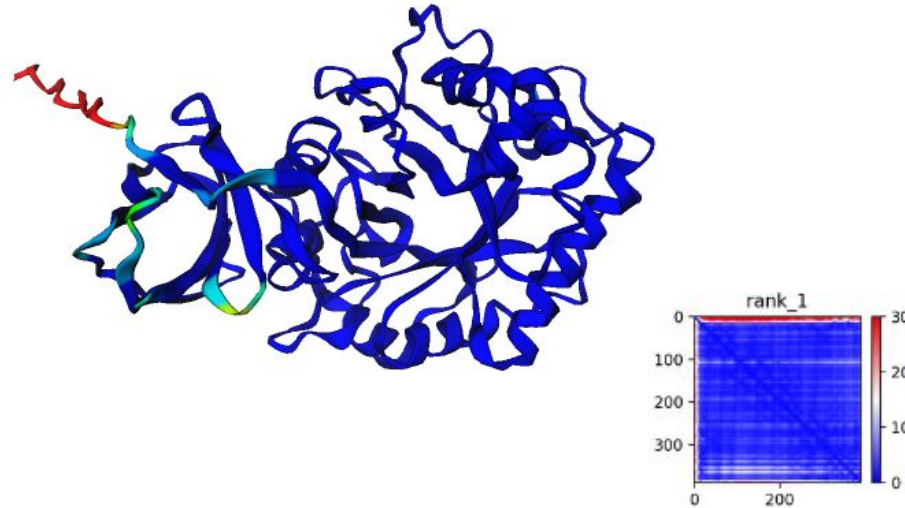


# Modelagem estrutural

Análise da xilanase RcXyn30\_8

# RcXyn30\_8

Indicadores de confiabilidade da predição da estrutura - pLDDT e PAE



**pLDDT:**

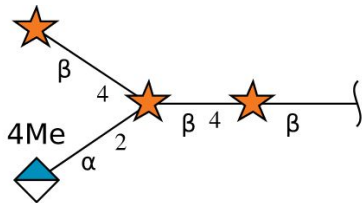


## Modelos utilizados para comparação

## EcXyn30A/XynA (1.39 Å)

| Domínios (PFAM) | e-value |
|-----------------|---------|
| Glyco_hydro_30C | 9.0e-12 |
| Glyco_hydro_30  | 4.9e-09 |

**Ligantes:**



MeGlcA-(1-2)-[Xyl]<sub>2</sub>-Xyl-Xyl

**Organismo:** *E. chrysanthemi*

**PDB: 2Y24** (Vrsanska, M. et al, 2011)

**R - 1.39 Å**

## XynC (2.59 Å)

| Domínios (PFAM) | e-value |
|-----------------|---------|
| Glyco_hydro_30C | 3.4e-05 |
| Glyco_hydro_30  | 0.0001  |

**Ligantes:**



MeGlcA-(1-2)-Xyl-Xyl

**Organismo:** *B. subtilis*

**PDB:** 3KL5 (St. John, F. J . et al, 2011 )

**R - 2.59 Å**

# Sítio catalítico

RcXyn30 possui sítio catalítico com aminoácidos conservados em relação à enzima XynC, já previamente caracterizada e com estrutura resolvida.

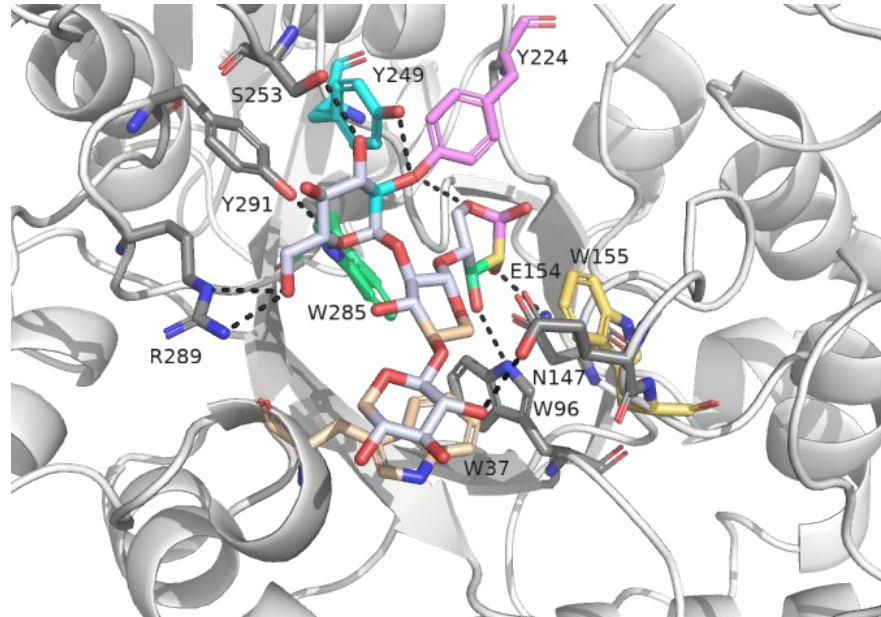
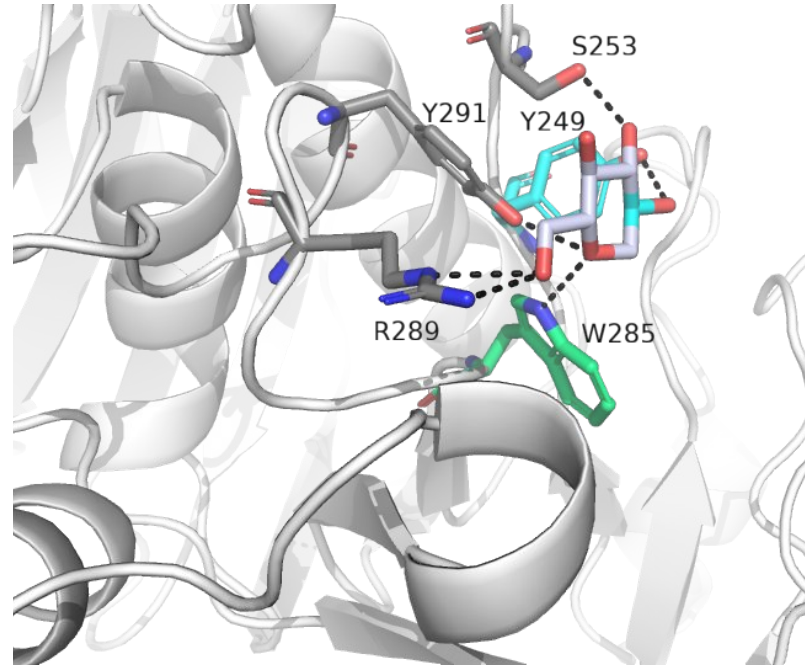


Figura 1 - Visão do sítio catalítico da RcXyn30\_8 a partir do terminal não redutor, contatos hidrofóbicos são coloridos na figura.

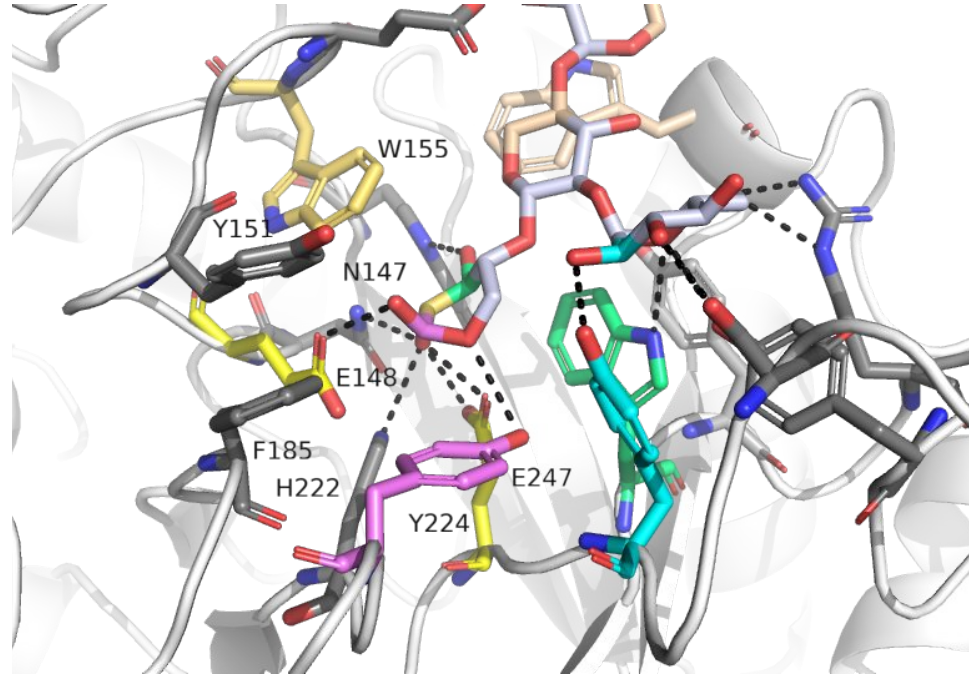
# Sítio catalítico

Um dos sítios é responsável pela interação com a ramificação. Na RcXyn30 todos os aminoácidos do sítio são conservados. Ele já foi reportado em trabalhos anteriores



**Figura 2 - Visão do sítio de interação com a ramificação da RcXyn30\_8, contatos hidrofóbicos são coloridos na figura.**

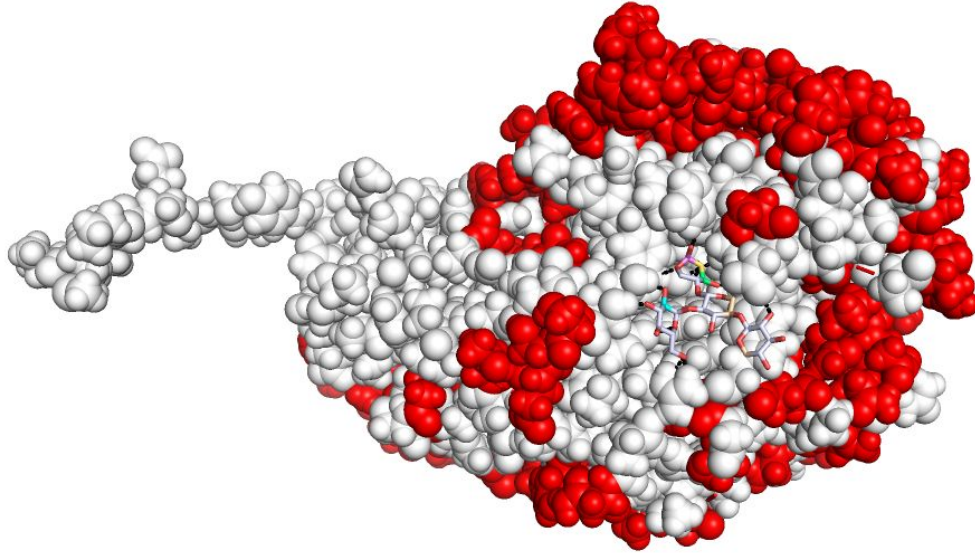
# Sítio catalítico



**Figura 3 - Visão do sítio catalítico da RcXyn30\_8 visto do terminal redutor do ligante, contatos hidrofóbicos são coloridos na figura.**

# Comparação XynC-RcXyn30

Vemos aqui que embora a maioria dos aminoácidos do sítio catalítico se conservem, os arredores do sítio carregam mutações na RcXyn30 em relação a XynC



**Figura 5 - RcXyn30\_8 é mostrada. Esferas em vermelho representam as mutações em relação a enzima XynC. Observa-se que o sítio catalítico ao redor do ligante parece bem conservado, com várias mutações nos bordos.**

# Sítio catalítico

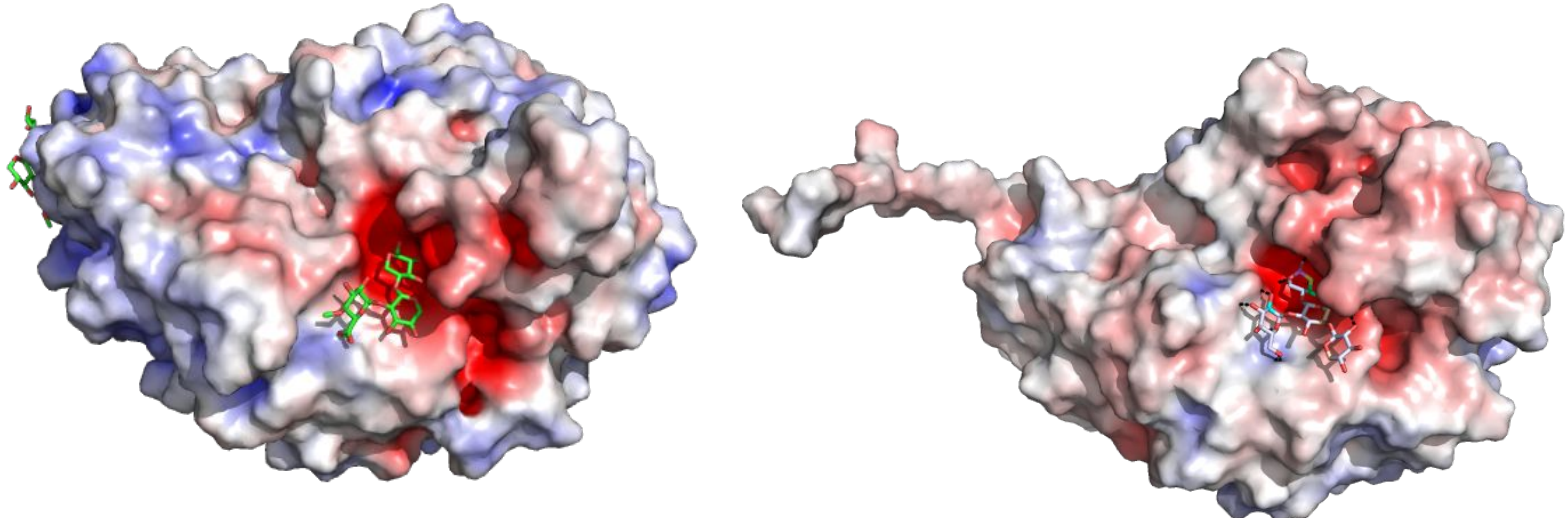
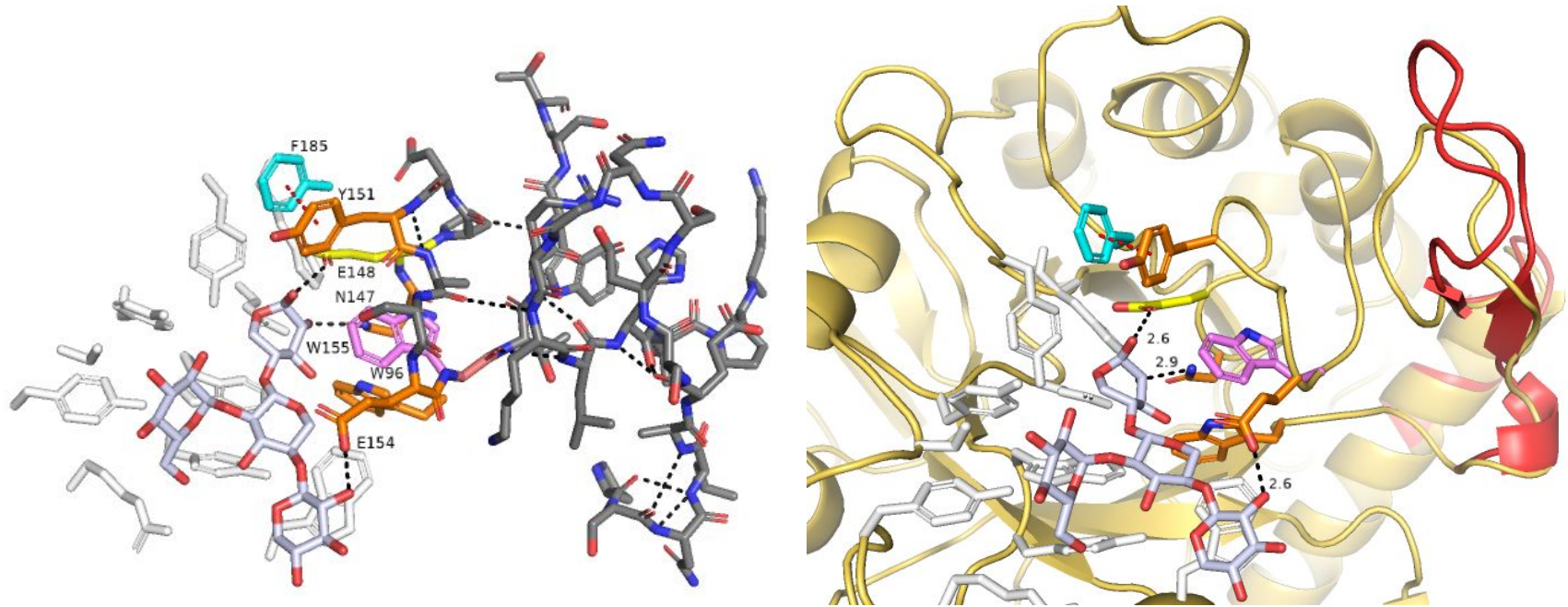


Figura 4 - Visão da XynC(a esquerda) RcXyn30\_8(a direita) coloridas pelo potencial eletrostático com o ligante. **Vemos que, embora os aminoácidos sejam conservados a mudança nos arredores do sítio catalítico faz com que as cavidades sejam diferentes.**



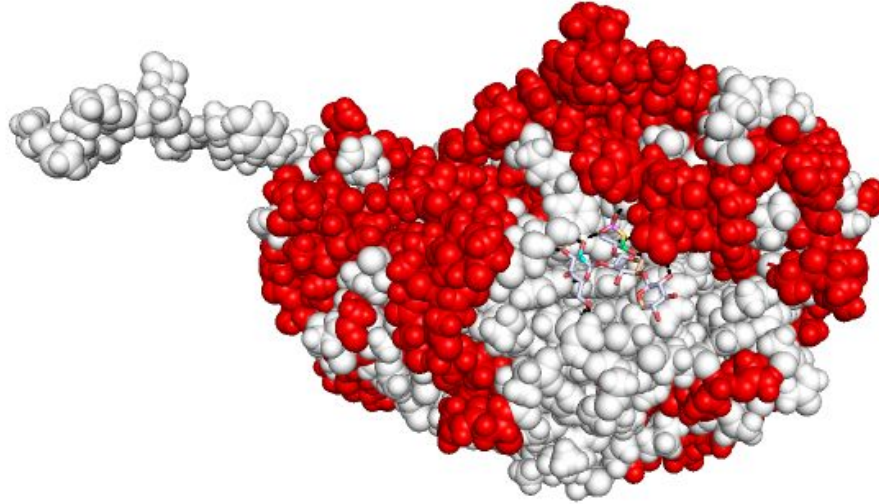
# Comparação XynC-RcXyn30



**Figura 6 - Motivo estrutural na borda do sítio catalítico da RcXyn30 que guarda mutações em relação a XynC. A figura 2 mostra o motivo na enzima XynC em vermelho(Beta-hairpin), e amarelo para RcXyn(loop). Comprimento das pontes de hidrogênio dos glutamatos é mostrado.**

É possível que a flexibilidade proporcionada pelo loop mais longo no motivo anterior para a RcXyn30 permita uma abertura maior da cavidade onde entraria o ligante. Vemos que as mutações localizadas acima do sítio catalítico próximo ao terminal redutor do ligante causam o surgimento de uma cavidade na RcXyn30. Dessa forma poderíamos esperar que a RcXyn30 seja apta a digerir substratos maiores

# Comparação EcXyn30-RcXyn30



**Figura 7 - RcXyn30\_8 é mostrada. Esferas em vermelho representam as mutações em relação a enzima EcXyn30. Observa-se que o sítio catalítico carrega mutações, assim como boa parte do N-terminal.**

# Comparação EcXyn30-RcXyn30

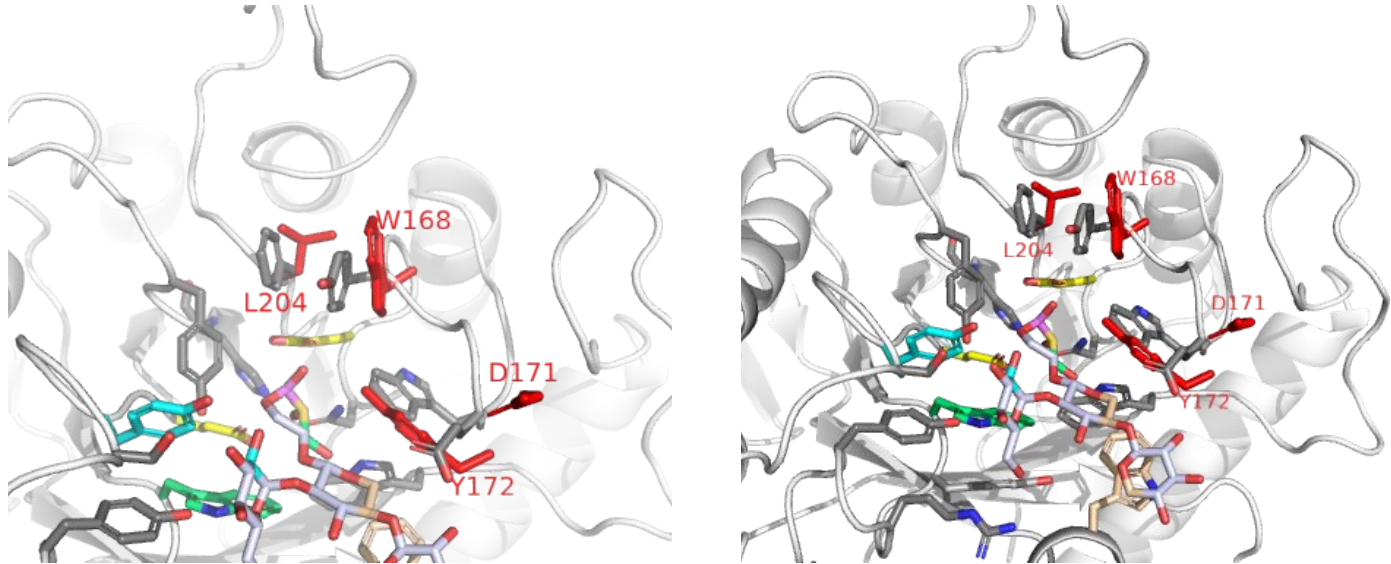
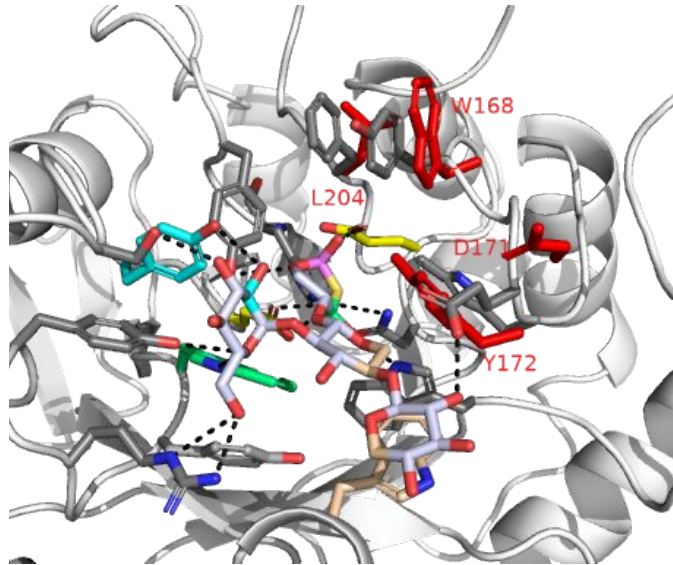


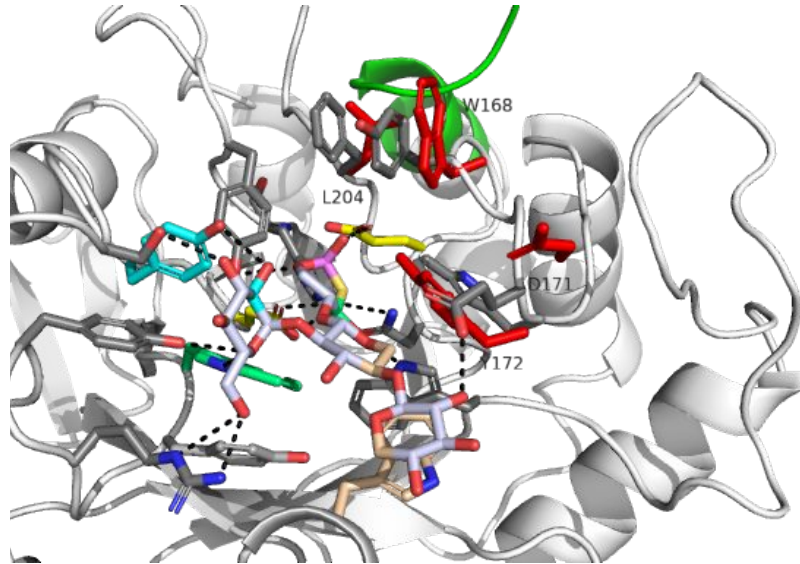
Figura 8 - Sítio catalítico da RcXyn30 é mostrado. Aminoácidos em vermelho são da EcXyn30 e representam as diferenças entre as enzimas. **Uma das mutações marcadas em vermelho (Leu-Phe) pode promover interações de stacking com carboidratos na RcXyn30**

# Comparação EcXyn30-RcXyn30



**Figura 9 - Sítio catalítico da RcXyn30 é mostrado. Aminoácidos em vermelho são da EcXyn30 e representam as diferenças entre as enzimas. Pontes de hidrogênio são mostradas.**

# Comparação EcXyn30-RcXyn30



A imagem mostra o sítio catalítico da RcXyn30 com um loop marcado em verde que representa uma inserção em relação a EcXyn30. Essa inserção pode servir para expansão da cavidade a partir da região de stacking promovida pelo par de aminoácidos (Phe-Tyr)

# Energias de ligação dos ligantes

Afim de observar o efeito da ramificação na afinidade da enzima pelo ligante, foram feitos testes para simular o valor da energia livre de ligação.

Vemos abaixo que a predição da energia livre mostra-se menor para substratos não ramificados, indicando uma preferência da enzima por esses substratos

# Kdeep(José Jiménez et. al)

|   | Mol. weight | dG<br>(kcal/mol)<br>(std) | Ligand<br>Efficiency<br>(kcal/mol)<br>(std) | pKd(std)           | pkl(std)   |
|---|-------------|---------------------------|---|--------------------|------------|
| MeGlcA <sup>2</sup> Xyl <sub>3</sub>                | 606.53      | -7.57 (-0.81)             | -0.18 (-0.02)                               | 5.61(0.60)         | 6.14(0.57) |
| Xyl <sub>3</sub>                                    | 414.36      | -6.77 (-0.69)             | -0.24(-0.02)                                | 5.02(0.51)         | 5.12(0.56) |
| MeGlcA <sup>2</sup> Xyl <sub>2</sub> <sup>(a)</sup> | 474.41      | -6.23(-0.64)              | -0.19(-0.02)                                | <b>4.62</b> (0.48) | 5.15(0.53) |
| MeXyl <sup>2</sup> Xyl <sub>3</sub> <sup>(b)</sup>  | 560.50      | -7.17(-0.85)              | -0.19(-0.02)                                | 5.31(0.63)         | 5.83(0.48) |

Tabela 1 - Cálculo das energias de ligação utilizando o software Kdeep para diferentes ligantes. Observa-se que o pKd (log[dissociation constant]) é menor para o ligante com uma unidade de xilose a menos. A afinidade é maior para o ligante original.

(a) Uma unidade de xilose é removida a partir do terminal não redutor. b) o grupo COOH da ramificação é removido