

Título em Português:	ESTUDOS ESTRUTURAIS E BIOFÍSICOS DE UMA CUTINASE DE ORIGEM ANTÁRTICA
Título em Inglês:	structural and biophysical studies of a cutinase of antartic origin
Autor:	Amanda Lara Fukuda Marques
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Richard Charles Garratt
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biofísica Molecular
Agência Financiadora:	FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

ESTUDOS ESTRUTURAIS E BIOFÍSICOS DE UMA CUTINASE DE ORIGEM ANTÁRTICA

Amanda Lara Fukuda Marques ¹

Me. Adriano Alves Furtado

Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Instituto de Física de São Carlos/USP

amanda.fukuda@usp.br ¹

Objetivos

Este estudo tem como objetivo estudar a estrutura da MetaG7, uma potencial PETase isolada em um projeto metagenômico de águas superficiais da Antártica [1], para compreender as diferenças estruturais com relação às enzimas homólogas e seu potencial para futuras aplicações em biorremediação de poli(tereftalato de etileno) (PET) em baixas temperaturas. Além disso, avaliar a estabilidade térmica da MetaG7 por meio da espectroscopia de Dicroísmo Circular para determinar sua temperatura de melting (T_m).

Métodos e Procedimentos

A enzima MetaG7 foi expressa em *Escherichia coli* da cepa Origami 2, utilizando um vetor pET28a-TEV com uma cauda de 6-histidinas (His-tag). A expressão foi induzida com isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 18°C.

A purificação da proteína foi realizada em duas etapas cromatográficas. Inicialmente, utilizou-se uma cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) com a coluna HisTrap HP,

seguida por uma cromatografia de exclusão molecular (SEC) com a coluna Superdex 200 XK-16. A pureza da amostra foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A estabilidade térmica da MetaG7 foi avaliada por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), determinando-se a temperatura de transição média (T_m) através de um gradiente de temperatura de 4 a 94°C.

Para a determinação estrutural, a proteína foi cristalizada pela técnica de difusão de vapor por gota sentada. Os cristais foram otimizados e submetidos à difração de raios X na linha de luz Manacá do síncrotron SIRIUS (CNPEM). A estrutura foi resolvida por substituição molecular e refinada utilizando os pacotes de software Phenix e CCP4, com a construção do modelo realizada no Coot. A análise estrutural e comparação com homólogos foram feitas com o PyMOL.

Resultados

A proteína MetaG7 foi expressa em sua forma solúvel e purificada com sucesso,

apresentando uma banda de aproximadamente 32 kDa em gel SDS-PAGE como mostra a figura 1. A etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular resultou em uma amostra pura com concentração de 6,75 mg/ml.

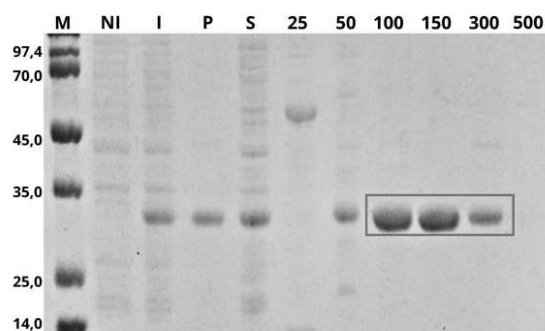


Figura 1: Gel SDS-PAGE 15% da purificação por afinidade da MetaG7. M: Marcador de massa molecular, NI: Não induzido, I: Induzido, P: Fração insolúvel (Pelet), S: Fração solúvel, 25-500: Concentração de Imidazol das eleições de 25 a 500 mM. Fonte: Elaborado pela autora.

A análise de estabilidade térmica por dicroísmo circular revelou uma temperatura de melting (T_m) de 52.8±0.4°C, mostrado na figura 2.

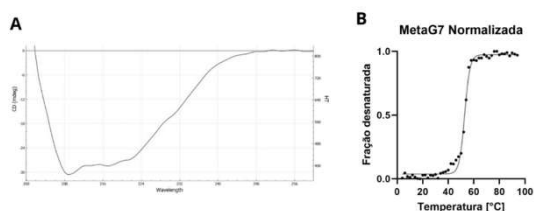


Figura 2: (A) Espectro de dicroísmo circular da MetaG7. (B) Curva de desnaturação térmica. Fonte: Elaborado pela autora.

Através de ensaios cristalográficos, a estrutura da MetaG7 foi determinada com uma resolução de 2.9 Å. A proteína exibe um enovelamento do tipo α/β-hidrolase, composto por uma folha-β central de 9 fitas circundada por 7 α-hélices. A análise estrutural comparativa revelou a conservação da tríade catalítica e dos resíduos

do subsítio de ligação I [2]. No entanto, foi observada uma variação no subsítio II, com a presença de uma isoleucina no lugar de uma valina característica de PETases do tipo IIa [3]. A estrutura também apresentou duas pontes dissulfeto, sendo uma delas, entre os resíduos C211 e C248, característica de PETases do tipo II. Adicionalmente, uma região que por alinhamento de sequência aparentava ser um loop estendido, revelou-se na estrutura como uma α-hélice estendida e estabilizada pelos resíduos Q257 e Y256.

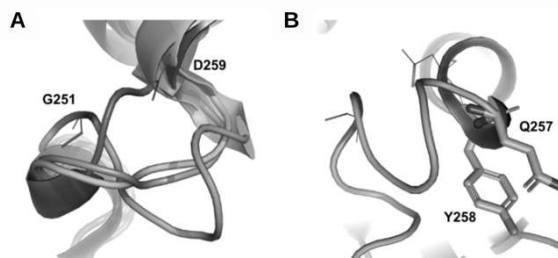


Figura 3: Comparação entre a MetaG7 (verde) e homologas tipo I (TfCut em magenta), tipo IIa (VgCut em laranja) e tipo IIb (IsPETase em ciano) na região (A) do loop estendido com o primeiro e último resíduo do loop da MetaG7 indicado em vermelho. (B) Loop estendido com representação em stick dos resíduos Q257 e Y256 da extensão da hélice alfa.

Fonte: Elaborado pela autora.

Conclusões

Observando os resultados obtidos, conclui-se que as técnicas de expressão e purificação foram bem-sucedidas ao se obter a MetaG7 pura e em uma boa concentração. Por meio da técnica do dicroísmo circular obteve-se a temperatura de melting $T_m = 52.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$, mostrando que apesar de ser uma proteína antártica, ela é estável em maiores temperaturas.

A obtenção dos cristais de MetaG7 foi um dos principais desafios, uma vez que as primeiras tentativas não foram bem-sucedidas nos experimentos de difração de raios-X. Onde a

diferença crítica para o sucesso do experimento foi não apenas cristalizar a 4°C, mas também pescar os mesmos a esta temperatura. Assim, produzimos cristais que difrataram e permitiram a resolução da estrutura cristalográfica da proteína a 2.9 Å.

Isso nos permitiu comparar regiões que apresentam grande conservação de resíduos com proteínas homólogas, como a tríade catalítica e o subsítio I. Mas também regiões com diferença na sequência como no primeiro aminoácido do subsítio II, que apresenta uma isoleucina onde usualmente se encontra uma valina (em PETases-like tipo II). Além disso, a região do loop estendido da MetaG7, o qual se esperava 3 resíduos a mais do que PETases-like do tipo II, de acordo com o alinhamento múltiplo de sequência, observamos a partir da estrutura cristalográfica, há a presença de uma hélice-alfa estendida no final do loop e estabilizada pelos resíduos Q257 e Y256. Observamos também as duas ligações dissulfetos características de PETases tipo II.

Portanto, tendo um maior conhecimento da estrutura da MetaG7 e sabendo que ela é ativa a baixas temperaturas, ela se mostra uma boa candidata para engenharia de proteína para a biorremediação, em particular para a degradação de PET em baixa temperatura.

Referências

- [1] FURTADO, A. A. **Estudos estruturais e bioquímicos de 10 enzimas com possível atividade de PET hidrolase oriundas de metagenoma antártico**. 2023. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.
- [2] HAN, X. et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. **Nature Communications**, v. 8, art. 2106, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-02255-z.
- [3] JOO, S. et al. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene

terephthalate) degradation. **Nature Communications**, v. 9, art. 382, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02881-1.

STRUCTURAL AND BIOPHYSICAL STUDIES OF A CUTINASE OF ANTARCTIC ORIGIN

Amanda Lara Fukuda Marques ¹

Me. Adriano Alves Furtado

Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos Institute of Physics/USP

amanda.fukuda@usp.br ¹

Objectives

This study aims to investigate the structure of MetaG7, a potential PETase isolated in a metagenomic project from Antarctic surface waters [1], to understand the structural differences in relation to homologous enzymes and its potential for future applications in the bioremediation of poly(ethylene terephthalate) (PET) at low temperatures. Furthermore, it aims to evaluate the thermal stability of MetaG7 through Circular Dichroism spectroscopy to determine its melting temperature (T_m).

Methods and Procedures

The MetaG7 enzyme was expressed in the *Escherichia coli* Origami 2 strain, using a pET28a-TEV vector with a 6-histidine tail (His-tag). Expression was induced with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 18°C.

The protein purification was carried out in two chromatographic steps. Initially, metal ion affinity chromatography (IMAC) was used with a HisTrap HP column, followed by size-exclusion chromatography (SEC) with a Superdex 200 XK-16 column. The purity of the sample was

verified by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

The thermal stability of MetaG7 was evaluated by Circular Dichroism (CD) spectroscopy, determining the mean transition temperature (T_m) through a temperature gradient from 4 to 94°C.

For the structural determination, the protein was crystallized using the sitting-drop vapor diffusion technique. The crystals were optimized and subjected to X-ray diffraction at the Manacá beamline of the SIRIUS synchrotron (CNPEM). The structure was solved by molecular replacement and refined using the Phenix and CCP4 software packages, with model building performed in Coot. Structural analysis and comparison with homologs were done using PyMOL.

Results

The MetaG7 protein was successfully expressed in its soluble form and purified, showing a band of approximately 32 kDa on an SDS-PAGE gel, as shown in Figure 1. The final purification step by size-exclusion

chromatography resulted in a pure sample with a concentration of 6.75 mg/ml.

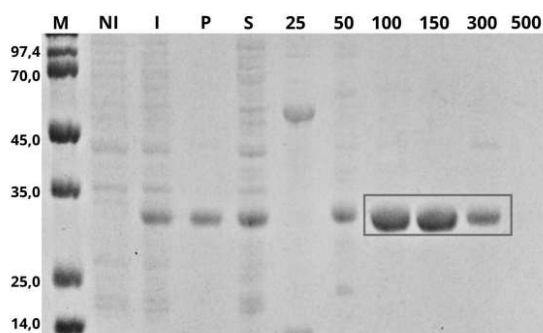


Figure 1: 15% SDS-PAGE gel of the affinity purification of MetaG7. M: Molecular mass marker, NI: Not induced, I: Induced, P: Insoluble fraction (Pellet), S: Soluble fraction, 25-500: Imidazole concentration of the elutions from 25 to 500 mM. Source: Prepared by the author.

Thermal stability analysis by circular dichroism revealed a melting temperature (T_m) of $52.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$, shown in Figure 2.

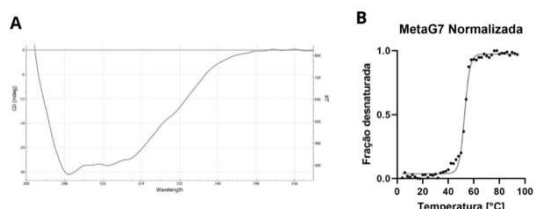


Figure 2: (A) Circular dichroism spectrum of MetaG7. (B) Thermal denaturation curve. Source: Prepared by the author.

Through crystallographic assays, the structure of MetaG7 was determined at a resolution of 2.9 Å. The protein exhibits an α/β -hydrolase fold, composed of a central 9-stranded β -sheet surrounded by 7 α -helices. Comparative structural analysis revealed the conservation of the catalytic triad and the residues of binding subsite I [2]. However, a variation was observed in subsite II, with the presence of an isoleucine instead of a valine, which is characteristic of type IIa PETases [3]. The structure also

presented two disulfide bridges, one of them, between residues C211 and C248, being characteristic of type II PETases. Additionally, a region that appeared to be an extended loop by sequence alignment was revealed in the structure to be an extended α -helix stabilized by residues Q257 and Y256.

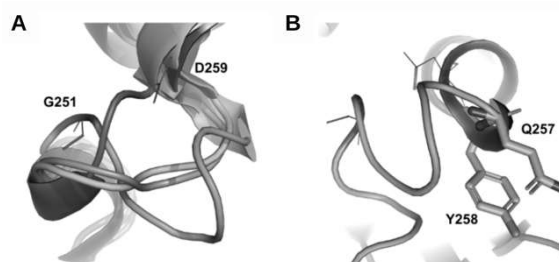


Figure 3: Comparison between MetaG7 (green) and homologs type I (TfCut in magenta), type IIa (VgCut in orange), and type IIb (IsPETase in cyan) in the region (A) of the extended loop with the first and last residue of the MetaG7 loop indicated in red. (B) Extended loop with a stick representation of residues Q257 and Y256 from the α -helix extension. Source: Prepared by the author.

Conclusions

Observing the results obtained, it is concluded that the expression and purification techniques were successful in obtaining pure MetaG7 at a good concentration. Using the circular dichroism technique, a melting temperature of $T_m = 52.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$ was obtained, showing that despite being an Antarctic protein, it is stable at higher temperatures.

Obtaining MetaG7 crystals was one of the main challenges, as the first attempts were not successful in the X-ray diffraction experiments. The critical difference for the success of the experiment was not only crystallizing at 4°C but also harvesting the crystals at this same temperature. Thus, we produced crystals that diffracted and allowed the resolution of the protein's crystallographic structure at 2.9 Å.

This allowed us to compare regions that show high residue conservation with homologous

proteins, such as the catalytic triad and subsite I. But it also allowed us to see regions with sequence differences, such as in the first amino acid of subsite II, which has an isoleucine where a valine is usually found (in type II PETase-likes). Furthermore, in the extended loop region of MetaG7, which was expected to have 3 more residues than type II PETase-likes according to the multiple sequence alignment, we observed from the crystallographic structure the presence of an extended α -helix at the end of the loop, stabilized by residues Q257 and Y256. We also observed the two disulfide bridges characteristic of type II PETases.

Therefore, having greater knowledge of the MetaG7 structure and knowing that it is active at low temperatures, it proves to be a good candidate for protein engineering for bioremediation, particularly for the degradation of PET at low temperatures.

References

- [1] FURTADO, A. A. **Estudos estruturais e bioquímicos de 10 enzimas com possível atividade de PET hidrolase oriundas de metagenoma antártico**. 2023. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.
- [2] HAN, X. et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. **Nature Communications**, v. 8, art. 2106, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-02255-z.
- [3] JOO, S. et al. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. **Nature Communications**, v. 9, art. 382, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02881-1.