

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CYNTHIA CHRISTINA DE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPUTACIONAL VISANDO O APRIMORAMENTO DAS
PROPRIEDADES CATALÍTICAS E DE TERMOESTABILIDADE DA LIPASE
LIPC12**

CURITIBA (SEDE ECOVILLE)

2023

CYNTHIA CHRISTINA DE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPUTACIONAL VISANDO O APRIMORAMENTO DAS
PROPRIEDADES CATALÍTICAS E DE TERMOESTABILIDADE DA LIPASE
LIPC12**

**Computational study aiming to improve the catalytic and thermostability
Properties of lipase LipC12**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química, Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Nome completo e por extenso.
Coorientador(a): Marcos Brown Gonçalves.

CURITIBA (SEDE ECOVILLE)

2023

CYNTHIA CHRISTINA DE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPUTACIONAL VISANDO O APRIMORAMENTO DAS
PROPRIEDADES CATALÍTICAS E DE TERMOESTABILIDADE DA LIPASE
LIPC12**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química, Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29 de novembro de 2023

Rafael Carvalho Barreto
Doutor em Física
<http://lattes.cnpq.br/9065135095315460>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Jonas Golart da Silva
Doutor em Farmacologia
<http://lattes.cnpq.br/2110566397333935>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Marcos Brown Gonçalves
Doutor em Física
<http://lattes.cnpq.br/2535484439420670>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CURITIBA (SEDE ECOVILLE)

2023

RESUMO

DE OLIVEIRA, Cynthia Christina. **Estudo computacional visando o aprimoramento das propriedades catalíticas e de termoestabilidade da lipase LIPC12**. 2024. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

LipC12 é uma lipase verdadeira que mostra resultados bastante promissores para aplicações em biocatálise industrial, como estabilidade e atividade em condições não fisiológicas de pH, temperatura e solvatação. Apesar de bastante atrativas, tais funcionalidades ainda não tornam a lipase em questão tão competitiva comercialmente, pois, em relação a outras enzimas, LipC12 ainda apresenta eficiência considerada insatisfatória frente a condições reacionais mais agressivas ou adversas. Entre as diferentes estratégias existentes para resolver a questão, o processo de design racional de enzimas auxiliado por ferramentas computacionais apresenta-se atualmente como uma das alternativas de trabalho mais eficientes. A viabilidade da abordagem é possível, dado que LipC12 é uma enzima que possui estrutura e muitas das suas propriedades e funções conhecidas. Em virtude de todo o exposto, o presente trabalho realizou o estudo computacional de LipC12 com a intenção de se atingir dois objetivos principais: (i) melhorar a compreensão a nível molecular de mecanismos que regem as suas propriedades de atividade e termoestabilidade e (ii) propor possíveis pontos de mutação a fim de torná-la mais eficiente e resistente em condições de reação mais agressivas ou adversas. Em relação ao estudo sobre a atividade de LipC12, os cálculos de *docking* molecular covalente confirmaram o comportamento R seletivo da lipase em reações de transesterificação de (R,S)-1-feniletanol com diferentes comprimentos de ésteres de vinila (acetato, propanoato e butanoato de vinila), mostrando, no geral, resultados bastante condizentes com os estudos de referência: os intermediários tetraédricos exibem conformações bastante características e com valores de energia de ligação cada vez mais favoráveis para a R seletividade na medida que ocorre o aumento do comprimento das cadeias acila. Além disso, a análise das interações foi capaz de revelar dois novos possíveis pontos de mutações para beneficiar a R seletividade de LipC12 na reação: VAL109 e SER113. Em relação ao estudo sobre a termoestabilidade de LipC12, as simulações clássicas de dinâmica molecular realizadas também conseguiram reproduzir o comportamento esperado, mostrando que o íon cálcio é um elemento importante para elevar a termoestabilidade de LipC12, a qual possui um caminho de desenovelamento bastante características, com a instabilidade frente ao aquecimento iniciando-se no sítio de ligação ao íon cálcio (alças superior e inferior) e propagando-se imediatamente para a α -hélice terminal. Sendo assim, as duas regiões em questão destacam-se como as mais promissoras a sofrerem mutações inicialmente.

Palavras-chave: LipC12; lipases; design racional de proteínas; mutagênese computacional.

() Não autorizo a disponibilização de endereço de correio eletrônico para contato.

(X) Autorizo a disponibilização do seguinte correio eletrônico para contato:

marcosb@utfpr.edu.br

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Cynthia Christina. **Computational study aiming to improve the catalytic and thermostability Properties of lipase LipC12**. 2024. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023. Estudo computacional visando o aprimoramento das propriedades catalíticas e de termoestabilidade da lipase LIPC12.

LipC12 is a true lipase that shows very promising results for applications in industrial biocatalysis, such as stability and activity under non-physiological conditions of pH, temperature, and solvation. Although quite attractive, such functionalities do not yet make the lipase in question as commercially competitive because, compared to other enzymes, LipC12 still exhibits efficiency considered unsatisfactory under more aggressive or adverse reaction conditions. Among the different existing strategies to address the issue, the process of rational enzyme design aided by computational tools currently appears as one of the most efficient working alternatives. The feasibility of the approach is possible, given that LipC12 is an enzyme that has a structure and many of its properties and functions known. In light of all the above, the present work carried out the computational study of LipC12 with the intention of achieving two main objectives: (i) to improve the molecular-level understanding of mechanisms governing its activity and thermostability properties, and (ii) to propose possible mutation points to make it more efficient and resistant under more aggressive or adverse reaction conditions. Regarding the study on LipC12 activity, covalent molecular docking calculations confirmed the selective R behavior of the lipase in transesterification reactions of (R,S)-1-phenylethanol with different lengths of vinyl esters (acetate, propanoate, and vinyl butanoate), showing overall results consistent with reference studies: the tetrahedral intermediates exhibit quite characteristic conformations and with increasingly favorable binding energy values for R selectivity as the length of the acyl chains increases. In addition, the analysis of interactions was able to reveal two new possible mutation points to benefit the R selectivity of LipC12 in the reaction: VAL109 and SER113. Regarding the study on the thermostability of LipC12, classical molecular dynamics simulations also managed to reproduce the expected behavior, showing that the calcium ion is an important element to increase the thermostability of LipC12, which has a path of unfolding quite characteristic, with instability against heating beginning at the calcium ion binding site (upper and lower loops) and immediately propagating to the terminal α -helix. Therefore, these two regions stand out as the most promising to undergo mutations initially.

Keywords: LipC12; lipases; rational protein design; computational mutagenesis.