

Título em Português:	Produção heteróloga e caracterização bioquímica de CAZymes envolvidas na hidrólise da xilana visando valorização da biomassa lignocelulósica.
Título em Inglês:	Heterologous production and biochemical characterization of CAZymes involved in xylan hydrolysis aiming to valorize lignocellulosic biomass.
Autor:	João Vítor Lopes Osshiro
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Igor Polikarpov
Área de Pesquisa /	Biologia Molecular
SubÁrea:	
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas

PRODUÇÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CAZYMES ENVOLVIDAS NA HIDROLISE DA XILANA VISANDO VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

João Vítor Lopes Osshiro

Orientador: Igor Polikarpov

Universidade de São Paulo

jvosh123@usp.br

Objetivos

O presente projeto foi dividido em uma parte experimental durante a sua primeira metade, no qual foi focado no aprendizado e aplicação de métodos bioquímicos e biofísicos, tal como a clonagem molecular, e purificação de enzimas. Durante esse período, a enzima alvo de estudo era a BIAbf43, uma arabinofuranosidase, class que é responsável por clivar decorações de arabinofuranose durante a hidrólise do xilano. Os objetivos foram de caracterizar bioquimicamente e biofísicamente sua atividade e estrutura. Durante a segunda metade do projeto, visou-se o aprendizado e aplicações de métodos computacionais voltados para a análise enzimática, tal como a utilização de ferramentas como o AlphaFold, ColabFold, PyMol e métodos de Sequence Alignment. Durante esse período, realizou-se uma hipótese de reavaliação de classificação funcional da enzima BgAgal27 da família GH27, tendo como base uma mutação estrutural. Outra parte do projeto, focou na análise diferencial de 4 Xilanases da família GH10, no qual, buscou-se através de métodos de alinhamento estrutural, entender possíveis diferenças que possam explicar a diferença, entre as Enzimas em estudo, de especificidade com determinadas decorações duplas de arabinoses em arabinoxilanos. Convencionou-se chamar nesse

presente trabalho as Xilanases como A,B,C e D. Essas podem ser divididas em dois subgrupos conforme suas diferenças de especificidade A/C e B/D

Métodos e Procedimentos

A fim de caracterizar a arabinofuranosidase BIAbf43, foi necessário obter uma considerável amostragem purificada da enzima, para tanto, foram utilizados métodos de clonagem molecular e expressão heteróloga de enzimas em meios Luria Bertani de cultivo e expressão compostas por bactérias E.Coli(Arctic Express). Métodos de Purificação por afinidade com Níquel foram utilizados. A amostragem da enzima foi submetida a diversas condições bioquímicas a fim de caracterizar sua atividade e houve uma tentativa de resolver a estrutura da enzima. A segunda parte do projeto envolveu o uso de programas de Deep Learning como o AlphaFold e ColabFold para gerar modelos de estruturais das enzimas BgAgal27 e das Xilanases. Realizando, o Sequence Alignment, descobriu-se as enzimas da mesmas famílias com estrutura primária/sequência mais próxima, e estudos comparativos foram realizados.

Resultados

As análises obtidas para estrutura da enzima BIAbf43 foram inconclusivas, possivelmente, por um erro experimental realizado durante a segunda etapa de purificação enzimática.

Utilizando análises comparativas para BgAgal27 com a enzima SaArap27A (PDB:1SZN). A enzima demonstrou uma incomum mutação única de resíduo na posição E(121) na BgAgal27, assim como a relatada na enzima SaArap27A, cujos análogos em outras enzimas da família GH27 são resíduos D para alpha-galactosidases. Isso, levanta e já resolvida(PDB:1SZN), o artigo que acompanha esse arquivo PDB relatou a existência de uma mutação também observada na hipótese de que talvez, a classificação funcional da BgAgal27 não seja, realmente, uma alpha-galactosidase.

Para as 4 xilanases em questão, diversos alinhamentos estruturais e sequenciais foram realizados, utilizando com molde a enzima registrada no site CAZy Q7SI98(UniProt). A partir das análises, percebeu-se um conjunto de alterações estruturais comum para B/D e incomum para A/C. No entanto, as mesmas não são por si só suficientes para explicar a diferenciação de especificidade entre os subgrupos A/C e B/D.

Conclusões

Diversas tentativas para cristalizar a enzima ColabFold:Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: Making protein folding accessible to all. Nature Methods, 2022 BgAgal27, foram realizadas, seus resultados inconclusivos e insuficientes podem ser fruto de duas hipóteses, sendo a primeira delas o fato de ter sido realizado um erro experimental na purificação da proteína do meio contendo a TEV, a segunda hipótese é a de que a estrutura da BIAbf43 possui domínios e linkers entre domínios que as tornam instáveis para cristalização. Quanto à classificação da enzima BgAgal27, os resultados obtidos servem de indício para uma alteração na classificação funcional para beta-pyranosidase, no entanto, para chegar a tal conclusão é necessário realizar experimentos da atividade da enzima, assim como também é sugerido realizar um experimento de mutação na enzima, para verificar se existe uma forte correlação entre a funcionalidade e a mutação observada. Da mesma forma vale para os resultados para as

enzimas A,B,C e D, nas quais uma mutações em resíduos em comum para B/D sugerem uma explicação para diferentes especificidades das enzimas em relação à A/B, no entanto, para embasar tal hipótese é necessário a realização de estudos computacionais sobre a dinâmica e minimização de energia dessas enzimas para entender os impactos dessas mutações

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao Grupo PoloTerra e ao meu Orientador Igor Polikarpov, por me ajudarem, apoiarem e ensinarem sobre essa área tão rica que é o estudo de CAZymes

Referências

1. AlphaFold2:Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
2. ColabFold:Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: Making protein folding accessible to all. Nature Methods, 2022
3. Zui Fujimoto, Atsushi Kuno, Satoshi Kaneko, Hideyuki Kobayashi, Isao Kusakabe, Hiroshi Mizuno, Crystal structures of the sugar complexes of Streptomyces olivaceoviridis E-86 xylanase: sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module1aEdited by R. Huber, Journal of Molecular Biology, Volume 316, Issue 1, 2002,
4. Artigo:Structural and functional analyses of catalytic domain of GH10 xylanase from Thermoanaerobacterium saccharolyticum JW/SL-YS485 Xu Han, Jian Gao, Na Shang, Chun-Hsiang Huang, Tzu-Ping Ko, Chun-Chi Chen, Hsiu-Chien Chan, Ya-Shan Cheng, Zhen

Zhu, Juergen Wiegel, Wenhua Luo, Rey-Ting Guo, Yanhe Ma

5. <https://glycam.org/cb/>
6. https://wiki.pymol.org/index.php/Show_contacts
7. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp
8. http://www.cazy.org/GH27_structure.html
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>

HETEROLOGOUS PRODUCTION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CAZYMES INVOLVED IN XYLAN HYDROLYSIS AIMING AT LIGNOCELLULOSIC BIOMASS VALORIZATION

João Vítor Lopes Osshiro

Igor Polikarpov

University of São Paulo

jvosh123@usp.br

Objectives

The present project was divided into an experimental phase during its first half, focusing on learning and applying biochemical and biophysical methods, such as molecular cloning and enzyme purification. During this period, the target enzyme for study was BIAbf43, an arabinofuranosidase responsible for cleaving arabinofuranose decorations during xylan hydrolysis. The goals were to biochemically and biophysically characterize its activity and structure. In the second half of the project, the focus shifted to learning and applying computational methods aimed at enzymatic analysis, such as using tools like AlphaFold, ColabFold, PyMol, and Sequence Alignment methods. During this period, a hypothesis was raised regarding the reclassification of the functional classification of the enzyme BgAgal27 from family GH27, based on a structural mutation. Another part of the project focused on the differential analysis of four GH10 family xylanases, aiming to understand possible differences in the specificity of the studied enzymes towards specific double arabinose decorations in arabinoxylans through structural alignment methods. In this study, the xylanases were designated as A, B, C, and D. These can be divided into two subgroups according to their specificity differences: A/C and B/D.

Materials and Methods

To characterize the arabinofuranosidase BIAbf43, a considerable amount of purified enzyme was required. To achieve this, molecular cloning methods and heterologous expression of enzymes in Luria Bertani culture media using Arctic Express E. Coli bacteria were used. Nickel affinity purification methods were employed. The enzyme sample was subjected to various biochemical conditions to characterize its activity, and an attempt was made to resolve the enzyme's structure. The second part of the project involved using deep learning programs like AlphaFold and ColabFold to generate structural models of BgAgal27 and the xylanases. Using Sequence Alignment, the closest primary structure/sequence family enzymes were identified, and comparative studies were conducted.

Results

The structural analyses of the enzyme BIAbf43 were inconclusive, possibly due to an experimental error during the second stage of enzyme purification. Using comparative analyses for BgAgal27 with the enzyme SaArap27A (PDB:1SZN), the enzyme exhibited an unusual unique residue mutation at position E(121), similar to what was reported for the enzyme SaArap27A, whose analogs in other GH27 family enzymes are D residues for alpha-galactosidases. This raises the hypothesis that the functional classification of BgAgal27 might

not be alpha-galactosidase. For the four xylanases in question, several structural and sequence alignments were performed using the enzyme registered on the CAZy website Q7SI98 (UniProt) as a template. From the analyses, a set of common structural alterations for B/D and uncommon for A/C were identified. However, these alone were not sufficient to explain the specificity differences between the A/C and B/D subgroups.

Conclusions

Several attempts to crystallize the enzyme BgAgal27 were made, but the results were inconclusive and insufficient. Two hypotheses were considered: the first is that an experimental error occurred during protein purification from the TEV-containing medium, and the second is that the structure of BIAbf43 has domains and linkers between domains that make it unstable for crystallization. Regarding the classification of BgAgal27, the results indicate a possible reclassification as beta-pyranosidase; however, to reach this conclusion, enzyme activity experiments are required, and a mutation experiment on the enzyme is also suggested to verify if there is a strong correlation between functionality and the observed mutation. Similarly, for enzymes A, B, C, and D, mutations common to B/D suggest an explanation for the different specificities between the enzymes in relation to A/B. However, computational studies on the dynamics and energy minimization of these enzymes are needed to understand the impacts of these mutations.

Acknowledgements

My sincere thanks to the PoloTerra Group and my advisor Igor Polikarpov for helping, supporting, and teaching me about this rich field of CAZyme studies.

References

1. AlphaFold2: Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.

- Nature 596, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
2. ColabFold: Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: Making protein folding accessible to all. Nature Methods, 2022
3. Zui Fujimoto, Atsushi Kuno, Satoshi Kaneko, Hideyuki Kobayashi, Isao Kusakabe, Hiroshi Mizuno, Crystal structures of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase: sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module1a. Journal of Molecular Biology, Volume 316, Issue 1, 2002.
4. Article: Structural and functional analyses of catalytic domain of GH10 xylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 Xu Han et al.
5. <https://glycam.org/cb/>
6. https://wiki.pymol.org/index.php/Sho_w_contacts
7. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx>
8. http://www.cazy.org/GH27_structure.html
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>