

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Ciências Biológicas

Arthur Tonietto Mangini

Análise conformacional da esterase de *Kaistella jeonii* por dinâmica molecular e
caracterização dos efeitos da interação com tereftalato de polietileno (PET)

Porto Alegre
2023

Arthur Tonietto Mangini

Análise conformacional da esterase de *Kaistella jeonii* por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos da interação com tereftalato de polietileno (PET)

Trabalho de Conclusão de Curso como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Márcio Dorn

Co-orientador: Éderson Sales Moreira Pinto

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Tonietto Mangini, Arthur

Análise conformacional da esterase de *Kaistella jeonii* por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos da interação com tereftalato de polietileno (PET) / Arthur Tonietto Mangini. -- 2024.

44 f.

Orientador: Márcio Dorn.

Coorientador: Éderson Sales Moreira Pinto.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Biorremediação. 2. IsPETase. 3. Dinâmica Molecular. 4. Poluição de plástico. 5. PET. I. Dorn, Márcio, orient. II. Sales Moreira Pinto, Éderson, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Arthur Tonietto Mangini

Análise conformacional da esterase de *Kaistella jeonii* por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos da interação com tereftalato de polietileno (PET)

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Márcio Dorn

Co-orientador: Éderson Sales Moreira Pinto

Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 25 de janeiro de 2024

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul -
UFRGS

Prof. Dr. Rodrigo Ligabue-Braun
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre - UFCSPA

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia aos meus pais, Elisabete e Osmar, pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me deram durante toda a minha existência; à minha irmã Luiza pelo apoio incondicional oferecido em todos os aspectos; à minha namorada, Luísa Vitória, que passou a fazer parte da minha vida e acrescentou tanto, esta é uma das muitas conquistas ao seu lado; ao meu primo Bernarndo pelos momentos de descontração e à toda minha família que sempre foi exemplo de força e coragem. Também aos meus amigos de curso, em especial: Pâmela, Sophia e Beatriz, grandes companheiros de jornada. Não obstante, meus primeiros orientadores e co-orientadores de iniciação científica: Ana Cláudia Franco, Lina Violet e Bruno Aschidamini pelo apoio e por pavimentar meu caminho na ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, o Professor Márcio Dorn, seu empenho e dedicação incondicionais foram essenciais para a minha motivação ao longo do percurso. Em especial, agradeço ao meu co-orientador Éderson Moreira pela sua postura impecável e incentivo durante toda esta jornada. Aos colegas Fernando e Lorenzo por todo o auxílio e paciência.

EPÍGRAFE

“Já que dependemos de uma abundância de ecossistemas funcionais para purificar nossa água, enriquecer nosso solo e fabricar o próprio ar que respiramos, a biodiversidade claramente não é uma herança a ser descartada descuidadamente.”

Edward Osborne Wilson

RESUMO

O plástico é encontrado globalmente no meio ambiente e atingiu uma escala preocupante. A biorremediação é uma alternativa mais ecológica e eficiente para remover esse polímero das áreas afetadas. Em 2022 foi descrita uma nova esterase extraída da bactéria *Kaistella jeonii* que poderia degradar promiscuamente o PET. Comparada com a bem conhecida IsPETase, esta nova esterase apresenta uma baixa identidade de sequência, mas possui uma estrutura tridimensional excepcionalmente semelhante. Notavelmente a nova esterase possui duas hélices α adicionais e não possui uma ligação dissulfeto em seu sítio de ligação. No entanto, esta nova esterase demonstrou menor eficiência catalítica. Neste trabalho, empregou-se simulação de Dinâmica Molecular para investigar a interação entre a esterase e o PET. Além disso, a compreensão do complexo proteína-ligante pode lançar luz sobre o mecanismo evolutivo de como as enzimas α/β hidrolase têm evoluído para degradar essas moléculas artificiais e promover o desenvolvimento de abordagens de engenharia racionais para melhorar enzimas semelhantes à PETase. Nossos resultados auxiliam no aprofundamento do conhecimento atual por trás do mecanismo de catálise biológica da degradação do PET, através da descrição da resposta estrutural à interação entre enzima e PET.

Palavras-chave: Biorremediação; IsPETase; Dinâmica Molecular; Poluição de plástico; PET.

Abstract

Plastic is found globally in the environment and has reached a concerning scale. Bioremediation is the most eco-friendly and cost-effective alternative to remove this polymer from affected areas. In 2022, a novel esterase enzyme extracted from the bacteria *Kaistella jeonii* could promiscuously degrade PET. Compared to the well-known *IsPETase*, this novel esterase presents a low sequence identity yet has a remarkably similar folding. Preliminary analysis showed that the new esterase has two additional α -helices and lacks one disulfide bond in the binding pocket. However, this new esterase demonstrated a lower catalytic efficiency. In this work, we employed Molecular Dynamics simulation to investigate the molecular mechanism between the esterase and PET. Understanding the protein-ligand interaction mechanism of PET binding can shed light on the evolutive mechanism of how α/β hydrolase enzymes have been evolving to degrade these artificial molecules and promote the development of rational engineering approaches to improve PETase-like enzymes. Furthermore, our results aid in deepening the current knowledge behind the mechanism of biological catalysis of PET degradation, through description of the structural response to the interaction between enzyme and PET.

Keywords/Palabras-clave/Mot-clés: Bioremediation; *IsPETase*; Molecular Dynamics; plastic pollution; PET;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 - Polímeros de plantas terrestres -	25
Figura 2 - Tipos de Plásticos -	26
Anexo A - Figura 1 - Estrutura da PET30 com o mecanismo enzimático -	37
Anexo A - Figura 2 - Estrutura da PET30 alinhada com a <i>IsPETase</i> -	40
Anexo A - Figura 3 - Análises de distâncias entre resíduos -	41
Anexo A - Figura 4 - Análises de RMSD, Rg, SASA, HB e Δ RMSF -	42
Anexo A - Figura 5 - Análises de PCA e <i>Free Energy Landscape</i> -	44

Equações

Equação 1 - RMSD	22
Equação 2 - RMSF	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHET - Tereftalato de bis-hidroxietila

CF - Campo de Força

DSSP - *Dictionary of Secondary Structure of the Protein*

DM - Dinâmica Molecular

HB - *Hydrogen bond analysis*

LINCS - *Linear Constraint Solver*

MHET - Mono-2-hidroxietil

NPT - *Ensemble* Isotérmico-Isobárico

NVT - *Ensemble* Canônico

PDB - *Protein Data Bank*

PET - Tereftalato de Polietileno

PME - *Particle Mesh Ewald*

Rg - *Radius of gyration*

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

RMSF - *Root Mean Square Fluctuation*

SASA - *Solvent accessible surface area*

SD - *Steepest Descent*

Tg - Temperatura de Transição Vítrea

LISTAS DE SÍMBOLOS

α - Alfa

Å - Ångström

β - Beta

δ - Delta

ϵ - Épsilon

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	METODOLOGIA.....	17
	2.1 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA, MODELAGEM E VALIDAÇÃO.....	17
	2.2 Ensemble Docking.....	17
	2.3 Simulação de Dinâmica Molecular.....	18
	2.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E PERFIL DE ENERGIA LIVRE.....	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4	DISCUSSÕES COMPLEMENTARES.....	21
	4.1 Análises.....	21
	4.2 Discussão evolutiva.....	23
5	CONCLUSÃO.....	28

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros sintéticos são produzidos pela ligação covalente de centenas ou milhares de unidades mais simples (monômeros). O plástico foi descoberto por John Wesley Hyatt em 1869, tratando polímero de celulose derivado de fibra de algodão com cânfora (Evode, Niyitanga, et al. 2021). Desde então, os plásticos tornaram-se uma mercadoria significativa em todo o mundo e têm diversas aplicações em produtos comerciais e industriais devido às suas notáveis características físicas e químicas (Evode, Niyitanga, et al. 2021).

No entanto, as mesmas características que conferem ao plástico o seu valor industrial fazem dele uma ameaça para a saúde mundial. A estrutura polimérica que confere maleabilidade e durabilidade torna o plástico persistente e de difícil degradação no meio ambiente (Chamas, Ali, et al. 2020). Além disso, a grande produção desta *commodity* em todo o mundo aumenta o potencial poluidor do plástico. As atuais tendências de produção e gestão de resíduos poderão acumular 12 mil milhões de toneladas métricas de plástico no ambiente e nos aterros até 2050 (Howard, Sophie A. e Ronan R. McCarthy, 2023).

A poluição plástica afeta a saúde humana e a biodiversidade e está a aproximar-se de um ponto irreversível (MacLeod, Matthew, et al., 2021). Os resíduos plásticos são encontrados globalmente nos alimentos, na água e em quase todos os ecossistemas (MacLeod, Matthew, et al., 2021; , Revel, Messika, Amélie Châtel e Catherine Mouneyrac, 2018; Carr, Steve A., Jin Liu e Arnold G. Tesoro., 2016; Allouzi, Mintallah Mousa A., et al., 2021). Notavelmente, os plásticos à base de tereftalato de polietileno (PET) são um dos mais utilizados nas indústrias de embalagens devido à sua durabilidade (Maurya, Ankita, Amrik Bhattacharya e Sunil Kumar Khare., 2020), o que levou este material a representar uma produção total de 18,8 milhões de toneladas em 2015 de um total de 269 milhões de toneladas de produção total de plástico (Taniguchi et al., 2019).

A reciclagem de plástico ocorre apenas para uma pequena percentagem do plástico produzido em massa (Howard, Sophie A. e Ronan R. McCarthy, 2023); a maior parte atinge e perturba o meio ambiente e diferentes formas de vida (Maurya, Ankita, Amrik Bhattacharya e Sunil Kumar Khare., 2020). A baixa eficácia da reciclagem exige uma alternativa mais econômica e eficiente. Desse modo, a

biorremediação torna-se uma boa opção para a problemática do plástico (Sharma, Babita, Arun Kumar Dangi e Pratyosh Shukla., 2018). A biorremediação é o processo de utilização de mecanismos biológicos para remover um contaminante do meio ambiente (Sharma, Babita, Arun Kumar Dangi e Pratyosh Shukla., 2018). Além disso, a remediação enzimática vem desenvolvendo-se rapidamente através da descoberta de novas enzimas microbianas, técnicas de engenharia genética e imobilização enzimática (Sharma, Babita, Arun Kumar Dangi e Pratyosh Shukla., 2018). Conseqüentemente, a busca e melhor compreensão de enzimas que degradam eficientemente o plástico é essencial para mitigar a sua poluição. Atualmente, a superfamília α/β hidrolase é a principal enzima utilizada para degradação plástica, especialmente o grupo das cutinases (Kawai, Fusako, et al., 2014; Kushwaha, Anamika, et al., 2023).

Um avanço notável na biorremediação surgiu com a descoberta de uma enzima bacteriana que degrada PET chamada de *IsPETase*, presente em *Ideonella sakaiensis*, em 2016 (Yoshida, Shosuke et al., 2016; Austin, Harry P. et al., 2018). A capacidade da *IsPETase* de degradar o PET clivando as ligações éster do polímero em tereftalato de mono-2-hidroxietil (MHET) e Tereftalato de bis-hidroxietila (BHET) permitiu vários estudos para engenharia de proteínas (Son, Hyeoncheol Francis, et al., 2019; Cui, Yinglu, et al., 2021) e representou um fator chave para a degradação do plástico, sendo uma das enzimas mais eficazes para a degradação do PET até agora. Além disso, a presença relativamente recente do plástico na história natural (desde o século XIX) tornou-se fundamental para compreender como as α/β hidrolases evoluíram para degradar essa nova estrutura polimérica, uma vez que o contato recente com o material desencadeou mudanças evolutivas nesse contexto.

Em 2022, uma nova esterase descrita em *Kaistella jeonii* (PET30) apresentou atividade de degradação do PET (Zhang, Hongli, et al., 2022). PET30 (Fig.1A Apêndice A) representa uma hidrolase que atua especificamente nas ligações éster, assim como a *IsPETase*. Portanto, o PET30 provavelmente se enquadra no sub-subtipo 1 da *IsPETase* EC (EC 3.1.1). Posicionada dentro da superfamília α/β hidrolase, ao lado de enzimas como lipases e esterases, a PET30 apresenta um motivo Gly – x1 – Ser – x2 – Gly distinto (Gly151 – Trp152 – Ser153 – Met154 – Gly155) em seu sítio ativo. Surpreendentemente, este motivo reflete a sequência idêntica encontrada na *IsPETase* (Gly158 – Trp159 – Ser160 – Met161 – Gly162),

acentuando ainda mais a semelhança estrutural entre estas enzimas que degradam PET (Joo, Seongjoon, et al., 2018).

Uma característica distintiva das α/β hidrolases é a tríade catalítica presente tanto na PET30 quanto na *IsPETase*, composta pelos resíduos Asp-His-Ser (Fig.1C Apêndice A), responsáveis por conferir sua funcionalidade enzimática. Em contraste com a *IsPETase*, a PET30 apresenta um ambiente menos hidrofóbico em seus resíduos adjacentes no sítio de ligação, estabelecendo uma diferença inicial entre essas enzimas estruturalmente semelhantes.

As estruturas terciárias das enzimas PET30 e *IsPETase* exibem um notável grau de semelhança, apesar de manterem uma identidade de sequência de apenas 34%. Exibindo um enovelamento α/β canônico, a PET30 apresenta uma folha β central torcida compreendendo dez fitas β , flanqueadas por sete hélices α em cada lado - um arranjo estrutural semelhante a *IsPETase* (Zhang, Hongli, et al., 2022) .

Neste estudo, ao considerar a eficácia da PET30 na degradação do PET e sua semelhança estrutural com a *IsPETase*, exploramos o potencial uso desta nova esterase na biorremediação do PET. Para atingir esse objetivo, utilizaram-se simulações de Dinâmica Molecular (DM) para analisar o comportamento molecular da proteína, comparando-o com a literatura disponível sobre *IsPETase*.

A DM é uma técnica de simulação *in-silico* para determinar as propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas de sistemas moleculares. Essa abordagem viabiliza a simulação de biomoléculas em condições particulares, como o comportamento de proteínas em um ambiente celular. O ponto de partida de uma simulação é normalmente uma estrutura de proteína experimental depositada no *Protein Data Bank* (PDB). Na DM atomística (*All-atom*), o sistema é construído por meio de partículas interativas que representam cada átomo individualmente, colocadas dentro de uma caixa de simulação suficientemente grande, onde as leis do movimento de Newton descrevem seus movimentos (Salo-Ahen, O. M. H., et al ., 2021). Outras formas de representar as estruturas proteicas são: "*United-atom*" e "*Coarse-grained*". Ambas reduzem o número de partículas que representam átomos e, portanto, o tempo de simulação. Para este trabalho, apenas a composição de DM "*All-atom*" será relevante.

Essas representações das proteínas são conduzidas por meio de modelos matemáticos das forças que descrevem as interações do sistema, seguindo os princípios da mecânica molecular, conhecido como campo de força (CF) de

mecânica molecular. Um CF é baseado em cálculos de mecânica quântica e/ou medições experimentais, descrevendo interações eletrostáticas entre átomos, o comprimento preferencial de cada ligação covalente e outros tipos de interações interatômicas (Hollingsworth, Scott A. e Ron O. Dror., 2018). Esses CFs evoluíram consideravelmente nas últimas décadas, possibilitando a obtenção de resultados confiáveis, alinhados com as observações experimentais, mesmo que sejam, por natureza, aproximações (Lindorff-Larsen et al., 2012). É importante notar que, como a DM clássica se baseia apenas nos movimentos da Mecânica Molecular, nenhuma ligação covalente se forma ou se rompe (Hollingsworth, Scott A. e Ron O. Dror., 2018).

Os três fundamentos básicos comuns a todos os CFs são: a hipótese termodinâmica, a aditividade e a transferibilidade. A hipótese termodinâmica assume que as macromoléculas são naturalmente direcionadas para seus estados de dobramento nativos pelas leis da termodinâmica. A aditividade admite que a energia potencial de qualquer sistema pode ser expressa como uma soma de diferentes potenciais a partir de uma simples interpretação física. A transferibilidade pressupõe que funções de energia potencial podem ser desenvolvidas para incorporar dados experimentais de estruturas representativas e aplicadas a uma gama muito mais ampla de moléculas com grupos químicos semelhantes (Monticelli, L., & Tieleman, D. P., 2012). Essas suposições permitem a construção de CFs capazes de lidar com muitas biomoléculas sem perder a confiabilidade.

A trajetória resultante da simulação de DM é uma descrição tridimensional em nível atômico da configuração do sistema em cada ponto durante o intervalo de tempo simulado (Hollingsworth, Scott A. e Ron O. Dror., 2018). Esta trajetória fornece informações essenciais sobre interações moleculares dinâmicas que determinam a estabilidade da proteína, função, relação proteína-ligante e tempo de residência (Childers, Matthew Carter e Valerie Daggett., 2017). Estudos anteriores de simulações DM foram conduzidos para compreender e otimizar a atividade da *IsPETase* (Fecker, Tobias, et al., 2018; Chen, Kun, et al., 2021, Chen, Linyu, et al., 2023). Fecker, Tobias, et al. 2018 usou DM para otimizar racionalmente a atividade catalítica da *IsPETase* em temperatura ambiente, e Chen, Linyu, et al. 2023 estudou o mecanismo de autorregulação da *IsPETase* para substratos PET com diferentes graus de polimerização, analisando o comportamento dos resíduos no sítio de ligação. Portanto, o uso de DM pode fornecer dados substanciais para o manejo

enzimático na biorremediação. Além disso, a compreensão do mecanismo molecular da enzima pode contribuir para aprofundar o entendimento da evolução das α/β -hidrolases em direção à degradação do PET.

2 METODOLOGIA

2.1 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA, MODELAGEM E VALIDAÇÃO

Retirou-se à estrutura tridimensional da proteína PET30 do *Protein Data Bank* (PDB) sob o identificador 7PZJ (Zhang, Hongli, et al., 2022). Foi aplicada uma abordagem de modelagem comparativa devido à ausência do segmento inicial (resíduos 1-27), correspondente ao seu peptídeo sinal, usando o servidor Robetta (Kim, David E., Dylan Chivian e David Baker., 2004) para modelagem e refinamento de estrutura. O modelo final inclui os resíduos 1 a 299, integrando o segmento N-terminal reconstruído. Várias ferramentas de validação foram utilizadas para avaliar a precisão e confiabilidade do modelo gerado (Bowie, James U., Roland Lüthy e David Eisenberg., 1991; Lüthy, Roland, James U. Bowie e David Eisenberg., 1992, Colovos, Chris e Todd O. Yeates., 1993; Laskowski, Roman A., et al., 1993; Hoof, Rob WW, et al., 1996, Pontius, Joan, Jean Richelle e Shoshana J. Wodak., 1996; Williams , Christopher J., et al., 2018).

2.2 ENSEMBLE DOCKING

Utilizou-se o *Marvin JS* (Csizmadia, Péter., 1999) para modelar a estrutura molecular polimérica do PET, composto por três monômeros, e submetido ao servidor *LigParGen* (Jorgensen, William L., e Julian Tirado-Rives., 2005; Dodda , Leela S., et al., 2017) para gerar os parâmetros para ligações, ângulos, diédricos e interações Lennard-Jones para o campo de força selecionado. Selecionando a opção 1,14*CM1A para parâmetros de carga parcial. O servidor também forneceu arquivos de topologia compatíveis com GROMACS para futuras simulações.

Para o acoplamento molecular da molécula de tereftalato de polietileno (PET) na estrutura da esterase, empregou-se o programa AutoDock Tools 1.5.7 (Sanner, Michel F., 1999) e AutoDock Vina 1.2.3 (Trott, Oleg e Arthur J. Olson. , 2010; Eberhardt, Jerome, et al., 2021). Uma caixa de grade foi posicionada utilizando as

coordenadas centrais dos resíduos catalíticos (Ser153, Asp198 e His230). Para mimetizar o estado nativo dos resíduos, o nitrogênio δ (N δ) de His230 foi protonado enquanto o nitrogênio ϵ (N ϵ) foi desprotonado, simultaneamente. As dimensões da caixa de grade foram definidas para abranger todo o centro ativo da enzima, com um tamanho de grade de 26 Å no eixo x, 21,5 Å no eixo y e 16,3 Å no eixo z. Posteriormente, importamos o ligante para o AutoDock Vina, que gerou dez poses diferentes. A conformação resultante do ligante, gerada pelo AutoDock Vina, foi empregada em simulações subsequentes de dinâmica molecular.

As simulações de Dinâmica Molecular (DM) foram conduzidas usando o pacote GROMACS versão 2021.5 (Lindahl, Abraham, 2022). Foi utilizada uma caixa de simulação cúbica para posicionar o sistema e adicionou-se uma ponte dissulfeto entre Cys262 e Cys285. O campo de força empregado para essas simulações foi OPLS-AA/M (Robertson, Michael J., Julian Tirado-Rives e William L. Jorgensen., 2015). Realizaram-se etapas seriadas de minimização para garantir uma configuração inicial ideal. O primeiro passo foi uma minimização à vácuo utilizando o algoritmo *Steepest Descent* (SD), seguido por uma série de etapas de minimização na água. O processo de solvatação empregou o modelo de água TIP3P e íons Na⁺ e Cl⁻ na concentração de 0,15 M. A segunda etapa de minimização ocorreu tratando as interações não ligadas com *Cut-off* e o algoritmo SD; a terceira etapa de minimização utilizou *Particle Mesh Ewald* (PME) para interações de longo alcance, e a etapa final de minimização empregou PME em combinação com o algoritmo *Conjugate Gradient*.

Executou-se uma simulação de 100 ns para o *Ensemble docking* e extraiu-se uma estrutura por nanossegundo para selecionar a melhor interação proteína-ligante. Elegeram-se as estruturas mais divergentes, realizando o cálculo do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) do centro catalítico. Utilizando as estruturas selecionadas, realizou-se mais uma etapa de *molecular docking* e, através do número e tipos de interações próximas aos resíduos catalíticos, selecionamos a configuração final do PET com base na literatura da *IsPETase*. Este processo criou um complexo proteína-ligante, formando a base para simulações de DM subsequentes.

2.3 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

A simulação foi realizada através de dois sistemas distintos: um para a esterase livre, PET30_F, e outro envolvendo o PET inserido no sítio de interação, denominado PET30_B.

Selecionou-se o OPLS-AA/M FF (Robertson, Michael J., Julian Tirado-Rives e William L. Jorgensen., 2015) e utilizamos o modelo TIP4P para moléculas de água. Para mimetizar uma condição fisiológica de 0,15 M, adicionamos íons Na⁺ e Cl⁻ para manter um sistema neutralizado. Executamos outra etapa de minimização de energia, empregando o algoritmo *Steepest Descent* (SD). O algoritmo LINCS (*Linear Constraint Solver*) (Hess, Berk, et al., 1997) foi utilizado para restringir comprimentos de ligações covalentes durante a fase de equilíbrio. No conjunto NVT, o termostato de redimensionamento V aqueceu o sistema a 300 K durante 1 ns. Posteriormente, na equilibração NPT, o barostato Parrinello-Rahman manteve uma pressão de 1 bar durante 1 ns. Finalmente, a simulação de 1 μ s para a etapa de produção foi realizada. Cada sistema passou por cinco réplicas de simulações, totalizando 10 μ s. Análises essenciais foram realizadas, como RMSD, *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), *Radius of gyration* (Rg), *Solvent accessible surface area* (SASA), *Hydrogen bond analysis* (HB), *Dictionary of Secondary Structure of the Protein* (DSSP) e *Principal Component Analysis* (PCA).

2.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E PERFIL DE ENERGIA LIVRE

Apêndice A

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontram-se disponíveis no Apêndice A disponível no fim do documento.

4 DISCUSSÕES COMPLEMENTARES

Nesta seção estão presentes discussões complementares às do artigo (Apêndice A).

4.1 ANÁLISES

Root Mean Square Deviation (RMSD) são as diferenças individuais entre as coordenadas x, y e z de um par de estruturas de proteínas ou um conjunto de quadros de simulação. Em um sistema protéico, pode-se calcular a diferença entre o seu arcabouço, o carbono α ou de toda a proteína a partir de cada quadro de simulação. O resultado fornece a variação da estrutura global de uma proteína em relação à estrutura referência.

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(x_i^{ref} - x_{i(t)})^2 + (y_i^{ref} - y_{i(t)})^2 + (z_i - z_{i(t)})^2]}$$

Equação 1: *Root Mean Square Deviation* (RMSD). (n) corresponde a número de átomos do *backbone* da proteína

Root Mean Square Fluctuation (RMSF) é muito semelhante ao RMSD, embora seja adicionado à equação o número total de intervalos de tempo considerados (t) para obter uma média. Este artifício permite obter a diferença média de cada resíduo ao longo do tempo de simulação. Observe que, embora o RMSD seja uma métrica de quanto duas estruturas diferentes se desviam, o RMSF é uma métrica (por resíduo) que mostra o quanto seções da mesma proteína oscilam em coordenadas em torno de uma estrutura de referência durante o tempo de simulação. É uma métrica de flexibilidade da cadeia.

$$RMSF(j) = \sqrt{\frac{1}{nt} \sum_{ti=1}^{nt} [(x_j^{ref} - x_j(ti))^2 + (y_j^{ref} - y_j(ti))^2 + (z_j^{ref} - z_j(ti))^2]}$$

Equação 2: *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF). (nt) indica o número de origens de tempo na trajetória. (i) é o índice sobre resíduos.

Δ RMSF é a diferença do RMSF de duas estruturas, neste estudo especificamente seria PET30_F e PET30_B. Seguindo esta lógica, valores positivos indicam uma flexibilidade maior em regiões da PET30_B e negativos em regiões da PET30_F.

Radius of gyration (Rg) é definido como a distância da proteína a um ponto onde toda a massa poderia ser concentrada sem alterar seu momento de inércia rotacional em relação à distribuição real de massa do corpo. (Alfred Rudin, Phillip Choi., 2013).

Solvent accessible surface area (SASA) é definido como a superfície exposta da proteína capaz de ser acessada por um centro hipotético de uma esfera de solvente com a superfície de contato de van der Waals da molécula. A partir dos resultados obtidos por essa ferramenta, os resíduos de aminoácidos de uma proteína podem ser classificados como inacessíveis ou expostos(Ausaf Ali, Syed, et al., 2014).

Dictionary of Secondary Structure of the Protein (DSSP) é uma ferramenta comumente usada para a anotação de elementos de estrutura secundária de estruturas de proteínas. Baseado em padrões de ligações de hidrogênio e restrições geométricas. Normalmente, os métodos de previsão de estrutura secundária usam três estados: hélice α , folha β e *coil* (Jonas Reeb, Burkhard Rost, 2019).

A *Principal Component Analysis* (PCA) é usada para reduzir sistematicamente o número de dimensões necessárias para descrever a dinâmica das proteínas. Como método estatístico multivariado, o PCA pode extrair os elementos mais importantes dos dados usando uma matriz de covariância construída a partir de coordenadas atômicas que descrevem os graus acessíveis de liberdade da trajetória das proteínas. Uma decomposição de valores próprios da matriz de covariância leva a um conjunto completo de modos coletivos ortogonais (vetores próprios), cada um com um valor próprio correspondente (variância) que caracteriza uma parte do movimento, onde valores próprios maiores descrevem movimentos em escalas espaciais maiores. Quando os dados originais (centralizados) são projetados em um autovetor, o resultado é chamado de componente principal (PC) (David, Charles C. e Donald J. Jacobs., 2014). O gráfico resultante possui os movimentos decompostos das escalas espaciais mais para as menos variáveis e, na maioria das vezes, os pontos finais (que representam a variância da estrutura da proteína) formam *clusters*.

Com estas análises podemos acessar informações importantes no decorrer da simulação. Análises como RMSD, Δ RMSF, SASA e Rg permitem entender, tanto no sistema da PET30_B quanto PET30_F, os movimentos conformacionais da proteína durante o tempo de simulação, através da alteração de suas coordenadas cartesianas, sua superfície acessível e centro de massa. Na análise de Δ RMSF, mesmo com regiões com flutuações marcantes entre cada sistema, os locais onde estão os resíduos auxiliares e catalíticos se mantêm estáveis. Isto pode ser resultado da importância dos mesmos para a função da enzima. O conjunto destas análises sugere que ambos os sistemas mantiveram-se estáveis durante a simulação, apesar de suas diferenças conformacionais adotadas (Anexo A Figura 4). Com os padrões resultantes da análise de PCA podemos perceber que o sistema PET30_B permaneceu com conformações mais restritas (evidenciado pelos *clusters* mais bem definidos) enquanto que PET30_F explorou conformações mais distintas (*clusters* maiores e menos definidos), provavelmente devido a ausência do PET (Anexo A Figura 5). DSSP demonstrou que o sistema PET30_B favoreceu a adoção de estruturas secundárias em regiões que não ocorreram em PET30_F, o que denota a adoção de conformações mais relevantes para a interação com o PET. É importante ressaltar que embora essas análises possam ser vistas como uma média de cada sistema, as réplicas também devem ser analisadas individualmente devido ao fator estocástico fornecido no NVT o que acarreta em situações distintas e igualmente relevantes.

4.2 DISCUSSÃO EVOLUTIVA

Os polímeros naturais são utilizados por plantas, fungos e artrópodes para protegê-los de danos físicos ou químicos e são compostos principalmente de hidrocarbonetos e polissacarídeos, formando estruturas muito resistentes (Fig. 1). Microorganismos, que evoluíram juntamente destes organismos, desenvolveram enzimas capazes de degradar esses polímeros. O plástico, por sua vez, é feito principalmente de polímeros derivados de monômeros de petróleo bruto. As ligações químicas que ligam os monômeros são semelhantes às encontradas em polímeros naturais de plantas. Portanto, várias enzimas que degradam a biomassa vegetal são capazes de clivar polímeros sintéticos (Chen, Chun-Chi, et al., 2020).

Figura 1 - Polímeros de plantas terrestres

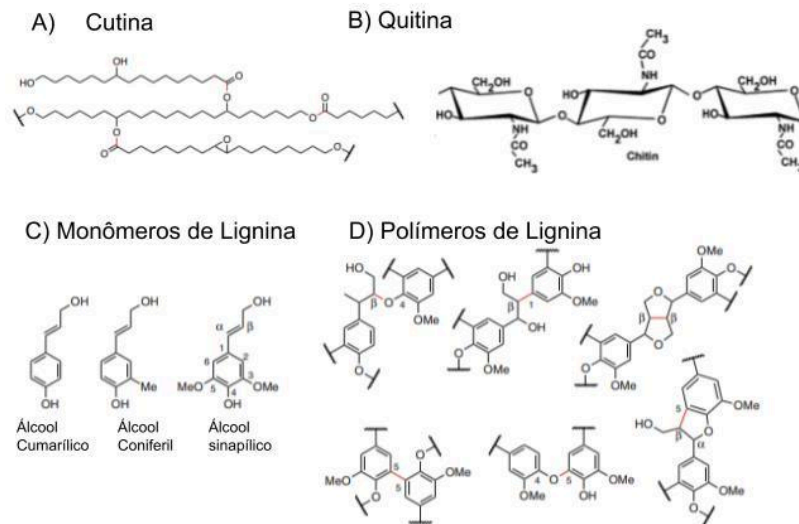


Figura 1: Adaptado de Chen, Chun-Chi, et al. (2020) e e Shahidi, Fereidoon et al. (1999). Imagens representativas de polímeros naturais. (A) demonstra a estrutura polimérica da cutina. (B) o polímero de queratina. (C) os monômeros de Lignina e (D) o seus polímeros.

A natureza das ligações que unem os monômeros é o principal determinante de quanto biodegradável é um polímero. Dos seis principais tipos de plásticos sintéticos (polietileno (PE) e poli(cloreto de vinila) (PVC), por exemplo) com ligações C – C são os mais difíceis de clivar. Por outro lado, o PET e o poliuretano (PUR) estão ligados por ligações éster e uretano (carbamato), respectivamente. Essa estrutura hidrolisável é mais suscetível à degradação enzimática (Fig. 2) (Chen, Chun-Chi, et al., 2020).

Figura 2 - Tipos de Plásticos

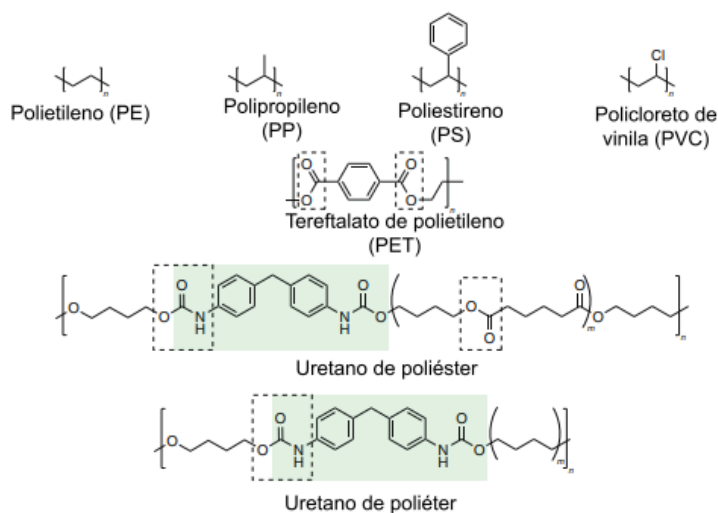


Figura 2: Estrutura principal dos polímeros sintéticos mais amplamente produzidos. Os polifenóis PE, PS, PP e PVC são mantidos juntos por fortes ligações CC. Já PET e PUR são mais suscetíveis à degradação porque apresentam ligações C-O. Adaptado de Chen, Chun-Chi, et al. (2020).

As enzimas hidrolisantes de PET, que assumem a forma de esterases, lipases ou cutinases, são as enzimas de degradação de plástico mais extensivamente estudadas (Chen, Chun-Chi, et al., 2020). Por exemplo, *I. sakaiensis* foi descoberta em um local de reciclagem de garrafas PET em 2016 (Yoshida, Shosuke et al., 2016), e a hipótese é uma adaptação de uma enzima que degrada a cutina para uma enzima que degrada o PET devido à pressão ambiental. Em contraste, *K. jeonii* é encontrada em habitats aquáticos, indicando que a distribuição global do PET, especialmente na água, atingiu níveis de poluição suficientes para se tornar uma pressão seletiva para que vários microrganismos o utilizem como fonte de carbono.

Em relação a *IsPETase*, um estudo importante na compreensão de seu caminho evolutivo e eficiência catalítica foi realizado por Joho, Yvonne, et al. 2022. Seu trabalho consistiu de uma reconstrução de sequência ancestral da *IsPETase* usando dois conjuntos de dados independentes de 82 e 147 sequências de enzimas existentes relacionadas para reconstruir 12 PETases ancestrais plausíveis. Eles mostraram a importância dos aminoácidos Ala171, Asp186, Ser214 e Ile218 na

estabilização proteica e na acomodação do PET no sítio de ligação. Ser214 e Ile218 desempenham um papel importante na ampliação do sítio de ligação ao substrato da *IsPETase*, aumentando a flexibilidade do Trp185, um importante aminoácido que interage com o PET denominado de *wobbly tryptophan* (Magalhães, Rita P. et al, 2021) . Os respectivos aminoácidos na PET30 são His206 e His210 e podem afetar a flexibilidade do Tyr178 (que cumpre o papel do Trp185). Os efeitos de Ala171 e Asp186 na *IsPETase* são mais sutis, mas parecem afetar a capacidade do Trp185 de atingir conformações cataliticamente produtivas, aumentando as restrições estruturais no sítio ativo. No entanto, na PET30 estão presentes os resíduos de Val164 e Leu179, e a menor quantidade de ligações de hidrogênio e pontes salinas podem influenciar a obtenção de conformações cataliticamente produtivas da enzima.

O estudo de Joho, Yvonne, et al. 2022 deixa claro que este volume maior disponível no sítio de ligação foi essencial na adaptação da *IsPETase* com o PET, permitindo a obtenção de conformações mais favoráveis para a reação. Esta é uma característica que poderia servir bem à PET30, já que é classificada como uma esterase e esta é a categoria menos eficaz na degradação do plástico entre as mencionadas acima. Isto provavelmente se deve ao volume limitado do sítio de ligação com substrato da esterase, que é otimizada para cadeias alifáticas mais curtas (Chen, Chun-Chi, et al., 2020). Este espaço limitado, além de impedir uma interação efetiva com cadeias longas de PET, dificulta que Tyr178 atinja conformações efetivamente produtivas para a reação como o Trp185 na *IsPETase*. Joho, Yvonne, et al. 2022 também demonstra a importância da ponte dissulfeto entre aminoácidos próximos ao Asp e His da tríade catalítica, para garantir a conformação correta na catálise. Isto coincide com os resultados obtidos com a PET30 que não possui esta ponte dissulfeto e eventualmente pode perder a proximidade entre os resíduos da tríade.

Outra característica interessante descrita da PET30 é sua capacidade de degradar plástico em temperaturas próximas de zero, permanecendo ativa até 4°C (Zhang, Hongli, et al., 2022). Fruto da adaptação de *K. jeonii* à temperaturas baixas. Atualmente, a maioria das PETases são desenvolvidas para degradar o PET em altas temperaturas, devido a sua Temperatura de Transição Vítrea ser próxima de 75°C (Liu, Fei, et al., 2023). A T_g é a temperatura onde a estrutura molecular do material ganha mobilidade, no caso do PET este estado facilitaria o acesso de

enzimas a sua estrutura polimérica e, portanto, sua clivagem. Por este motivo, alguns estudos visam aumentar a termoestabilidade da *IsPETase* e torná-la capaz de manter-se íntegra nesta temperatura para degradar o PET (Brott, Stefan, et al, 2022). Entretanto, como o oceano acaba sendo um local de grande retenção de microplásticos, os microrganismos que ali residem tornam-se importantes fontes de exploração para a biorremediação (Wei, Ren, et al., 2020). Uma vez que o baixo percentual de plástico reciclado e a dificuldade de atingir a máxima eficiência catalítica em ambientes naturais (devido a sua T_g) fazem dos organismos que conseguem degradá-lo nesse ambiente objetos de estudos valiosos, como é o caso da *K. jeonii*.

Por isso, com a descoberta de enzimas capazes de degradar plástico sob outras condições, uma nova possibilidade de biorremediação se abre. O *design* de enzimas pode usar de estudos estruturais para mitigar o dano da poluição plástica em ambientes desfavoráveis, com baixas temperaturas neste caso. Sendo assim, estudos como este podem servir de base para a engenharia de proteínas de esterases e torná-las melhores alternativas de biorremediação.

5 CONCLUSÃO

Atualmente mais de 24 enzimas capazes de degradar plástico vem sendo estudadas (Magalhães, Rita P. et al, 2021). O que demonstra o interesse mundial em mitigar os danos da poluição de plástico no meio ambiente de forma mais consciente. Em resumo, este estudo demonstrou o mecanismo de interação entre a PET30 e o PET. Os resultados indicam uma interação favorável, mesmo com uma baixa eficiência. Isso abre possibilidade para futuros estudos de engenharia de enzimas para o melhoramento desta esterase, além de promoverem um maior entendimento do caminho evolutivo percorrido por essas enzimas para a degradação do PET. A literatura existente sobre a *IsPETase* e a grande similaridade estrutural entre as duas enzimas permitem entender fatores chave na adaptação destas enzimas na degradação do PET. A ponte dissulfeto no sítio de interação juntamente com aminoácidos que permitem a interação com cadeias maiores de PET são exemplos disso. Essas diferenças marcantes entre a PET30 e a *IsPETase* permitem inferir potenciais regiões passíveis de mutações para favorecer a reação. Entretanto, mais estudos de biologia estrutural são necessários para avaliar com cautela o efeito de cada uma destas alterações.

É fato que a poluição ambiental de plástico é uma problemática a ser encarada de forma multifatorial. Uma vez que a reciclagem, a biorremediação, o tratamento de resíduos industriais e domiciliares, a cadeia produtiva e consumo dos plásticos podem contribuir de diferentes formas na conservação de ambientes naturais. Por isso, estudos nestas diferentes áreas colaboram para a construção de tecnologias ecologicamente mais amigáveis, mesmo com suas limitações inerentes. Enquanto a biorremediação ainda é uma alternativa raramente utilizada pela dificuldade de ser aplicada e regulamentada (Wei, Ren, et al., 2020), ela apresenta perspectivas de grande valia devido à sua eficiência e desenvolvimento tecnológico nos últimos anos. Em razão disso, este estudo teve o objetivo de contribuir com o conhecimento nesta área e, especificamente, aprofundar o entendimento do comportamento da PET30 para futuros estudos.

Conclusões também disponíveis no Apêndice A.

REFERÊNCIAS

Alfred Rudin, Phillip Choi, in *The Elements of Polymer Science & Engineering* (Third Edition), 2013

Allouzi, Mintallah Mousa A., et al. "Micro (nano) plastic pollution: The ecological influence on soil-plant system and human health." *Science of the Total Environment* 788 (2021): 147815.

Ausaf Ali, Syed, et al. "A review of methods available to estimate solvent-accessible surface areas of soluble proteins in the folded and unfolded states." *Current Protein and Peptide Science* 15.5 (2014): 456-476.

Austin, Harry P., et al. "Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.19 (2018): E4350-E4357.

Kim, David E., Dylan Chivian, and David Baker. "Protein structure prediction and analysis using the Robetta server." *Nucleic acids research* 32.suppl_2 (2004): W526-W531.

Bowie, James U., Roland Lüthy, and David Eisenberg. "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure." *Science* 253.5016 (1991): 164-170.

Brott, Stefan, et al. "Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation." *Engineering in life sciences* 22.3-4 (2022): 192-203.

Carr, Steve A., Jin Liu, and Arnold G. Tesoro. "Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants." *Water research* 91 (2016): 174-182.

Chamas, Ali, et al. "Degradation rates of plastics in the environment." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 8.9 (2020): 3494-3511.

Chen, Chun-Chi, et al. "Enzymatic degradation of plant biomass and synthetic polymers." *Nature Reviews Chemistry* 4.3 (2020): 114-126.

Chen, Kun, et al. "Molecular insights into the enhanced performance of EKylated PETase toward PET degradation." *ACS Catalysis* 11.12 (2021): 7358-7370.

Chen, Linyu, et al. "Atomistic insight into the binding mode and self-regulation mechanism of IsPETase towards PET substrates with different polymerization degree." *Physical Chemistry Chemical Physics* (2023).

Childers, Matthew Carter, and Valerie Daggett. "Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design." *Molecular systems design & engineering* 2.1 (2017): 9-33.

Colovos, Chris, and Todd O. Yeates. "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions." *Protein science* 2.9 (1993): 1511-1519.

Csizmadia, Péter. "MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web." (1999).

Cui, Yinglu, et al. "Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy." *Acs Catalysis* 11.3 (2021): 1340-1350.

David, Charles C., and Donald J. Jacobs. "Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins." *Protein dynamics: Methods and protocols* (2014): 193-226.

Der Spoel, Van. "GROMACS 2021.5 Source code." Zenodo.

Dodda, Leela S., et al. "LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands." *Nucleic acids research* 45.W1 (2017): W331-W336.

Dodda, Leela S., et al. "1.14* CM1A-LBCC: localized bond-charge corrected CM1A charges for condensed-phase simulations." *The Journal of Physical Chemistry B* 121.15 (2017): 3864-3870.

Eberhardt, Jerome, et al. "AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings." *Journal of chemical information and modeling* 61.8 (2021): 3891-3898.

Evode, Niyitanga, et al. "Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability." *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* 4 (2021): 100142.

Fecker, Tobias, et al. "Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase." *Biophysical journal* 114.6 (2018): 1302-1312.

Hess, Berk, et al. "LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations." *Journal of computational chemistry* 18.12 (1997): 1463-1472.

Hollingsworth, Scott A., and Ron O. Dror. "Molecular dynamics simulation for all." *Neuron* 99.6 (2018): 1129-1143.

Hooft, Rob WW, et al. "Errors in protein structures." *Nature* 381.6580 (1996): 272-272.

Howard, Sophie A., and Ronan R. McCarthy. "Modulating biofilm can potentiate activity of novel plastic-degrading enzymes." *npj Biofilms and Microbiomes* 9.1 (2023): 72.

Joho, Yvonne, et al. "Ancestral sequence reconstruction identifies structural changes underlying the evolution of *Ideonella Sakaiensis* PETase and variants with improved stability and activity." *Biochemistry* 62.2 (2022): 437-450.

Jonas Reeb, Burkhard Rost, in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019

Jorgensen, William L., and Julian Tirado-Rives. "Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.19 (2005): 6665-6670.

Joo, Seongjoon, et al. "Structural insight into molecular mechanism of poly (ethylene terephthalate) degradation." *Nature communications* 9.1 (2018): 382.

Kawai, Fusako, et al. "A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190." *Applied microbiology and biotechnology* 98 (2014): 10053-10064.

Kushwaha, Anamika, et al. "Biodegradation of poly (ethylene terephthalate): Mechanistic insights, advances, and future innovative strategies." *Chemical Engineering Journal* 457 (2023): 141230.

Laskowski, Roman A., et al. "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." *Journal of applied crystallography* 26.2 (1993): 283-291.

Lindahl, Abraham, H.v.d.S., 2022. Gromacs 2021.

Lindorff-Larsen, Kresten, et al. "Systematic validation of protein force fields against experimental data." *PloS one* 7.2 (2012): e32131.

Liu, Fei, et al. "Current advances in the structural biology and molecular engineering of PETase." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11 (2023).

Lüthy, Roland, James U. Bowie, and David Eisenberg. "Assessment of protein models with three-dimensional profiles." *Nature* 356.6364 (1992): 83-85.

MacLeod, Matthew, et al. "The global threat from plastic pollution." *Science* 373.6550 (2021): 61-65.

Magalhães, Rita P., Jorge M. Cunha, and Sérgio F. Sousa. "Perspectives on the Role of Enzymatic Biocatalysis for the Degradation of Plastic PET." *International Journal of Molecular Sciences* 22.20 (2021): 11257.

Maurya, Ankita, Amrik Bhattacharya, and Sunil Kumar Khare. "Enzymatic remediation of polyethylene terephthalate (PET)-based polymers for effective management of plastic wastes: an overview." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (2020): 602325.

Monticelli, L., & Tieleman, D. P. (2012). Force Fields for Classical Molecular Dynamics. *Biomolecular Simulations*, 197–213. doi:10.1007/978-1-62703-017-5_8

Pontius, Joan, Jean Richelle, and Shoshana J. Wodak. "Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures." *Journal of molecular biology* 264.1 (1996): 121-136.

Revel, Messika, Amélie Châtel, and Catherine Mouneyrac. "Micro (nano) plastics: a threat to human health?." *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1 (2018): 17-23.

Robertson, Michael J., Julian Tirado-Rives, and William L. Jorgensen. "Improved peptide and protein torsional energetics with the OPLS-AA force field." *Journal of chemical theory and computation* 11.7 (2015): 3499-3509.

Salo-Ahen, O. M. H., et al. "Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development. *Processes* 9: 71." (2021).

Sanner, Michel F. "Python: a programming language for software integration and development." *J Mol Graph Model* 17.1 (1999): 57-61.

Shahidi, Fereidoon, Janak Kamil Vidana Arachchi, and You-Jin Jeon. "Food applications of chitin and chitosans." *Trends in food science & technology* 10.2 (1999): 37-51.

Sharma, Babita, Arun Kumar Dangi, and Pratyosh Shukla. "Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review." *Journal of environmental management* 210 (2018): 10-22.

Son, Hyeoncheol Francis, et al. "Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation." *Acs Catalysis* 9.4 (2019): 3519-3526.

Yoshida, Shosuke, et al. "A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate)." *Science* 351.6278 (2016): 1196-1199.

Taniguchi, Ikuo, et al. "Biodegradation of PET: current status and application aspects." *Acs Catalysis* 9.5 (2019): 4089-4105.

Trott, Oleg, and Arthur J. Olson. "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." *Journal of computational chemistry* 31.2 (2010): 455-461.

Wei, Ren, et al. "Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling." *Nature Catalysis* 3.11 (2020): 867-871.

Williams, Christopher J., et al. "MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation." *Protein Science* 27.1 (2018): 293-315.

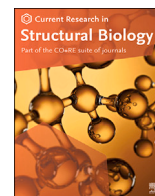
Zhang, Hongli, et al. "The Bacteroidetes *Aequorivita* sp. and *Kaistella jeonii* produce promiscuous esterases with PET-hydrolyzing activity." *Frontiers in microbiology* 12 (2022): 803896.

APÊNDICE A



Contents lists available at ScienceDirect

Current Research in Structural Biology

journal homepage: www.journals.elsevier.com/current-research-in-structural-biology

Research Article

Assessment of *Kaistella jeonii* esterase conformational dynamics in response to poly(ethylene terephthalate) binding

Ederson Sales Moreira Pinto^a, Arthur Tonietto Mangini^a, Lorenzo Chaves Costa Novo^a,
Fernando Guimaraes Cavatao^a, Mathias J. Krause^d, Marcio Dorn^{a,b,c,*}

^a Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Buildings 43421, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Institute of Informatics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Building 43424, Porto Alegre, RS, Brazil

^c National Institute of Science and Technology - Forensic Science, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Institute for Applied and Numerical Mathematics, Karlsruhe Institute of Technology, Englerstraße 2, D-76131, Karlsruhe, BW, Germany

ARTICLE INFO

Edited by A. Wlodawer

Keywords:

Molecular dynamics simulation

PETase

Bioremediation

Biodegradation

PET

ABSTRACT

The pervasive presence of plastic in the environment has reached a concerning scale, being identified in many ecosystems. Bioremediation is the cheapest and most eco-friendly alternative to remove this polymer from affected areas. Recent work described that a novel cold-active esterase enzyme extracted from the bacteria *Kaistella jeonii* could promiscuously degrade PET. Compared to the well-known PETase from *Ideonella sakaiensis*, this novel esterase presents a low sequence identity yet has a remarkably similar folding. However, enzymatic assays demonstrated a lower catalytic efficiency. In this work, we employed a strict computational approach to investigate the binding mechanism between the esterase and PET. Understanding the underlying mechanism of binding can shed light on the evolutive mechanism of how enzymes have been evolving to degrade these artificial molecules and help develop rational engineering approaches to improve PETase-like enzymes. Our results indicate that this esterase misses a disulfide bridge, keeping the catalytic residues closer and possibly influencing its catalytic efficiency. Moreover, we describe the structural response to the interaction between enzyme and PET, indicating local and global effects. Our results aid in deepening the knowledge behind the mechanism of biological catalysis of PET degradation and as a base for the engineering of novel PETases.

1. Introduction

Plastic pollution is not only an emergent threat to human health and biodiversity but is nearing an irreversible point (MacLeod et al., 2021). Plastic residues are found globally in food, water, and in almost every ecosystem (Carr et al., 2016; Revel et al., 2018; Allouzi et al., 2021; MacLeod et al., 2021; Howard and McCarthy, 2023). Remarkably, poly(ethylene terephthalate) (PET)-based plastics are one of the most used in packaging industries because of their durability (Maurya et al., 2020). Amidst the mass-produced plastic, recycling only takes place for a diminutive share (Howard and McCarthy, 2023). The remaining plastic reaches the environment and negatively impacts its surroundings and diverse life forms (Maurya et al., 2020). In response to the challenges of plastic pollution, cost-effective and eco-friendly bioremediation is gaining prominence (Sharma et al., 2018). Ongoing

advancements in microbial enzymes, genetic engineering, and enzyme immobilization emphasize the potential of enzymatic remediation in this field (Sharma et al., 2018). Currently, cutinases are the main enzymes used for plastic degradation (Egmond and de Vlieg, 2000; Maurya et al., 2020).

In 2016, Yoshida et al. (2016) described that *Ideonella sakaiensis* could degrade PET. The characterization of the enzyme *IsPETase* enabled several studies for protein engineering (Son et al., 2019; Cui et al., 2021) and, until now, is one of the most effective enzymes for PET degradation. Simulations using Molecular Dynamics (MD) were conducted to understand and optimize the *IsPETase* activity (Fecker et al., 2018; Chen et al., 2021), giving more information about enzyme characteristics crucial for protein engineering. MD gives atomistic information about the dynamic molecular mechanism that determines the protein stability, function, and protein-ligand interaction and is a reliable strat-

* Corresponding author at: Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Buildings 43421, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: mdorn@inf.ufrgs.br (M. Dorn).

URL: <https://sbc.inf.ufrgs.br> (M. Dorn).

<https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2024.100130>

Received 11 December 2023; Received in revised form 21 January 2024; Accepted 29 January 2024

Available online 5 February 2024

2665-928X/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

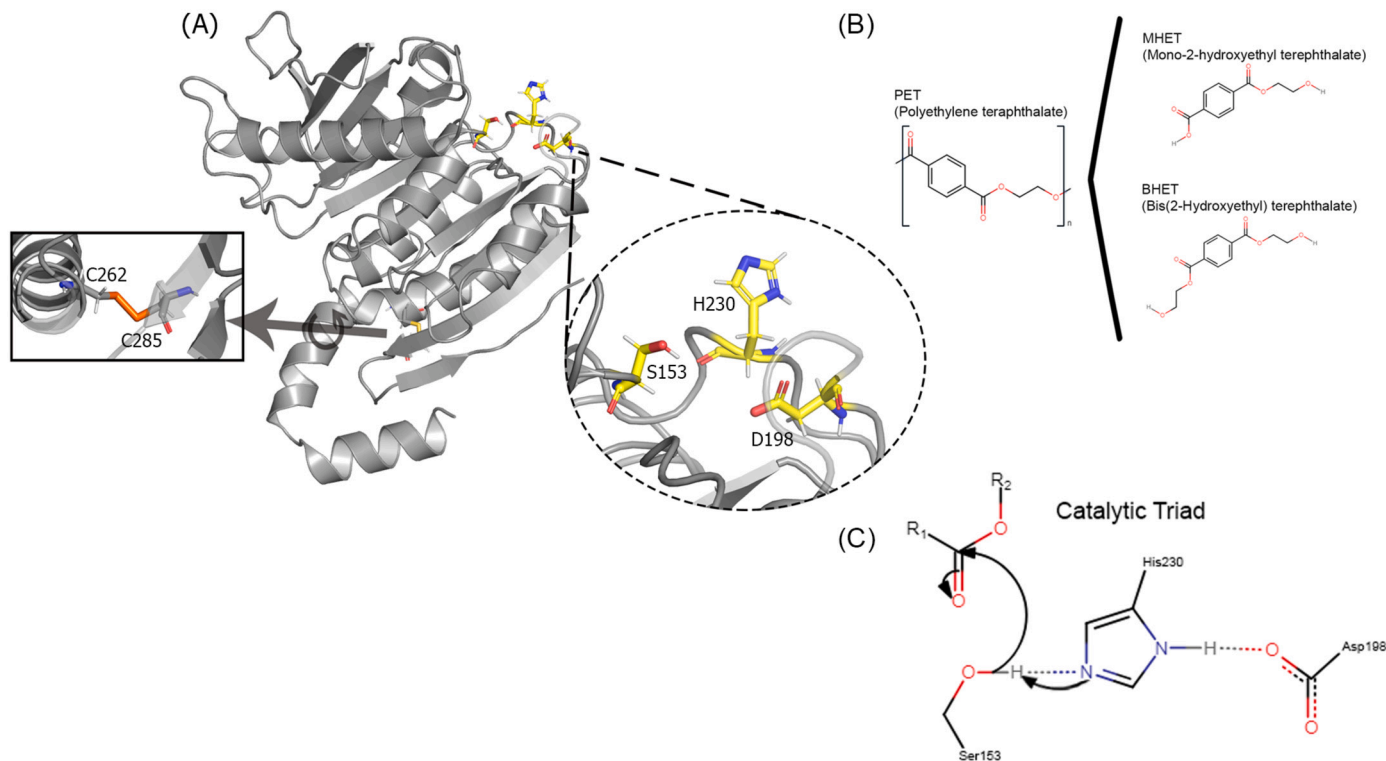


Fig. 1. A) Structure of the esterase (PET30), highlighting the disulfide bridge formed by residues Cys262 and Cys285, and the catalytic residues Ser153, Asp198, and His230. B) Chemical formula representing PET monomer and PETase degradation products, MHET and BHET. C) Schematics of the general reaction mechanism of esterases, depicting the expected reaction of the esterase's catalytic triad.

egy to access a protein's molecular behavior (Childers and Daggett, 2017). Therefore, using MD can provide substantial data for enzyme management in bioremediation.

In 2022, a new esterase was described from *Kaistella jeonii* (PET30) that showed PET degradation activity (Zhang et al., 2022). PET30 Fig. 1A, classified as an esterase (serine protease) with EC 3.1 designation, represents a hydrolase acting specifically on ester bonds. Enzymes denoted as "PETases" can degrade PET by cleaving the ester bonds of the polymer into Mono-2-hydroxyethyl terephthalate (MHET) and Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) Fig. 1B. In alignment with this enzymatic function, PET30 likely falls under the EC sub-subtype 1 (EC 3.1.1), akin to cutinases, lipases, and carboxylesterases known for their PETase activity. Positioned within the α/β hydrolase superfamily, alongside enzymes like lipases and esterases, PET30 features a distinctive Gly-x1-Ser-x2-Gly motif (Gly151-Trp152-Ser153-Met154-Gly155) at its active site. Strikingly, this motif mirrors the identical sequence found in *IsPETase* (Gly158-Trp159-Ser160-Met161-Gly162), further underlining the structural similarity between these PET-degrading enzymes (Joo et al., 2018).

A notable feature of PET30 is its catalytic triad, a defining characteristic of α/β hydrolases. Comprising the residues Asp-His-Ser Fig. 1C, this triad underscores PET30's enzymatic functionality. When aligned with *IsPETase* structure, PET30 reveals a less hydrophobic environment surrounding its catalytic pocket, providing an initial distinction between these structurally akin enzymes.

Despite a relatively low sequence identity of 34% with *IsPETase*, PET30's tertiary structure mirrors its PET-degrading counterpart. Displaying a canonical α/β -fold, PET30 features a central twisted β -sheet comprising ten β -strands, flanked by seven α -helices on either side - a structural arrangement similar to *IsPETase* (Zhang et al., 2022).

In this work, noting the performance of PET degradation and some common characteristics with *IsPETase*, we observe the potential use of this new esterase on the bioremediation of PET. Furthermore, the report of the enzyme's molecular mechanism could give more information on

cutinase's evolutionary pathway toward PET degradation. Therefore, we use a classic MD to understand and compare the protein's molecular behavior with the *IsPETase* literature available.

2. Methodology

2.1. Protein structure, modeling, and validation

We retrieved the initial structure of PET30 from the Protein Data Bank (PDB) under the identifier 7PZJ (Berman et al., 2000). Due to the absence of the initial segment (residues 1-27), a comparative modeling approach was employed. The structure was subjected to the Robetta server (Kim et al., 2004) for structure modeling and refinement. The resultant model comprises residues 1 to 299, integrating the reconstructed N-terminal segment. The accuracy and reliability of the generated model were assessed through various validation tools (Bowie et al., 1991; Lüthy et al., 1992; Colovos and Yeates, 1993; Laskowski et al., 1993; Hooft et al., 1996; Pontius et al., 1996; Williams et al., 2018) to ensure its suitability for subsequent analyses.

2.2. Ensemble docking and initial simulation

The molecular structure of PET was modeled using Marvin JS (Csimadia, 1999) in a trimer format. Next, we submitted the structure to the LigParGen server (Jorgensen and Tirado-Rives, 2005; Dodda et al., 2017a,b), which generates parameters for bonds, angles, dihedrals, and Lennard-Jones interactions for the selected forcefield (FF). We use the 1.14*CM1A option for partial charge parameters. The server also provided topology files compatible with GROMACS for further simulations.

We employed AutoDock Tools 1.5.7 (Sanner et al., 1999) and AutoDock Vina 1.2.3 (Trott and Olson, 2010; Eberhardt et al., 2021) software for molecular docking of the PET molecule into the esterase structure. A grid box was strategically positioned at the central coordinates of the catalytic residues, namely Ser153, Asp198, and His230.

To mimic the native state of the residues, we protonated the nitrogen δ of His230 while concurrently deprotonating the nitrogen ϵ . The dimensions of the grid box were set to encompass the entire active enzyme center, with a grid size of 26 Å on the x-axis, 21.5 Å on the y-axis, and 16.3 Å on the z-axis. Subsequently, we imported the ligand into AutoDock Vina, which generated ten different poses. The resultant conformation of the ligand, as generated by AutoDock Vina, was employed in subsequent molecular dynamics simulations.

We conducted Molecular Dynamics (MD) simulations using the GROMACS package version 2021.5 (Lindahl et al., 2022). The system was positioned within a cubic simulation box, and a disulfide bridge formation between CYS 262 and CYS 285 was configured. The force field employed for these simulations was OPLS-AA/M (Robertson et al., 2015). We opted to perform serial minimization steps to ensure an optimal starting configuration. The first minimization step was a vacuum minimization utilizing the Steepest Descent (SD) algorithm, followed by a series of minimization steps in water. The solvation process employed the TIP3P water model and Na^+ and Cl^- ions in a concentration of 0.15 M. The second minimization step occurred treating the non-bonded interactions with a Cut-off and the SD algorithm; the third minimization step used Particle Mesh Ewald (PME) for long-range interactions and; the final minimization step employed PME in combination with the Conjugate Gradient algorithm.

We use the 100 resulting frames from the 100 ns simulation to select the best protein-ligand interaction. Performing catalytic center RMSD, we select the most divergent structures. We use π -stacking and distance analysis to decide the best catalytic triad (Ser153-His230-Asp-198) coordination with PET. With the elected structure, we performed a new Docking following the conditions above. This process created a protein-ligand complex, forming the foundation for subsequent MD simulations.

We ran a 100 ns simulation for the ensemble docking and extracted one structure per nanosecond. Next, we calculated the Root Mean Square Deviation (RMSD) of the catalytic center, including all the residues described as relevant for the substrate accommodation, and selected the ones presenting the higher values of RMSD. We submitted each structure for molecular docking and filtered them by the number and types of interactions, proximity to the catalytic residues, and the final configuration pose of PET, based on the *IsPETase* literature. The selected structure was used to generate the protein-ligand complex for the starting point of subsequent Molecular Dynamics (MD) simulations.

2.3. Molecular dynamics simulations

In this phase, we assembled the simulations in two distinct systems: one dedicated to elucidating the behavior of the free esterase, denoted as PET30_F , and the other involving the PET trimer bound at the binding pocket, referred to as PET30_B .

We selected the OPLS-AA/M FF and used the water molecules TIP4P model. We added Na^+ and Cl^- ions to maintain a neutralized system, mimicking a physiological condition of 0.15 M. An additional energy minimization step was executed, employing the Steepest Descent algorithm. The LINCS (Linear Constraint Solver) algorithm was utilized to constrain covalent bond lengths during the equilibration phase. In the NVT ensemble, the V-rescale thermostat heated the system to 300 K over 1 ns. Subsequently, in the NPT ensemble equilibration, the Parrinello-Rahman barostat maintained a pressure of 1 bar over 1 ns. Finally, the production step was performed for 1 μs simulation. Each system underwent five replicas of simulations, giving a total of 10 μs . Essential analyses were conducted, such as RMSD, Root Mean Square Fluctuation (RMSF), Radius of Gyration (R_g), Solvent Accessible Surface Areas (SASA), hydrogen bond analysis (HB), and Dictionary of Secondary Structure of the Protein (DSSP). The Supplementary Material contains information regarding the details of general trajectory analyses.

2.4. Principal component analysis and free energy profile

A multi-step process was executed to conduct Principal Component Analysis (PCA). We used the trajectories of the five replicas of each system separately, removing rotational and translational motions from the trajectories. Employing the *Covar* module in Gromacs, a covariance matrix was systematically generated based on the Cartesian coordinates of the protein backbone atoms over the trajectory. The obtained covariance matrix was then subjected to eigenvalue-eigenvector analysis using the *Anaeig* module. This analytical step identifies the principal components (PCs) of motion inherent in the system. We projected the entire simulation trajectory onto the identified principal components using the trajectory and the calculated eigenvectors. To construct the Free Energy Profile, we used the MD-Davis Python library (Maity and Pal, 2022) with PC1 and PC2 as input.

3. Results and discussion

The decision to model the initial 27 residues segment was driven by the acknowledgment of the limitations in available structural information, the potential impact of the missing segment on overall dynamics, and the pragmatic choice to adhere to evolutionarily selected sequences for a comprehensive exploration of PET30's behavior in MD simulations. This strategy was critical for a more nuanced understanding of the protein's structural dynamics and functional implications.

Both systems, PET30_F , and PET30_B , were simulated in quintuplicate to avoid drawing conclusions based on low-probability events due to specific local minima captured by one single trajectory (Knapp et al., 2018). Each replica composing the energy landscape associated with the global movement of PET30 systems can be considered equally relevant. However, each one depicts a different ensemble of local minima. This way, we must be careful when drawing conclusions based on the average of the five replicas or if the analysis requires consideration of specific energy minima, i.e., analyzing the event occurring in each replica separately.

Moreover, we take into consideration the effect of the molecular docking method. Docking estimates the binding pose between the protein and the ligand. However, the protein remains rigid during the docking process. Since there is no structure of PET30 co-crystallized with PET, we know that our initial PET30_B system is an approximation. Employing molecular docking to generate an initial protein-ligand complex structure for MD simulations justifies the difficulty of the system achieving an optimal conformation of interaction. Thus, we observe different PET30_B replicas exploring distinct levels of interaction with PET. Replica 1 shows the PET ligand leaving the binding pocket but eventually returning; replicas 2 and 5 show the ligand eventually leaving and staying out, interacting with a different portion of the protein and; replicas 3 and 4 keep the ligand tightly bound at the binding pocket throughout the whole simulation **SFig.13,20-22**.

3.1. Structural profiling of PET30: insights and comparison with *IsPETase*

The whole structure of PET30 comprises 366 residues in total. However, PDB 7PZJ missed the initial 27 residues and the C-terminal 300-366; thus, we performed a modeling step. Zhang et al. (Zhang et al., 2022) demonstrated at a web lab that PET30 keeps its catalytic activity unaltered even after removing residues 300 to 366 (called $\text{PET30}\Delta\text{PorC}$ in their work); thus, we removed the final modeled segment and kept the first 27 residues (validation results found in **SFig.1-4**). Comparing the structure of our model with *IsPETase* (PDB 6EQE (Austin et al., 2018)), the superposition is notable, and the structure's alignment results in a 0.735 RMSD value **Fig. 2A**.

IsPETase has a core β -sheet composed of 9 β -strands ($\beta 1$ - $\beta 9$), surrounded by 7 distinct α -helix ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) and loops connecting each secondary structure element. PET30's β -sheet core exhibits an extra β -strand close to the C-terminal end, labeled as $\beta 10$ **Fig. 2B**. Two additional helices appeared after we modeled the initial segment of PET30,

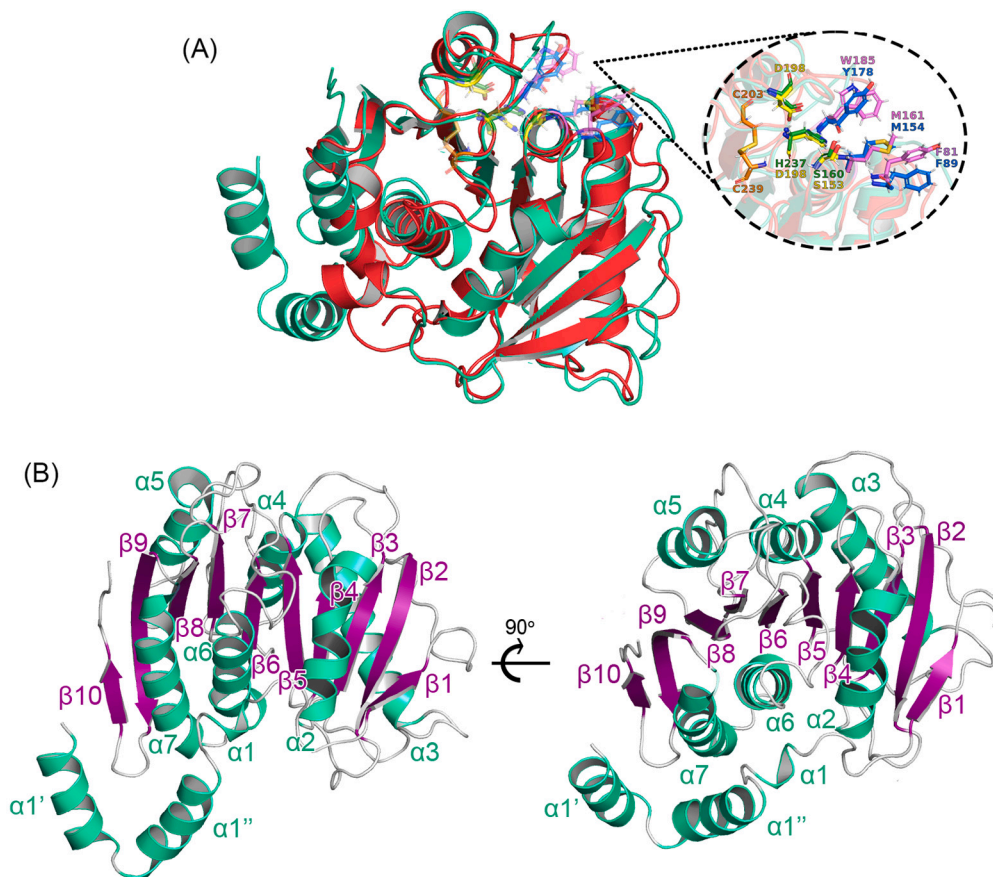


Fig. 2. A) Structure of PET30 model (green cyan) aligned to *IsPETase* structure (red). The catalytic residues of PET30 (Ser153, Asp198, His237) colored in yellow, and *IsPETase* represented (Ser160, Asp206, and His237) in green; auxiliary residues of PET30 (Phe80, Met154, and Tyr178) depicted in blue, and auxiliary residues from *IsPETase* (Tyr81, Met161, and Trp185) marked as pink. A disulfide bridge (only present in the *IsPETase*) is illustrated as orange. B) Structure of the PET30 model, depicting each secondary structure individually. Pet 30 core has a β -sheet composed of ten β -strands, named $\beta 1$ to $\beta 10$ from the N-terminal end; and nine α -helices, naming $\alpha 1'$ and $\alpha 1''$ the modeled helices, and $\alpha 1$ to $\alpha 7$ the correspondent helices with *IsPETase* structure.

which we called $\alpha 1'$ and $\alpha 2''$. This naming choice is based on two considerations. First, considering these helices come before the canonical ones, we wanted to keep the original numbering of $\alpha 1$ to $\alpha 7$. Additionally, MD results demonstrate that these helices are not stable. DSSP analysis shows that $\alpha 1'$, composed of residues 2-13, quickly turns into coil structure; $\alpha 1''$, comprising residues 15-27, reduces its helix structure size, with residues 15-18 and 25-27 presenting as a coil for 85% of the time; whereas residues 19-24 keeps it helical structure for over 60% of the time.

Furthermore, a comparison between PET30 and *IsPETase* structures reveals key distinguished features. First, *IsPETase* exhibits two disulfide bridges (Han et al., 2017), while PET30 is described only with one. The extra bridge of *IsPETase* connects two loops that harbor the catalytic residues Asp and His, guaranteeing that they do not get too far apart. In the position where the analogous Cys residues should be, we find a Gly and a Val instead. In this sense, we measured the distance between Gly195 and Val232 over time. Disulfide bonds typically have a length of 2.05 Å, with 3.0 Å being used as the PDB database's cutoff for disulfides (Sun et al., 2017). From our simulations, we observed that the PET30_F Gly195-Val232 distance starts at 3.0 Å apart, but this distance varies, sometimes increasing until 5.0 Å. For PET30_B, the distance is even more prominent, starting at 3.0 Å and reaching 6.0 Å around 300 ns, staying at this distance for almost all the simulation Fig. 3D. From these insights, it can be inferred that the absence of the expected disulfide bridge in PET30 introduces greater flexibility and variability in the Gly195-Val232 distance, potentially influencing the enzyme's catalytic efficiency in PET degradation. Since the presence of the PET molecule further increases the distance between the residues, it is reasonable to

assume that the amount of stress over the loop by the presence of the ligand affects the PET30 catalytic process. This structural distinction offers a plausible explanation for the observed differences in catalytic performance between PET30 and *IsPETase*. It indicates the importance of the disulfide bridge in modulating enzymatic activity in the context of PET degradation.

One notable structural feature is a conserved string of four Gly residues composing the initial segment of the helix $\alpha 4$ (Gly155-Gly156-Gly157-Gly158), also present in the *IsPETase*. Furthermore, PET30 has an additional four Gly-residues motif at the initial segment of the helix $\alpha 6$ (Gly238-Gly239-Gly240-Gly241). Given that Gly residues' lack of side-chain provides them with increased flexibility, they tend to decrease helix stability. This decrease in helix stability occurs because Gly residues are, in fact, so flexible that the entropy effect accentuates enough to drive the structural change from a defined secondary structure to a loop (Imai and Mitaku, 2005). Surprisingly, DSSP analysis reveals that (Gly)₄ $\alpha 4$ stays as a helix 100% of the time. Diversely, three out of 4 Gly residues in the helix $\alpha 6$ remain as helix for about 35% of the time, and the rest show coil behavior.

Another divergence arises when comparing the binding site of PET30 and *IsPETase*. While *IsPETase*'s binding motif involves Tyr87-Met161-Trp185 (Tyr-Met-Trp), PET30 substitutes two residues, adopting Phe80-Met154-Tyr178 (Phe-Met-Tyr) as its auxiliary residues. Intriguingly, a mutational study of PET30 has illuminated the critical role of specific residues in its catalytic function. Mutants PET30(Phe80Tyr) and PET30(Tyr178Trp), as well as a variant featuring both mutations, exhibited a loss of activity in degrading PET. These findings highlight the delicate interplay between the binding motif and catalytic activity

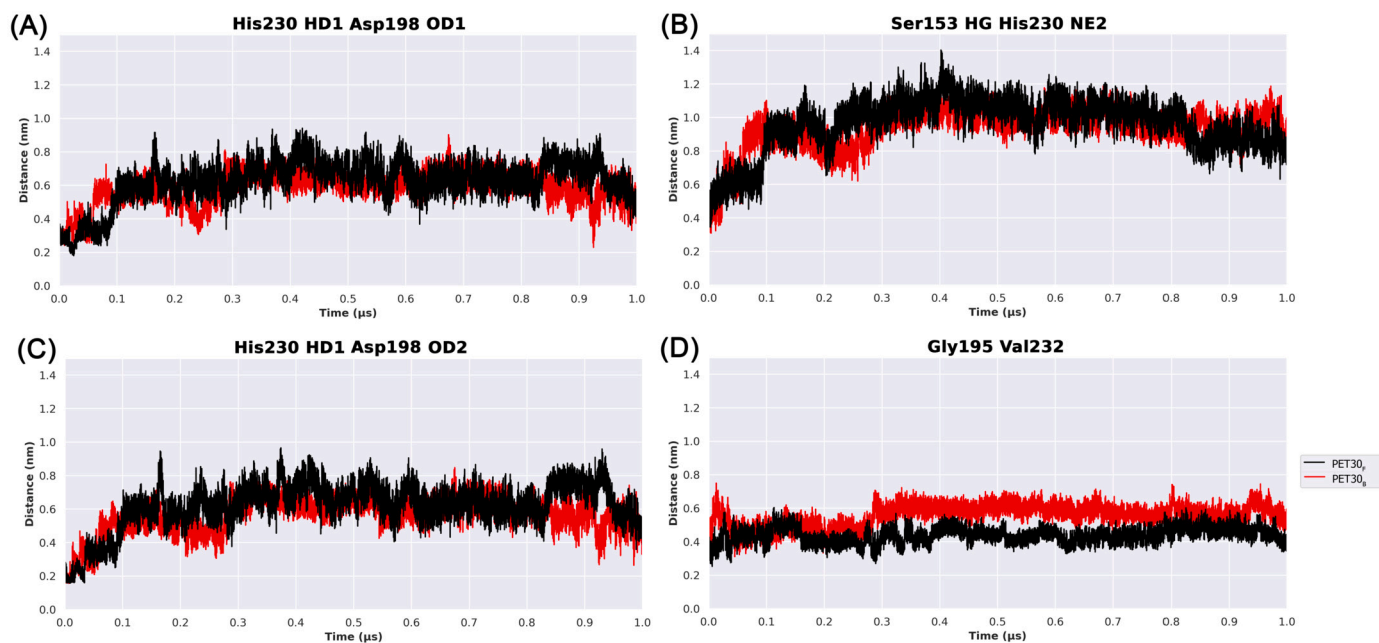


Fig. 3. Measurement of the distance between significant residues over time. The PET30_F represented in color black and PET30_B depicted in red A) Distance between hydrogen atom HD1 from His230 and the oxygen atom OD1 from Asp198. B) Distance between hydrogen atom HG from Ser153 and the nitrogen ϵ atom from His230. C) Distance between hydrogen atom HD1 from His230 and the oxygen atom OD2 from Asp198. D) Minimal distance between residues Gly195 and Val232, where the *IsPETase* structure has an extra disulfide bridge.

in PET-degrading enzymes, emphasizing the intricate relationship between sequence, structure, and function in these significant proteins. The role of the auxiliary residues in PET30 will be discussed in more depth later.

3.2. The halting of the catalytic triad: when it is time to hold their ground

As shown in Fig. 1C, the enzyme-substrate complex should have a specific residue coordination. The hydrogen from $N\delta$ of His230 pairs with the oxygen from the Asp198 residue; the hydrogen belonging to the hydroxyl group of Ser153 aligns with the $N\epsilon$ of His230 and; the oxygen from the hydroxyl group of Ser153 interacts with a carbon from the ester group of the substrate molecule. In this sense, we assessed the distance among these groups throughout the simulations.

In the presence of the PET molecule, there is a notable reduction in the distance between the hydrogen bonded to the nitrogen delta ($N\delta$) of His230 and the oxygens from Asp198, suggesting a coordinated interaction Fig. 3A,C. Additionally, the hydrogen from the Ser153 hydroxyl group consistently maintains closer proximity to the nitrogen epsilon ($N\epsilon$) of His230 in PET30_B compared to PET30_F, providing further evidence of coordination among catalytic residues Fig. 3B. Although the distance between Ser153 and the PET molecule remains relatively constant across replicas 3 and 4, their distances vary from the PET center of mass SFig.27. Examination of the dihedral distribution of Ser153 SFig.23 reveals a flipping behavior concurrent with shifts of the PET molecule within the binding pocket.

Furthermore, RMSD (Fig. 4A) and RMSF (Fig. 4E) demonstrate a slightly increased overall backbone position variation relative to the initial structure and flexibility for PET30_B. However, the catalytic residues situated in specific regions of the protein either do not change their degree of flexibility compared to PET30_F or even become less flexible in the presence of PET. Moreover, we measured the distance between the catalytic residues. This result is consistent with previous observations from *IsPETase*. Studies of *IsPETase* demonstrate the importance of certain regions becoming more flexible while retaining the rigidity of other regions to maintain catalytic efficiency, such as the flexibility of Ser214 and Trp185, demonstrated by Liu et al. (2022). They showed

that Ser214 provides a minor steric hindrance, giving more flexibility at the Trp185 site of *isPETase*, which is beneficial to the wobbling of the Trp185 site and stable binding to the PET aromatic ring. For PET30, the analogous residues by alignment are His206, respective to Ser214, and Tyr178, respective to Trp185. Zhang et al. (2022) tested the mutation Ser214His and observed that while it improved thermostability, it also decreased the catalytic efficiency, suggesting that this could be a potential mutation to improve PET30 efficiency. The implication of the interaction with Tyr178, one of the auxiliary residues, will be discussed next.

3.3. The role of the auxiliary residues: the sidekicks step into the spotlight

Our simulation reveals a significant feature of the auxiliary residues during the interaction between PET30 and PET. Δ RMSF (Fig. 4E) reveals that the catalytic triad residues lessen their flexibility, and the three auxiliary residues become more rigid - or at least keep the same level of flexibility of PET30_F - despite the slight overall shifting of RMSF towards higher flexibility. This observation suggests that these residues attain some level of coordination. To investigate this mechanism further, we observed the distances of Phe80-Met154, Phe80-Tyr178, and Met154-Tyr178 and their distance to the PET molecule.

Distinct differences between PET30_F and PET30_B emerge when considering simulations where the PET molecule remains tightly bound to the binding pocket and those where it detaches. In PET30_F replicas and replicas 1, 2, and 5 of PET30_B (where PET detaches briefly), the distance between Phe80 and Tyr178 exhibits considerable variation over time. In contrast, replicas 3 and 4 of PET30_B maintain a consistently close distance of approximately 6 Å throughout the entire simulation. Upon closer examination of PET30_B replicas 3 and 4 and their interaction with each auxiliary residue and PET, it becomes evident that Phe80 and Tyr178 maintain a more stable distance from PET than Met154. This observation might be because Phe80 and Tyr174 can interact with PET through π - π stacking.

Furthermore, DSSP analysis SFig.9 indicates that Phe80 and Tyr178 remain closely associated in the presence of PET despite adopting a coil conformation. This observation indicates the PET molecule's influence in coordinating these residues, as evidenced by their distinctive

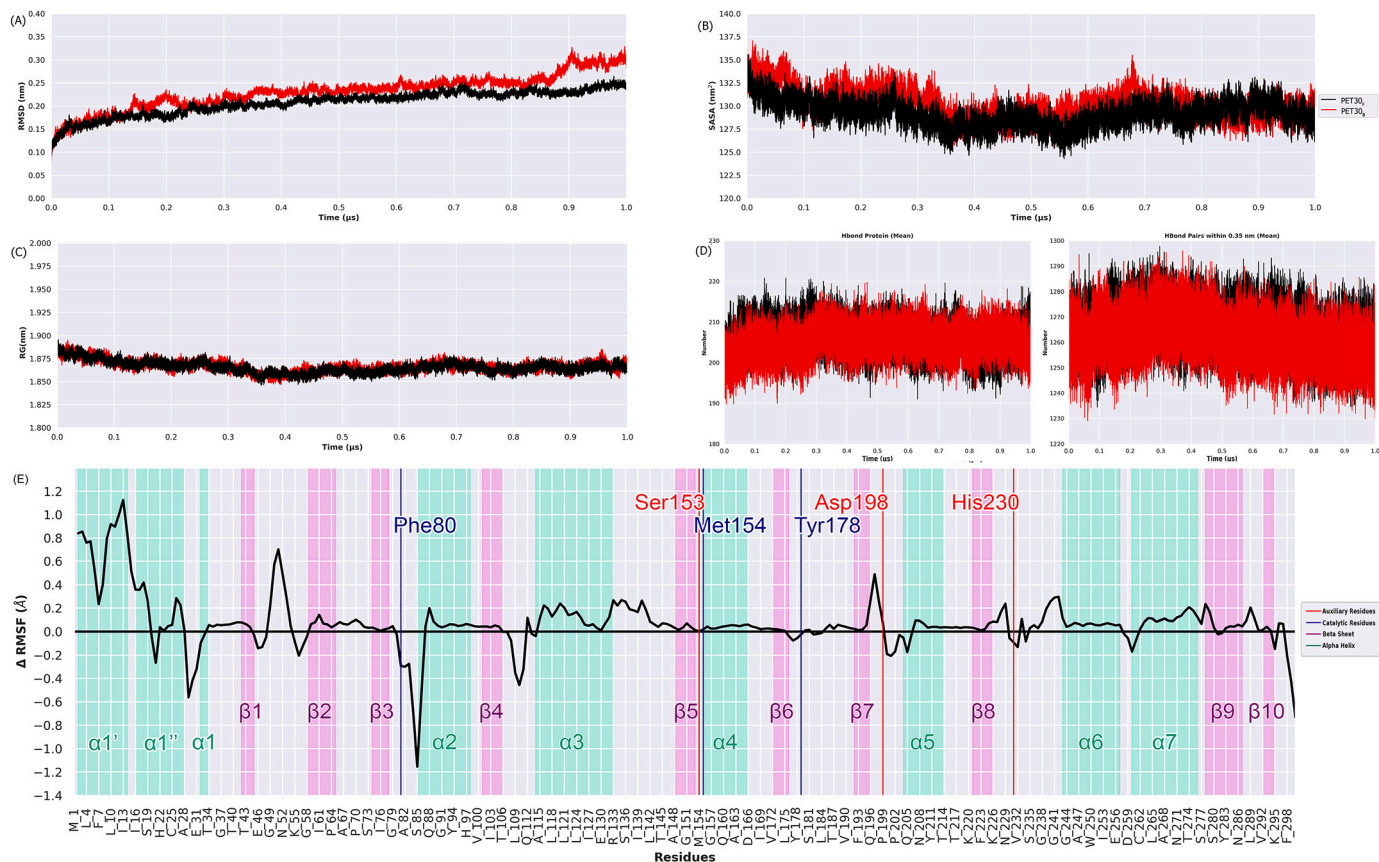


Fig. 4. MD trajectory analyses. The PET30_F is represented in black, and the PET30_B is depicted in red. Each graph characterizes the average result of the five replicas. A) RMSD result. B) SASA result. C) Rg result. D) HB results. On the left, the graph considers the distance of 0.35 nm and the angle of 30°; on the right, the graph considers only the distance of 0.35 nm. E) Δ RMSF result. Δ RMSF is calculated as RMSF PET30_B - RMSF PET30_F. Positive values indicate higher flexibility of the PET30_B whereas negative values reveal higher flexibility of PET30_F. The regions representing the β -strands are colored in cyan, and the regions indicating the α -helices are colored in violet. The red lines indicate the catalytic residues and the dark blue lines indicate the auxiliary residues.

behavior. Additionally, despite being in a coil conformation, Phe80 and Tyr178 tend to hold together when interacting with PET. This observation further underscores the coordinating effect of the PET molecule on these auxiliary residues.

3.4. Taking the wrong avenue: when the PET molecule gets lost around the protein

The initially available PET30 structure exhibited a catalytic pocket conformation unsuitable for binding, as demonstrated by incongruent results from molecular docking compared to literature expectations Tournier et al. (2020) (see Supplementary Materials). Then, ensemble docking was employed to generate PET30 structures more aligned with the anticipated binding conformation. Poses exhibiting characteristics such as an open pocket and proper alignment of catalytic and auxiliary residues were selectively chosen. Comparative analysis of various docking results utilizing different PET30 conformations revealed a more suitable outcome than the initial docking attempt with the native PDB structure. Notably, discrepancies in the alignment of catalytic residues, especially coordination of the catalytic residues, in the original structure were rectified in the final structure, demonstrating correct alignment and optimal distance. The selected docking result was then utilized in our MD simulations, exhibiting the PET molecule adopting an optimal conformation within the catalytic pocket. These simulations confirmed the efficacy of the refined approach in capturing the biologically relevant enzyme-substrate binding conformation within a short timeframe.

Our first concern was how long the PET molecule would stay in contact with the binding site SFig.27. Since our simulations reach the

microsecond scale, an unbinding event is expected. Generally, residence time varies from picoseconds to milliseconds (Huang and Caflisch, 2011), and the PET30 binding site is entirely external to the protein structure, composing a shallow pocket. From our simulations, we observed the unbinding of PET in 2 out of 5 replicas, which we kept to calculate the averages of each analysis. Replica 2 shows the unbinding occurring around 300 ns, where PET leaves the binding pocket, circles the protein, and lodges in a pocket close to the N- and C-termini junctions. Replica 5 shows the first unbinding event occurring around 270 ns, and the PET molecule relocates a few angstroms away from the binding pocket but returns to the binding pocket around 300 ns. Later, the PET leaves again, around 400 ns. Here, we note that close to the binding pocket, a helix, formed by residues 180-185, and an adjacent coil, consisting of residues 205-212, are arranged into a road-like pattern, where the PET molecule starts trailing. Most of these residues are polar, and only two are aromatic (His206 and His210); we notice that Tyr211 is aromatic, but it is the only residue in the helix that keeps interacting with the inside residues of the protein, never flipping to interact with the PET molecule. The PET molecule slowly crawls from the binding pocket until it starts interacting with the last residues of this sideways avenue. However, around 470 ns, it starts moving backward and stops at a position interacting with the initial residues from the road (180-182 from the coils and 205-212 from the helix) (Supplementary Material Movie-PET30B5). Replica 1 also shows an unbinding around 50 ns, but the PET molecules return to the binding pocket at 300 ns and stay there until the end of the simulation. Replicas 3 and 4 maintain the PET molecule tightly bound close to the catalytic site all the time.

3.5. Simulations aftermath: contrasting PET30_F and PET30_B dynamics

Next, we will highlight the main observations distinguishing PET30_F and PET30_B. RMSD analysis (Fig. 4A) revealed that PET30_B exhibits a slightly higher overall backbone position variation than PET30_F, particularly after 100 ns, reaching a significant difference of 0.5 nm at approximately 900 ns. This observation suggests that the presence of PET introduces a subtle yet cumulative effect on the structure dynamics of PET30.

Moreover, Δ RMSF analysis (Fig. 4E) indicate nuanced differences in the flexibility of PET30_F and PET30_B. While the overall Δ RMSF difference is minimal (approximately 0.1 nm), certain regions crucial for the catalytic mechanism exhibited significant variations. Notably, the catalytic triad residues (Ser153, Asp198, and His230) showed distinct flexibility patterns, indicating the influence of PET binding on their dynamics.

In the modeled segment (residues 1 to 27), PET30_B displayed higher flexibility, particularly around residue 21, showcasing a significant contrast of 1.3 nm compared to PET30_F. Interestingly, the auxiliary residue Phe80 region exhibited a marked decrease in flexibility in PET30_B, suggesting a potential role in ligand accommodation. Regions surrounding catalytic residues displayed consistent flexibility, emphasizing the intricate interplay between ligand binding and enzymatic function.

DSSP analysis unveils distinct secondary structure variations between PET30_F and PET30_B systems (see SFig.9). Specifically, in β -strand 3 (residues 219-228), the last four residues (225-228) exhibit fluctuating conformations between coil and β -sheet throughout the simulation. PET30_B maintains a more prolonged β -sheet conformation in this segment than PET30_F. Also, residues 229-233, including the catalytic residue His230, alternate between α -helix and coil conformations. PET30_B consistently favors the α -helix conformation, which is more extended than PET30_F in this region. Furthermore, DSSP analysis reveals a structural difference in residue 288, forming a β -turn between β -strands β 9 and β 10. In the presence of the ligand, this residue adopts a coil conformation exclusively, contrasting with PET30_F, where it sporadically assumes a β -sheet conformation. This observation aligns with the dRMSF results, indicating reduced flexibility in the absence of the ligand. Residues 226-228, forming a loop between β -strand β 8 and helix α 6, exhibit a β -strand conformation more frequently (25% of the time) in the presence of the PET molecule, compared to the free enzyme state (15% of the time). The flexibility analysis of residue 152, adjacent to the catalytic Ser153, shows a balanced distribution between helix, β -sheet, and coil conformations, consistent across both PET30_F and PET30_B. Notably, the helix α 2 (residues 83-96) displays dynamic variations over time, with residue 83 evenly splitting between helix and coil, residues 84-88 favoring helix (55% of the time), residues 89-94 consistently adopting a helix conformation, residue 95 displaying a 75% helix conformation, and residue 96 favoring a coil conformation (90% of the time).

Furthermore, PCA revealed substantial distinctions between the PET30_F and PET30_B systems Fig. 5A,B. While the initial positions of each replica were nearly identical, with minor differences arising during equilibration, a noticeable divergence in energy distribution became evident. Each replica portrayed a unique distribution, and our analyses depicted two distinct pieces of information: clusters formed by the trajectory of each replica and clusters formed by the density of points.

The PC1 vs PC2 plot for PET30_F displayed a more continuous landscape, suggesting that the enzyme fluctuates more freely among energy minima when unbound. In contrast, the PC1 vs PC2 plot for PET30_B exhibited a more distinctive cluster, with some clusters entirely isolated from others. These findings indicate that the enzyme adopts specific conformations during interaction with the PET molecule. A comparison of the density plots revealed that PET30_B had a higher density at specific points, while PET30_F exhibited lower density with more distributed points. Notably, points from replicas 2 and 5 in PET30_B remained closer to the initial position. Furthermore, looking into the

movies showing the principal movements captured in PCA of PET30_F and PET30_B (Supplementary material Movie-PCA-PET30_F and Movie-PET30_B), we observe that when the PET molecule is present, the catalytic residues Ser152 and Asp198 hold their position close together. At the same time, His230 moves, closing its distance to the other catalytic residues, indicating increased coordination among them. On the other hand, in the absence of PET, the residues Asp198 and His230 fluctuate more, suggesting a lower level of coordination compared to PET30_B.

In the context of the free energy profile generated from the probability distributions of PC1 and PC2, a significant difference emerged between PET30_F and PET30_B. The global minimum energy for PET30_F was -17.1 kJ/mol, whereas PET30_B reached -19.2 kJ/mol, indicating a difference of 2.1 kJ/mol. Furthermore, PET30_B exhibited four well-separated small clusters, each reaching approximately -15 kJ/mol. In contrast, PET30_F displayed a more scattered energy distribution, featuring one large cluster at -10 kJ/mol, four clusters within the larger one reaching -11 kJ/mol, and three smaller clusters reaching -14 kJ/mol, where one of them contains the global minimum cluster.

The outcomes obtained from the R_g analysis (Fig. 4C) demonstrate a consistent similarity between PET30_F and PET30_B, indicating virtually identical values. Both systems exhibit a slight compaction trend throughout the simulation. In the context of hydrogen bond analysis, it is observed that both PET30_F and PET30_B maintain a comparable number of internal hydrogen bonds (Fig. 4D), with these numbers exhibiting no significant variation throughout the simulation. SASA analysis (Fig. 4B) reveals a marginal increase in the overall surface area of the protein when interacting with the PET molecule. Notably, around the 800 ns mark, the SASA values for PET30_F and PET30_B converge, suggesting a comparable surface area in the simulation. These findings collectively suggest that the structural behavior variation between PET30_F and PET30_B is nuanced, and importantly, the presence of PET does not exert an abrasive impact on this enzyme.

4. Conclusions

PET30, identified as an esterase, exhibits activity in degrading PET, albeit with a lower catalytic efficiency than IsPETase. Nevertheless, our MD investigation reveals a favorable interaction between PET30 and PET. Furthermore, studying an enzyme with reduced catalytic efficiency provides a unique perspective on the evolution of plastic-degrading enzymes, shedding light on the ongoing process of adaptation toward PET degradation. The comparatively lower catalytic efficiency of PET30 signifies a stage in its evolutionary trajectory, suggesting that this enzyme is still fine-tuning its mechanisms for optimal PET degradation. This perspective contributes to our understanding of the dynamic nature of enzyme evolution in the context of plastic degradation, paving the way for future endeavors in designing more robust and efficient biocatalysts for addressing environmental challenges posed by synthetic polymers.

In conclusion, our findings demonstrate the intricate interplay between PET30 and PET, providing a molecular-level understanding of how the enzyme responds to and interacts with its substrate. These insights contribute valuable knowledge for the rational design of enzymes with enhanced PET-degrading capabilities, thereby advancing efforts in combating plastic pollution.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

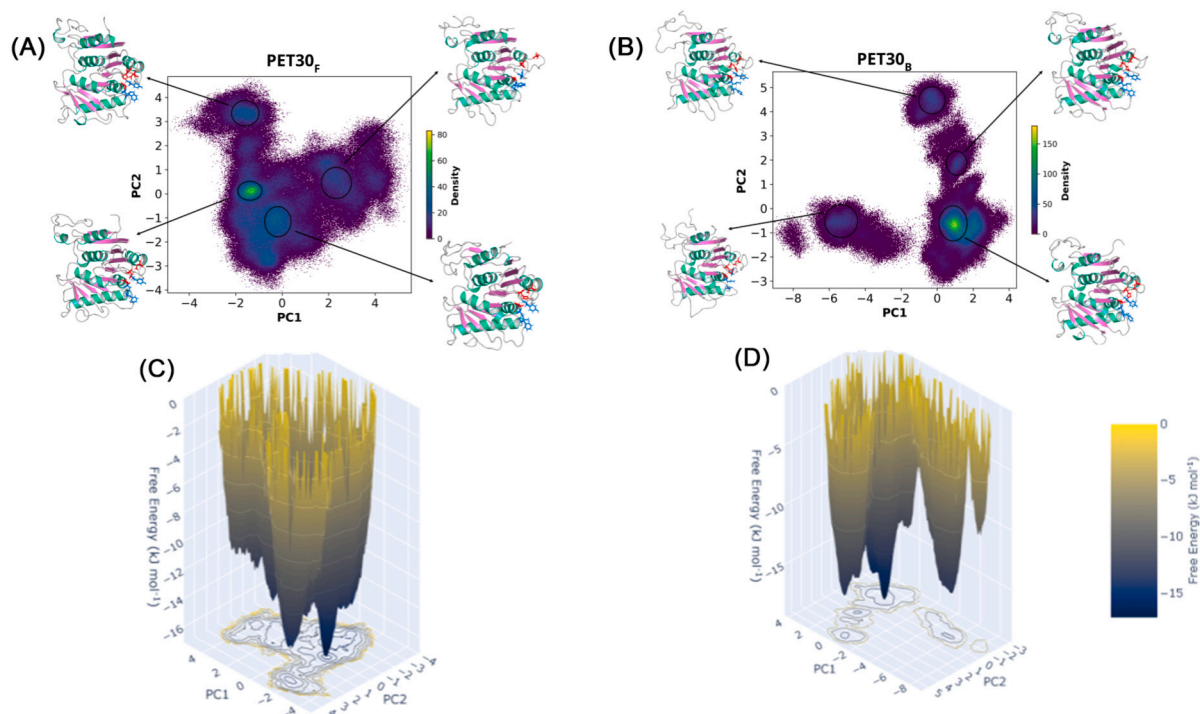


Fig. 5. PCA and energy profile. A) 2D plot of PCA from PET30_F, depicting PC1 in the x-axis and PC2 in the y-axis, colored by the density of points. Structures of the four most representative clusters are shown. B) 2D plot of PCA from PET30_B, depicting PC1 in the x-axis and PC2 in the y-axis, colored by the density of points. Structures of the four most representative clusters are shown. C) Free energy profile derived from PET30_F PCA. D) Free energy profile derived from PET30_B PCA.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS [19/2551-0001906-8], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq [314082/2021-2, 440279/2022-4 and 408154/2022-5], and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - [PROBRAL 88881.198766/2018-01]. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. This work was performed on the HoreKa supercomputer funded by the Ministry of Science, Research and the Arts Baden-Württemberg and by the Federal Ministry of Education and Research.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2024.100130>.

References

- Allouzi, M.M.A., Tang, D.Y.Y., Chew, K.W., Rinklebe, J., Bolan, N., Allouzi, S.M.A., Show, P.L., 2021. Micro (nano) plastic pollution: the ecological influence on soil-plant system and human health. *Sci. Total Environ.* 788, 147815.
- Austin, H.P., Allen, M.D., Donohoe, B.S., Rorrer, N.A., Kearns, F.L., Silveira, R.L., Pollard, B.C., Dominick, G., Duman, R., El Omari, K., et al., 2018. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E4350–E4357.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D., 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164–170.
- Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res.* 91, 174–182.
- Chen, K., Hu, Y., Dong, X., Sun, Y., 2021. Molecular insights into the enhanced performance of ekylated petase toward pet degradation. *ACS Catal.* 11, 7358–7370.
- Childers, M.C., Daggett, V., 2017. Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. *Mol. Syst. Des. Eng.* 2, 9–33.
- Colovos, C., Yeates, T.O., 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2, 1511–1519.
- Csizmadia, P., 1999. MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the world wide web. In: *Proc. of ECOSOC-3, the 3rd Int Electr Conf on Synthetic Organic Chem*, September 1–30, p. 367a369.
- Cui, Y., Chen, Y., Liu, X., Dong, S., Tian, Y., Qiao, Y., Mitra, R., Han, J., Li, C., Han, X., et al., 2021. Computational redesign of a petase for plastic biodegradation under ambient condition by the grape strategy. *ACS Catal.* 11, 1340–1350.
- Dodda, L.S., Cabeza de Vaca, I., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L., 2017a. Ligpargen web server: an automatic opsls-aa parameter generator for organic ligands. *Nucleic Acids Res.* 45, W331–W336.
- Dodda, L.S., Vilseck, J.Z., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L., 2017b. 1.14* cm1a-lbcc: localized bond-charge corrected cm1a charges for condensed-phase simulations. *J. Phys. Chem. B* 121, 3864–3870.
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F., Forli, S., 2021. Autodock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *J. Chem. Inf. Model.* 61, 3891–3898.
- Egmond, M.R., de Vlieg, J., 2000. Fusarium solani pisi cutinase. *Biochimie* 82, 1015–1021.
- Fecker, T., Galaz-Davison, P., Engelberger, F., Narui, Y., Sotomayor, M., Parra, L.P., Ramírez-Sarmiento, C.A., 2018. Active site flexibility as a hallmark for efficient pet degradation by I. Sakaiensis petase. *Biophys. J.* 114, 1302–1312.
- Han, X., Liu, W., Huang, J.W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T.P., Xu, L., Cheng, Y.S., Chen, C.C., Guo, R.T., 2017. Structural insight into catalytic mechanism of pet hydrolase. *Nat. Commun.* 8, 2106.
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E.E., 1996. Errors in protein structures. *Nature* 381, 272.
- Howard, S.A., McCarthy, R.R., 2023. Modulating biofilm can potentiate activity of novel plastic-degrading enzymes. *NPJ Biofilms Microbiomes* 9, 72.
- Huang, D., Caflisch, A., 2011. The free energy landscape of small molecule unbinding. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002002.
- Imai, K., Mitaku, S., 2005. Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins. *Biophysics* 1, 55–65.
- Joo, S., Cho, I.J., Seo, H., Son, H.F., Sagong, H.Y., Shin, T.J., Choi, S.Y., Lee, S.Y., Kim, K.J., 2018. Structural insight into molecular mechanism of poly (ethylene terephthalate) degradation. *Nat. Commun.* 9, 382.
- Jorgensen, W.L., Tirado-Rives, J., 2005. Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 6665–6670.
- Kim, D.E., Chivian, D., Baker, D., 2004. Protein structure prediction and analysis using the rosetta server. *Nucleic Acids Res.* 32, W526–W531.
- Knapp, B., Ospina, L., Deane, C.M., 2018. Avoiding false positive conclusions in molecular simulation: the importance of replicas. *J. Chem. Theory Comput.* 14, 6127–6138.

- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Lindahl, Abraham, Hess, van der Spoel, 2022. Gromacs 2021.5. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5850051>.
- Liu, Y., Liu, Z., Guo, Z., Yan, T., Jin, C., Wu, J., 2022. Enhancement of the degradation capacity of ispetase for pet plastic degradation by protein engineering. *Sci. Total Environ.* 834, 154947.
- Lüthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D., 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83–85.
- MacLeod, M., Arp, H.P.H., Tekman, M.B., Jahnke, A., 2021. The global threat from plastic pollution. *Science* 373, 61–65.
- Maity, D., Pal, D., 2022. MD DaVis: interactive data visualization of protein molecular dynamics. *Bioinformatics* 38, 3299–3301.
- Maurya, A., Bhattacharya, A., Khare, S.K., 2020. Enzymatic remediation of polyethylene terephthalate (pet)-based polymers for effective management of plastic wastes: an overview. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 602325.
- Pontius, J., Richelle, J., Wodak, S.J., 1996. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J. Mol. Biol.* 264, 121–136.
- Revel, M., Châtel, A., Mouneyrac, C., 2018. Micro (nano) plastics: a threat to human health? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 1, 17–23.
- Robertson, M.J., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L., 2015. Improved peptide and protein torsional energetics with the opls-aa force field. *J. Chem. Theory Comput.* 11, 3499–3509.
- Sanner, M.F., et al., 1999. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 17, 57–61.
- Sharma, B., Dangi, A.K., Shukla, P., 2018. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *J. Environ. Manag.* 210, 10–22.
- Son, H.F., Cho, I.J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H.Y., Choi, S.Y., Lee, S.Y., Kim, K.J., 2019. Rational protein engineering of thermo-stable petase from ideonella sakaiensis for highly efficient pet degradation. *ACS Catal.* 9, 3519–3526.
- Sun, M.a., Wang, Y., Zhang, Q., Xia, Y., Ge, W., Guo, D., 2017. Prediction of reversible disulfide based on features from local structural signatures. *BMC Genomics* 18, 1–10.
- Tournier, V., Topham, C., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M.L., Texier, H., Gavalda, S., et al., 2020. An engineered pet depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature* 580, 216–219.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461.
- Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., Verma, V., Keedy, D.A., Hintze, B.J., Chen, V.B., et al., 2018. Molprobity: more and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 27, 293–315.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, K., 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196–1199.
- Zhang, H., Perez-Garcia, P., Dierkes, R.F., Applegate, V., Schumacher, J., Chibani, C.M., Sternagel, S., Preuss, L., Weigert, S., Schmeisser, C., et al., 2022. The bacteroidetes *aequorivita* sp. and *kaistella jeonii* produce promiscuous esterases with pet-hydrolyzing activity. *Front. Microbiol.* 12, 803896.