



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**MAYARA ITALA GERONIMO DE AZEVEDO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE UMA QUITOSANASE DE  
*Chromobacterium violaceum* EM ESTIRPES DE *Escherichia coli* RECOMBINANTES  
COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO**

**FORTALEZA**

**2017**

MAYARA ITALA GERONIMO DE AZEVEDO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE UMA QUITOSANASE DE  
*Chromobacterium violaceum* EM ESTIRPES DE *Escherichia coli* RECOMBINANTES COM  
POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA

2017

MAYARA ITALA GERONIMO DE AZEVEDO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE UMA QUITOSANASE DE  
*Chromobacterium violaceum* EM ESTIRPES DE *Escherichia coli* RECOMBINANTES COM  
POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

Aprovada em: 29/06/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

M.e José Ednésio da Cruz Freire  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

M.a Suelen Carneiro de Medeiros  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha família.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e esforço que sempre me ajudou a seguir em frente. Em especial a minha mãe, Raimunda, que nunca duvidou de mim, sem ela eu literalmente não estaria aqui; a minha tia, Marli (*in memorium*), que não pôde estar aqui para acompanhar a reta final da minha graduação, mas que desde sempre foi um exemplo para mim; a minha irmã, Marcela, por ser a melhor (e única) irmã que eu tenho; ao meu pai, Neto; as minhas tias Marlene, Fátima e Socorro e aos meus avós, Maria e Estevão.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por ter me aceitado em seu laboratório e pela excelente orientação.

Aos membros da banca examinadora e colegas de laboratório, Suelen e Ednézio, pelo grande auxílio e sugestões em diversos experimentos.

Aos demais colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Mirele, Simone, Juscelino, Jéssica e Edvar. Todos vocês foram de grande ajuda para minha formação.

Aos meus amigos, Adrianne, Misrael, Nadine e Patrícia, essa graduação não teria sido a mesma sem vocês.

Aos membros do Laboratório de Toxinas Vegetais, onde a minha experiência em laboratório começou. Em especial a Mariana, que me acompanhou nos primórdios da minha iniciação científica.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Quando tudo parecer ir contra você, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele.”

Henry Ford

## RESUMO

*Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa, saprófita e de vida livre. Com o sequenciamento do seu genoma, várias ORFs codificando proteínas com potencial biotecnológico foram reveladas. Dentre elas, estão várias glicosídeo hidrolases, incluindo quitinases e quitosanases. Quitosanases são enzimas capazes de degradar a quitosana, um polímero de  $\beta$ -D-glucosamina e o produto dessa degradação, os oligômeros de quitosana ou oligômeros de GlcN, são de grande interesse industrial, apresentando atividade antitumoral, anticolesterol, entre outras, além de agir contra microrganismos e serem utilizados na alimentação. O presente trabalho teve como objetivo produzir uma quitosanase recombinante (Cv3931) da família 46 das glicosídeo hidrolases e realizar análises de interação molecular, de *C. violaceum* ATCC 12472. A ORF que codifica Cv3931 foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonada no vetor pET303/CT-His para a expressão em três estirpes de *Escherichia coli*. A proteína recombinante foi secretada para o meio de cultura pelas três estirpes, na sua forma solúvel e funcional, sendo purificada cromatografia de afinidade em matriz *Sepharose* acoplada a níquel. Análises de bioinformática também foram empregadas para um estudo mais aprofundado das interações moleculares realizadas por essa proteína. A quitosanase produzida na estirpe OrigamiB (DE3) pLysS aparentemente apresentou uma maior atividade enzimática, provavelmente devido o favorecimento da formação de ponte dissulfeto por essa estirpe. Os oligômeros liberados pela hidrólise da quitosana pela rCv3931 apresentaram indícios de atividade antimicrobiana. A partir do modelo tridimensional gerado e do *docking* molecular com diferentes ligantes foi observado que Cv3931 mostra uma sequência extremamente conservada com uma quitosanase de *Bacillus circulans*. Estudos mais aprofundados sobre a rCv3931 e dos oligômeros liberados quando essa proteína hidrolisa a quitosana poderão tornar essa enzima uma importante ferramenta industrial.

**Palavras-chave:** Quitosanase. GlcN. Quitosana.

## ABSTRACT

*Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative, saprophytic and free-living bacterium. The genome sequencing of this organism revealed several ORFs encoding proteins with biotechnological potential. Among them are various glycoside hydrolases, including chitinases and chitosanases. Chitosanases are enzymes capable of degrading chitosan, a polymer of  $\beta$ -D-glucosamine and the product of this degradation, the oligomers of chitosan or oligomers of GlcN, are of great industrial interest, presenting antitumor and anticholesterol activity, among others, besides being used in food e having antimicrobial activity. The present work aimed to produce a recombinant chitosanase (Cv3931) from the 46 family of glycoside hydrolases, from *C. violaceum* ATCC 12472. The ORF encoding Cv3931 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pET303/CT-His for expression in three strains of *Escherichia coli*. The recombinant protein was secreted into the culture medium by the three strains, in its soluble and functional form, and it was purified by affinity chromatography. Bioinformatics analyzes were also used for a more in-depth study of the molecular interactions carried out by this protein. The chitosanase produced in the strain OrigamiB (DE3) pLysS apparently showed a higher enzymatic activity, probably due to the favoring of the disulphide bridge formation by this strain. The oligomers released by the hydrolysis of chitosan by rCv3931 showed signs of antimicrobial activity. From the generated three-dimensional model and the molecular docking with different ligands it was observed that Cv3931 shows an extremely conserved sequence with a chitosanase from *Bacillus circulans*. Further studies on rCv3931 and the oligomers released when this protein hydrolyzes chitosan may make this enzyme an important industrial tool.

**Keywords:** Chitosanase. GlcN. Chitosana.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 plaqueada em LB ágar.....	16
Figura 2 – Estrutura molecular planar da violaceína.....	17
Figura 3 – Estrutura molecular da planar quitosana totalmente desacetilada.....	20
Figura 4 – Divisão das regiões do provável peptídeo sinal da Cv3931.....	39
Figura 5 – Demonstração do ponto de clivagem do peptídeo sinal da Cv3931.....	40
Figura 6 – Representação dos domínios encontrados na sequência da Cv3931.....	43
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,0 % mostrando um gradiente de temperatura para a amplificação da ORF da Cv3931.....	49
Figura 8 – Eletroforese do gel de agarose 0,8% referente a confirmação da clonagem da ORF Cv3931 com o plamídeo pET303CT-His.....	51
Figura 9 – Gel de eletroforese SDS-PAGE evidenciando a expressão de rCv3931.....	53
Figura 10 – Perfil da atividade quitosanásica em placa da F0/95 das três estirpes usadas para produção de rCv3931.....	55
Figura 11 – Purificação da quitosanase recombinante de <i>C. violaceum</i> .....	57
Figura 12 – Atividade quitosanásica dos picos cromatográficos.....	59
Figura 13 – Atividade antibacteriana de rCv3931.....	62
Figura 14 – Atividade antibacteriana dos oligômeros de quitosana liberados por rCv3931.....	64
Figura 15 – Sobreposição dos modelos de Cv3931 com o <i>template</i> 1QGI.....	67
Figura 16 – <i>Plot</i> Ramachandra do modelo de Cv3931 depois da otimização pelo servidor GALAXY.....	69
Figura 17 – <i>Z-score</i> do modelo de Cv3931 obtido pelo servidor ProSa-Web.....	70
Figura 18 – Qualidade global do modelo obtida pelo servidor ERRAT2.....	71

Figura 19 – 3D-1D <i>Averaged score</i> para o modelo da Cv3931.....	72
Figura 20 – Preferência de solvente do servidor Solvx para cada aminoácido do modelo de Cv3931.....	73
Figura 21 – Regiões de desordem no modelo da CvHex previstas pelo servidor PrDOS...	74
Figura 22 – Representação da estrutura em superfície e em <i>cartoon</i> do modelo da Cv3931 com o ligante (GlcN)2-GlcNAc.....	77
Figura 23 – Distância entre os dois resíduos catalíticos de Cv3931.....	78
Figura 24 – Resíduos da Cv3931 que fazem interação com o ligante (GlcN)2-GlcNAc....	79
Figura 25 – Representação da interação molecular de Cv3931 com os ligantes GlcNAc e GlcNAc-(GlcN)2.....	81
Figura 26 – Interação de Cv3931 com GlcN3.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da quitosanase Cv3931 de <i>C. violaceum</i> para clonagem em <i>E. coli</i> .....	27
Tabela 2 – Scores dos servidores usados para predição do peptídeo sinal de Cv3931.....	38
Tabela 3 – Scores de localização referentes ao servidor PSORTb.....	41
Tabela 4 – Características físico-químicas preditas pelos servidores ExPasy-ProtParam e XtalPred.....	46
Tabela 5 – Valores de RMSD para os modelos de Cv3931 com o <i>template</i> 1QGI.....	66
Tabela 6 – Resíduos de 1QGI que interagem com o ligante.....	80
Tabela 7 – Resíduos de Cv3931 que interagem com o ligante.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>3D</b>	Tridimensional
<b>BHI</b>	Caldo de infusão cerebral ( <i>brain heart infusion</i> )
<b>CDD</b>	<i>Conserved Domain Database</i>
<b>DMAB</b>	para-dimetilbenzaldeído
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidade óptica a 600nm
<b>GH</b>	<i>Glycoside Hydrolases</i>
<b>GlcN</b>	D-glicosamina
<b>GlcNAc</b>	N-acetil-D-glicosamina
<b>GRAVY</b>	Índice de hidrofobicidade e hidropaticidade
<b>IPTG</b>	Isopropiltiogalactopiranosídeo
<b>IA</b>	Índice alifático
<b>II</b>	Índice de instabilidade
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>LB</b>	Caldo Luria Bertani
<b>Mr</b>	Massa molecular
<b>N- terminal</b>	Amino-terminal
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>RMSD</b>	<i>Root-mean-square deviation</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>PS</b>	Peptídeo Sinal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Quitina</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Quitosana</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Quitosanases</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Família GH46</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Expressão heteróloga de proteínas</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Expressão de proteína heterólogas em bactérias</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Análises <i>in silico</i></b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Modelagem molecular</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Docking molecular</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Cepas de Bactérias</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Enzimas</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Plasmídeo</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise da sequência deduzida da <i>Cv3931</i></b> .....	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise de domínios conservados</b> .....	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Caracterização físico-química</b> .....	<b>26</b>
<b>5.4</b>	<b>Amplificação da ORF <i>Cv3931</i></b> .....	<b>27</b>
<b>5.5</b>	<b>Clonagem da ORF <i>Cv3931</i> no vetor de expressão pET303/CT-His</b> .....	<b>28</b>
<b>5.6</b>	<b>Indução da expressão da proteína recombinante r<i>Cv3931</i></b> .....	<b>29</b>
<b>5.7</b>	<b>Purificação da proteína recombinante</b> .....	<b>30</b>
<b>5.8</b>	<b>Determinação da concentração de proteínas</b> .....	<b>31</b>
<b>5.9</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e condições redutoras (PAGE-SDS)</b> .....	<b>31</b>

5.10	Atividade enzimática.....	32
5.10.1	Ensaio de atividade quitosanásica por difusão em placa.....	32
5.10.2	Ensaio de atividade quitinásica.....	32
5.11	Obtenção de oligômeros de quitosana.....	33
5.12	Atividade antibacteriana.....	33
5.12.1	Preparação do inóculo.....	33
5.12.2	Atividade antibacteriana por difusão em placa.....	33
5.13	Predição da estrutura 3D de Cv3931.....	34
5.13.1	Construção do modelo.....	34
5.13.2	Validação do modelo.....	34
5.14	Docking molecular.....	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.1	Características da Estrutura Primária.....	36
6.2	Domínios conservados.....	42
6.3	Características físico-químicas.....	44
6.4	Amplificação da ORF Cv3931.....	48
6.5	Clonagem da ORF Cv3931 no vetor de expressão pET303/CT-His.....	50
6.6	Indução da expressão da proteína recombinante rCv3931 em diferentes estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	52
6.7	Purificação da quitosanase recombinante.....	56
6.8	Atividade quitinásica de rCv3931.....	60
6.9	Atividade antibacteriana.....	61
6.9.1	Atividade antibacteriana de rCv3931.....	61
6.9.2	Atividade antibacteriana dos oligômeros liberados por rCv3931 na degradação de quitosana.....	63
6.10	Construção e validação do modelo tridimensional de Cv3931.....	65
6.11	Docking molecular.....	75
7	CONCLUSÃO.....	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
9	ANEXOS.....	92

## 1 INTRODUÇÃO

*Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa de vida livre, saprófita e aeróbica facultativa, encontrada no solo e água de regiões tropicais e subtropicais (YANG; LI, 2011). A anotação do genoma de *C. violaceum* revelou, além dos genes relacionados ao metabolismo geral, uma proporção significativa (em torno de 11%) de ORFs (*Open Reading Frame*) codificando proteínas transportadoras de membrana, que permitem essa bactéria a se adaptar a uma grande variedade de ambientes (GRANGEIRO *et al.*, 2004). Genes com potencial de aplicação biotecnológica foram também identificados, alguns destes codificam quitinases e outras glicosídeo hidrolases. (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Quitosana é o nome geral para um grupo de quitina parcialmente e completamente desacetilada. Foi descoberto que esse polissacarídeo é biocompatível, biodegradável e não tóxico. (LI, DUNN, GRANDMAISON, & GOOSEN, 1997). Foram encontradas evidências de que a quitosana possui várias atividades biológicas, como antioxidante, redução de colesterol, e propriedades antibactericidas e antifúngicas (FERNANDES *et al.*, 2008). O elevado peso molecular e a insolubilidade da quitosana faz dela inconveniente para várias aplicações e atualmente a quitosana tem atraído interesse quando convertida em oligossacáridos de quitosana (COS), já que estes, além de terem baixo peso molecular, são solúveis em água e também tem muitas atividades biológicas notáveis (SHEN *et al.*, 2009; ARTAN *et al.*, 2010; SENEVIRATHNE *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2011). As quitosanases (EC 3.2.1.132) são glicosídeo-hidrolases que catalisam a endo-hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas presentes na quitosana parcialmente acetilada para libertar oligossacáridos de quitosana (COS) (THADATHIL *et al.*, 2014). Para a produção de COS, a hidrólise mediada por quitosanases têm vantagens sob a hidrólise química ou física, pois essas enzimas podem catalisar a hidrólise da quitosana em condições médias de reação sem a produção de monossacarídeos. Esse processo também é mais ambientalmente amigável e produz misturas de COS mais definidas (AZLAN *et al.*, 2009; WANG *et al.*; 2014). Tendo em vista que sistemas bacterianos para expressão de proteínas heterólogas têm vantagens na facilidade de uso, custo, curto tempo de geração e escalabilidade (TERPE, 2006) e abordagens computacionais reduzem o espaço de procura e proporcionarem informações biologicamente e probabilisticamente importantes (BANWAIT *et al.*, 2015) esse trabalho busca expressar uma provável quitosanase de *C. violaceum* ATCC 12472 em diferentes estirpes de *Escherichia coli*, além de testar a atividade da proteína recombinante e realizar análises de bioinformática com o intuito de entender as possíveis interações moleculares com oligômeros de quitosana, visto o grande valor desta molécula na indústria.

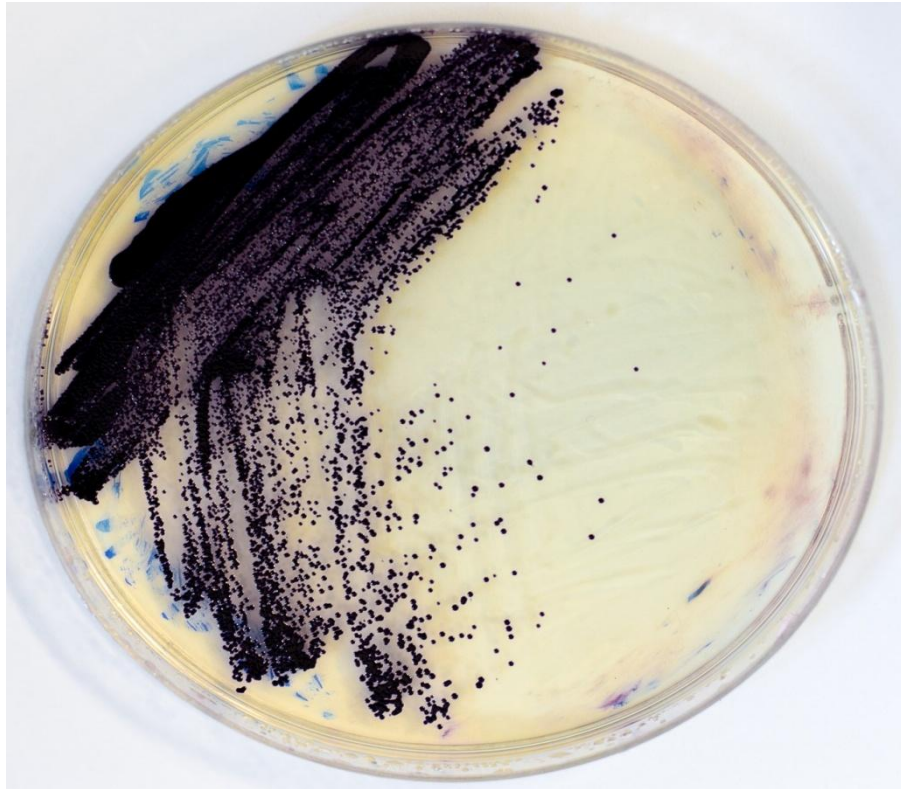
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa de vida livre, saprófita e aeróbica facultativa, encontrada no solo e água de regiões tropicais e subtropicais. Essa espécie é encontrada de forma abundante nas águas do Rio Negro, na Amazônia. Ocasionalmente, pode atuar como patógeno oportunista em animais e no homem, causando septicemia fatal a partir de lesões na pele, produzindo abscessos no fígado e pulmão (YANG; LI, 2011). Woolley (1905) fez o primeiro registro de *C. violaceum* como patógeno em búfalo nas ilhas Filipinas. O primeiro caso de infecção por esse microrganismo em humanos foi registrado na Malásia, em 1927 (SNEATH, 1953). Desde então, pouco mais de 100 casos de infecções em seres humanos foram relatados em todo o mundo, com taxa de mortalidade de 53% (YANG; LI, 2011).

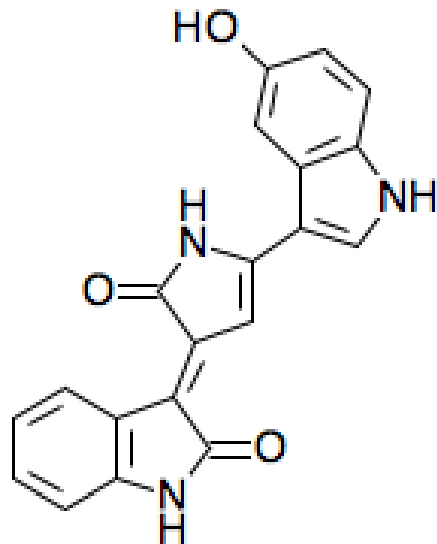
Essa bactéria foi descrita, independentemente, por Bergozini e Boisbaudran no século XIX, chamando atenção pela sua cor violeta característica. A cor de *C. violaceum* se dá, pois esse microrganismo, além de outros compostos secundários, produz majoritariamente um composto de pigmento púrpura 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno] 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona conhecido como violaceína (Figura 1), que é derivada do indol e é sintetizada a partir do L-triptofano. A violaceína (Figura 2) desperta amplo interesse devido às atividades biológicas: como antibacteriano, antitumoral, e antiparasitário (CALDAS *et al.*, 1978; DURÁN *et al.*, 1989; MELO *et al.*, 2000).

Figura 1 – *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 plaqueada em LB Ágar



Fonte: Própria autora

Figura 2 - Estrutura molecular planar da violaceina



Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Devido ao seu potencial biotecnológico, *C. violaceum* foi escolhida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para ser o primeiro microrganismo a ter o seu genoma completamente sequenciado no Brasil. A sequência completa do genoma da estirpe ATCC 14272 foi finalizada em 2002 e publicada em 2003. Tal projeto envolveu 25 laboratórios de sequenciamento, um centro de bioinformática e 3 laboratórios coordenadores, distribuídos pelo Brasil. (VASCONCELOS *et al.*, 2003). A anotação do genoma revelou, além dos genes relacionados ao metabolismo geral, uma proporção significativa (em torno de 11%) de ORFs codificando proteínas transportadoras de membrana, que permitem essa bactéria a se adaptar a uma grande variedade de ambientes nas regiões tropicais e subtropicais (GRANGEIRO *et al.*, 2004) Além disso, genes supostamente relacionados à resposta a condições de estresse, motilidade, patogenicidade e com potencial de aplicação biotecnológica foram também identificados. Por exemplo, uma ORF que codifica uma desalogenase ácida pode mediar a desintoxicação ambiental juntamente com um óperon de resistência a arsenico. Outros genes de interesse biológico identificados foram os que codificam quitinases e outras glicosídeo hidrolases. (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

## 2.2 Quitina

A quitina é um polímero formado por ligações  $\beta$ -1,4 entre unidades de monossacarídeo *N*-acetil-*D*-Glucosamina (GlcNAc) e é o segundo polissacarídeo mais abundante após biopolímeros estruturais de plantas como a celulose e a hemicelulose. A quitina proporciona resistência química e estrutural em exoesqueletos de crustáceos e artrópodes, bem como nas paredes celulares dos fungos. Na natureza, a quitina é uma importante fonte de energia para uma variedade de organismos. (PURUSHOTHAM *et al.*, 2012).

A deacetilação completa ou parcial da quitina produz quitosana, um polisacarídeo linear. (VERNAZZA *et al.*, 2005).

## 2.3 Quitosana

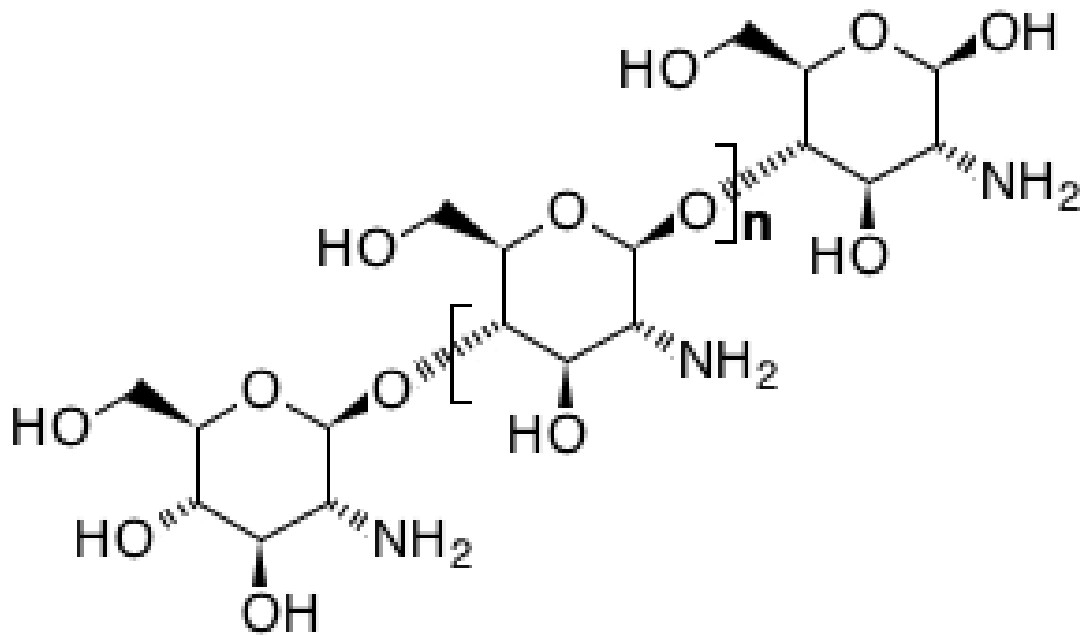
A quitosana, polímero de  $\beta$ -(1,4)-*D*-glucosamina (Figura 3), é um dos aminopolissacarídeos naturais mais abundantes. Quitosana é o nome geral para um grupo de quitina parcialmente e completamente desacetilada. Foi descoberto que esse polissacarídeo é biocompatível, biodegradável e não tóxico. (LI, DUNN, GRANDMAISON, & GOOSEN, 1997). Esse polímero é o principal derivado *N*-deacetilado da quitina, embora a *N*-deacetilação seja quase nunca completa. Atualmente, a quitosana é obtida comercialmente a

partir da *N*-deacetilação da quitina de crustáceos. (ZITOUNI *et al*, 2012).

A quitosana é insolúvel em meio aquoso em condições neutras e básicas, mas é solúvel em solução aquosa diluída de ácido (TIKHONOV *et al.*, 2006). Foram encontradas evidências de que a quitosana possui várias atividades biológicas, como antioxidante, redução de colesterol, e propriedades antibactericidas e antifúngicas, além de ser útil como um componente de dietas ativo para a perda de gordura corporal. Essas características, combinadas com a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, fazem com que esse polímero seja interessante para várias aplicações na agricultura, produtos farmacêuticos, cosméticos, indústria de alimentos e têxtil, e também na medicina (FERNANDES *et al*, 2008). A massa molecular da maioria das quitosanas comerciais é de 100 a 1200 kDa (ROLLER; COVILL, 1999), e isso limita as aplicações práticas devido à insolubilidade em valores de pH maiores que 6.3 (SEO *et al.*, 2007).

O elevado peso molecular e a insolubilidade da quitosana são desvantajosos para várias aplicações e atualmente a quitosana tem atraído interesse quando convertida em oligossacarídeos de quitosana (COS), já que estes, além de terem baixo peso molecular, são solúveis em água e também têm muitas atividades biológicas notáveis, tais como não toxicidade, biocompatibilidade, atividade anti-câncer e efeitos anti-metastáticos, anti-HIV, hepatoprotetor, antioxidante, hipocolesterolêmico, antimicrobiano, imunostimulante, antitumoral, efeito de aceleração da absorção de cálcio e de ferro e atividade anti-inflamatória (SHEN *et al.*, 2009; ARTAN *et al.*, 2010; SENEVIRATHNE *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2011).

Figura 3- Estrutura planar da quitosana totalmente deacetilada



Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

## 2.4 Quitosanases

As quitosanases (EC 3.2.1.132) são glicosídeo hidrolases que catalisam a endo-hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas de quitosana parcialmente acetilada para libertar oligossacáridos de quitosana (COS) (THADATHIL *et al.*, 2014). Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos e plantas, onde desempenham um papel importante na nutrição e na defesa. Essa classe foi descrita pela primeira vez em 1973, a partir de diferentes microrganismos do solo. Nos últimos 40 anos, vários trabalhos foram publicados sobre a ocorrência, produção, purificação e caracterização de quitosanases de diferentes microrganismos, incluindo bactérias, fungos e cianobactérias, e plantas (SOMASHEKAR & JOSEPH, 1996).

Pesquisas recentes sobre quitosanases têm recebido atenção devido a sua ampla aplicação em vários campos. Uma das aplicações mais práticas e promissoras das quitosanases é a preparação de COS (WANG *et al.*, 2014). Para a produção de COS, a hidrólise mediada por quitosanases tem vantagens sob a hidrólise química ou física, na qual quitosanases podem catalizar a hidrólise em condições médias de reação e sem a produção de monossacarídeos. Esse processo também é mais ambientalmente aceitável e produz misturas de COS mais definidas. (AZLAN *et al.*, 2009; WANG *et al.*; 2014).

Quitosanas pertencem a cinco famílias de glicosídeo hidrolases (GH): GH5, GH8, GH46, GH75 e GH80, baseado na suas sequências de aminoácidos. Dentre essas famílias, quitosanases da família GH46, especialmente aquelas de *Bacillus* e *Streptomyces* têm sido extensivamente estudadas em termos de suas características catalíticas, mecanismos enzimáticos e estrutura de proteínas. (THADATHIL *et al.*, 2014)

### 2.4.1 Família GH46

A família GH46 foi construída de acordo com a duas primeiras quitosanases descritas na literatura: as quitosanases de *Bacillus circulans* MH-K1 e de *Streptomyces sp.* N174. Em contraste com várias famílias de glicosídeo hidrolases que possuem enzimas tendo especificidade para diferentes substratos, se tornou aparente, com a descoberta de novos membros da família GH46, que essa família inclui enzimas exclusivamente específicas para a hidrólise da quitosana. Proteínas da família GH46 estão essencialmente presentes em eubactérias (VIENS *et al.*, 2015). Essa família de enzimas utilizam o mecanismo de catálise de inversão (FUKAMIZO *et al.*, 1995) e seus resíduos catalíticos foram identificados por mutagênese sítio dirigido e cristalografia na quitosanase de *Streptomyces sp.* N174. O resíduo catalítico ácido é o Glu<sup>22</sup> na sequência SSAENSS, enquanto o Asp<sup>40</sup> (DIGDGRG) é o resíduo

catalítico básico. (BOUCHER *et al*, 1995)

## **2.5 Expressão heteróloga de proteínas**

Proteínas participam de todas as atividades celulares, e o conhecimento da função das proteínas é essencial para o entendimento dos sistemas biológicos. Estudos de métodos que proporcionam a produção de proteínas *in vitro* são críticos uma vez que é inerente a determinação das propriedades cinéticas, termodinâmicas e moleculares. Idealmente, proteínas poderiam ser purificadas da sua fonte original, no entanto, o hospedeiro nativo é frequentemente inadequado por várias razões, por exemplo, baixo rendimento protéico, dificuldade de purificação, entre outros. Consequentemente, sistemas para a produção heteróloga de proteínas são comumente usados para produzir uma grande quantidade de proteína. Hospedeiros para expressão heteróloga são escolhidos usando vários critérios, incluindo traçabilidade, produção vantajosa, características de processamento (secreção ou modificação pós-traducionais), economia de tempo ou condições de crescimento. (ZERBS, 2014)

Proteínas heterólogas são de interesse considerável, tanto para a pesquisa básica como para uma variedade de aplicações biomédicas e industriais (MADZAK *et al.*, 2004).

### **2.5.1 Expressão de proteínas heterólogas em bactérias**

Sistemas bacterianos para expressão de proteínas heterólogas têm vantagem na facilidade de uso, custo, curto tempo de geração e escalabilidade. Esses sistemas de expressão têm sido amplamente usados em projetos de produção de proteína de alto rendimento e frequentemente representam o experimento inicial para qualquer tipo de alvo de expressão. *Escherichia coli* tem sido estudada por vários anos como um modelo bacteriano e é um dos hospedeiros mais populares para a produção de proteínas heterólogas (TERPE, 2006).

*E. coli* continua sendo o hospedeiro de escolha de muitos laboratório quando se trata da expressão de proteínas recombinantes para estudos bioquímicos, funcionais e, principalmente, estruturais. A sua flexibilidade em termos de manipulação genética, o seu rápido crescimento e baixo custo de manutenção têm feito dessa bactéria uma ferramenta indispensável. Isso é exemplificado pelo grande número de ferramentas que estão disponíveis e continuam a ser desenvolvidas para esse hospedeiro. Considerando apenas o *Protein Data Bank* (PDB), mais de 90% das estruturas depositadas usaram *E. coli* para a produção de pelo menos uma entidade macromolecular (VINCENELLI *et al*, 2013).

## **2.6 Análises *in silico***

A Bioinformática surgiu na década de 80, com os avanços na área de biologia molecular e o surgimento de projetos genomas, como o estudo da aplicação de técnicas computacionais e matemáticas para a geração e gerenciamento de dados biológicos (ARAÚJO, *et al.*, 2008). Abordagens computacionais reduzem o espaço de procura e oferecem resultados biologicamente e probabilisticamente importantes (BANWAIT *et al.*, 2015).

### **2.6.1 Modelagem molecular**

A modelagem *in silico* de proteínas é útil na predição de modelos 3D das proteínas seguido pela predição dos seus sítios ativos. Além disso, a presença de resíduos ativos críticos na estrutura podem ser encontrados em análises computacionais. A modelagem de proteínas e os métodos de *design* pavimentam o caminho para a construção de novas e melhores enzimas termoestáveis com as características desejadas (KHAN *et al.*, 2016).

Métodos de modelagem para criar estruturas 3D de proteínas têm sido desenvolvidos recentemente. A modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa, atualmente é o mais preciso método de modelagem de proteínas. Todos os atuais métodos de modelagem por homologia consistem em quatro passos sequenciais: dobramento e seleção do modelo, alinhamento com modelo alvo, construção do modelo e avaliação do modelo (SANTOS FILHO *et al.*, 2003).

### **2.6.2 Docking molecular**

As ferramentas de *docking* molecular são usadas para prever a conformação e orientação relativa de duas ou mais moléculas constituintes. Pioneiras no início dos anos 80, abordagens computacionais tem importante contribuição para a localização e caracterização dos sítios de ligação em macromoléculas, assim como na descoberta, no *design* e na comparação de novas drogas para achar novos compostos com uma alta afinidade para a proteína alvo (LÓPEZ-CAMACHO *et al.*, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Expressar uma quitosanase de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 em diferentes estirpes de *Escherichia coli*, avaliar a atividade biológica da proteína recombinante e prever o modo de interação molecular a partir ferramentas computacionais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Clonar e expressar uma quitosanase recombinante de *Chromobacterium violaceum*
- Analisar a atividade enzimática e biológica da quitosanase recombinante produzida
- Caracterizar a proteína de estudo com base em ferramentas computacionais
- Gerar um modelo tridimensional de uma quitosanase de *C. violaceum* assim como prever seu mecanismo de catálise com base em ferramentas computacionais

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Cepas de bactérias

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi usada nos experimentos de clonagem. A expressão da proteína recombinante foi conduzida em *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* Rosetta (DE3) e *Escherichia coli* OrigamiB (DE3) pLysS. Experimentos de atividade antibacteriana foram conduzidos com a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p) e a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

### 4.2 Enzimas

As enzimas de restrição Xho I (10 U/ $\mu$ L) e Xba I (10 U/ $\mu$ L) acompanhadas de seus respectivos tampões de reação, foram obtidas da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). T<sub>4</sub> DNA ligase acompanhada de seu tampão de reação apropriado também foi adquirida da Invitrogen.

### 4.3 Plasmídeo

O plasmídeo utilizado para expressão foi o pET303/CT-His (ThermoFisher).

### 4.4 Reagentes

Todos os reagentes usados nesse trabalho foram de grau analítico e com alto grau de pureza.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Análise da sequência deduzida da Cv3931

A sequência de aminoácidos da provável quitosanase de *Chromobacterium violaceum* (Anexo 1), chamada de Cv3931, (número de acesso no GenBank: AAQ61593.1) foi obtida no banco de dados NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os servidores SignalP 4.1 (PETERSEN, *et al.*, 2011), Signal-*CF* (CHOU, *et al.*, 2007), PrediSi (HILLER, *et al.*, 2004) e SecretomeP (BENDTSEN, *et al.*, 2005) foram utilizados para identificar a presença ou ausência de peptídeo sinal (PS) e, em caso de presença, o provável sítio de clivagem na proteína Cv3931. A proteína madura também foi submetida a análises para identificar a sua localização celular no servidor PSORTb 3.0.2 (YU *et al.*, 2010).

### 5.2 Análise de domínios conservados

Com o intuito de determinar a família proteica, bem como a região catalítica da Cv3931 foi utilizado o servidor CDD - *Conserved Domains Database* (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2015), assim como o servidor SMART - *Simple Modular Architecture Research Tool* (LETUNIC *et al.* 2014).

### 5.3 Caracterização físico-química

Para a caracterização físico-química da proteína Cv3931 a ferramenta ProtParam (GASTEIGER, *et al.*, 2005) do servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) e o servidor XtalPred (SLABINSKI, *et al.*, 2007) foram utilizados. Ambos os servidores analisaram o ponto isoelétrico teórico (pI), a massa molecular (*Mr*), o índice de estabilidade (II) e o índice de hidrofobicidade (GRAVY), além disso, a ferramenta ProtParam analisou o índice alifático (IA) o tempo de meia vida da proteína. O servidor XtalPred ainda avaliou a maior região de desordem da proteína e o número de proteínas com estrutura resolvida que tem similaridade significativa com a proteína de estudo. Para identificar a presença de pontes dissulfeto o servidor DiANNA (FERRE & CLOTE, 2006) foi utilizado.

#### 5.4 Amplificação da ORF Cv3931

Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram construídos para amplificação da sequência de DNA (1.083 pares de base; Anexo 2) da ORF Cv3931 de *C. violaceum* ATCC 12472 (Tabela 1). A ORF Cv3931 está localizada na fita complementar do cromossomo de *C. violaceum* (número de acesso no GenBank: AAQ61593.1), estendendo-se da posição 4.252.283 a 4.253.365. A sequência da ORF foi completamente amplificada, incluindo os primeiro 87 nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal nativo da quitosanase, para a expressão em *E. coli*. Sítios para as enzimas de restrição (*Xho* I e *Xba* I) foram adicionados nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos, para facilitar a manipulação do produtos amplificado.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região codificadora da quitosanase Cv3931 de *C. violaceum*, com peptídeo sinal para clonagem em *E. coli*

Cv3931F: 5'	<u>CCGGTCTAGA</u> <sup>1</sup> ATGAAATACGCAGCAAAACGC	3'
Cv3931R: 5'	CCGGCTCGAG <sup>2</sup> CTTCATTCCAGTTGGTGAC	3'

<sup>1</sup>O sublinhado representa o sítio para a enzima *Xba*I

<sup>2</sup>O sublinhado representa o sítio para a enzima *Xho*I

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL (*Axygen Scientific Inc.*, Union City, CA, USA). Utilizando uma DNA polimerase termoestável de alta fidelidade, para um volume final de 25 µL contendo DNA genômico (50 ng), dNTPs (10 mM), oligonucleotídeos iniciadores (5 µM cada um), tampão GC 5X com MgCl<sub>2</sub> (KAPA HiFi HotStart), KAPA HiFi DNA Polimerase (0,5 U; KAPABiosystems) e água ultra-pura estéril (q.s.p. 25 µL). O processo de amplificação ocorreu em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), programado para uma etapa de inicial de desnaturação (4 min a 95 °C), seguida por 34 ciclos de 20 s a 98 °C (desnaturação), 15 s a doze temperaturas de 52 °C a 72 °C (pareamento), para avaliar a melhor temperatura de pareamento, e 40 s a 72 °C (extensão). Após o último ciclo, uma última fase de extensão prolongada (72 °C por 4 min) foi realizada. Posteriormente, as amostras permaneceram estocadas a 4 °C no termociclador até que, em seguida, fossem estocadas a -20 °C até uso posterior. Para análise dos produtos da reação uma alíquota de 5 µL foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et al* (1989).

### 5.5 Clonagem da ORF Cv3931 no vetor de expressão pET303/CT-His

O produto amplificado por PCR foi purificado com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com o protocolo fornecido, após a purificação, o produto purificado e 1 µg do plasmídeo pET303/CT-His (Anexo 3) foram digeridos com *Xho* I (20 U) e *Xba* I (40 U), a 37 °C por 3 horas, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas. Após o término da reação, os fragmentos digeridos foram purificados novamente utilizando-se o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Os produtos de PCR e o plasmídeo pET303/CT-His, digeridos e purificados, foram submetidos a uma reação de ligação com T<sub>4</sub> DNA ligase (1U), nas condições sugeridas pelo fabricante da enzima. A reação de ligação foi incubada a 22 °C por 20 min.

O produto da reação de ligação foi inserido em células de *E. coli* DH5α por tratadas com cloreto de cálcio de acordo com o protocolo descrito por Sambrook (1989). As células submetidas ao tratamento com cloreto de cálcio foram recuperadas em 800 µL de meio SOC pré-aquecido a 37 °C e mantidos sob agitação ocasional a cada 15 minutos por 90 min a 37 °C.

Após o período de incubação, 100 µL da cultura foram plaqueados em meio LB ágar suplementado com ampicilina (200 µg/mL). As culturas foram mantidas a 37 °C por 24 h, até a visualização de colônias. Algumas colônias foram escolhidas e inoculadas em 5 mL de caldo LB (contendo ampicilina 200 µg/mL) e incubadas sob agitação constante (180 rpm) a 37 °C, por, aproximadamente, 16 h. Ao final desse período, os 5 mL de cada cultura foram usados para a purificação de DNA plasmidial utilizando o *kit NucleoSpin® Plasmid (NoLid)*(Macherey-Nagel), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A presença do inserto nas preparações de DNA plasmidial foi, então, confirmada por digestão com as endonucleases apropriadas.

Após a confirmação, o plasmídeo recombinante pET303/CT-His::Cv3931 (50 ng) foi inserido por eletroporação, a 2.500 V (Eletroporador 2510, Eppendorf), em células do hospedeiro de expressão *E. coli* OrigamiB (DE3) plysS, *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* Rosetta (DE3), para posterior indução da expressão da proteína recombinante. As células submetidas a eletroporação foram recuperadas em 1 mL de meio SOC pré-aquecido a 37 °C e mantidos sob agitação ocasional por 90 min a 37 °C. Após esse período, 50 µL da cultura foram plaqueados

em meio LB ágar suplementado com ampicilina (200 µg/mL), clorafenicol (34 µg/mL) tetraciclina (12,5 µg/mL) e canamicina (15 µg/mL) para *E. coli* OrigamiB (DE3) plysS; ampicilina (200 µg/mL) e clorafenicol (34 µg/mL) para *E. coli* Rosetta (DE3) e ampicilina (200 µg/mL) para *E. coli* BL21 (DE3). As culturas foram mantidas por 24 h a 37 °C e clones de *E. coli* OrigamiB (DE3) plysS, *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* Rosetta (DE3) transformadas com pET303/CT-His::Cv3931 foram mantidas em meio estoque contendo glicerol 15% e armazenados a -80 °C.

### 5.6 Indução da expressão da proteína recombinante rCv3931

As células das três estirpes de *E. coli* contendo o plasmídeo pET303/CT-His::Cv3931 foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (200 µg/mL), clorafenicol (34 µg/mL) tetraciclina (12,5 µg/mL) e canamicina (15 µg/mL) para *E. coli* OrigamiB (DE3) pLyss; ampicilina (200 µg/mL) e clorafenicol (34 µg/mL) para *E. coli* Rosetta (DE3) e ampicilina (200 µg/mL) para *E. coli* BL21 (DE3), a partir do estoque em glicerol 15%, para a obtenção de colônias isoladas. Células de *E. coli* Rosetta (DE3) contendo o plasmídeo pET303/CT-His integro também foram plaqueadas em meio LB Ágar contendo ampicilina (200 µg/mL) e clorafenicol (34 µg/mL). Uma colônia de cada estirpe foi escolhida, inoculada em meio LB caldo contendo os antibióticos citados anteriormente e encubada sob agitação orbital de 180 rpm, por 16 h a 37 °C.

Das culturas obtidas uma alíquota de 1 mL foi inoculada em meio LB suplementado com contendo ampicilina (200 µg/mL), clorafenicol (34 µg/mL) tetraciclina (12,5 µg/mL) e canamicina (15 µg/mL). As culturas foram incubadas sob agitação orbital de 180 rpm a 37 °C e quando suas densidades ópticas a 600nm atingiram um valor em torno de 0,5, a indução da expressão de proteína recombinante foi iniciada pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,4 mM. Após a adição do IPTG, as culturas foram incubadas a 37 °C por 24 h com agitação orbital de 180 rpm.

Ao final desse período as culturas foram centrifugadas a 8.000 x g por 10 min a 4 °C e o meio de cultura livre de células, foi exaustivamente dialisado com água destilada. Após a diálise, sulfato de amônio sólido foi adicionado para um intervalo de saturação de 0-95%. As amostras foram mantidas em repouso por 16 h e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado (F0/95) foi solubilizado em água destilada, dialisado exaustivamente também com água destilada e armazenado a -20 °C até o uso.

## 5.7 Purificação da proteína recombinante

As frações (0-95) dos extratos das induções de proteína recombinante das três estirpes de *E. coli* usadas foram juntas, formando uma única amostra e esta foi colocada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e centrifugada (5.000 x *g* por 10 minutos) para a retirada de material insolúvel. O sobrenadante foi aplicado em uma matriz de *Sepharose* com níquel imobilizado, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Proteínas que não interagiram com a matriz (Pico I; PI) foram eluídas com o tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e 5 mM de imidazol) até que a  $A_{280}$  do material eluído fosse menor que 0,020. As proteínas retidas foram então eluídas em fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e imidazol nas concentrações de 20, 40 e 100 mM, formando assim três picos de proteínas retidas (PII; PIII; PIV). As frações retidas com  $A_{280} > 0,030$  foram reunidas e dialisadas exaustivamente com água destilada.

Neste processo cromatográfico o fluxo utilizado foi de 700  $\mu\text{L}/\text{min}$  e todas as alíquotas foram analisadas em uma absorbância de 280nm.

## 5.8 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada usando a método descrito por Bradford (1976). A uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford, essa mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 min a temperatura ambiente. As leituras de absorbância foram feitas utilizando um comprimento de onda de 595nm. A estimativa da concentração protéica foi feita a partir de uma curva de concentrações conhecida de albumina sérica bovina (BSA).

## 5.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e condições redutoras (PAGE-SDS)

Eletroforeses em géis de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970) com géis montados com placas de vidro. Os géis de concentração (concentração final de acrilamida 5%) e de

separação (concentração final de acrilamida de 15%) foram preparados de acordo com a mistura dos seguintes componentes:

	Gel de Concentração 5%	Gel de Separação 15%
H <sub>2</sub> O destilada	1,35 mL	1,15 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8%)	335 µL	2,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	1,25 mL
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8	250 µL	-
10% SDS	20 µL	50 µL
Persulfato de Amônio 10% (p/v)	20 µL	50 µL
TEMED	4 µL	4 µL

As amostras a serem analisadas foram ressuspensas em tampão de amostra [água; SDS 2% (m/v); β-Mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,0001%], aquecidas a 100 °C por 10 minutos e, quando não utilizadas, foram armazenadas a -20 °C.

A migração eletroforética foi realizada na voltagem de 120 V em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). Os géis foram revelados com uma solução de nitrato de prata.

## 5.10 Atividade enzimática

### 5.10.1 Ensaio de atividade quitosanásica por difusão em placa

Para a realização do ensaio de atividade quitosanásica em placa 0,1% (m/v) de quitosana e 1% (m/v) de ágar foram dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, essa mistura foi autoclavada e então distribuída em uma placa de petri estéril. Após a solidificação da mistura, foram feitos poços de 0,5 cm e foram aplicadas as amostras da fração 0/95 dos extratos secretados de rCv3931 referentes às três estirpes de *E. coli* e o controle contendo a fração 0/95 do extrato secretado de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada com pET303/CT-His íntegro, assim como o pico retido da cromatografia de afinidade com níquel referente a proteína recombinante e o pico não retido. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, após esse período as mesmas foram coradas com vermelho congo 0,1% (m/v) para a observação da formação de halos.

### 5.10.2 Ensaio de atividade quitinásica

O ensaio enzimático para a detecção de atividade quitinásica foi feito de acordo com o método colorimétrico desenvolvido por Boller e colaboradores (1983), tendo como parâmetro a liberação de *N*-acetil-*D*-glucosamina a partir da ação hidrolítica da proteína sob a quitina coloidal.

Para o ensaio, foram incubados 250 µL das amostras com 250 µL de quitina coloidal 1% (m/v) a 37 °C por 1 h, sob leve agitação. Em seguida, a reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C em banho-maria, por 5 min e resfriada imediatamente em banho de gelo. Após o resfriamento as amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 10 min a 25 °C) e 300 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo contendo 10 µL de β-glucoronidase (13,2 U/mL). Essa mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e a resfriada imediatamente em banho de gelo. Foram adicionados 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 190 µL de tetraborato de potássio 600 mM á mistura e, em seguida, esta foi novamente aquecida a 100 °C por 5 minutos e resfriada em banho-de-gelo. Foi adicionado 1 mL de uma solução de p-dimetilaminobenzaldeído [DMAB 10% (m/v) preparado em ácido acético contendo 12,5% de HCl 11,5 M] diluída 1x em ácido acético PA e essa mistura foi incubada a 37 °C por 20 min e a leitura de absorbância a 585nm foi feita. Para calcular a quantidade de *N*-acetil-*D*-glucosamina liberado foi utilizado uma curva padrão construída a

partir de concentrações conhecidas desse açúcar, em um intervalo de 100 a 1000  $\mu\text{M}$  (REISSIG *et al.*, 1955).

### **5.11 Obtenção de oligômeros de quitosana**

Os oligômeros de quitosana liberados pela rCv3931 foram obtidos mantendo a proteína recombinante em contato com quitosana 0,1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 por 24 h a 37 °C sob agitação constante. Após essa incubação, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante armazenado até o uso.

### **5.12 Atividade antibacteriana**

#### **5.12.1 Preparação dos inóculos**

Os inóculos da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p) e da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foram preparados escolhendo-se uma colônia da cepa isolada em ágar Muller-Hinton e inoculando estas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) caldo por 16 h a 37 °C. O meio BHI caldo contendo as bactérias foi diluído em solução salina 0,9% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland.

#### **5.12.2 Atividade antibacteriana por difusão em placa**

Para a avaliação da atividade antimicrobiana da rCv3931 e dos oligômeros de quitosana liberados quando a rCv3931 está em contato com esse polímero, foi empregado o método de difusão em ágar. Cada suspensão de microrganismo foi semeada, com auxílio de um *swab* descartável, em toda a superfície de meio ágar Muller Hinton. Em seguida, foram feitos poços de 0,8 cm de diâmetro e as amostras foram aplicadas. Após a incubação das placas a 37 °C por 24 h, foi realizada a avaliação dos resultados, observando a formação de halos ao redor dos poços contendo as amostras. Em todas as placas avaliadas também foram aplicados um controle negativo (Fração 0/95 de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada com pET303CT-His íntegro) e um controle positivo (Amicacina 200 mg/mL nas concentrações adequadas para cada microrganismo utilizado)

## 5.13 Predição da estrutura 3D

### 5.13.1 Construção do modelo

Para a construção do modelo 3D da quitosanase de *C. violaceum* (Cv3931), a sequência de aminoácidos correspondente a região madura da proteína foi submetida aos seguintes servidores: Phyre<sup>2</sup> (KELLEY *et al.*, 2015), Swiss-Model (BIASINI *et al.*, 2014), M4T (FUENDES *et al.*, 2007), utilizando o modo automático. O modelo também foi obtido empregando o software MODELLER (WEBB *et al.*, 2014), usando como template as estruturas das proteínas: 1CHQ, 1QGI, 4ILY e 4OLT, todas elas quitosanasas.

### 5.13.2 Validação do modelo

Para a validação dos modelos obtidos, estes foram submetidos à avaliação de parâmetros geométricos e estereoquímicos no servidor Molprobity (CHEN *et al.*, 2010). O RMSD (*root-mean-square deviation*) foi calculado com o programa PyMol (The PyMOL *Molecular Graphics System*, Version 1.8 Schrödinger, LLC), utilizando como parâmetro os *templates* selecionados pelos servidores ou manualmente (MODELLER). O melhor modelo obtido em relação aos aminoácidos fora do *plot* Ramachandra e ao RMSD foi otimizado pelo servidor GALAXY (SHIN *et al.*, 2014).

Em seguida, a qualidade geral do modelo foi obtida a partir do *Z-score* do servidor ProSa-Web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), o fator de qualidade global do modelo calculado pelo servidor ERRAT2 (COLOVOS; YEATES, 1993); o 3D-1D *avegare score* obtido do servidor VERIFY\_3D (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991). O servidor SolvX (HOLM; SANDER, 1992) também foi usado para a validação, a partir do seu *score* geral que avalia o perfil de solvatação do modelo.

## 5.14 Docking molecular

Para a realização da análise de interação molecular (*Docking* Molecular), o software Autodock tools (MORRIS *et al.*, 2009) foi utilizado. O modelo 3D validado da Cv3931 foi usado juntamente com o ligante selecionado com base na estrutura complexada com a quitosanase de *Bacillus circulans* (PDB 1QGI): um dímero de *D*-glucosamina ligado a *N*-acetil-*D*-glucosamina [(GlcN)<sub>2</sub>-GlcNAc]. A análise de interação molecular também foi realizada com um trímero de *N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc)<sub>3</sub>, ligante de uma quitinase de *Ostrinia furnacalis* (PDB 3W4R), um trímero de *D*-glucosamina (GlcN)<sub>3</sub>, desenhado *ab initio*

pelo software Marvin Sketch 15.6.15 e com um *N*-acetil-*D*-glucosamina ligado a dímero de *D*-glucosamina [GlcNAc-(GlcN)<sub>2</sub>] também desenhado *ab initio* pelo software mencionado anteriormente.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Características da estrutura primária

Analisando a estrutura primária da Cv3931 nos servidores SignalP 4.1, Signal-CF, PrediSi e selecionando a opção de bactéria Gram-negativa, foi mostrado que, dentre os 360 aminoácidos contidos na sequência codificada da ORF da Cv3931, existe a presença de um peptídeo sinal (PS) de 29 aminoácidos da região N-terminal da proteína. O PS será identificado pela célula, irá direcionar a proteína para a região onde a mesma exercerá sua atividade e será clivado por proteases específicas. Com a clivagem da sequência referente ao PS, uma proteína com 331 aminoácidos será formada. Essa clivagem ocorre entre os aminoácidos Ala<sup>29</sup> e Glu<sup>30</sup>. A figura 5 mostra os gráficos relacionados aos servidores SignalP 4.1, Signal-CF e PrediSi e o ponto de clivagem do peptídeo sinal.

O valor do *cutoff* para bactérias Gram-negativas do servidor SignalP 4.1 é de 0,570, já para o servidor PrediSi é 0,5, esse valor é otimizado por correlação para cada classe de organismos, melhorando, assim, a acurácia dos resultados (Tabela 2). A sequência do peptídeo sinal predita pelos servidores utilizados está de acordo com as características gerais de um peptídeo sinal: Uma sequência de 20 a 30 aminoácidos com uma região N carregada positivamente, seguida por uma região H hidrofóbica de 7 a 13 aminoácidos e uma região levemente polar terminando a sequência sinal (Figura 4). A região N do peptídeo sinal descrito possui um pI de 10.29, a região H possui uma sequência de 13 aminoácidos hidrofóbicos e a região C possui um pI de 5.24. A sequência da Cv3931 também foi submetida no servidor SecretomeP, onde um SecP *score* de 0.960 foi obtido, esse servidor tem um *cutoff* de 0.5 para bactérias, também afirmando a presença de um peptídeo sinal na proteína em questão já que o servidor SecretomeP apresenta predições *ab initio*, diferente dos servidores que apresentam algoritmos baseados em outras proteínas.

Os resultados das análises com o servidor PSORTb apontaram Cv3931 como uma proteína extracelular com um *score* de localização de 9.64 (Tabela 3). Essa predição condiz com várias quitosanases bacterianas que são exportadas para o meio extracelular, incluindo tanto bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* (LIANG *et al* 2014; RIVAS *et al*, 2000; YEON *et al*, 2004), *Streptomyces* (BROUCHER *et al*, 1992), bem como bactérias Gram-negativas como *Burkholderia gladioli* (SHIMOSAKA *et al*, 2000).

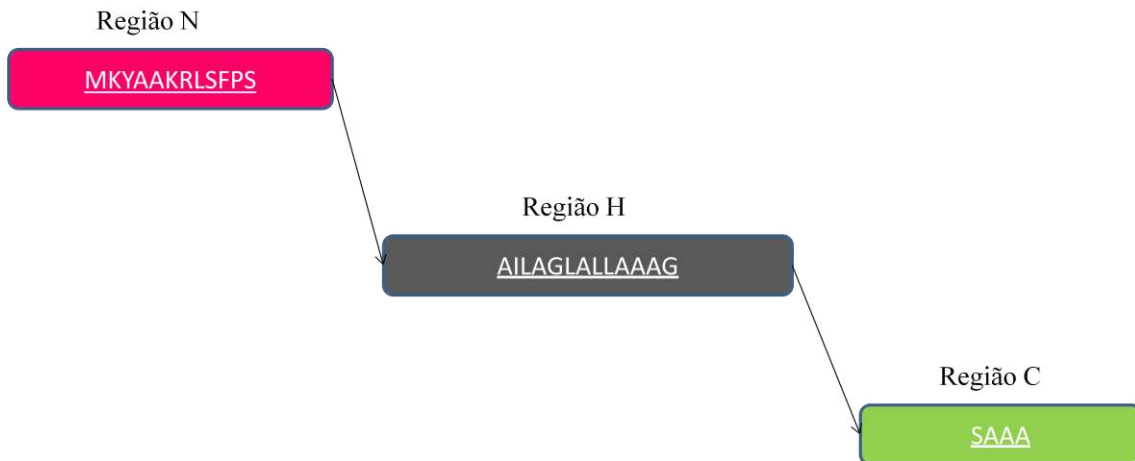
A predição dos servidores SignalP, Signal-CF, PrediSi e SecretomeP de que a Cv3931 possui um peptídeo sinal é corroborada com a predição do servidor PSORTb, já que, para que uma proteína seja direcionada para o local onde essa molécula exercerá sua atividade, esta precisa da presença de um PS para que proteínas transportadoras o identifiquem e a exportem.

No caso da Cv3931 o local onde o seu provável peptídeo sinal irá exportá-la, de acordo com as predições do servidor PSORTb, é o meio extracelular.

Tabela 2 – *Scores* dos servidores usados para predição do peptídeo sinal de Cv3931

Servidor	Parâmetro	Nº de aminoácidos do Peptídeo Sinal	Confiabilidade
SignalP	<i>D-score</i>	29	79.3%
SecretomeP	<i>Sec-score</i>	-	96%
PrediSi	<i>S-score</i>	29	91.27%
Signal-CF	-	29	100%

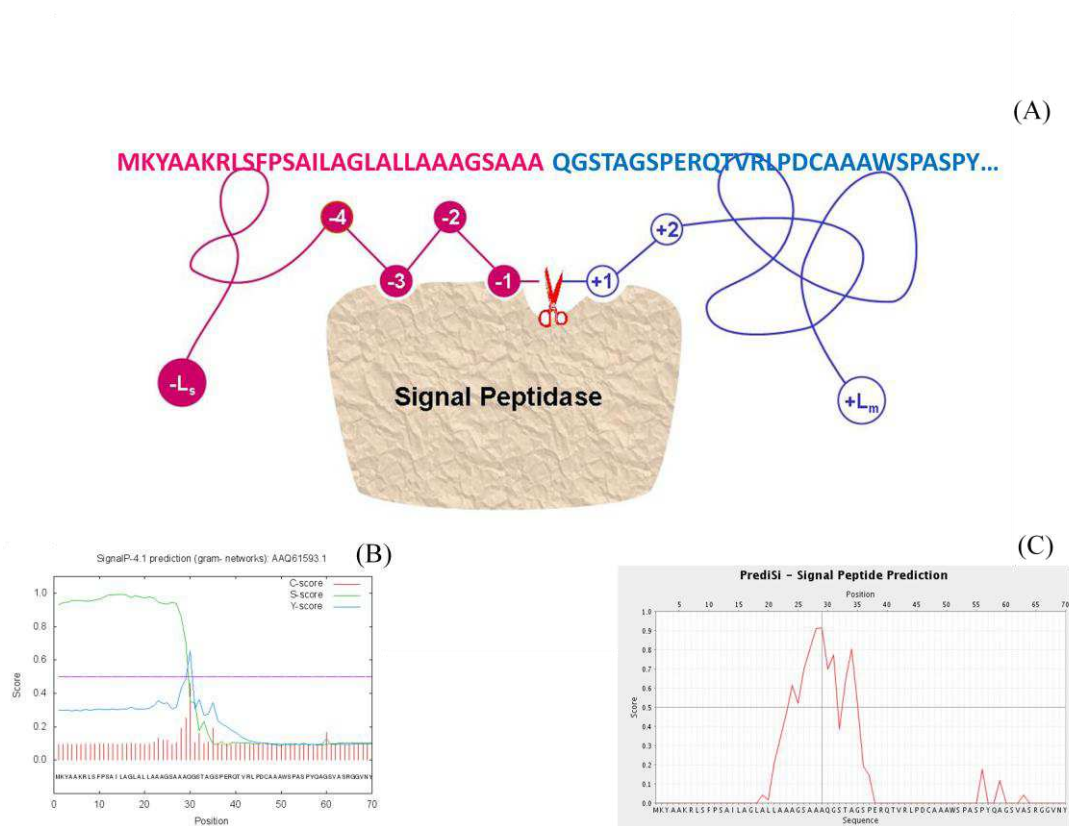
Figura 4 – Divisão das regiões do provável peptídeo sinal da Cv3931



Fonte: Própria autora

A região N em rosa se refere a sequência de aminoácidos básicos que inicia o peptídeo sinal, enquanto a região H se refere a sequência de aminoácidos hidrofóbicos do PS e a região C a sequência de aminoácidos levemente polar localizada no final do peptídeo sinal.

Figura 5- Demonstração do ponto de clivagem do peptídeo sinal da Cv3931



(A) Demonstração do ponto de clivagem do peptídeo sinal da Cv3931 no servidor Signal-CF, onde a sequência em rosa se refere ao peptídeo sinal e a sequência em azul se refere ao início da proteína madura. (B) Gráfico fornecido pelo servidor SignalP 4.1 demonstrando o ponto de clivagem do peptídeo sinal da Cv3931 e os *scores* C, S, Y utilizados no servidor para o cálculo do *D-score*. (C) Gráfico fornecido pelo servidor PrediSi demonstrando o ponto de clivagem do peptídeo sinal da Cv3931 e o *S-score* utilizado no servidor.

Tabela 3- *Scores* de localização referentes ao servidor PSORTb

<i>Scores</i> de Localização:	
Citoplasma	0.01
Membrana Citoplasmática	0.01
Periplasma	0.11
Membrana Externa	0.23
Extracelular	9.64
Predição Final: Extracelular	9.64

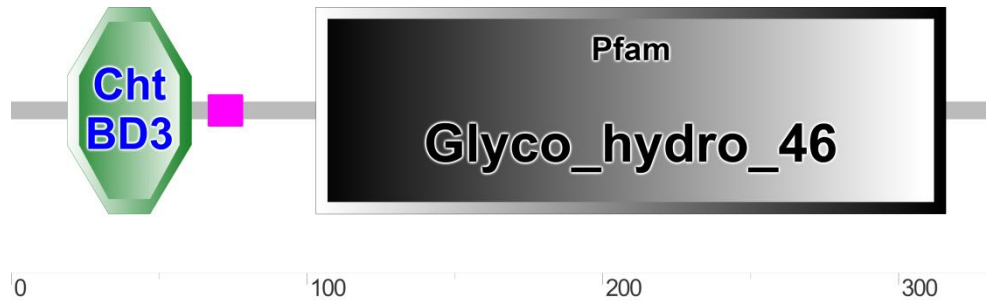
## 6.2 Domínios conservados

A sequência de aminoácidos da Cv3931 foi submetida aos servidores CDD, e SMART e a identificação de domínios conservados foi possível, tais como o da família GH46, que é uma família que possui proteínas que são essencialmente endo- $\beta$ -1,4-quitosanases, e um domínio de ligação a carboidrato Cht\_BD3, que condiz com um domínio de ligação a quitina.

O servidor CDD aponta que o domínio que identifica as proteínas da família GH46 está no intervalo dos resíduos 92 a 316, com um *E-value* de  $1.27e^{-93}$ . Já o servidor SMART indica que este domínio está localizado entre os resíduos 103 e 316 com um *E-value* de  $4.30e^{-58}$ . O domínio de ligação a quitina Cht\_BD3 foi identificado entre os resíduos de aminoácidos 19 e 59 (*E-value*:  $2.45e^{-6}$ ) pelo servidor CDD e entre os resíduos 19 e 61 ( $2.24e^{-7}$ ). A Figura 6 mostra os domínios encontrados.

O domínio de ligação a quitina Cht\_BD3 está geralmente relacionado a quitinases e outras proteínas de ligação a quitina. Não há muitos relatos de quitosanases com esse domínio, porém Shimosaka *et al* (2000) analisou a sequência de aminoácidos de uma quitosanase de *Burkholderia gladioli* e identificou uma região que mostrou alta similaridade com um domínio de ligação a quitina de quitinases bacterianas, no entanto depois de análises da proteína nativa, o mesmo autor sugeriu que esse domínio seria clivado durante a produção da quitosanase madura.

Figura 6 - Representação dos domínios encontrados na sequência da Cv3931



Fonte: <http://smart.embl-heidelberg.de>

### 6.3 Características físico-químicas

Utilizando a ferramenta Protparam do servidor ExPasy e o servidor XtalPred, as características físico-químicas da Cv3931 foram identificadas. A massa molecular teórica ( $M_r$ ), o ponto isoelétrico (pI), o índice de instabilidade (II) e o índice de hidrofobicidade (GRAVY) foram avaliados nos dois servidores, já o índice alifático (IA) e o tempo de meia vida da proteína em *E. coli* foram previsto apenas pela ferramenta Protparam e a maior região de desordem apenas pelo servidor XtalPred. A tabela 4 mostra a comparação entre as características físico-químicas obtidas nos dois os servidores.

Os resultados gerados pelos servidores foram condizentes. A massa molecular teórica média ( $M_r$ ) predita pela ferramenta Protparam e pelo servidor XtalPred foi de aproximadamente 35,680 KDa, o ponto isoelétrico teórico foi de 8,54, o índice de instabilidade e o índice de hidrofobicidade foram de aproximadamente 29,245 e -0,627, respectivamente. O índice alifático predito pela ferramenta Protparam foi de 56,74 e o tempo de meia-vida em *E. coli* predito também por esta ferramenta foi de 10 horas *in vivo*. Foram encontradas 12 estruturas resolvidas de proteínas com similaridade significativa a Cv3931, dentre elas se encontram 6 quitosanases e 6 quitinases, onde os maiores *E-values* ( $3.0e^{-83}$  e  $3.0e^{-70}$ , respectivamente) foram encontrados com duas quitosanases, uma de *Bacillus circulans* (SAITO *et al.*, 1999) (PDB 1QGI) e outra de *Streptomyces* sp. (TAKASUKA *et al.*, 2014) (PDB 4ILY).

A massa molecular teórica de 35,68 kDa predita para a Cv3931 é um pouco maior do que a massa molecular de outras quitosanases da mesma família (GH46), incluindo as quitosanases citadas com similaridade significativa a Cv3931, as massas moleculares das quitosanases de *Bacillus circulans* e de *Streptomyces* sp. são, respectivamente, de aproximadamente 29 e 27 kDa. A  $M_r$  maior de Cv3931 em relação a outras quitosanases similares provavelmente está relacionada ao domínio de ligação a quitina citado anteriormente.

O índice de instabilidade proporciona uma estimativa da proteína analisada em um tubo de ensaio. Uma proteína é considerada estável se seu II for menor que 40. (GURUPRASAD *et al.*, 1990) No caso de Cv3931 esse valor foi de 29,245, o que, pelos parâmetros de índice de instabilidade, classifica essa proteína como estável. O índice de hidrofobicidade (GRAVY) está relacionado com a polaridade da proteína, esse índice é calculado adicionando o valor de hidropaticidade para cada resíduo de aminoácido da proteína e dividindo esse valor pelo número total de resíduos. Valores negativos indicam uma proteína com interações polares, já valores positivos indicam uma proteína com interações apolares.

Para a Cv3931 esse valor foi de aproximadamente -0,630, considerando que os valores desse índice variam de +2 a -2 para a maioria das proteínas, esse resultado aponta essa proteína como polar. Já o índice alifático está relacionado à termoestabilidade de uma proteína e é definido como o volume relativo ocupado por cadeias laterais alifáticas (IKAI, 1980). Quanto maior esse índice, mais estável é a proteína, o que indica que a Cv3931 (IA = 56,74) é uma proteína termoestável.

Tabela 4 - Características físico-químicas preditas pelos servidores ExPasy-ProtParam e XtalPred

	<b>Proteína</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>Mr (KDa)</b>	<b>pI teórico</b>	<b>II</b>	<b>IA</b>	<b>GRAVY</b>
<b><i>ProtParam</i></b>	<i>Cv3931</i>	<i>331</i>	35,678	8,54	29,250	56,74	-0,625
<b><i>XtalPred</i></b>	<i>Cv3931</i>	<i>331</i>	35,683	8,54	29,240	-	-0,630
<b>Média</b>			35,680	8,54	29,245		-0,627

O servidor DiANNA fez predições de duas pontes dissulfeto na Cv3931, uma entre Cys<sup>18</sup> e Cys<sup>64</sup> e outra entre Cys<sup>122</sup> e Cys<sup>196</sup>. As ligações dissulfeto são importantes para a estabilidade e a função de muitas proteínas secretadas e em bactérias Gram-negativas, estas ligações são catalisadas por oxidorreduasas de tiol-dissulfeto (Dsb) no periplasma (REARDON-ROBINSON *et al.*, 2015). Sendo Cv3931 predita como uma proteína secretada para o meio extracelular, as pontes dissulfeto podem exercer um papel fundamental na estabilidade dessa proteína. Saito (1999) descreveu que a quitosanase de *Bacillus circulans* (PDB 1QGI), que mostra uma grande similaridade com Cv3931, possui uma ponte dissulfeto entre Cys<sup>50</sup> e Cys<sup>124</sup>, reforçando assim a presença dessas ligações em Cv3931.

#### **6.4 Amplificação da ORF Cv3931**

O resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada com os iniciadores específicos para a sequência completa da ORF Cv3931, incluindo seu peptídeo sinal, para a posterior expressão em *Escherichia coli* pode ser visualizado na figura 7, onde se mostra um gel de agarose 1% evidenciando uma reação com um gradiente de temperatura que foi feita no intuito de encontrar a melhor condição para o pareamento dos iniciadores com o molde de DNA genômico de *C. violaceum*. A melhor temperatura encontrada foi a de 63,2 °C. As bandas observadas são de aproximadamente 1.1 kB e estão condizentes com o tamanho da ORF da Cv3931 encontrada no banco de dados *GenBank*.

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1 % mostrando um gradiente de temperatura para a amplificação da ORF da Cv3931



Foram utilizadas 12 temperaturas de pareamento, de 52 a 72 °C para a amplificação da sequência da ORF de Cv3931. O poço MM contém 200 ng do marcador 1 kb DNA *Ladder* (Promega), os outros poços contêm os produtos das reações em cadeia da polimerase nas diferentes temperaturas usadas.

### 6.5 Clonagem da ORF Cv3931 no vetor de expressão pET303/CT-His

Após a confirmação da amplificação específica dos produtos desejados, reações de PCR em quadruplicata foram realizadas com o intuito de obter uma quantidade satisfatória de produto para digestão e inserção do mesmo no vetor pET303/CT-His. À vista disso, os produtos de PCR purificados e o plasmídeo pET303/CT-His foram digeridos com as enzimas *Xho* I e *Xba* I. Após a digestão, uma reação de ligação com a T<sub>4</sub> DNA ligase foi realizada. Placas de meio LB ágar (com 200 µg/mL de ampicilina) foram inoculadas com *E. coli* DH5α possivelmente transformadas com os produtos da ligação com a T<sub>4</sub> DNA ligase. Foram selecionadas 4 colônias para a extração de DNA plasmidial e confirmação da transformação. A figura 8 mostra a eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos extraídos das colônias selecionadas. Para a confirmação da transformação, o produto da purificação plasmidial foi digerido com a enzima *Xho* I. Os resultados mostram que todas as 4 colônias selecionadas estavam transformadas com o plasmídeo pET ligado a sequência da ORF Cv3931 já que a banda mostrada no gel de 6.214 pb, comparada ao controle referente ao plasmídeo íntegro de 5.014 pb, está condizente com o tamanho deste plasmídeo ligado a ORF Cv3931 que possui 1.087 pb. A massa molecular real do plasmídeo íntegro é de 5.369 pb, mas considerando que na migração eletroforética uma massa de 5.014 pb foi encontrada, esta foi utilizada como base para as análises.

Figura 8 – Eletroforese do gel de agarose 0,8% referente a confirmação da clonagem da ORF *Cv3931* com o plamídeo pET303CT-His



O poço MM contém 300 ng do marcador  $\lambda$ DNA/Hind III Fragments (BioLabs) e os poços de 1 a 4 contém 500 ng dos plamídeos pET303/CT-His::*Cv 3931* extraídos dos clones de 1 a 4. O poço 500 ng do plamídeo pET303/CT-His íntegro.

## 6.6 Indução da expressão da proteína recombinante rCv3931 em diferentes estirpes de *Escherichia coli*

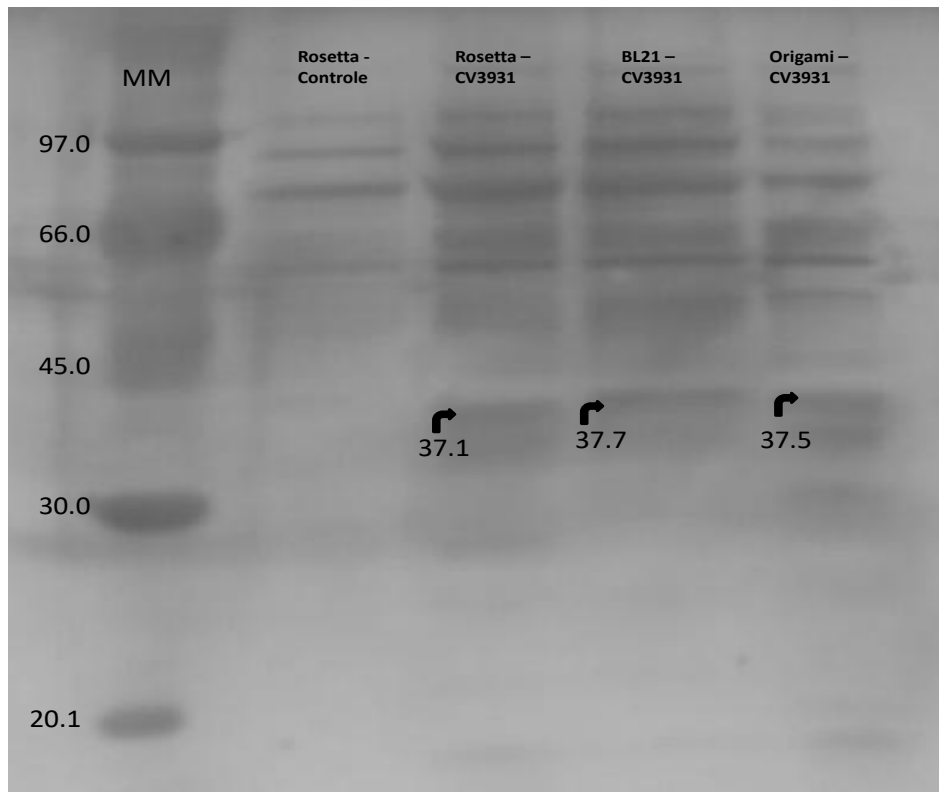
A indução da expressão da quitosanase recombinantes de *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) e OrigamiB (DE3) pLysS foi realizada com clones escolhidos de forma aleatória. A indução da expressão foi feita a 37 °C sob agitação constante, com adição de IPTG 500 mM para uma concentração final de 0,4 mM. A coleta dos sobrenadantes foi realizada após 24 horas de indução.

A figura 9 mostra o gel de eletroforese SDS-PAGE 15% com as amostras da fração 0/95 do meio livre de células das três estirpes de *E. coli* transformadas com pET303/CT-His::Cv3931. Todas as estirpes apresentam uma banda em torno de 37 kDa que não é encontrada no controle [fração 0/95 do meio livre de células de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada com pET303/CT-His íntegro], tendo em vista que a massa molecular predita para Cv3931 é de 35.6 kDa e que o plasmídeo utilizado para a expressão de rCv3931 adiciona 6 resíduos de histidina no C-terminal de proteínas recombinantes, a massa molecular aparente em torno de 37 kDa indica que a proteína rCv3931 foi produzida com sucesso pelas três estirpes de *E. coli* [BL21 (DE3), Rosetta (DE3), OrigamiB (DE3) pLysS], sendo secretada para o meio de cultura por meio do seu peptídeo sinal endógeno.

Lobo e colaboradores (2013) clonaram e expressaram uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* com o seu peptídeo sinal endógeno em *E. coli* BL21 (DE3). A quitinase recombinante foi secretada para o meio extracelular e análises da fração periplasmática e do extrato intracelular total solúvel revelaram que apenas uma pequena parte da proteína recombinante não havia sido secretada. O fato de que essa quitinase, assim como Cv3931, é de *C. violaceum* e também foi expressa em *E. coli*, reforça que o peptídeo sinal endógeno de rCv3931 foi reconhecido e essa proteína foi secretada para o meio extracelular.

A secreção para o meio extracelular de um hospedeiro de produção de proteínas recombinantes relevantes para fins biotecnológicos é uma possibilidade alternativa atrativa comparada às estratégias de expressão intracelular já que facilita muito o processamento *downstream* e reduz significativamente os custos de produção da proteína alvo desejada. (FREUDL, 2017). Portanto, a secreção bem sucedida de rCv3931 para o meio de cultura é de extrema importância para que essa proteína possa ter futuras aplicações industriais.

Figura 9 – Gel de eletroforese SDS-PAGE evidenciando a expressão de rCv3931



Análise por SDS-PAGE da fração 0/95 do meio livre de células obtido a partir da indução da expressão de rCv3931 em células de *E. coli* Rosetta (DE3), BL21 (DE3) e OrigamiB (DE3) pLyss transformada com o vetor pET303/CT-His::Cv3931. A massa molecular aparente (kDa) das bandas referentes à quitosanase recombinante, indicadas pelas setas pretas, foram estimadas utilizando o marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare), representado no poço M.

Analisando a atividade quitosanásica em placa contendo quitosana 0,1% (m/v) da Fração 0/95 das três estirpes utilizadas para a expressão de rCv3931 (Figura 10), onde 56 µg de proteína foram aplicados em cada poço, pode-se observar que houve formação de halos de degradação para todas as frações 0/95 das estirpes de *E. coli* utilizadas, levantando mais um indício de que de rCv3931 foi produzida e secretada para o meio extracelular com sucesso.

Apesar de haver a formação de halos de degradação referentes as frações 0/95 das três estirpes utilizadas, notou-se que o halo produzido por F0/95 do secretado de OrigamiB (DE3) pLyss (2,8 cm) foi maior comparado aos halos de degradação da F0/95 de BL21 (DE3) (2,5 cm) e Rosetta (DE3) (2,3 cm). Essa diferença pode ter ocorrido devido à característica intrínseca de estirpes de *E. coli* Origami de facilitar a formação de ponte dissulfeto em proteínas recombinantes. Ponte dissulfeto são importantes para a estabilidade e dobramento de proteínas e sendo Cv3931 uma proteína com uma predição para a formação de duas pontes dissulfeto (Item 6.3), a característica intrínseca de Origami de promover a formação dessas interações pode ter influenciado na maior atividade enzimática da proteína recombinante produzida por essa estirpe.

Figura 10 – Perfil da atividade quitosanasica em placa da F0/95 das três estirpes usadas para produção de rCv3931.

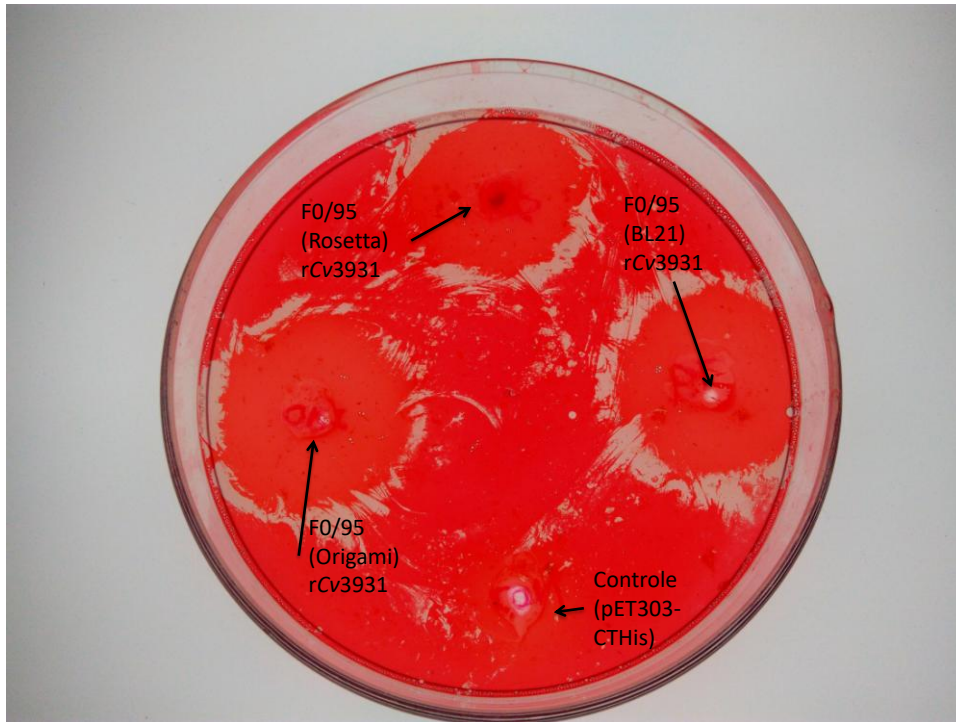


Imagem da atividade quitosanasica em placa evidenciando a atividade enzimática da proteína recombinante das três estirpes de *Escherichia coli* utilizadas na expressão de rCv3931.

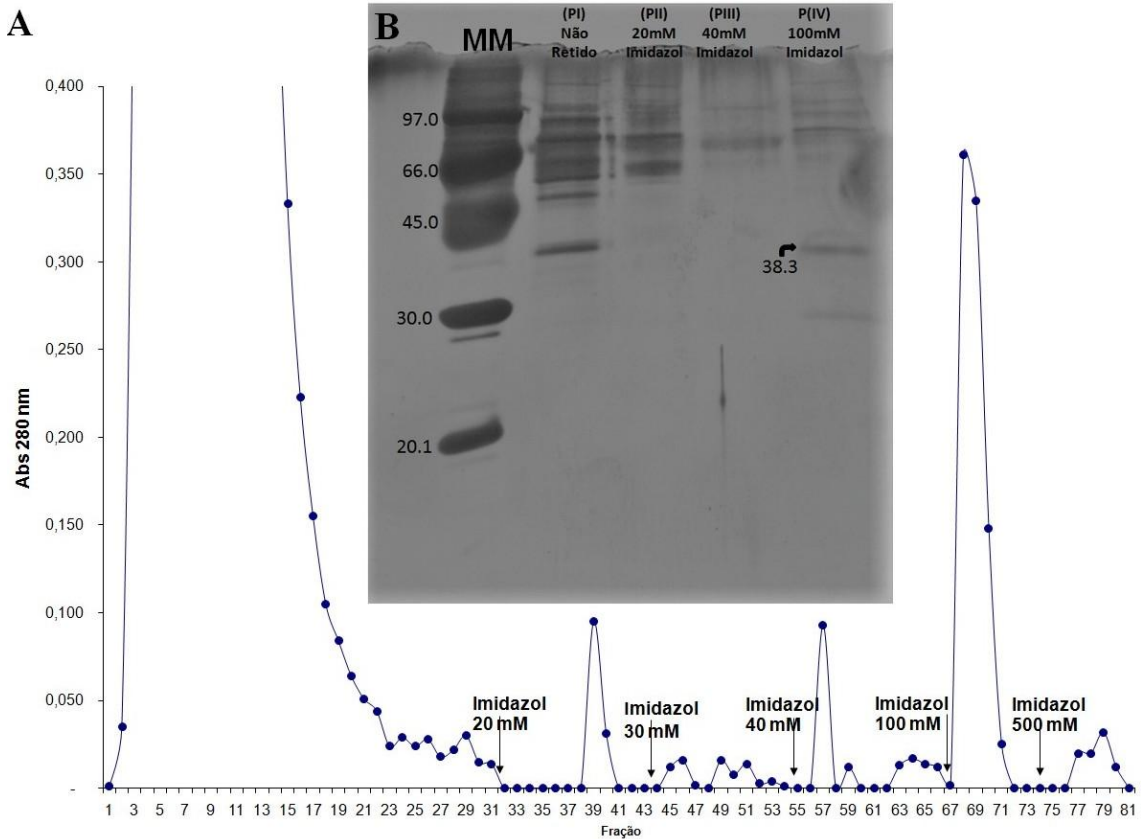
## 6.7 Purificação da quitosanase recombinante

Tendo em vista que o vetor utilizado para a expressão de rCv3931 adiciona uma calda de histidina ao C-terminal das proteínas, uma matriz de *Sepharose* com níquel imobilizado foi utilizada visando a purificação da quitosanase recombinante. As amostras das três frações 0/95 das estirpes utilizadas foram juntas, essa amostra foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e foi aplicada na matrix.

O pico não retido (PI), eluído com o tampão de equilíbrio (de sódio 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e 5 mM de imidazol), foi recuperado a um fluxo constante de 700  $\mu$ L/minuto. Já o material retido na matriz foi eluído em concentrações crescentes de imidazol (20 a 100 mM) e um fluxo constante de 700  $\mu$ L/minuto. Todas as alíquotas foram analisadas através da absorbância 280 nm ao longo de todo o processo cromatográfico (Figura 11-A).

As alíquotas dos picos retidos eluídos com fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e imidazol nas concentrações (20, 40 e 100 mM) que apresentaram as maiores leituras em  $A_{280}$  foram reunidas e dialisadas exaustivamente contra água. Essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 11-B).

Figura 11 – Purificação da quitosanasase recombinante de *C. violaceum*



(A) Perfil cromatográfico do processo de purificação da rCv3931. (B) Análise do perfil cromatográfico por SDS-PAGE. O poço MM se refere ao marcador de peso molecular *Low Molecular Weight* (GE Healthcare). Os poços seguintes se referem ao pico não retido em matriz de *Sepharose* com níquel imobilizado (PI) e os picos retidos eluídos com diferentes concentrações de imidazol (20, 40, 100 mM).

Foi possível a observação de uma banda de aproximadamente 38,3 kDa no pico retido eluído com 100 mM de imidazol (PIV) e uma banda muito semelhante de aproximadamente 38,7 kDa no pico não retido (PI). Para averiguar em qual pico cromatográfico, PIV ou PI, a rCv3931 foi eluída ou se ambas as bandas identificadas nos diferentes picos representam a proteína recombinante, uma atividade enzimática com PI e PIV foi realizada (Figura 12). Foram aplicadas 56 µg de proteína nos poços que representam o controle [F0/95 de Rosetta (DE3) transformada com pET303/CT-His íntegro] e 0/95 de Rosetta (DE3) transformada com pET303/CT-His::Cv3931, 14 µg no poço que representa PI e 6,3 µg no poço que representa PIV. Como esperado, foi observado um halo de degradação na fração 0/95 de (DE3) transformada com pET303/CT-His::Cv3931 (2,25 cm). Outro halo de degradação foi observado ao redor do poço onde o PIV foi aplicado (2,7 cm), o que evidencia que a proteína recombinante interagiu com a matrix de *Sepharose* acoplada com níquel e foi eluída com 100 mM de imidazol tendo em vista que o pico não retido (PI), comparado ao controle, não apresentou nenhuma atividade significativa.

Figura 12 – Atividade quitosanásica dos picos cromatográficos

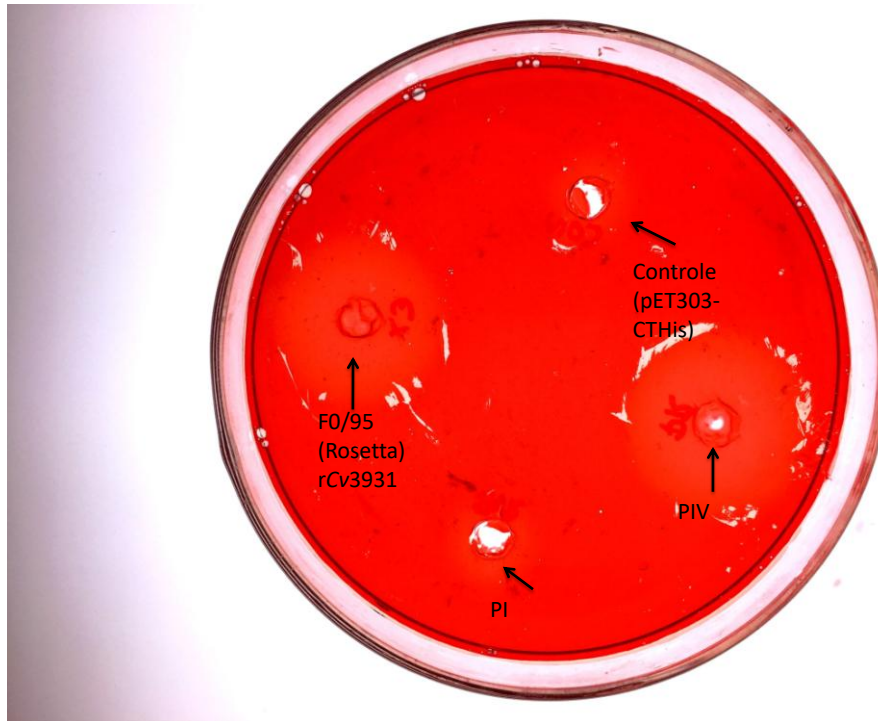


Imagem referente a atividade quitosanásica em placa dos picos cromatográficos da matriz de *Sepharose* acoplada com níquel comparando PI e PIV ao controle [Rosetta (DE3) transformada com pET 303/CT-His íntegro] e a F0/95 de Rosetta (DE3) transformada com pET 303/CT-His::Cv3931.

### **6.8 Atividade quitinásica de rCv3931**

Não foi observada atividade quitinolítica em rCv3931, sendo testados todas as F(0/95) das estirpes utilizadas para a expressão da proteína recombinante e o pico IV da cromatografia. Resultado já esperado, considerando que quitosanases não possuem atividade quitinolítica descrita.

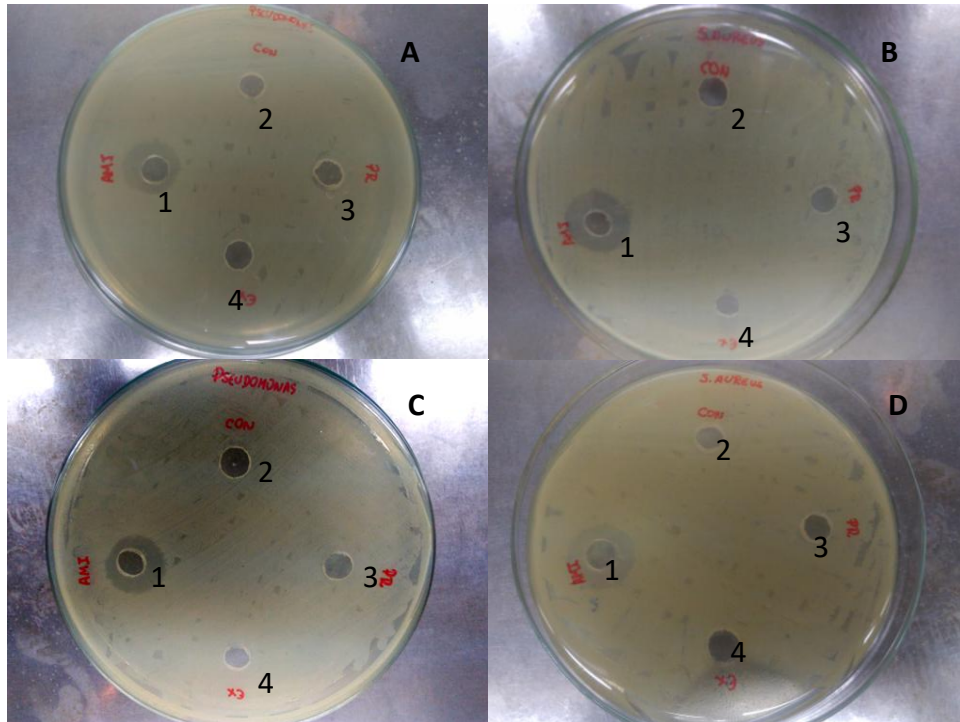
## 6.9 Atividade antibacteriana

### 6.9.1 Atividade antibacteriana de rCv3931

Os resultados da atividade antibacteriana por difusão em placa com a proteína rCv3931 em meio Ágar Muller Hinton normal e meio Ágar Muller Hinton com quitosana 0,1% (m/v) frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 6538p) bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (Figura 13) não demonstraram nenhuma inibição de crescimento bacteriano.

A falta de inibição nos poços onde a F0/95 do extrato secretado de OrigamiB (DE3) pLysS e do PIV da cromatografia realizada anteriormente pode ser devido a baixa quantidade de proteína aplicada, 100 µg para F0/95 do extrato secretado e 9 µg para o PIV da cromatografia. A repetição da atividade antibacteriana por difusão em placa com concentrações maior de proteína é necessária para averiguar se a falta de inibição do crescimento microbiano deve-se a baixa quantidade de proteína aplicada no ensaio ou se rCv3931 não apresenta a característica de inibir o crescimento dos microrganismos utilizados. Muslim *et al* (2016) avaliou a atividade antibiofilme de uma quitosanase de *Bacillus licheniformis* e essa proteína teve a capacidade de inibir a formação de biofilme de todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas neste estudo, sendo assim importante a avaliação do potencial antibiofilme de rCv3931.

Figura 13 – Atividade antibacteriana de rCv3931



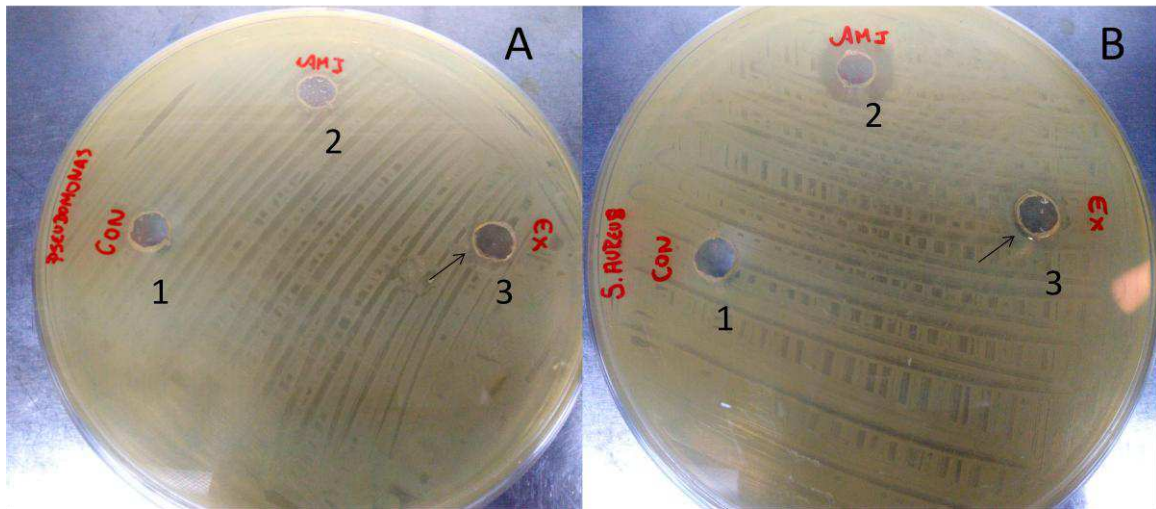
As figuras 13-A e 13-B mostram o ensaio feito com meio Agar Muller Hinton normal e as figuras 13-C e 13-D mostram o ensaio feito com meio Agar Muller Hinton com 0,1% (m/v) de quitosana. As placas das figuras 13-A e 13-C foram semeadas com *S. aureus* (ATCC 6538p) e as placas das figuras 13-B e 13-D com *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) Os poços 1 se referem ao antibiótico amicacina, usado como controle positivo nesse ensaio. Os poços 2 se referem a F0/95 do extrato secretado de Rosetta (DE3) transformada com pET303/CT-His íntegro. Os poços 3 e 4 se referem ao PIV da matrix de Sepharose acoplada com níquel e a F0/95 do extrato secretado de OrigamiB (DE3) pLysS transformada com pET303/CT-His::Cv3931, respectivamente.

### 6.9.2 Atividade antibacteriana dos oligômeros liberados por rCv3931 na degradação de quitosana

Os resultados da atividade antibacteriana por difusão em placa com os oligômeros de quitosana liberados quando rCv3931 ficou em contato com quitosana 0,1% por 24 h frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 6538p) e a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (Figura 14) demonstraram leve inibição do crescimento ao redor dos poços onde foram aplicados 100 µL de uma mistura de oligômeros obtida a partir de 500 µg da F0/95 do extrato secretado de OrigamiB (DE3) pLysS transformada com pET303/CT-His::Cv3931 em contato com quitosana (80% de deacetilação) 0,1% (m/v) por 24 h.

Lee *et al* (2009) testou a atividade antimicrobiana de oligômeros de quitosana *in vitro* e *in vivo* contra a bactéria Gram-negativa *Vibrio vulnificus* obtendo significativa diminuição de células viáveis de *V. vulnificus* em camundongos tratados com oligômeros de quitosana. Os autores desse trabalho utilizaram oligômeros já caracterizados, com 10 kDa e 1 kDa de massa molecular, o que mostra a necessidade da caracterização dos oligômeros liberados por rCv3931 quando essa proteína degrada a quitosana para que as melhores condições para a exploração do seu potencial antimicrobiano, além de outras atividades biológicas já relacionadas a oligômeros de quitosana. É importante salientar que, no trabalho citado, as concentrações dos oligômeros foram altas (0.5 a 10 mg/ml *in vivo* e 0.1 a 0.5 mg por rato), o que também evidencia a necessidade da quantificação e da otimização do método de obtenção dos oligômeros produzidos por rCv3931 para que aja a melhor avaliação do potencial e das concentrações mais efetivas para a realização dessa atividade.

Figura 14 – Atividade antibacteriana dos oligômeros de quitosana liberados por rCv3931



A figura 14-A se refere a placa com *Pseudomonas aeruginosa* e a figura 14-B a placa com *S. aureus*. Os poços com o número 1 se referem a F0/95 do extrato secretado de Rosetta (DE3) transformada com pET303/CT-His íntegro. Os poços com o número 2 se referem ao antibiótico amicacina, usado como controle positivo nesse ensaio. Os poços com o número 3 a F0/95 do extrato secretado de OrigamiB (DE3) pLysS transformada com pET303/CT-His::Cv3931. As setas apontam para onde houve uma leve inibição de crescimento ao redor os poços 3.

## 6.10 Construção e validação do modelo tridimensional de Cv3931

Para a construção de um modelo por homologia confiável, os servidores procuram e definem os melhores *templates* de estruturas já resolvidas com os menores *E-values* e com maior identidade entre as sequências.

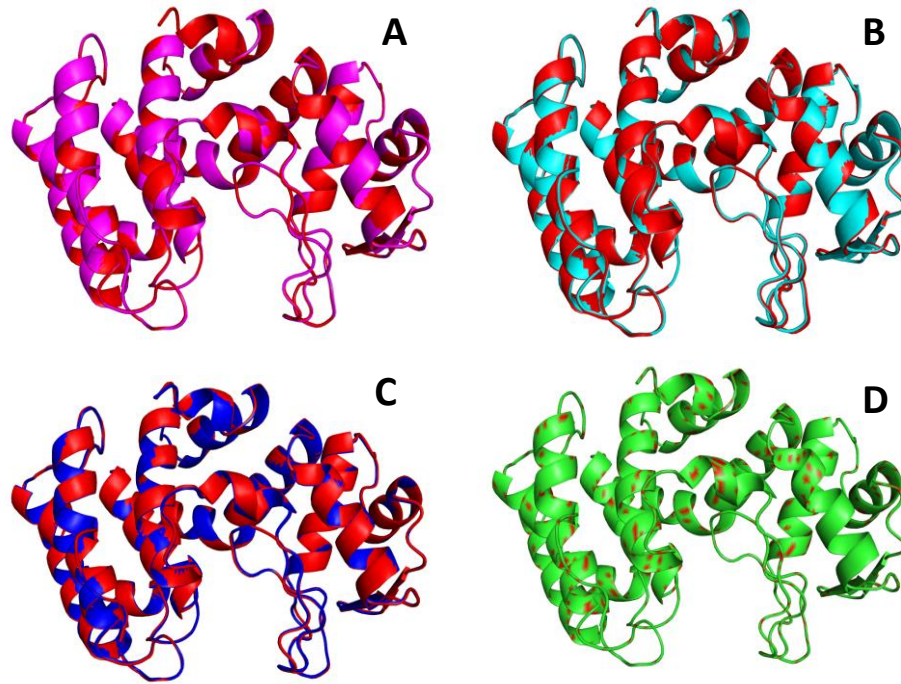
Três servidores e um software foram utilizados para a construção do modelo da Cv3931. O *template* 1QGI foi selecionado pelos servidores Phyre<sup>2</sup>, Swiss-Model e M4T, já com o software Modeller foram selecionados os *templates* 1CHQ, 1QGI, 4ILY, 4OLT, gerando um modelo para cada *template*. É importante salientar que nenhum dos servidores usados para construir os modelos de Cv3931 encontrou um *template* que tivesse uma identidade com os primeiros 72 resíduos de aminoácidos de Cv3931, que correspondem ao domínio de ligação a quitina dessa proteína. Considerando que os modelos de Cv3931 foram construídos por homologia, estes não apresentam essa parte da proteína.

Para avaliar o melhor modelo, o servidor Molprobitry foi utilizado para analisar todos os modelos gerados em relação aos pares  $\phi - \varphi$  distribuídos nas regiões favoráveis ou permitidas no *plot* de Ramachandran. Os cinco modelos gerados pelo software Modeller apresentavam 6, 4, 3, 2 e 8 resíduos fora da região permitida. O modelo gerado pelo servidor Swiss-Model apresentava 3 resíduos fora da região permitida; já o modelo do servidor M4T, 2 resíduos e o modelo do servidor Phyre<sup>2</sup> 2 resíduos. Outro parâmetro utilizado para avaliar o melhor modelo foi o cálculo do RMSD (tabela 5) (figura 15) com o *template* 1QGI, escolhido para a construção do modelo por todos os servidores, inclusive para o modelo do software MODELLER que obteve apenas 2 resíduos fora da região permitida no gráfico ramachanda.

Tabela 5 – Valores de RMSD para os modelos de Cv3931 com o *template* 1QGI

RMSD	
Modelo Cv3931 Swiss Model/1QGI	0,055
Modelo Cv3931 M4T/1QGI	0,130
Modelo Cv3931 MODELLER/ 1QGI	0,095
Modelo Cv3931 Phyre <sup>2</sup> /1QGI	0,000

Figura 15 – Sobreposição dos modelos de *Cv3931* com o *template* 1QGI



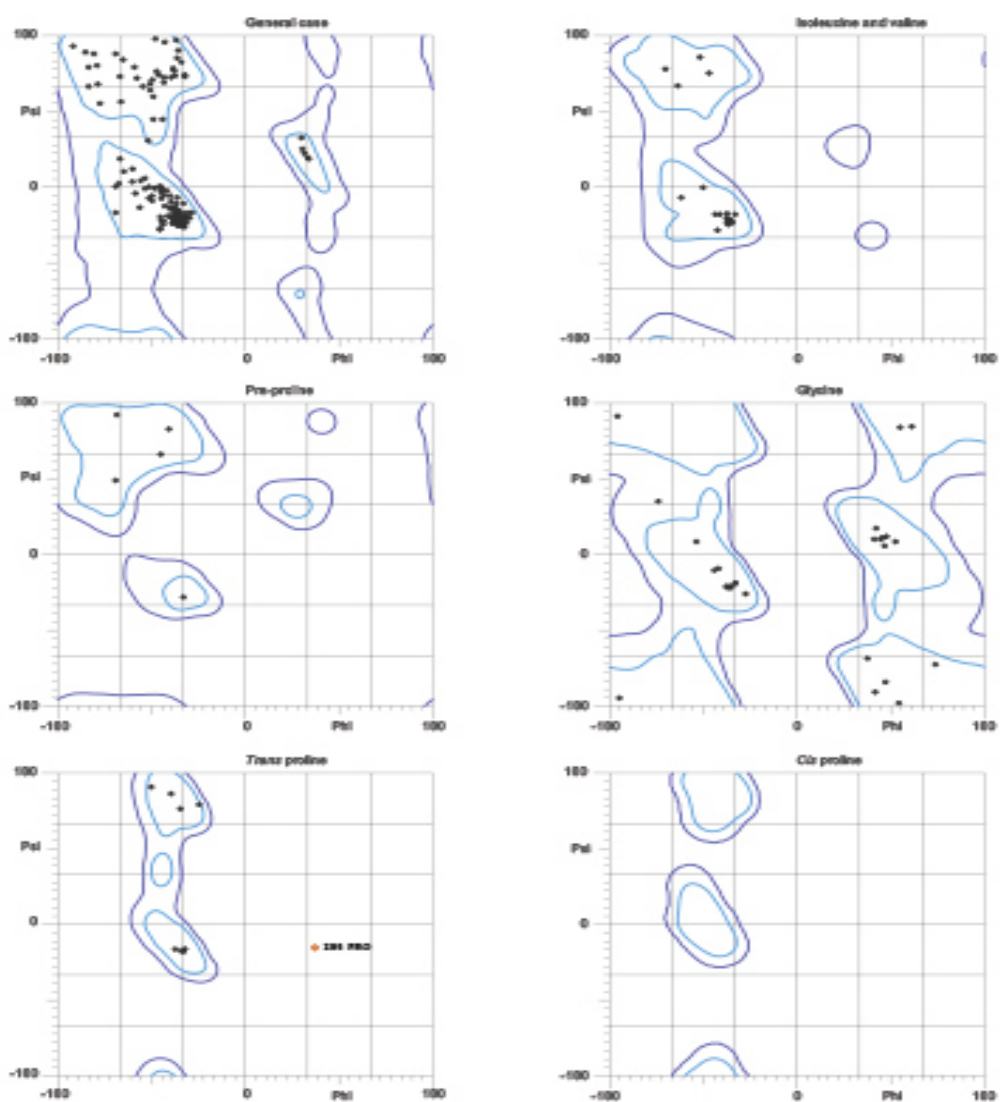
Em todas as figuras, 1QGI está representada em vermelho. A figura 15-A representa o modelo de *Cv3931* construído no servidor Swiss-Model em rosa; a figura 15-B, o modelo do servidor M4T em ciano; a figura 15-C, o modelo do software MODELLER em azul; e a figura 15-D, o modelo do servidor Phyre<sup>2</sup> em verde.

Com a análise do RMSD para todos os modelos de Cv3931 obtidos, foi possível observar que o modelo do servidor Phyre<sup>2</sup> se mostrou o melhor para Cv3931, já que este apresentou uma sobreposição perfeita (RMSD = 0,000) comparada ao *template* utilizado.

Para a otimização os resíduos que se encontravam fora da região permitida, o servidor Galaxy foi utilizado. O *plot* Ramachanda obtido após a otimização (Figura 16) mostra que apenas 1 resíduo, referente a prolina 295 está fora da região permitida. Considerando prolina um resíduo muito rígido para que seus ângulos sejam otimizados e que, no caso do modelo de Cv3931 comparado a 1QGI, não faz parte do sítio catalítico da proteína, esse modelo foi avaliado como bom para que outras análises fossem feitas.

O modelo de Cv3931 foi validado utilizando a qualidade geral do modelo foi avaliada pelo *Z-score* a partir do ProSaweb, o fator de qualidade global a partir do ERRAT2, o 3D-1D *Averaged score*, a partir do VERIFY\_3D e o *score* global do servidor Solvx. O *Z-score* teve um valor de -7,53, nesse plot, é baseado em grupos de estruturas de diferentes fontes (Raio-X e NMR) de proteínas com estruturas já resolvidas, representados em diferentes cores (Figura 17), sendo assim, o valor obtido para o modelo de Cv3931 está dentro dos padrões permitidos. O valor do fator de qualidade global do ERRAT2 foi de 98,387 (Figura 18), esse valor é baseado em estatísticas de interações não ligadas entre diferentes átomos; modelos de alta qualidade produzem fatores acima de 95, o que foi o caso do modelo de Cv3931. O VERIFY\_3D determina a compatibilidade de um modelo 3D com sua própria sequência de aminoácidos (1D), atribuindo uma classe estrutural com base em sua localização e ambiente e comparando os resultados com boas estruturas, pelo menos 80% dos aminoácidos do modelo precisam ter um Average score  $\geq$  a 0,2 para este seja considerado aceitável, no caso do modelo de Cv3931 100% de seus aminoácidos estão dentro do padrão aceitável (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991), sendo 0,23 o menor valor obtido (Figura 19). O *score* global do servidor Solvx é um valor que mede a acessibilidade do solvente para cada resíduo dentro de uma proteína, uma estrutura boa deve ter um *score* geral abaixo de zero, quanto mais negativo esse valor, melhor o modelo; o *score* geral para Cv3931 foi de -127,6 (Figura 20). A figura 21 mostra o resultado da regiões de desordem do modelo da Cv3931, previstas pelo servidor PrDOS.

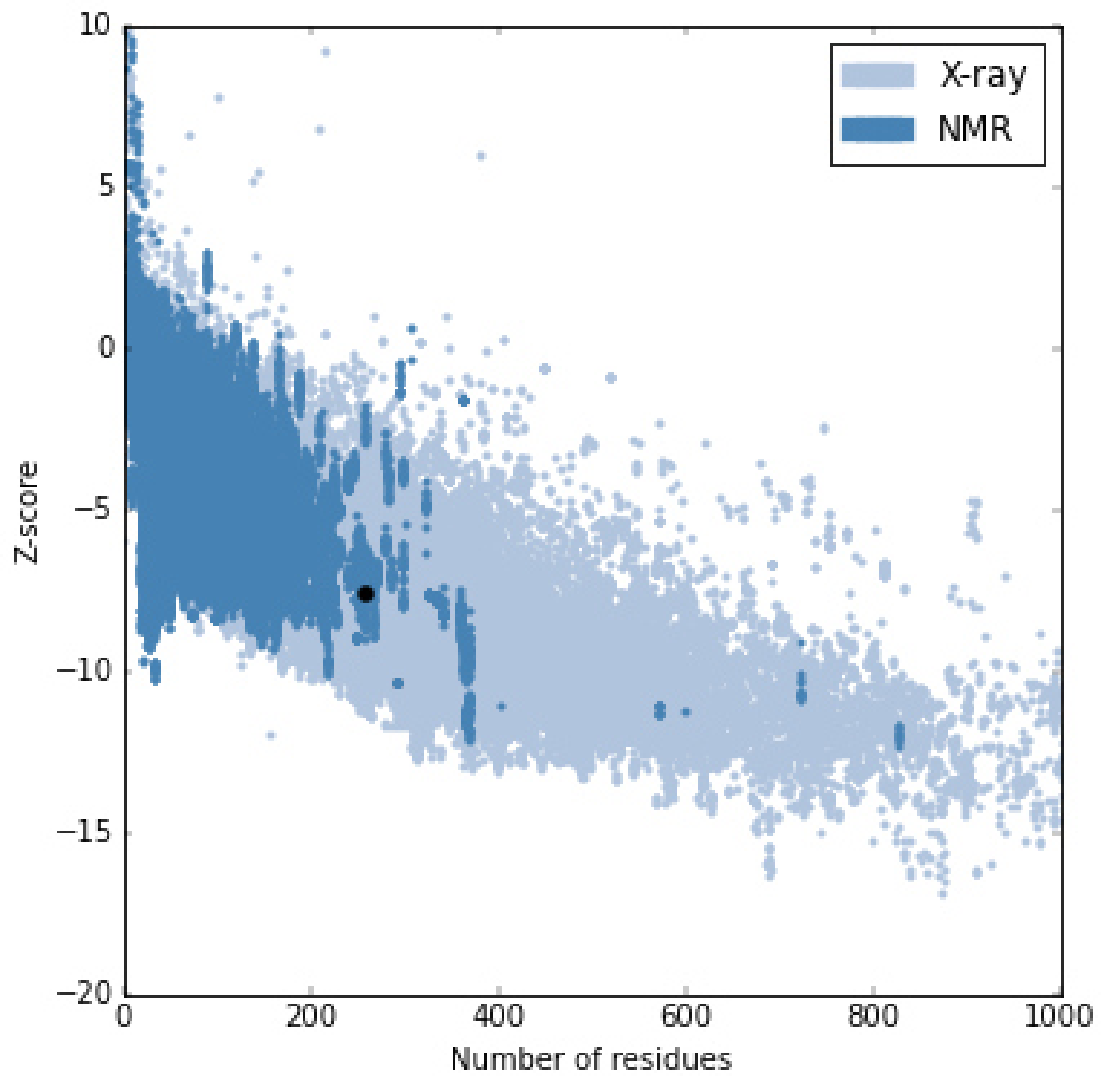
Figura 16 – *Plot* Ramachandra do modelo de Cv3931 depois da otimização pelo servidor GALAXY



**98.8% (254/257) of all residues were in favored (98%) regions.**  
**99.6% (256/257) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.**

Fonte: molprobiy.biochem.duke.edu

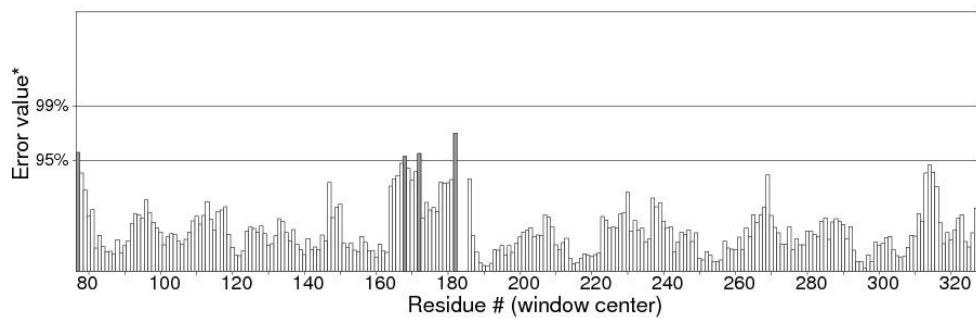
Figura 17 - Z- score do modelo de Cv3931 obtido pelo servidor ProSa-Web



Fonte: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>

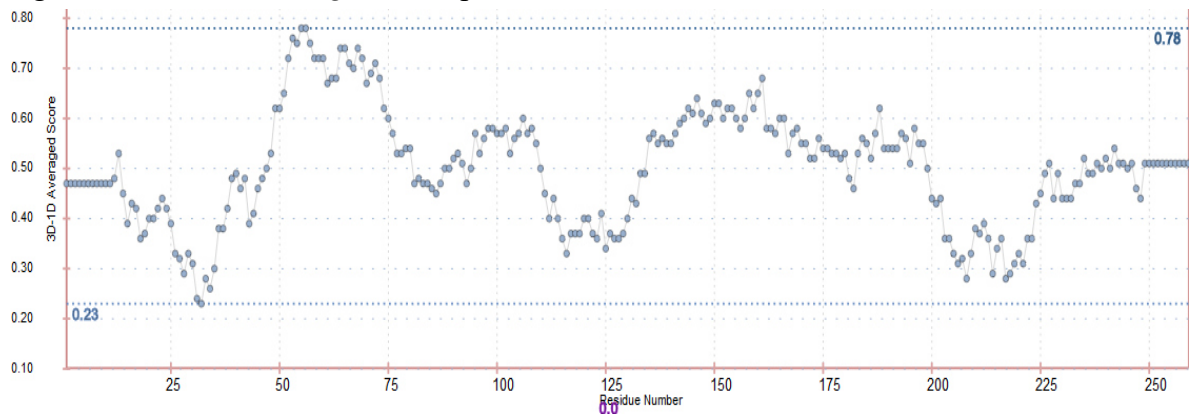
Figura 18 - Qualidade global do modelo obtida pelo servidor ERRAT2

Program: ERRAT2  
File: /var/www/SAVES/Jobs/3855575/errata.pdb  
Chain#:1  
Overall quality factor\*\*: 98.387



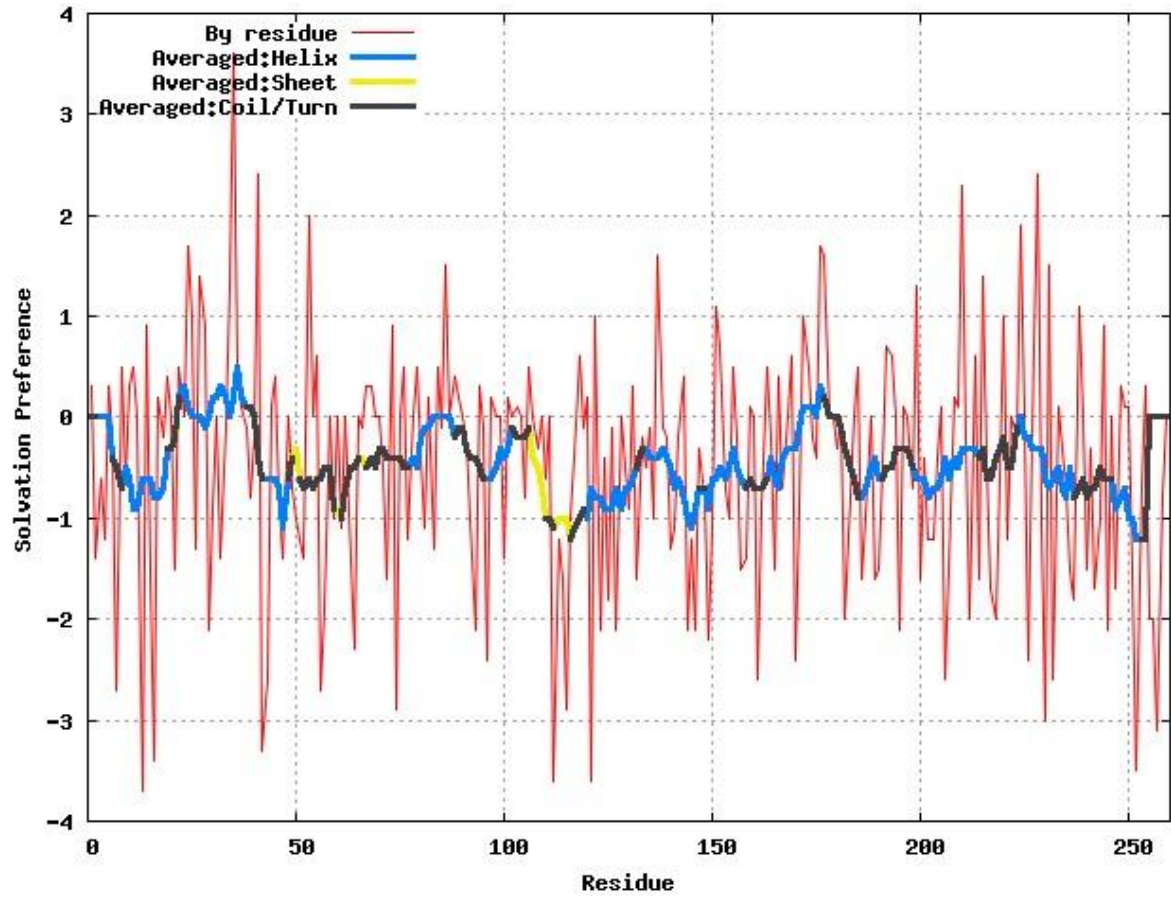
Fonte: <http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>

Figura 19 - 3D-1D Averaged score para o modelo da Cv3931



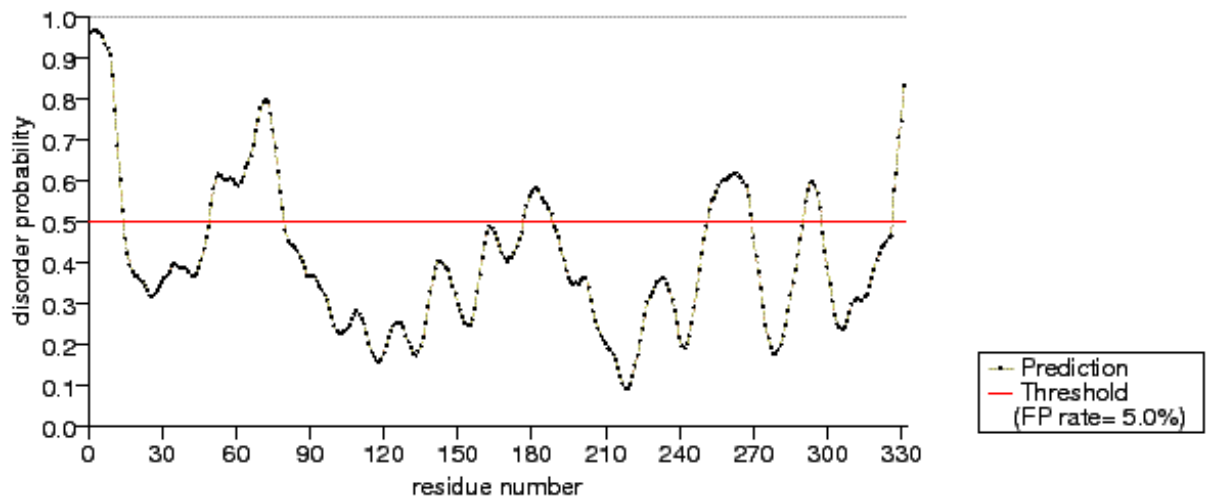
Fonte: [http://services.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D/](http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/)

Figura 20 – Preferência de solvente do servidor SolvX para cada aminoácido do modelo da Cv3931



Fonte: [ekhidna.biocenter.helsinki.fi/solvx/start](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/solvx/start)

Figura 21 - Regiões de desordem no modelo da CvHex previstas pelo servidor PrDOS



Fonte: <http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>

## 6.11 Docking molecular

O estudo de *docking* molecular da Cv3931 foi conduzido com base na estrutura co-cristalizada da quitosanase (PDB 1QGI) com o ligante (GlcN)2-GlcNAc. O modelo da Cv3931 foi sobreposto na estrutura cristalizada e um *docking* sítio dirigido foi realizado. A figura 22 mostra o ligante [(GlcN)2-GlcNAc] ancorado na fenda catalítica de Cv3931.

Já é descrito na literatura que os resíduos catalíticos de quitosanases da família GH46 são Glu e Asp, no caso de 1QGI esses resíduos são Glu<sup>37</sup> e Asp<sup>55</sup>. Quando 1QGI e Cv3931 foram sobrepostas foi observado que Glu<sup>109</sup> e Asp<sup>127</sup> de Cv3931 ocupam o mesmo local que os resíduos catalíticos que Glu<sup>37</sup> e Asp<sup>55</sup> de 1QGI, o que aponta Glu<sup>109</sup> e Asp<sup>127</sup> como os principais resíduos catalíticos de Cv3931.

As glicosídeo hidrolases podem catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas por meio de dois mecanismo: inversão e retenção. A distância média dos resíduos catalíticos em enzimas com o mecanismo de inversão é de 9,5 Å, enquanto essa distância é de 5,3 Å em enzimas com o mecanismo de retenção; É possível afirmar que Cv3931 pertence a classe das enzimas que utilizam o mecanismo de inversão, pois a distância entre Glu<sup>109</sup> e Asp<sup>127</sup> é de 10,9 Å (Figura 23), a mesma distância encontrada para os resíduos catalíticos de 1QGI, que é considerada uma glicosídeo hidrolase que utiliza o mecanismo de inversão, sendo Glu<sup>37</sup> o ácido geral da reação e Asp<sup>55</sup> a base geral.

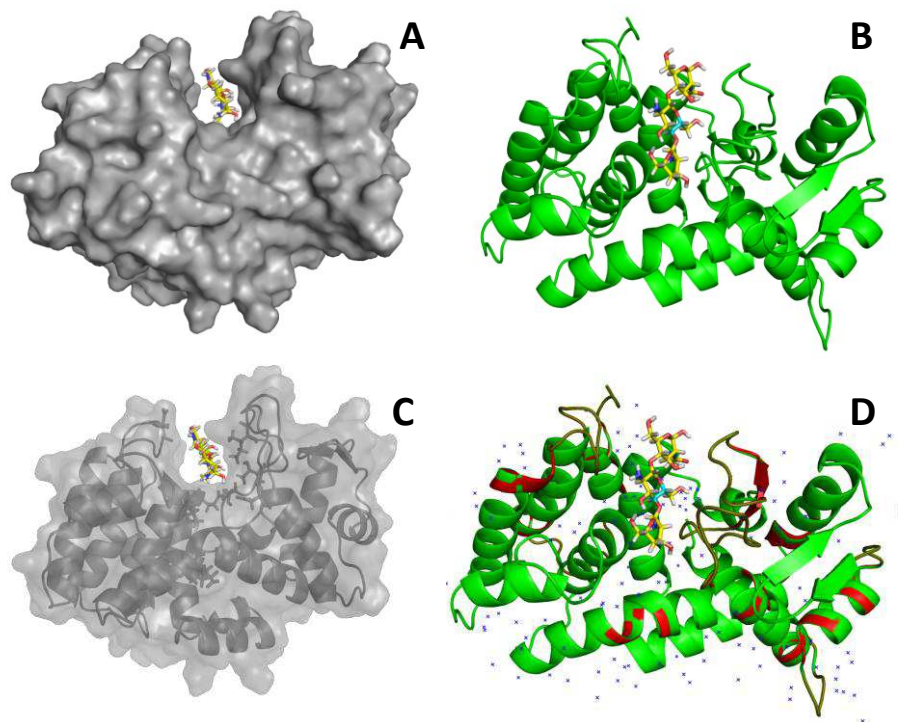
Foi observado que na estrutura co-cristalizada de 1QGI quase todas as interações feitas com o ligante, inclusive a interações com dos resíduos catalíticos, são feitas por intermédio de moléculas de água. Isso também ocorre com Cv3931, corroborando com a predição do índice hidrofobicidade para essa proteína (item 6.3) que previu Cv3931 sendo uma proteína com interações polares. Os resíduos identificados interagindo com o ligante são: Gln<sup>110</sup>, Thr<sup>132</sup>, Phe<sup>136</sup>, Tyr<sup>220</sup>, Leu<sup>247</sup> e Asp<sup>290</sup> (Figura 24). Esses resíduos são os mesmo em 1QGI, exceto Asp<sup>290</sup> que em 1QGI é uma Lys<sup>218</sup>; Asp<sup>290</sup> e Lys<sup>218</sup> em Cv3931 e em 1QGI respectivamente são os únicos resíduos que fazem uma interação direta com o ligante. Considerando que Cv3931 e 1QGI são muito semelhantes e provavelmente vieram de uma proteína homóloga comum, a troca de um resíduo de lisina por um resíduo de ácido aspártico foi possivelmente uma mutação na quitosanase de *Chromobacterium violaceum* que ocorreu ao longo do tempo. Lisina e ácido aspártico são ambos aminoácidos polares, sendo lisina um resíduo básico e ácido aspártico um resíduo ácido, mas que em alguns casos, como nos próprios resíduos catalíticos principais de quitosanases da família GH46, pode agir como base. Liu *et al.* (2015) descreveu que resíduos aromáticos como Trp, Phe e Tyr são geralmente encontrados no sítio

catalítico de enzimas quitinolíticas (quitinases e quitosanases), potencializando a estabilidade e o reconhecimento do substrato pelas enzimas. Em Cv3931 é foi observada a presença dos resíduos mencionados. As tabelas 6 e 7 mostram a comparação dos resíduos que interagem com o ligante em 1QGI e em Cv3931, assim como as distâncias entre esses resíduos e as moléculas de água.

Com base na especificidade da posição de clivagem da quitosana parcialmente acetilada, as chitosanases são classificadas em três diferentes subclasses onde a subclasse I pode clivar ligações entre GlcN-GlcN e GlcNAc-GlcN; a subclasse II, apenas ligações entre GlcN-GlcN; e a subclasse III, ligações entre GlcN-GlcN e GlcN-GlcNAc. Saito *et al.* (2000) descreveu a quitosanase de *Bacillus circulans* MH-K1, mencionada até agora como 1QGI, como sendo uma quitosanase da subclasse III e os estudos de *docking* molecular da Cv3931 realizados com o ligante [(GlcN)<sub>2</sub>-GlcNAc] apontam essa proteína como sendo da subclasse III, assim como 1QGI.

Para confirmação da subclasse em que Cv3931 pertence, foram feitas análises de *docking* molecular com os ligantes GlcN<sub>3</sub>, GlcNAc<sub>3</sub> e GlcNAc-(GlcN)<sub>2</sub>. Todos os ligantes foram capazes de ancorar no sítio catalítico de Cv3931, porém nos ligantes GlcNAc<sub>3</sub> e GlcNAc-(GlcN)<sub>2</sub> é observado que o grupo acetil está muito próximo da base da fenda catalítica (Figura 25), próxima a Asp<sup>127</sup>, causando um significativo “obstáculo estérico”, o que se relaciona a uma maior quantidade de energia necessária para que a reação ocorra devido aproximação de grupos maiores em uma reação química. Isso não é observado no ligante GlcN<sub>3</sub> que, como esperado, se encaixa na fenda catalítica e por não possuir nenhum grupo acetil, não oferece nenhum obstáculo para a reação de catálise. A figura 26 mostra que os mesmo resíduos de aminoácidos interagem com o ligante.

Figura 22 – Representação da estrutura em superfície e em *cartoon* do modelo de Cv3931 com o ligante GlcNAc-(GlcN)2



A figura 22-A representa a estrutura em superfície de Cv3931 com o ligante GlcNAc-(GlcN)2; A figura 22-B, a estrutura em superfície e em *cartoon* de Cv3931 com o mesmo ligante; A figura 22-C, a estrutura em superfície e em *cartoon*; e a figura 22-D a estrutura em *cartoon* de Cv3931 e de 1QGI sobrepostas.

Figura 23 – Distância entre os dois resíduos catalíticos de Cv3931

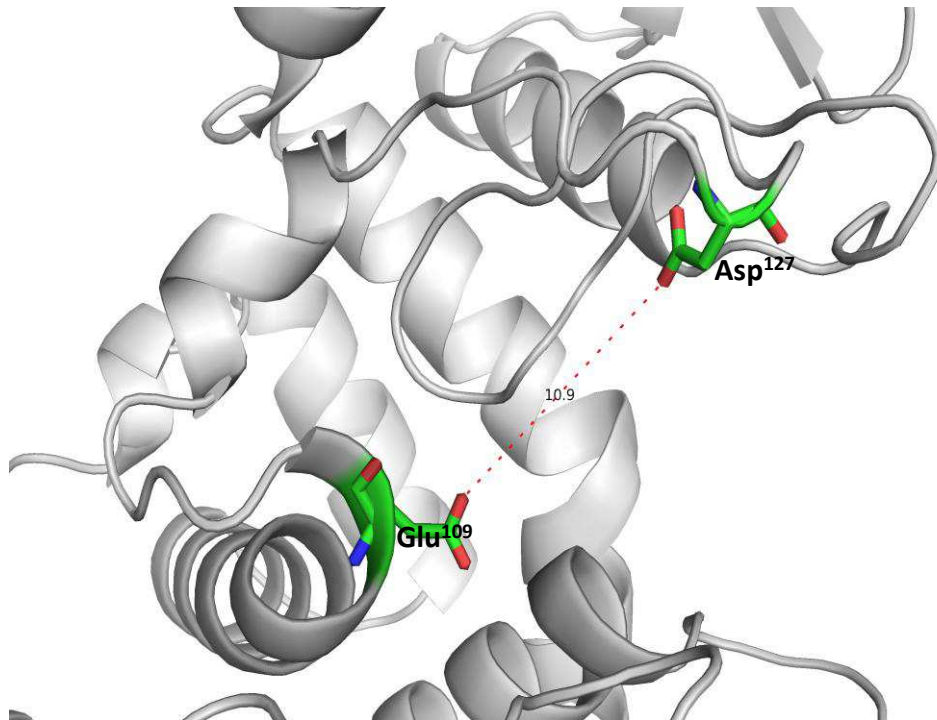


Figura 24 - Resíduos da Cv3931 que fazem interação com o ligante (GlcN)2-GlcNAc

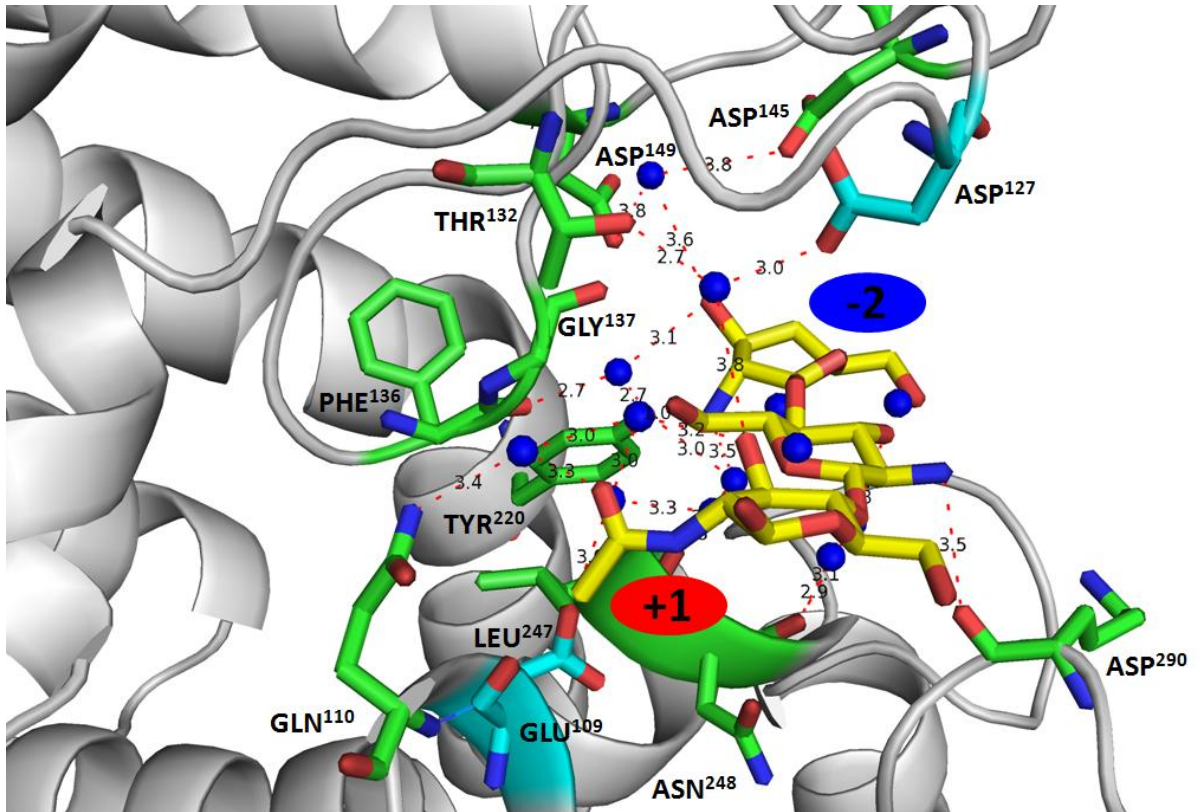


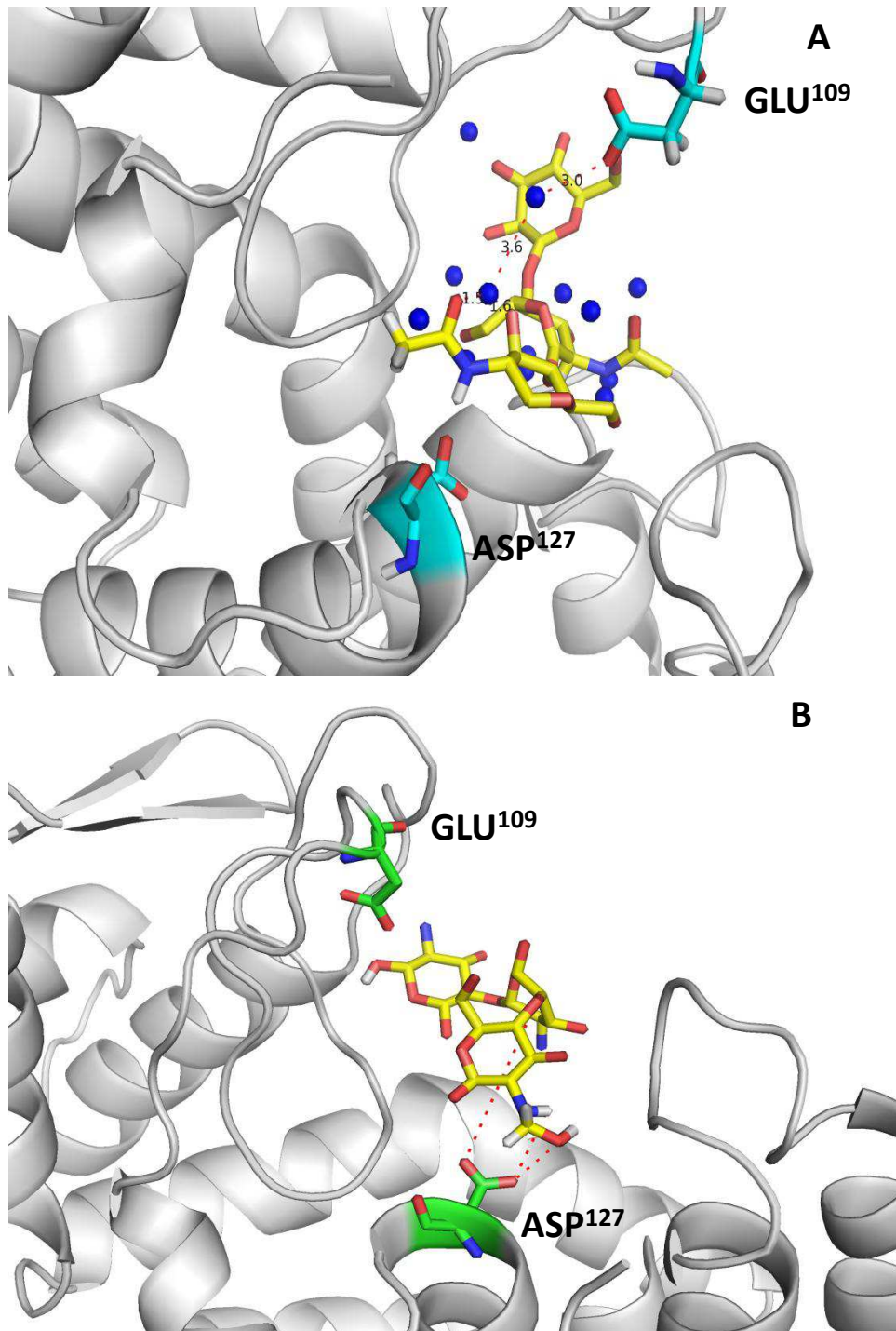
Tabela 6 – Resíduos de 1QGI que interagem com o ligante

Resíduo/Átomo	Distância(Å)	Água	Distância(Å)	Átomo(Ligante)
Glu <sup>37</sup> (Oe1)	3,3	440	2,9	N2 GlcN -2
Gln <sup>38</sup> (Ne2)	3,4	431	3,3	O7 GlcNAc +1
Asp <sup>55</sup> (Od2)	3,0	341	2,9	O6 GlcN -1
Thr <sup>60</sup> (Og1)	2,7	341	2,9	O6 GlcN -1
Phe <sup>64</sup> (O)	2,7	350	2,9	N2 e O3 GlcN -2
			3,1	
Tyr <sup>148</sup> (O)	2,7	350	3,1	N2 e O3 GlcN -2
	3,0	344	2,8	N2 GlcN -2
Leu <sup>175</sup> (O)	2,8	440	3,0	N2 GlcN -2
	2,8	344	2,9	
Lys <sup>218</sup> (O)	3,5	-	-	N2 GlcN -1

Tabela 7 - Resíduos de Cv3931 que interagem com o ligante

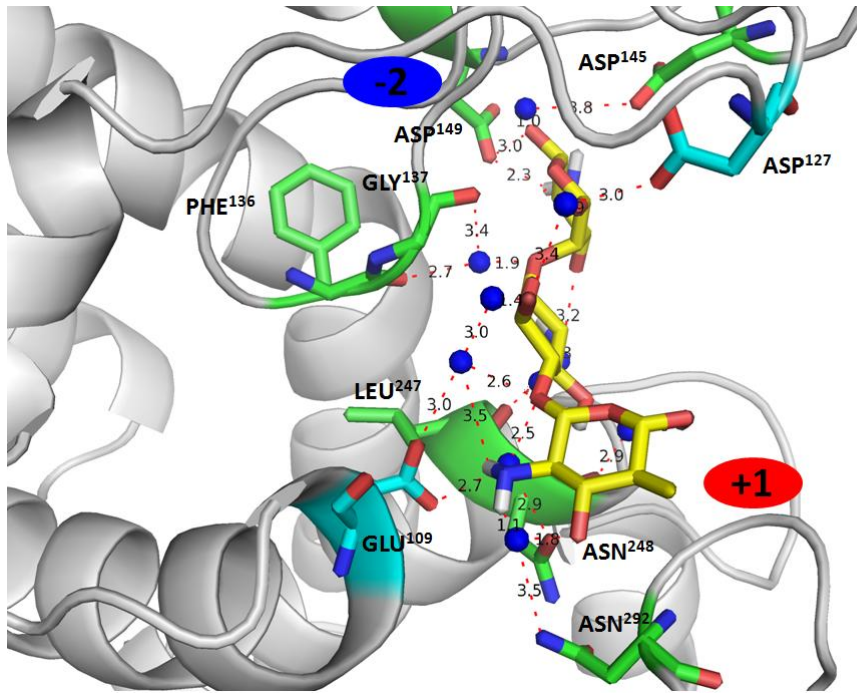
Resíduo/Átomo	Distância(Å)	Água	Distância(Å)	Átomo(Ligante)
Glu <sup>109</sup> (Oe1)	3,3	440	2,9	N2 GlcN -2
Gln <sup>110</sup> (Ne2)	3,4	431	3,3	O7 GlcNAc +1
Asp <sup>127</sup> (Od2)	3,0	341	2,9	O6 GlcN -1
Thr <sup>132</sup> (Og1)	2,7	341	2,9	O6 GlcN -1
Phe <sup>136</sup> (O)	2,7	350	2,9	N2 e O3 GlcN -2
			3,1	
Tyr <sup>220</sup> (O)	2,7	350	3,1	N2 e O3 GlcN -2
	3,0	344	2,8	N2 GlcN -2
Leu <sup>247</sup> (O)	2,8	440	2,5	N2 GlcN -2
	2,8	344	3,5	
Asp <sup>290</sup> (O)	3,5	-	-	N2 GlcN -1

Figura 25 – Representação da interação molecular de Cv3931 com os ligantes GlcNAc3 e GlcNAc-(GlcN)2



A figura 25-A representa a interação de Cv3931 com GlcNAc3 e a figura 25-B representa a interação de Cv3931 com GlcNAc-(GlcN)2.

Figura 26 – Interação de Cv3931 com GlcN3



## 7 CONCLUSÃO

*Cv3931* é uma quitosanase de *Chromobacterium violaceum* que pertence a família GH46 e foi expressa de maneira funcional em três estirpes de *Escherichia coli* e seu peptídeo sinal foi capaz de secretar essa enzima para o meio de cultura. Os oligômeros liberados por *rCv3931* na degradação da quitosana apresentaram atividade antimicrobiana que pode ser explorada com a caracterização dos mesmos.

O modelo 3D construído para *Cv3931* têm a estrutura conservada em relação à quitosanase de *Bacillus circulans*, assim, *Cv3931* provavelmente apresenta os mecanismo de catálise que essa proteína. Deste modo, *Cv3931* é uma quitosanase que exhibe um potencial biotecnológico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTAN, M. et al. Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chitooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 5, p. 656–662, mar. 2010.

AZLAN, K.; WAN SAIME, W. N.; LAI KEN, L. Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 3, p. 296–302, jan. 2009.

BENDTSEN, J. D. et al. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 58, 2005

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W252-258, jul. 2014.

BOLLER, T. et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**, v. 157, n. 1, p. 22–31, 1 fev. 1983.

BOUCHER, I. et al. Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 52, p. 31077–31082, 1995.

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science (New York, N.Y.)**, v. 253, n. 5016, p. 164–170, 12 jul. 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

CALDAS, L.R., et al. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In: Proceedings of the **International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology** (Tyrrell, R.M., ed). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,

121-126. 1978.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, 1 jan. 2010.

CHOI, Y. J. et al. Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4522–4531, 1 ago. 2004.

CHOU, K.-C.; SHEN, H.-B. Signal-CF: A subsite-coupled and window-fusing approach for predicting signal peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 3, p. 633–640, jun. 2007.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993.

ARAÚJO, N. D. DE et al. A era da bioinformatica: seu potenciale suas implicacoes para as ciencias da saude. **Estudos de biologia**, v. 30, n. 70–72, p. 143–148, 2008.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, p. 11660–11665, 2003.

FERNANDES, J. C. et al. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. **Food Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 922–928, out. 2008.

FUENTES, N. et al. M4T: a comparative protein structure modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W363–W368, jul. 2007.

FERRE, F.; CLOTE, P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server, p. W182–W185, 1 jul. 2006.

FREUDL, R. Beyond amino acids: Use of the *Corynebacterium glutamicum* cell factory for the secretion of heterologous proteins. **Journal of Biotechnology**, 24 fev. 2017.

FUKAMIZO, T. et al. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. **Biochemical Journal**, v. 311, n. 2, p. 377–383, 1995.

GARCÍA-GODOY, M. et al. Solving Molecular Docking Problems with Multi-Objective Metaheuristics. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10154–10183, 2 jun. 2015.

GASTEIGER, E. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExpASY server**. [s.l.] Springer, 2005.

GRANGEIRO, T.B., et al. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genetics and Molecular Research** 3, 117–133, 2004.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155–161, dez. 1990.

HILLER, K. et al. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W375–W379, 1 jul. 2004.

HOLM, L.; SANDER, C. Evaluation of protein models by atomic solvation preference. **Journal of Molecular Biology**, v. 225, n. 1, p. 93–105, 5 maio 1992.

IKAI, A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. **Journal of Biochemistry**, v. 88, n. 6, p. 1895–1898, dez. 1980.

JUNG, W.-J.; PARK, R.-D. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. **Marine drugs**, v. 12, n. 11, p. 5328–5356, 2014.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 7 maio 2015.

KHAN, F. I. et al. Current updates on computer aided protein modeling and designing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 48–62, abr. 2016.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 15 nov. 2010.

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

LEE, B. C. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activity of water-soluble chitosan oligosaccharides against *Vibrio vulnificus*. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 24, n. 3, p. 327–333, set. 2009.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D257–D260, 28 jan. 2015.

Li, Q.; Dunn, E. T.; Grandmason, E. W.; Goosen, M. F. A. Applications and Properties of Chitosan. **Technomic Publishing Company, Inc.**: Lancaster. 3-29. 1992.

LIANG, T.-W. et al. Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 8–14, fev. 2014.

LIU, S. et al. Substrate-binding specificity of chitinase and chitosanase as revealed by active-site architecture analysis. **Carbohydrate Research**, v. 418, p. 50–56, dez. 2015.

LOBO, M. D. P. et al. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 46, 1 jun. 2013.

MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J.-M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. **Journal of Biotechnology, Recombinant Proteins and Host Cell Physiology**. v. 109, n. 1, p. 63–81, 8 abr.

2004.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 28 jan. 2015.

MELO, P. DA S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 36, n. 8, p. 539–543, 2000.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MUSLIM, S. N. et al. Chitosanase purified from bacterial isolate *Bacillus licheniformis* of ruined vegetables displays broad spectrum biofilm inhibition. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 257–262, nov. 2016.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PURUSHOTHAM, P. et al. Chitin Binding Proteins Act Synergistically with Chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36714, 9 maio 2012.

REARDON-ROBINSON, M. E. et al. A Disulfide Bond-forming Machine Is Linked to the Sortase-mediated Pilus Assembly Pathway in the Gram-positive Bacterium *Actinomyces oris*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 35, p. 21393–21405, 28 ago. 2015.

REISSIG, J. L.; STORMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 217, n. 2, p. 959–966, dez. 1955.

RETTORI, D.; DURÁN, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 685–688, 1998.

RIVAS, L. A. et al. The *Bacillus subtilis* 168 *csn* gene encodes a chitosanase with similar

properties to a *Streptomyces* enzyme. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 2929–2936, 2000.

ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 67–77, 1999.

SAITO, J. et al. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-Å resolution and its substrate recognition mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30818–30825, 1999.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2nd ed ed. [s.l.] Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.

SENEVIRATHNE, M.; AHN, C.-B.; JE, J.-Y. Hepatoprotective effect of chitooligosaccharides against tert-butylhydroperoxide-induced damage in Chang liver cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 995–1000, jan. 2011.

SEO, S.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W. Simultaneous Depolymerization and Decolorization of Chitosan by Ozone Treatment. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. C522–C526, nov. 2007.

SHEN, K.-T. et al. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1864–1871, ago. 2009.

SHIMOSAKA, M. et al. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 354–360, 1 set. 2000.

SHIN, W.-H. et al. Prediction of protein structure and interaction by GALAXY protein modeling programs. **Bio Design**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2014.

SLABINSKI, L. et al. The challenge of protein structure determination-lessons from structural genomics. **Protein Science**, v. 16, n. 11, p. 2472–2482, nov. 2007.

SNEATH, P. H. A. et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **The Lancet**, v. 262,

n. 6780, p. 276–277, 1953.

SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. Chitosanases—properties and applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 35–45, 1996.

TAKASUKA, T. E. et al. Structure-guided analysis of catalytic specificity of the abundantly secreted chitosanase SACTE\_5457 from *Streptomyces* sp. SirexAA-E. **Proteins**, v. 82, n. 7, p. 1245–1257, jul. 2014.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–222, set. 2006.

THADATHIL, N.; VELAPPAN, S. P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. **Food Chemistry**, v. 150, p. 392–399, maio 2014.

TIKHONOV, V. E. et al. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 66–72, abr. 2006.

VERNAZZA, C.; GIBSON, G.; RASTALL, R. In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 539–545, 20 jun. 2005.

VIENS, P.; LACOMBE-HARVEY, M.-È.; BRZEZINSKI, R. Chitosanases from Family 46 of Glycoside Hydrolases: From Proteins to Phenotypes. **Marine Drugs**, v. 13, n. 11, p. 6566–6587, 28 out. 2015.

VINCENTE LLI, R.; ROMIER, C. Expression in *Escherichia coli*: becoming faster and more complex. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p. 326–334, jun. 2013.

WANG, C.-L. et al. Environmental chitinous materials as adsorbents for one-step purification of protease and chitosanase. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 6, p. 2363–2369, jul. 2014.

WEBB, B.; SALI, A. Protein structure modeling with MODELLER. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1137, p. 1–15, 2014.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-410, jul. 2007.

XIA, W. et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 170–179, mar. 2011.

YANG, C.-H.; LI, Y.-H. Chromobacterium violaceum infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435–441, out. 2011.

YOON, H.-G. et al. Thermostable chitosanase from Bacillus sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3727–3734, 2000.

YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608–1615, 1 jul. 2010.

ZERBS, S.; GIULIANI, S.; COLLART, F. Small-scale expression of proteins in E. coli. **Methods in Enzymology**, v. 536, p. 117–131, 2014.

ZITOUNI, M. et al. Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain Paenibacillus sp. 1794 newly isolated from compost. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5801–5813, jul. 2013.

## 9 ANEXOS

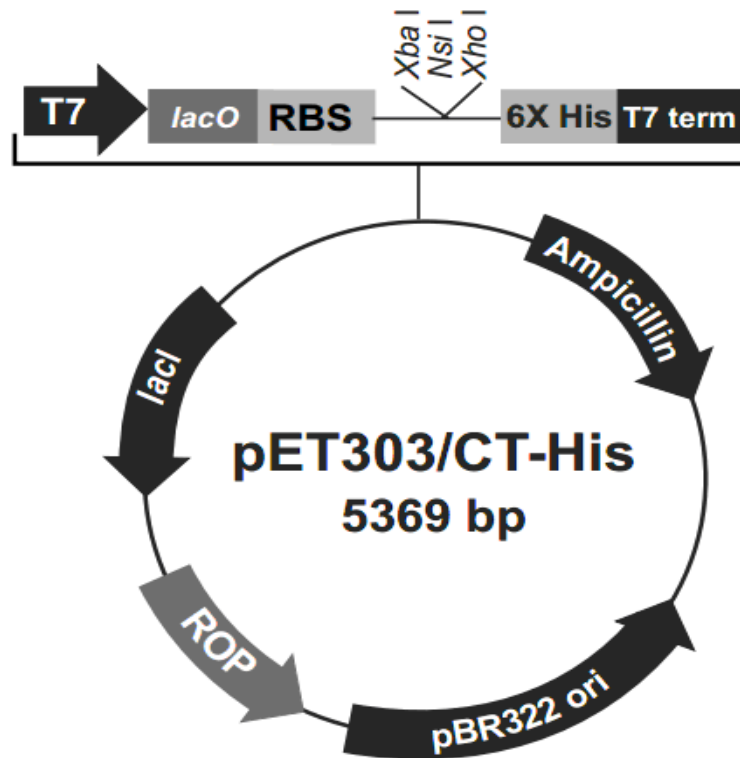
### Anexo I. Sequência de aminoácidos, com o peptídeo sinal de Cv3931

>AAQ61593.1 probable chitosanase A [*Chromobacterium violaceum* ATCC 12472]  
MKYAAKRLSFPSAILAGLALLAAAGSAAAQGSTAGSPERQTVRLPDCAAWSPPSY  
QAGSVASRGGVNYTAAFWTQGNPPEQGQAWQAGKRCRPAQAADHDANFPPAT  
LKFLKANTGLDGEQWDNIMKLVNKPEQDSLEWTKFYGYCENIGDKRGYTIGIFGATT  
GGPNDEGPDGPTLFKEFDASSGASNPSIAGGLARAGVHGSM  
QGKILKISDSAkvfcDKIGSLQNNPAWRDAMWNTFYKVYIQYSVQQARQRFSSALT  
IGSFVDTALNQGATGDSGTLQGLLSRSGNSGDEKTFMTAFYAQRSKIVDTNDYNQPPN  
GKNRVKQWSTLLNMGETDLKNADA AVQKV TNWEMK

**Anexo II. Sequência de nucleotídeos, com a região codificadora do peptídeo sinal, da ORF da Cv3931 (1083 nucleotídeos)**

```
>gb|AE016825.1|:4252283-4253365 Chromobacterium violaceum ATCC 12472,
complete genome
ATGAAATACGCAGCAAAAACGCCTTTCCTTCCCGTCCGCCATCCTGGCGGGACTCGCCCTCCTCGCCGCCG
CCGGTTCTGCGGCGGCCAGGGCTCGACGGCCGGCAGCCCCGAAAGACAAACCGTTTCGCCTGCCCGACTG
CGCCGCCGCGTGGAGCCCCGCCTCGCCCTATCAAGCCGGCAGCGTCGCCAGCCGCGGGCGGCGTCAACTAC
ACCGCGGCCTTCTGGACCCAGGGCAATCCTCCGGAACAGGGCCAGGCCTGGCAGGCGGGCAAGCGCTGTC
GTCCGGCCGCGCAGGCCAAGGCCGCCGACCACGACGCCAACTTTCGCCCGCGACGCTGAAATTCCTGAA
AGCCAACACCGGCCTGGACGGCGAGCAGTGGGACAACATCATGAAGCTGGTCAACAAGCCGGAGCAGGAT
TCGCTGGAGTGGACCAAGTTCTACGGCTACTGCGAGAA
CATCGGCGACAAGCGCGGATACACGATAGGCA
TCTTCGGCGCCACCACCGGTGGCCCGAACGACGAGGGCCCGGACGGTCCCACGCTGTTCAAGGAGTTCGA
CGCTTCCAGCGGCGCGAGCAATCCCTCCATCGCCGGCGGTCTGGCCCGCGCCGGCGTGCACGGCAGCATG
CAGGGCAAGATCCTGAAGATCAGCGACAGCGCCAAGGTGTTCTGCGACAAGATCGGCAGCCTGCAGAACA
ATCCCGCCTGGCGCGACGCGATGTGGAACACCTTCTACAAGGTATACATCCAATACAGCGTGCAGCAGGC
CCGCCAGCGCGGCTTCTCCAGCGCGCTGACCATAGGCTCCTTCGTGACACCGCGCTGAACCAGGGCGCA
ACCGGCGATTCCGGCACGCTGCAGGGCCTGCTGTCCCCTCCGGCAACAGCGGCGACGAGAAAACCTTCA
TGACCGCCTTCTACGCGCAGCGCAGCAAGATCGTCGACACCAACGACTACAATCAGCCGCCCAACGGCAA
AAACCGGTCAAGCAATGGAGCACGCTGTTGAACATGGGCGAGACCGACTTGAAGAATGCCGACGCCGCG
GTGCAGAAAGTCACCAACTGGGAAATGAAGTAA
```

Anexo III. Plasmídeo pET303/CT-His, vetor de expressão em *Escherichia coli*



**Comments for pET303 CT-His  
5369 nucleotides**

T7 promoter: bases 20-36  
 T7 promoter priming site: bases 20-39  
 lac operator (*lacO*): bases 39-63  
 Ribosome binding site (RBS): bases 95-100  
 6X His Tag: bases 119-136  
 T7 reverse priming site: bases 186-206  
 T7 transcription termination region: bases 147-277  
 F1 origin: bases 287-742  
*bla* promoter: bases 775-879  
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 874-1734  
 pBR322 origin: bases 1945-2678 (c)  
 ROP ORF: bases 2920-3011 (c)  
*lacI* ORF: bases 3914-5032 (c)

(c) = complementary strand