



Grupo de
**Bioinformática
Estrutural**
Centro de Biotecnologia / UFRGS

Desenvolvimento de um Protocolo
para a Otimização da
Termorresistência de Proteínas de
Aplicação Biotecnológica e
Industrial

Felipe Nepomuceno
Prof. Hugo Verli

Grupo de Bioinformática Estrutural
Centro de Biotecnologia, UFRGS

www.ufrgs.br/bioinfo

26 de Agosto de 2016

1. Introdução

- ▶ Grande uso de enzimas na indústria

1. Introdução

- ▶ Grande uso de enzimas na indústria



1. Introdução

► Grande uso de enzimas na indústria



1. Introdução

► Grande uso de enzimas na indústria



1. Introdução

► Grande uso de enzimas na indústria



1. Introdução

► Grande uso de enzimas na indústria



1. Introdução

- ▶ Grande uso de enzimas na indústria
- ▶ Submissão a condições adversas

1. Introdução

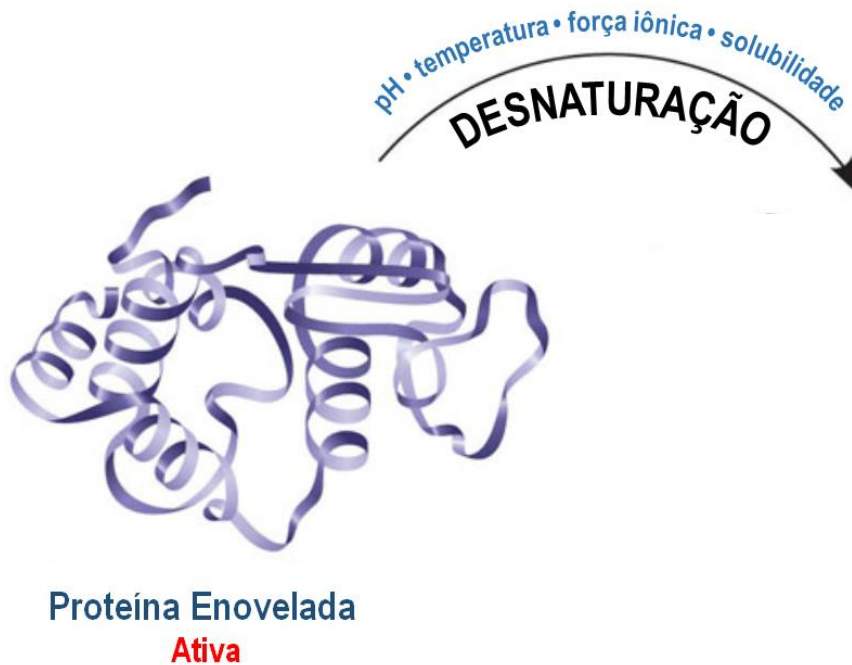
- ▶ Grande uso de enzimas na indústria
- ▶ Submissão a condições adversas



Proteína Enovelada
Ativa

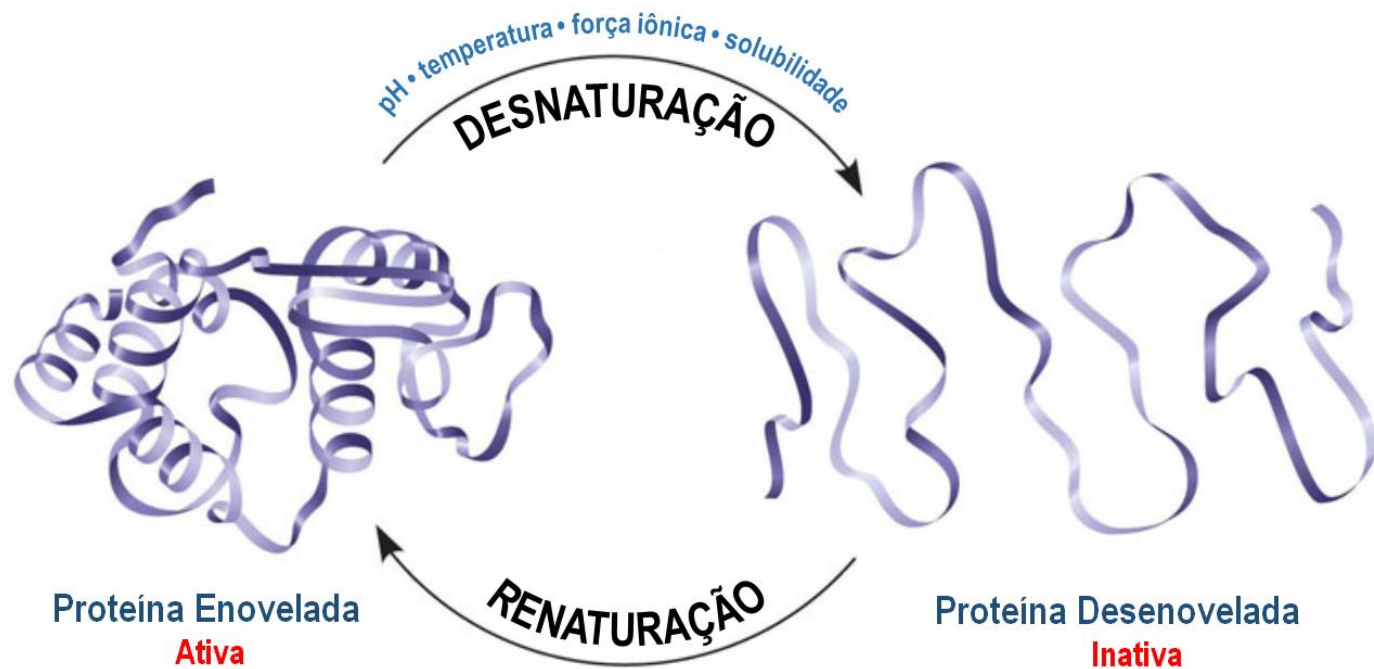
1. Introdução

- ▶ Grande uso de enzimas na indústria
- ▶ Submissão a condições adversas



1. Introdução

- ▶ Grande uso de enzimas na indústria
- ▶ Submissão a condições adversas



1.Introdução

► Proteínas termoestáveis provenientes de outros organismos

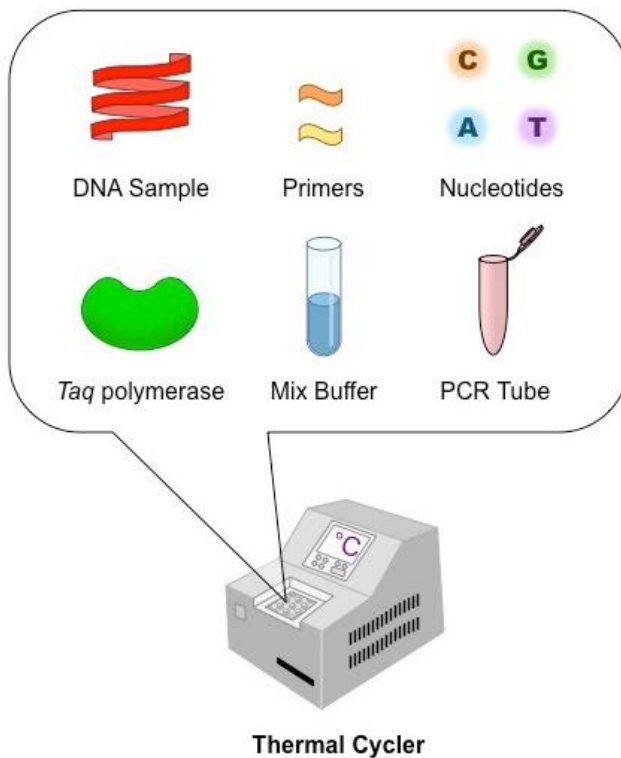
1.Introdução

- ▶ Proteínas termoestáveis provenientes de outros organismos
 - ▶ Taq Polimerase

1.Introdução

► Proteínas termoestáveis provenientes de outros organismos

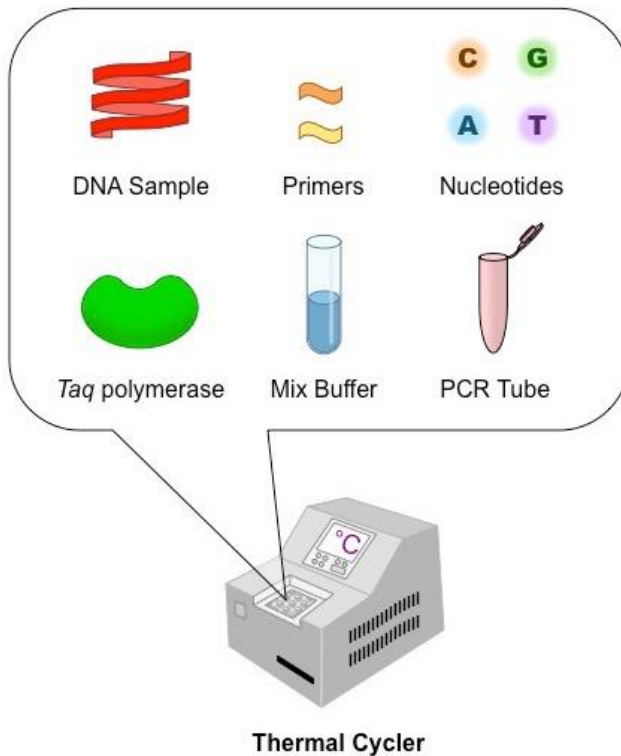
► Taq Polimerase



1.Introdução

► Proteínas termoestáveis provenientes de outros organismos

► Taq Polimerase



► Dependência de encontrar homólogos termorresistentes

► Técnicas de obtenção alternativos

2. Objetivos

► Principais objetivos deste trabalho:

► Desenvolver um protocolo de análise de desnaturação virtual de proteínas

► Analisar pontos específicos de desnaturação, a fim de prever e implementar mutações que os tornem mais termoestáveis

3. Métodos

► Escolha de uma proteína modelo para execução dos testes

3. Métodos

- ▶ Escolha de uma proteína modelo para execução dos testes
 - ▶ Subtilisina de *Bacillus subtilis* (3WHI)

3. Métodos

- ▶ Escolha de uma proteína modelo para execução dos testes
 - ▶ Subtilisina de *Bacillus subtilis* (3WHI)

Obtenção do
cristal em banco
de dados

PDBid: 3WHI

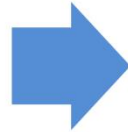


3. Métodos

- ▶ Escolha de uma proteína modelo para execução dos testes
 - ▶ Subtilisina de *Bacillus subtilis* (3WHI)

Obtenção do
cristal em banco
de dados

PDBid: 3WHI



Modelagem
Comparativa

Modeller

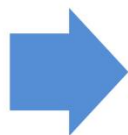
3. Métodos

- ▶ Escolha de uma proteína modelo para execução dos testes

- ▶ Subtilisina de *Bacillus subtilis* (3WHI)

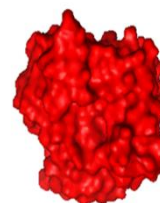
Obtenção do
cristal em banco
de dados

PDBid: 3WHI



Modelagem
Comparativa

Modeller

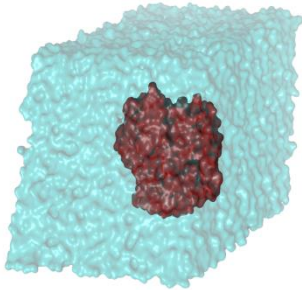


Modelo obtido
convertido para o
formato Gromacs

GROMACS FAST.
FLEXIBLE.
FREE.

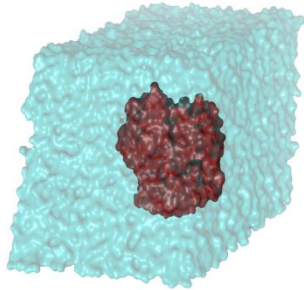
Campo de força
GROMOS 54a7

3. Métodos

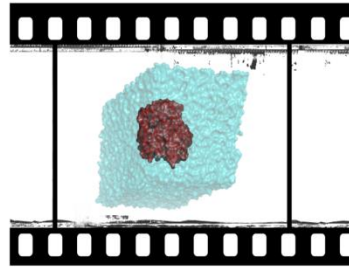


Etapa de solvatação,
neutralização e
equilibração

3. Métodos

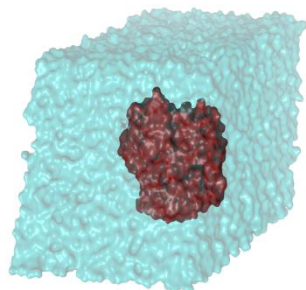


Etapa de solvatação,
neutralização e
equilibração

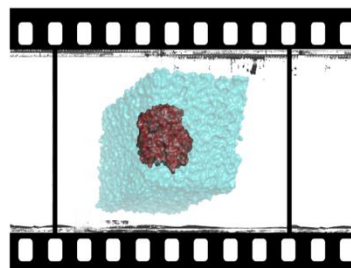


Execução da
dinâmica por 5 ns

3. Métodos



Etapa de solvatação,
neutralização e
equilibração

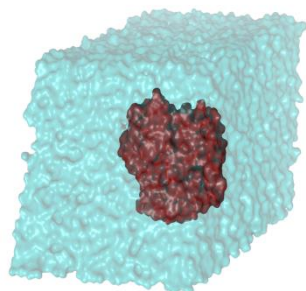


Execução da
dinâmica por 5 ns

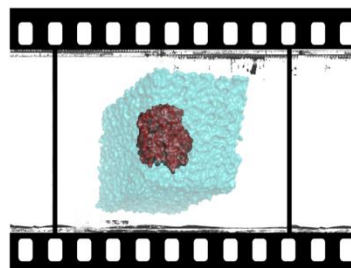


Repetição da
dinâmica a
300K, 373K e
473K

3. Métodos



Etapa de solvatação,
neutralização e
equilibração



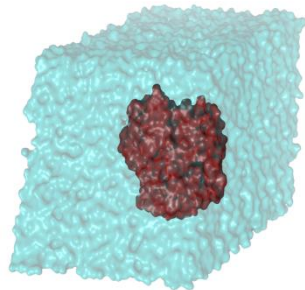
Execução da
dinâmica por 5 ns



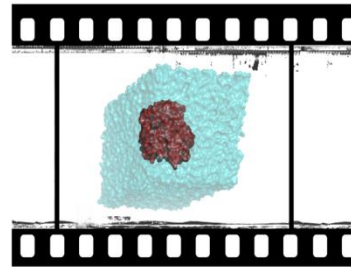
Repetição da
dinâmica a
300K, 373K e
473K

► Dinâmicas realizadas em triplicata

3. Métodos



Etapa de solvatação,
neutralização e
equilibração



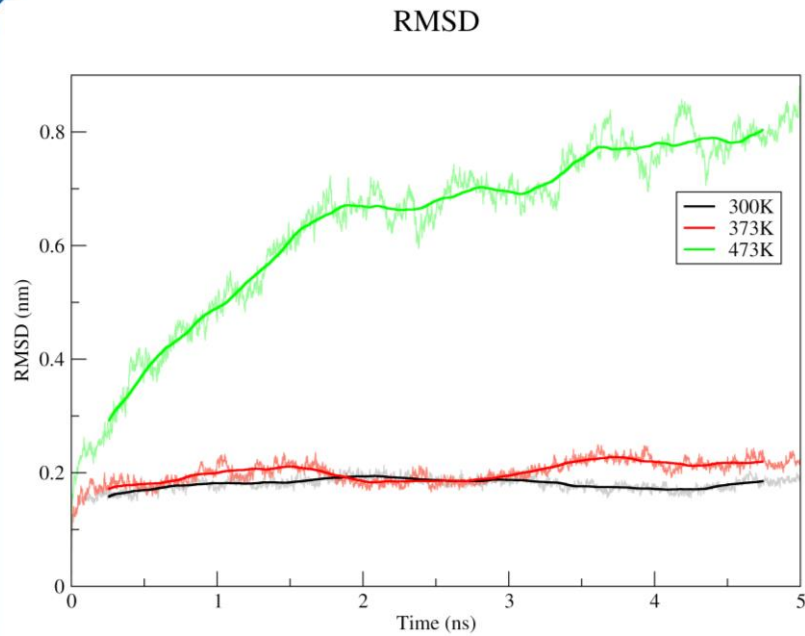
Execução da
dinâmica por 5 ns



Repetição da
dinâmica a
300K, 373K e
473K

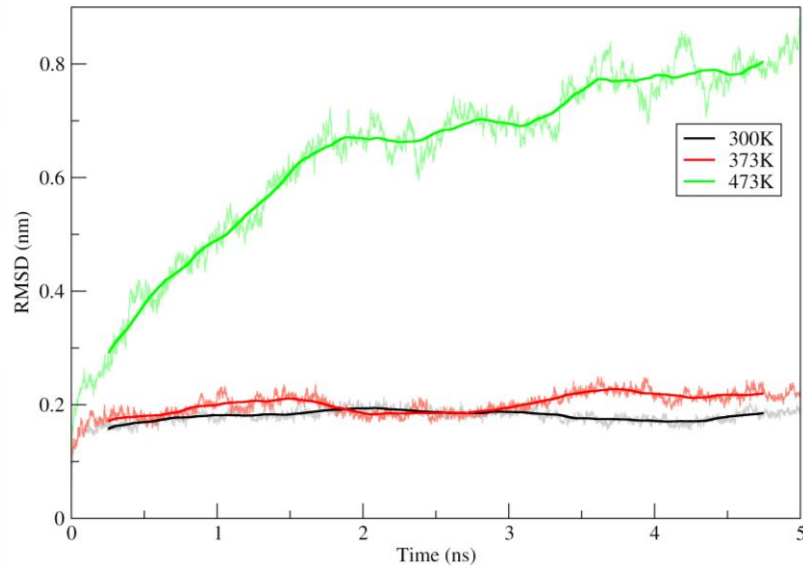
- ▶ Dinâmicas realizadas em triplicata
- ▶ Análises dos dados gerados buscando padrões de desnaturação
 - ▶ RMSD, RMSF, DSSP, Mapas de Contatos

4. Resultados

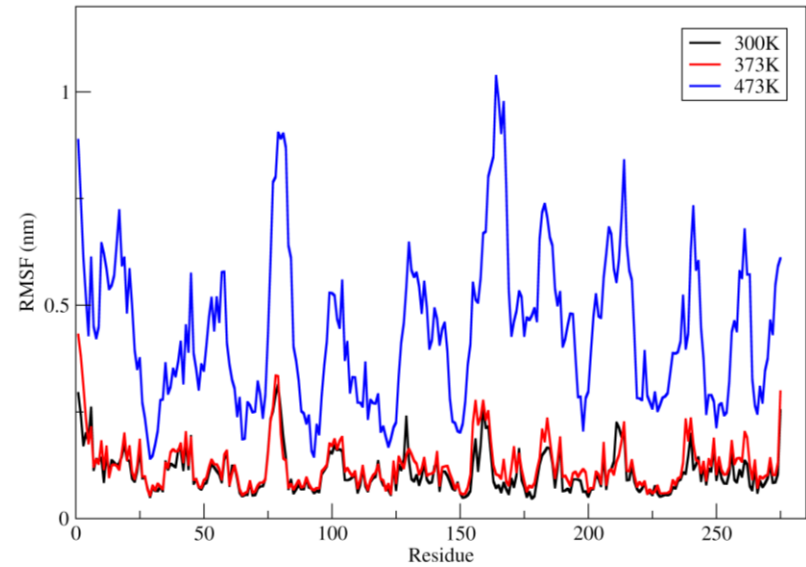


4. Resultados

RMSD

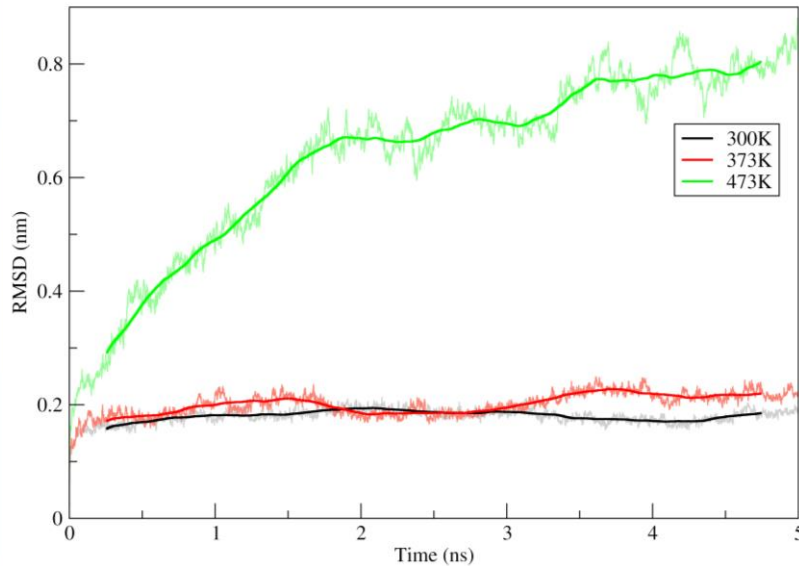


RMS fluctuation

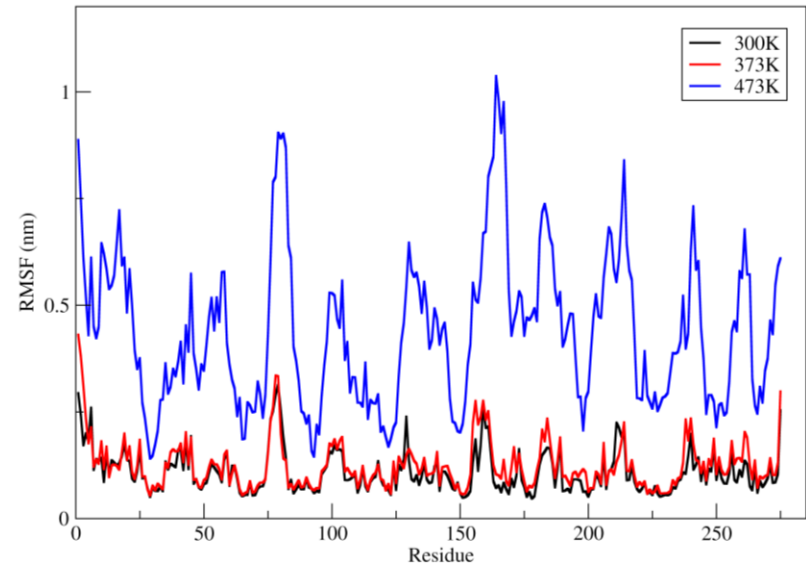


4. Resultados

RMSD



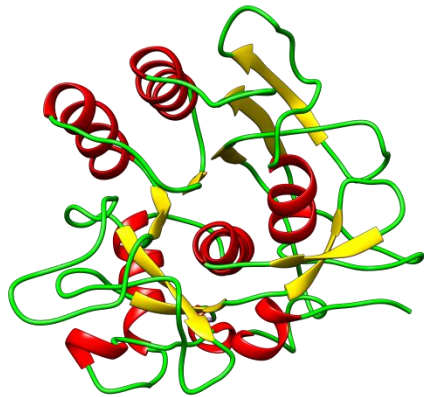
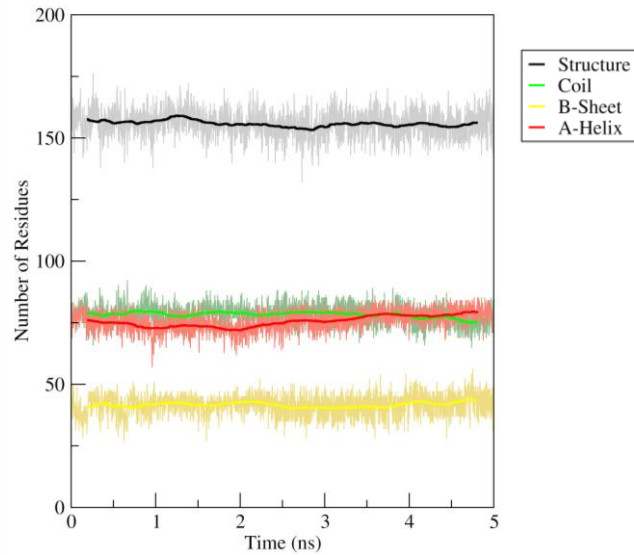
RMS fluctuation



- Dinâmicas a 300K e 373K tiveram pouca variação
- Visível diferença entre o modelo a 473K e as demais
- Forte indício de desnaturação da proteína

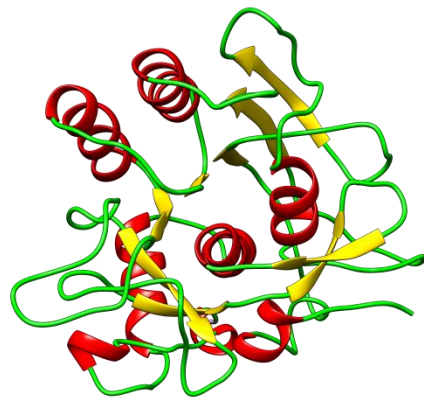
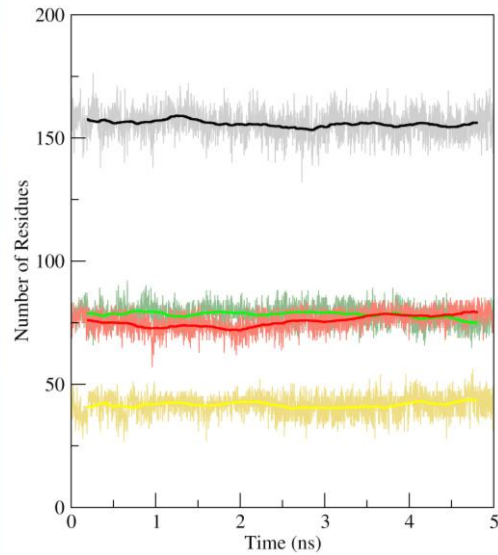
4. Resultados

300K

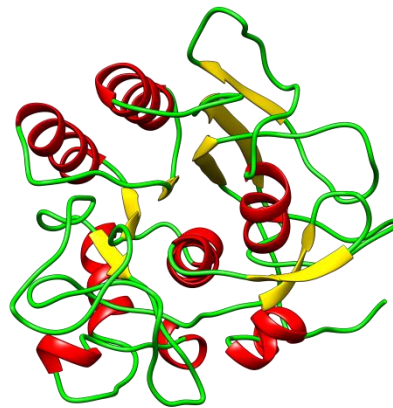
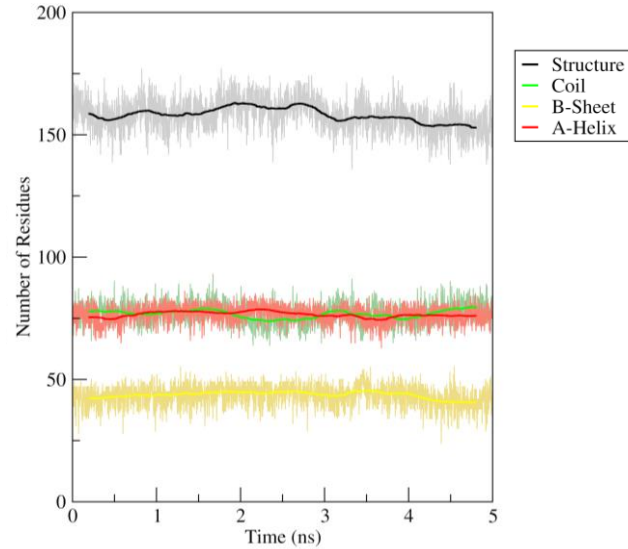


4. Resultados

300K

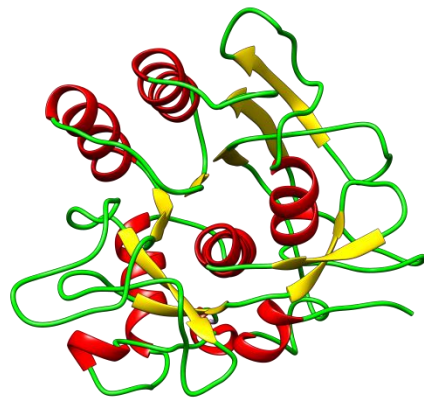
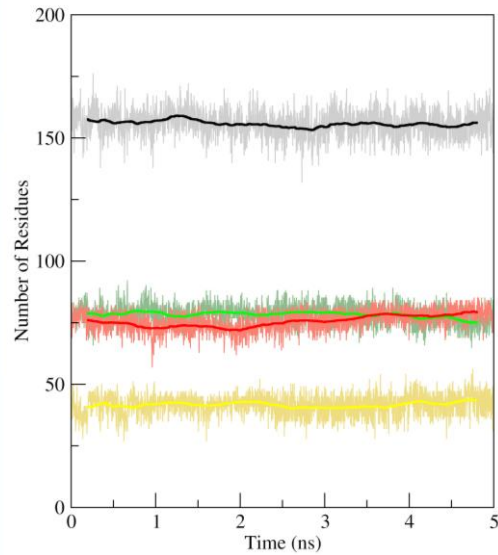


373K

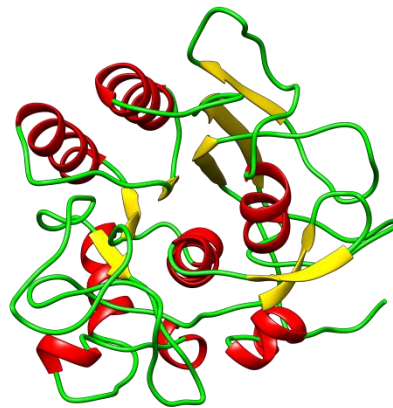
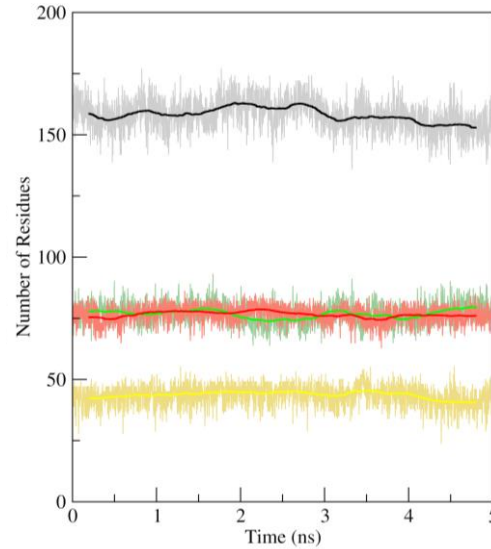


4. Resultados

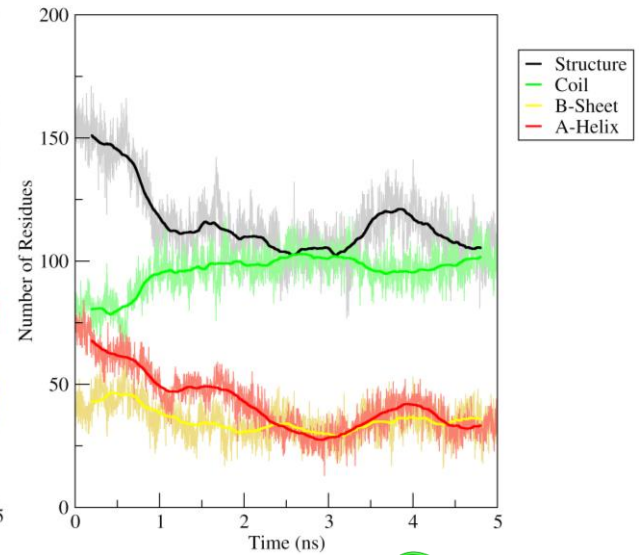
300K



373K



473K



4. Resultados

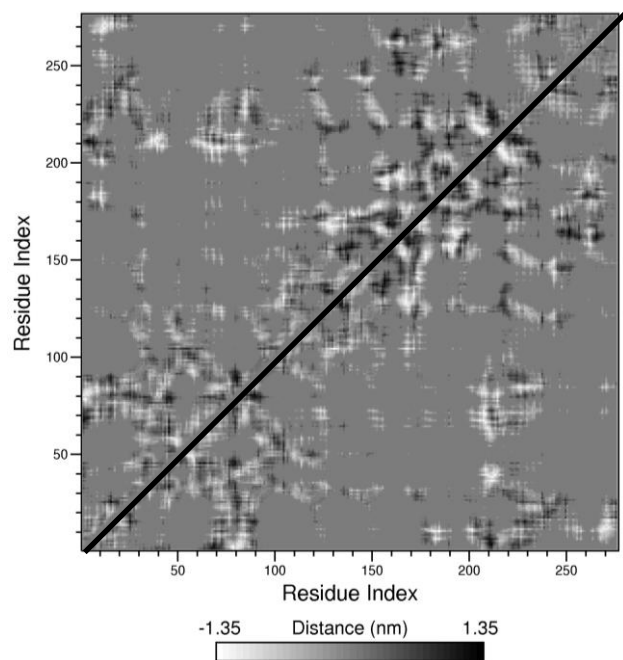
- ▶ Análise pontual das regiões de maiores alterações

4. Resultados

- ▶ Análise pontual das regiões de maiores alterações
 - ▶ Mapas de contatos

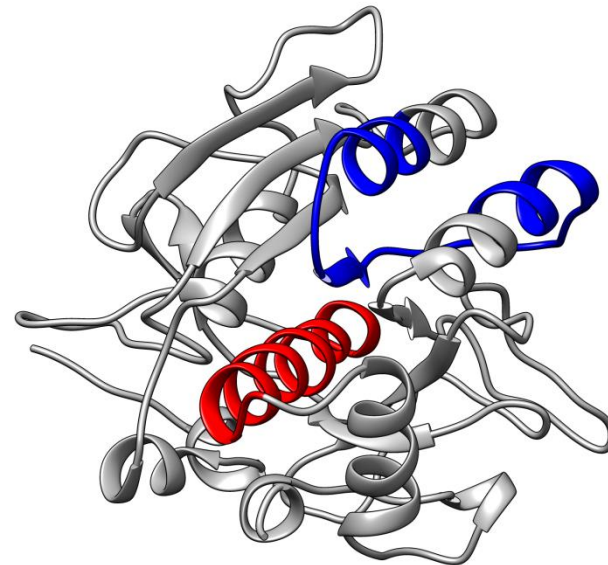
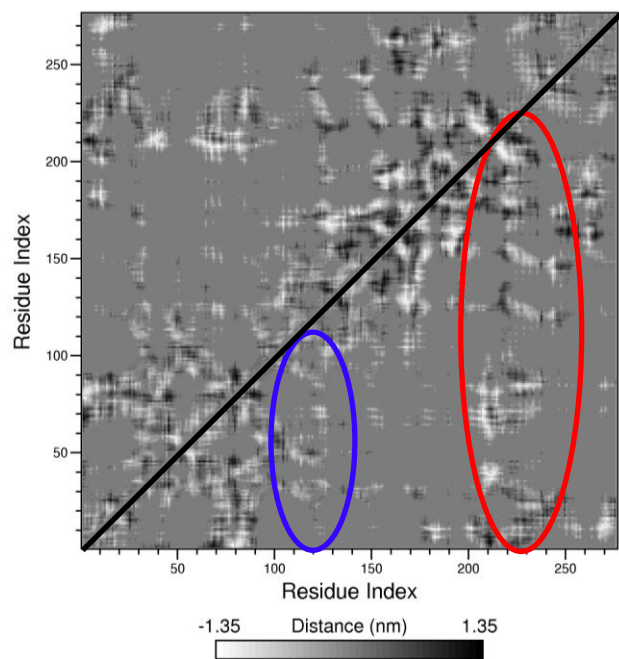
4. Resultados

- ▶ Análise pontual das regiões de maiores alterações
 - ▶ Mapas de contatos



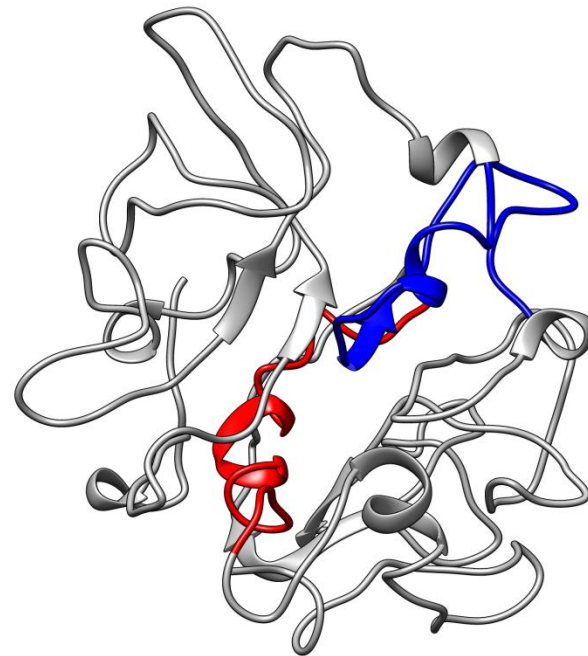
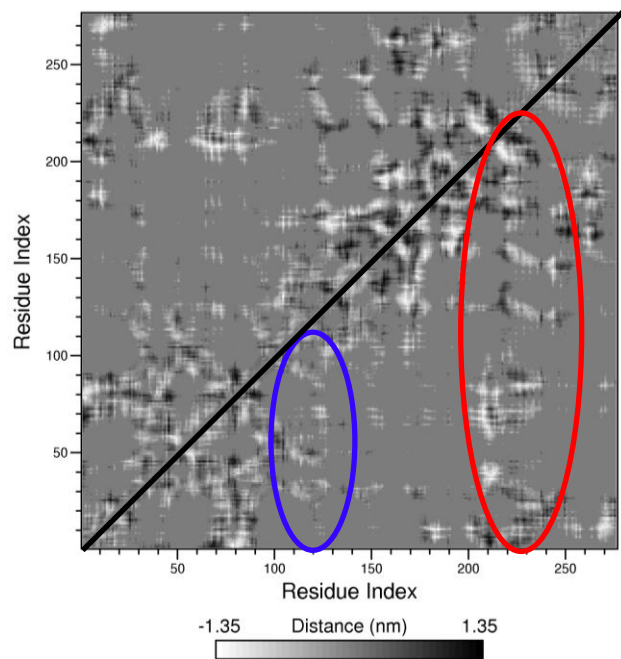
4. Resultados

- ▶ Análise pontual das regiões de maiores alterações
 - ▶ Mapas de contatos



4. Resultados

- Análise pontual das regiões de maiores alterações
 - Mapas de contatos



5. Conclusões

► Com os dados obtidos a partir das análises conclui-se que:

► Temperaturas elevadas são necessárias para a clara visualização de desnaturação

5. Conclusões

► Com os dados obtidos a partir das análises conclui-se que:

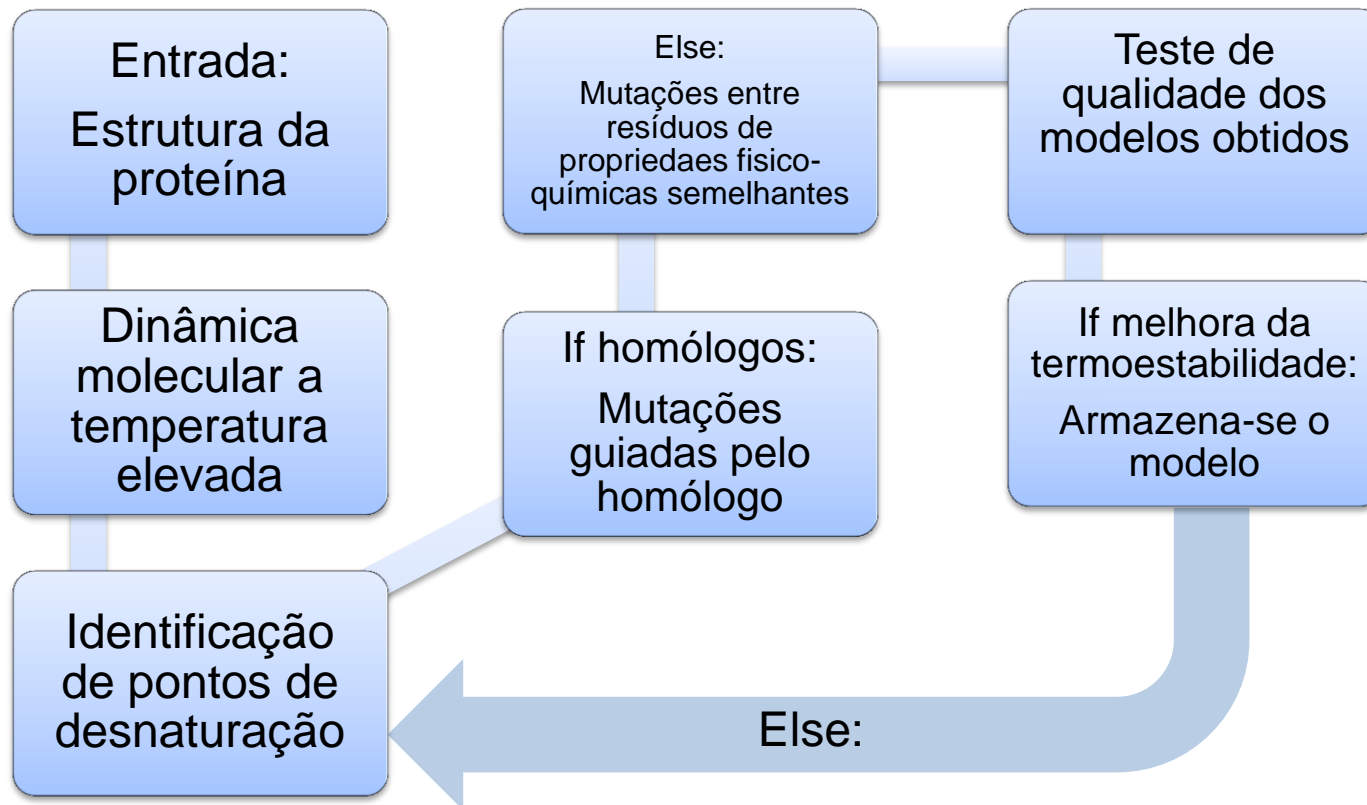
► Temperaturas elevadas são necessárias para a clara visualização de desnaturação

► Foi possível identificar pontos de provável desnaturação

► Mais análises e testes com outros modelos serão necessárias para estabelecer um protocolo eficiente e funcional

6. Perspectivas

- ▶ Analisar a matriz de distância interatômicas (Alterações pontuais)
- ▶ Finalizar o protocolo para implementar mutações nos modelos





Grupo de
**Bioinformática
Estrutural**
Centro de Biotecnologia / UFRGS



FAPERGS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul



Grupo de
**Bioinformática
Estrutural**
Centro de Biotecnologia / UFRGS

Desenvolvimento de um Protocolo
para a Otimização da
Termorresistência de Proteínas de
Aplicação Biotecnológica e
Industrial

Felipe Nepomuceno
Prof. Hugo Verli

Grupo de Bioinformática Estrutural
Centro de Biotecnologia, UFRGS

www.ufrgs.br/bioinfo

26 de Agosto de 2016