

ANDRÉ RICHARD PRAUSE

**“DESENHO DE UMA ENZIMA
ÁCIDO GRAXO DESCARBOXILASE
PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ALCENOS”**

**CAMPINAS
2013**

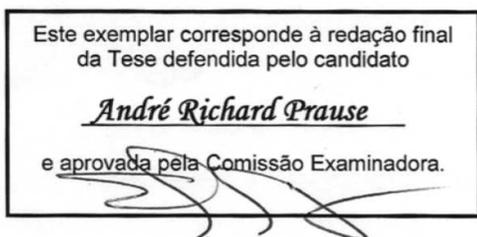
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANDRÉ RICHARD PRAUSE

“DESENHO DE UMA ENZIMA
ÁCIDO GRAXO DESCARBOXILASE
PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ALCENOS”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor, em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P891d Prause, André Richard, 1984-
Desenho de uma enzima ácido graxo descarboxilase para a produção enzimática de alcenos / André Richard Prause. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas - Engenharia genética. 2. Evolução molecular direcionada. 3. Ensaio de triagem em larga escala. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Design of a fatty acid decarboxylase for the enzymatic production of alkenes

Palavras-chave em inglês:

Proteins - Genetic engineering

Directed molecular evolution

High-throughput screening assays

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Anderson Ferreira da Cunha

Adriano Defini Andricopulo

Claudio Chrysostomo Werneck

Jörg Kobarg

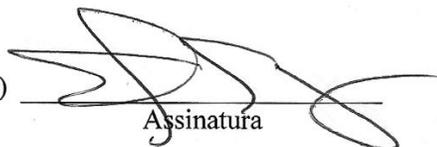
Data de defesa: 10-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 10 de outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha



Assinatura

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo



Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck



Assinatura

Dr. Jörg Kobarg



Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva

Assinatura

Resumo

Com o aumento da busca por novas fontes renováveis para a substituição do petróleo fóssil como substrato de derivados petroquímicos, as indústrias de plásticos, atualmente um dos ramos mais dependentes da acessibilidade do petróleo, já alcançaram um nível alto de sustentabilidade em linhas de polímeros verdes. Porém, rotas verdes para a obtenção do produto final ainda não foram implantadas industrialmente, sendo que somente precursores dos monômeros desejados são produzidos. A partir desses precursores, o processo é continuado convencionalmente através de operações químicas até a obtenção do monômero.

O desenvolvimento de uma rota enzimática para esses monômeros pode ser uma alternativa para os processos praticados na indústria. Enzimas são amplamente utilizadas para a bio-conversão industrial de compostos químicos e a busca por enzimas capazes de catalisar novas reações tem se intensificado, criando uma demanda maior por processos automatizados com aplicação de protocolos de rastreamento de alto desempenho.

Para a realização da produção enzimática de alcenos de cadeia curta, uma enzima nativa, apresentando um mecanismo catalítico similar à reação desejada, foi modificada pela aplicação do conceito de “desenho de proteínas”, que reúne técnicas de diversificação, recombinação, clonagem, expressão heteróloga e rastreamento, utilizando a “enzima molde” como ponto de partida.

A enzima P450_{BSβ}, selecionada por apresentar os melhores pré-requisitos para modificações estruturais, foi submetida ao “desenho de proteínas”, gerando 5.271 versões mutantes. O rastreamento de alto desempenho automatizado dessas proteínas alteradas, utilizando uma plataforma robótica, possibilitou a obtenção de uma enzima que apresenta a nova ação catalítica da conversão de 100 μM de ácido octanóico para 2,6 μM de 1-hepteno.

Essa nova enzima abre o caminho para a produção industrial de “bio-alcenos” em micro-organismos, criando um sistema de fermentação que poderia sustentar uma rota verde para os monômeros necessários para a produção de plásticos.

Abstract

With the increased search for renewable resources for substituting fossil petroleum as the raw material for petrochemical products, the plastics industry, currently being one of the branches with the highest dependency on petroleum availability, already reached a high level of sustainability in their green polymer lines. Still, green routes producing the final product have not been implemented industrially and only precursors of the desired are being produced. Using these precursors, the process is continued conventionally, using chemical operations for the production of the monomers.

The development of an enzymatic route toward these monomers could be an alternative for current industrial processes. Enzymes are widely used in industrial bioconversion of chemicals and the search for enzymes with the potential of catalyzing new reactions has intensified, creating a higher demand for automatized processes for the application of high-throughput screening protocols.

In order to realize the enzymatic production of short-chained alkenes, a native enzyme, presenting a catalytic mechanism similar to the target reaction, was modified, applying the concept of “protein design”, which unites diversification, recombination, cloning, heterologous expression and screening techniques, utilizing the “template enzyme” as a starting point.

The enzyme P450_{BSβ}, selected for possessing the best prerequisites for structural modifications, was submitted to “protein design”, creating 5,271 mutant versions. Automatized high-throughput screening of these altered proteins, utilizing a liquid handling platform, enabled the discovery of an enzyme, which presents a new catalytic action: the conversion of 100 μM butyric acid to 2.6 μM 1-heptene. This new enzyme opens the way for the industrial production of “bio-alkenes” in microorganisms, creating a fermentation system, which would be able to sustain a green route toward the necessary monomers for the production of plastics.

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Sumário.....	xi
Agradecimentos	xvii
Lista de figuras.....	xix
Lista de tabelas.....	xxiii
Lista de abreviações	xxv
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. Alcenos	5
2.2. Plástico verde.....	6
2.3. Enzimas produtoras de alceno.....	8
2.4. Desenho de proteínas.....	11
2.4.1. Evolução dirigida	12
2.4.2. Desenho racional.....	13
2.4.3. Rastreamento e seleção de clones positivos.....	15
3. Objetivos.....	17
4. Materiais e métodos.....	19
4.1. Identificação do gene alvo.....	19
4.2. Meios de cultura.....	20
Luria-Bertani (LB)	20
TSBYE	21
Meio mineral M9	21
4.3. Plasmídeos	22
pGEM®-T Easy.....	22
pET-28a(+)	23
pET-22b(+)	24
4.4. PCR de colônia de bactérias.....	25
4.5. Extração de DNA genômico de bactérias.....	26
4.6. Preparo de bactérias eletrocompetentes.....	26
4.7. Transformação de bactérias eletrocompetentes	27
4.8. Isolamento de genes	27

4.9.	Construção de plasmídeos.....	28
4.9.1.	pAP1 – pAP4	28
4.9.2.	pAP5 – pAP8	28
4.9.3.	pAP9.....	30
4.9.4.	pAP10 – pAP16	30
4.9.5.	pAP17.....	30
4.10.	Extração de plasmídeo de bactérias (Miniprep).....	31
4.11.	Expressão heteróloga.....	32
4.11.1.	Determinação das condições ótimas.....	32
4.11.2.	Expressão em escala pequena	33
4.11.3.	Purificação.....	33
4.11.4.	Extração de proteínas da fração periplasmática	34
4.11.5.	Quantificação	35
4.12.	Ensaio de atividade enzimática.....	35
4.13.	Desenho de proteínas.....	37
4.13.1.	epPCR.....	37
4.13.2.	Desenho racional	37
4.14.	Rastreamento e seleção de clones positivos	38
4.15.	Automatização robótica dos ensaios de desenho de proteínas	39
4.15.1.	Sistema de rastreamento de alto desempenho	39
4.15.2.	Montagem da biblioteca de clones	44
4.15.3.	Expressão heteróloga de proteínas diversificadas	44
4.15.4.	Rastreamento de clones positivos.....	46
4.15.5.	Seleção de mutantes candidatos	47
4.15.6.	Agendamento do processo HTS	47
4.16.	Métodos analíticos	48
4.16.1.	GC-MS	48
4.16.2.	HPLC.....	49
4.17.	Sequenciamento	49
5.	Resultados e discussão	51
5.1.	Identificação do gene alvo.....	51
5.2.	Isolamento dos genes	54
5.3.	Construção de plasmídeos.....	56
5.3.1.	pAP1 – pAP4	56

5.3.2.	pAP5 – pAP8	57
5.3.3.	pAP9.....	58
5.3.4.	pAP10 – pAP16	59
5.3.5.	pAP17.....	59
5.4.	Expressão heteróloga	60
5.4.1.	Determinação das condições ótimas	60
5.4.2.	Expressão em escala pequena.....	61
5.4.3.	Purificação	62
5.4.4.	Quantificação.....	64
5.4.5.	Secreção	65
5.5.	Ensaio de atividade enzimática das descarboxilases nativas	66
5.6.	Método de detecção de atividade de ácido graxo descarboxilase	70
5.7.	Desenho de proteínas	74
5.7.1.	Evolução dirigida	74
5.7.2.	Desenho racional.....	76
5.8.	Automatização robótica dos ensaios de desenho de proteínas	79
5.8.1.	Montagem da biblioteca de clones	80
5.8.2.	Expressão heteróloga de proteínas diversificadas	80
5.8.3.	Rastreamento de mutantes de desempenho positivo	84
5.9.	Análise das proteínas diversificadas de desempenho positivo	84
5.10.	Análise das mutações resultando no gene da ácido octanóico descarboxilase	88
6.	Conclusões	93
7.	Referências bibliográficas.....	97
8.	Anexo – Declaração de autorização CIBio	101

Dedico este trabalho aos meus pais Siegfried e Maria,
minha irmã Christiane e minha noiva Aline,
pelo amor e apoio.

“I may never find all the answers

I may never understand why

I may never prove

What I know to be true

But I know that I still have to try”

John Petrucci

Agradecimentos

Aos meus pais Siegfried e Maria, pela educação, o amor e apoio incondicional nas minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gonçalo pela grande oportunidade, a confiança depositada e as discussões valiosas.

Aos amigos do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE), pelos conselhos, as conversas, pela ajuda no dia a dia e os momentos de descontração.

A toda a equipe de apoio do LGE, Eliane, Sílvia, Mariana, Welbe e Ernestina, pelo apoio nos mais diversos assuntos ao longo do meu trabalho.

A todos os membros de minha qualificação e banca, pelas sugestões e contribuições neste trabalho.

Ao Dr. Roberto pelas discussões e o apoio estrutural no CTBE. À Rita e ao William, pelo apoio e os ensinamentos no uso dos equipamentos CG/MS.

À minha irmã Christiane, pelo carinho e apoio, apesar da distancia.

À minha noiva Aline, que sempre esteve ao meu lado, pelas palavras de motivação, apoio e carinho.

À Hamilton Robotics pela confiança e o apoio.

À BRASKEM, pelo apoio financeiro; ao diretor de Competitividade e Inovação da Divisão de Polímeros da Braskem, Antônio Morschbacker, pelo apoio a este trabalho. Ao Iuri, Felipe e à Johana pelos conselhos e apoio.

À FAPESP pelo apoio financeiro em conjunto com a BRASKEM.

Lista de figuras

Figura 1: Etapas de produção convencional de eteno a partir de petróleo fóssil. ...	7
Figura 2: Etapas de produção de “eteno verde”, como a realizada pela empresa Braskem (BRASKEM, 2011).	7
Figura 3: Mecanismo de ação proposto das enzimas ácido graxo descarboxilases (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011).	8
Figura 4: Via fermentativa de glicose para o ácido butírico (butirato) em Clostridia	9
Figura 5: Esquema simplificado da mudança de afinidade da enzima ácido graxo descarboxilase durante o processo de desenho de proteínas.	10
Figura 6: Ilustração do conceito de desenho de proteínas semirracionais (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008).	11
Figura 7: Produção enzimática de três compostos a partir de ácido hexadecanóico por descarboxilação	15
Figura 8: Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy (Fonte: Promega, Cat. A1380)	22
Figura 9: Mapa do plasmídeo pET-28a(+) (Fonte: Novagen, Cat. 69864-3)	23
Figura 10: Mapa do plasmídeo pET-22b(+) (Fonte: Novagen, Cat. 69744-3)	24
Figura 11: Bloco de ação “aspire” e seus parâmetros no software “Hamilton Venus Two”.	40
Figura 12: O <i>deck</i> do Microlab STARlet.	41
Figura 13: Os oito canais de pipetagem do Microlab STARlet, sem ponteiras.	42
Figura 14: Vista frontal da estufa Cytomat com a porta aberta.	43
Figura 15: Visualização de um agendamento de quatro processos em paralelo, no módulo “Scheduler”.	48
Figura 16: Sobreposição de resultados positivos da análise Fuzzpro.	53
Figura 17: Gel de agarose com amostras de PCR gradiente	55
Figura 18: Confirmação de insertos após transformação de pAP1 a pAP4 em <i>E. coli</i> por Miniprep e PCR.	56
Figura 19: Confirmação de insertos após transformação de pAP5 a pAP8 em <i>E. coli</i> , extração por Miniprep, seguida de PCR.	57
Figura 20: Confirmação do inserto após transformação de pAP9 em <i>E. coli</i> , extração por Miniprep, seguida de PCR.	58

Figura 21: Resultado da expressão heteróloga da proteína B a 30 °C na cepa de expressão <i>E. coli</i> BL21 Rosetta™ 2.....	60
Figura 22: Proteínas A, B, C e D expressas em <i>E. coli</i> BL21 Rosetta™ 2 após 5 h de indução a 30 °C, com 0,1 mM IPTG.....	61
Figura 23: Proteínas A, B, C e D expressas em <i>E. coli</i> BL21 Rosetta™ 2 após 4 h de indução a 30 °C com 0,1 mM IPTG e 27 mg/l FeCl ₃	62
Figura 24: Cromatogramas da purificação das descarboxilases nativas no sistema ÄKTA.....	63
Figura 25: Resultado da purificação de proteínas A – D por afinidade (ÄKTA purifier).	64
Figura 26: Confirmação da expressão secretada da enzima descarboxilase.	65
Figura 27: Produção enzimática de 1-pentadeceno a partir de 100 µM ácido hexadecanóico, em 30 min ea 25 °C, pelas ácido graxo descarboxilases A – D. .	67
Figura 28: Atividades específicas das enzimas ácido graxo descarboxilases A – D.	68
Figura 29: Concentrações residuais do substrato ácido hexadecanóico após ensaios enzimáticos com as enzimas ácido graxo descarboxilases A – D	69
Figura 30: Análise comparativa das concentrações residuais de ácido butírico, após ensaios enzimáticos com as proteínas A – D	70
Figura 31: Absorção em luz UV 190 nm de ensaios enzimáticos.....	71
Figura 32: Relação entre concentração de peróxido de hidrogênio e absorbância 405 nm.	72
Figura 33: Bolsa de ligação de substrato na enzima P450 _{BSβ} (LEE et al., 2003). .	74
Figura 34: Mapa de mutações aleatória introduzidas por epPCR.	76
Figura 35: Pontos de interesse para o desenho racional da enzima P450 _{BSβ} (LEE et al., 2003).	77
Figura 36: Predição PSIPRED (JONES, 1999) da estrutura secundária da proteína B comparada com a mutante F173Y.....	79
Figura 37: Organização das amostras para ensaios HTS em uma placa de microtitulação de 96 poços.....	80
Figura 38: Processamento de dados do HTS.....	85

Figura 39: Cromatogramas GC-MS confirmando a produção de 2,6 μ M 1-hepteno a partir de 100 μ M de ácido octanóico pela enzima “13.C11”.	86
Figura 40: Alinhamento (MUSCLE, oito iterações) da sequência nucleotídica da ácido octanóico descarboxilase (primeira linha) com a sequência nucleotídica da ácido graxo descarboxilase original (segunda linha).	89
Figura 41: Alinhamento (MUSCLE, oito iterações) da tradução da sequência da enzima ácido octanóico descarboxilase (primeira linha) com a sequência proteica da enzima ácido graxo descarboxilase original (segunda linha).	90
Figura 42: Posicionamento estrutural da metionina 400 (em vermelho) na bolsa de ligação do substrato ácido hexadecanóico (PAL, em verde).	91
Figura 43: Sumário esquematizado dos resultados obtidos durante o rastreamento das bibliotecas de ácido graxo descarboxilases diversificadas.	94
Figura 44: A nova enzima desenhada, obtida como resultado principal dessa tese, mostra a propriedade de conversão de ácido octanóico, um composto de oito carbonos.	95

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição da solução de elementos traço (100x).....	21
Tabela 2: Reação de PCR de colônia de <i>E. coli</i>	25
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação e clonagem (pET28a(+)) dos genes correspondentes.....	29
Tabela 4: Protocolo da reação de epPCR à esquerda e seu programa de termociclagem à direita	37
Tabela 5: Mutações direcionadas planejadas e <i>primers</i> correspondentes.....	38
Tabela 6: Protocolo da reação de Phusion PCR à esquerda e seu programa de termociclagem à direita	38
Tabela 7: Precisão de pipetagem, relatada pelo fabricante do STARlet	43
Tabela 8: Protocolo da reação de PCR para sequenciamento Sanger à esquerda e seu programa de termociclagem à direita	49
Tabela 9: Genes candidatos para o desenho de uma descarboxilase produtora de alcenos de cadeia curta.	53
Tabela 10: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes correspondentes. Em verde a cauda pré-adaptadora, vermelho os sítios de restrição e preto a parte complementar ao gene. A T_m foi determinada em ensaios de PCR de gradiente.	54
Tabela 11: Mutações direcionadas planejadas e <i>primers</i> correspondentes.....	59
Tabela 12: Aumento de solubilidade de p450 descarboxilases pela expressão em <i>E. coli</i> BL21 Rosetta™ 2	62
Tabela 13: Quantificação de proteínas por método Bradford a 595 nm.	65
Tabela 14: Relação entre concentrações de MgCl ₂ e MnCl ₂ e número de mutações não-silenciosas inseridas no gene <i>CYP152A1</i>	75
Tabela 15: Características do aminoácido nativo fenilalanina (F) e os seus substitutos histidina (H), triptofano (W) e tirosina (Y).	78
Tabela 16: Atividades enzimáticas de OleT (enzima do gene <i>orf880</i>) utilizando cinco ácidos graxos de 22 a 14 carbonos como substrato (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009).	87

Tabela 17: Análise comparativa das propriedades dos aminoácidos metionina e leucina (CHOTHIA, 1976; KYTE; DOOLITTLE, 1982; WADE, 2009; ZAMYATNIN, 1972)..... 91

Lista de abreviações

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
cLLD	Detecção de nível de líquido por condutividade
CO-RE	<i>Compressed O-Ring Expansion</i> , Expansão de o-ring comprimido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
epPCR	<i>Error-prone PCR</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
HMM	<i>Hidden Markov model</i> , modelo Markov escondido
HPI	Índice de hidrofobicidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidase de raiz forte
HTS	<i>High-throughput screening</i> , rastreamento de alto desempenho
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
iSWAP	<i>internal Swivel Arm Plate Handler</i> , braço interno giratório de manuseio de placas
LB	Luria-Bertani
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OD	Densidade ótica
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pLLD	Detecção de nível de líquido por pressão
PP	Polipropileno
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TSBYE	<i>Tryptic soy broth yeast extract</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

1. Introdução

Atualmente, enzimas nativas são utilizadas em vários ramos industriais, como na fermentação alcoólica, em detergentes ou na produção de couro, onde atuam como proteínas catalizadoras que aceleram a transformação de um composto para um produto através da redução da energia de ativação de uma determinada reação específica (CHERRY, 2003; STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008)

O aumento da importância de produção de compostos químicos a partir de fontes renováveis por ação de enzimas livres ou fermentação microbiana é relacionado aos benefícios em termos de sustentabilidade e qualidade ambiental, ligados ao processo biotecnológico. O caso mais estudado e aplicado é a fermentação alcoólica, na qual a sacarose de cana-de-açúcar é consumida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e convertida em etanol (RINCONES et al., 2009).

Enzimas livres utilizadas em processos industriais envolvem, por exemplo, a α -amilase, na indústria de panificação e a pectina metil esterase, para o clareamento de suco. Em 2009, o mercado de enzimas industriais alcançou o patamar de cinco bilhões de dólares americanos (SANCHEZ; DEMAIN, 2011).

Por outro lado, o fato de enzimas nativas serem um produto da evolução natural, surgindo e variando conforme a necessidade apresentada pelos organismos hospedeiros, limita a disponibilidade de reações que poderão ser catalisadas por proteínas oferecidas pela natureza (HIBBERT; DALBY, 2005). Sendo assim, a evolução natural, responsável pelo desenvolvimento das características enzimáticas apresentadas aos processos industriais mencionados, teria que ser substituída por uma evolução dirigida para promover a produção de outros compostos não naturais (RINCONES et al., 2009).

A produção biotecnológica de monômeros de origem fóssil tem sido foco de investigação para a utilização na síntese de polímeros (LEE et al., 2004). Com esse intuito, já são realizadas conversões enzimáticas com enzimas resultantes de evolução dirigida e fermentações com micro-organismos geneticamente modificados por engenharia metabólica (RINCONES et al., 2009).

Até os dias de hoje, somente precursores de monômeros petroquímicos foram produzidos, tais como ácido propiônico, propanol, 1,2-propanodiol, ácido láctico, ácido butírico, ácido acrílico, isopropanol e glicerol (LEE et al., 2004). Estes precursores podem ser convertidos quimicamente em, por exemplo, propeno.

A produção de polipropileno (PP) atingiu 36,5 milhões de toneladas em 2009 e um crescimento anual de 4,6% é estimado até o ano 2020, podendo chegar a uma produção de 59,6 milhões de toneladas de PP neste ano. A capacidade global de produção de PP chegará a 62 milhões de toneladas até 2019, com maior aumento na região asiática. Seguindo o crescimento atual até 2019, é previsto um mercado com receita de 145 bilhões de dólares americanos (CERESANA, 2012).

Para a produção enzimática de alcenos de cadeia curta, hoje em dia derivados da indústria petroquímica, será necessário aplicar uma variedade de técnicas de biologia molecular para modificar a capacidade de um micro-organismo de utilizar uma fonte de nutrientes renovável, transformando-a em compostos que poderão ser utilizados na indústria de plásticos ou biocombustíveis.

Este objetivo pode ser atingido pelo desenho de proteínas, que envolve técnicas de diversificação, recombinação, clonagem, expressão heteróloga e rastreamento, utilizando uma “enzima molde” como ponto de partida. Essa enzima possui um mecanismo de ação e um substrato similar ao da reação alvo. Depois da aplicação das técnicas mencionadas, a nova enzima deverá ter um produto final de fermentação do micro-organismo no qual o gene que codifica a enzima será inserido como substrato, para não impedir funções essenciais para a sobrevivência da célula. O princípio do desenho de proteínas abrange duas

técnicas principais: evolução dirigida e desenho racional (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008).

A evolução dirigida utiliza mutações aleatórias que são inseridas no gene codificante por técnicas de PCR, para gerar uma diversidade artificial pelo aumento da taxa de mutação durante a replicação do gene alvo (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008). Já no desenho racional, as alterações na sequência da proteína serão introduzidas de maneira direcionada. Informações de literatura, bioinformática e comparação de sequências serão utilizadas para determinar o tipo de mudança que será inserido no gene da enzima alvo. Subsequentemente, as alterações são avaliadas em testes de expressão heteróloga e ensaios de atividade enzimática.

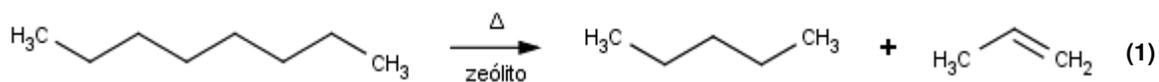
Interlaçando a evolução dirigida com o desenho racional, a enzima de melhor desempenho será capaz de cumprir um papel não existente na natureza. Essa nova enzima tornaria o micro-organismo alvo em uma fábrica de um produto químico que pudesse ser alimentado com uma fonte de nutrição renovável como, por exemplo, o caldo de cana. Podendo gerar derivados petroquímicos a partir dessas fontes, será possível criar independência do petróleo, além de produzi-los com um impacto ambiental menor (RINCONES et al., 2009).

2. Revisão bibliográfica

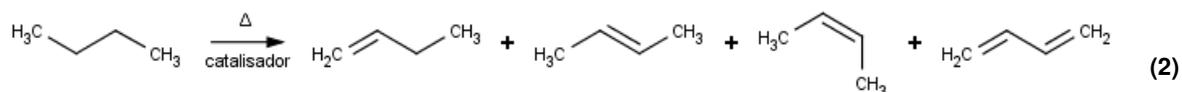
2.1. Alcenos

Alcenos, também conhecidos como olefinas, são hidrocarbonetos alifáticos com no mínimo uma ligação dupla entre dois átomos de carbono. Além do petróleo, alcenos também estão presentes em uma variedade de plantas e animais e são produtos de grande importância na indústria mundial. Pelas características das duplas ligações, os alcenos são ricos em energia e convertidos em outros compostos com facilidade. Eles representam a base de uma grande quantidade de polímeros, drogas, pesticidas e outros compostos químicos com alto valor agregado. O etileno, um tipo de alceno, é o composto orgânico mais produzido pela indústria e é principalmente utilizado para a produção do plástico polietileno (WADE, 2009).

A síntese de alcenos é realizada por craqueamento de hidrocarbonetos, utilizando gás natural condensado ou nafta como matéria-prima. Durante o craqueamento, alcanos são quebrados em alcenos e alcanos de peso molecular menor, através de catalise em zeólitos (Equação (1)). O processo demanda altas temperaturas (450 a 750 °C) e pressão até 7 MPa para se alcançar o resultado desejado.



Outra forma de síntese de alcenos é a reforma catalítica, que leva a perda de um hidrogênio do alcano sobre temperaturas altas de aproximadamente 500 °C e pressões moderadas de 1 a 2,5 Mpa. Este método resulta na formação de alceno com a mesma quantidade de carbonos do alcano original (Equação (2)).



2.2. Plástico verde

Atualmente, os plásticos mais utilizados pela indústria global são os polialcenos, representando 90% de todos os plásticos fabricados (STEVENS, 2003). Possuindo um esqueleto exclusivamente composto de ligações entre carbonos, os polialcenos apresentam uma durabilidade elevada comparada a polímeros naturais, como celulose, amido, proteínas e ácidos nucleicos. Os esqueletos dos polímeros naturais podem ser heteroatômicos, contendo outros átomos além do carbono, ou conter ligações múltiplas, prejudicando a estabilidade contra degradação oxidativa (STEVENS, 2003).

Fontes renováveis para a produção de derivados de petróleo passaram a ser foco da indústria petroquímica, que enfrenta custos crescentes e virtualmente possui como única matéria-prima o petróleo. Adicionalmente, os avanços na conscientização ambiental resultaram em exigências para uma diminuição nas emissões de dióxido de carbono, dificultando ainda mais a manutenção da produção da indústria petroquímica (RINCONES et al., 2009).

Auxiliada pelo progresso nas diferentes áreas de pesquisa, especialmente em biotecnologia, a indústria busca soluções envolvendo a fermentação de compostos a partir de fontes renováveis, sendo esses os mesmos monômeros que podem ser obtidos por origem fóssil.

O caso de sucesso mais conhecido da realização desse conceito é a empresa petroquímica brasileira Braskem, que adquiriu a certificação de um plástico 100% verde, o polietileno verde, em 2007 (BRASKEM, 2011). Nesse processo, a utilização de etanol de cana como substrato consegue capturar 2,5 toneladas de dióxido de carbono por tonelada de polietileno produzido, sendo que a mesma quantidade de dióxido de carbono é emitida no caso da rota de produção a partir de combustíveis fósseis.

Em contraste à produção convencional de alcenos que demanda altas quantidades de energia em forma de aquecimento e pressão (Figura 1 e item 2.1), o eteno verde é obtido durante um processo que utiliza condições amenas (BRASKEM, 2011). O mosto da cana-de-açúcar é submetido à fermentação alcoólica, utilizando leveduras industriais e em seguida destilada para a separação de etanol (AMORIM et al., 2011). Aplicando temperaturas em torno de 450 °C, o etanol é desidratado na fase final, convertendo o mesmo para o eteno (Figura 2) (BRASKEM, 2011).



Figura 1: Etapas de produção convencional de eteno a partir de petróleo fóssil. Todas as operações unitárias a partir da extração do petróleo até a obtenção do eteno demandam uma alta quantidade de energia (WADE, 2009).



Figura 2: Etapas de produção de "eteno verde", como a realizada pela empresa Braskem (BRASKEM, 2011). Condições de processo amenas contribuem para a sustentabilidade do eteno verde.

Com uma produção de 200 mil toneladas de polietileno verde por ano, a Braskem se tornou a maior produtora de biopolímeros do mundo (BRASKEM, 2011). Seguindo este exemplo, outras empresas estão entrando no mercado de produção de plástico verde, buscando rotas alternativas baseadas em matéria-prima renovável. Esse desenvolvimento aponta para um futuro promissor, com

capacidade de tornar a indústria de plástico um meio de captação de dióxido de carbono, ao invés de fonte de poluição.

2.3. Enzimas produtoras de alceno

A patente WO/2009/085,278 (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009) descreve a produção de alcenos através da ação de ácido graxo descarboxilases, nativos em micro-organismos. Utilizando o co-substrato peróxido de hidrogênio, essas enzimas convertem ácidos graxos de cadeia par entre doze e vinte carbonos em um alceno, liberando uma molécula de dióxido de carbono (RUDE et al., 2011), como ilustrado na Figura 3.

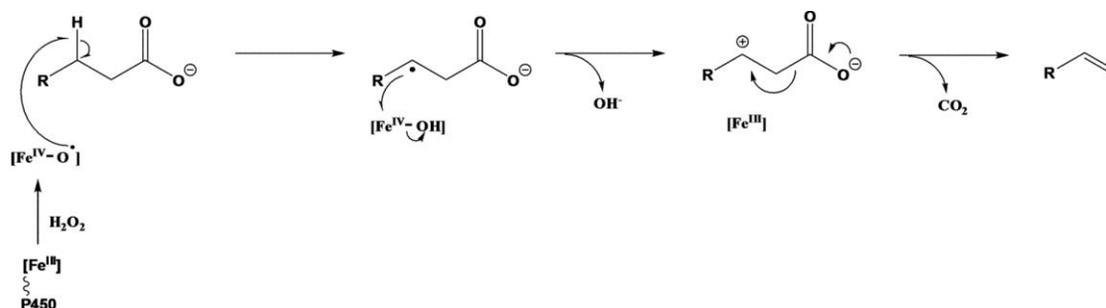


Figura 3: Mecanismo de ação proposto das enzimas ácido graxo descarboxilases (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011). Primeiramente, o grupo heme é oxidado pelo co-substrato H_2O_2 , iniciando a reação. Em seguida, o heme ativado abstrai um átomo de hidrogênio do ácido graxo na posição α ou β e gera um carbono radical. Um próton adicional é abstraído da posição β , resultando na formação de água e um carbocátion, causando a descarboxilação final, gerando o alceno.

No presente trabalho, esse mecanismo de ação foi identificado como de interesse para ser adicionado ao metabolismo do gênero *Clostridium*, com o intuito de criação de um micro-organismo capaz de consumir carbono de fontes renováveis, emitindo o propeno como produto gasoso. Isso pode ser realizado através da conversão do produto ácido butírico em propeno na etapa final da via fermentativa, como ilustrado em Figura 4.

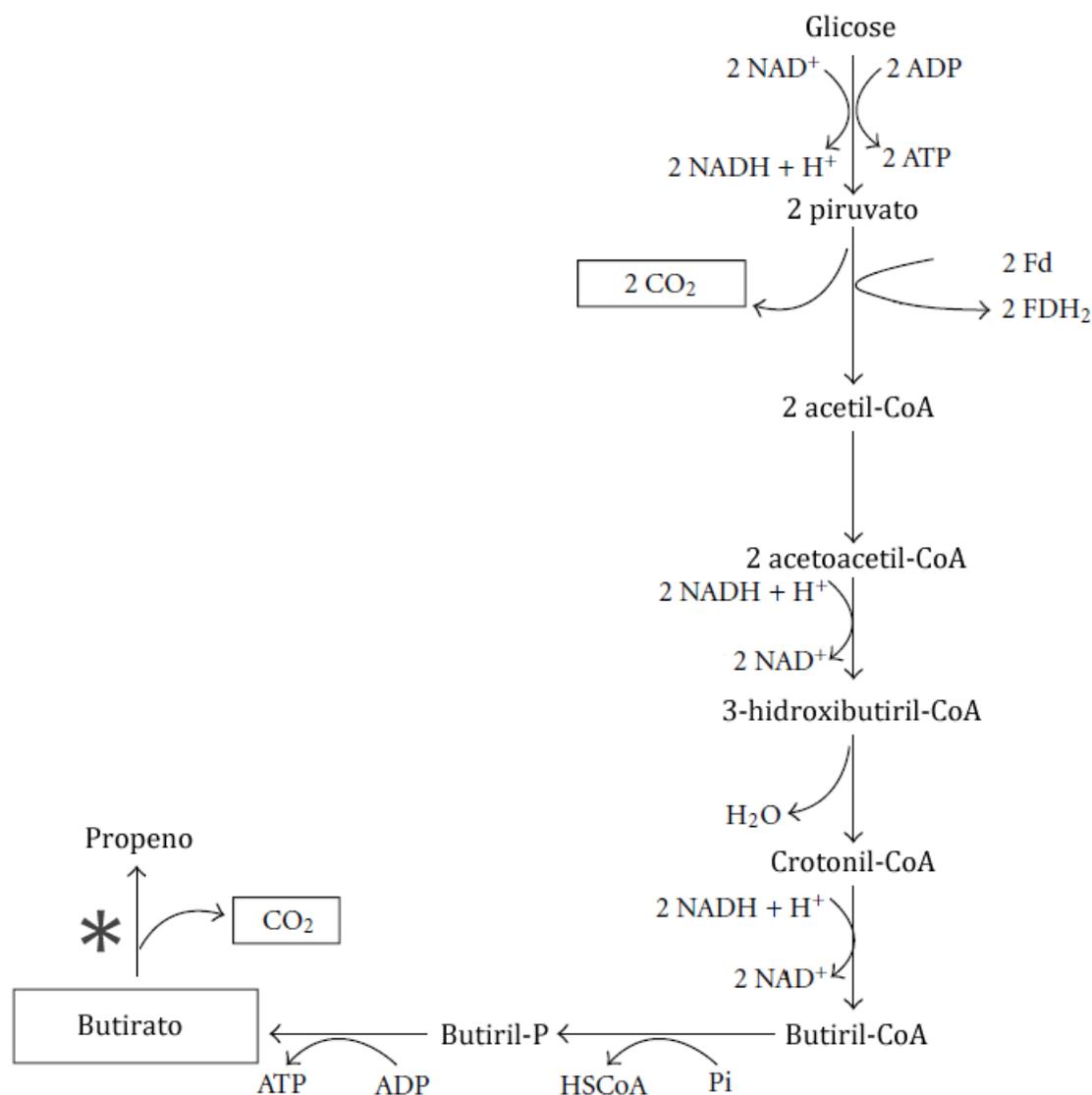


Figura 4: Via fermentativa de glicose para o ácido butírico (butirato) em Clostridia, com passo adicional no final da via, convertendo butirato em propeno (adaptada de DWIDAR et al., 2012). O último passo, marcado pelo asterisco, será realizado por uma enzima nova, desenhada para a descarboxilação de butirato.

Como mencionado anteriormente, somente ácidos graxos de cadeias entre vinte e doze carbonos são catalisados pelas enzimas ácido graxo descarboxilases (RUDE et al., 2011). Ácidos de cadeias menores não possuem afinidade com a bolsa de ligação dessas enzimas (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011), pois a redução de tamanho da cadeia carbônica induz uma diminuição de hidrofobicidade do ácido (WADE, 2009). Com esta redução, a bolsa de ligação

hidrofóbica da enzima não estabelece as interações hidrofóbicas necessárias com os ácidos hidrofílicos menores e subsequentemente a reação enzimática não é realizada.

Para possibilitar uma rota enzimática para a produção de propeno, o principal objetivo dessa tese se manifesta na tentativa de estabelecer esta afinidade e habilitar a conversão de ácido com menos de doze carbonos para o alceno correspondente. Isso poderia ser atingindo através da modificação de uma das descarboxilases escolhidas pelos métodos envolvidos no conceito do desenho de proteínas. As cinco enzimas escolhidas, todas de origem bacteriana, foram CYP152A1, CE2459, OleT, KRH21570 e Mpop1292, descritas na patente mencionada (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009).

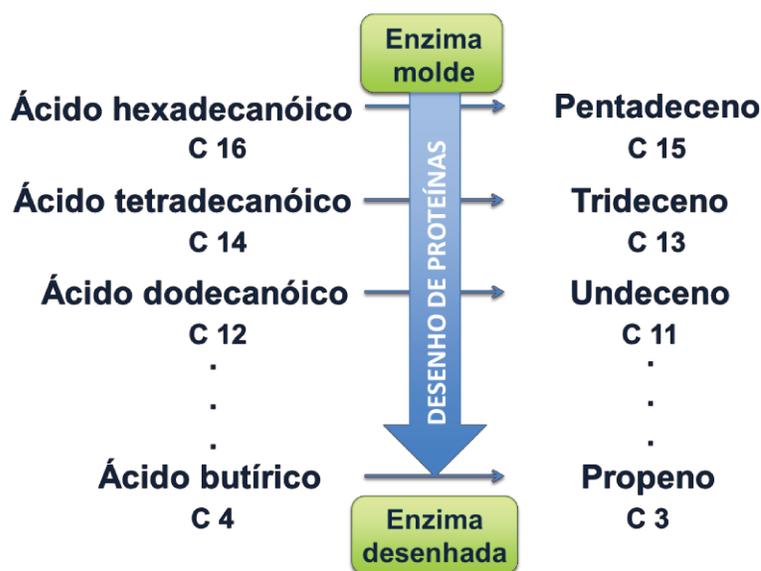


Figura 5: Esquema simplificado da mudança de afinidade da enzima ácido graxo descarboxilase durante o processo de desenho de proteínas. Partindo de uma enzima molde, o objetivo principal da tese foi a obtenção de uma enzima desenhada capaz de catalisar a descarboxilação de ácidos menores que doze carbonos. Com essa finalidade o alvo foi a conversão de ácido butírico em propeno.

2.4. Desenho de proteínas

Os métodos de desenho de proteínas são utilizados para modificar características de proteínas, tornando-as mais favoráveis às suas aplicações finais. Dois conceitos gerais interagem um com o outro: a evolução dirigida, inserindo alterações aleatórias na sequência codificante da proteína; e o desenho racional, introduzindo alterações direcionadas (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008) (Figura 6). Este conjunto de métodos resulta em um desenho semirracional (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008).

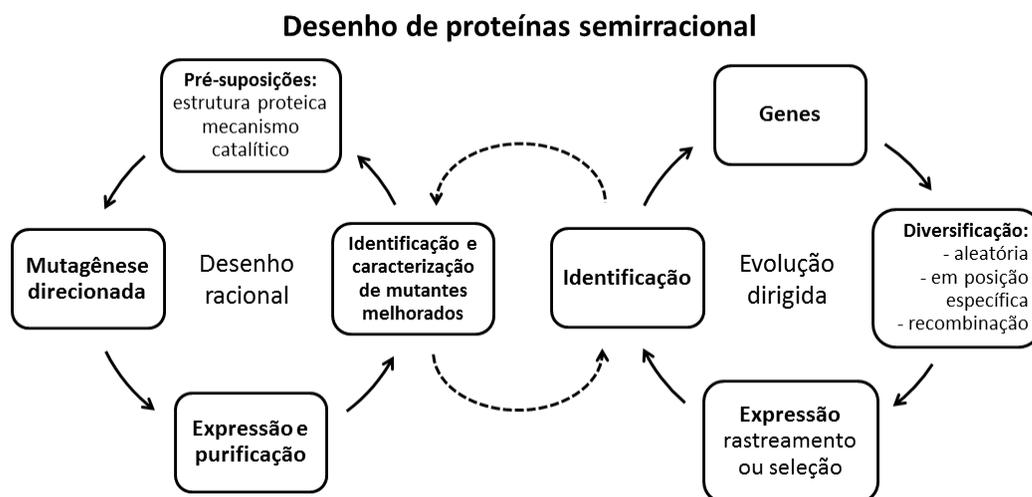


Figura 6: Ilustração do conceito de desenho de proteínas semirracional (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008). O desenho racional em conjunto com a evolução dirigida reúnem técnicas de diversificação planejadas e aleatórias no processo de desenho de proteínas.

2.4.1. Evolução dirigida

A evolução dirigida utiliza mutações aleatórias inseridas no gene codificante por técnicas de PCR para gerar uma diversidade artificial pelo aumento da taxa de mutação durante a replicação do gene alvo (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008). As mutações na sequência de DNA afetam a proteína traduzida, por alterar a sequência de aminoácidos. Isso provoca mudanças nas características da enzima, como eletrostática, hidrofobicidade e conformação estrutural de regiões da proteína (KUCHNER; ARNOLD, 1997). Alterações no centro ativo da enzima podem ser vantajosas para o desenvolvimento de especificidade e eficiência à reação alvo (KUCHNER; ARNOLD, 1997). Mudanças na superfície da enzima podem ser benéficas para a estabilidade térmica e solubilidade (KUCHNER; ARNOLD, 1997). A determinação dessas mutações benéficas é realizada através da construção de uma biblioteca de clones. Esses clones são rastreados pela detecção do produto desejado por um método colorimétrico. Os clones positivos são usados para continuar com ensaios de mutação e recombinação iterativos para melhorar o desempenho das enzimas.

Para a diversificação das sequências gênicas, que codificam as enzimas alvos, existe uma grande variedade de métodos (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008). O método mais elucidado, econômico e popular para a introdução aleatória de mutações é o *error-prone* PCR (epPCR) (LOO et al., 2004).

A técnica de epPCR é baseada na redução da fidelidade de *Taq* polimerase durante a replicação do DNA do gene alvo (MCCULLUM et al., 2010). Este efeito é altamente controlável pela modificação de uma variedade de fatores, entre eles: aumento da concentração de *Taq* DNA polimerase, aumento do tempo de extensão da polimerase durante a reação de epPCR, aumento de concentração de íons de $MgCl_2$, aumento de concentração e desbalanceamento de substrato dNTP e adição de íons de $MnCl_2$ (LEUNG; CHEN; GOEDDEL, 1989).

No trabalho de Ruller e colaboradores (2008), a aplicação da técnica de epPCR diversificou da enzima xilanase A (XylA) proveniente de *Bacillus subtilis* rastreada por termoestabilidade. Nesse experimento, uma variante termoestável

de XylA foi obtida, permitindo uma elevação da temperatura de trabalho em 20 °C. Foram identificadas quatro mutações entre a enzima original e a final que levaram ao aumento de termoestabilidade através das alterações na sequência de aminoácidos (RULLER et al., 2008).

2.4.2. Desenho racional

O desenho racional se baseia na introdução de alterações direcionadas na sequência do gene para a manipulação de características como eletrostática, hidrofobicidade e estrutura estérica de regiões da proteína alvo para o aumento de sua atividade e especificidade desejada (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008).

Em contraste à evolução dirigida, o desenho racional exige um estudo mais aprofundado das características originais da proteína candidata. Nesse caso, é preciso analisar as regiões de interesse a serem modificadas e prever o resultado após as modificações.

Como produtos de aplicações do desenho de proteínas de sucesso podem ser citadas as anticalinas e a sitagliptina transaminase.

As anticalinas mimetizam a função de anticorpos e são utilizadas como ferramentas de pesquisa na área de bioquímica e como remédio potencial na terapia médica. A combinação direcionada de anticorpos com lipocalinas, que representam uma família de proteínas de sítio ativo com alta variabilidade plástica, resultou nessas proteínas artificiais. As lipocalinas utilizadas foram submetidas à mutagênese aleatória e sítio-dirigida. Essas alterações permitiram a construção de anticalinas, com vantagens como tamanho físico menor que anticorpos, ausência da necessidade de modificações pós-traducionais, características biofísicas robustas e a opção de expressar essas proteínas em sistemas bacterianos (SKERRA, 2008).

A sitagliptina transaminase foi obtida através da ω -transaminase modificada de *Arthrobacter* sp. por desenho de proteínas, resultando em um biocatalisador industrial para a produção do composto antidiabético sitagliptina. A combinação de técnicas racionais, baseadas na alteração da estrutura enzimática com a evolução

dirigida levou à adaptação da enzima às condições bruscas do processo de produção, possibilitando a obtenção da nova enzima, que converte o substrato cetona prositagliptina para o produto sitagliptina (SAVILE et al., 2010).

No caso da ácido graxo descarboxilase, a estratégia do desenho racional do desempenho da especificidade da enzima terá como alvo a alteração da bolsa de ligação do ácido graxo pela mudança das características dos aminoácidos envolvidos na formação de sua parte hidrofóbica. Tanto a troca de aminoácidos no final do canal hidrofóbico por aminoácidos hidrofílicos ou neutros, como a inserção de uma barreira estérica em forma de uma cadeia lateral de um aminoácido poderão permitir a ligação de ácidos de cadeia menor que doze carbonos. A ação catalítica não deverá ser afetada, já que ela ocorre somente na cabeça hidrofílica do ácido, promovida pelo grupo heme da enzima (LEE et al., 2003).

Uma primeira etapa para o desenho racional foi demonstrado no trabalho de Rude e colaboradores (2009, 2011), onde a glutamina na posição 85 do gene *CYP152A1* foi substituída por uma histidina. Essa mudança aumentou a produção de 1-pentadeceno a partir de ácido hexadecanóico, comparado com a forma nativa da enzima (Figura 7). A alteração dos aminoácidos foi derivada da sequência de nucleotídeos do gene *OleT*, que apresenta uma taxa menor de hidroxilação. A modificação da glutamina 85 para histidina não afetou a razão entre descarboxilação e hidroxilação significativamente, mas aumentou a produção do alceno em 50%, comprovando a possibilidade de modificação das características dessa enzima para favorecer a reação desejada de descarboxilação (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011).

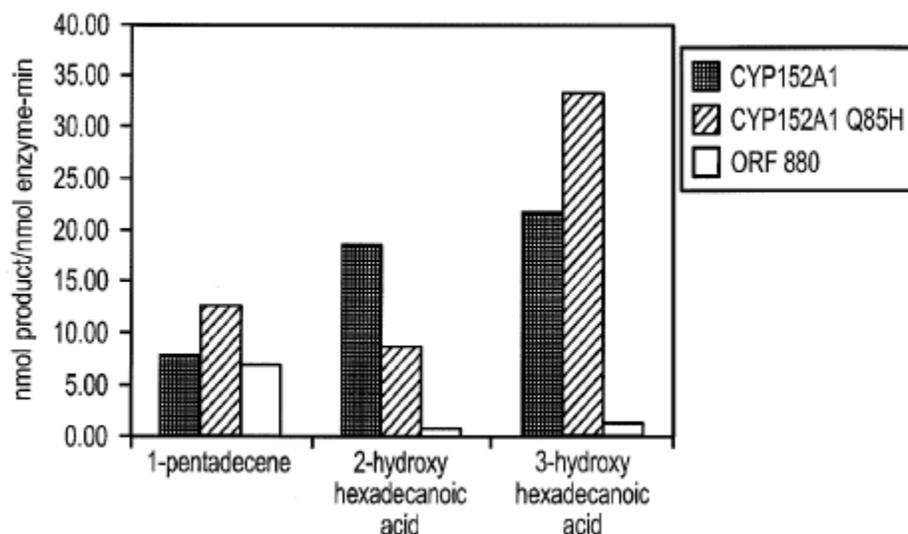


Figura 7: Produção enzimática de três compostos a partir de ácido hexadecanoico por descarboxilação (1-pentadeceno) e hidroxilação (ácido 2-hidroxihexanoico e ácido 3-hidroxihexadecanoico), realizado por Alibhai e colaboradores (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009). A mutação Q85H aumenta a taxa de descarboxilação em torno de 55%.

2.4.3. Rastreamento e seleção de clones positivos

Enzimas do tipo ácido graxo descarboxilase, da família de proteínas citocromo p450, são capazes de produzir alcenos, a partir de ácidos graxos, por descarboxilação do substrato sob liberação de dióxido de carbono e consumo de peróxido de hidrogênio (RUDE et al., 2011).

Até o presente momento, não foi descrito na literatura um método adequado para o rastreamento de alto desempenho da presença de alcenos após a reação enzimática de descarboxilação. Um método para a detecção do dióxido de carbono emitido também não seria viável em sistemas de rastreio de alto desempenho.

ABTS

O 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), um substrato cromógeno da peroxidase de raiz forte (HRP), foi identificado nesse trabalho como candidato para um ensaio colorimétrico, por medição indireta do consumo de substrato durante a reação enzimática, através de estudos já descritos. Foi demonstrado anteriormente que a redução de peróxido de

hidrogênio para água, catalisada pela HRP, leva à oxidação de um elétron de ABTS, formando assim um cátion radical metaestável. A formação desse cátion resulta em uma solução de intensiva cor verde-azulada, que pode ser detectada em um espectrofotômetro com absorvância máxima, em um comprimento de onda de 405 nm (SIGMA-ALDRICH., 2012).

Durante a reação enzimática da ácido graxo descarboxilase, a conversão de um ácido graxo para um alceno é catalisada, consumindo peróxido de hidrogênio como co-substrato. A peroxidação de ABTS através de HRP e peróxido de hidrogênio residual é um método colorimétrico rápido e sensível para a detecção de mudanças no nível de peróxido de hidrogênio no meio de reação, provocadas pela atividade da enzima ácido graxo descarboxilase.

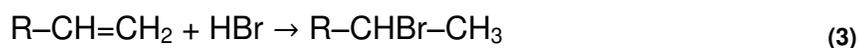
UV

Como a absorvância de alcenos atinge o seu máximo em luz ultravioleta, em um comprimento de onda de 190 nm, a formação desses compostos pode ser monitorada pela medição de absorvância. A diferença do aumento de absorvância, comparada com uma amostra referência não contendo enzima é utilizada para a detecção de atividade enzimática (GHOSH, 2003).

Água de bromo

Segundo o método de descoloração de água de bromo por alcenos, a solução de cor marrom se descora na presença de alcenos, através da adição do halogênio bromo à dupla ligação do alceno (WADE, 2009).

Descrita pela regra de Markovnikov, o hidrogênio de um haleto se liga ao átomo de carbono mais hidrogenado da dupla ligação de um alceno, ou seja, ao carbono que possui mais ligações com o hidrogênio (MARKOVNIKOV, 1870).



A adição de bromo ao alceno forma o 2-bromoalceno.

3. Objetivos

O objetivo desse trabalho é a modificação de uma enzima ácido graxo descarboxilase para a obtenção de uma nova enzima com capacidade de realizar a descarboxilação de um ácido graxo ou ácido carboxílico linear, sendo formado por número inferior a doze carbonos, para o alceno correspondente.

Objetivos específicos a serem realizados:

- a) Identificação de enzimas ácido graxo descarboxilases, produtoras potenciais de alcenos, através de pesquisa bibliográfica e bioinformática.
- b) Expressão e verificação da atividade das enzimas ácido graxo descarboxilases candidatas para a determinação da enzima molde para o desenho de proteínas.
- c) Comparação de versões diversificadas através de desenho racional da enzima molde com a versão nativa.
- d) Desenvolvimento de um método de rastreamento da atividade de ácido graxo descarboxilase que seja compatível com um sistema de rastreamento de alto desempenho.
- e) Desenvolvimento de um método de expressão heteróloga, ensaio enzimático e aplicação do rastreamento da atividade de ácido graxo descarboxilase, desenvolvido no sistema de rastreamento de alto desempenho.
- f) Investigação das enzimas mutantes que apresentaram desempenho positivo.

4. Materiais e métodos

4.1. Identificação do gene alvo

Para a produção de alcenos através de fontes renováveis de carbono, foram utilizados diversos bancos de dados de artigos, patentes e genes, para busca de genes codificantes de enzimas de origem microbiana.

Primeiramente, as cinco proteínas descritas na patente WO/2009/085278 (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009) foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW (LARKIN et al., 2007) e os motivos com atividade de ácido graxo descarboxilase, descritos na patente, foram identificados para a confirmação da sua presença em todos os genes. Os quatro motivos foram:

- 1) F-x-x-E-[VI]-[RK]-R-x-Y-P-F-{F}-P-x-[LIV]
- 2) P-x(6)-[LI]-x(4)-{G}-[VI]-[HQM]-x-[MLV]-D-G-x(2)-H-x(2)-R-K
- 3) [AC]-[AG]-[IV]-[DE]-[IL]-x-N-x(2)-R-P-x-[VI]-A-x(3)-[FY]-x(2)-F-x(3)-A-[LMV]-x-[DE]
- 4) {RK}-x(6)-[LMV]-x(4)-[AC]-[AG]-[IV]-[DE]-[IL]-x-N-x(2)-R-P-x-[VI]-A-x(3)-[FY]-x(2)-F-x(3)-A-[LMV]-x-[DE]

Estes motivos estão listados na representação PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>), na qual cada posição da sequência é separada por um hífen. Existem regras para a interpretação dos motivos. Um “x” significa que qualquer resíduo de aminoácido pode preencher a posição. Colchetes “[]” representam posições ambíguas, que podem ser tomadas por um dos resíduos definidos entre os colchetes. Consequentemente, uma posição “[MLV]” significa ou uma metionina ou uma leucina ou uma valina. Chaves “{ }” indicam resíduos que são proibidos nessa posição. Por exemplo, “{F}” proíbe que uma fenilalanina esteja presente nesse ponto da sequência. Resíduos seguidos por um número entre parênteses “(n)” são repetidos n vezes. “A(3)” representa uma sequência “A-A-A”.

Em seguida, foi realizada uma busca por outras proteínas, não mencionadas na patente, com utilização do programa Fuzzpro (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000). Este algoritmo consegue analisar um banco de dados de sequências de nucleotídeos e aminoácidos pela presença de motivos de atividade. Informando a sequência do motivo em questão, Fuzzpro foi aplicado pela interface web para buscas nos bancos de dados de proteínas do NCBI, incluindo os bancos GenPept, RefSeq, Swiss-Prot, PIR, PRF, PDB e CDD.

A terceira busca foi realizada com um Modelo Markov Escondido (HMM), que retorna uma lista dos homólogos mais próximos à sequência informada (SÖDING, 2005). Como somente a estrutura da proteína do gene *CYP152A1* de *B. subtilis* estava resolvida, esta sequência foi utilizada para a busca. O algoritmo HMM compara a sequência proteica com estrutura conhecida com outras estruturas resolvidas, por exemplo, dos bancos de dados PDB e SCOP e adiciona informações de outros bancos de dados de propriedades proteicas, como PFAM e SMART, entre outros (SÖDING; BIEGERT; LUPAS, 2005).

4.2. Meios de cultura

Os meios listados abaixo foram utilizados para o cultivo de bactérias. Todos os meios foram autoclavados à temperatura de 121 °C e 120 kPa de pressão, por 20 minutos, após o preparo.

Luria-Bertani (LB)

Composição: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio e, opcionalmente, 1,5% de ágar para o preparo de LB sólido.

Para a seleção de transformantes contendo plasmídeo foram adicionadas combinações de 34 µg/mL de canamicina, 100 µg/mL de ampicilina, 100 µg/mL de cloranfenicol e/ou 80 µg/mL de X-Gal, dependendo da necessidade, após autoclavagem do meio.

TSBYE

Composição: 2% de triptona, 0,6% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, 0,25% de fosfato dipotássico e 0,25% de glicose.

Meio mineral M9

Composição: 33,7 mM de fosfato dissódico, 22 mM de fosfato monopotássico, 8,55 mM de cloreto de sódio, 9,35 mM de cloreto de amónio, 0,4% de glicose, 1 mM de sulfato de magnésio, 0,3 mM de cloreto de cálcio, 1 µg/L de biotina, 1 µg/L de tiamina e solução de elementos traço 1x. A composição da solução de elementos traço está descrita em Tabela 1.

Tabela 1: Composição da solução de elementos traço (100x)

Composto	c [mM]
EDTA	13,4
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	3,1
ZnCl ₂	0,62
H ₃ BO ₃	0,162
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,076
CoCl ₂ ·2 H ₂ O	0,042
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,0081

4.3. Plasmídeos

pGEM®-T Easy

Vetor de clonagem linearizado, que possui timinas nas duas extremidades, permitindo a ligação de produtos de PCR que apresentam uma adenina na região 3'. O plasmídeo contém o gene de resistência contra o antibiótico ampicilina e sítio de clonagem interrompendo o gene *lacZ*, que possibilita a seleção dos clones positivos em X-Gal.

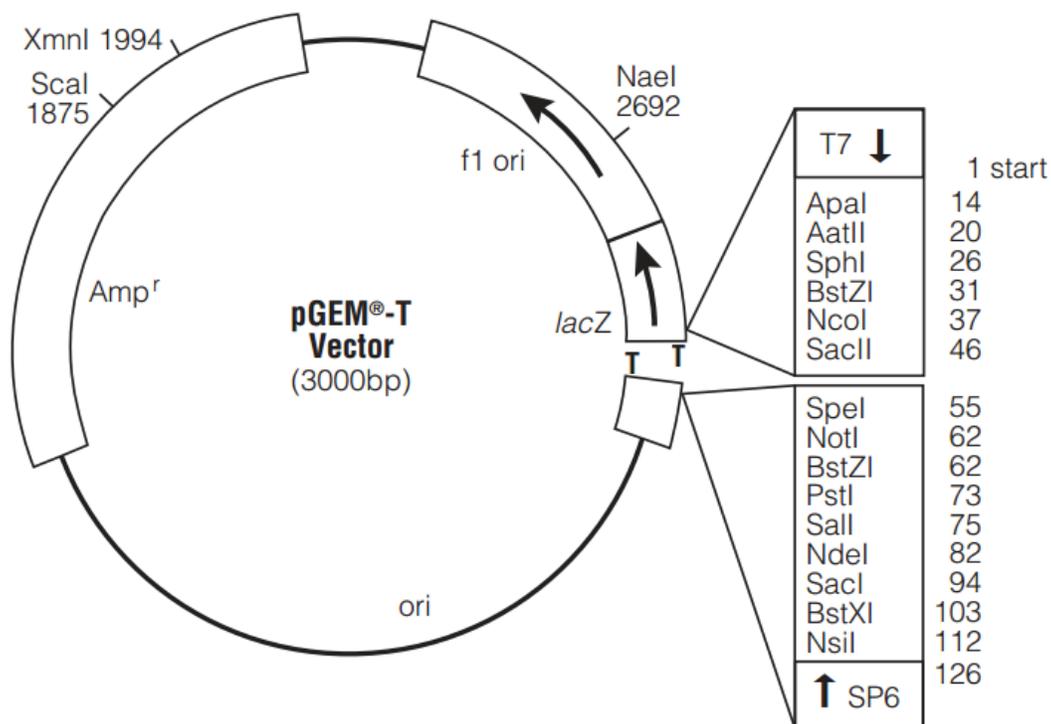


Figura 8: Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy (Fonte: Promega, Cat. A1380)

pET-28a(+)

Plasmídeo para expressão heteróloga em *Escherichia coli*, induzível por IPTG, com His•Tag N-terminal e gene de resistência contra o antibiótico canamicina.

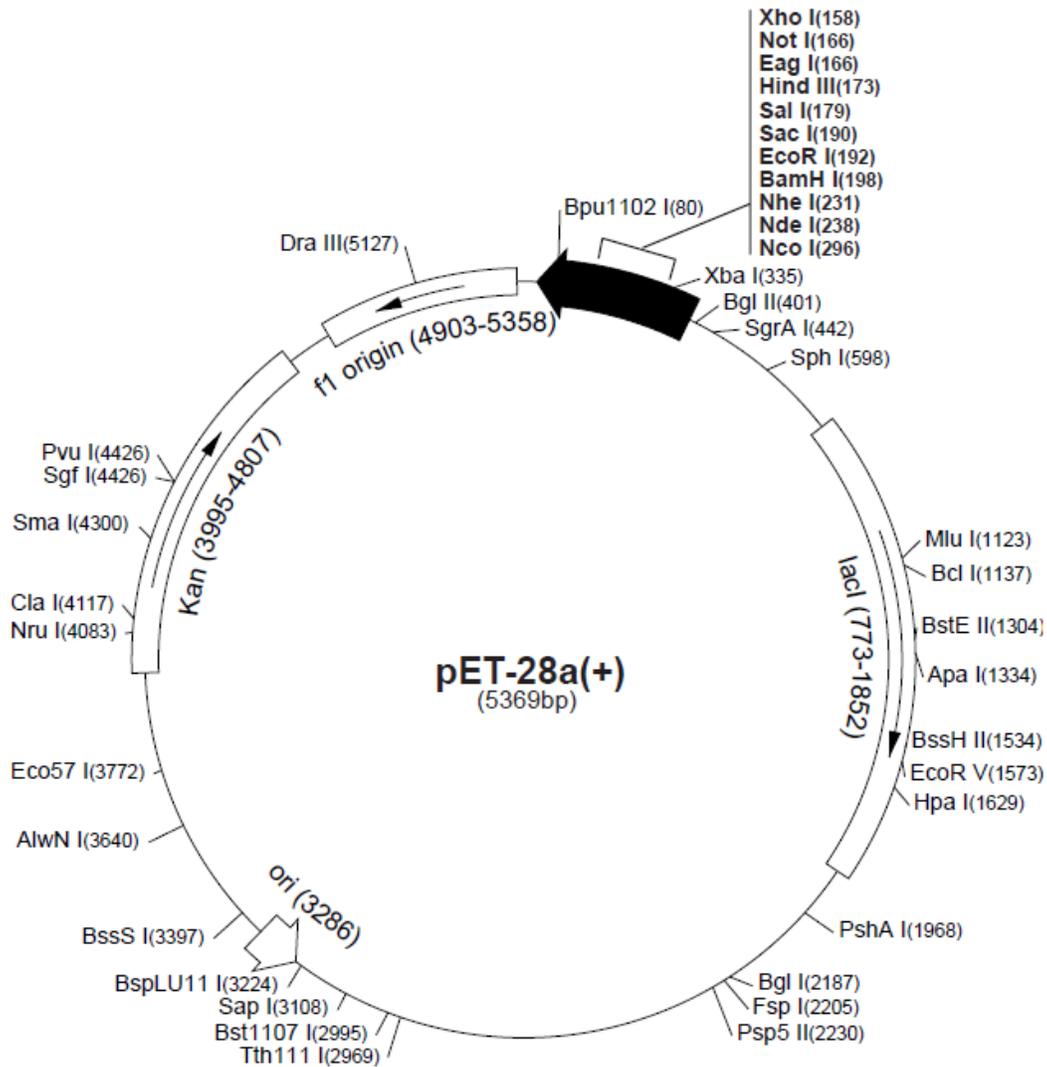


Figura 9: Mapa do plasmídeo pET-28a(+) (Fonte: Novagen, Cat. 69864-3)

pET-22b(+)

Plasmídeo para expressão heteróloga em *E. coli*, induzível por IPTG, com His•Tag N-terminal e gene de resistência contra o antibiótico ampicilina. O peptídeo sinal *peIB* N-terminal é responsável pela secreção periplásmica da proteína inserida.

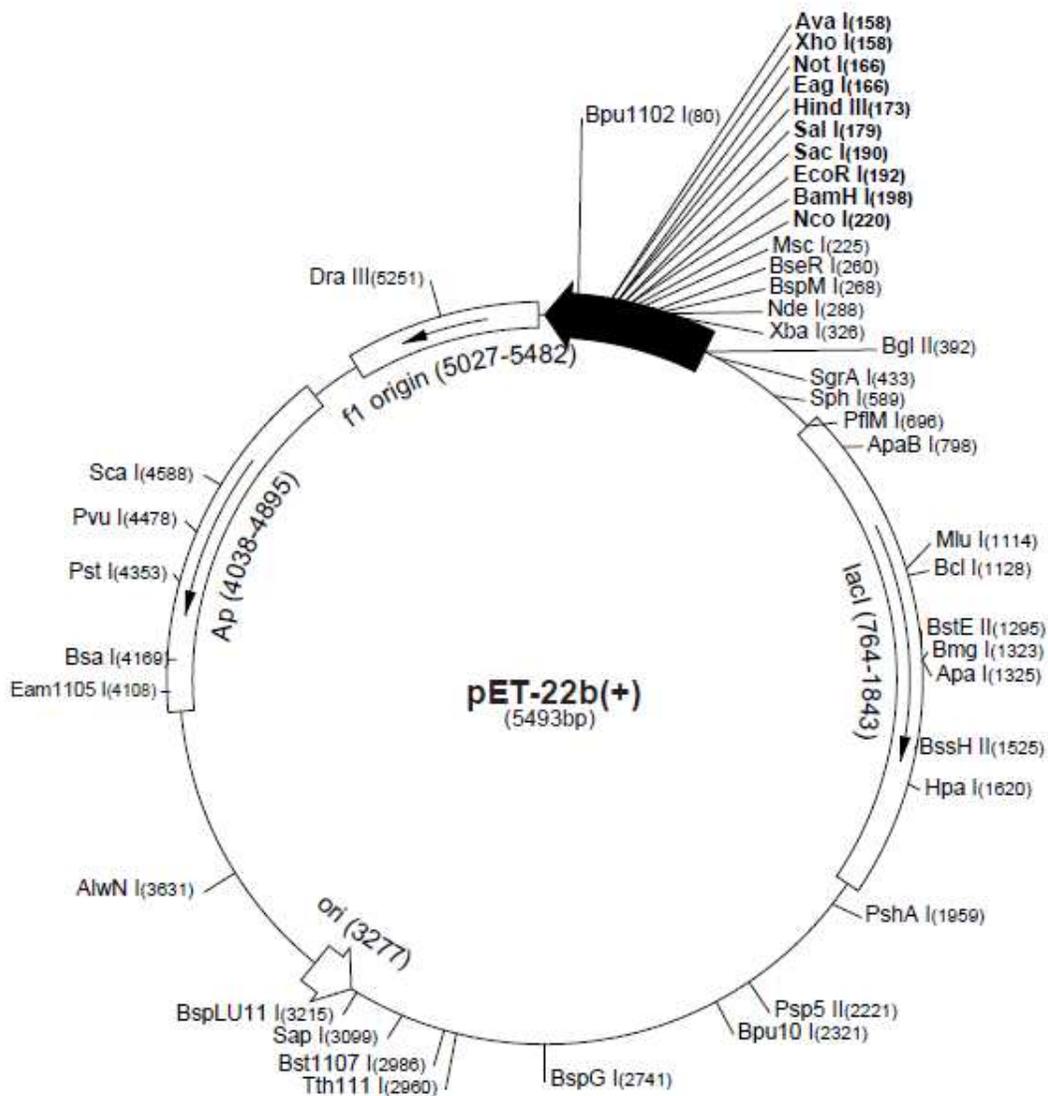


Figura 10: Mapa do plasmídeo pET-22b(+) (Fonte: Novagen, Cat. 69744-3)

4.4. PCR de colônia de bactérias

Para a confirmação de clones positivos de *E. coli*, uma colônia isolada foi ressuspensa em 10 µl de água destilada estéril. Em seguida, o conteúdo das células foi liberado por choque térmico, por aquecimento a 94 °C por seis minutos, seguido de refrigeração a -20°C por dez minutos. A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado na reação de PCR, cuja composição e programa de termociclagem estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Reação de PCR de colônia de *E. coli* a esquerda e seu programa de termociclagem a direita

Reagente	Volume [µl]	T [°C]	t [min]
DNA (Sobrenadante)	1,0	94	5:00
<i>Primer forward</i>	0,6	94	0:50
<i>Primer reverse</i>	0,6	T _m	0:50
MgCl ₂	0,6	72	1:00 por kb
Tampão GoTaq (5x)	2,0	72	5:00
GoTaq Polimerase	0,2	4	∞
dNTP	0,2		
H ₂ O	4,8		

} 30x

Após a conclusão da reação, os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e submetidos a uma corrente elétrica em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA·2H₂O pH 8,5), em voltagem ajustada a 6 Volts por centímetro de gel.

Em seguida, o gel foi visualizado e digitalizado sob luz UV em um fotodocumentador (Gel Doc™ XR+, BioRad). Caso não especificado posteriormente, as reações de PCR neste trabalho foram realizadas por esse protocolo.

4.5. Extração de DNA genômico de bactérias

A extração de DNA genômico de bactérias foi preparada como descrito em “Preparation of Genomic DNA from Bacteria” no livro “Current Protocols in Molecular Biology” (WILSON, 2001).

4.6. Preparo de bactérias eletrocompetentes

Uma colônia isolada da cepa de *E. coli* desejada foi inoculada em um frasco *Erlenmeyer* contendo 50 mL de meio LB líquido e incubado a 37 °C e 250 rpm *overnight*.

Esse pré-inóculo foi utilizado para inocular dois meios LB líquido de 200 mL cada, resultando em uma densidade ótica inicial de 0,1 a 600 nm. As culturas foram incubadas a 37 °C e 250 rpm até atingirem uma densidade ótica de 0,5. O meio contendo as células foi distribuído em tubos de 50 mL e mantido em um banho de gelo por 15 minutos.

Após uma centrifugação a 8.000 rpm a 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e as células sedimentadas ressuspensas em 30 mL de glicerol 10% gelado. O passo de centrifugação foi repetido e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 5 mL de glicerol e o conteúdo total foi reunido em um único tubo. Esse tubo foi centrifugado novamente e o sobrenadante descartado. A ressuspensão das células foi realizada em 2 mL de glicerol e alíquotas de 40 µl foram preparadas em tubos de 1,5 mL. As células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

4.7. Transformação de bactérias eletrocompetentes

Antes da transformação, as células eletrocompetentes estocadas a -80 °C foram descongeladas em um banho de gelo. 1 a 2 µl de plasmídeo foram adicionados a 40 µl de células e todo o conteúdo transferido para uma cubeta de eletroporação estéril resfriada (gap 2 mm, BioRad). A cubeta foi submetida a um pulso de 2,5 kV no eletroporador (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad) e 1 mL de meio LB líquido foi inserido na cubeta imediatamente após a conclusão do pulso. As células ressuspensas foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e incubadas a 37 °C por uma hora. Foram plaqueados 100 e 200 µl da suspensão de células em LB sólido contendo os antibióticos adequados para a seleção dos transformantes correspondentes. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight*.

4.8. Isolamento de genes

Para o isolamento dos genes alvos, foram utilizadas linhagens hospedeiras *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Kocuria rhizophila* DSM 11926, *Jeotgalicoccus halotolerans* DSM 17274 e *Methylobacterium populi* ATCC BAA-705 da coleção de micro-organismos DSMZ (Braunschweig, Alemanha). O DNA genômico da linhagem *Bacillus subtilis* ATCC 6633 já estava disponível no estoque do laboratório.

Primers específicos, um *forward* e um *reverse* (Invitrogen), foram desenvolvidos para a amplificação desses genes por PCR (Tabela 10).

Os micro-organismos adquiridos estavam liofilizados, o que exigiu o passo de reativação das culturas. Após reativação, ocorreu o cultivo das linhagens e a extração de seus DNA genômicos, como descrito em item 4.5. Em seguida, foi determinada a temperatura ótima para o pareamento dos *primers* para a padronização da reação. Após esses passos, os genes alvos (Tabela 9) foram amplificados por PCR.

4.9. Construção de plasmídeos

4.9.1. pAP1 – pAP4

Para o isolamento e armazenamento inicial dos genes candidatos, os genes amplificados foram ligados ao plasmídeo comercial pGEM®-T Easy (Promega). O produto de ligação foi inserido em células competentes de *E. coli* DH10B por eletroporação (2,5 kV) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As bactérias foram incubadas *overnight* em placas de LB contendo X-Gal e os clones positivos foram selecionados.

Para confirmar a integridade dos genes inseridos nos transformantes, os insertos foram sequenciados pelo método de Sanger (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer).

pAP1: pGEM®-T Easy + *C3330*

pAP2: pGEM®-T Easy + *CYP152A1*

pAP3: pGEM®-T Easy + *CE2459*

pAP4: pGEM®-T Easy + *OleT*

4.9.2. pAP5 – pAP8

Primers específicos foram desenvolvidos para a amplificação dos genes candidatos. Para a realização da clonagem desses genes no vetor pET-28a(+), o plasmídeo foi clonado em *E. coli* DH10B e extraído por Miniprep (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Primeiramente, foi realizada uma tentativa de adicionar somente os adaptadores para as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*, para facilitar futuras manipulações. Como o gene *CE2459* contém sítios da enzima *BamHI* na sua sequência, o adaptador de *HindIII* foi adicionado nesse caso (Tabela 3).

Tabela 3: Primers utilizados para a amplificação e clonagem (pET28a(+)) dos genes correspondentes. Em verde a cauda pré-adaptadora, vermelho os sítios de restrição e preto a parte complementar ao gene. A T_m foi determinada em ensaios de PCR de gradiente.

Gene	Primer	Adaptador	T_m [°C]
<i>CYP152A1</i> - forward	ACGCTAGCAATGAGCAGATTCCACATGAC	<i>NheI</i>	59
<i>CYP152A1</i> - reverse	ACGGATCCTCTTCGATAAAGGAAGAGAGCTT	<i>BamHI</i>	
<i>OleT</i> - forward	ACGCTAGCGCAACACTTAAGAGGGATAAG	<i>NheI</i>	56
<i>OleT</i> - reverse	ACGGATCCTTATGTTCTGTCTACAACCTTCG	<i>BamHI</i>	
<i>CE2459</i> - forward	ACGCTAGCGAAGAGGTCCCACCGATGAC	<i>NheI</i>	60
<i>CE2459</i> - reverse	ACAAGCTTCGAAAATCCCACCACATCAG	<i>HindIII</i>	
<i>C3330</i> - forward	ACGCTAGCTTACTAAAAGAAAATACAGCAAAAAG	<i>NheI</i>	54
<i>C3330</i> - reverse	ACGGATCCGTAAATTAATTCCAAAATTAAGC	<i>BamHI</i>	

Os genes candidatos foram novamente amplificados por PCR com utilização de DNA genômico. O produto foi purificado de gel de agarose (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) e então digerido com as enzimas correspondentes aos adaptadores, sendo posteriormente inserido no plasmídeo digerido com as enzimas adequadas. Em seguida, células competentes de *E. coli* DH10B foram transformadas por eletroporação (2,5 kV) com o produto de ligação (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Para confirmar a integridade dos genes inseridos nos transformantes, os insertos foram sequenciados pelo método de Sanger (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer).

pAP5: pET-28a(+) + *C3330*

pAP6: pET-28a(+) + *CYP152A1*

pAP7: pET-28a(+) + *CE2459*

pAP8: pET-28a(+) + *OleT*

4.9.3. pAP9

O gene *CYP152A1* de *B. subtilis*, diversificado pela técnica epPCR, foi inserido no plasmídeo de secreção periplásmica pET-22b(+) (Merck). A secreção da proteína para o espaço periplásmico da célula possibilita a automatização dos ensaios de expressão e atividade enzimática (item 4.15.3).

pAP9: pET-22b(+) + *CYP152A1* diversificado

4.9.4. pAP10 – pAP16

As variações do gene *CYP152A1*, diversificado por desenho racional (PCR com Taq Phusion), foram inseridas no plasmídeo de secreção periplásmica pET-22b(+) (Merck). Esse passo possibilitou a avaliação dessas construções no sistema de rastreamento de alto desempenho (item 4.15.3).

pAP10: pET-22b(+) + *CYP152A1* Q85H

pAP11: pET-22b(+) + *CYP152A1* F173H

pAP12: pET-22b(+) + *CYP152A1* F173W

pAP13: pET-22b(+) + *CYP152A1* F173Y

pAP14: pET-22b(+) + *CYP152A1* F292H

pAP15: pET-22b(+) + *CYP152A1* F292W

pAP16: pET-22b(+) + *CYP152A1* F292Y

4.9.5. pAP17

Esse plasmídeo representa o vetor pET-22b(+) ligado ao gene *CYP152A1* diversificado, que foi gerado e avaliado como benéfico durante os ensaios de alto desempenho.

pAP17: pET-22b(+) + *CYP152A1* diversificado

4.10. Extração de plasmídeo de bactérias (Miniprep)

A colônia de bactéria contendo o plasmídeo a ser extraído foi inoculada em 4 mL de meio líquido LB contendo os antibióticos adequados, dependendo do plasmídeo e da linhagem de *E. coli* utilizada. Após a incubação *overnight* a 37 °C, 1,5 mL de cultura foram coletados e centrifugados a 14.000 rpm e 4 °C por 10 minutos, para sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µl da solução 1 gelada, composta por 10 mM EDTA pH 8, 25 mM Tris-HCl pH 8 e 10 µg RNase, sendo incubadas por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, 200 µl de solução 2, contendo 0,2 M NaOH e 1% dodecil sulfato de sódio (SDS), foram adicionados e misturados por inversão do tubo. 150 µl de solução 3 gelada, sendo 3 M acetato de potássio e 11,5% ácido acético glacial, foram transferidos para o tubo, que foi submetido à inversão. A reação permaneceu em um banho de gelo por 30 minutos e, logo após, centrifugada a 14.000 rpm e 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e 1 mL de isopropanol gelado foi adicionado e misturado. Após um passo de centrifugação a 14.000 rpm e 4 °C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70% gelado. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm e 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após secagem do sedimento, ocorreu sua ressuspensão em 40 µl de água destilada estéril (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A quantificação do conteúdo de DNA na solução foi realizada aplicando 1 µl de amostra no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), com utilização de água destilada como referência.

4.11. Expressão heteróloga

Para determinar as características de cada enzima candidata foi necessário obtê-las em forma purificada. Isso envolve os passos de expressão heteróloga, purificação da proteína alvo do extrato bruto e quantificação da concentração da solução contendo a enzima.

A expressão das enzimas foi conduzida na cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta™ 2, transformada com os genes respectivos por eletroporação.

4.11.1. Determinação das condições ótimas

A padronização do método usado para a expressão heteróloga das proteínas A - D foi realizada pela expressão das proteínas A e B em escala pequena (FRANCIS; PAGE, 2010).

Foram conduzidos ensaios em 50 mL de meio LB, partindo de uma densidade ótica (OD_{600}) de 0,1 e crescendo a cultura a 37 °C e 200 rpm até uma OD_{600} de 0,6. Duas concentrações diferentes de IPTG foram utilizadas para a indução da expressão da proteína heteróloga: 0,1 e 0,5 mM. As temperaturas 20, 30 e 37 °C foram utilizadas após indução para investigação de seu efeito na expressão e solubilidade das enzimas. As amostras foram coletadas diretamente após a indução (t_0 , 10 mL) e após duas horas (t_2 , 7 mL), quatro horas (t_4 , 5 mL) e 16 horas (t_{16} , 3 mL). A diminuição do volume coletado melhora a comparabilidade da intensidade das bandas de proteína no gel de acrilamida. Antes de correr o gel, as amostras foram centrifugadas, ressuspendidas em 1 mL de tampão de lise B-PER e sonicadas no gelo por um minuto com amplitude de sonicação de 20% e intervalos de 9,9 s / 9,9 s. Após um passo de centrifugação para separar a fase solúvel da insolúvel, as amostras foram aplicadas em um gel de acrilamida (13%), com corrida a 120 V.

Para melhorar as solubilidades obtidas por essa primeira otimização, foi realizada uma segunda rodada de expressões em escala de 50 mL. Foram

utilizados quatro meios diferentes para investigar a influência da mudança de acessibilidade aos íons metálicos para o micro-organismo hospedeiro.

Essa série de expressões foi conduzida em meio LB, meio LB complementado com 27 mg/L de FeCl₃, meio mineral M9 e o quarto modo, que envolve o crescimento da cultura de *E. coli* em meio LB padrão e a adição do íon necessário para a proteína em questão, no momento da indução com IPTG. Nesse caso, foram adicionados 27 mg/L de FeCl₃ (RUDE et al., 2011).

Todas as culturas foram incubadas a 37 °C, com 250 rpm de agitação e induzidas com 0,1 mM IPTG, após quatro horas. A partir desse momento, a cultura foi incubada a 30 °C e agitação de 150 rpm, durante a indução da expressão. Os passos seguintes desse protocolo seguem os mesmos passos da otimização anterior.

4.11.2. Expressão em escala pequena

A expressão em escala pequena de quatro proteínas candidatas foi conduzida com os transformantes respectivos dos genes dessas enzimas, seguindo o padrão determinado como resultado das etapas descritas anteriormente (item 5.4.2).

4.11.3. Purificação

Após uma expressão em escala de 500 mL, seguindo o mesmo padrão determinado no capítulo 5.4.1, quatro enzimas candidatas foram purificadas no sistema de purificação de proteínas por cromatografia ÄKTA (GE Healthcare). Através desse método, a separação da proteína alvo ocorre por afinidade da cauda de seis histidinas com níquel.

Com esse intuito, foi utilizada uma coluna HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare) carregada com sulfato de níquel. A amostra de proteína foi aplicada na coluna com tampão de ligação (20 mM tampão fosfato, 200 mM cloreto de sódio, 10 mM imidazol, pH 7,4). Depois da eluição das proteínas inespecíficas da coluna, a percentagem do tampão de eluição (20 mM tampão fosfato, 500 mM imidazol, pH

7,4) foi aumentada gradualmente para 7,5% e mantida neste ponto até que a proteína alvo eluísse completamente. O gradiente de tampão foi continuado até atingir a percentagem de 100% tampão de eluição. Foram coletadas frações de 2 mL da solução efluente.

As frações contendo a proteína alvo foram separadas em um tubo. Uma parte foi complementada com glicerol para uma concentração final de 15% glicerol e congelada a -20 °C e a outra armazenada a 4 °C, sem alterações.

4.11.4. Extração de proteínas da fração periplasmática

A extração da fração periplasmática foi realizada por choque osmótico das células que expressaram a proteína. O tampão de saturação, contendo 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA e 200 g/l sacarose e o tampão de choque osmótico, composto por 5 mM MgCl₂, foram preparados e refrigerados (GRISSHAMMER; NAGAI, 1995). Após a fase de indução, a cultura foi transferida para tubos de ensaio de 50 mL e centrifugada a 8.000 rpm e 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de tampão de saturação a cada 50 mL de cultura original. O tubo foi incubado em banho de gelo por dez minutos sob leve agitação. Depois de um passo de centrifugação igual ao primeiro, após descarte do sobrenadante, foi adicionado 4 mL de tampão de choque osmótico. A suspensão foi submetida a banho de gelo por dez minutos sob leve agitação e a centrifugação foi repetida. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a 4 °C.

4.11.5. Quantificação

Soluções de proteína foram submetidas ao método de quantificação Bradford, medindo a absorbância da solução a 595 nm, após coloração com o reagente Coomassie Brilliant Blue 1 (BioRad).

Padrões de albumina de soro bovino (BSA), contendo 0, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL de proteína, diluídos em 0,15 M de NaCl, foram preparados. As amostras de proteína foram aplicadas em diluições de 1x, 2x e 5x.

Para a realização do ensaio, 1 mL da solução de Coomassie Brilliant Blue 1 foi adicionado a 20 µl de amostra em uma cubeta de leitura de absorbância e misturado por inversão da cubeta.

Após o tempo de cinco minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro a 595 nm. As concentrações desconhecidas das amostras de proteína podem ser calculadas comparando suas absorbâncias com a curva padrão de albumina.

4.12. Ensaio de atividade enzimática

Os materiais utilizados para a realização do ensaio foram: ácido hexadecanóico (Merck, Alemanha), peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil), ácido clorídrico (Chemco, Brasil), fosfato monossódico (Merck, Alemanha), fosfato dissódico (Merck, Alemanha) e soluções de enzimas ácido graxo descarboxilase purificadas.

As reações de descarboxilação foram realizadas em tubos de ensaio Eppendorf de 1,5 mL com um volume final de 1 mL e placas de microtitulação de 96 poços com um volume final de 200 µl, contendo 100 mM de tampão fosfato pH 7,5, 100 µM de ácido hexadecanóico, 50 µM de peróxido de hidrogênio e 0,5 µM de ácido graxo descarboxilase (adaptado de Rude et. al, 2011). Uma amostra referência foi preparada, substituindo a ácido graxo descarboxilase por ácido graxo descarboxilase desativada por calor (95 °C por 5 min).

Para a realização de cada ensaio, primeiro o tampão fosfato foi transferido para o recipiente de ensaio (tubo ou poço da placa) e o substrato, diluído em etanol, foi adicionado. Após uma etapa de homogeneização, a enzima e o peróxido de hidrogênio foram transferidos em rápida sucessão, iniciando assim a reação enzimática.

A solução foi incubada sob agitação por 30 minutos a 25 °C e a enzima foi desativada adicionando-se 10 M de ácido clorídrico, atingindo uma concentração final de 0,1 M. A análise quantitativa dos compostos formados durante a reação foi realizada por GC-MS (item 4.16.1).

4.13. Desenho de proteínas

4.13.1. epPCR

O seguinte protocolo foi utilizado para a introdução de quatro mutações não-silenciosas por gene de ácido graxo descarboxilase.

Foram preparadas duas soluções específicas para a realização de epPCR: uma solução de dNTP desbalanceada, composta de 20% de dATP e dGTP e 80% de dCTP e dTTP e outra contendo 1 mM de cloreto de manganês, esterilizada por microfiltração.

A composição da reação de epPCR em um volume final de 50 μ l e o programa utilizado no termociclador estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Protocolo da reação de epPCR à esquerda e seu programa de termociclagem à direita

Reagente	Volume [μ l]	T [°C]	t [min]
Tampão GoTaq (5x)	10	94	5:00
GoTaq polimerase	0,5	94	0:50
dNTP desbalanceado	2,5	59	0:50
<i>Primer forward</i> 5 μ M	1	72	1:20
<i>Primer reverse</i> 5 μ M	1	72	5:00
25 mM MgCl ₂	10	4	∞
1 mM MnCl ₂	7,5		
DNA molde	0,1		
H ₂ O	17,4		

} 30x

4.13.2. Desenho racional

As mutações desenhadas foram inseridas por mutagênese direcionada por Taq-Phusion polimerase (New England Biolabs). Os *primers forward* e *reverse* fosforilados na extremidade 5' e a polimerase Phusion de alta fidelidade permitem a replicação do plasmídeo inteiro e a subsequente circularização do produto de PCR por T4 ligase.

Mutações pontuais foram introduzidas através dos *primers forward* desenvolvidos (Tabela 5).

Tabela 5: Mutações direcionadas planejadas e *primers* correspondentes. Os códons afetados estão sublinhados, enquanto as bases modificadas estão em negrito

Mutação	Primer
Q85H	ATT <u>CAT</u> TGGAATGGATGGCAGCG
F173H	ATGCG <u>CAT</u> GGTGCTGTGGGACCG
F173Y	ATGCGT <u>AT</u> GGTGCTGTGGGACCG
F173W	TCGACGCGT <u>GG</u> GGTGCTGTG
F292H	GCCCG <u>CA</u> TTTAGGGGCGCTTGTC
F292W	CCCGT <u>GG</u> TTAGGGGCGCTTGTC
F292Y	CCCGT <u>A</u> TTTAGGGGCGCTTGTC

O protocolo e o programa de termociclagem da reação de PCR estão listados em Tabela 6.

Tabela 6: Protocolo da reação de Phusion PCR à esquerda e seu programa de termociclagem à direita

Reagente	Volume [µl]	T [°C]	t [min]
Tampão Phusion (5x)	2,0	98	0:30
Taq Phusion	0,1	98	0:05
dNTP	0,2	T _m	0:20
Primer forward 5 uM	0,6	72	1:45
Primer reverse 5 uM	0,6	72	7:00
DNA molde	0,2		
H ₂ O	6,3	4	∞

} 30x

4.14. Rastreamento e seleção de clones positivos

Para a realização do ensaio colorimétrico para a detecção de atividade enzimática através de descarboxilação, foi preparada uma solução de 5% de produto de ensaio de atividade (item 4.12) e 95% de 1 mM ABTS sal diamônio (Sigma-Aldrich, EUA) com 0,5 U/mL de peroxidase de raiz forte (Sigma-Aldrich, EUA).

Em paralelo, uma curva padrão com amostras de referência, contendo concentrações de 0 a 100 μM de peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil), foi realizada para obter a relação entre absorvância a 405 nm e a concentração de peróxido de hidrogênio por meio de regressão linear.

Depois de um tempo de incubação de 15 minutos a 25 °C, a absorvância da solução em um comprimento de onda de luz de 405 nm foi obtida através de um espectrofotômetro.

4.15. Automatização robótica dos ensaios de desenho de proteínas

A programação da automatização utilizando a plataforma robótica foi integralmente desenvolvida como parte desse trabalho.

4.15.1. Sistema de rastreamento de alto desempenho

O sistema de rastreamento de alto desempenho utilizado neste trabalho permite a execução precisa e contínua de uma variedade de protocolos. O equipamento consiste de três componentes principais: plataforma de pipetagem Microlab STARlet (Hamilton Robotics), estufa automatizada Cytomat 2 C-LIN (Thermo Scientific) e espectrofotômetro SpectraMax Plus384 (Molecular Devices).

A realização de experimentos nessa plataforma é programada no pacote Venus Two, uma interface de software proprietária da Hamilton Robotics. Os procedimentos a serem realizados pela plataforma robótica foram programados através de uma sequência de blocos de ações e ajustes de seus parâmetros, como esquematizado na Figura 11.

A plataforma de pipetagem STARlet disponibiliza uma variedade de componentes na superfície de trabalho (*deck*) e no seu braço de pipetagem. A Figura 12 mostra a parte interna do STARlet, onde, da esquerda para a direita, estão localizadas posições para carregadores (*racks*) de ponteiros de diversos volumes, suportes para recipientes de reagentes de 50 e 200 mL, tubos de ensaio e placas de microtitulação (MTP).

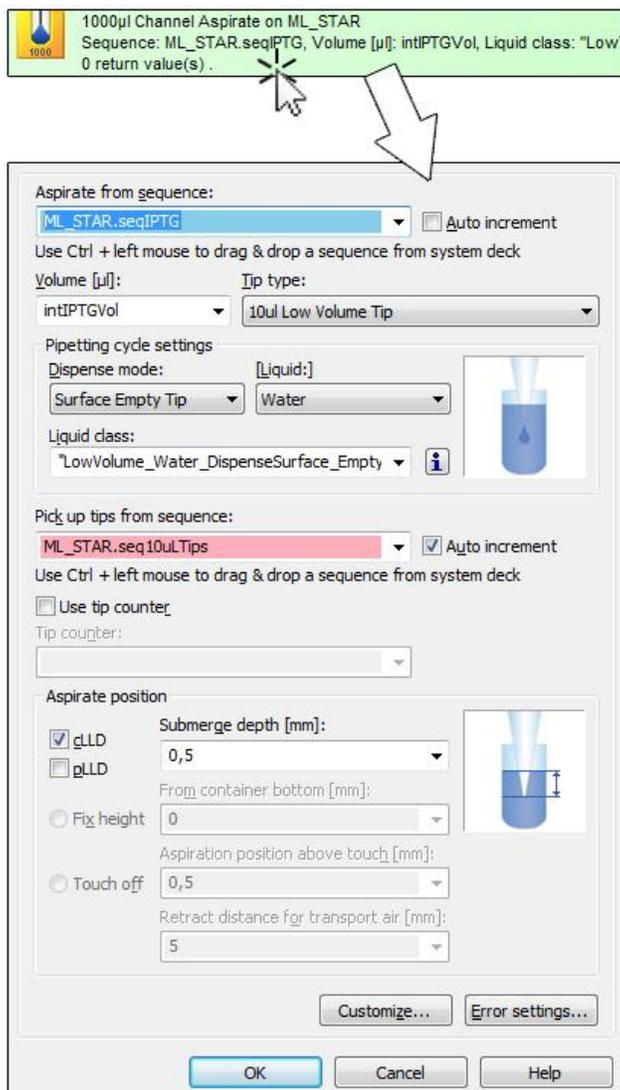


Figura 11: Bloco de ação “aspire” e seus parâmetros no software “Hamilton Venus Two”. Primeiro a sequência de locais de aspiração de líquido é definida em “Aspirate from sequence” com opção de incremento automático da sequência. “Volume [µl]” permite a definição do volume de líquido aspirado. “Tip type” informa o tipo de ponteira utilizada para a operação. “Dispense mode” define o modo de dispensação do líquido. “Liquid” permite o ajuste da pipetagem ao tipo de líquido usado. O item escolhido como “Liquid class” contém parâmetros físicos sobre como o líquido é manipulado durante aspiração e dispensação. As ponteiras para o passo de aspiração são adquiridas nos locais definidos pela sequência escolhida em “Pick up tips from sequence” com opção de incremento automático da mesma. A opção “Use tip counter” permite a contagem contínua de ponteiras usadas. O modo de aspiração de líquido pode ser monitorado por cLLD (detecção de nível de líquido por condutividade) ou pLLD (detecção de nível de líquido por pressão). Detectando o nível de líquido no local de aspiração, a ponteira entra no líquido pelo valor informado em “Submerge depth”. Negando o uso dos dois modos de detecção de nível, os parâmetros “From container bottom”, “Aspiration position above touch” e “Retract distance for transport air” permitem a definição de alturas (eixo z) para a aspiração de líquido.

A garra acima dos racks de ponteiras é a ferramenta iSWAP, que possibilita o transporte de placas para as posições do suporte ao lado direito e alcançar posições fora dos limites do *deck*. As ferramentas CO-RE Grip, posicionadas na barra de descarte, localizada à direita na frente da figura, são acessadas através de dois canais de pipetagem do STARlet e somente podem ser utilizadas para alcançar posições dentro dos limites do *deck*.

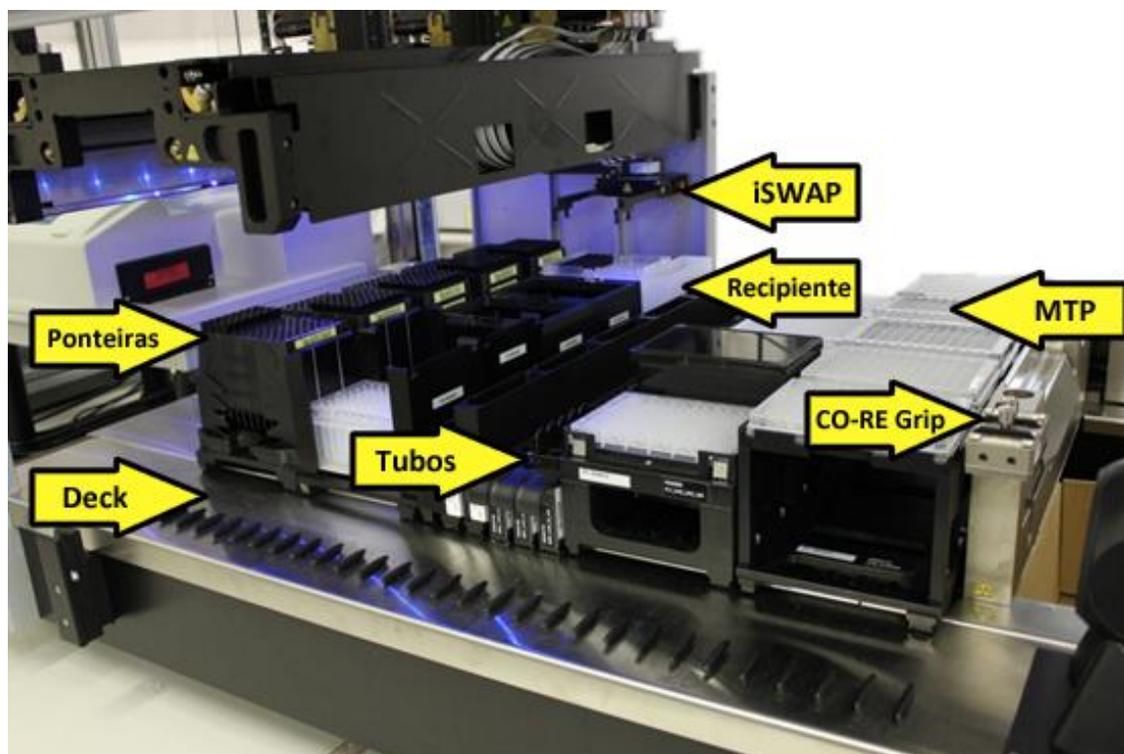


Figura 12: O *deck* do Microlab STARlet. A superfície de trabalho (*deck*) contém acessórios para acomodar diferentes consumíveis. Ponteiras de diversas capacidades, recipientes para reagentes, tubos de ensaio, placas de *deep-well* e de microtitulação, entre outros, podem ser utilizados.

O STARlet possui oito canais de pipetagem (Figura 13). Utilizando placas de 96 poços, a plataforma consegue transferir líquido para uma coluna da placa em uma única operação. A aspiração do líquido é realizada por deslocamento de ar, similar às pipetas manuais. O movimento dos canais é livre em todas as direções, podendo alcançar todas as posições dentro dos limites do *deck*.

As ponteiras utilizadas pelo sistema são disponíveis nos volumes de 10, 50, 300 e 1000 μ l, conseguindo cobrir a faixa de 1 a 1000 μ l de volume líquido. A ligação entre o canal e a ponteira é estabelecida por um *o-ring* em volta do canal,

que é expandido quando o canal entra na ponteira, realizando a vedação. O material especial das ponteiras permite a detecção do nível de líquido por condutividade. Para líquidos não condutíveis existe o modo de detecção de nível por pressão, que funciona por aspiração contínua do canal até a detecção da mudança de pressão dentro do canal, ao tocar na superfície do líquido. Essas características permitem uma variedade de modos de pipetagem e a sua adequação às necessidades de cada aplicação. Utilizando volumes adequados para cada tipo de ponteira, as precisões das transferências de líquido, relatadas pelo fabricante do equipamento, estão na faixa de 1% (Tabela 7).

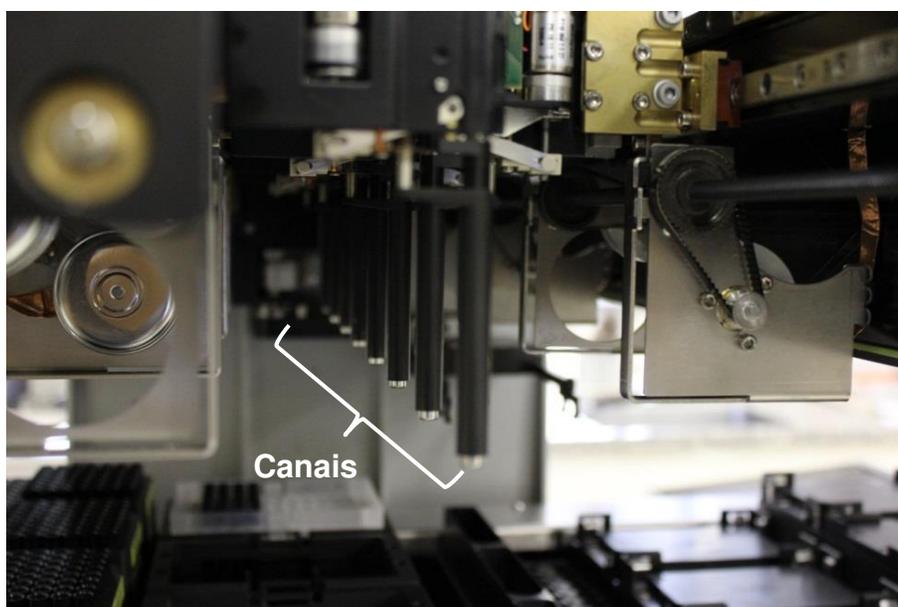


Figura 13: Os oito canais de pipetagem do Microlab STARlet, sem ponteiras.

A estufa robotizada “Cytomat” possui 31 posições para placas de microtitulação, distribuídas em dois racks (Figura 14). Controlada pelo software Hamilton Venus Two, o braço robótico da estufa consegue armazenar e retirar a placa requerida de sua posição, disponibilizando a mesma na bandeja externa da estufa, que age como interface entre a plataforma de pipetagem STARlet e o Cytomat.



Figura 14: Vista frontal da estufa Cytomat com a porta aberta.

Tabela 7: Precisão de pipetagem, relatada pelo fabricante do STARlet

Volume ponteira [μl]	Volume líquido [μl]	Precisão [%]
10	0,5	6,0
10	10	1,0
300	200	0,75

4.15.2. Montagem da biblioteca de clones

Após a produção de uma biblioteca de DNA com o gene p450 descarboxilase de *B. subtilis* diversificado (item 4.13), essa biblioteca foi inserida na linhagem de expressão *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 por eletroporação (item 4.7), usando o plasmídeo de secreção pET-22b(+). Cada uma das colônias dos clones que cresceram nas placas de LB sólido com os antibióticos ampicilina e cloranfenicol foi transferida para um poço de uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 200 µl de meio LB líquido e incubada na estufa robotizada Cytomat por 16 horas a 30 °C. Foram usados 91 clones mutantes, dois controles sem inóculo e três controles com o gene nativo por placa.

4.15.3. Expressão heteróloga de proteínas diversificadas

Inóculo

Como primeiro passo da expressão heteróloga dentro do sistema de HTS, o Cytomat retira a placa a ser processada de sua posição específica no rack e transporta para a bandeja exterior, que atua como interface entre a plataforma de pipetagem e a estufa. A garra iSWAP desloca a placa para a posição P1 no deck e em seguida transporta para a gaveta aberta do espectrofotômetro SpectraMax, para realizar uma leitura de controle das densidades óticas em cada poço da placa a 600 nm, após cinco segundos de agitação. Depois da leitura, a placa é transportada para a posição P1 pela garra iSWAP e a ferramenta CO-RE Grip transfere uma nova placa da pilha de placas para a posição P2. Em seguida, a placa é destampada pelo CO-RE Grip, deslocando a tampa para a posição T2, que permite o enchimento de todos os poços com 180 µl de meio LB líquido. O CO-RE Grip retira a tampa da placa contendo a cultura em P1 e move para a posição T1. 20 µl de cultura de cada poço são transferidos para a placa em P2 com um passo de homogeneização. As tampas de ambas as placas são repostas pelo CO-RE Grip e a placa contendo o pré-inóculo é transportada para a bandeja de interface do Cytomat pelo iSWAP. A estufa devolve esta placa para a sua posição original, enquanto o iSWAP desloca a placa nova de P2 para a gaveta

aberta do SpectraMax para realizar outra leitura de controle, obtendo as densidades óticas dos poços da placa inoculada a 600 nm após cinco segundos de agitação. O iSWAP retorna a placa para a posição P2 e a transporta para a bandeja de interface da estufa para ser transferida para a próxima posição vazia no rack da estufa, onde permanece incubada a 30 °C por 2,5 horas. A placa de pré-inóculo é retirada e armazenada em câmara fria a 4 °C.

Indução e complementação

Após este tempo de incubação, a placa é retirada da estufa, destampada pelo CO-RE Grip e a cultura é homogeneizada por pipetagem. A tampa é devolvida para a placa e uma leitura de controle é realizada no SpectraMax. O iSWAP transfere a placa para a posição P2 e o CO-RE Grip retira a tampa antes da adição de 2 µl da mistura de 50 mM IPTG e 16,6 mM FeCl₃. A placa é tampada pelo CO-RE Grip e incubada no Cytomat a 30 °C por cinco horas.

Lise periplasmática

Seguindo o diálogo de usuário na tela do computador, a placa é retirada manualmente da estufa e centrifugada a 3.500 rpm e 4 °C por vinte minutos. Iniciando o passo de lise periplasmática por choque osmótico, as soluções de saturação e de choque osmótico geladas são disponibilizadas nos recipientes de reagentes denominados. Após o descarte do sobrenadante, a placa é repostada na sua posição original no rack do Cytomat e o diálogo é confirmado pelo usuário. Na sequência, a estufa transfere a placa centrifugada para a bandeja externa e o iSWAP desloca para a posição P1 no deck, onde é destampada pelo CO-RE Grip para a homogeneização das células em 100 µl de tampão de saturação. A placa é tampada e movida para a posição P4 e manualmente posta em um banho de gelo por dez minutos. Após ser centrifugada novamente a 3.500 rpm e 4 °C por vinte minutos, o sobrenadante é descartado e a placa é reposicionada na posição P4 para as células saturadas serem suspendidas em 50 µl de solução de choque osmótico gelada. Após dez minutos no banho de gelo, a placa é centrifugada pela terceira vez a 3.500 rpm e 4 °C por vinte minutos.

Ensaio enzimático

Em paralelo, a plataforma de pipetagem prepara o ensaio enzimático. O CO-RE Grip disponibiliza duas placas novas da pilha de placas no deck nas posições P2 e P3 e as destampa. 90 µl de tampão fosfato com ácido hexadecanóico são transferidos para cada poço da placa em P2, aspirando 300 µl e dispensando 90 µl em série, em três colunas seguidas. Os primeiros e últimos 15 µl são dispensados no recipiente de reagente de ácido hexadecanóico. A placa em P3 é preenchida com 90 µl de ácido butírico em tampão fosfato pelo mesmo método. Em seguida, 100 µl da solução de peróxido e hidrogênio são adicionados a todos os poços de ambas as placas em P2 e P3, aspirando 300 µl e dispensando 100 µl em duas colunas seguidas, descartando os primeiros e últimos 50 µl para o recipiente de reagente de peróxido de hidrogênio.

Após o retorno da placa centrifugada para a posição P4 e confirmando a continuação do método pelo diálogo de usuário no computador, a placa é transportada para a posição P1 pelo CO-RE Grip e destampada. 10 µl do sobrenadante de cada poço são aspirados e dispensados nos poços correspondentes na placa em P2 e a mesma é tampada. O mesmo processo é repetido para a placa em P3 e ambas as placas em P1 e P3 são tampadas pelo CO-RE Grip. A placa em P1 é descartada para o lixo pelo iSWAP e as duas placas em P2 e P3 são incubadas no Cytomat por uma hora a 30 °C e armazenadas nas próximas posições livres no rack da estufa.

4.15.4. Rastreamento de clones positivos

No próximo passo, ambas as placas são retornadas para as posições P2 e P3 no deck e uma placa nova é transferida para a posição P1 pelo CO-RE Grip. As tampas das placas em P1 e P2 são removidas e 190 µl de solução ABTS com HRP são adicionados em cada poço da placa em P1. Em seguida, 10 µl do ensaio enzimático com ácido hexadecanóico são aspirados da placa em P2 e misturados na placa contendo ABTS nos poços correspondentes. Ambas as placas são tampadas e a placa do ensaio enzimático em P2 é descartada para o lixo pelo iSWAP.

Uma nova placa vazia da pilha de placas é disponibilizada na posição P2 e destampada. A tampa da placa em P3 também é removida. A nova placa é preenchida com 190 µl de solução ABTS com HRP e 10 µl do ensaio enzimático com ácido butírico. O CO-RE Grip retorna as tampas para as placas e o iSWAP descarta a placa em P3 para o lixo.

Após um período de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente no deck, as absorbâncias dos poços de ambos os ensaios são medidas pelo espectrofotômetro a 405 nm, com agitação prévia de cinco segundos e devolvidas para as suas posições no deck. Finalizando o método, as placas são descartadas para o lixo pelo iSWAP.

4.15.5. Seleção de mutantes candidatos

Os valores de absorbância de cada placa foram comparados com a média das absorbâncias, resultando do desempenho das proteínas nativas expressas nos três poços de controle. Os menores valores de absorbância foram destacados pelo programa Microsoft Excel e as culturas dos poços escolhidos foram inoculadas em 4 mL de LB líquido, contendo os antibióticos ampicilina e cloranfenicol e incubadas a 37 °C *overnight*. As culturas foram armazenadas a -80 °C em meio LB, contendo 15% glicerol.

4.15.6. Agendamento do processo HTS

Para permitir o processamento automatizado de mais de uma placa por dia, foi utilizado o módulo “Scheduler”, que faz parte do pacote de software “Venus”. O agendamento é realizado após a avaliação da disponibilidade dos recursos da plataforma durante cada passo do método. Feito isso, o módulo encaixa ações em períodos de intervalo de cada um dos recursos da plataforma robótica e permite ensaios paralelos em até oito placas por dia. A Figura 15 mostra um agendamento feito para o processamento de quatro placas em paralelo. Barras cinzas representam períodos de intervalo dos recursos da plataforma. Na parte de baixo,

os três recursos da plataforma de HTS estão listados (ML Star, Cytomat e SpectraMax) e os blocos coloridos indicam a duração de cada ação dos mesmos.

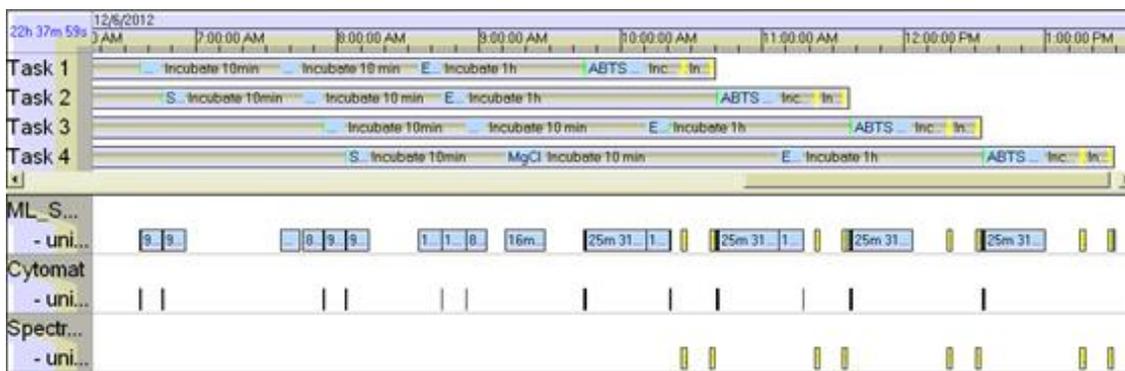


Figura 15: Visualização de um agendamento de quatro processos em paralelo, no módulo “Scheduler”.

4.16. Métodos analíticos

4.16.1. GC-MS

A identificação e quantificação de compostos químicos foram realizadas através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Waters Micromass Q-TOF). Uma coluna HP-5-MS (30 m x 0,25 mm; filme 0,25 µm) com fluxo de 1 mL/min de hélio foi utilizada para a separação das moléculas. Foram injetados 10 µl de cada amostra com um *split* de 5 e uma temperatura de 280 °C no injetor. A temperatura do forno foi mantida a 100 °C por 5 min e aumentada gradualmente para 280 °C, com uma taxa de 20 °C/min. A temperatura de 280 °C foi mantida por mais 3 min. A temperatura do detector foi ajustada para 280 °C e a faixa de 50 a 500 m/z foi escaneada pelo equipamento (adaptado de RUDE et al., 2011).

Antes da corrida, a fase orgânica das amostras de 1,5 mL foi extraída pela adição de 300 µl de acetato de etila. O extrato foi derivatizado com 50 µl de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano (Sigma) a 60 °C por 20 min para evitar a perda de sinal do substrato diante da alta temperatura durante a injeção (adaptado de RUDE et al., 2011).

4.16.2. HPLC

A quantificação de ácido butírico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC, em um cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414) e detector de arranjo de fotodiodos (Waters 2998). Foi utilizada uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm, BioRad) aquecida em um forno a 35 °C, H₂SO₄ 2 mM (pH 2,3) como fase móvel e um fluxo de 0,6 mL/min.

4.17. Sequenciamento

Os sequenciamentos de confirmação de inserto e identificação de seqüências diversificadas foram realizados utilizando o método Sanger (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer).

A reação de PCR para o preparo de amostras para o sequenciamento está descrita na Tabela 8.

Tabela 8: Protocolo da reação de PCR para sequenciamento Sanger à esquerda e seu programa de termociclagem à direita

Reagente	Quantidade	T [°C]	t [min]
Tampão/BigDye 1:1	2,0 µl	96	1:00
<i>Primer</i> (5 pmol)	1,6 µl	96	0:10
DNA	300 ng	58	0:05
H ₂ O	q.s.p. 10 µl	60	1:00
		4	∞

} 25x

5. Resultados e discussão

5.1. Identificação do gene alvo

A patente WO/2009/085278 (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009) descreve a produção de alcenos através da ação de ácido graxo descarboxilases, nativos em micro-organismos. Utilizando o co-substrato H_2O_2 , essas enzimas convertem ácidos graxos de cadeia par entre doze e vinte carbonos em um alceno, liberando uma molécula de dióxido de carbono (RUDE et al., 2011).

Cinco enzimas, cada uma delas produzida por uma bactéria diferente, são descritas na patente mencionada (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009). Nessa patente foram relatados motivos supostamente característicos para ácido graxo descarboxilases. No presente trabalho, estes motivos foram confirmados como conservados nos genes dos cinco organismos pelo algoritmo de alinhamento ClustalW (LARKIN et al., 2007). Os alinhamentos podem ser visualizados no Quadro 1. Como o motivo 3 (em vermelho) é um trecho de motivo 4 (laranja e vermelho), o resultado de ambos está reunido em uma única tabela.

Além dos cinco genes relatados na patente, foram identificados outros genes com o potencial de função das enzimas ácido graxo descarboxilase. O algoritmo Fuzzpro (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000) permite a busca de motivos em bancos de dados de sequências genômicas e foi aplicado ao banco de dados do NCBI, rastreando sequências proteicas pelos padrões dos motivos 1 a 4.

Sobrepondo os resultados da análise Fuzzpro, foi identificado um organismo adicional que contém um gene com todos os motivos característicos para a atividade de ácido graxo descarboxilase (Figura 16). Descrito como proteína hipotética CA_C3330, o gene de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) foi considerado um dos candidatos para os ensaios de atividade de enzimas ácido graxo descarboxilase nativas.

Outra análise bioinformática, utilizando o Modelo Markov Escondido (HMM), também lista este gene (CA_C3330) como um dos homólogos mais similares aos cinco genes descritos na patente.

Quadro 1: Confirmação de ocorrência de motivos de ácido graxo descarboxilase em genes candidatos. Os motivos conservados (em vermelho) foram identificados em todos os alinhamentos dos cinco genes especificados na patente WO/2009/085278 (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009).

Motivo 1: FXXE [VI] [RK]RXYPF {F} PX [LIV]

```

M. populi -----AAERFTDEVRRFYPIPFI GGRVRAPFHFGGHDFREGEWVLM D 326
B. subtilis -----EREMFVQEVRRYYPFGPFL GALVKKDFVWNNCEFKKGTSVLL D 317
Jeotgal. sp -----YAYKFAQEVRRYYPFVPFL PGKAKVDIDFQGV TIPAGVGLAL D 319
C. efficiens -----PVAFFAQEVRRVYPFVPML PAIATTDTEIQGCPVHEGERVIID 329
K. rhizophila GTLLDVPEAVAFAQEVRRVYPFVPML PAEVTQDTEIQGCPVHKGERVVLD 328
          *.:***** *** *:: . . . . * : : *

```

Motivo 2: PX (6) [LI] X (4) {G} [VI] [HQM] X [MLV] DGX (2) HX (2) RK

```

M. populi --DSDLFAARLLL-SPVICMSGAEAAARHFYDGHFRTRRHALPPTSFALIQ 90
B. subtilis --NSDLFQARLLG-KNFICMTGAEAAKVFYDTRFRQONALPKRVQKSLF 79
Jeotgal. sp --NTSVFQTKALGGKPFVVVTGKEGAEMFYNNDDVVQREGMLPKRIVNTLF 79
C. efficiens SPDANTPLRSRMLFKPVTIVRGSAGVELFYDNDRMKRDGAMPAVIRIPLF 91
K. rhizophila SSDSGCPVRMPLLGKQTVLVRGEEGVKLFYDTSRVRRDGAMPGVVQGPLF 83
          ::.      : .      : *      ... ** :      . *      : *      :
M. populi DHGSVMVLDGAAHLARKAMFLSLVGEELQRLAGLAERHWREAVSGWARK 140
B. subtilis GVNAIQGMDGSAHIHRKMFLSLMTPPHQKRLAELMTEEWKAAVTRWEKA 129
Jeotgal. sp GKGAIHTVDGKKHVDRKALFMSLMTEGNLNYVRELTRTLWHANTQRMESM 129
C. efficiens GEGAVHSLDGEEHRLRKRQLADVAYDDDKVAEFDALVRREVDREVVDWAR 141
K. rhizophila GAGAVHGLDGEAHRVRKNQLADMAYEDERVAAYKPFVAEELENLVARWK- 132
          . . :: : ** * ** : . :

```

Motivo 3 e 4:

{RK} X (6) [LMV] X (4) [AC] [AG] [IV] [DE] [IL] XNX (2) RPX [VI] AX (3) [FY] X (2) FX (3) A [LMV] X [DE]

```

M. populi PRNWRG-HLYRARTERWVRKVIDEIRSGRRDVPPG-AARTIAEHQDADGQ 236
B. subtilis PRHWKG-RRARPRAEWEIEVMIEDARAGLLKTTSGTALHEMAFHTQEDGS 226
Jeotgal. sp FKGYKASKEARRRVEDWLEEQI IETRKGNIHPPEGTALYEFAHWEDYLGN 229
C. efficiens LKGHALGWINRARLNWALKLIRQARAGERHVAPGSALEAMSRLVGPDGE 238
K. rhizophila AT-HLVSRLDRIALDRRFAALIKDVRAGKVNAPEDSVLAHMAALVDEHGE 228
          *      :      *      : * *      . . . .      ::      * .
M. populi RLDRTVAGVELINVLRPTVANARYIVFAAMALHDPHQRAALADGGE--- 283
B. subtilis QLDSRMAAIELINVLRPIVAISYFLVFSALALHEHPKYKEWLRSGNSR-- 274
Jeotgal. sp PMSRTCAIDLMNTFRPLIAINRFVSFGLHAMNEPITREKIKSEPD--- 276
C. efficiens LVDASIAGIELQNLTRPTVAVSLFASFAGSALVEHPEWVEKIREGGQ--- 285
K. rhizophila LVDAKTAGIELQNLTRPNVAVARFAAFAATALVEHPEWVERIRAASEQRG 278
          : *      . . : * * ** : *      : * . * : : *      :      .

```

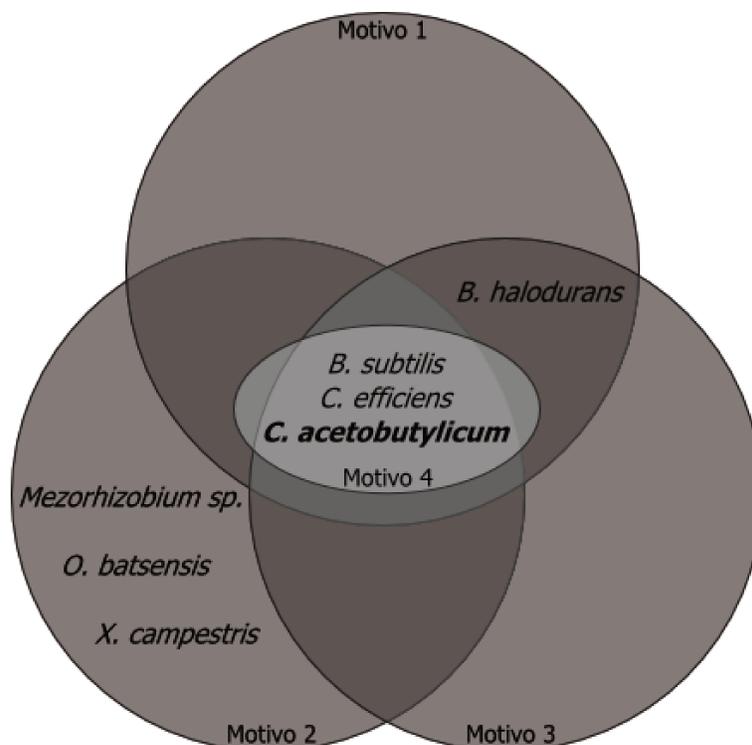


Figura 16: Sobreposição de resultados positivos da análise Fuzzpro.

Genes de *B. subtilis*, *C. efficiens* e *C. acetobutylicum* são os únicos possuindo todos os quatro motivos em questão.

Todas as enzimas identificadas fazem parte da família dos citocromos p450, com um tamanho médio de 48 kDa (1251 – 1290 pb). Essas descarboxilases são bifuncionais e agem também como hidroxilases (RUDE et al., 2011). As enzimas encontradas correspondem aos genes listados em Tabela 9.

Tabela 9: Genes candidatos para o desenho de uma descarboxilase produtora de alcenos de cadeia curta.

Nome	Sigla	Origem	Tamanho [pb]
<i>C3330</i>	A	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	1257
<i>CYP152A1</i>	B	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	1254
<i>CE2459</i>	C	<i>Corynebacterium efficiens</i> (DSM 44549)	1287
<i>OleT</i>	D	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i> (DSM 17274)	1266
<i>KRH21570</i>	-	<i>Kocuria rhizophila</i> (DSM 11926)	1251
<i>Mpop1292</i>	-	<i>Methylobacterium populi</i> (ATCC BAA-705)	1275

5.2. Isolamento dos genes

Os *primers* para a amplificação dos genes candidatos (Tabela 9) foram desenhados com o software Primer3, visando uma futura clonagem no plasmídeo pET SUMO (Invitrogen) com o resultado apresentado na Tabela 10 (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

Tabela 10: Primers utilizados para a amplificação dos genes correspondentes. Em verde a cauda pré-adaptadora, vermelho os sítios de restrição e preto a parte complementar ao gene. A T_m foi determinada em ensaios de PCR de gradiente.

Gene	Primer	Adaptador	T_m [°C]
CYP152A1 - forward	TCTAGGATCCAATGAGCAGATTCCACATGAC	BamHI	59
CYP152A1 - reverse	CTGGAAGCTTTCTTCGATAAAGGAAGAGAGCTT	HindIII	
OleT - forward	CAGTGTCGACGCAACACTTAAGAGGGATAAG	Sall	56
OleT - reverse	GACTCGAGTTATGTTCTGTCTACAACCTTCG	XhoI	
CE2459 - forward	CTGAATTCGAAGAGGTCCCACCGATGAC	EcoRI	60
CE2459 - reverse	GACTCGAGCGAAAATCCCACCACATCAG	XhoI	
C3330 - forward	CAGTGTCGACTTACTAAAAGAAAATACAGCAAAAAG	Sall	54
C3330 - reverse	GACTCGAGGTAAATTAATTCCAAAATTAAGC	XhoI	
KRH21570 - forward	CTGAATTCACTTCACCGTTCGGTCAGACCCGTTTC	EcoRI	60
KRH21570 - reverse	TCAGAAGCTTGCGCTCAGCGGGTGGTG	HindIII	

Devido ao alto conteúdo GC da região do gene Mpop1292, não foram encontrados *primers* adequados para a amplificação do gene de *M. populi*. Por esse motivo, o gene foi removido da lista de candidatos para as etapas subsequentes.

As linhagens foram reativadas e cultivadas com sucesso e o DNA genômico foi extraído (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Em seguida, as T_m dos *primers* foram determinadas por PCR de gradiente, baseadas nas T_m calculadas pelo software Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), para garantir o maior nível de especificidade da amplificação e assim a maior qualidade do isolamento dos genes candidatos (Figura 17).

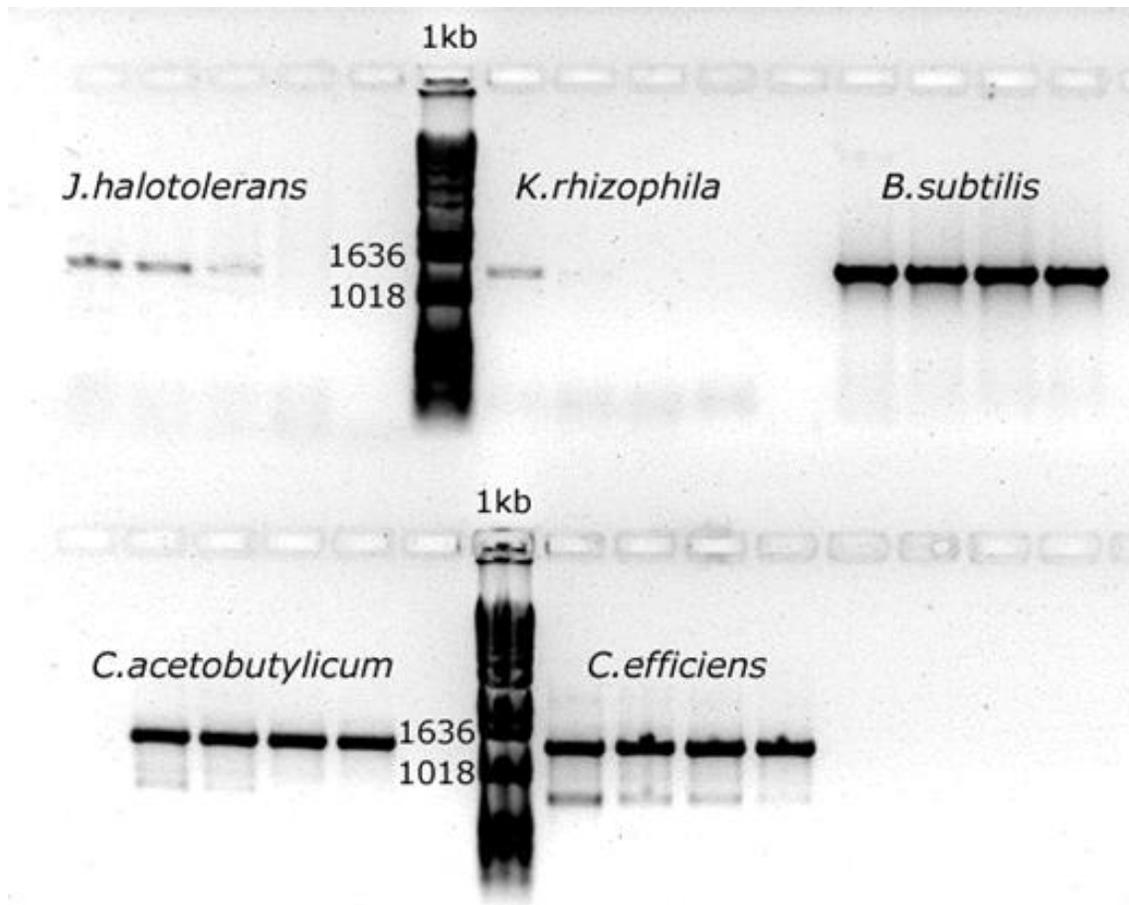


Figura 17: Gel de agarose com amostras de PCR gradiente das linhagens *J. halotolerans*, *K. rhizophila*, *B. subtilis*, *C. acetobutylicum* e *C. efficiens*, mostrando a confirmação da amplificação dos genes candidatos.

5.3. Construção de plasmídeos

5.3.1. pAP1 – pAP4

Quatro dos cinco genes candidatos (genes A – D, Tabela 9) foram inseridos no vetor de clonagem pGEM®-T Easy. A Figura 18 mostra o gel com os produtos de PCR, realizado a partir de plasmídeos dos transformantes positivos, após Miniprep. As clonagens também foram confirmadas pelo padrão de digestão dos plasmídeos após ensaios de restrição com as enzimas correspondentes aos adaptadores utilizados em cada gene.

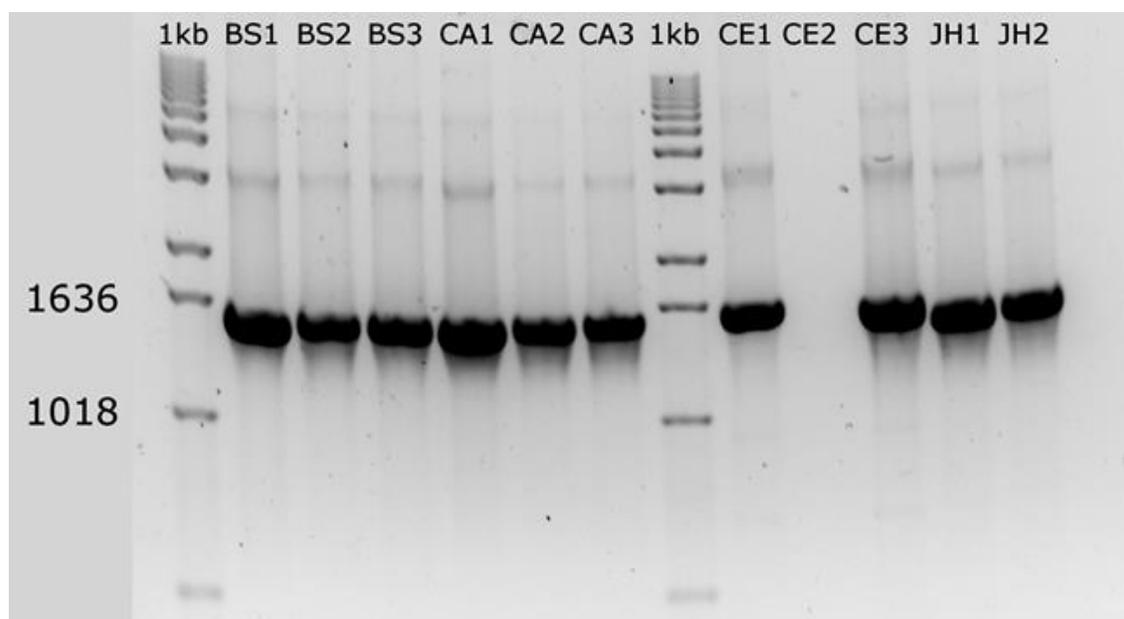


Figura 18: Confirmação de insertos após transformação de pAP1 a pAP4 em *E. coli* por Miniprep e PCR. BS = *B. subtilis*, CA = *C. acetobutylicum*, CE = *C. efficiens*, JH = *J. halotolerans*.

5.3.2. pAP5 – pAP8

Os *primers* desenvolvidos nesse trabalho, para a utilização no plasmídeo de expressão pET-28a(+), foram apresentados na Tabela 3.

Foram obtidos clones contendo os genes A – D, confirmados por extração do plasmídeo através de Miniprep, seguido de PCR com os *primers* específicos de cada gene (Tabela 3). O resultado da amplificação de cada inserto dos transformantes é apresentado na Figura 19.

As clonagens também foram confirmadas pelo padrão de restrição dos plasmídeos, através de reações de digestão com as enzimas correspondentes aos adaptadores utilizados em cada gene.

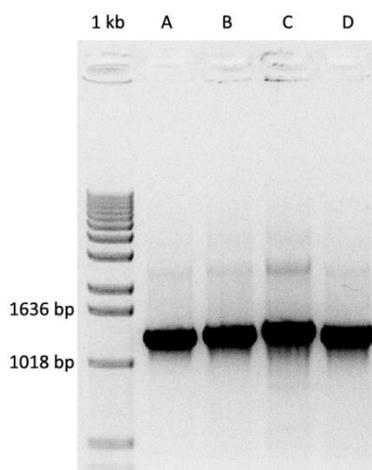


Figura 19: Confirmação de insertos após transformação de pAP5 a pAP8 em *E. coli*, extração por Miniprep, seguida de PCR. As letras denominam os genes das proteínas A a D.

5.3.3. pAP9

A transformação de *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 com o plasmídeo pAP9 (pET-22b(+) com gene de proteína B inserido) foi confirmada por amplificação do gene B, através de PCR a partir do produto de Miniprep (Figura 20).

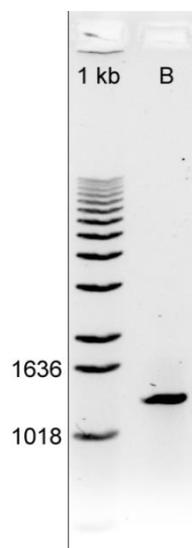


Figura 20: Confirmação do inserto após transformação de pAP9 em *E. coli*, extração por Miniprep, seguida de PCR. As letras denominam os genes das proteínas A a D.

A clonagem também foi confirmada pelo padrão de restrição do plasmídeo, após reação com as enzimas *Nco*I e *Bam*HI.

5.3.4. pAP10 – pAP16

Os plasmídeos pAP10 a pAP16 consistem de vetor de secreção pET-22b(+) e um dos genes diversificados por mutação direcionada inserido.

Tabela 11: Mutações direcionadas planejadas e *primers* correspondentes. Os códons afetados estão sublinhados, enquanto as bases modificadas estão em negrito.

Mutação	Primer
Q85H (RUDE et al., 2011)	ATT <u>CAT</u> TGGAATGGATGGCAGCG
F173H	ATGCG <u>CAT</u> GGTGCTGTGGGACCG
F173Y	ATGCGT <u>AT</u> GGTGCTGTGGGACCG
F173W	TCGACGCGT <u>GG</u> GGTGCTGTG
F292H	GCCCG <u>CA</u> TTTAGGGGCGCTTGTC
F292W	CCCGT <u>GG</u> TTAGGGGCGCTTGTC
F292Y	CCCGT <u>AT</u> TTAGGGGCGCTTGTC

5.3.5. pAP17

O plasmídeo pAP17 consiste de vetor de secreção periplásmica pET-22b(+) e o gene diversificado da proteína B inserido, que gerou a nova enzima com atividade ácido octanóico descarboxilase.

5.4. Expressão heteróloga

5.4.1. Determinação das condições ótimas

Através da comparação de intensidade das bandas nos géis de acrilamida, na fração solúvel, com tamanho de aproximadamente 48 kDa (Figura 21), a indução da expressão com 0,1 mM de IPTG se mostrou suficiente, apresentando as mesmas concentrações de proteína após 0, 2 e 4 horas, comparada com a utilização de 0,5 mM. O tempo de expressão prolongado de 16 horas não apresentou diferença na concentração proteica, comparada com a amostra retirada após 4 horas. Entre as temperaturas utilizadas (20, 30 e 37 °C), as maiores intensidades foram obtidas a 30 °C.

Dessa maneira, as condições de expressão ótimas avaliadas para a proteína B foram determinadas como 30 °C e 0,1 mM de IPTG, com um tempo de expressão de 4 horas, sendo aplicadas para os ensaios subsequentes com todas as proteínas candidatas.

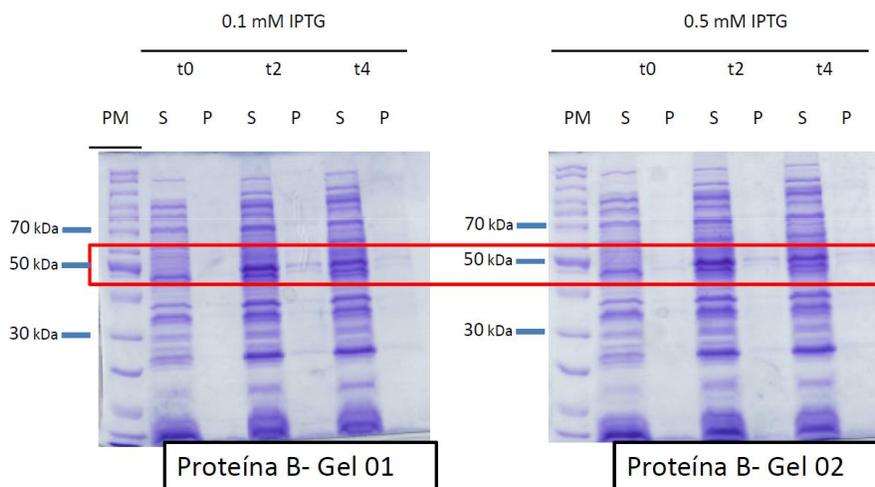


Figura 21: Resultado da expressão heteróloga da proteína B a 30 °C na cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta™ 2, ressaltando as bandas relevantes (~48 kDa). À esquerda o gel com o perfil de proteínas expressas por indução com 0,1 mM de IPTG, mostrando a mesma relação entre as frações t₀, t₂ e t₄ solúveis (colunas “S”) e insolúveis (colunas “P”) como o gel da direita, que mostra o perfil de proteínas expressas por indução com 0,5 mM de IPTG.

5.4.2. Expressão em escala pequena

Após a primeira otimização da expressão em escala pequena, os padrões de expressão das proteínas A a D foram investigados e comparados entre si, com o intuito de determinar a melhor candidata para os ensaios posteriores.

Avaliando a solubilidade das quatro enzimas, a proteína A mostrou uma solubilidade aproximada de 50%, proteína B teve o melhor desempenho com 60% na fração solúvel e as proteínas C e D foram expressas com 30% na parte solúvel, como pode ser observado na Figura 22.

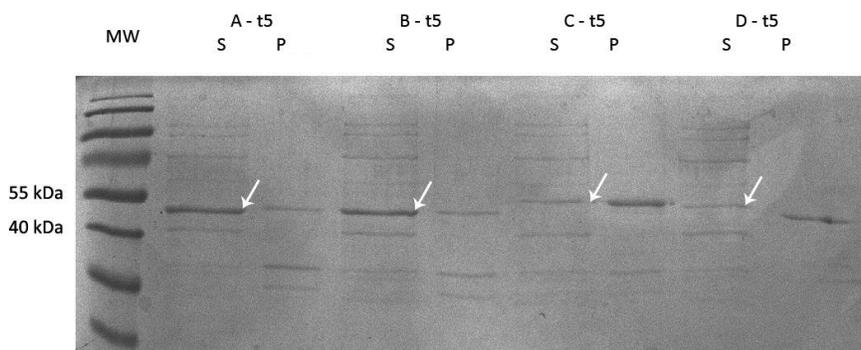


Figura 22: Proteínas A, B, C e D expressas em *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 após 5 h de indução a 30 °C, com 0,1 mM IPTG. As setas brancas apontam para as bandas das proteínas relevantes nas frações solúveis “S”. Fração “P” denomina a parte insolúvel, retida no *pellet*. A análise do padrão de bandas mostra que proteína B teve o melhor desempenho na relação entre fração solúvel e insolúvel com aproximadamente 60% solubilidade, seguida pela proteína A, com 50%. Proteínas C e D mostram solubilidade inferior, com aproximadamente 30% de solubilidade.

Aplicando o quarto modo de expressão do capítulo 4.11.1, os níveis de proteína na fração solúvel aumentaram significativamente, como visualizados na Figura 23 e descritos em Tabela 12.

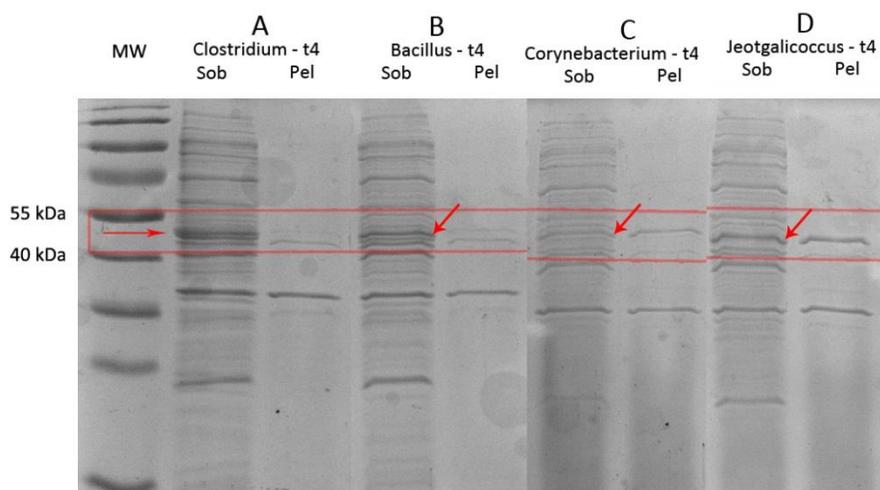


Figura 23: Proteínas A, B, C e D expressas em *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 após 4 h de indução a 30 °C com 0,1 mM IPTG e 27 mg/l FeCl₃. As setas apontam para as bandas das proteínas relevantes nas frações solúveis “Sob”. Fração “Pel” denomina a parte insolúvel, retida no *pellet*. A análise do padrão de bandas mostra que todas as proteínas foram expressas com um aumento de solubilidade, estimando o valor maior para a proteína B, com aproximadamente 80% de solubilidade, seguida pela proteína A, com 70%. Um aumento drástico foi observado para as proteínas C e D, com solubilidades de 60 e 50% respectivamente.

Tabela 12: Aumento de solubilidade de p450 descarboxilases pela expressão em *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 com 4 h de indução a 30 °C, adicionando 0,1 mM IPTG e 27 mg/l FeCl₃. O resultado mostra um aumento médio de 20% de solubilidade para todas as proteínas expressas.

**Solubilidade [%] após
indução com**

Proteína	IPTG	IPTG e FeCl ₃
A	50	70
B	60	80
C	30	60
D	30	50

5.4.3. Purificação

As proteínas ácido graxo descarboxilases candidatas foram purificadas em um sistema de cromatografia ÄKTA, utilizando a afinidade da cauda de seis histidinas (6His) das proteínas clonadas com os íons de níquel (4.11.3).

A Figura 24 mostra os cromatogramas obtidos durante as purificações. As quatro proteínas foram eluídas em aproximadamente 55 mL (pico).

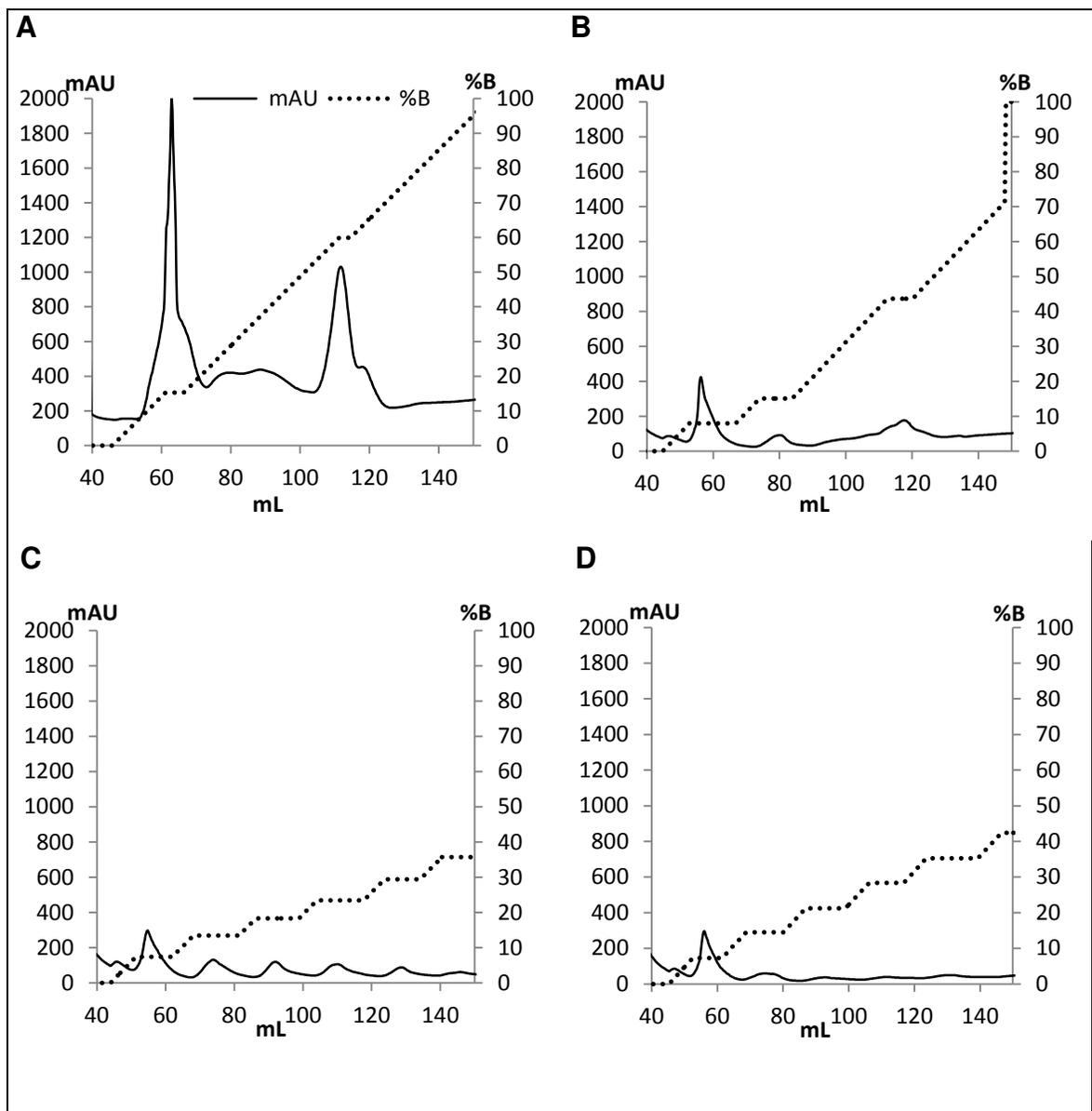


Figura 24: Cromatogramas da purificação das descarboxilases nativas no sistema AKTA. Eixo y esquerdo: mAU (concentração de proteína), eixo y direito: % de tampão de eluição, eixo x: volume de tampão passado pela coluna em mL. O pico de ácido graxo descarboxilase pode ser observado em aproximadamente 55 mL.

Os padrões de intensidade dos picos nos cromatogramas da Figura 24 representam diferentes concentrações. A proteína de maior concentração foi a

proteína A de *C. acetobutylicum*, apresentando um sinal de 2000 mAU, seguida pelas proteínas B (420 mAU), C e D (ambas 300 mAU).

As divergências entre as concentrações expressas das quatro enzimas foram confirmadas, através da aplicação das frações de proteína purificada em um gel de acrilamida (Figura 25). A coluna 5 mostra a alta concentração da proteína A. Proteína B foi purificada com alto grau de pureza (colunas 13 a 16), enquanto as proteínas C e D apresentaram bandas fracas no gel, indicando concentrações baixas.

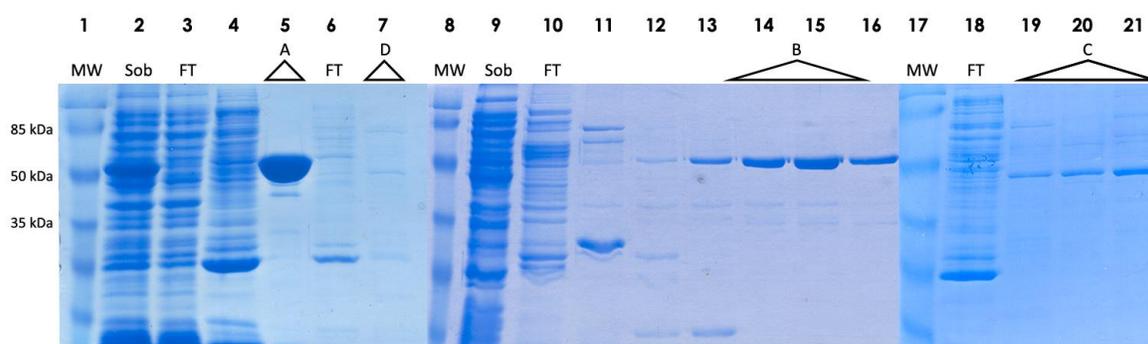


Figura 25: Resultado da purificação de proteínas A – D por afinidade (ÄKTA purifier). Da esquerda para a direita, colunas 1 a 5: Expressão da Proteína A. 1 - Marcador molecular de proteínas, 2 - fase solúvel, 3 - *flowthrough* (proteínas sem afinidade à coluna de cromatografia), 4 – primeira fração, 5 - segunda fração, com proteína A identificada pelo peso molecular. Colunas 6 a 7: Proteína D. 6 – *flowthrough*, 7 – primeira fração, com proteína D identificada. Colunas 8 a 16: Proteína B. 8 – Marcador molecular, 9 - fase solúvel, 10 - *flowthrough*, 11 - primeira fração, 12 - segunda fração, com proteína B e impurezas, 13 – terceira fração, com aumento de concentração da proteína B, 14 - quarta fração, com proteína B em alto grau de pureza, 15 - quinta fração, com proteína B em maior concentração e grau de pureza, 16 - sexta fração. Colunas 17 a 21: Proteína C. 17 – Marcador molecular, 18 – *flowthrough*, 19 – primeira fração, com proteína C visível, 20 – segunda fração, com proteína C identificada e menor grau de impurezas, 21 – terceira fração, com proteína C em maior concentração.

5.4.4. Quantificação

Os valores resultantes da quantificação através do método Bradford das proteínas purificadas estão apresentados em Tabela 13. A proteína A foi produzida, apresentando a maior concentração, de 620 µg/mL, seguida pelas Proteínas B e C, ambas no mesmo patamar, com 265 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. A proteína D foi obtida com a menor concentração, de 142 µg/mL.

Tabela 13: Quantificação de proteínas por método Bradford a 595 nm.

Proteína	c [µg/mL]
A	620
B	265
C	256
D	142

5.4.5. Secreção

Após a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 com o plasmídeo pAP9 (item 5.3.3), a expressão heteróloga em escala pequena de 50 mL foi conduzida para confirmação da expressão secretada da descarboxilase. A proteína foi extraída seguindo o protocolo de lise periplasmática (item 4.11.4) e identificada em um gel de acrilamida (Figura 26).

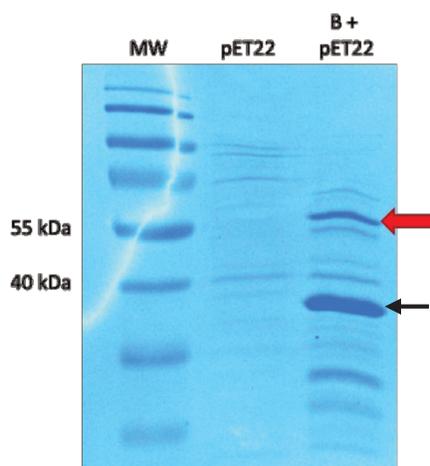


Figura 26: Confirmação da expressão secretada da enzima descarboxilase. A cepa transformada somente com o plasmídeo de secreção (coluna “pET22”) não apresenta bandas significativas na região de tamanho molecular de 57 kDa. A seta vermelha aponta para a banda representando a enzima ácido graxo descarboxilase, proteína B, expressa e secretada para o periplasma da cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta™ 2 (coluna “B + pET22”). A seta preta indica a banda do peptídeo sinal pelB, de tamanho molecular de 37 kDa.

Com a funcionalidade da secreção da proteína heteróloga confirmada, essa estratégia de expressão foi selecionada para ser aplicada nos passos posteriores desse trabalho, nos ensaios de rastreamento de HTS. A secreção da proteína facilita as etapas de lise de células para a extração da proteína, antes dos ensaios

enzimáticos dos passos subsequentes do método de rastreamento automatizado. Em contraste com a necessidade de aplicação de técnicas que requerem manipulação manual como a sonicação, a secreção possibilita a extração da proteína na plataforma robótica através de choque osmótico.

5.5. Ensaios de atividade enzimática das descarboxilases nativas

A análise dos ensaios enzimáticos por GC-MS com o substrato ácido hexadecanóico mostrou as atividades de descarboxilação de todas as enzimas, de A a D. Foram detectadas quantias de ácido hexadecanóico trimetilsililéster, substrato derivatizado, e 1-pentadeceno, produto da descarboxilação, que foram comparadas com os padrões das mesmas substâncias e os espectros de massa dos respectivos picos. Através dessas análises, a proteína B de *B. subtilis* foi avaliada como a mais promissora para ensaios de melhoramento de alto desempenho, sendo a escolhida como enzima molde para os ensaios de diversificação, na estratégia de desenho de proteínas.

Mesmo sendo a segunda melhor, considerando a média de produção absoluta de 1-pentadeceno, a proteína B mostrou a maior capacidade de consumo de ácido hexadecanóico e tem características de alta solubilidade na expressão heteróloga. Essa facilitação do processo para a obtenção da enzima foi decisiva na escolha entre as enzimas B e C.

A Figura 27 mostra a produção absoluta das quatro enzimas testadas, comparando as concentrações finais do produto desejado da descarboxilação do substrato ácido hexadecanóico, o 1-pentadeceno, após o ensaio enzimático descrito no item 4.12.

Partindo de uma concentração de 100 μM de ácido hexadecanóico em 1 mL de solução de ensaio, foram detectados 1,0 a 6,1 μM do produto 1-pentadeceno, após 30 minutos de incubação. Nesse ensaio, a proteína C mostrou o melhor desempenho, produzindo 6,1 μM de 1-pentadeceno, seguida pela proteína B com 5,3 μM de produto, o que significa uma diferença de 14%.

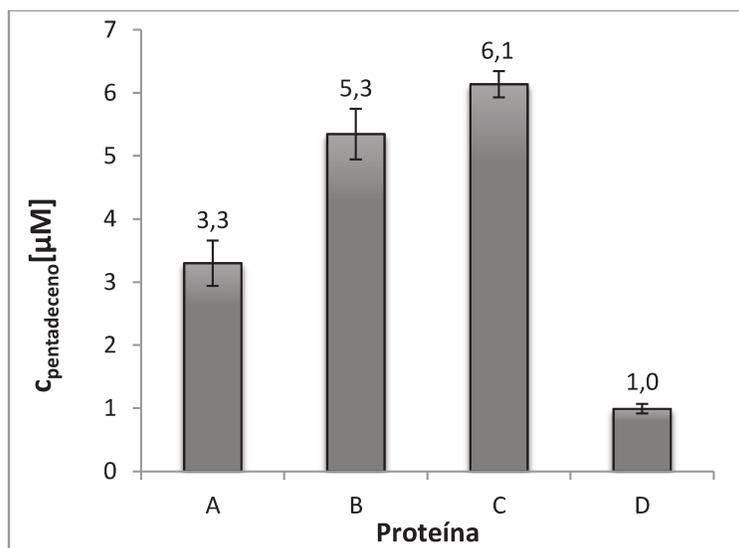


Figura 27: Produção enzimática de 1-pentadeceno a partir de 100 μM ácido hexadecanóico, em 30 min ea 25 °C, pelas ácido graxo descarboxilases A – D. As concentrações foram determinadas por GC-MS. A proteína C se destacou, produzindo 6,1 μM de 1-pentadeceno e a proteína B, escolhida para os ensaios de desenho de proteínas, apresentou 5,3 μM .

Para confirmar os resultados obtidos e aumentar a comparabilidade, os valores absolutos gerados através de GC-MS após os ensaios enzimáticos foram normalizados, aplicando-se o mesmo valor de concentração de enzima para todos os quatro ensaios. Seguindo a quantificação através do método *Bradford* (item 5.4.4), o desempenho de cada proteína foi avaliado pela comparação de suas atividades específicas. Como pode ser visualizado na Figura 28, as proteínas B e C apresentam valores de atividade específica próximos. A proteína B exibiu $1,1 \times 10^{-8}$ U/mg de atividade, enquanto que a proteína C obteve um valor de $1,2 \times 10^{-8}$ U/mg. A diferença se enquadra em torno de somente 8% neste caso, confirmando o bom desempenho da proteína B e justificando a escolha dessa enzima dentre as candidatas.

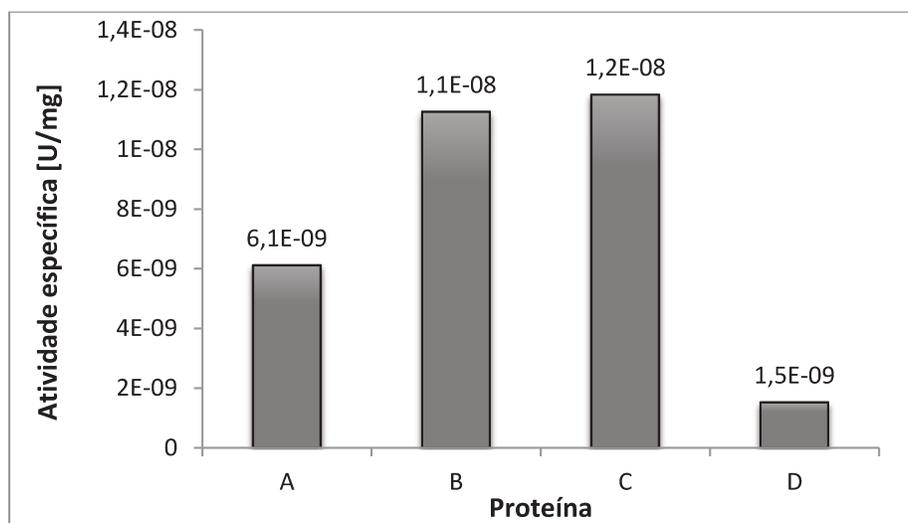


Figura 28: Atividades específicas das enzimas ácido graxo descarboxilases A – D. Foram utilizados os dados dos ensaios de atividade (Figura 27) e das quantificações das respectivas proteínas pelo método *Bradford* (item 5.4.4).

Após os ensaios com todas as quatro proteínas candidatas, foram determinadas as concentrações residuais do substrato ácido hexadecanóico para cada enzima. A proteína B apresentou o maior consumo do substrato após os ensaios enzimáticos com ácido hexadecanóico (Figura 29). Como o consumo da proteína B atingiu mais de 50% do substrato presente e a proteína C somente processou em torno de 20%, a afinidade da proteína B ao substrato ácido hexadecanóico se mostra maior do que a da proteína C.

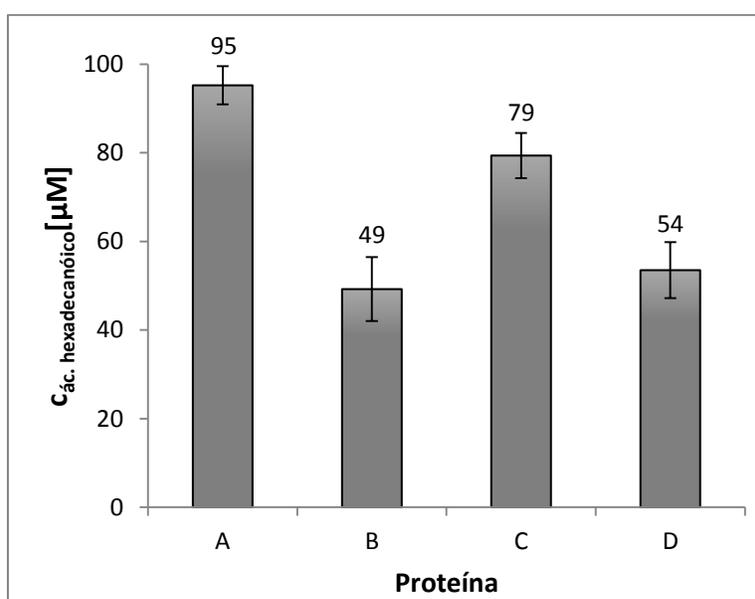


Figura 29: Concentrações residuais do substrato ácido hexadecanóico após ensaios enzimáticos com as enzimas ácido graxo descarboxilases A – D, determinadas por GC-MS. Foi utilizada uma concentração inicial de 100 µM ácido hexadecanóico, um tempo de reação de 30 min e uma temperatura de 25 °C. A proteína B apresentou o melhor desempenho, consumindo 51% de substrato.

O maior consumo de substrato apresentado pela proteína B resulta em um maior potencial de conversão através da mesma. Uma taxa alta de conversão de substrato se mostra benéfica para a produção de novos compostos com utilização da enzima modificada. Sendo assim, a proteína B foi selecionada para os próximos passos.

Testes com as quatro enzimas A – D, utilizando ácido butírico como substrato, mostraram que nenhuma das quatro proteínas apresenta a capacidade de consumir ácido butírico. A Figura 30 ilustra que as amostras controle, contendo enzima inativada por calor, mostraram a mesma concentração de substrato das amostras com enzima ativa, após os ensaios enzimáticos.

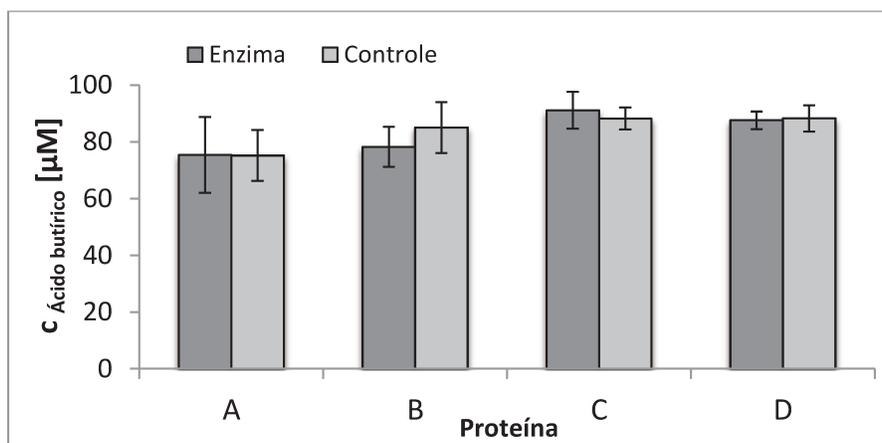


Figura 30: Análise comparativa das concentrações residuais de ácido butírico, após ensaios enzimáticos com as proteínas A – D, partindo de 100 µM de ácido butírico, determinadas por HPLC. Não foi detectado consumo significativo do substrato ácido butírico através das proteínas utilizadas.

5.6. Método de detecção de atividade de ácido graxo descarboxilase

UV

O aumento de absorção da solução de reação em luz UV 190 nm, durante o ensaio enzimático, mostrou que os percursos das curvas de absorção das reações catalisadas por enzimas atingem o valor máximo de absorção mais cedo do que as não catalisadas (Figura 31). Essa diferença distinta oferece uma possibilidade de detecção de atividade enzimática, porém exige a leitura de cada placa por um período extenso durante o ensaio. Isso impossibilitou o uso do equipamento para o processamento de múltiplas placas em paralelo. A distinção automatizada das duas curvas e a determinação do grau de diferença para a comparação entre as amostras também exigiria métodos matemáticos e estatísticos elaborados.

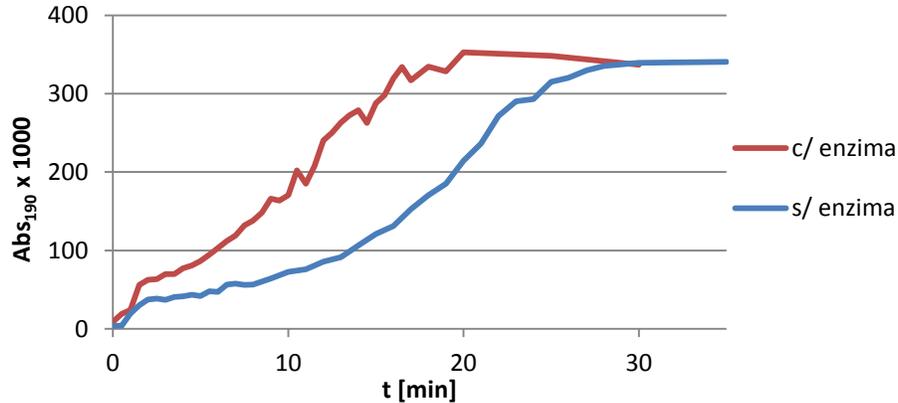


Figura 31: Absorção em luz UV 190 nm de ensaios enzimáticos com proteína A (vermelho) e sem enzima (azul), com substrato ácido hexadecanóico. Utilizando a proteína, a absorbância sofre um aumento significativamente mais rápido do que é o caso sem a proteína. Esse fato possibilita a detecção de atividade enzimática pelo monitoramento da reação por medidas de absorbância.

Água de bromo

O método de descoloração de água de bromo por alcenos foi testado com o sobrenadante de uma fermentação de *E. coli* para a expressão de proteínas e não houve interferência através de meio e metabolitos no processo de descoloração. Após adição de água de bromo, o meio passou a apresentar uma coloração marrom e se descorou para a cor amarela clara original somente após a adição de 1-hexeno.

Os ensaios enzimáticos não mostraram resultados conclusivos no teste com água de bromo. Enquanto os ensaios contendo alcenos descoravam a solução totalmente, aqueles contendo ácido graxo descoravam a solução parcialmente.

Como a descoloração de água de bromo não permitia testes quantitativos através da medição de absorbância, conclui-se que essa metodologia também somente poderá ser usada na detecção de alcenos em grandes concentrações e não foi considerada viável para a realização em ensaios de HTS.

ABTS

Através da utilização de ABTS, foi desenvolvido um método colorimétrico para a detecção de atividade de descarboxilases que utilizam ácidos graxos como substratos e geram alcenos como produtos.

O ensaio desenvolvido é compatível com sistemas de rastreamento de alto desempenho, por ser somente composto por passos de transferência de líquidos, intervalos de incubação e leituras de absorbância, além de oferecer a opção de ser realizado em placas de microtitulação de 96 poços.

Aplicando a relação entre absorbância e concentração de peróxido de hidrogênio, obtida através de regressão linear, a diferença de absorbância entre a referência e a amostra representa a quantidade de peróxido de hidrogênio consumida pela ácido graxo descarboxilase (Figura 32). Sendo uma reação equimolar, este valor é igual à quantidade de produto.

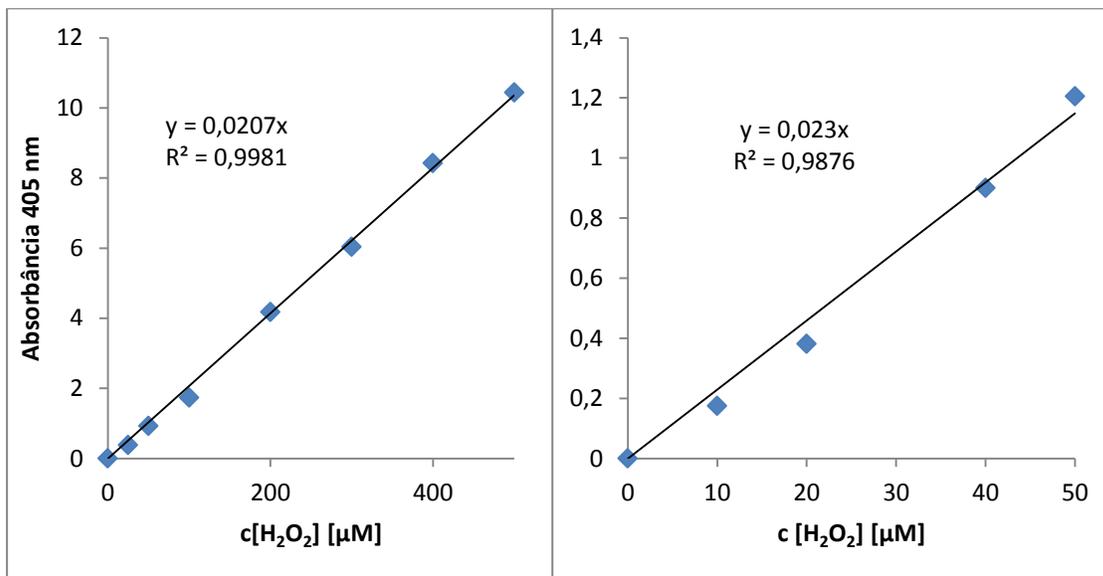


Figura 32: Relação entre concentração de peróxido de hidrogênio e absorbância 405 nm. Após reação com 1 mM ABTS, faixa entre 0 e 500 μM H₂O₂ à esquerda, 0 e 50 μM à direita. 40% amostra e 60% ABTS.

Duas curvas padrão foram realizadas, determinando a correlação entre concentração de peróxido de hidrogênio e absorbância a 405 nm. As correlações se mantiveram lineares, utilizando curvas de 0 a 500 μM e 0 a 50 μM de peróxido (Figura 32).

Este método possibilita a detecção da diminuição de concentração de peróxido de hidrogênio após a reação e habilita a determinação passiva de atividade enzimática.

O método foi testado comparando-se a ação da enzima ácido graxo descarboxilase CYP152A1 de *B. subtilis* com uma alíquota da mesma enzima inativada por calor (10 minutos a 95 °C). As soluções a serem analisadas foram preparadas, seguindo o protocolo de ensaio de atividade enzimática (item 4.12) e diluídas a 1:20 e 1:100 em 1 mM ABTS. Os resultados obtidos mostram que a diluição da amostra e conseqüentemente, do conteúdo de peróxido de hidrogênio, não afeta a relação entre os dois conjuntos de valores medidos. Enquanto a razão entre o conteúdo de peróxido de hidrogênio da proteína ativa e inativa é de 0,857, com fator de diluição de 20, essa razão mostra um valor de 0,829, diluindo a amostra a 1:100.

Como as proporções entre as duas diluições se mantiveram, o ensaio foi adaptado para o uso no sistema de HTS dentro dessa faixa de diluição. Para manter os valores de absorbância nas placas de microtitulação baixos, evitando assim passos de diluição desnecessários, foi escolhida uma diluição de 5% de amostra em 95% de 1 mM ABTS para os ensaios no sistema de HTS, que resulta em 10 μl de amostra e 190 μl de ABTS para o volume de trabalho de 200 μl . Esta proporção também evita a pipetagem de volumes muito pequenos (< 5 μL), aumentando a precisão do ensaio.

5.7. Desenho de proteínas

5.7.1. Evolução dirigida

Como três trechos na cadeia peptídica da enzima alvo estão envolvidos na formação da bolsa de ligação do substrato ácido graxo (AA 70 - 79, 170 - 173, 242 - 292), a sequência inteira do gene foi submetida a mutações aleatórias (Figura 33) (LEE et al., 2003).

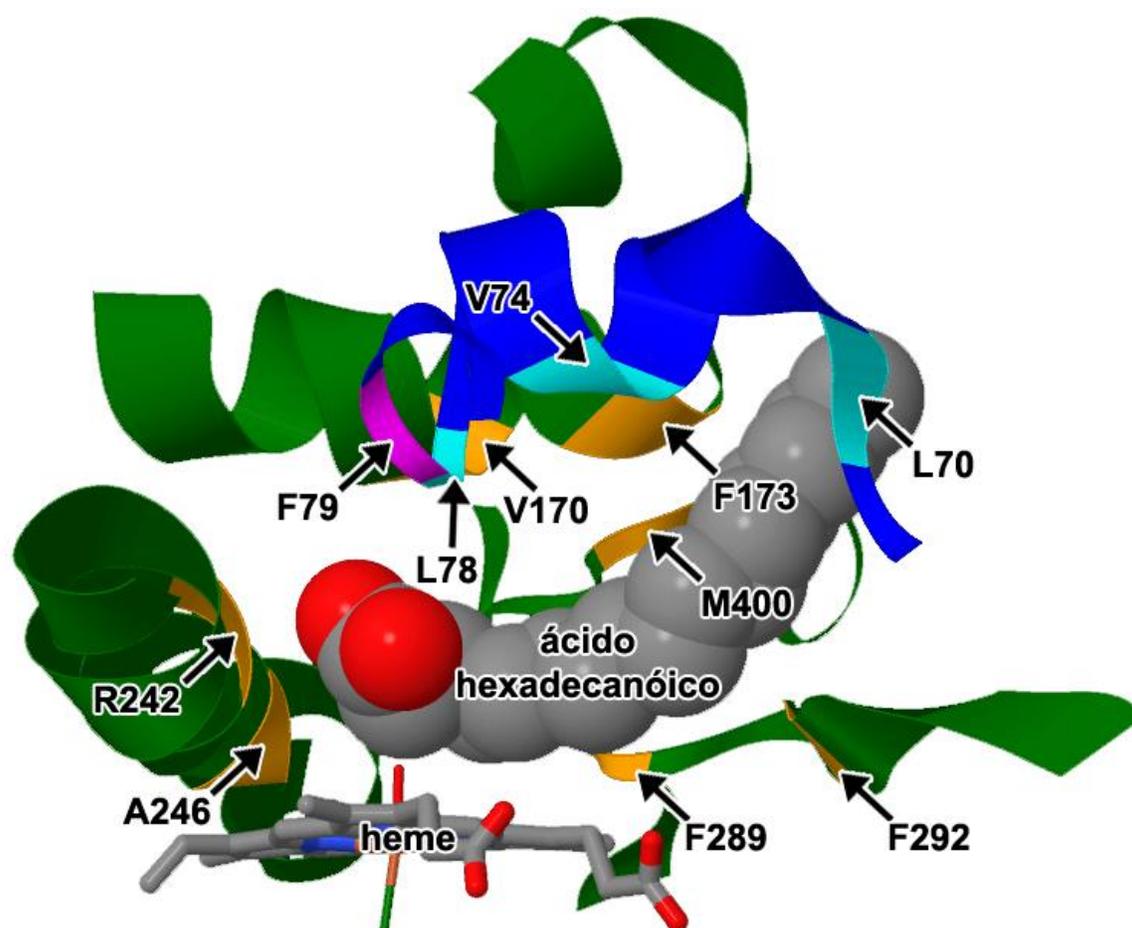


Figura 33: Bolsa de ligação de substrato na enzima P450_{BSβ} (LEE et al., 2003). O substrato ácido hexadecanóico está cercado por aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. Na parte de baixo, o grupo heme posiciona a cabeça hidrofílica do ácido graxo para realizar a reação no centro ativo.

O alvo desta manipulação é a alteração da afinidade da enzima, possibilitando a produção de alcenos a partir de substratos de cadeias inferiores a doze carbonos, o que não é possível utilizando enzimas nativas.

As condições do método de epPCR, utilizado para a diversificação aleatória, foram padronizadas para a geração de quatro mutações não-silenciosas por gene e resultou no protocolo descrito no capítulo 4.13.1. A Tabela 14 lista os ensaios realizados para a padronização do protocolo, variando a concentração de $MgCl_2$ de 2,5 a 7,5 mM e de $MnCl_2$ de 50 a 150 μM . O alvo de quatro mutações não-silenciosas foi atingido, suplementando a reação de PCR com 5 mM $MgCl_2$ e 150 μM $MnCl_2$.

Tabela 14: Relação entre concentrações de $MgCl_2$ e $MnCl_2$ e número de mutações não-silenciosas inseridas no gene *CYP152A1*. Entre parênteses o número de mutações silenciosas. O resultado desejado de quatro mutações não-silenciosas foi alcançado com 7,5 μl de 1 mM $MnCl_2$ e 10 μl de 25 mM $MgCl_2$.

Número de mutações por epPCR

25 mM $MgCl_2$	1 mM $MnCl_2$		
	2,5 μl	5 μl	7,5 μl
5 μl	0 (0)	1 (1)	2 (2)
10 μl	2 (0)	3 (2)	4 (1)
15 μl	2 (2)	5 (2)	7 (3)

O mapa de distribuição de mutações aleatórias introduzidas por epPCR, apresentado na Figura 34, criado através da utilização do programa Geneious (BIOMATTERS, [s.d.]), mostra as sequências diversificadas de quatro amostras amplificadas pelo protocolo desenvolvido como barras duplas. Os campos coloridos representam as mutações geradas. A linha de cima mostra mudanças nucleotídicas, a de baixo ressalta mudanças na sequência de aminoácidos. Como pode ser observado em amostra 1, por exemplo, houve uma mutação silenciosa na posição 402, mantendo o códon do aminoácido original.

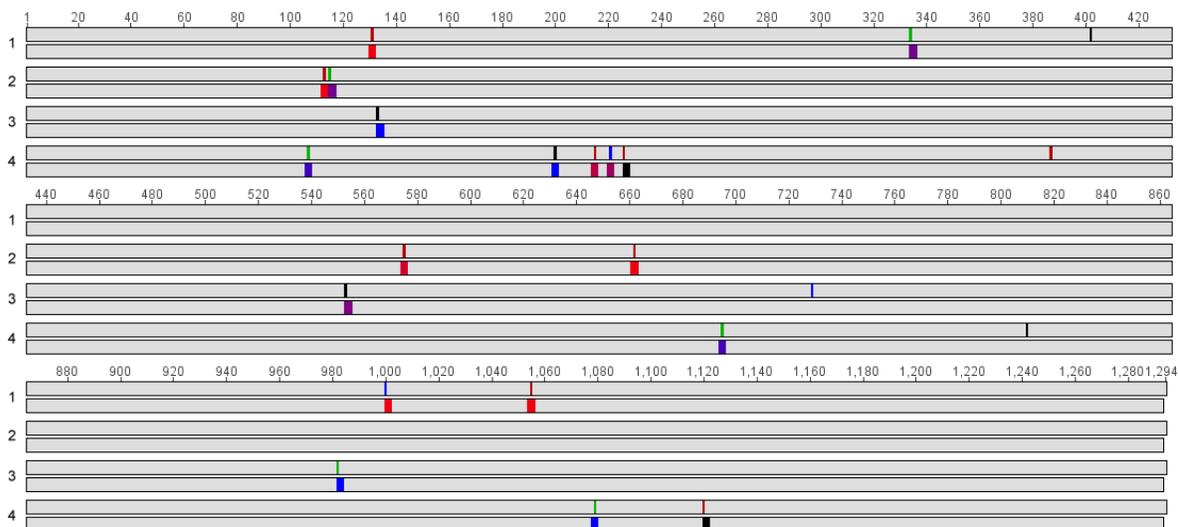


Figura 34: Mapa de mutações aleatória introduzidas por epPCR. As filas 1 a 4 representam quatro clones diversificados. A barra de cima ressalta mutações pontuais na sequência de DNA, enquanto a barra de baixo mostra mudanças na sequência proteica. Amostra 1, por exemplo, apresenta cinco mutações, sendo uma delas silenciosa, pois não resultou em mudança na sequência proteica da terceira mutação.

A distribuição das mutações ao longo do gene mostra que todas as regiões são afetadas pelas alterações aleatórias e que a quantidade de mutações pontuais inseridas é altamente controlável através das condições utilizadas durante o epPCR. Sendo assim, uma taxa constante de mudanças é introduzida em todas as áreas da sequência, permitindo a construção de uma ampla biblioteca de genes diversificados.

5.7.2. Desenho racional

A estratégia do desenho racional objetiva identificar possíveis substituições de aminoácidos envolvidos na interação entre o substrato ácido graxo de cadeia longa (doze a vinte carbonos). Dessa maneira, características da bolsa de ligação no centro ativo da enzima são modificadas, possibilitando a entrada de ácidos menores e subsequente interação e reação com os mesmos.

Investigando a conformação da bolsa de ligação da proteína B, denominada p450_{BSβ} no trabalho citado pela resolução da estrutura da proteína (LEE et al.,

2003), duas cadeias laterais de aminoácidos principais, participantes dessa cavidade, foram escolhidas como alvo de substituição. Por serem estruturalmente essenciais para a formação da bolsa, terem tamanho médio para interferência estérica na bolsa e terem características hidrofóbicas, dando preferência a ácidos graxos de cadeia longa, os aminoácidos F173 e F292 se mostraram como alvos promissores para os ensaios de desenho racional.

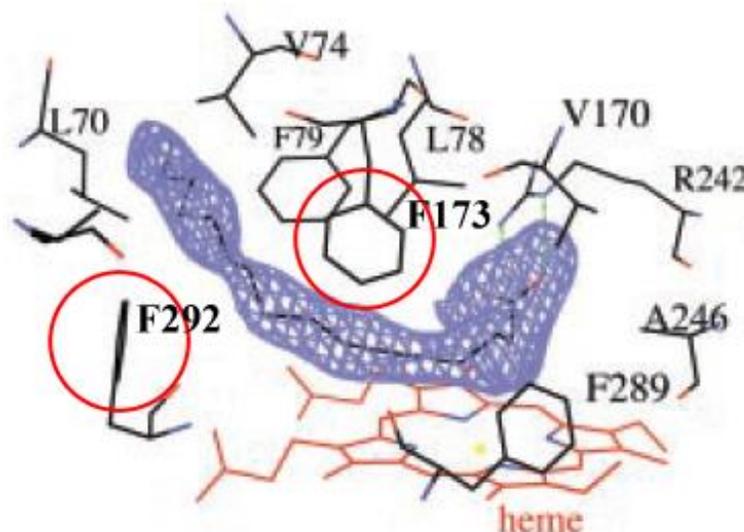


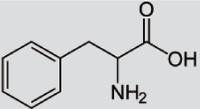
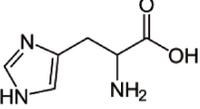
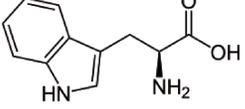
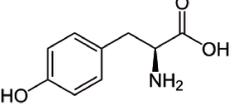
Figura 35: Pontos de interesse para o desenho racional da enzima P450_{BSP} (LEE et al., 2003). F173 e F292 se mostraram como alvos promissores para os ensaios de desenho racional por serem essenciais para a formação da bolsa de ligação, terem tamanho médio para interferência estérica na bolsa e características hidrofóbicas.

Como já havia sido descrito, que a mutação Q85H causa um aumento da atividade de descarboxilação, comparada à hidroxilação (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011), a mesma também foi incluída no planejamento de desenho racional desse trabalho.

A Tabela 15 mostra os aminoácidos candidatos para a substituição dos resíduos de fenilalanina nas posições 173 e 292. A histidina foi escolhida como uma opção de mudança extrema, invertendo a polaridade de apolar para polar e mudando a força de hidrofobicidade de um índice de hidrofobicidade (HPI) de 2,8 para o lado hidrófilo (HPI -3,2). O triptofano e a tirosina representam tentativas

mais amenas, reduzindo o HPI para -0,9 no caso do triptofano e -1,3 escolhendo a tirosina. O triptofano conserva as propriedades apolares da fenilalanina, mas é levemente hidrófilo, enquanto a tirosina é polar e reduz um pouco mais a hidrofobicidade.

Tabela 15: Características do aminoácido nativo fenilalanina (F) e os seus substitutos histidina (H), triptofano (W) e tirosina (Y). A coluna “HPI” indica os índices de hidrofobicidade dos aminoácidos correspondentes. Valores positivos representam uma hidrofobicidade alta.

Aminoácido	Estrutura	HPI	Polaridade
F		2,8	apolar
H		-3,2	polar
W		-0,9	apolar
Y		-1,3	polar

Foram então planejadas as mutações direcionadas que serão introduzidas na sequência da proteína B, listadas na Tabela 5. Sendo necessárias de uma a três mudanças na sequência de nucleotídeos para a alteração dos códons desejados, os *primers* para a inserção das mutações pontuais foram desenhados.

Para se prever se haverá mudanças na conformação das proteínas diversificadas pelo desenho racional, foi utilizado o algoritmo Psipred (JONES, 1999) que calcula a provável estrutura secundária de uma determinada sequência proteica. Todas as mutações desenhadas foram testadas com este programa e não mostraram alterações drásticas no padrão da sua estrutura. Como exemplo, o resultado da comparação da predição da mutante F173Y com o seu homólogo nativo é apresentado na figura abaixo.

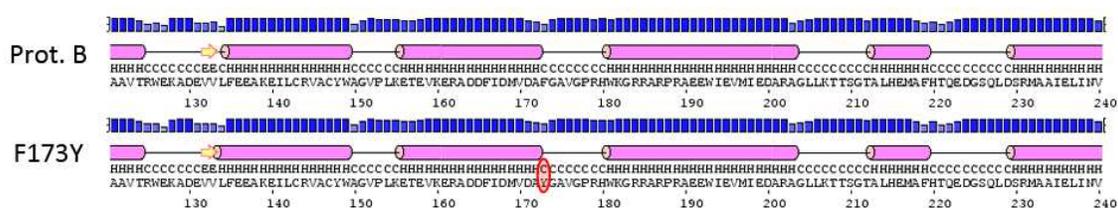


Figura 36: Predição PSIPRED (JONES, 1999) da estrutura secundária da proteína B comparada com a mutante F173Y. A mutação ressaltada em vermelho não causou mudanças significativas na sua região.

Os *primers* desenhados (Tabela 5) foram então aplicados no método descrito em item 4.13.2 para a obtenção dos genes contendo as alterações direcionadas.

5.8. Automatização robótica dos ensaios de desenho de proteínas

Visando um rastreamento de 5.000 mutantes aleatórios, os ensaios de desenho de proteínas foram realizados na plataforma HTS. Foi necessário transformar métodos de escala de bancada para ensaios em escala miniaturizada para possibilitar a execução dos ensaios pelo sistema robotizado e diminuir as quantidades de reagentes consumidos.

Foi escolhido um volume de trabalho de 200 µl nos poços das placas de microtitulação de 96 poços, após avaliação do volume máximo que ainda permitiria pequenas adições de reagentes e a inserção de ponteiros para a homogeneização do líquido. As placas foram mantidas tampadas sempre que possível.

5.8.1. Montagem da biblioteca de clones

Para a multiplicação inicial das colônias contendo o plasmídeo pAP9 (item 5.3.3), foi selecionada inoculação manual em 200 µl de meio LB líquido. A composição de cada placa foi padronizada como mostra a Figura 37, contendo 91 clones mutantes (em vermelho), dois controles sem inóculo para o controle de contaminação (em cinza) e três controles com o gene nativo por placa para comparação com o estado original da proteína (em azul).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	epPCR1	epPCR9	epPCR17	epPCR25	epPCR33	epPCR41	epPCR49	epPCR57	epPCR65	epPCR73	epPCR81	epPCR89
B	epPCR2	epPCR10	epPCR18	epPCR26	epPCR34	epPCR42	epPCR50	epPCR58	epPCR66	epPCR74	epPCR82	epPCR90
C	epPCR3	epPCR11	epPCR19	epPCR27	epPCR35	epPCR43	epPCR51	epPCR59	epPCR67	epPCR75	epPCR83	epPCR91
D	epPCR4	epPCR12	epPCR20	epPCR28	epPCR36	epPCR44	epPCR52	epPCR60	epPCR68	epPCR76	epPCR84	Blank1
E	epPCR5	epPCR13	epPCR21	epPCR29	epPCR37	epPCR45	epPCR53	epPCR61	epPCR69	epPCR77	epPCR85	Blank1
F	epPCR6	epPCR14	epPCR22	epPCR30	epPCR38	epPCR46	epPCR54	epPCR62	epPCR70	epPCR78	epPCR86	Native1
G	epPCR7	epPCR15	epPCR23	epPCR31	epPCR39	epPCR47	epPCR55	epPCR63	epPCR71	epPCR79	epPCR87	Native2
H	epPCR8	epPCR16	epPCR24	epPCR32	epPCR40	epPCR48	epPCR56	epPCR64	epPCR72	epPCR80	epPCR88	Native3

Figura 37: Organização das amostras para ensaios HTS em uma placa de microtitulação de 96 poços. Foram rastreados 91 mutantes aleatórios por placa (epPCR##, em vermelho). Duas amostras brancas, contendo somente o meio de crescimento, foram aplicadas nos poços D12 e E 12 (Blank1, em cinza). Três colônias contendo o gene nativo da enzima foram inoculados nos últimos poços da placa para gerar um controle para a comparação da atividade enzimática com o estado original da proteína (Native#, em azul).

5.8.2. Expressão heteróloga de proteínas diversificadas

Inóculo

Para a automatização do inóculo, a placa do pré-inóculo foi incubada na estufa Cytomat, a 30 °C durante 16 horas. As placas foram inseridas em sequência no rack de placas de microtitulação, começando na posição 1. Uma

interface com o usuário foi criada para a inserção de dados sobre cada placa, contendo o número serial da placa e a posição no rack da estufa.

A execução da leitura de absorvância das placas vindas da estufa exigiu um transporte de duas etapas pela ferramenta iSWAP. O Cytomat transportava a placa para sua bandeja externa, onde o iSWAP agarrava a placa e a deslocava para a sua posição determinada no deck. Após o comando para abertura da gaveta do espectrofotômetro, o iSWAP girava 180° para pegar a placa novamente e a levava para o espectrofotômetro. Esses passos foram necessários para manter a mesma orientação da placa. Sem essa etapa adicional, o iSWAP pegava a placa e girava 180° para alcançar a gaveta do fotômetro, invertendo a orientação dos poços.

Nesse trabalho, foi necessário criar um protocolo para o espectrofotômetro SpectraMax que permitisse a leitura da absorvância de todos os poços de cada placa a 600 nm, após cinco segundos de agitação para a nivelção dos meniscos do líquido dentro dos poços. A ocorrência de meniscos irregulares aumenta com volumes menores de líquido e causam erros na leitura da absorvância.

Em testes de crescimento da cepa *E. coli* BL21 Rosetta™ 2, utilizada para os ensaios de expressão, foi determinado que o fator de diluição necessário para atingir uma densidade ótica de 0,1 no início dos ensaios, era de 1:10. Isso significava o preenchimento de uma placa vazia com 180 µl de meio LB líquido. Para cumprir o fator de diluição, 20 µl de cultura tinham que ser adicionados e homogeneizados com o meio por subsequente aspiração e dispensação do conteúdo do poço.

Uma leitura de controle de absorvância foi programada para a placa nova, enquanto o pré-inóculo foi retornado para a sua posição original no rack da estufa, utilizando a variável contendo essa informação. Em seguida, o método consultava o banco de dados da estufa para retornar a próxima posição livre no rack e transportava a placa para esse destino.

Em testes preliminares, o tempo de incubação das células para atingir uma densidade ótica de 0,6 resultou em 2,5 horas a 30 °C.

Como as células da placa nova seriam submetidas à lise por choque osmótico, o pré-inóculo que não sofreu alterações precisava ser conservado para obter material biológico viável, após a análise dos resultados. Dessa maneira, foi planejada a remoção da placa de pré-inóculo da estufa Cytomat e a sua transferência para uma câmara fria a 4 °C.

Indução e complementação

Visando uma indução da expressão da proteína ácido graxo descarboxilase utilizando 0,1 mM IPTG e 27 mg/l FeCl₃ (item 5.4.1), a concentração da solução indutora foi composta de 10 mM IPTG e 16,6 mM FeCl₃ para permitir uma adição de um volume baixo (2 µl) aos 200 µl já presentes nos poços. Passos de homogeneização por pipetagem e de leitura de absorbância de controle foram inseridos, aproveitando um ponto de intervenção do sistema de pipetagem. O tempo de indução de cinco horas foi determinado como ótimo nos testes preliminares.

Lise periplasmática

O protocolo de lise periplasmática (item 4.11.4) foi adaptado, para a sua miniaturização e realização no sistema HTS.

Os passos de centrifugação foram executados manualmente pelo usuário. Diálogos com o usuário na tela do computador criavam uma interface entre os passos robotizados e manuais. A velocidade de centrifugação foi mantida a 3.500 rpm em um rotor de placas de microtitulação.

O ensaio de lise periplasmática (item 4.11.4) foi adaptado proporcionalmente para o volume de cultura de 200 µl. Os volumes de tampão de ressuspensão das células (40 e 16 µl) estavam abaixo do limite possível para a utilização de etapas de homogeneização, pois estes volumes não cobriram a superfície inteira do fundo do poço durante a pipetagem. Por essa razão, o ensaio

foi modificado e volumes maiores de tampão foram aplicados. Mantendo-se o padrão de diminuição de volume, foram determinados volumes de 100 µl de tampão de saturação e 50 µl de tampão de choque osmótico para a realização da lise periplasmática. Essas soluções foram armazenadas na câmara fria a 4 °C até o primeiro uso no dia e mantidas no gelo quando não foram utilizados pelo método. Para manter as placas resfriadas durante o tempo de incubação, as mesmas foram retiradas manualmente do deck e colocadas em um banho de gelo.

Ensaio enzimático

Os ensaios enzimáticos foram desenhados conforme o protocolo de bancada (item 4.12). Os tampões de reação contendo os ácidos foram preparados com concentrações de 222 µM de ácido e 111 mM de tampão fosfato pH 7,5. Foram adicionados 100 µM do co-substrato peróxido de hidrogênio em 100 mM tampão fosfato pH 7,5. Essas composições permitiram a mistura de 90 µl de tampão substrato com 100 µl de tampão co-substrato e 10 µl de solução enzimática para a montagem do ensaio. Para acelerar o procedimento de pipetagem, a aspiração do volume máximo da ponteira de 300 µl e a dispensação em série em três colunas seguidas na placa foram programadas. A próxima aspiração foi realizada sem troca de ponteiras. Antes da troca de um tipo de ácido para o outro, as ponteiras eram descartadas. O peróxido de hidrogênio foi dispensado de maneira similar em duas colunas seguidas e sem troca de ponteira entre as duas placas, pois o líquido era injetado para dentro dos poços sem entrar em contato com o seu conteúdo. Por último, a solução contendo a enzima extraída foi adicionada aos poços, utilizando-se uma ponteira de 10 µl para cada poço.

Como a duração da incubação desse ensaio foi de uma hora, a placa foi armazenada dentro da estufa Cytomat para liberar as posições no deck da plataforma de pipetagem.

5.8.3. Rastreamento de mutantes de desempenho positivo

Seguindo a padronização do ensaio de detecção colorimétrica da atividade de ácido graxo descarboxilases (item 5.6), 10 µl do ensaio enzimático, contendo o analito peróxido de hidrogênio, foram adicionados a 190 µl de solução ABTS com HRP. A solução do conjunto de reagentes colorimétricos, ABTS 1 mM e 0,5 U/mL HRP, foi dispensada sem troca de ponteiros. Os produtos do ensaio enzimático foram aplicados utilizando-se uma ponteira por poço.

Como o deck só apresentava três posições adequadas para placas transportáveis pelo iSWAP, primeiramente as placas de ambos os ensaios enzimáticos foram apresentadas em suas posições. Posteriormente, foi preparado o ensaio colorimétrico do primeiro substrato ácido e a placa contendo o ensaio enzimático foi removida da posição e descartada. Nessa posição, o segundo ensaio colorimétrico foi preparado em uma nova placa e a placa do segundo ensaio enzimático descartada no lixo, liberando a terceira posição.

O tempo de incubação de 15 minutos foi confirmado como suficiente e as absorbâncias da solução colorimétrica foram determinadas por um método do software SoftMax 6.2 a 405 nm, com agitação prévia de cinco segundos. Para a limpeza do deck, as placas foram descartadas no lixo pelo iSWAP.

A metodologia de rastreamento de alto desempenho, desenvolvida para a plataforma robótica, gerou novos protocolos e programas que poderão ser aplicados em outros trabalhos que utilizem automatização.

5.9. Análise das proteínas diversificadas de desempenho positivo

Após os ensaios no sistema HTS, os dados de absorbância dos testes colorimétricos de 5.271 mutantes foram analisados através do método descrito no capítulo 4.15.5. As proteínas mutantes que apresentavam uma tendência positiva de desempenho foram expressas e submetidas a ensaios enzimáticos. Os

produtos desses ensaios foram analisados por GC-MS para determinar as atividades enzimáticas e a formação qualitativa de produto. A Figura 38 apresenta um exemplo de um resultado positivo.

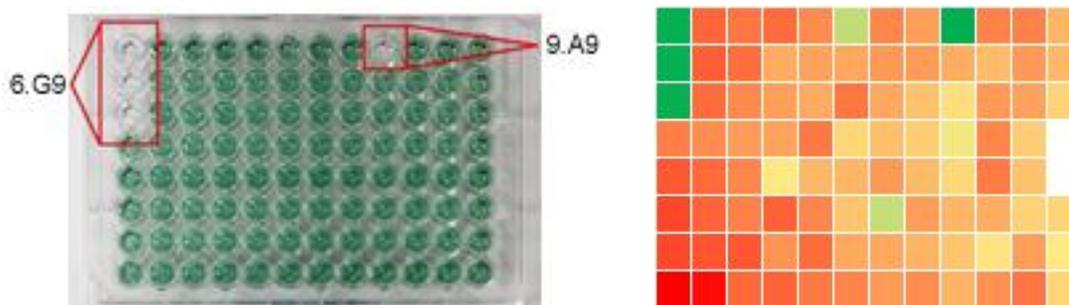


Figura 38: Processamento de dados do HTS. Duas representações da placa 9, utilizando o substrato ácido hexadecanóico estão apresentadas. À esquerda: fotografia mostrando a confirmação do desempenho positivo de uma enzima mutante de um ensaio anterior, placa número 6, em triplicata. Outra enzima mutante positiva foi identificada na placa 9, no poço A9. À direita: avaliação do grau de desempenho de cada mutante em Microsoft Excel. Campos verdes significam o aumento da atividade enzimática comparado com a proteína nativa. Células vermelhas indicam uma diminuição da atividade enzimática.

De 26 mutantes com desempenho considerado positivo pelos resultados do ensaio colorimétrico, uma única enzima mostrou um padrão de atividade novo. A enzima resgatada do poço C11 da placa 13, expressa pela sequência inserida no plasmídeo pAP17 (item 5.3.5), apresentou formação de 2,6 μM 1-hepteno a partir de 100 μM ácido octanóico. A Figura 39 mostra os cromatogramas que confirmam a presença de 1-hepteno após a reação enzimática. A molécula 1-hepteno foi identificada na amostra contendo um padrão de 50 μM 1-hepteno, após 2,65 minutos, como mostrado em cromatograma C. O cromatograma B apresenta a distribuição de picos, resultando da reação com enzima desativada por calor. Nenhum sinal foi detectado no tempo de retenção do 1-hepteno. A identificação do 1-hepteno no cromatograma A foi realizada pelo tempo de retenção e o espectro de massas, que confirmou a sua presença em triplicata.

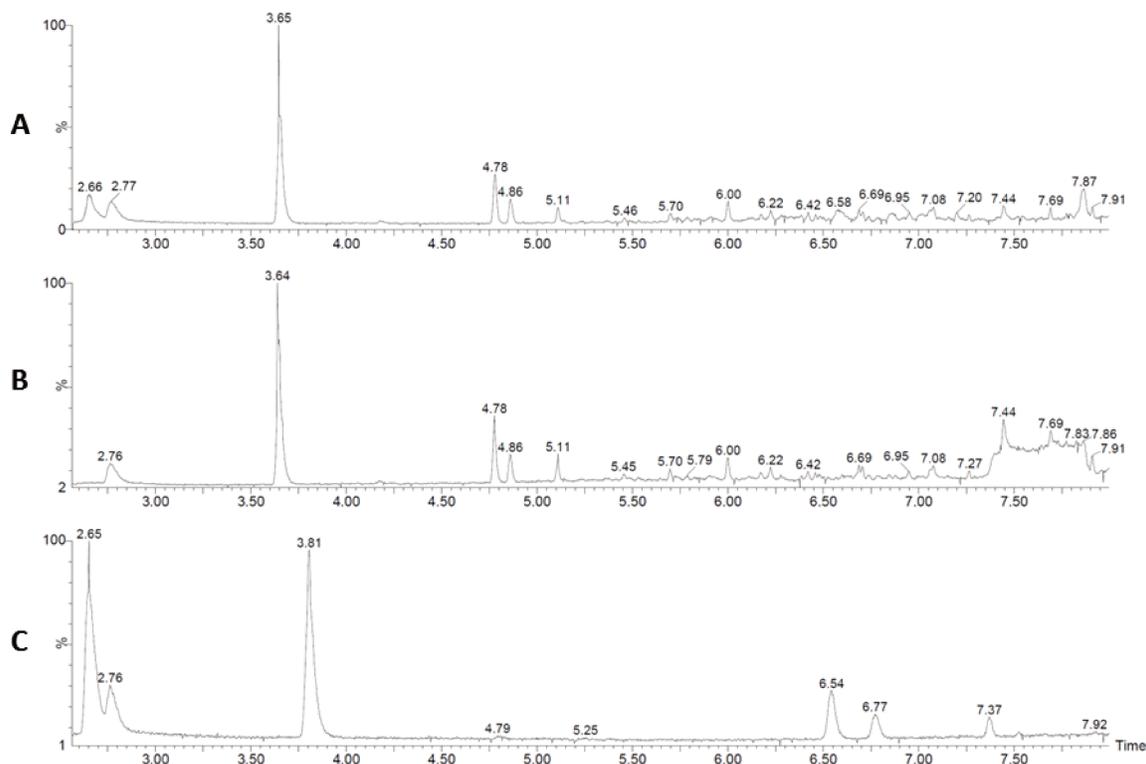


Figura 39: Cromatogramas GC-MS confirmando a produção de 2,6 μM 1-hepteno a partir de 100 μM de ácido octanóico pela enzima “13.C11”. A: Enzima mutante “13.C11” com substrato ácido octanóico ($t=3.65$) e pico de produto 1-hepteno ($t=2.66$); B: Enzima desativada com ácido octanóico ($t=3.64$) e ausência de produto 1-hepteno; C: Padrão 1-hepteno ($t=2.65$).

Como o controle contendo enzima desativada (cromatograma B) não apresenta o sinal correspondente ao 1-hepteno, pode se excluir uma reação de interferência entre os reagentes presentes na composição do ensaio.

Com a confirmação da produção de 1-hepteno pela enzima diversificada, as modificações inseridas na proteína B (plasmídeo pAP17) foram responsáveis pela criação de uma nova função da enzima, possibilitando a conversão de ácido octanóico para 1-hepteno.

A função descrita torna a proteína diversificada, encontrada no poço C11 da placa 13, em uma enzima ácido octanóico descarboxilase que apresenta uma função nova. A ácido graxo descarboxilase deu origem à ácido octanóico descarboxilase após sofrer mutações aleatórias, benéficas para atingir o objetivo desse trabalho. Como consequência dessas mutações, o centro ativo da enzima

desenvolveu a capacidade de se ligar ao ácido octanóico e catalisar a mesma reação descarboxilante.

A característica definitiva da nova enzima encontra-se na conversão de 100 μM ácido octanóico para 2,6 μM 1-hepteno. Este tipo de reação enzimática, a descarboxilação de um ácido apresentando uma cadeia carbônica de apenas oito átomos, ainda não havia sido descrita anteriormente.

Os produtos proteicos dos genes citados na patente WO/2009/085,278 (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009) mostram atividade de descarboxilação em compostos de 22 a 14 carbonos, com o ácido hexadecanóico gerando a maior atividade enzimática, citando o gene *orf880* de *Jeotgalicoccus* sp. como o mais produtivo (Tabela 16).

Tabela 16: Atividades enzimáticas de OleT (enzima do gene *orf880*) utilizando cinco ácidos graxos de 22 a 14 carbonos como substrato (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009). A maior atividade foi observada utilizando ácido hexadecanóico. Em comparação, os resultados da enzima nova, ácido octanóico descarboxilase (AOD), na última fileira.

Enzima	Substrato	Carbonos	Atividade (nmol alceno/min)
OleT (patente)	ácido tetradecanóico	14	22,9
	ácido hexadecanóico	16	181,9
	ácido octadecanóico	18	77,2
	ácido eicosanóico	20	19,7
	ácido behenico	22	30,6
AOD (desenvolvida nesse trabalho)	ácido octanóico	8	0,37

O trabalho descrito por Rude e colaboradores menciona a produção de alcenos por descarboxilação de ácidos graxos entre 20 e 16 átomos nas suas cadeias carbônicas, citando OleT_{JE} e P450_{BS β} como ativos (RUDE et al., 2011).

Anteriormente, havia sido indicada a hidroxilação de ácido tetradecanóico por P450_{BSB} (MATSUNAGA et al., 1999). Este tipo de reação enzimática foi caracterizado como um dos geradores de subprodutos durante a descarboxilação pela enzima ácido graxo descarboxilase (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011).

Com uma atividade enzimática de 0,37 nmol de alceno por minuto, o desempenho da nova ácido octanóico descarboxilase encontra-se abaixo das atividades observadas nas enzimas nativas neste trabalho e também nos estudos de Rude e colaboradores (ALIBHAI; RUDE; SCHIRMER, 2009; RUDE et al., 2011). Por outro lado, a produção de 1-hepteno a partir de ácido octanóico, mediada pelo desenho de proteínas, demonstra a capacidade dessa ferramenta para aplicação em enzimas, seja no aumento do desempenho catalítico ou na busca de novas funções.

5.10. Análise das mutações resultando no gene da ácido octanóico descarboxilase

A identificação da natureza da mudança no perfil catalítico da enzima original foi realizada pelo sequenciamento do gene da ácido octanóico descarboxilase através do método Sanger (Applied Biosystems). Os *primers* T7 promotor, T7 terminador e um *primer* interno ao gene da enzima ácido graxo descarboxilase original de *B. subtilis* foram utilizados para obter os fragmentos necessários para a montagem do gene com cobertura completa.

Como ilustrado na Figura 40, a sequência de DNA da enzima ácido octanóico descarboxilase se diferencia da ácido graxo descarboxilase por cinco mutações pontuais. Essas mutações são c.113A>T, c.115G>A, c.575A>T, c.662C>T e c.1198A>C.



Figura 40: Alinhamento (MUSCLE, oito iterações) da sequência nucleotídica da ácido octanóico descarboxilase (primeira linha) com a sequência nucleotídica da ácido graxo descarboxilase original (segunda linha). Cinco mutações pontuais foram identificadas. Todas as mutações na sequência de DNA provocaram uma troca de códon.

Todas as alterações na sequência de DNA se traduzem em mudanças de aminoácidos na sequência proteica, significando que mutações silenciosas não foram geradas. Consequentemente, a sequência diversificada que resultou na criação da enzima ácido octanóico descarboxilase apresenta cinco mudanças na sequência de aminoácidos: Q38L, A39T, E192V, T221I e M400L (Figura 41).



Figura 41: Alinhamento (MUSCLE, oito iterações) da tradução da sequência da enzima ácido octanóico descarboxilase (primeira linha) com a sequência proteica da enzima ácido graxo descarboxilase original (segunda linha). Cinco mutações pontuais podem ser observadas (em destaque vermelho).

A substituição da metionina na posição 400 por leucina é a única mudança de aminoácido que ocorreu perto da bolsa de ligação do substrato, como ilustrado na Figura 42. Comparando as características de ambos os aminoácidos, pode-se perceber que os dois apresentam propriedades muito similares um ao outro (Tabela 17).

Em termos qualitativos, metionina e leucina são hidrofóbicos, apolares e de carga neutra (KYTE; DOOLITTLE, 1982; WADE, 2009). Isso torna esses dois aminoácidos altamente substituíveis dentro de uma estrutura proteica e indica que uma substituição de metionina para leucina conseguirá manter o arranjo estrutural, enquanto algumas características na região dessa alteração serão modificadas (BORDO; ARGOS, 1991).

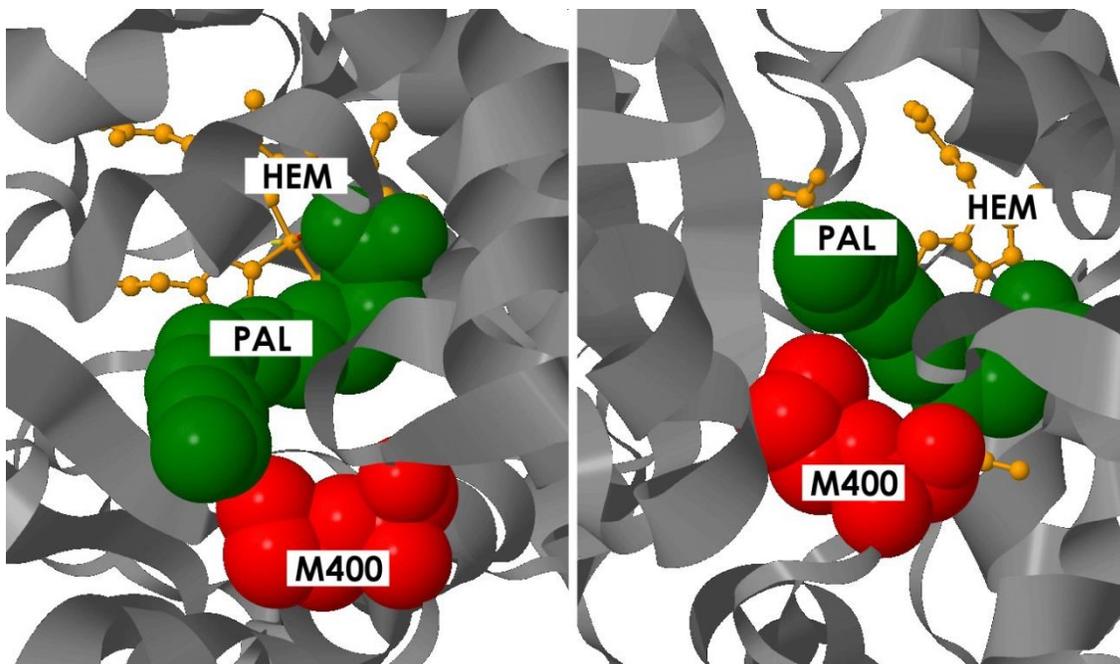


Figura 42: Posicionamento estrutural da metionina 400 (em vermelho) na bolsa de ligação do substrato ácido hexadecanóico (PAL, em verde). A cadeia lateral da metionina interage com a cauda hidrofóbica do substrato de 16 carbonos, enquanto o grupo heme (HEM, em amarelo) da enzima se posiciona na cabeça hidrofílica do ácido. A imagem mostra dois ângulos diferentes da mesma situação para uma melhor visualização, gerados pelo programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2010) através dos dados estruturais da proteína B (LEE et al., 2003).

Tabela 17: Análise comparativa das propriedades dos aminoácidos metionina e leucina (CHOTHIA, 1976; KYTE; DOOLITTLE, 1982; WADE, 2009; ZAMYATNIN, 1972). Mudanças amenas na hidrofobicidade e estrutura foram decisivas para a alteração de atividade da enzima. A manutenção das características apolares e de carga neutra, em combinação com a preservação da hidrofobicidade, permitiu a nova função enzimática (BORDO; ARGOS, 1991). A perda de um átomo de enxofre, causada pela mutação, permite uma flexibilidade maior da estrutura proteica, aumentando a chance de interação com novos substratos.

Aminoácido	Metionina	Leucina
Hidrofobicidade	1,9	3,8
Estrutura	<chem>CSCCC(N)C(=O)O</chem>	<chem>CC(C)CC(N)C(=O)O</chem>
Polaridade	apolar	apolar
Carga	neutra	neutra
Enxofre	1 átomo	0 átomos
Superfície [Å^2]	185	170
Volume [Å^3]	162,9	166,7

Além das alterações físico-químicas, a mutação da metionina 400 para uma leucina causa diferenças no efeito estérico pela cadeia lateral substituída, que influencia as propriedades da bolsa de ligação por um arranjo espacial de átomos alterado. Enquanto o volume da cadeia lateral aumenta ligeiramente de 162,9 para 166,7 Å³, a superfície molecular sofre uma diminuição de 185 para 170 Å² (Tabela 17) (CHOTHIA, 1976; ZAMYATNIN, 1972). Comparando-se as estruturas de ambos os aminoácidos (Tabela 17), esses valores se mostram compreensíveis, pois a cadeia encurta e surge uma ligação ramificada na transição para a leucina. O volume molecular aumenta, diminuindo a superfície da cadeia lateral.

Analisando o conjunto das principais mudanças ocorridas, como o aumento da hidrofobicidade e diminuição da superfície da cadeia lateral na posição 400, pode-se concluir que essas novas condições da bolsa de ligação favorecem a interação e o processamento do novo substrato ácido octanóico.

A elevação do índice de hidrofobicidade da superfície de interação entre o substrato e a proteína na região da posição 400 restringe a colocação de substratos com propriedades mais hidrofílicas do que o substrato original, o ácido hexadecanóico, diminuindo a afinidade da área afetada por esse tipo de molécula.

Por outro lado, a diminuição da área superficial da cadeia lateral na posição 400 descongestiona a bolsa de ligação, dando acesso a substratos diferentes do ácido hexadecanóico, o substrato original da enzima molde. Essa alteração facilita a realização da descarboxilação utilizando outras moléculas, como por exemplo, o ácido octanóico, que foi identificado como um substrato novo, dando origem à descoberta de uma nova enzima ácido octanóico descarboxilase.

6. Conclusões

Através da triagem de seis genes, codificando seis enzimas ácido graxo descarboxilases, uma enzima molde foi identificada para ensaios de diversificação por métodos de desenho de proteínas.

O gene *CYP152A1* de *Bacillus subtilis*, codificando a proteína P450_{BSβ} foi submetido às técnicas de epPCR, para a realização de diversificação aleatória e desenho racional, inserindo mutações direcionadas na sequência de DNA.

A metodologia para utilização da plataforma robótica no rastreamento de alto desempenho foi desenvolvida nesse trabalho com sucesso, gerando novos protocolos e programas que poderão ser aplicados em outros trabalhos que utilizem essa plataforma.

A proteína P450_{BSβ} diversificada “13.C11” foi rastreada pelo sistema automatizado de alto desempenho e apresentou a propriedade nova de conversão de 100 μM ácido octanóico para 2,6 μM 1-hepteno. As alterações na sequência da proteína foram resolvidas por sequenciamento, ficando comprovado que os métodos desenvolvidos durante esse trabalho conseguem ser aplicados para o rastreamento de alterações no perfil catalítico de enzimas artificialmente evoluídas.

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, uma nova enzima ácido octanóico descarboxilase foi gerada durante os ensaios de diversificação e rastreamento, através da aplicação do conceito de desenho de proteínas (STEBEL; GAIDA; ARNDT, 2008).

5.271 versões aleatoriamente diversificadas do gene molde *CYP152A1* foram investigadas utilizando o sistema robotizado, que possibilitou a descoberta da enzima ácido octanóico descarboxilase (Figura 43). A atividade nova da conversão de um substrato com apenas oito carbonos na cadeia do ácido carboxílico mostra que a estrutura e as propriedades do gene molde *CYP152A1* suportaram as mudanças impostas pelo desenho de proteínas. A identificação do novo perfil de atividade abre o caminho para futuras pesquisas para o

aprimoramento da utilização da própria enzima ácido octanóico descarboxilase. Dando continuidade ao trabalho desenvolvido, o desenho de proteínas poderia ser aplicado, baseando-se na sequência nova para atingir atividades com substratos de cadeias carbônicas ainda menores (Figura 44).

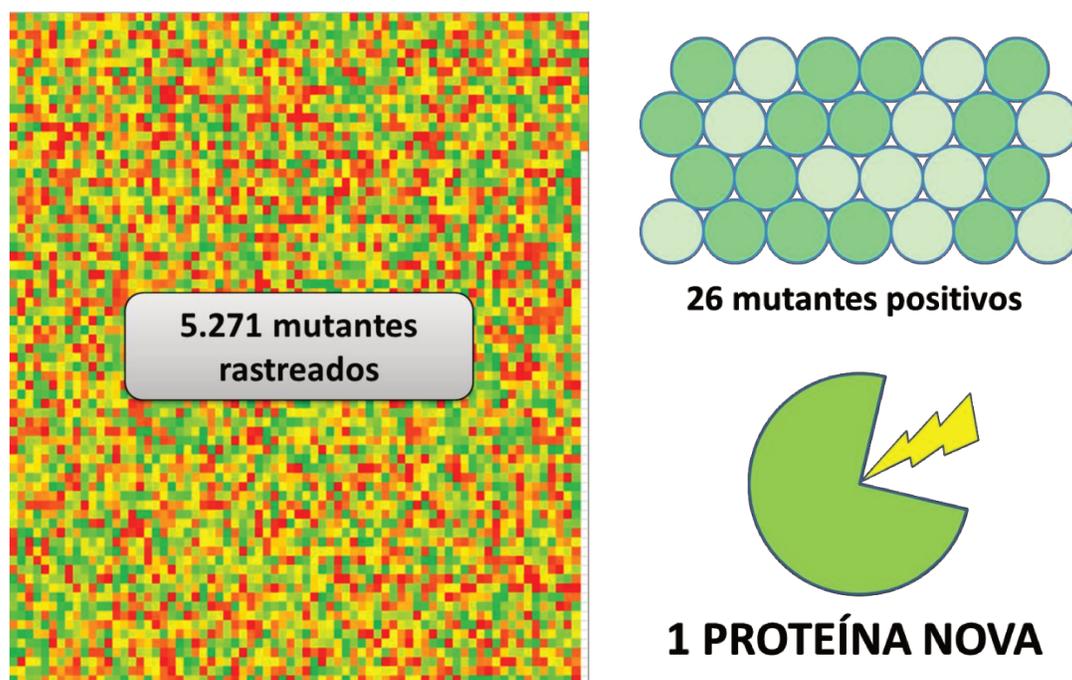


Figura 43: Sumário esquematizado dos resultados obtidos durante o rastreamento das bibliotecas de ácido graxo descarboxilases diversificadas. Após o rastreamento de 5.271 colônias diversificadas, foram identificadas 26 versões com desempenho positivo. Uma proteína com atividade nova foi confirmada, convertendo ácido octanóico para 1-hepteno.

A introdução de alterações que habilitarão a conversão de ácido butírico para propeno por um processo mais extenso de melhoramento das descarboxilases, o gene da enzima poderá ser inserido em um micro-organismo do gênero *Clostridium* com alta produtividade de ácido butírico a partir de fontes de carbono renováveis, como o caldo de cana. Entrando no final da via metabólica, a enzima nova transformará o produto ácido butírico em propeno, que será liberado do meio em forma gasosa, facilitando a coleta, medição e a purificação e evitando concentrações tóxicas do composto no meio.

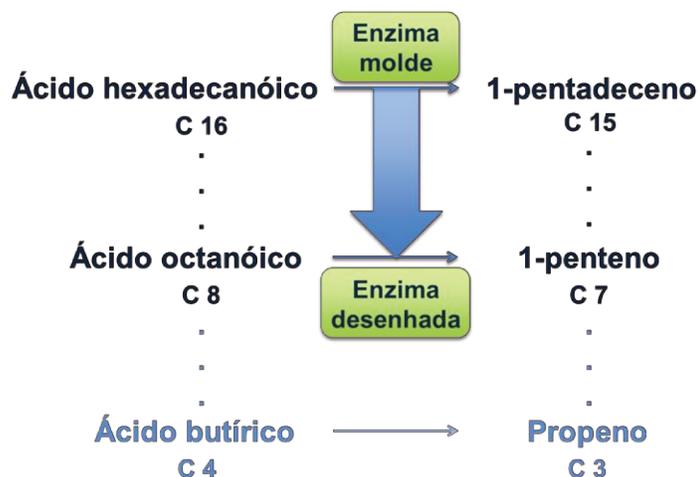


Figura 44: A nova enzima desenhada, obtida como resultado principal dessa tese, mostra a propriedade de conversão de ácido octanóico, um composto de oito carbonos, para um alceno, enquanto a enzima molde somente catalisava a descarboxilação de ácidos graxos com no mínimo doze carbonos. A busca por uma enzima com capacidade de converter ácido butírico para propeno poderá ser iniciada, continuando esse trabalho com novos ensaios, utilizando a nova enzima como ponto de partida.

A produção industrial de “biopropeno” que apresenta as mesmas propriedades que o propeno convencional, extraído do petróleo, poderia ser realizada em um micro-organismo contendo uma nova enzima desenvolvida. Esse sistema microbiano poderia sustentar um processo fermentativo para a produção de um produto *commodity* de alto volume de uso em indústrias de diversos ramos.

7. Referências bibliográficas

ALIBHAI, M.; RUDE, M.; SCHIRMER, A. **Methods and compositions for producing olefins**, WO Patent WO/2009/085278, jul. 2009. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2009085278>>. Acesso em: 7 dez. 2010

AMORIM, H. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.

BIOMATTERS. **Geneious 4.8**, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.geneious.com/>>

BORDO, D.; ARGOS, P. Suggestions for “safe” residue substitutions in site-directed mutagenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 217, n. 4, p. 721–729, 20 fev. 1991.

BRASKEM. **Biopolímero polietileno verde, inovação transformando plástico em sustentabilidade**. Disponível em: <http://www.braskem.com.br/plasticoverde/doc/Eteno_Verde_01.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2013.

CERESANA. **Market Study: Polypropylene**. [s.l: s.n.].

CHERRY, J. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438–443, ago. 2003.

CHOTHIA, C. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 105, n. 1, p. 1–12, 25 jul. 1976.

DWIDAR, M. et al. The future of butyric acid in industry. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 471417, jan. 2012.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. **Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]**, v. Chapter 5, p. Unit 5.24.1–29, ago. 2010.

GHOSH, S. Copper(I)-Catalyzed Inter- and Intramolecular [2 + 2]-Photocycloaddition Reactions of Alkenes. In: **CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, Volumes 1 & 2, Second Edition**. [s.l.] CRC Press, 2003.

GRISSHAMMER, R.; NAGAI, K. Purification of Over-Produced Proteins from *E. coli* Cells. In: **DNA Cloning 2**. 1. ed. [s.l.] Oxford University Press, 1995.

HIBBERT, E. G.; DALBY, P. A. Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 1–6, 2005.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195–202, 17 set. 1999.

KUCHNER, O.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of enzyme catalysts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 523–530, dez. 1997.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 5 maio 1982.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 1 nov. 2007.

LEE, D.-S. et al. Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*. Crystallographic, spectroscopic, and mutational studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9761–7, 2003.

LEE, S. Y. et al. Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. **Macromolecular bioscience**, v. 4, n. 3, p. 157–64, 15 mar. 2004.

LEUNG, D. W.; CHEN, E.; GOEDDEL, D. V. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. **Technique**, v. 1, p. 11–15, 1989.

LOO, B. VAN et al. Directed Evolution of Epoxide Hydrolase from *A. radiobacter* toward Higher Enantioselectivity by Error-Prone PCR and DNA Shuffling. **Most**, v. 11, p. 981–990, 2004.

MARKOVNIKOV, V. I. Ueber die Abhängigkeit der verschiedenen Vertretbarkeit des Radicalwasserstoffs in den isomeren Buttersäuren. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 153, n. 2, p. 228–259, 1870.

MATSUNAGA, I. et al. Characterization of the ybdT gene product of *Bacillus subtilis*: Novel fatty acid β -hydroxylating cytochrome P450. **Lipids**, v. 34, n. 8, p. 841–846, 1999.

MCCULLUM, E. O. et al. Random mutagenesis by error-prone PCR. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 634, p. 103–9, jan. 2010.

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in genetics : TIG**, v. 16, n. 6, p. 276–277, jun. 2000.

RINCONES, J. et al. The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics. **Polymer Reviews**, v. 49, n. 2, p. 85–106, 7 maio 2009.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–86, jan. 2000.

RUDE, M. A. et al. Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel p450 fatty acid decarboxylase from jeotgalicoccus species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1718–27, mar. 2011.

RULLER, R. et al. Thermostable variants of the recombinant xylanase a from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 70, n. 4, p. 1280–1293, 1 mar. 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224–230, 2011.

SAVILE, C. K. et al. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. **Science**, v. 329, n. 5989, p. 305–309, 16 jul. 2010.

SCHRÖDINGER, L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1**, ago. 2010.

SIGMA-ALDRICH. **Product Information: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt**, 2012.

SKERRA, A. Alternative binding proteins: Anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. **FEBS Journal**, v. 275, n. 11, p. 2677–2683, 1 jun. 2008.

SÖDING, J. Protein homology detection by HMM–HMM comparison. **Bioinformatics**, v. 21, n. 7, p. 951–960, 1 abr. 2005.

SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl 2, p. W244–W248, 1 jul. 2005.

STEBEL, S.; GAIDA, A.; ARNDT, K. Directed Protein Evolution. **Molecular Biometrics**, p. 631–656, 2008.

STEVENS, E. S. What Makes Green Plastics Green? **Biocycle**, v. 44, p. 24–27, 2003.

WADE, L. G. **Organic Chemistry**. 7. ed. [s.l.] Prentice Hall, 2009.

WILSON, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. **Current Protocols in Molecular Biology**, 2001.

ZAMYATNIN, A. A. Protein volume in solution. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 24, p. 107–123, 1972.

8. Anexo – Declaração de autorização CIBio

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada “Desenho de uma ácido graxo descarboxilase para a produção enzimática de alcenos”:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03, Instituição: Universidade Estadual de Campinas

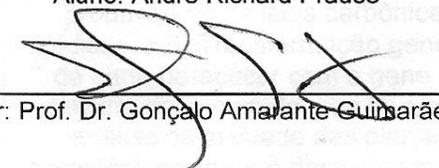
() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



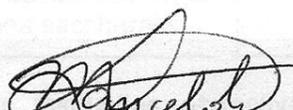
Aluno: André Richard Prause



Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura