

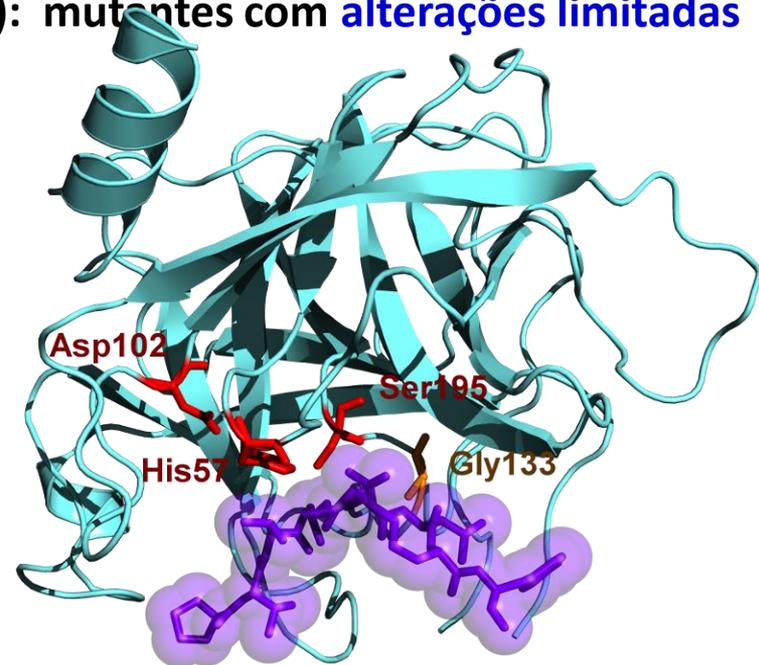
Continuação: Enzimas naturais → modificadas (*≠ das naturais*)

Mutagênese (tecnologia do DNA recombinante): mutantes com **alterações limitadas**

- *Sítio-dirigida* ou *sítio-específica*:

única ou múltipla

- *Randômica*



Modificação química: em princípio, **alterações ilimitadas**

- *Não específica*: explora grupos reativos de mesmo tipo (Ex: β COOH de Asp, γ -COOH de Glu)

- *Sítio-específica*: explora diferentes reatividades de grupos do mesmo tipo vindos de diferentes “ambientes” da proteína (Ex. Asp 102 e Asp X)

- *Sítio-seletiva*: combinação de mutagênese sítio-dirigida + modificação química
[Ex. AlaX → Cys(R)]

Ex. modificação por **mutagênese sítio-dirigida**: enzimas mutadas com propriedades alteradas

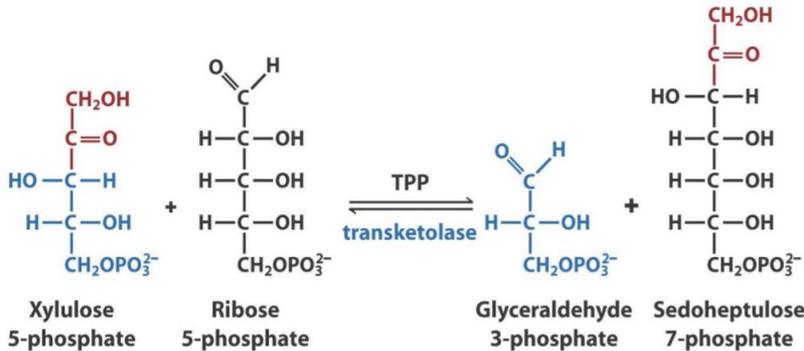
Sítios estruturalmente flexíveis → alvos → aumento de estabilidade enzimática

RFS = *rigifying flexible sites strategy* → BAIXA

EFICIÊNCIA → existem outras?

Estratégia escolhida → “*ΔΔG calculations inRosetta*”

→ Alvos escolhidos → loops flexíveis de transcetolase de *E. coli*. → 49 variantes simples



Loops	β-turns	Type	Possible mutations
Loop6 138–148	139RPGH142	II	R139C,P H142C,D,K,Q,S,T
Loop13 245–257	246IIGF249	II	I246C,P I247A,E,K,P F249C,D,K,Q,S,T K254C,G,N,D,S,T,P
	251SPNK254	I	
	252PNKA255	I	
	254KAGT257	II	
Loop15 278–287	282APFE285	II	A282C,P F284G,N E285C,D,K,Q,S,T
Loop17 331–337	334PSDF337	I	F337C,G,N

H. Yu et al. (2017) Two strategies to engineer flexible loops for improved enzyme thermostability, Scientific Reports | 7:41212.

Table 1. Design of variants based on β-turn amino acid positional preference.

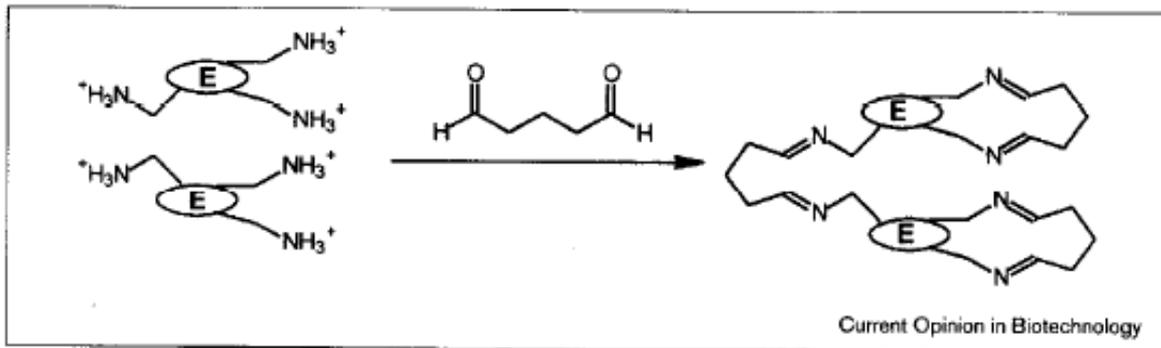
I189H, A282P, D143K = mais termoestáveis do que a TK selvagem

A282P com H192P = meia-vida 3X > a 60°C, atividade específica 5X > a 65°C, Kcat 1,3 X maior e Tm 5°C acima.

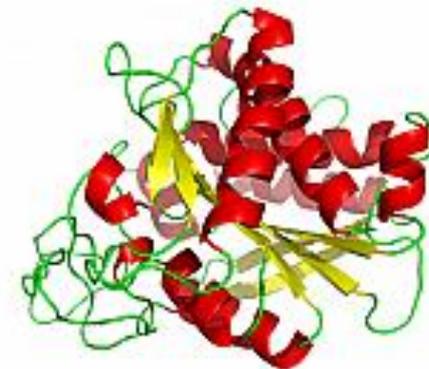
Modificação química: mesmos objetivos do anterior

Agente bifuncional: cross-linking

Cross-linked enzyme crystals

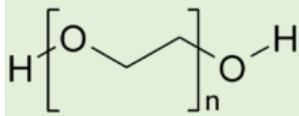


CLECs are generated from the glutaraldehyde inter- and intra-molecular imine crosslinking of enzyme (E) ϵ -amino lysine groups in microcrystals (10^{-1} mm in size).

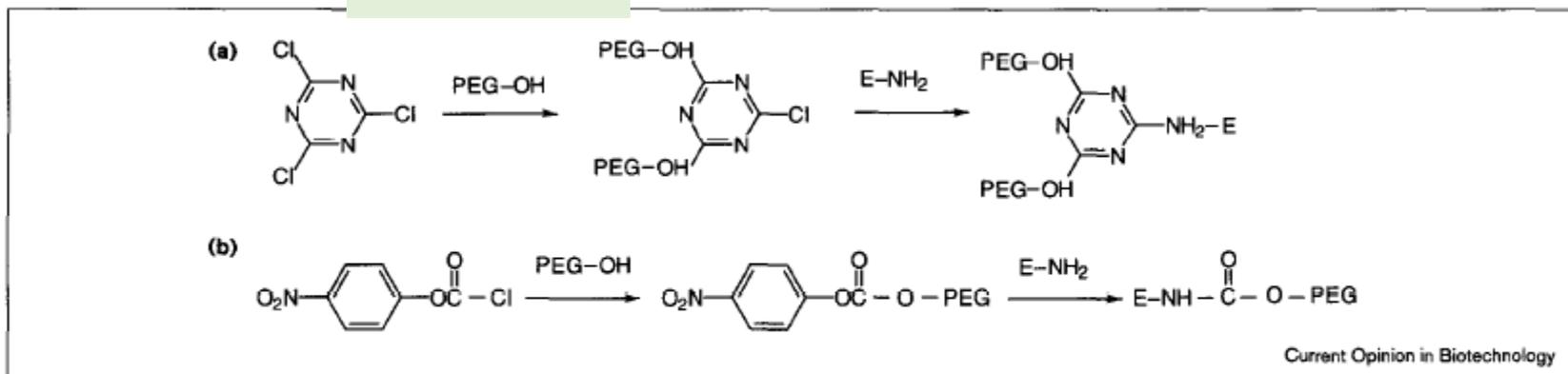


1964: **Carboxipeptidase A**
(exo-peptidase; MW ~ 35 KDa)

Enzimas com maior estabilidade e atividade; estrutura cristalina definida



Polímero monofuncional



Enzyme (E) modification with PEG activated with (a) cyanuric chloride and (b) *p*-nitrophenyl chloroformate.

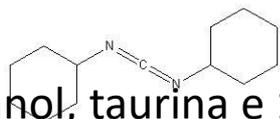
Exemplos dos tipos de modificação **química** já feitos:

1) Modificação não-específica (*explora grupos reativos de mesmo tipo*)

proteases:

- alquilação e reação com anidridos de ϵNH_2 de Lys (K) em αQT = **mais tolerável a S. orgânicos**
- reação com carbodiimidas para ligar ciclo-dextrinas em Thr (T) = **7-8 X mais estável à autólise e > atividade esterásica** (melhor ligação ao S; > $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$): Asp153 / Glu186 modificados

ribonucleases:



- reação com aminoetanol, taurina e 1,2 diaminoetano + 6-8 **COOH** →
- **CONHCH₂CH₂OH**, **CONHCH₂CH₂-SO₃⁻** e **CONHCH₂CH₂-NH₃⁺** = alteração de cargas = <<
atividade hidrolítica ; > citotoxicidade frente a células específicas

lipases:

- reação de aminas com Z (*benziloxicarbonil*), Z-NO₂, acetil = **> enantioseletividade em esterificação de ácidos**
- possível explicação = modificação estrutural com a acilação para forma mais compacta e menos flexível reconhece menos o enantiômero S

α -quimotripsina (*endo-protease pancreática*; MW ~ 23 KDa)

Table 5-3 Specificities of Various Endopeptidases

Enzyme	Source	Specificity	Comments
Trypsin	Bovine pancreas	R_{n-1} = positively charged residues: Arg, Lys; $R_n \neq$ Pro	Highly specific
Chymotrypsin	Bovine pancreas	R_{n-1} = bulky hydrophobic residues: Phe, Trp, Tyr; $R_n \neq$ Pro	Cleaves more slowly for R_{n-1} = Asn, His, Met, Leu
Elastase	Bovine pancreas	R_{n-1} = small neutral residues: Ala, Gly, Ser, Val; $R_n \neq$ Pro	
Thermolysin	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	R_n = Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val; $R_{n-1} \neq$ Pro	Occasionally cleaves at R_n = Ala, Asp, His, Thr; heat stable
Pepsin	Bovine gastric mucosa	R_n = Leu, Phe, Trp, Tyr; $R_{n-1} \neq$ Pro	Also others; quite nonspecific; pH optimum = 2
Endopeptidase V8	<i>Staphylococcus aureus</i>	R_{n-1} = Glu	

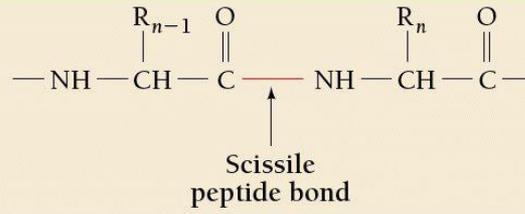
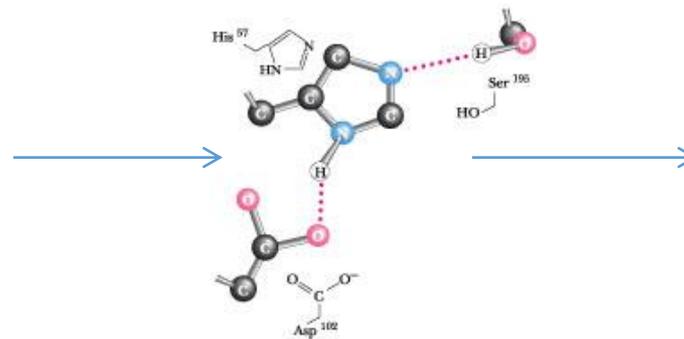
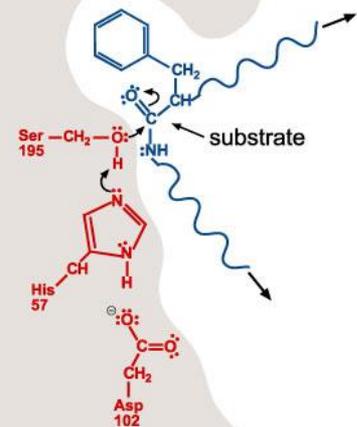


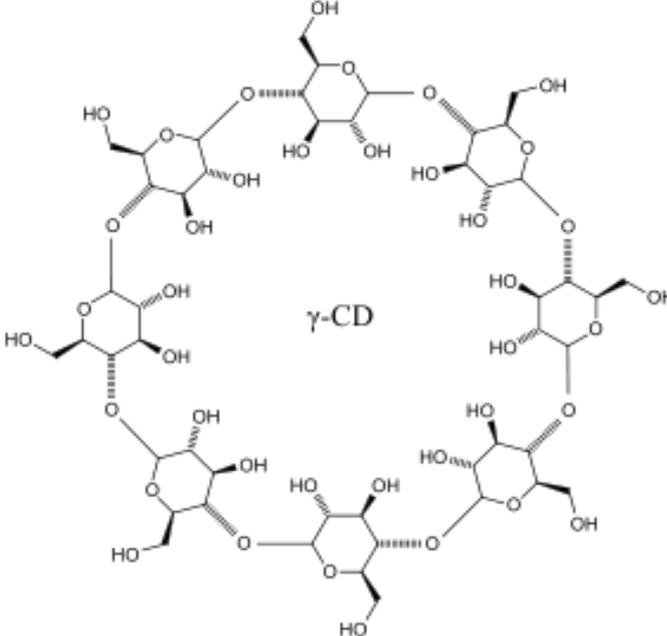
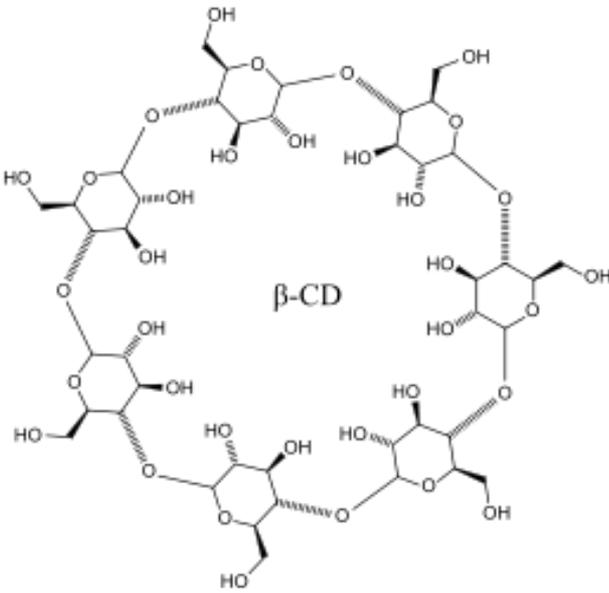
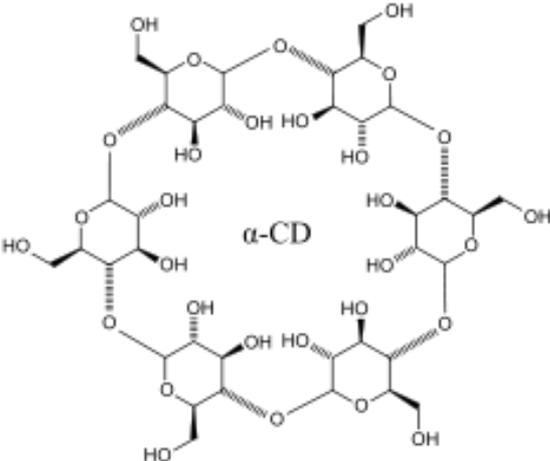
Table 5-3 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons



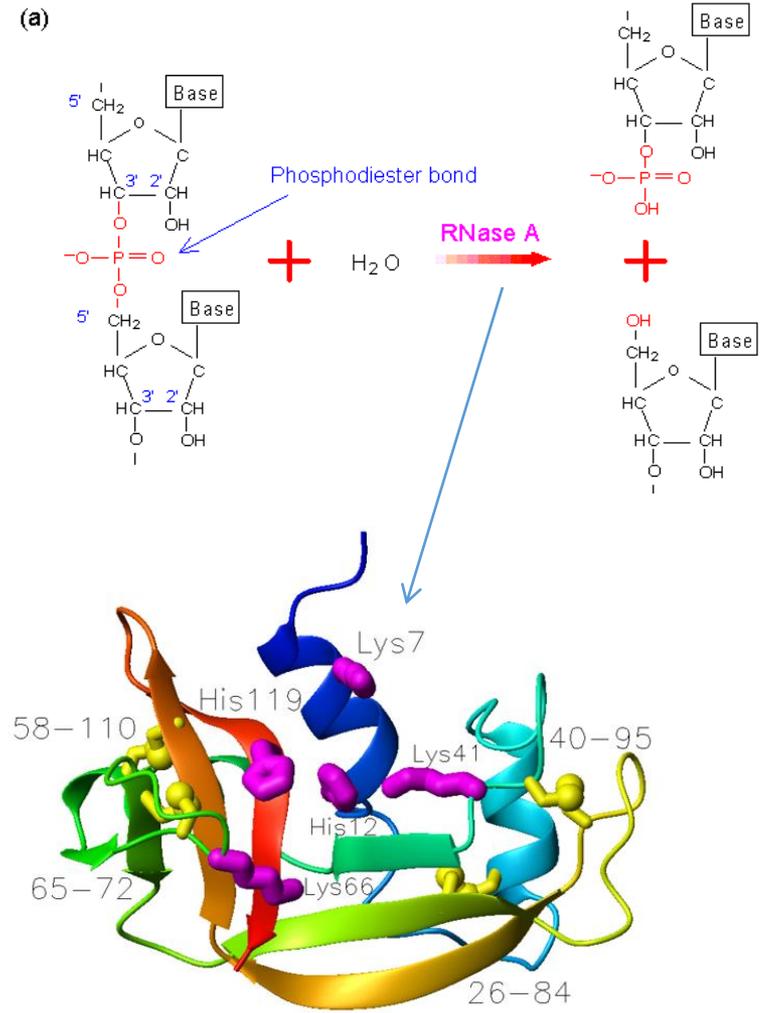
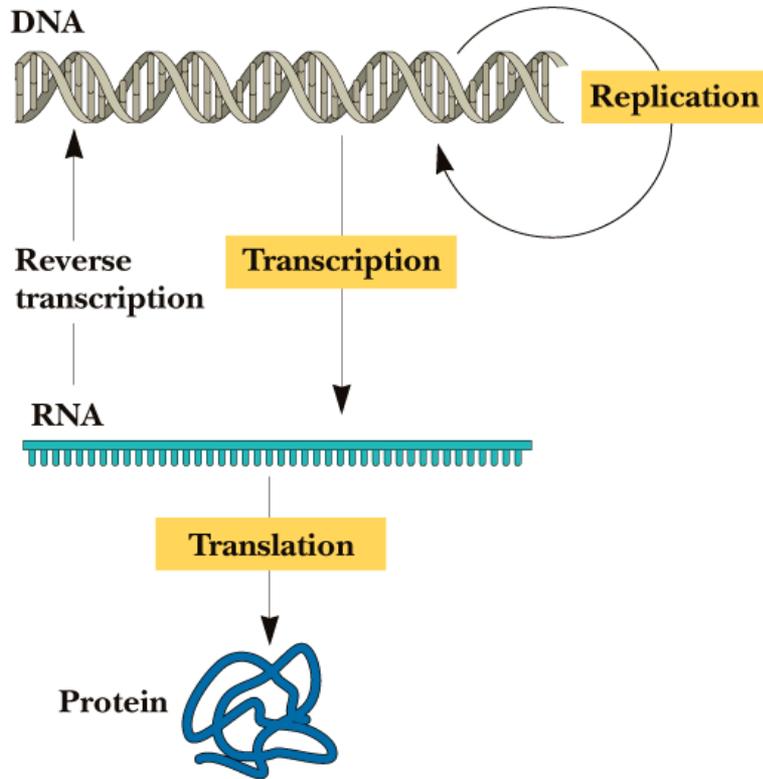
enzyme active site



Ciclo-dextrinas



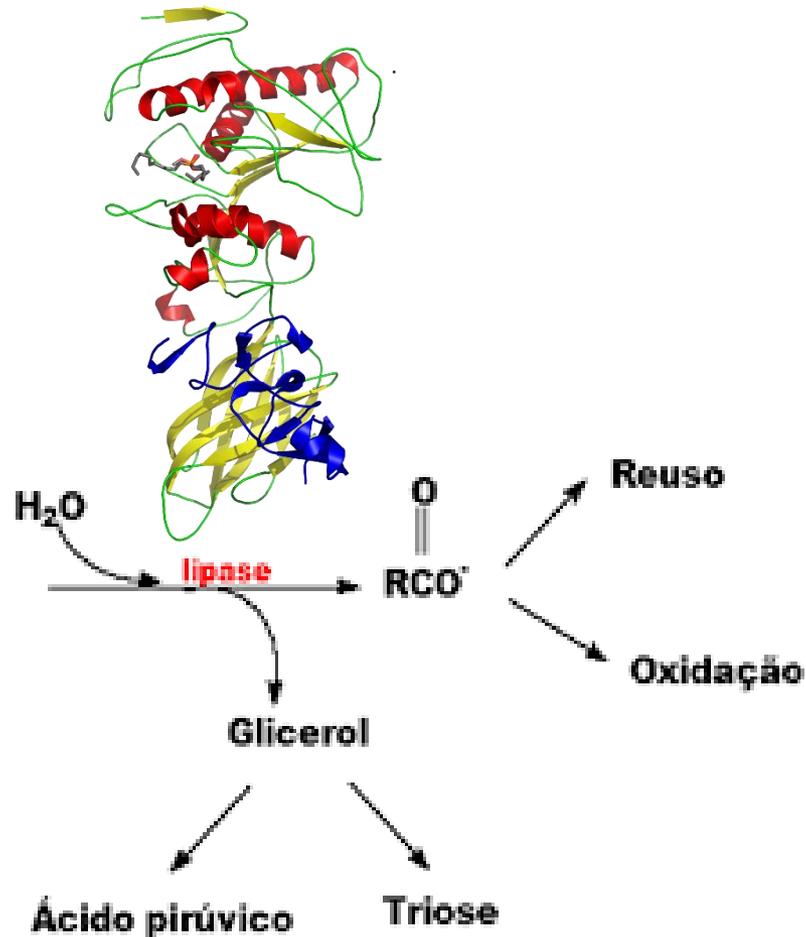
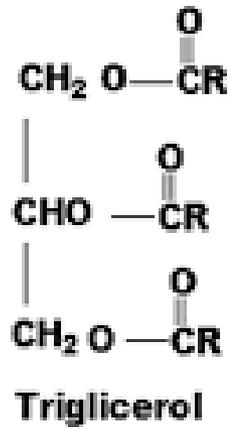
Ribonuclease (*RNAase A* pancreática; MW ~ 14 KDa)



Metabolismo de RNA
Maturação de RNA
Defesa contra infecção por retro-viruses

Lipase (*pancreática humana*; MW ~ 50 KDa)

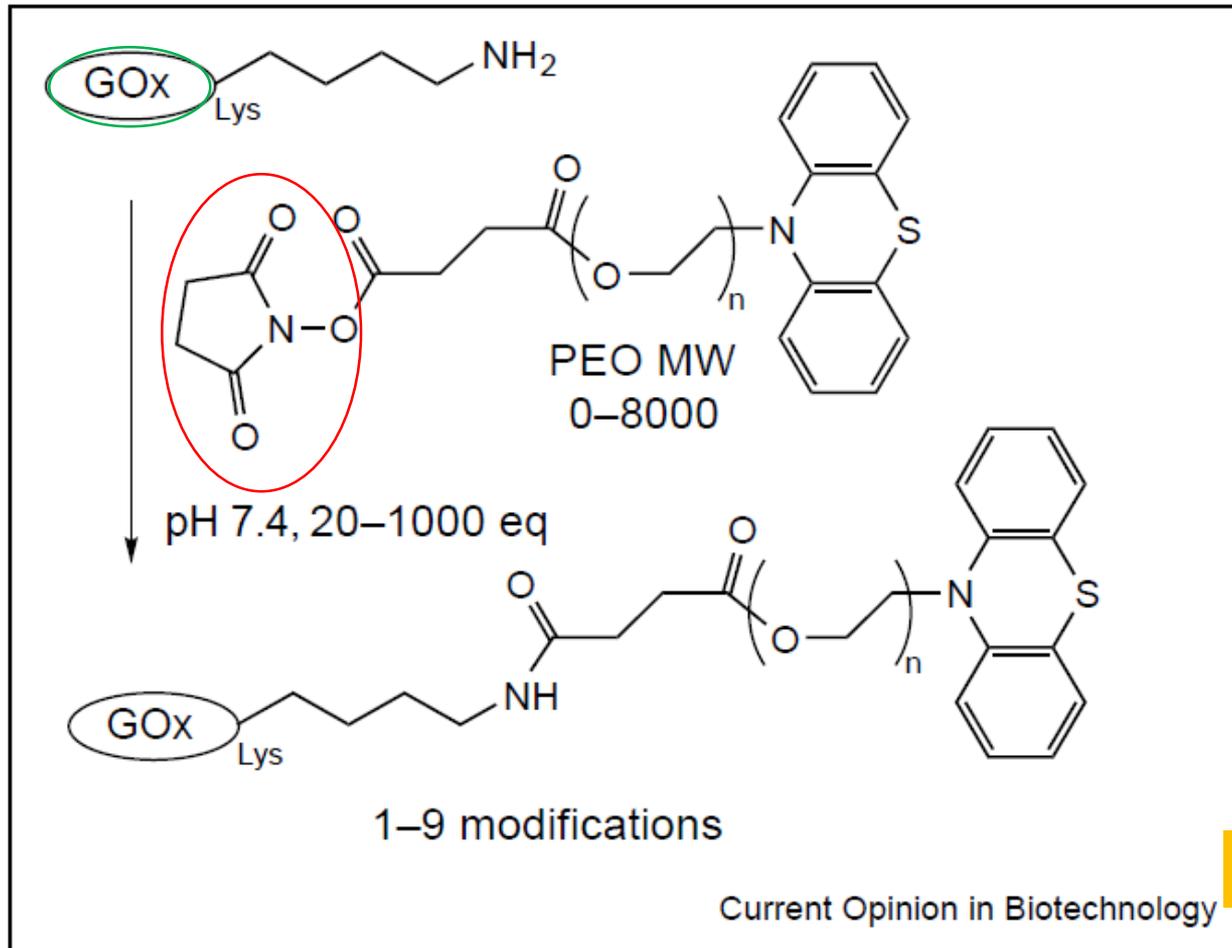
Metabolismo de lipídeos
Produção de biodiesel



Continua...
→

1) Modificação não-específica (*explora grupos reativos de mesmo tipo*)

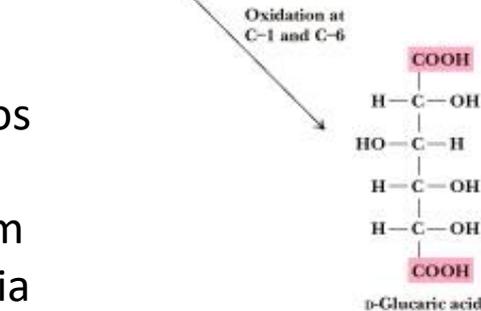
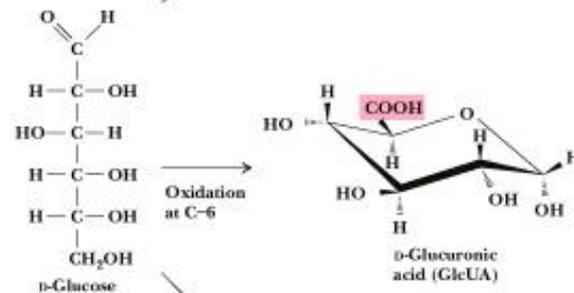
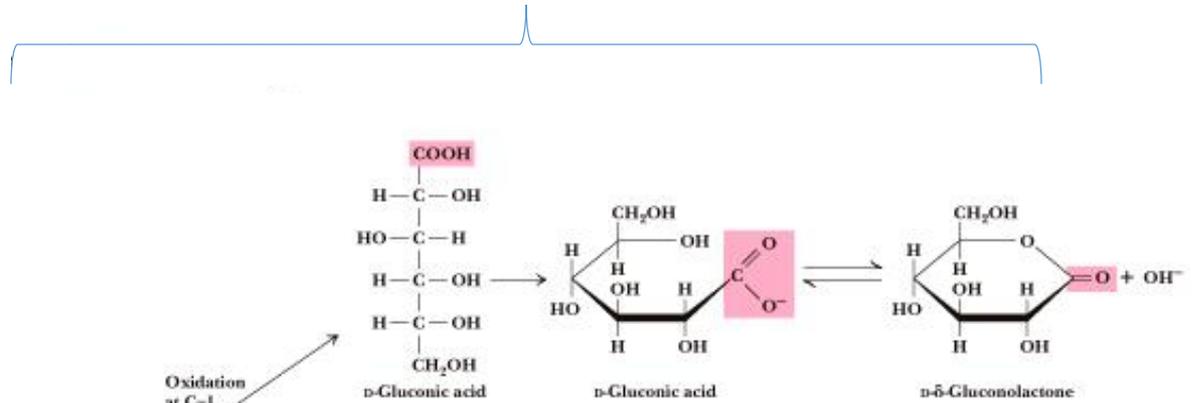
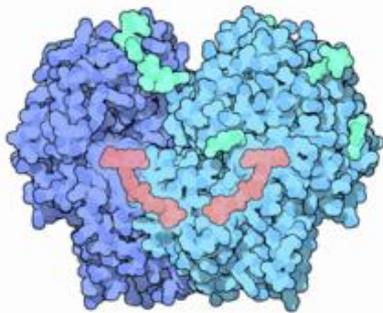
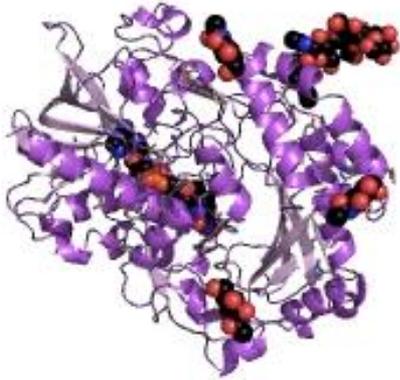
Modificação de glucose-oxidase (GO): aumento de eficiência



Davis, 2003

Lysine modification was used to create GOx-PT-PEO hybrids that showed activities dependent on the PEO length [20]. GOx, glucose oxidase; PT-PEO, phenothiazine-labelled polyethylene oxide.

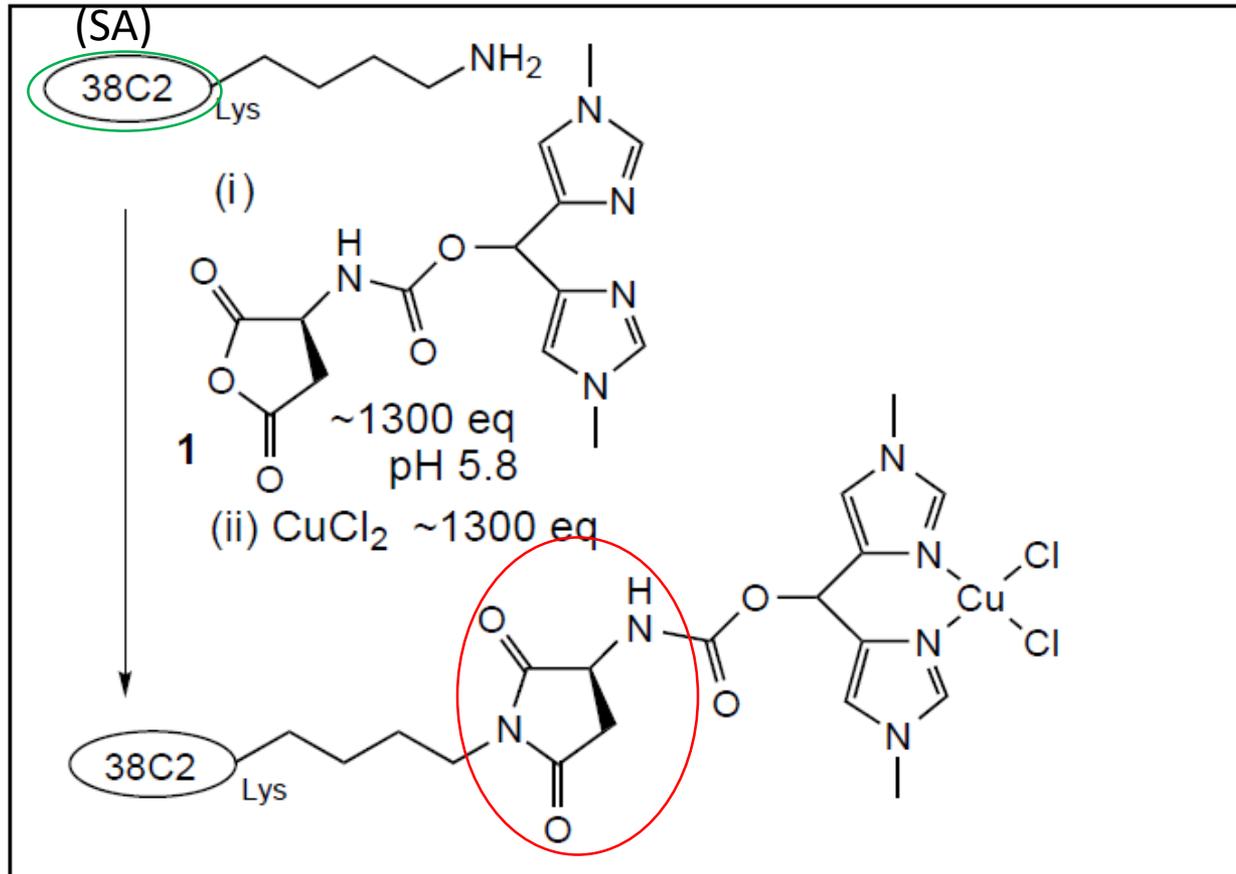
Glucose-oxidase (GO): dímero; oxiredutase; MW ~160 KDa



Metabolismo de carboidratos
 Cofator: FAD/FADH₂
 Determinação de glucose em fluidos e indústria alimentícia

2- Modificação química sítio-específica ou regio-seletiva

(explora diferentes reatividades de grupos do mesmo tipo vindos de diferentes “ambientes” da proteína)



38C2
(Anticorpo Aldolase)

||
metalloprotease-like

Davis, 2003

Incapaz de **catalisar oxidações** para análises de Cu

Apresenta **atividade hidrolítica expressiva (K_{cat} 10⁴)** > do que a do complexo **com piridina**

Também ocorre com:

- OH de Ser de serino-proteases → **inativa**
- NH₂ terminal de subtilisina Carlsberg → **menos autolítica e mais termoestável**

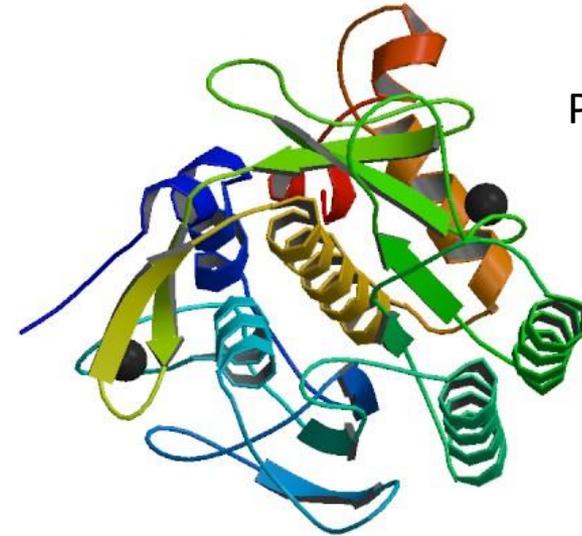
2- Modificação química sítio-específica ou regio-seletiva (*explora diferentes reatividades de grupos do mesmo tipo vindos de diferentes “ambientes” da proteína*)

Protease; J. Mol. Biol.
(1992) 228, 580-595

---S₁-S₁'--- (Sítio ativo de subtilisina *Bacillus lentus*)



---P₁-P₁'--- (ligação peptídica-alvo do substrato)



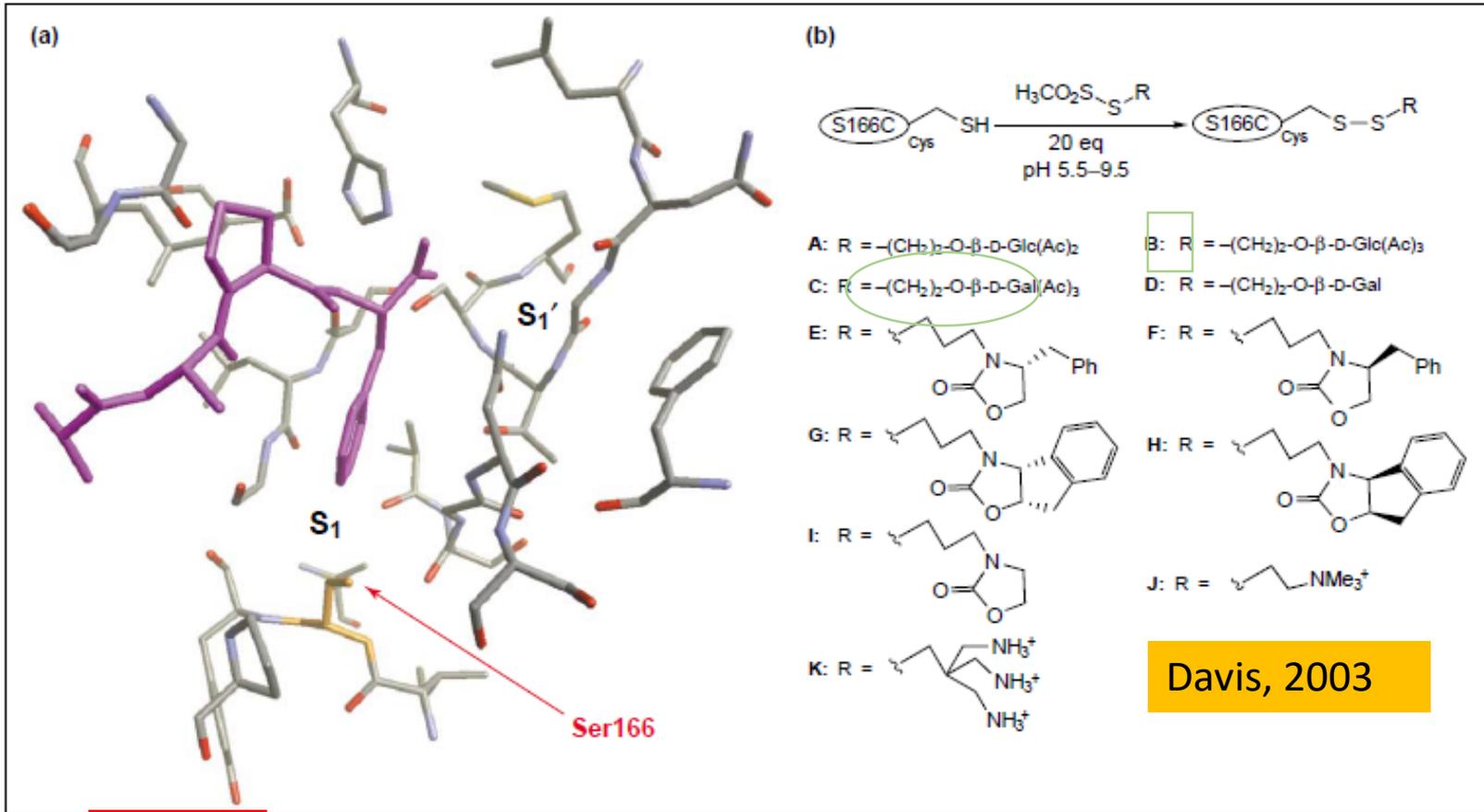
Proteólises

Glicosilação de S1:

Especificidade pelo substrato ampliada (aceite de D- aminoácidos):

S1 hidrofóbico → hidrofílico mudança do enovelamento do bolso para permitir solvatação → aumento de flexibilidade “do bolso”

3- Modificação Sítio-seletiva (combinação de mutagênese sítio-dirigida + modificação química) Ex. Ala → Cys(R)



Modifications to broaden substrate tolerance. The introduction of 'polar patches' to position 166 at the base of the primary specificity determining pocket of a serine protease greatly broadened the substrate tolerance to allow its use in the coupling of D-amino acids. (a) Structure of the specificity determining pocket with bound substrate mimic shown in purple; Ser166 is in yellow and other atoms are in standard colours. (b) The various carbohydrate, oxazolidinone and trimethylammonium 'polar patches' A-J were attached to position 166 using methanethiosulfonate chemistry.

Ser166Cys-S(CH₂)₂NMe₃⁺: catálise de Z-D-Glu + Gly-NH₂ → Z-D-Glu-Gly-NH₂ (74 %)

Ser166Cys-S(3R,4S)indenooxazolidinona → catalisador eficiente de:

Z-L-Ala + Gly-NH₂ → Z-L-Ala-Gly-NH₂ (91 %)

Z-D-Ala + Gly-NH₂ → Z-D-Ala-Gly-NH₂ (86 %)

Vá para o vídeo #3