, possibilitando o reconhecimento molecular do substrato pelo sítio ativo. As LH SS mais importantes são aquelas que envolvem os resíduos de Tyr e Glu, possivelmente mantendo as cadeias laterais desses resíduos numa orientação adequada para a captação e adaptação do substrato no sítio catalítico.

Agradecimentos

Fapesp e CNPq

¹ Lindahl, E.; Hess, B. ; van der Spoel, D., *J. Mol. Model*, **2001**, 7, 306.

² van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hunenberg, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.; *In Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, **1996**.

³ Wakarchuk, W. W.; Campbell, R. L.; Sung, W. L.; Yaguchi, J. D. M., *Protein Science*, **1994**, 3, 467.

⁴. Gruber, K.; Klintschar, G.; Hayn, M.; Schlacher, A.; Steiner, W.; Kratky, C., *Biochemistry*, **1998**, 37, 13475.