



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**RAQUEL RODRIGUES RAMPASIO**

**ESTUDOS SOBRE A CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *SEH1*  
(EPÓXIDO HIDROLASE) DE *Pichia stipitis* EM *Pichia pastoris***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA  
NA ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

**ORIENTADOR: PROFA. DRA. LUCIANA GONZAGA DE OLIVEIRA**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
POR RAQUEL RODRIGUES RAMPASIO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LUCIANA GONZAGA DE  
OLIVEIRA.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

R147e Rampasio, Raquel Rodrigues (1986-).  
Estudos sobre a clonagem e expressão do gene  
*SEH1* (epóxido hidrolase) de *Pichia stipitis* em *Pichia*  
*pastoris* / Raquel Rodrigues Rampasio. – Campinas, SP:  
[s.n.], 2012.

Orientador: Luciana Gonzaga de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1. Epóxido hidrolase. 2. *Pichia stipitis*. 3. *Pichia*  
*pastoris*. 4. Expressão heteróloga. I. Oliveira, Luciana  
Gonzaga. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Studies towards cloning and expression of SEH1 gene (epoxide hydrolase) of *Pichia stipitis* in *Pichia pastoris*

**Palavras-chave em inglês:**

Epoxide hydrolase  
*Pichia stipitis*  
*Pichia pastoris*  
Heterologous expression

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:**

Luciana Gonzaga de Oliveira [Orientador]  
Anete Pereira de Souza  
Ljubica Tasic

**Data de defesa:** 28/02/2012

**Programa de pós-graduação:** Química

Dedico esta dissertação à minha família e  
ao meu namorado.

## **Agradecimentos**

A Deus por tudo.

À minha família, especialmente meus pais, Antonio e Wania, e minha irmã Daniely, que com sua dedicação me trouxe até aqui.

Ao meu namorado, Haraldo, pela imensa compreensão, apoio e incentivo.

Aos professores que tive na E.E. Villagelin, na E.T.E. Bento Quirino e na UNICAMP (graduação e pós-graduação), pelo conhecimento que levarei para sempre.

À Prof. Dr. Luciana, minha orientadora, pela confiança em mim depositada e, principalmente, pelo otimismo, compreensão e amizade.

Aos amigos que fizeram parte do grupo nestes últimos anos: Pedro, Renata, Suelen, Suéllen, Larissa, Patrícia, Morgana, Leila, Deborah, Lucas, Kathryn, Eduardo e Gilcelene, por compartilharem as aflições e alegrias que vivenciamos na UNICAMP.

À Prof. Dr. Wanda e seu grupo, especialmente: Renan, Paula, Gabriella, Gisele, Thais e Andreza, pela amizade.

Aos colegas dos grupos dos Professores Ramos, Anita, José Augusto, Dias, Ljubica, Reis, Lancellotti e Anete, pela disponibilidade em emprestar equipamentos e repassar conhecimento ao grupo iniciante.

A todos os funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, ao CNPq pelo auxílio financeiro.

# Curriculum vitae

## 1. Formação Acadêmica

2010 – 2012 Mestrado em Química

2004 – 2009 Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas (UNICAMP)

## 2. Formação Complementar

2009 Técnicas Microbiológicas. (Carga horária: 6 h). Instituto de Química (UNICAMP).

2006 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (Carga horária: 8 h). Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

## 3. Atuação profissional

1. Departamento de Química Orgânica – UNICAMP

08/2009-01/2010

Projeto de Iniciação Científica: “Clonagem e expressão do gene *EPH1* (epóxido hidrolase) de *Rhodotorula glutinis* em *Pichia pastoris*”

2. Laboratório Nacional de Biociências – LNBio

10/2005-10/2006

Projeto de Iniciação Científica: “Construção de vetores para a expressão e testes de interação das septinas humanas”

3. ICI – Divisão Quest Aromas e Fragrâncias

03/2005-09/2005

Estagiária em Assuntos Regulatórios

#### **4. Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

Rampasio, R. R.; De Oliveira, L. G. Clonagem e expressão do gene *EPH1* (epóxido hidrolase) de *Rhodotorula glutinis* em *Pichia pastoris*. In: XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2010, Campinas.

Souza, T. A. C. B.; Rampasio, R. R.; Zanchin, N. I. T.; Barbosa, J. A. R. G. Cloning, expression and purification of the human septin 2 and the GTPase domain of the human septin 6. In: Reunião Anual dos Usuários do LNLS, 2007, Campinas.

#### **5. Apresentação de trabalho**

Rampasio, R. R.; De Oliveira, L. G. Directed evolution of the *Pichia stipitis* epoxide hydrolase. In: ESPCA on Natural Products, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis, 2011, Campinas.

Rampasio, R. R.; Zanchin, N. I. T. Construção de vetores para a expressão e testes de interação das septinas humanas. In: Congresso Interno de Iniciação Científica do LNLS, 2006, Campinas.

## Resumo

### **Estudos sobre a clonagem e expressão do gene *SEH1* (epóxido hidrolase) de *Pichia stipitis* em *Pichia pastoris***

Epóxidos enantiopuros e dióis vicinais têm sido utilizados na síntese de inúmeras moléculas bioativas. Dessa forma, as epóxido-hidrolases microbianas capazes de hidrolisar enantioseletivamente epóxidos racêmicos emergiram como uma alternativa promissora na obtenção destes compostos. Recentemente, a linhagem *P. stipitis* CCT 2617 foi selecionada por apresentar atividade hidrolítica frente à epóxidos terminais e teve seu genoma completo publicado. Assim, esta levedura foi selecionada para o trabalho de clonagem e expressão de sua epóxido hidrolase. Neste trabalho, a clonagem do gene *SEH1*, que codifica para a epóxido hidrolase de *P. stipitis*, foi efetuada com sucesso em *P. pastoris*, tanto no vetor pPICZ $\alpha$  A, quanto no vetor pPICZ B. A clonagem da proteína com a cauda de histidina deve auxiliar na detecção da expressão. A detecção de uma banda, referente a uma proteína de 46 kDa, no gel de eletroforese foi um indício de que a expressão da enzima SEH (contendo o fator  $\alpha$ ) ocorreu, porém, não conseguimos reproduzir este resultado posteriormente. Além disso, buscamos melhores alternativas para a detecção da atividade enzimática, como o teste de adrenalina e o ensaio baseado em substrato fluorogênico, que devem ser aperfeiçoados para a utilização com células íntegras. A modelagem computacional da estrutura tridimensional da PSEH resultou em um modelo contendo 40% de hélices  $\alpha$  e 12% de folhas  $\beta$ . Determinamos que os resíduos que devem fazer parte do sítio ativo são Tyr319, Asp209, Asp352 e His383 e, tendo em vista que a PSEH deve se apresentar na forma de um homodímero com sítio ativo similar ao das EHs de *P. aeruginosa*, *A. radiobacter* e *A. niger*, nossa hipótese é que esta enzima deve hidrolisar epóxidos pouco volumosos e aromáticos com algum nível de enantiosseletividade.

## Abstract

### Studies towards cloning and expression of *SEH1* gene (epoxide hydrolase) of *Pichia stipitis* in *Pichia pastoris*

Enantiopure epoxides and vicinal diols have been used to prepare a number of bioactive molecules. Thus, the microbial epoxide hydrolases able to enantioselectively hydrolyze racemic epoxides emerged as a promising alternative in the synthesis of these compounds. Recently, the *P. stipitis* CCT2617 strain was selected due to the presence of hydrolytic activity against terminal epoxides and had its genome completely described. Therefore, this yeast was selected for cloning and expression of the gene *SEH1*, which was annotated as epoxide hydrolase. In this work, the cloning of *SEH1* gene, codifying for the epoxide hydrolase of *P. stipitis*, was done with success in *P. pastoris*, both in pPICZ $\alpha$  A and pPICZ B vectors. The cloning of the protein with a histidine tag should help in the detection of expression. The detection of a protein with 46 kDa evidenced that the expression of SEH enzyme (containing the  $\alpha$  factor) is occurring, however, this result was not reproducible due to the sample degradation. Furthermore, better alternatives for the detection of enzyme activity were performed, as adrenaline test and fluorogenic assay, which must be optimized for application with whole cells. The 3D structure computational modeling of PSEH resulted in a model that contains 40% of  $\alpha$  helices and 12% of  $\beta$  sheets. Our hypothesis is that the residues that make part of the active site are Tyr319, Asp209, Asp352 and His 383. And, considering that the PSEH should be in the homodimeric form with an active site similar to that of the EHs of *P. aeruginosa*, *A. radiobacter* and *A. niger*, this enzyme should hydrolyze small and aromatic epoxides probably with some enantioselectivity.

# Índice

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Lista de Esquemas</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Epóxido hidrolases .....	3
1.2. Epóxido hidrolase de <i>Pichia stipitis</i> .....	9
1.3. Sistema de expressão em <i>Pichia pastoris</i> .....	10
1.4. Resumo dos resultados anteriores .....	12
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>15</b>
3.1. Oligonucleotídeos .....	15
3.2. Tampões e outras soluções .....	15
3.3. Micro-organismos .....	16
3.4. Vetores .....	17
3.5. Meios de cultivo .....	17
3.6. Cultivo e Manutenção das Linhagens .....	19
3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	19
3.8. Tratamento com enzimas de restrição .....	20
3.9. Desfosforilação das extremidades 5' de fragmentos de DNA .....	21
3.10. Ligação de moléculas de DNA .....	21
3.11. Purificação de DNA .....	21
3.12. Purificação de DNA plasmidial .....	22
3.13. Purificação de DNA genômico .....	22
3.14. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA .....	22
3.15. Preparação de células eletrocompetentes. ....	22
3.16. Eletrotransformação .....	24
3.17. Eletroforese de DNA .....	25
3.18. Eletroforese de proteínas .....	25
3.19. Triagem enzimática de alto desempenho com sonda fluorogênica .....	25
3.20. Teste de expressão das linhagens recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> .....	26
3.21. Triagem enzimática de alto desempenho em placa contendo meio sólido 27	
3.22. Teste de adrenalina .....	27
3.23. Sequenciamento de DNA .....	28
3.24. Análises <i>in silico</i> .....	28

<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>29</b>
4.1. Análises <i>in silico</i> .....	49
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Anexos.....</b>	<b>65</b>

## Lista de Abreviaturas

$A_{600\text{nm}}$	Absorbância medida a 600 nm
ANEH	Epóxido Hidrolase de <i>Arpergillus niger</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
Da	Dalton
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Deoxirribonucléico
<i>E</i>	Razão Enantiomérica
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra acético
<i>ee</i>	Excesso Enantiomérico
EH	Epóxido Hidrolase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
PSEH	Epóxido Hidrolase de <i>Pichia stipitis</i>
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
rpm	Rotações por Minuto
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Hidrólise do <i>trans</i> -1-fenil-1,2-epóxi-propano	<b>6</b>
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos	<b>15</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores de absorvância obtidos no teste de adrenalina utilizando diferentes concentrações de periodato de sódio	<b>47</b>
<b>Tabela 4.</b> Valores de absorvância corrigidos obtidos no teste de interferência de células	<b>48</b>
<b>Tabela 5.</b> Ponto Isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) teóricos das enzimas citadas nesse trabalho	<b>49</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1.** (A) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (B) Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico das reações de PCR utilizadas para amplificação do gene *SEH* de *Pichia stipitis*. M: Padrão de peso molecular; 1-4: Reações de PCR utilizando como DNA molde as amostras de 1 a 4. Condições da PCR: Phusion DNA Polymerase (Finnzymes), 25 ciclos,  $T_m = 51,0\text{ }^\circ\text{C}$ . ..... **30**
- Figura 2.** Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de clivagem do vetor pPICZ $\alpha$ A com enzimas de restrição. M: Padrão de peso molecular; 1: tratamento com a enzima *Xba*I; 2: tratamento com a enzima *Not*I; 3: vetor não linearizado. .... **31**
- Figura 3.** Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de clivagem do fragmento *SEH* com as enzimas de restrição *Xba*I e *Not*I. M: Padrão de peso molecular; 1 e 3: amostras de fragmento tratadas. .... **32**
- Figura 4.** Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da análise de restrição para confirmação da presença do fragmento *SEH* no vetor pPICZ $\alpha$  A. M: Padrão de peso molecular; CN: Controle negativo; 1-5: Reações utilizando o DNA plasmidial das amostras de 1 a 5. .... **33**
- Figura 5.** Mapa do vetor pPICZ $\alpha$  A. .... **35**
- Figura 6.** Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de linearização vetor pPICZ $\alpha$  A – *SEH* 2 com *Dra*I. M: Padrão de peso molecular; 1-3: amostras das reações de linearização do DNA plasmidial. .... **36**
- Figura 7.** Exemplificação da triagem em placa contendo meio sólido e 2 mM de substrato, clones: *P. pastoris* KM71H + pPICZ $\alpha$  A – *SEH* 2. .... **38**
- Figura 8.** Fotodocumentação do gel de poliacrilamida analítico de amostras coletadas durante a indução da expressão. M: Padrão de peso molecular: Pre-stained Broad Range (Bio Rad); C: Controle - Albumina, 96 h: Alíquota da indução. .... **39**
- Figura 9.** (A) Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); (B) Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico das reações de PCR utilizadas para amplificação do gene *SEH* de *Pichia stipitis*. M: Padrão de peso molecular; I e E: Reações de PCR para clonagem no pPICZ B e pPICZ $\alpha$  A, respectivamente. .... **40**
- Figura 10:** Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de clivagem do vetor pPICZ $\alpha$  A com enzimas de restrição. M: Padrão de peso molecular (Fermentas); Fragmentos tratados: I (intra), E (extra), B (pPICZ B) e A (pPICZ $\alpha$  A). .... **41**

<b>Figura 11.</b> Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da análise de restrição para confirmação da presença do fragmento <i>SEH</i> nos vetores. M: Padrão de peso molecular; CN: Controle negativo; I1: clone para expressão intracelular; E1-E3: clones para expressão extracelular. ....	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b> Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de linearização dos vetores com <i>DraI</i> . M: Padrão de peso molecular; à direita: amostras.....	<b>45</b>
<b>Figura 13.</b> Modelos obtidos para a PSEH, destacando as hélices $\alpha$ (em rosa) e as folhas $\beta$ (em amarelo). ....	<b>50</b>
<b>Figura 14.</b> Representação da estrutura da PSEH, destacando a localização do fator $\alpha$ (em vermelho) e da cauda de histidina (em azul). ....	<b>52</b>
<b>Figura 15.</b> Representação da estrutura da PSEH, com destaque para Tyr258 (em roxo), Tyr319 (em verde), Asp209 (em azul), Asp352 (em amarelo) e His383 (em vermelho). ....	<b>55</b>
<b>Figura 16.</b> Comparação entre a posição da Tyr381, que faz parte do sítio ativo da 1EK1 (em branco), com a Tyr258 da PSEH (em cinza). ....	<b>56</b>
<b>Figura 17.</b> Representação do sítio ativo da PSEH, Tyr319 (em verde), Asp209 (em azul), Asp352 (em amarelo) e His383 (em vermelho). ....	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b> Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com a 1EK1 (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco). ....	<b>58</b>
<b>Figura 19.</b> Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com a 3I28 (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco). .	<b>59</b>
<b>Figura 20.</b> Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com a 3KDA (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco). ....	<b>59</b>
<b>Figura 21.</b> Exemplo do tipo de substrato aceito pela EH de <i>P. aeruginosa</i> (A) 1-bromo-2,3-epóxi-propano, (B) <i>cis</i> -2,3-difeniloxirano. ....	<b>60</b>
<b>Figura 22.</b> Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com outras EHs (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco), sendo (A) 1EHY, (B) 1QO7 e (C) 3G02. ....	<b>61</b>

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Exemplo de utilização de epóxido enantiopuro como precursor na produção industrial do fármaco Indinavir® <sup>8</sup> .....	<b>2</b>
<b>Esquema 2.</b> Representação esquemática do mecanismo de atuação da epóxido hidrolase de <i>A. radiobacter</i> <sup>16</sup> .....	<b>4</b>
<b>Esquema 3.</b> Representação esquemática de uma reação enantioconvergente utilizando a ANEH e catálise ácida para a obtenção do composto enantiopuro <sup>22</sup> ... <b>7</b>	<b>7</b>
<b>Esquema 4.</b> Representação esquemática de uma reação enantioconvergente utilizando as EHs de <i>A. niger</i> (ANEH) e <i>B. sulfurescens</i> (BSEH). Entre parênteses estão indicados o rendimento e o <i>ee</i> , respectivamente <sup>23</sup> .....	<b>8</b>
<b>Esquema 5.</b> Representação esquemática de uma reação enantioconvergente utilizando um único biocatalisador para a obtenção do composto enantiopuro <sup>24</sup> .... <b>9</b>	<b>9</b>
<b>Esquema 6.</b> Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção da epóxido hidrolase de <i>P. stipitis</i> (PSEH) <sup>40</sup> .....	<b>37</b>
<b>Esquema 7.</b> Modelo de reação da epóxido hidrolase de <i>P. stipitis</i> (PSEH) utilizando fenil glicidil éter como substrato <sup>33</sup> .....	<b>37</b>
<b>Esquema 8.</b> Representação esquemática do teste de adrenalina para detecção da epóxido hidrolase de <i>P. stipitis</i> (PSEH) <sup>41</sup> .....	<b>46</b>
<b>Esquema 9.</b> Reação de hidrólise da leucotoxina catalisada por EH <sup>44</sup> .....	<b>58</b>

# 1. Introdução

Em drogas racêmicas, os enantiômeros podem ser absorvidos ou degradados a diferentes taxas, tendo atividade farmacológica igual ou distinta, com uma das formas sendo inativa ou mesmo tóxica. Dessa forma, o “US Food and Drug Administration” (FDA) tem imposto a introdução de substâncias ativas em sua forma enantiopura através de regulamentações cada vez mais rigorosas<sup>1</sup>. Portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de compostos opticamente puros, tem dado a catálise química assimétrica posição de destaque na química orgânica moderna<sup>2</sup>.

Os requerimentos para a síntese de compostos opticamente ativos podem ser alcançados utilizando, por exemplo, catalisadores de metais de transição<sup>3</sup> ou por biocatálise com a aplicação de enzimas<sup>4</sup>. Neste contexto, um grande número de sistemas de triagem enzimática tem sido utilizado para detectar atividades catalíticas para aplicação em inúmeras transformações de substratos e em reações enantiosseletivas<sup>5</sup>. Estes sistemas permitem a detecção da atividade enzimática indiretamente, através de uma mudança de cor da amostra ou do crescimento microbiano diferenciado devido à seleção biológica, por exemplo.

---

<sup>1</sup> Stinson, S. C. *Chem. Eng. News* **2000**, 78, 55.

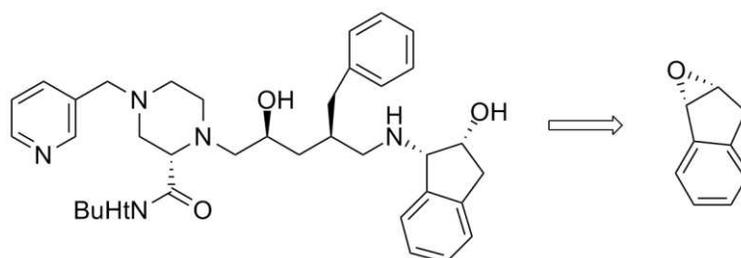
<sup>2</sup> Reetz, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 5716.

<sup>3</sup> Brunner, H.; Zettlmeier, W. *Handbook of enantioselective catalysis with transition metal compounds*, vol I-II. **1993**, VCH, Weinheim, Germany; Ojima (ed) *Catalytic asymmetric synthesis* **1993**, VCH, Weinheim; Noyori, R. *Asymmetric catalysis in organic synthesis* **1994**, Wiley-UCH, New York; Jacobsen, E. N.; Pfaltz, A.; Yamamoto, H. (eds) *Comprehensive asymmetric catalysis* **1999**, Springer, Berlin Heidelberg New York.

<sup>4</sup> Davies, H. G.; Green, R. H.; Kelly, D. R.; Roberts, S. M. *Biotransformations in preparative organic chemistry: the use of isolated enzymes and whole cell systems in synthesis* **1989**, Academic Press, London; Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in synthetic organic chemistry* **1994**, Drauz, K.; Waldmann, H. (eds) *Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook* **1994**, VCH, Weinheim, Germany; Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry* **1994**, Springer, Berlin Heidelberg New York.

<sup>5</sup> Reetz, M. T.: *Enzyme Assays: High Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprint* **2006**, Wiley-VCH; Schrader, W.; Eipper, A.; Pugh, D. J.; Reetz, M. T. *Can. J. Chem.* **2002**, 80, 626; Welch, C. J.; Pollard, S. D.; Mathre, D. J.; Reider, P. J. *Org. Lett.* **2001**, 3, 95; Reetz, M. T.; Becker, M. H.; Klein, H-W.; Stöckigt *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1758; Reetz, M. T.; Zonta, A.; Scimossek, K.; Liebeton, K.; Jaeger, K. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 2830; Reetz, M. T.; Wilensek, S.; Zha, D.; Jaeger, K. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3589; Reetz, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 5716; Reetz, M. T.: *Comprehensive Review of Directed Evolution of Enantioselective Enzymes* In *Advances in Catalysis* **2006**, Ed. Gates, B. C., Knözinger, K.; Elsevier.

Epóxidos enantiopuros e dióis vicinais são utilizados para a síntese de drogas antiobesidade, nematocidas, agentes anticâncer e inúmeras outras moléculas bioativas<sup>6,7</sup>. Um exemplo é o epóxido utilizado como precursor na síntese do Indinavir® da Merck (Esquema 1), um inibidor de protease de HIV, cujas vendas produziram receitas superiores a US\$ 500 milhões em menos de três anos no mercado<sup>8</sup>.



Esquema 1. Exemplo de utilização de epóxido enantiopuro como precursor na produção industrial do fármaco Indinavir®<sup>8</sup>.

Dessa forma, as epóxido hidrolases microbianas capazes de hidrolisar enantioselectivamente epóxidos racêmicos emergiram como uma alternativa promissora na obtenção destes compostos.

Recentemente, utilizando sondas fluorogênicas para triagem de atividade enzimática, a linhagem *P. stipitis* CCT 2617, foi selecionada por apresentar atividade hidrolítica frente à epóxidos terminais<sup>9</sup>. Devido ao interesse do grupo de pesquisas em desenvolver projetos voltados para a obtenção de enzimas, e considerando o trabalho recentemente publicado relatando o genoma completo de *P. stipitis*<sup>10</sup> (o que facilita enormemente o trabalho de desenho dos *primers* necessários para amplificação do gene que codifica para a enzima em estudo) esta levedura foi selecionada para o trabalho de isolamento, clonagem, expressão da epóxido-hidrolase e posteriores modificações da enzima via evolução dirigida.

<sup>6</sup> Simeó, Y.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 40.

<sup>7</sup> Kotik, M.; Brichac, J.; Kyslík, P. *J. Biotechnol.* **2005**, *120*, 364.

<sup>8</sup> Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.

<sup>9</sup> Bicalho, B.; Chen, L. S.; Grognux, J.; Reymond, J. L.; Marsaioli, A. J. *J. Braz. Chem. Soc* **2004**, *6*, 911; Mantovani, S. M. *Dissertação de Mestrado – IQ, Unicamp* **2007**.

<sup>10</sup> du Preez, J.C.; van Driessel, B.; Prior, B.A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *30*, 53.

O gene em questão foi anteriormente isolado e sua expressão em sistemas heterólogos, utilizando diferentes linhagens de *E. coli* como hospedeiro e vários vetores (ver item 1.4) para a produção da proteína, não levou à produção de uma enzima funcional. Uma alternativa bastante viável consiste em adotar um sistema de expressão em eucarioto, *P. pastoris*, um dos sistemas de expressão heteróloga mais eficientes para genes eucariotos<sup>11</sup>.

### 1.1. Epóxido hidrolases

As epóxido hidrolases (EC 3.3.2.3) são responsáveis pela desintoxicação de xenobióticos e estão envolvidas na síntese de mensageiros químicos e metabólitos secundários. Estas enzimas podem fazer parte do metabolismo de uma variedade de epóxidos, desde pequenos e alifáticos até poliaromáticos impedidos<sup>12</sup>, muitos dos quais são mutagênicos e/ou carcinogênicos. Os epóxidos são geralmente formados pela oxidação de compostos olefínicos ou aromáticos, catalisada por citocromo P-450<sup>13</sup>. Sua toxicidade está relacionada com a alta reatividade do anel oxirano, o qual devido ao seu caráter eletrofílico, pode reagir com uma variedade de nucleófilos biológicos. A transformação enzimática de epóxidos a dióis é de vital importância para a regulação celular. Os dióis resultantes são mais solúveis em água e podem ser facilmente eliminados do organismo<sup>14</sup>. As EHs solúveis de mamíferos têm várias funções biológicas no metabolismo de lipídeos e na regulação da pressão sanguínea, já as EHs microbianas têm um papel importante no metabolismo de compostos orgânicos, sendo que, cada uma possui sua própria preferência por substratos.

A maioria das EHs conhecidas pertence à classe das  $\alpha/\beta$ -hidrolases e possui uma tríade catalítica que consiste de dois resíduos de ácido aspártico e um resíduo de histidina. A tríade é altamente conservada, mesmo que a similaridade entre as sequências seja baixa<sup>14</sup>.

---

<sup>11</sup> Cereghino, J. L.; Cregg, J. M.; *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 45.

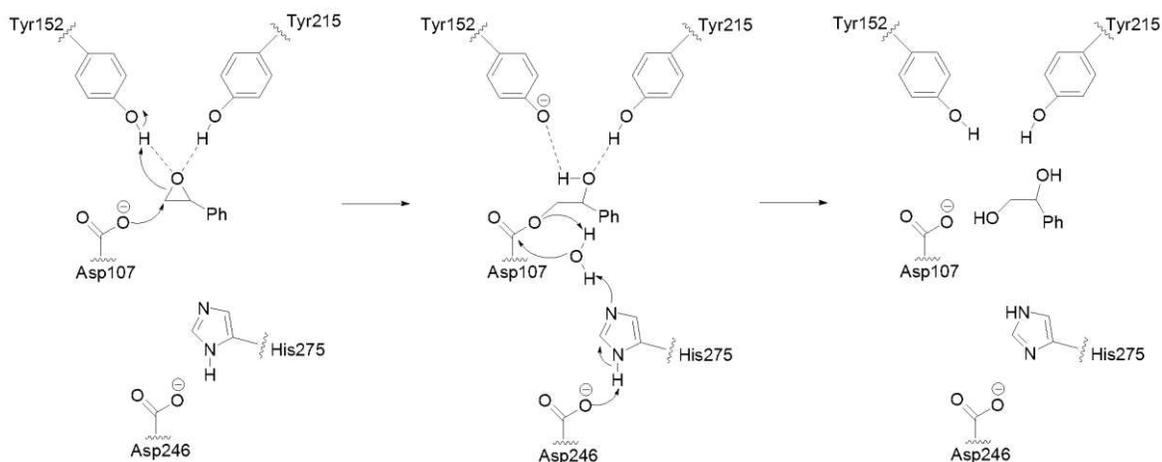
<sup>12</sup> Widersten, M.; Gurell, A.; Lindberg, D. *Bioch. Bioph. Acta* **2010**, *1800*, 316.

<sup>13</sup> Chiappe, C.; Cordon, A.; Lo Moro, G.; Palese, C. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 341.

<sup>14</sup> Archelas, A.; Furtoss, R. *Tibtech* **1998**, *16*, 108.

As EHs são enzimas independentes de co-fatores e encontradas em uma variedade de organismos, de bactérias a mamíferos, podendo possuir alta enantiosseletividade e atividade<sup>15</sup>. Tais fatores tiveram como consequência o interesse em utilizar essas enzimas em síntese orgânica.

Dessa forma, as epóxido hidrolases passaram a ser objeto de estudo, o que levou à determinação da estrutura tridimensional da epóxido hidrolase (EH) de *Agrobacterium radiobacter*<sup>16</sup> e à proposta de um mecanismo de atuação<sup>16</sup>, no qual dois resíduos de tirosina (Tyr152 e Tyr215) ativam o anel oxirano para o ataque nucleofílico de um resíduo de aspartato (Asp107). Na segunda etapa, ocorre a hidrólise da ligação carboxílica, do intermediário formado, por uma molécula de água ativada pelo par His275 e Asp246, fornecendo assim o diol vicinal como produto (Esquema 2).



Esquema 2. Representação esquemática do mecanismo de atuação da epóxido hidrolase de *A. radiobacter*<sup>16</sup>.

Outras EHs tiveram sua estrutura resolvida e apresentaram mecanismo de atuação muito semelhante ao descrito anteriormente, como no caso de uma EH

<sup>15</sup> Archelas, A.; Furtoss, R. *Curr. Opinion in Biotechnol* **2001**, 5, 112.

<sup>16</sup> Nardini, M.; Ridder, I. S.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Rink, R.; Janssen, D.B.; Dijkstra, B.W. *J Biol Chem* **1999**, 274, 14579.

humana<sup>17</sup> e da EH de *Aspergillus niger*<sup>18</sup>. Como no mecanismo proposto, o ataque nucleofílico inicial pode ocorrer em qualquer um dos dois átomos de carbono do anel oxirano, a configuração absoluta do diol pode ser mantida ou invertida, dependendo da preferência da enzima.

No caso da EH de *A. radiobacter*, observa-se a preferência pelo (*R*)-enantiômero. Por exemplo, na abertura do óxido de estireno racêmico o (*R*)-diol é formado com uma razão enantiomérica (*E*) igual a 17<sup>19</sup>. Já no caso da EH de *Aspergillus niger* é observada a preferência pelo (*S*)-enantiômero. Por exemplo, na reação com o fenil glicidil éter racêmico, o (*S*)-diol é formado com *E* = 4,6<sup>18</sup>. Esta última enzima foi expressa com sucesso em *E. coli*<sup>18</sup>, assim como as EHs de *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula araucariae* e *Rhodotorula glutinis*<sup>20</sup>, sendo que a última também foi expressa em *P. pastoris*<sup>21</sup>.

As EHs destas leveduras foram testadas na hidrólise do *trans*-1-fenil-1,2-epóxi-propano e apresentaram preferência pela reação com o (1*S*,2*S*)-enantiômero, principalmente no caso das enzimas expressas no sistema heterólogo, conforme apresentado na Tabela 1<sup>20</sup>.

---

<sup>17</sup> German, A. G.; Christophe, M.; Bruce, D.; Hammock, I.; Christianson, D. W. *Biochem.* **2004**, *43*, 4716.

<sup>18</sup> Reetz, M. T.; Bocola, M.; Wang, L.W.; Sanchis, J.; Cronin, A.; Arand, M.; Zou, J.; Archelas, A.; Bottalla, A.; Naworyta, A.; Mowbray, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7334.

<sup>19</sup> Lingyun, R.; Li, C.; Wilfred, C.; Kenneth, F. R.; Thomas, K. W. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, *71*, 3995.

<sup>20</sup> Visser, H.; Weijers, A. G. M.; van Ooyen, A. J. J.; Verdoes, J. C. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1687.

<sup>21</sup> Kima, H. S.; Lee, S. J.; Lee, E. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *43*, 2.

Tabela 1. Hidrólise do *trans*-1-fenil-1,2-epóxi-propano

Organismo	Linhagem	<i>E</i>
<i>R. glutinis</i>	CBS8761	24
<i>R. toruloides</i>	CBS14	6
<i>R. araucariae</i>	CBS6031	5
<i>E. coli</i>	BL21(DE3) <i>RgEph1</i>	61
<i>E. coli</i>	BL21(DE3) <i>RtEph1</i>	100
<i>E. coli</i>	BL21(DE3) <i>RaEph1</i>	20

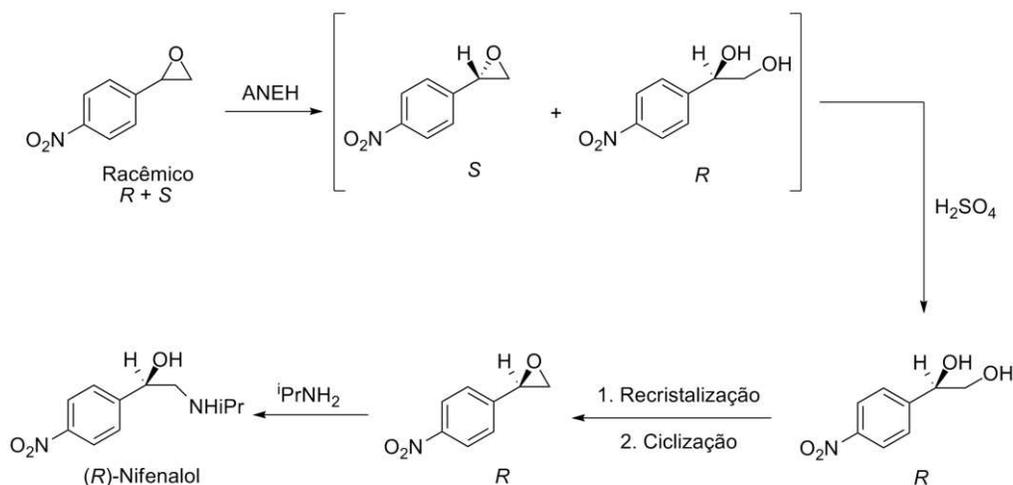
Onde, *RgEph1*, *RtEph1* e *RaEph1*, são EH de *R. glutinis*, *R. toruloides* e *R. araucariae*, respectivamente.

Um estudo envolvendo a evolução dirigida da EH de *A. niger*<sup>18</sup> revelou os aspectos mecanísticos que levam à preferência por um enantiômero: os resíduos de aminoácido próximos ao sítio ativo permitem o posicionamento de uma das formas com uma menor distância entre o resíduo de aspartato que efetua o ataque nucleofílico e o átomo de carbono que sofre o ataque. No caso do estudo citado, a mutação de oito resíduos próximos ao sítio ativo ocasionou um aumento do *E* de 4,6 para 115 na reação com fenil glicidil éter racêmico para a formação do (*S*)-diol.

Tendo em vista a preferência diferenciada com relação a um enantiômero, a catálise utilizando EH permite superar um problema intrínseco da resolução cinética, o rendimento teórico máximo de 50%, a partir do uso de reações enantioconvergentes. Essas reações se dão via um processo no qual cada enantiômero é convertido ao mesmo produto através de dois caminhos independentes, onde um dos enantiômeros reage com retenção da configuração, enquanto o outro é transformado com inversão, em uma reação utilizando uma EH e um catalisador químico, duas EHs com enantiosseletividades opostas ou um único biocatalisador que possua regioseletividade oposta para cada enantiômero.

Como exemplo da combinação de uma EH com um catalisador químico, podemos citar a síntese do enantiômero biologicamente ativo do (*R*)-Nifenalol®,

um bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, partindo do óxido de *para*-nitro-estireno<sup>22</sup>. Inicialmente, foi utilizada a aplicação da hidrólise enantiosseletiva com o uso da ANEH, seguida da hidrólise catalisada por ácido do epóxido remanescente (Esquema 3). Este método permitiu a preparação do produto enantiopuro com rendimento de 58% e ee de 80%.

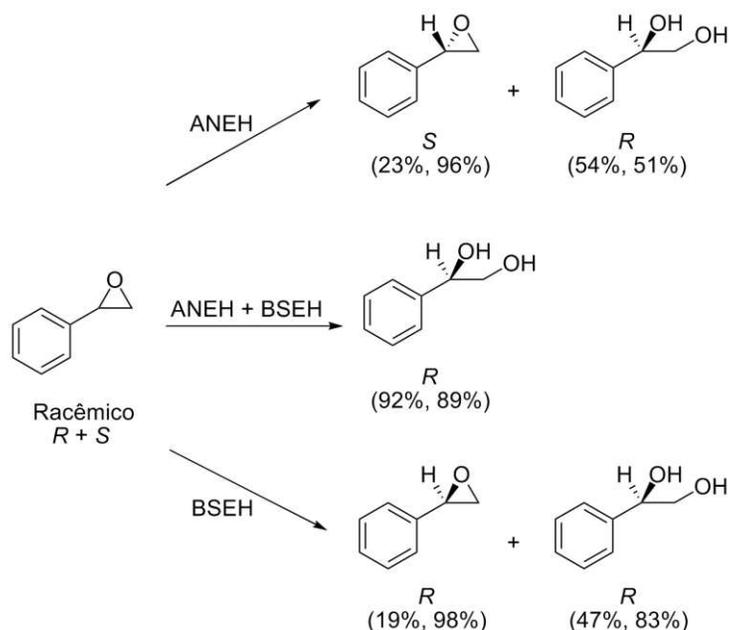


Esquema 3. Representação esquemática de uma reação enantioconvergente utilizando a ANEH e catálise ácida para a obtenção do composto enantiopuro<sup>22</sup>.

Com relação à aplicação de duas EHs em um mesmo procedimento, podemos citar o uso das EHs de *A. niger* e *B. sulfurescens* para a transformação do óxido de estireno (Esquema 4)<sup>23</sup>.

<sup>22</sup> Pedragosa-Moreau, S.; Morisseau, C.; Baratti, J.; Zylber, J.; Archelas, A.; Furstoss, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9707.

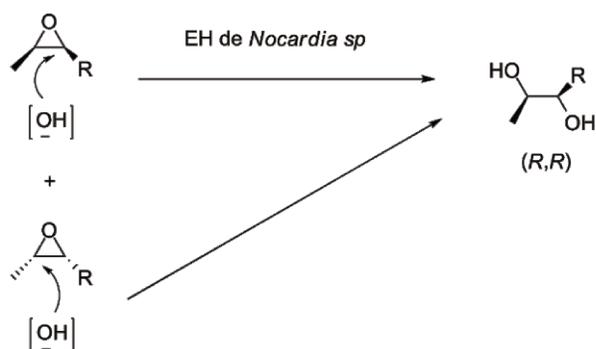
<sup>23</sup> Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5533.



Esquema 4. Representação esquemática de uma reação enantioconvergente utilizando as EHs de *A. niger* (ANEH) e *B. sulfurescens* (BSEH). Entre parênteses estão indicados o rendimento e o *ee*, respectivamente<sup>23</sup>.

Estes processos, por dependerem de mais de um catalisador, são mais sensíveis a alterações, de forma que, uma reação enantioconvergente envolvendo apenas um catalisador é preferencial. Neste caso, além da alta enantiosseletividade, o catalisador precisa ter regioseletividade oposta para cada um dos enantiômeros. Devido a esta condição, difícil de ser cumprida, este tipo de processo é raramente relatado. Um exemplo é a hidrólise de epóxidos 2,3-substituídos pela EH de *Nocardia sp* (Esquema 5) para a obtenção do produto com *ee* de 97% e 100% de conversão<sup>24</sup>.

<sup>24</sup> Kroutil, W.; Mischitz, M.; Faber, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **1997**, *24*, 3629.



Esquema 5. Representação esquemática de uma reação enantioconvergente utilizando um único biocatalisador para a obtenção do composto enantiopuro<sup>24</sup>.

## 1.2. Epóxido hidrolase de *Pichia stipitis*

*Pichia stipitis* é uma levedura bastante conhecida pela sua alta capacidade nativa de fermentação da xilose<sup>25</sup>. Sabe-se que culturas suplementadas de *P. stipitis* são capazes de produzir 50 g/L de etanol a partir deste açúcar<sup>10</sup>. O grande interesse pela capacidade fermentativa desta levedura e o grande potencial para ser utilizada em processos industriais levou o grupo de pesquisas de Thomas W. Jeffries e Igor V. Grigoriev a seqüenciar e organizar o genoma completo de *P. stipitis*<sup>26</sup>.

Recentemente, seu gênero foi renomeado em honra do Professor Alexander Scheffers, por sua contribuição à biotecnologia e por seu serviço como editor do periódico *FEMS Yeast Research*, sendo assim esta levedura foi renomeada como *Scheffersomyces stipitis*<sup>27</sup>, dessa forma, ambos os nomes podem ser encontrados na literatura.

Dois genes que codificam epóxido hidrolases solúveis com 966 pb estão associadas ao genoma de *P. stipitis* CBS 6054 (*SEH1* e *SEH2*) os quais apresentam 94% de identidade. De acordo com os dados depositados na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) o gene não possui introns, o que

<sup>25</sup> van Dijken, J.P.; van den Bosch, E.; Hermans, J.J.; de Miranda, L.R.; Scheffers, W.A. *Yeast* **2**, **1986**, 123.

<sup>26</sup> Jeffries, T.W.; Grigoriev, I.V.; Grimwood, J.; Laplaza, J.M.; Aerts, A.; Salamov, A.; Schmutz, J.; Lindquist, E.; Dehal, P.; Shapiro, H.; Jin, Y.S.; Passoth, V.; Richardson, P.M. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 319.

<sup>27</sup> Kurtzman, C. P.; Motofumi, S. *Mycoscience* **2010**, *51*, 2.

possibilita a sua amplificação a partir do DNA genômico, e codifica para um polipeptídeo de 321 aminoácidos e 36,7 kDa. Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a caracterização da epóxido hidrolase de *Pichia stipitis*.

### 1.3. Sistema de expressão em *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de metabolizar metanol como sua única fonte de carbono. A enzima álcool oxidase (AOX) está envolvida na primeira etapa desta via metabólica, oxidando o metanol a formaldeído com o uso de oxigênio molecular. Para compensar a baixa afinidade da enzima com o oxigênio, a mesma é produzida em grande quantidade<sup>28</sup>. Dois genes codificam para a enzima álcool oxidase: *AOX1* e *AOX2*, sendo o produto do primeiro o responsável pela maior parte da atividade de álcool oxidase na célula. A expressão desse gene é fortemente regulada e induzida por metanol e não ocorre na ausência deste composto. Por estes motivos, o promotor que regula a produção da AOX é usado para dirigir a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*<sup>11</sup>.

A popularidade do sistema de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* pode ser atribuída a diversos fatores, dentre os quais se destacam: a simplicidade das técnicas necessárias para a manipulação genética molecular; a habilidade de *P. pastoris* de produzir altos níveis de proteína heteróloga, tanto intra quanto extracelularmente; a capacidade de promover modificações pós-traducionais típicas de eucariotos superiores (como glicosilação e formação de ligações dissulfeto); a possibilidade de obtenção de grande quantidade de biomassa e sua disponibilidade como *kit* comercial<sup>29</sup>.

Os vetores utilizados para a clonagem neste sistema são integrados ao genoma da levedura por recombinação homóloga, sendo o direcionamento do DNA feito pela presença da sequência do promotor 5' *AOX1* nos mesmos. A linearização do vetor com uma enzima de restrição, cujo sítio esteja localizado

---

<sup>28</sup> Cregg, J. M.; Barringer, K. J.; Hessler, A. Y.; Madden, K. R. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *12*, 3376.

<sup>29</sup> Cereghino, J. L.; Cregg, J. M.; *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 45.

nas regiões 5' *AOX1*, estimula eventos de recombinação por *crossover* simples, levando à inserção gênica neste locus com uma alta frequência (50 a 80%). Os outros transformantes podem passar por eventos de conversão gênica, nos quais apenas a marca de resistência do vetor foi integrada ao locus<sup>21</sup>. Como a recombinação pode ocorrer de diferentes formas, é necessário fazer uma triagem dos clones para um melhor nível de expressão.

Os plasmídeos são bifuncionais e resistentes à Zeocina. Para a manutenção e replicação em *E. coli* há uma origem de replicação de procariotos, mas não há origem de replicação em levedura, de forma que, após a transformação em *P. pastoris*, os transformantes resistentes à Zeocina serão aqueles que tiveram a sequência do plasmídeo recombinada em seu DNA genômico.

O sistema também permite a adição de uma cauda de histidina no C-terminal da proteína recombinante que pode ser utilizada para a purificação ou detecção da mesma. Conforme citado anteriormente, a proteína pode ser expressa e secretada para o meio, isso é possível, porque alguns vetores possuem o peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*.

Além dessas características, a expressão pode ser feita em linhagens com diferentes fenótipos quanto à utilização de metanol. As linhagens que possuem o fenótipo selvagem crescem rapidamente em metanol, sendo consideradas Mut<sup>+</sup> (Methanol Utilization Plus). Linhagens que possuem uma deleção no gene *AOX1* e apresentam um crescimento lento em metanol, por possuir apenas o *AOX2*, são denominadas Mut<sup>S</sup> (Methanol Utilization Slow) e são melhores produtoras de algumas enzimas recombinantes<sup>11</sup>.

Dessa forma, selecionamos o sistema de expressão em *P. pastoris* devido à sua eficiência para a expressão de genes eucariotos, como alternativo à expressão em *E. coli* que, nesse caso, se mostrou ineficiente.

#### 1.4. Resumo dos resultados anteriores

Os resultados descritos a seguir foram obtidos por de Oliveira, L. G., Sanchis, J. M. e Fernandez, L. em experimentos realizados no Max Planck Institut für Kholenforschung.

O gene *SEH* foi amplificado utilizando-se *primers* desenhados baseando-se nas sequências XP001387255 (*P. stipitis* CBS 6054) e XP001382299 (*P. stipitis* CBS 6054), correspondentes *SEH1* e *SEH2*, respectivamente. O fragmento foi subclonado e sequenciado em pUC18-*Sma*I, apresentando as seguintes modificações com relação a sequência originalmente descrita:

Posição	<i>P. stipitis</i> (LGO)	<i>SEH1</i>	<i>SEH2</i>	
294	T	C	C	Val (GTC) Val (GTT)
627	C	T	T	Ile (ATT) Ile (ATC)
804	A	G	A	Lys (AAG) Lys (AAA)
847	A	G	G	Val (GTC) Ile (ATC)

Inicialmente foi planejada uma estratégia de clonagem em pETM11 e expressão em *E.coli* Origami(2DE3). Vários estudos têm mostrado que a expressão em Origami(2DE3) resulta na formação de proteínas até 10 vezes mais ativas que em outros hospedeiros, uma vez que o sistema facilita a formação de ligações de dissulfeto no citoplasma em função das mutações nos genes que codificam para a tioredoxina redutase (*trxB*) e glutathiona redutase (*gor*).

O gene *SEH* foi amplificado com *primers* contendo os sítios *Nco*I e *Not*I para subclonagem em pETM11. Foi utilizado o conjunto de *primers* EHPS-*Nco*I-F: 5'-CATTCCATGGCGATGACAGAAAGATTCGTTATCAAGC-3' e EHPS-*Not*I-R: 5'-CTTGCGGCCGCCTAACTACTGGTAGCCTTG-3'. Após sequenciamento, o plasmídeo contendo as informações corretas foi utilizado para transformar *Escherichia coli* Origami(2DE3), na ausência e na presença de chaperonas (pGroES). Neste experimento foram utilizadas diversas concentrações de IPTG (0,2/ 1,0 / 2,0 e 10,0 mM) para indução da expressão por 8 horas, entretanto nenhuma atividade foi detectada pelo teste de adrenalina após 3 e 24 horas de

reação na presença dos substratos *trans*-2,3-epoxibutano, *cis*-2,3-epoxibutano, 1,2-epoxi-2-metilbutano, 2,3-epoxi-3,4,4-trimetilpentano, ciclopentenóxido, cicloexenóxido, (+/-)óxido de estireno, (*R*)-glicidol, glicidil fenil éter, limoneno epóxido (*cis+trans*), etil-(2*R*,3*R*)-2,3-epóxi-3-metilpropanoato, exo-2,3-epóxi-norbornana.

A linhagem *E. coli* Origami(2DE3) foi transformada também com pTf16 (tig), pG-Tf2 (groES-groEL-tig), pKJE7 (dnaK-dnaJ-grpE) e pG-KJE8 (dnaK-dnaJ-grpE; groES-groEL). A linhagem controle *E. coli* Origami(2DE3) transformada apenas com o plasmídeo, sem chaperonas, foi cultivada em uma bateria de testes junto aos demais transformantes e a indução realizada por 8 e 24 horas. Entretanto, a atividade observada para as linhagens controle foram similares às observadas para todos os transformantes. Os lisados foram também avaliados por SDS-PAGE (12%) e não detectada nenhuma banda significante em torno de 37 kDa.

Alternativamente, foi realizada a tentativa de clonagem e expressão no sistema pQE60/*E. coli* (DH5α), analogamente ao sistema adotado para a expressão da epóxido hidrolase de *Aspergillus niger*<sup>18</sup>. O gene clonado em pETM11 foi utilizado como molde para amplificação com os *primers* contendo os sítios de restrição *Bgl*II e *Eco*RI. (Primer F: AGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAATGACAGAAAGATTCGTTATCAAG (*Eco*RI) e Primer R: GGTGATGGTGATGAGATCTCTAACTACTGGTAGCCTTGG (*Bgl*II)).

O fragmento foi utilizado para ligação em pQE60- *Bgl*II/*Eco*RI e *E. coli* (DH5α) foi utilizada para transformação. Após confirmação da sequencia em alguns clones selecionados, estes foram utilizados para realização dos experimentos de expressão. A atividade enzimática foi avaliada utilizando-se o teste de adrenalina e os substratos citados anteriormente, após 3 e 24 horas de reação, entretanto a atividade observada foi muito similar àquela observada para o lisado celular. Adicionalmente, foi feita análise do perfil reacional por HPLC e novamente os resultados obtidos foram similares ao do controle (linhagem não transformada).

## 2. Objetivos

Tendo em vista a importância das epóxido hidrolases na obtenção de epóxidos enantiopuros e dióis vicinais, que são utilizados como blocos de construção na síntese orgânica, os objetivos deste trabalho consistem no isolamento, clonagem e expressão do gene *SEH1* e na obtenção de uma enzima funcional, associada à produção da epóxido hidrolase de *Pichia stipitis* em *Pichia pastoris*, assim como a caracterização *in silico* da PSEH.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram sintetizados pela Invitrogen e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos

Nome	Sequência	T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>
<i>NotI</i> -SEH-F <sup>a</sup>	P-CTT <u>GCGGCCGC</u> ATGACAGAAAGATTCGTTATCAAAC	66,0
<i>XbaI</i> -SEH-R <sup>a</sup>	P-CTT <u>TCTAGACT</u> AACTACTGGTAGCCTTGG	62,0
<i>EcoRI</i> -SEH-F (intra) <sup>a</sup>	P-GATC <u>GAAATTC</u> ATGACAGAAAGATTCGTTATC	67,0
<i>EcoRI</i> -SEH-F (extra) <sup>a</sup>	P-GATC <u>GAAATTC</u> CACAGAAAGATTCGTTATCAA	67,0
<i>NotI</i> -SEH-R <sup>a</sup>	P-TCG <u>GCGGCCGC</u> ACTACTGGTAGCCTTGGAA	80,0

(<sup>a</sup>) A sequência sublinhada indica o sítio de restrição. (<sup>b</sup>) *Melting Temperature*, calculada pelo fabricante.

#### 3.2. Tampões e outras soluções

- YNB 10X: Dissolveram-se 134 g de *Yeast Nitrogen Base* (com sulfato de amônio e sem aminoácidos) em 1 L de água destilada. Esterilizou-se por filtração.
- Biotina 500X: Dissolveram-se 20 mg de biotina em 100 mL de água destilada. Esterilizou-se por filtração.
- Histidina 100X: Dissolveram-se 400 mg de L-histidina em 100 mL de água. Esterilizou-se por filtração.
- D-Glicose 10X: Dissolveram-se 200 g de D-glicose em 1 L de água destilada. Esterilizou-se por filtração ou em autoclave por 15 min.
- Metanol 10X: Misturou-se 5 mL de metanol com água destilada até um volume de 100 mL. Esterilizou-se por filtração.

- Glicerol 10X: Misturou-se 100 mL de glicerol com 900 mL de água destilada. Esterilizou-se por filtração.
- Tampão fosfato 1 M pH 6: Misturou-se 132 mL de  $K_2HPO_4$  1 M e 868 mL de  $KH_2PO_4$  1 M. Ajustou-se o pH para 6 adicionando ácido fosfórico ou KOH. Esterilizou-se em autoclave por 15 min.
- Sorbitol 1 M: Dissolveram-se 182,2 g de sorbitol em 1 L de água destilada. Esterilizou-se em autoclave por 15 min.
- Solução estoque de sonda fluorogênica 20 mM: Diluiu-se até a concentração desejada em água:acetonitrila (1:1).
- BSA 5 mg/mL: Dissolveram-se 5 mg de BSA em 1 mL da solução tampão utilizada no ensaio.
- Solução aquosa de sal de adrenalina 10 mM: Em um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 18 mg de L-adrenalina em 7 mL de água e 98  $\mu$ L de HCl 37%. Após a dissolução do sal, completou-se o volume para 10 mL com água.
- Solução estoque de epóxido ou diol 100 mM: Dissolveram-se 0,5 mmol do substrato desejado em 5 mL de acetonitrila.
- Periodato de sódio 10 mM: Dissolveram-se 21,4 mg de  $NaIO_4$  em 10 mL de água. A solução foi preparada na hora do uso.

### 3.3. Micro-organismos

- *E. coli* (DH5 $\alpha$ ): Foi utilizada para a obtenção de células eletrocompetentes.
- *Pichia stipitis* CCT2617 (Coleção de Culturas Tropicais, Fundação André Tosselo): Foi utilizada como fonte para o isolamento do gene *SEH*.
- *Pichia pastoris* X-33 (Mut<sup>+</sup>, Invitrogen): Foi utilizada para a expressão do gene *SEH*.
- *Pichia pastoris* KM71H (Mut<sup>s</sup>, Invitrogen): Foi utilizada para a expressão do gene *SEH*.
- *Pichia pastoris* GS115 (Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>, Invitrogen): Foi utilizada para a expressão do gene *SEH*.

- *Pichia pastoris* GS115/pPICZ/lacZ (Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>, Invitrogen): Foi utilizada como controle em teste de expressão.
- *Pichia pastoris* GS115/Albumin (Mut<sup>s</sup>, Invitrogen): Foi utilizada como controle em teste de expressão.

### 3.4. Vetores

Os vetores de expressão pPICZ $\alpha$  A (Anexo 1) e pPICZ B (Anexo 2), ambos comercializados pela Invitrogen, foram utilizados para a clonagem em *E. coli* e expressão em *P. pastoris*, de forma extra e intracelular, respectivamente. Nestes plasmídeos bifuncionais, a expressão é controlada pelo promotor do gene *AOX1*. O primeiro contém o peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, o qual promove a secreção da proteína heteróloga.

### 3.5. Meios de cultivo

- Meio LB:

Bacto-triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água destilada até	1 L

Para meio sólido adicionaram-se 20 g/L de ágar. Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Meio LB com baixa concentração de sal:

Bacto-triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
Água destilada até	1 L

Para meio sólido adicionaram-se 20 g/L de ágar. Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Meio YP:

Extrato de levedura	10 g
Peptona	20 g
Água destilada até	1 L

Para meio sólido adicionaram-se 20 g/L de agar. Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Meio YPD:

Extrato de levedura	10 g
Peptona	20 g
D-Glicose (Dextrose)	20 g
Água destilada até	1 L

Para meio sólido adicionaram-se 20 g/L de agar. Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Meio BMGY (meio para obtenção de biomassa de *Pichia pastoris*):

Extrato de levedura	10 g
Peptona	20 g
Água destilada até	700 mL

Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Deixou-se esfriar a temperatura ambiente e adicionaram-se:

Tampão Fosfato 1M pH 6,0	100 mL
Solução de Biotina	2 mL
Solução de YNB 10x	100 mL
Solução de Glicerol 10x	100 mL

- Meio BMMY (Meio para indução da expressão em *P. pastoris*):

O glicerol da composição anterior foi substituído por metanol 10x.

- Meio de screening para *P. pastoris*:

Fundiu-se 1L de meio YP ágar. Esfriou-se a uma temperatura de aproximadamente 50°C e adicionaram-se:

Metanol	5 mL
Zeocina	25 µg/mL
Solução 60 mM de glicidil fenil éter em DMSO	25 mL

Alternativamente, utilizou-se BMMY ágar adicionado de Zeocina e substrato.

### 3.6. Cultivo e Manutenção das Linhagens

As linhagens de *E. coli* foram incubadas a 37°C, durante 16-18 horas. Os cultivos em meio líquido foram realizados em erlenmeyers estéreis, incubando-se a 37°C e 250 rpm de agitação. No caso do cultivo de clones resistentes a Zeocina, o meio foi suplementado com 25 µg/mL do antibiótico.

As linhagens de *Pichia* foram crescidas em erlenmeyers estéreis de 500 mL contendo 100 mL de meio YPD inoculado com uma colônia. Os frascos foram incubados a 28°C e 250 rpm. No caso das cepas transformadas com plasmídeos derivados de pPICZ, adicionou-se Zeocina ao meio a uma concentração final de 100 µg/mL.

A conservação das linhagens foi realizada em placas de Petri seladas com parafilme a 4°C (2-3 semanas) ou em soluções estoque de glicerol 20% a - 80°C (a conservação desta maneira preserva a linhagem por vários anos).

Todos os procedimentos foram realizados em fluxo unidirecional CFLV 12 (Grupo VECO).

### 3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A mistura de reações padrão para a amplificação de fragmentos de DNA foi preparada em microtubos de 200 µL adicionando-se os seguintes componentes:

Componente	Volume (µL)	Concentração final
Água deionizada estéril	6,4	
5x HF Buffer (Finnzymes)	4	1 X
dNTPs 10mM (Invitrogen)	0,4	200 µM de cada
<i>Primer F</i> 2,5mM (Invitrogen)	4	0,5 µM
<i>Primer R</i> 2,5mM (Invitrogen)	4	0,5 µM
DNA molde	1	50-200 ng
Phusion (Finnzymes)	0,2	0,02 U/µL

As condições de temperatura do termociclador (TC-512 Techne) usadas na reação de amplificação foram:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	98,0	120	1
Desnaturação	98,0	10	25
Anelamento	51,0	30	
Extensão	72,0	40	
Extensão final	72,0	300	1
	4,0	∞	

### 3.8. Tratamento com enzimas de restrição

Os componentes da reação são: o tampão de digestão específico para cada endonuclease, o DNA, água deionizada até completar o volume final e, por último, as unidades necessárias das enzimas de restrição. Usualmente utiliza-se de 100 ng a 2 µg de DNA em uma reação de 20 µL. O tempo de incubação das reações de digestão depende da quantidade e do tipo de DNA, assim como do número de unidades da enzima, variando de 2 a 4 h. A temperatura ótima da enzima é indicada pelo fabricante, sendo geralmente de 37°C. As enzimas foram fornecidas pela Fermentas. A clonagem foi feita utilizando as enzimas

correspondentes aos sítios adicionados pelo *primer* e a linearização do vetor foi feita utilizando-se a enzima *Dral*.

### **3.9. Desfosforilação das extremidades 5' de fragmentos de DNA**

Depois de atingido o tempo de incubação da reação de restrição, adicionou-se 1 µL da enzima BAP -*Bacterial Alkaline Phosphatase* (Invitrogen) - e incubou-se por 1 h a 65°C. Após, prosseguiu-se com a purificação do DNA.

### **3.10. Ligação de moléculas de DNA**

As ligações de fragmentos de DNA foram realizadas em um volume de 10 µL. Primeiramente, foram misturadas as quantidades necessárias de inserto e vetor, 2 µL de tampão da ligase (5 x), 0,5 unidades de enzima - ligase do bacteriófago T4 (Promega) e água deionizada para completar os 10 µL finais. A reação foi incubada por 24 h a 16°C. Foram feitas reações nas razões molares inserto: vetor de 1:1, 2:1 e 3:1.

### **3.11. Purificação de DNA**

Para a purificação do DNA procedente de reações enzimáticas foram utilizadas duas metodologias de purificação. A primeira foi utilizada após a digestão com *Dral*. Realizou-se o procedimento de precipitação com fenol/clorofórmio uma vez, e precipitando com etanol usando 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol 100%. A solução foi centrifugada, o sobrenadante descartado, o *pellet* lavado com etanol 70% e deixado para secar ao ar. O DNA foi ressuspensionado em 10 µL de água deionizada estéril, estando pronto para a transformação nas linhagens de *Pichia* eletrocompetentes.

A segunda metodologia de purificação, utilizado o *kit* Invisorb® Fragment CleanUp (Invisorb), foi aplicada nos demais casos. Este *kit* permite a purificação tanto do DNA procedentes de reações enzimáticas, quanto do DNA presente em gel de agarose.

### **3.12. Purificação de DNA plasmidial**

A extração do DNA plasmidial foi efetuada utilizando-se o *kit* Spin Plasmid Mini Two (Invisorb).

### **3.13. Purificação de DNA genômico**

A extração e purificação do DNA genômico foi feita por um método não enzimático<sup>30</sup>.

### **3.14. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA**

A quantificação do DNA obtido em cada etapa foi efetuada no espectrofotômetro Biomate (Thermo Scientific), em  $\lambda_{ab} = 260$  nm, utilizando cubetas de quartzo. Tais cubetas apresentam uma capacidade de 100  $\mu$ L, dessa forma, era feita uma diluição de 2  $\mu$ L da amostra em 98  $\mu$ L de água deionizada antes de efetuarmos as medidas.

### **3.15. Preparação de células eletrocompetentes.**

**3.15.1.** As células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Inoculou-se 500 mL de meio LB com 1/100 do volume de um pré inóculo em crescimento a 16 h.
2. Cresceram-se as células a 37°C e sob agitação de 300 rpm até  $A_{600nm}$  de 0,5 a 0,7.
3. Resfriaram-se as células no gelo por 20 min. Nas próximas etapas, as células foram mantidas o mais próximo possível de 0°C e resfriaram-se todos os recipientes onde as células vieram a ser adicionadas. Transferiram-se as células para um tubo de centrífuga resfriado e centrifugou-se a 4000 x g por 15 min a 4°C.
4. Descartou-se completamente o sobrenadante.

---

<sup>30</sup> Sharma, A. D.; Singh, J. *Analytical Biochemistry* **2005**, 337, 354.

5. As células foram ressuspensas, gentilmente, em 500 mL de glicerol 10% gelado. Centrifugou-se a 4000 x g por 15 min a 4°C. Descartou-se completamente o sobrenadante.
6. As células foram ressuspensas em 250 mL de glicerol 10% gelado. Centrifugou-se nas mesmas condições que anteriormente. Descartou-se completamente o sobrenadante.
7. As células foram ressuspensas em 20 mL de glicerol 10% gelado. Centrifugou-se novamente e descartou-se completamente o sobrenadante.
8. As células foram ressuspensas em um volume de 1-2 mL de glicerol 10% gelado. Esta suspensão foi alíquotada e armazenada à – 80°C. As células são estáveis por seis meses nessas condições.

**3.15.2.** As células eletrocompetentes de *P. pastoris* foram preparadas de acordo com o procedimento do manual do EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen), conforme descrito a seguir:

1. Inoculou-se uma colônia da linhagem em 5 mL de meio YPD a 30 °C e 250 rpm durante, aproximadamente, 18 h.
2. Inoculou-se 500 mL de meio YPD, em um Erlenmeyer de 2 L, com 0,5 mL do cultivo anterior e incubou-se até  $A_{600nm}$  de 1,3 a 1,5 (por aproximadamente 18 h).
3. Recolheram-se as células por centrifugação a 1500 x g por 5 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 500 mL de água destilada estéril e gelada. Nas próximas etapas, as células foram mantidas o mais próximo possível de 0°C e todos os recipientes, onde as células vieram a ser adicionadas, foram resfriados.
4. Centrifugou-se nas mesmas condições que anteriormente e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 250 mL de água destilada estéril e gelada.
5. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 20 mL de Sorbitol 1 M gelado.

6. Centrifugou-se mais uma vez, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1 mL de Sorbitol 1 M gelado, mantidas no gelo e utilizadas no mesmo dia.

### **3.16. Eletrotransformação**

**3.16.1.** Foi utilizado o seguinte protocolo para a eletroporação de *E. coli*:

1. Descongelaram-se 40 µL de células eletrocompetentes em gelo. Adicionou-se 1 µL de DNA às células e misturou-se gentilmente.
2. Transferiu-se para uma cubeta de eletroporação previamente esterilizada e resfriada em gelo.
3. Secou-se a parte externa da cubeta e colocou-se no suporte do eletroporador.
4. Aplicou-se 1800 V.
5. Rapidamente, adicionou-se 1 mL de meio LB às células, transferiu-se para um tubo de cultura estéril e incubou-se por 1 h a 37°C sob agitação.
6. Plaquearam-se alíquotas de 100 µL em placas contendo o meio de seleção apropriado.

**3.16.2.** Foi utilizado o seguinte protocolo para a eletroporação de *Pichia pastoris*:

1. Misturou-se 80 µL de células eletrocompetentes recém-preparadas, com 5 a 10 µg de DNA plasmidial linearizado e transferiu-se para uma cubeta de eletroporação previamente esterilizada e resfriada em gelo.
2. Incubou-se a cubeta no gelo por 5 min. Secou-se a parte externa da cubeta e a mesma foi posicionada no suporte do eletroporador.
3. Aplicou-se 1500 V.
4. Rapidamente, adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M gelado às células, transferiu-se para um tubo de cultura estéril e incubou-se por 1 h a 30°C sem agitação.
5. Após este período, adicionou-se 1 mL de YPD e incubou-se por 1 h a 30°C e 250 rpm de agitação.

6. Plaquearam-se alíquotas de 200 µL em placas contendo o meio de seleção YPDS suplementado com 100 µg/mL de Zeocina. Incubou-se a 30 °C durante 3 ou 4 dias.

### **3.17. Eletroforese de DNA**

A eletroforese de moléculas de DNA foi efetuada utilizando 0,8% de agarose (Invitrogen) e tampão TBE 1 X (Invitrogen). As amostras de DNA foram misturadas com tampão de carga 6 X Loading Dye (Invitrogen). Como padrão de peso molecular utilizou-se 2 µL do 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ou GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) . Para possibilitar a visualização do DNA no gel foram utilizados 5 µL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) para cada 50 mL de gel. Após a aplicação das amostras, a eletroforese foi efetuada aplicando uma diferença de potencial de 120 V por 20 min.

### **3.18. Eletroforese de proteínas**

A preparação dos géis e a eletroforese foram realizadas com o sistema Mini-Protean II (BioRad). Os géis de resolução e empacotamento continham 12 e 5 % de poliacrilamida, respectivamente. A eletroforese foi realizada a 200 V por 1 h.

Os géis foram corados com prata, seguindo um protocolo que utiliza microondas para acelerar o processo, permitindo a visualização das bandas no mesmo dia. Como padrão de peso molecular foi utilizado o SDS-PAGE Molecular Weight Standards – Broad Range (BioRad).

### **3.19. Triagem enzimática de alto desempenho com sonda fluorogênica**

As células das linhagens transformadas foram crescidas (pré-cultura) em meio líquido BMGY (10 mL), adicionado de glicerol para obtenção de biomassa de *P. pastoris*, por 24-48 horas a 250 rpm e 28°C. Posteriormente, 1 mL da pré-cultura foi transferido para meio BMMY (suplementado de metanol) para indução da expressão da enzima em *Pichia pastoris*. Após 48 horas ou absorvância a 600 nm igual a 1, as células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante

utilizado para ensaio baseado em substrato fluorogênico<sup>31</sup>. Estes ensaios, juntamente com seus controles, foram realizados em duplicatas e montados da seguinte maneira:

- *Ensaio*: 10  $\mu$ L das sondas 2 mM; 80  $\mu$ L de BSA 5,0 mg/mL, 100  $\mu$ L de sobrenadante e 10  $\mu$ L de NaIO<sub>4</sub> 20 mM por poço.
- *Controle positivo*: 10  $\mu$ L do produto a 2 mM; 80  $\mu$ L de BSA 5,0 mg/mL, 100  $\mu$ L de sobrenadante e 10  $\mu$ L de NaIO<sub>4</sub> 20 mM por poço.
- *Controle negativo*: 10  $\mu$ L das sondas a 2 mM; 80  $\mu$ L de BSA 5,0 mg/mL, 100  $\mu$ L de solução tampão borato pH 8,8 e 10  $\mu$ L de NaIO<sub>4</sub> 20 mM por poço.
- *Controle microbiano*: 10  $\mu$ L solução tampão borato pH 8,8; 80  $\mu$ L de BSA 5,0 mg/mL, 100  $\mu$ L sobrenadante e 10  $\mu$ L de NaIO<sub>4</sub> 20 mM por poço.

As medidas de fluorescência dessas reações foram realizadas em leitor de fluorescência *Flashscan 530 Analytic Jena* utilizando filtro de excitação com  $\lambda_{ex}$ = 365 nm e leitura de emissão de fluorescência feita à  $\lambda_{em}$ = 460 nm. As leituras foram feitas em microplacas de polipropileno de 96 cavidades, à temperatura ambiente durante 10 h com intervalos de leitura de 3,0 min.

### **3.20. Teste de expressão das linhagens recombinantes de *Pichia pastoris***

Outro teste para a expressão da enzima de interesse, que é sugerido no sistema de clonagem e expressão EasySelect *Pichia* Expression System (Invitrogen), foi efetuado utilizando linhagens controle, fornecidas pelo fabricante, além das linhagens de *P. pastoris* contendo o gene *SEH*. Neste experimento, as células foram crescidas (pré-cultura) em meio líquido BMGY (100 mL), adicionado de glicerol para obtenção de biomassa de *P. pastoris*, a 250 rpm e 28°C, até absorbância a 600 nm entre 2 e 6. Posteriormente, a pré-cultura foi transferida para meio BMMY (suplementado de metanol) para indução da expressão da enzima em *Pichia pastoris*, até uma  $A_{600nm}$ = 1. A cada 24 h de indução foi adicionado metanol 100% para uma concentração final de 0,5%. Foram retiradas

---

<sup>31</sup> Wahler, D.; Reymond, J. L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 535.

alíquotas de 1 mL das culturas a cada 12 h. Estas alíquotas foram analisadas para a presença de proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE).

Alternativamente, a expressão foi iniciada em  $A_{600\text{nm}} = 3$ <sup>32</sup>.

### 3.21. Triagem enzimática de alto desempenho em placa contendo meio sólido

Foi efetuada uma metodologia de triagem em placa contendo meio sólido<sup>33</sup>. Neste processo são preparadas placas contendo meio de cultura sólido (meio de *screening*) suplementado com fenil glicidil éter. O crescimento das colônias na superfície do ágar pode ser diretamente relacionado à presença de epóxido-hidrolases ativas. O ensaio é rápido e a avaliação da atividade enzimática consiste em um processo visual.

### 3.22. Teste de adrenalina

Os transformantes foram crescidos em meio líquido BMGY (400 µL), por 24 h a 250 rpm e 28°C. Em seguida, 20 µL da pré-cultura foram transferidos para meio BMMY (400 µL) por 48 h. Após este período, centrifugou-se por 3 min, a 4000 rpm e 4 °C, os sobrenadantes foram utilizados no teste de adrenalina.

Os ensaios foram realizados em duplicatas e montados da seguinte maneira:

- *Ensaio*: 80 µL de sobrenadante; 10 µL de substrato 10 mM, 10 µL de NaIO<sub>4</sub> 10 mM e 15 µL de uma solução aquosa de sal de adrenalina 10 mM por poço.
- *Controle positivo*: 80 µL de BMGY ou de solução tampão; 10 µL de diol 10 mM, 10 µL de NaIO<sub>4</sub> 10 mM e 15 µL de uma solução aquosa de sal de adrenalina 10 mM por poço.

---

<sup>32</sup> Lee, E. Y.; Yoo, S.; Kima, H. S.; Park, S. *Enz. Microb. Tech.* **2004**, *35*, 624-631.

<sup>33</sup> Reetz, M. T.; Wang, L-W. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 295.

- *Controle negativo*: 80 µL de BMGY ou de solução tampão; 10 µL de substrato 10 mM, 10 µL de NaIO<sub>4</sub> 10 mM e 15 µL de uma solução aquosa de sal de adrenalina 10 mM por poço.

As medidas de absorbância dessas reações foram realizadas no leitor *Flashscan 530 Analytic Jena* em  $\lambda = 490$  nm. As leituras foram feitas em microplacas de polipropileno de 96 cavidades, à temperatura ambiente durante 5 min com intervalos de leitura de 1 min.

### 3.23. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos fragmentos clonados nos vetores pPIC foram realizados pela empresa Helixxa (Campinas) utilizando o equipamento 3130xl, da Applied Biosystems. A metodologia utilizada baseia-se no método Sanger<sup>34</sup>.

### 3.24. Análises *in silico*

O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (Mw) teóricos foram calculados utilizando o Compute pI/Mw tool (ExPASy)<sup>35</sup>, a estrutura 3D da PSEH foi modelada com a utilização do servidor I-TASSER<sup>36</sup> e sua estrutura quaternária foi obtida utilizando o servidor QuatIdent<sup>37</sup>.

---

<sup>34</sup> Zhang, J. Z., Fang, Y., Hou, J. Y. *Anal. Chem.* **1995**, 67,4589.

<sup>35</sup> Bjellqvist, B.; Hughes, G.J.; Pasquali, C.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D. F. *Electrophoresis* **1993**, 14, 1023.

<sup>36</sup> Ambrish, R.; Alper, K.; Zhang, Y. *Nature Protocols* **2010**, 5, 725.

<sup>37</sup> Shen, H.; Chou, K. *J. Proteome Res.* **2009**, 8, 1577.

## 4. Resultados e Discussão

Inicialmente foi efetuada a extração do DNA genômico de *P. stipitis*<sup>38</sup>, as três amostras obtidas foram quantificadas, apresentando concentrações de 200, 145 e 65 ng/μL de DNA. A quantificação do DNA obtido em cada etapa deste projeto foi efetuada no espectrofotômetro em  $\lambda_{ab} = 260$  nm. Como leituras nesta região do espectro requerem cubetas feitas de um material que não absorva a radiação ultravioleta, foram utilizadas cubetas de quartzo.

Estas amostras foram utilizadas como DNA molde em reações de PCR, já que o gene não possui introns, onde:

- 1) 1 μL da amostra de DNA genômico de *P. stipitis* (200 ng/μL)
- 2) 1 μL da amostra de DNA genômico de *P. stipitis* (200 ng/μL) diluído 1/10
- 3) 1 μL de amostra de DNA genômico de *P. stipitis* (145 ng/μL)
- 4) 1 μL da amostra de DNA genômico de *P. stipitis* (145 ng/μL) diluído 1/10

Os oligonucleotídeos *NotI-SEH-F* e *XbaI-SEH-R* (Tabela 2) foram utilizados como iniciadores.

Após a reação de PCR, a amplificação do fragmento desejado foi monitorada por eletroforese em gel de agarose (0,8%). Este método pode ser utilizado para estimar a massa molar da molécula de DNA analisada, para tanto, foi construída uma curva do fator de retenção no gel *versus* o logaritmo da massa molar. Dessa forma, pode-se observar na Figura 1 a amplificação de uma banda próxima a 1000 pb, de acordo com o marcador de peso molecular utilizado, condizente com o resultado esperado, uma banda de 966 pb.

---

<sup>38</sup> Sharma, A. D.; Singh, J. *Analytical Biochemistry* **2005**, 337, 354.

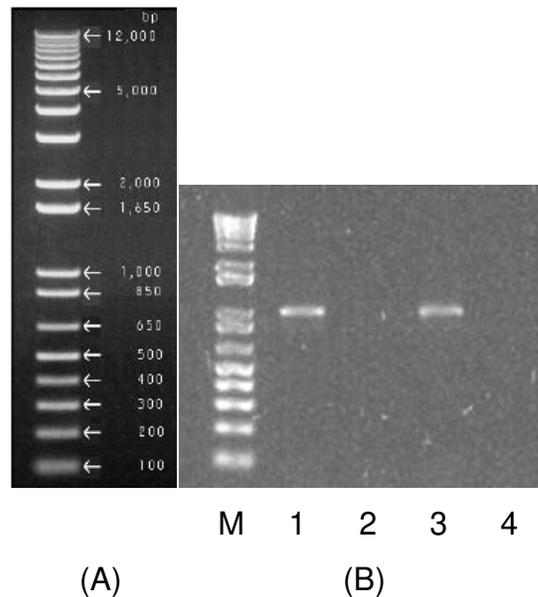


Figura 1. (A) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (B) Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico das reações de PCR utilizadas para amplificação do gene *SEH* de *Pichia stipitis*. M: Padrão de peso molecular; 1-4: Reações de PCR utilizando como DNA molde as amostras de 1 a 4. Condições da PCR: Phusion DNA Polymerase (Finnzymes), 25 ciclos,  $T_m = 51,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As amostras 1 e 3 do gene amplificado foram purificadas utilizando o *kit* Invisorb® Fragment CleanUp (Invisorb), que foi utilizado em todas as etapas de purificação de DNA neste projeto, exceto se especificado o contrário. Este *kit* permite a purificação tanto do DNA procedentes de reações enzimáticas, quanto do DNA presente em gel de agarose, e baseia-se na ligação dos fragmentos de DNA na superfície de uma coluna que, após as lavagens para a retirada das impurezas, é eluído em água deionizada.

Após esta etapa as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro, apresentando concentrações de 150 e 80 ng/ $\mu\text{L}$ , respectivamente.

O vetor pPICZ $\alpha$  A e o fragmento amplificado com os *primers* contendo sítios de restrição, foram tratados sequencialmente com as enzimas *Xba*I e *Not*I. Foi necessário efetuar este procedimento em duas etapas, uma vez que as enzimas apresentam atividade máxima em diferentes soluções tampão.

No caso do plasmídeo, depois de atingido o tempo de incubação da reação de restrição, adicionou-se 1  $\mu$ L da enzima BAP - *Bacterial Alkaline Phosphatase* (Invitrogen) - e incubou-se por 1 h a 65 °C. Este procedimento permite a eliminação dos grupos fosfatos da extremidade 5' do DNA (desfosforilação) prevenindo a recircularização do vetor. Após, prosseguiu-se com a purificação do DNA. As reações foram monitoradas por eletroforese, cujo resultado pode ser visualizado nas Figuras 2 e 3.

Durante a eletroforese, quando a molécula de DNA encontra-se linear sua mobilidade na matriz de agarose deve ser inversamente proporcional a sua massa molecular. Já as moléculas de DNA circular podem assumir diferentes conformações, como relaxada ou superenovelada, formas que não migram de acordo com sua massa molecular. Por exemplo, a forma superenovelada migra mais rapidamente que as formas relaxada e linear, pois sua conformação é mais compacta.

Dessa forma, podemos concluir que após a digestão com as enzimas a amostra foi completamente linearizada, já que apresenta apenas uma banda correspondente ao plasmídeo linearizado que migra de acordo com seu tamanho, de aproximadamente 3,5 kb (Figura 2).

A amostra da digestão do plasmídeo com ambas as enzimas foi quantificada, após a purificação, apresentando concentração de 65 ng/ $\mu$ L.

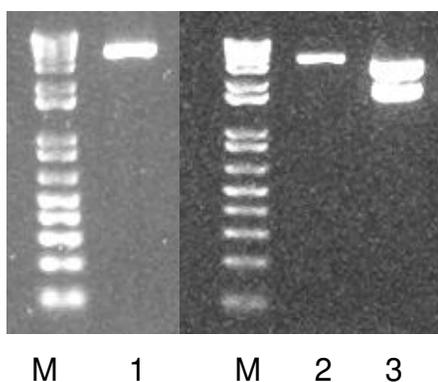


Figura 2. Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de clivagem do vetor pPICZ $\alpha$ A com enzimas de restrição. M: Padrão de peso molecular; 1: tratamento com a enzima *Xba*I; 2: tratamento com a enzima *Not*I; 3: vetor não linearizado.

Após o tratamento das amostras 1 e 3, correspondentes aos fragmentos amplificados por PCR, com *Xba*I e *Not*I, foi feita a purificação e a quantificação das amostras, que apresentaram concentrações de 37 e 25 ng/ $\mu$ L. A fotodocumentação do gel analítico é apresentada na Figura 3.

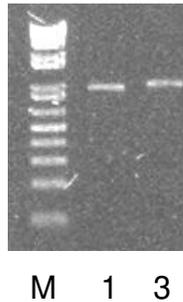


Figura 3. Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de clivagem do fragmento *SEH* com as enzimas de restrição *Xba*I e *Not*I. M: Padrão de peso molecular; 1 e 3: amostras de fragmento tratadas.

Posteriormente, o vetor e o fragmento de interesse, tratados com as enzimas de restrição, foram submetidos a uma reação de ligação na presença da enzima T4 DNA ligase, que catalisa a formação de ligações fosfodiéster entre as extremidades 3' e 5' de fragmentos de DNA. Nestas reações é necessário levar em conta a razão molar inserto: vetor. Para achar a razão ideal, foram feitas reações nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1. O produto desta reação (pPICZ $\alpha$  A contendo o gene *SEH*) foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ).

Após este procedimento, observamos o crescimento de 5 colônias no meio sólido, das quais extraímos o DNA plasmidial utilizando o *kit* Spin Plasmid Mini Two (Invisorb), cuja metodologia compreende a lise alcalina das células e a precipitação das proteínas e do DNA genômico, seguida pela adsorção do DNA plasmidial à membrana da coluna, remoção dos contaminantes e eluição do plasmídeo.

Posteriormente, o DNA plasmidial foi utilizado em uma análise de restrição para verificar a presença do inserto. Essa análise foi efetuada utilizando-se as enzimas *Eco*RI e *Bam*HI, e a liberação de um fragmento de 1435 pb indica que o

inserto foi inserido no vetor. O resultado da reação pode ser visualizado na Figura 4.

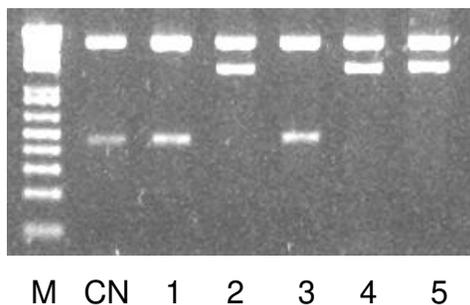


Figura 4. Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da análise de restrição para confirmação da presença do fragmento *SEH* no vetor pPICZ $\alpha$  A. M: Padrão de peso molecular; CN: Controle negativo; 1-5: Reações utilizando o DNA plasmidial das amostras de 1 a 5.

No gel analítico observamos que ocorreu a liberação de um fragmento do tamanho esperado nas amostras 2, 4 e 5, confirmando a presença do inserto no vetor. Essas amostras de DNA plasmidial foram então quantificadas, apresentando concentrações de 147, 210 e 240 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Estes vetores foram então enviados para seqüenciamento, o que mostrou que em todos os casos o inserto foi clonado *in frame* com o fator  $\alpha$ , mas apenas o clone 2 apresentava a sequência correta, com a troca de apenas um nucleotídeo (guanina por adenina na posição 847, o que resultaria na troca de um resíduo de Valina (gtc) por Isoleucina (atc)). Este clone, cuja sequência é apresentada a seguir, foi denominado pPICZ $\alpha$  A – *SEH* 2. A sequência destacada em vermelho corresponde ao fator  $\alpha$ , em laranja o nucleotídeo trocado e em verde o *stop* códon.

atgagatttccttcaatTTTTactgctgTTTTattcgcagcatcctccgattagctgct  
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A  
ccagtcaactacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcggg  
P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G  
tactcagatttagaaggggatttcgatggttgctgTTTTgccattttccaacagcacaat  
Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N  
aacgggttattgTTTTataataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggta  
N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V  
tctctcgagaaaagagaggctgaagctgaattc atgacagaaagattcgttatcaaactt  
S L E K R E A E A E F M T E R F V I K L  
accacggttccagaagtttcaccaccttctcgaactacagcgaacaagatgTTTTcaa  
T H G S R S F T T F S N Y S E Q D V F K  
gggtgccggaaccaaattggacaagagtgatcttctcttgcattgggttctctgatgaaat  
G A G T K W T R V I F L L H G F P D E N  
tcgtcctatgatgaagcctggccgcatttagcacaagggtttcctaatgaaaagggctct  
S S Y D E A W P H L A Q G F P N E K G L  
ttggtgctagcaccattattgagaggctacgaagagctgagtttggggccagacgaatat  
L L L A P L L R G Y E E L S L G P D E Y  
agtactcatgatgtcgtggagacgttgggtgcctggatcaagcagattaaccccagcaac  
S T H D V A G D V G A W I K Q I N P S N  
aaggttccagttcacattttggggccacgattgggggtgctataactgccttcaaaactgct  
K V P V H I L G H D W G A I T A F K T A  
tcaaggttccagagttggttacttcaattgtgactttggcaattccttatttgaccaat  
S R F P E L V T S I V T L A I P Y L T N  
gtggttccctggaagttggcttggaaatgttcctgaacagttgtactattcgtcgtatatg  
V V P W K L A W N V P E Q L Y Y S S Y M  
gtgacgatgcagttatcgttcttgtacagatccagattcgaacaaacaggcagagattcg  
V T M Q L S F L Y R S R F E Q T G R D S  
tacttagattcgtctggaagtactggtctcctacctggaagtataccgaaaaagatattc  
Y L D S L W K Y W S P T W K Y T E K D I  
agtaagaccagagccagattgagtgatcacagaatcatggatgctaccacagcctattac  
S K T R A R L S D H R I M D A T T A Y Y  
agagccatcttcaacccgattaaccttattaacggcaagtctaaatggcccgttgacttc  
R A I F N P I N L I N G K S K W P V D F  
agccaagttcccacatatTTTTataggtggagcccaagacggttgtatgaccagcaaattg  
S Q V P T Y F I G G A Q D G C M T S K L  
tatgaatgggaaagagagttggttgaaggacgaaccaat atcaagaccactattttgcc  
Y E W E R E L L K D E P N I K T T I L P  
aacctgggcatcttctacatcgagaagaacccccaaaaagttgctgagtttagcgattgag  
N L G H F L H R E E P Q K V A E L A I E  
ttcttcgaaaagtactcttccaaggctaccagtagt tag  
F F E K Y S S K A T S S -

Conforme citado anteriormente, o promotor responsável pela regulação do gene *AOX1* é utilizado para dirigir a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Sendo assim, para que a epóxido hidrolase de *P. stipitis* seja expressa por esse sistema, é necessária a integração do plasmídeo contendo o gene *SEH* ao loco do promotor *AOX1* no genoma da levedura. Esta integração ocorre por um processo de recombinação homóloga entre o DNA transformante e regiões de homologia dentro do genoma. Neste caso, a inserção do gene ocorre no loco do promotor *AOX1*, pois sua sequência esta presente tanto no DNA transformante (pPICZ $\alpha$  A contendo o gene *SEH*) quanto no genoma da levedura metilotrófica. Este processo é estimulado pela clivagem do vetor com uma sequência compartilhada pelo genoma, dessa forma, efetuamos a reação de linearização do plasmídeo com a enzima de restrição *DraI*, cujo sítio se encontra na região do promotor 5' *AOX1* (Figura 5), antes da transformação em *P. pastoris*.

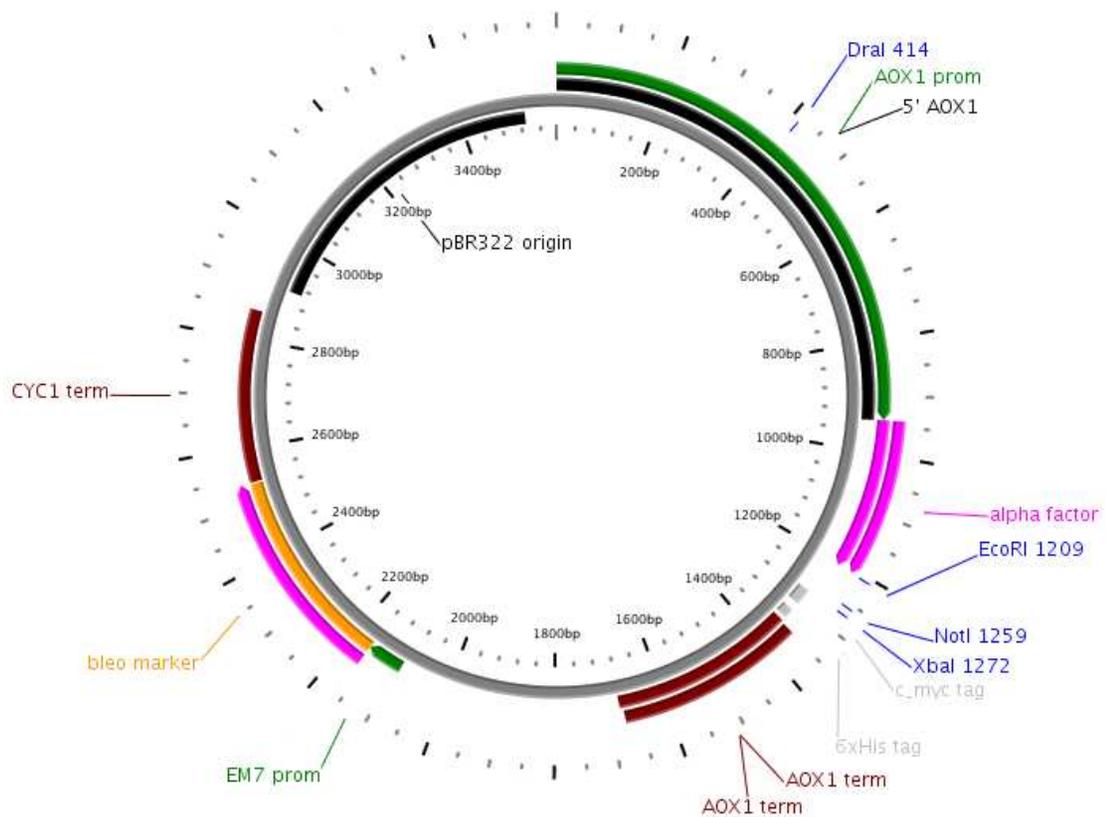


Figura 5. Mapa do vetor pPICZ $\alpha$  A.<sup>39</sup>

<sup>39</sup> Dong, X.; Stothard, P.; Forsythe, I.; Wishart, D. *Nucleic Acid Res.* **2004**, 32.

A reação foi monitorada por eletroforese, sendo possível verificar a linearização efetiva (Figura 6) e purificada por extração com fenol/clorofórmio e precipitação em etanol.

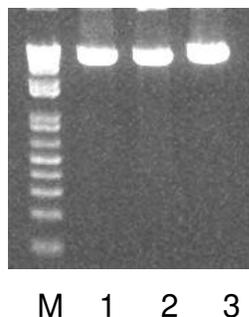


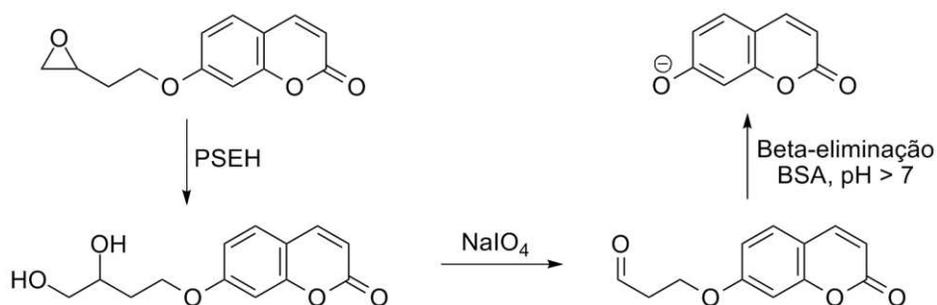
Figura 6. Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de linearização vetor pPICZ $\alpha$  A – SEH 2 com *DraI*. M: Padrão de peso molecular; 1-3: amostras das reações de linearização do DNA plasmidial.

Prosseguimos com a transformação, utilizando as amostras linearizadas, em *P. pastoris* X-33, GS115 e KM71H eletrocompetentes recém preparadas. Foi possível a observação de diversas colônias após 4 dias de incubação a 28 °C.

Para testar se a enzima estava sendo expressa foi utilizado inicialmente o ensaio fluorogênico descrito por Reymond<sup>31</sup> e modificado por Marsaioli<sup>40</sup>, conforme descrito no item 3.19.

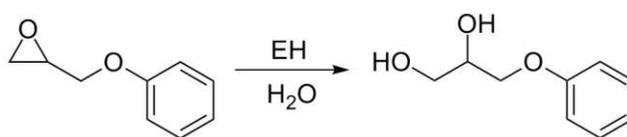
Neste teste, o substrato, um epóxido, sofre uma reação de hidrólise catalisada pela epóxido hidrolase gerando o diol vicinal como produto principal. Na presença do periodato de sódio, esse diol é convertido ao aldeído, o qual sofre uma reação de  $\beta$ -eliminação catalisada por albumina de soro bovino (BSA) dando origem ao ânion da umbeliferona que é fluorescente, conforme apresentado no Esquema 6.

<sup>40</sup> Sicard, R.; Chen, L. S.; Marsaioli, A. J.; Reymond, J. L. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1041; Chen, L. S. *Tese de Doutorado – IQ, Unicamp* **2006**.



Esquema 6. Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção da epóxido hidrolase de *P. stipitis* (PSEH)<sup>40</sup>.

Porém, o controle positivo mostrou uma forte redução da fluorescência (93%) na presença do meio BMMY, utilizado para induzir a expressão, de forma que, não foi possível a utilização deste ensaio para a detecção da atividade enzimática. Optamos então por efetuar uma metodologia de triagem em placa contendo meio sólido e fenil glicidil éter<sup>33</sup>, já que epóxidos monossustituídos são conhecidos por sua alta toxidez e atividade mutagênica, de forma que o crescimento das colônias na superfície do ágar pode ser diretamente relacionado à presença de epóxido-hidrolases ativas, as quais catalisam a hidrólise do epóxido, conforme reação no Esquema 7.



Esquema 7. Modelo de reação da epóxido hidrolase de *P. stipitis* (PSEH) utilizando fenil glicidil éter como substrato<sup>33</sup>.

Após vários dias de incubação das placas a 28 °C, utilizando os meios YP/MeOH 0,5% ou BMMY-ágar com 1, 2 e 3 mM de substrato, não foi possível observar o crescimento de colônias sobre a superfície do ágar quando a concentração do substrato era de 3 mM. Nas concentrações de 1 e 2 mM observamos o crescimento de todos os clones transferidos para a placa, e

também, da linhagem de *P. stipitis* (controle positivo – B1) em menor extensão, mas não da linhagem de *P. pastoris* que não contém o gene *SEH* (controle negativo – A1) (Figura 7).



Figura 7. Exemplificação da triagem em placa contendo meio sólido e 2 mM de substrato, clones: *P. pastoris* KM71H + pPICZαA – *SEH* 2.

Estes transformantes também foram utilizados no teste descrito no item 3.20, iniciando a expressão em  $A_{600nm} = 1$ .

Após efetuar a eletroforese das amostras coletadas, os géis foram corados com prata, já que esta metodologia permite a detecção de quantidades tão pequenas quanto 2 ng de proteína em uma única banda (50 vezes mais sensível que *Comassie*), e verificamos que a expressão da enzima de interesse, de aproximadamente 37 kDa, não estava ocorrendo em nenhuma das frações coletadas. Assim como, não estava ocorrendo a expressão das linhagens controle.

Dessa forma, optamos por refazer o teste iniciando a expressão em uma absorbância maior ( $A_{600nm} = 3$ ), já que essa condição foi utilizada com sucesso para a expressão da epóxido hidrolase de *R. glutinis* nesse mesmo sistema<sup>32</sup>. Nesse caso, foi possível detectar a expressão da linhagem controle *Pichia pastoris* GS115/Albumin que secreta albumina (67 kDa), após 96 horas de

indução. Após esse mesmo período, também foi possível detectar a expressão de uma proteína em aproximadamente 46 kDa, que pode corresponder tanto a enzima SEH contendo o fator  $\alpha$  (que possui, aproximadamente, 10 kDa), quanto a uma proteína endógena da linhagem KM71H (Figura 8).

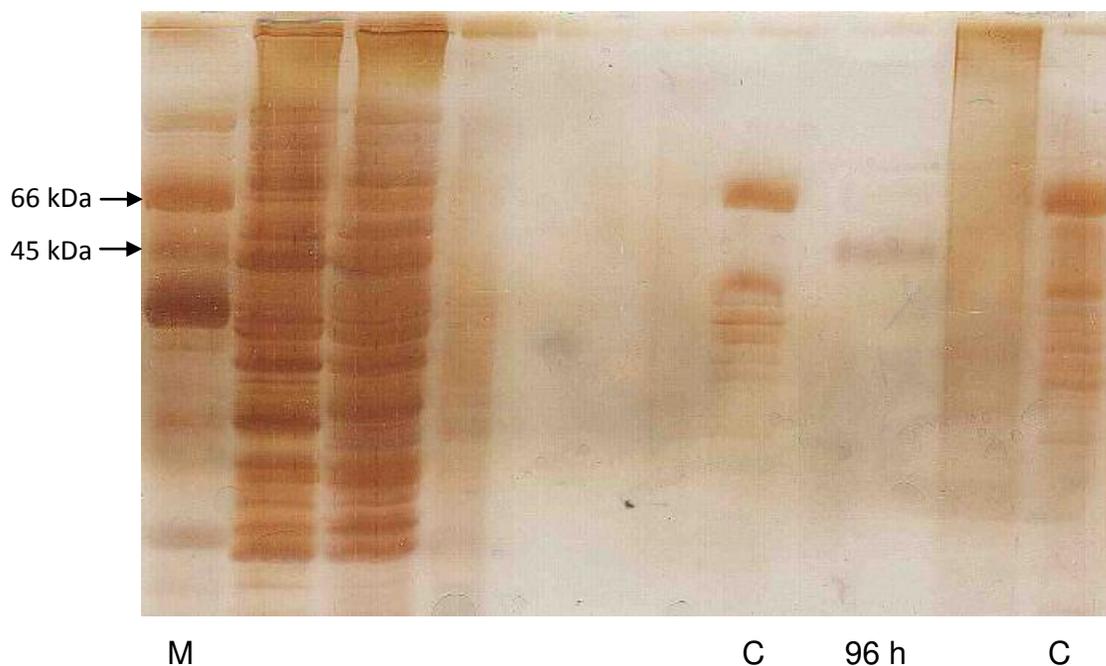


Figura 8. Fotodocumentação do gel de poliacrilamida analítico de amostras coletadas durante a indução da expressão. M: Padrão de peso molecular: Prestained Broad Range (Bio Rad); C: Controle - Albumina, 96 h: Alíquota da indução.

Para descartar a possibilidade de uma proteína endógena, o mesmo experimento foi efetuado utilizando a linhagem transformada com o pPICZ $\alpha$  A sem o gene de interesse, e não foi observada nenhuma banda na região de 45 kDa, o que é um indício de que a expressão da enzima SEH está ocorrendo.

Para confirmar este resultado é interessante utilizar outra metodologia de detecção, dessa maneira, optamos por refazer a clonagem adicionando uma cauda de poli-histidina. Decidimos então, clonar tanto no pPICZ $\alpha$  A quanto no pPICZ B, para testar a expressão tanto extra quanto intracelularmente, já que em

alguns casos, a proteína pode não ser processada corretamente e falhar em secretar.

Para isso, foram desenhados os *primers* *EcoRI-SEH-F* (extra - E) e *NotI-SEH-R*, para a clonagem no pPICZ $\alpha$  A; e *EcoRI-SEH-F* (intra - I) e *NotI-SEH-R*, para a clonagem no pPICZ B. A reação em cadeia da polimerase foi efetuada utilizando o plasmídeo pPICZ $\alpha$  A – *SEH 2* como DNA molde. O resultado da amplificação pode ser visualizado na Figura 9, onde se pode observar a amplificação de uma banda próxima a 1000 pb de acordo com o marcador de peso molecular utilizado.

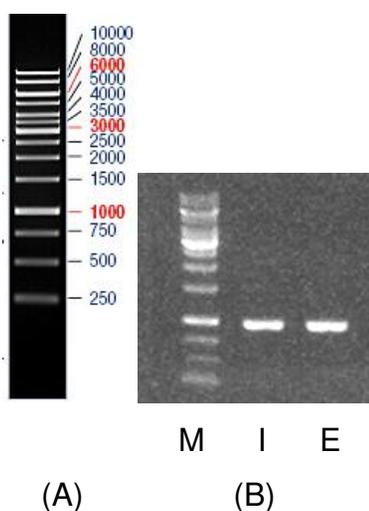


Figura 9. (A) Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); (B) Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico das reações de PCR utilizadas para amplificação do gene *SEH* de *Pichia stipitis*. M: Padrão de peso molecular; I e E: Reações de PCR para clonagem no pPICZ B e pPICZ $\alpha$  A, respectivamente.

As amostras I e E do gene amplificado foram purificadas e quantificadas no espectrofotômetro, apresentando concentrações de 400 e 370 ng/ $\mu$ L, respectivamente.

Os vetores pPICZ $\alpha$ A e pPICZ B e os fragmentos amplificados com os *primers* contendo sítios de restrição foram tratados com as enzimas *EcoRI* e *NotI*, em uma mesma reação para cada caso, já que as enzimas apresentam atividade máxima em uma mesma solução tampão. Os plasmídeos foram desfosforilados

após esta reação. As reações foram monitoradas por eletroforese, cujo resultado pode ser visualizado na Figura 10.

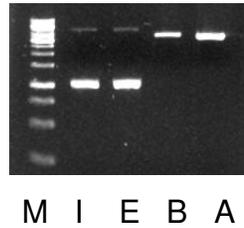
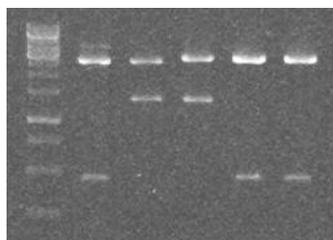


Figura 10: Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de clivagem do vetor pPICZ $\alpha$  A com enzimas de restrição. M: Padrão de peso molecular (Fermentas); Fragmentos tratados: I (intra), E (extra), B (pPICZ B) e A (pPICZ $\alpha$  A).

As amostras da digestão foram quantificadas, após a purificação, apresentando concentrações de 17 ng/ $\mu$ L (inserto I), 25 ng/ $\mu$ L (inserto E), 50 ng/ $\mu$ L (pPICZ $\alpha$  A) e 77 ng/ $\mu$ L (pPICZ B).

Os vetores e seus respectivos fragmentos, tratados com as enzimas de restrição, foram submetidos a uma reação de ligação, cujos produtos, pPICZ B – SEH I e pPICZ $\alpha$  A – SEH E, foram utilizados para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ).

Após este procedimento, observamos o crescimento de colônias no meio sólido, das quais extraímos o DNA plasmidial, que, posteriormente, foi utilizado em uma análise de restrição para verificar a presença do inserto. Essa análise foi efetuada utilizando-se as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, e a liberação de um fragmento de aproximadamente 1500 pb indicou que o fragmento foi ligado no vetor. O resultado pode ser visualizado na Figura 11.



M CN I1 E1 E2 E3

Figura 11. Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da análise de restrição para confirmação da presença do fragmento *SEH* nos vetores. M: Padrão de peso molecular; CN: Controle negativo; I1: clone para expressão intracelular; E1-E3: clones para expressão extracelular.

No gel analítico observamos que ocorreu a liberação de um fragmento do tamanho esperado nas amostras I1 e E1, confirmando a presença do inserto no vetor. Essas amostras de DNA plasmidial foram então quantificadas, apresentando concentrações de 80 e 285 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Estes plasmídeos foram então enviados para seqüenciamento, que mostrou que os clones apresentavam a mesma sequência que pPICZ $\alpha$  A – *SEH* 2. Além disso, foi possível observar que o gene foi clonado *in frame* com a cauda de histidina em ambos os casos e, no caso do pPICZ $\alpha$  A, também com o fator  $\alpha$ . Conforme sequências apresentadas a seguir, onde destacado em vermelho temos o fator  $\alpha$ , em laranja o nucleotídeo trocado e em verde a cauda de poli-histidina.

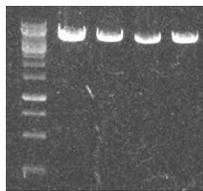
pPICZapha A + SEHE:

atgagatttccttcaatttttactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagctgct  
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A  
ccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcgg  
P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G  
tactcagattttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaat  
Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N  
aacgggttattgtttataaataactactattgccagcattgctgctaagaagaaggggta  
N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V  
tctctcgagaaaagagaggctgaagctgaattcacagaaagattcgttatcaaacttacc  
S L E K R E A E A E F T E R F V I K L T  
cacggttcagaagtttcaccaccttctcgaactacagcgaacaagatgttttcaaagg  
H G S R S F T T F S N Y S E Q D V F K G  
gccggaaccaaattggacaagagtgatctttctcttgcatgggtttcctgatgaaaattcg  
A G T K W T R V I F L L H G F P D E N S  
tcctatgatgaagcctggccgcatttagcacaagggtttcctaataaaaagggtcttttg  
S Y D E A W P H L A Q G F P N E K G L L  
ttgctagcaccattattgagaggctacgaagagctgagtttggggccagacgaatatagt  
L L A P L L R G Y E E L S L G P D E Y S  
actcatgatgtcgtgagacggttggtgcttgatcaagcagattaaccccagcaacaag  
T H D V A G D V G A W I K Q I N P S N K  
gttccagttcacattttgggccacgattgggggtgctataactgccttcaaaactgcttca  
V P V H I L G H D W G A I T A F K T A S  
aggtttccagagttgggttacttcaattgtgactttggcaattccttatttgaccaatgtg  
R F P E L V T S I V T L A I P Y L T N V  
gttccctggaagttggcttggaatgttccctgaacagttgtactattcgtcgtatatggtg  
V P W K L A W N V P E Q L Y Y S S Y M V  
acgatgcagttatcgttcttgtagacatccagattcgaacaaacaggcagagattcgtac  
T M Q L S F L Y R S R F E Q T G R D S Y  
ttagattcgtcctggaagtactgggtcctcctacctggaagtataaccgaaaaagatatcagt  
L D S L W K Y W S P T W K Y T E K D I S  
aagaccagagccagattgagtgatcacagaatcatggatgctaccacagcctattacaga  
K T R A R L S D H R I M D A T T A Y Y R  
gccatcttcaaccgattaaccttattaacggcaagtctaaatggcccgttgacttcagc  
A I F N P I N L I N G K S K W P V D F S  
caagttcccacatattttataggtggagcccaagacggttgatgaccagcaaattgtat  
Q V P T Y F I G G A Q D G C M T S K L Y  
gaatgggaaagagagttggtgaaggacgaacccaatatacaagaccactattttgcccac  
E W E R E L L K D E P N I K T T I L P N  
ctgggccattttcttacatcgagaagaacccccaaaaagttgctgagtttagcgattgagttc  
L G H F L H R E E P Q K V A E L A I E F  
ttcgaaaagtactcttccaaggctaccagtagtgcgggccgagctttctagaacaaaaa  
F E K Y S S K A T S S A A A S F L E Q K  
ctcatctcagaagaggatctgaatagcgcgctcgaccatcatcatcatcattga  
L I S E E D L N S A V D H H H H H H -

## pPICZ B + *SEH1*:

```
atgacagaaagattcgttatcaaacttaccacggttccagaagtttcaccaccttctcg
M T E R F V I K L T H G S R S F T T F S
aactacagcgaacaagatgttttcaaaggtgccggaaccaaaggacaagagtgatcttt
N Y S E Q D V F K G A G T K W T R V I F
ctcttgcatgggtttcctgatgaaaattcgtcctatgatgaagcctggccgcatttagca
L L H G F P D E N S S Y D E A W P H L A
caagggtttcctaataaaaagggtcttttgggtgctagcaccattattgagaggctacgaa
Q G F P N E K G L L L L A P L L R G Y E
gagctgagtttggggccagacgaatatagtaactcatgatgtcgtggagacgttgggtgcc
E L S L G P D E Y S T H D V A G D V G A
tggatcaagcagattaaccccagcaacaaggttccagttcacattttgggccacgattgg
W I K Q I N P S N K V P V H I L G H D W
ggtgctataactgccttcaaaactgcttcaaggtttccagagttgggttacttcaattgtg
G A I T A F K T A S R F P E L V T S I V
actttggcaattccttatttgaccaatgtgggtccctggaagttggcttggaatgttctt
T L A I P Y L T N V V P W K L A W N V P
gaacagttgtactattcgtcgtatattggtgacgatgcagttatcgttcttgtacagatcc
E Q L Y Y S S Y M V T M Q L S F L Y R S
agattcgaacaaacaggcagagattcgtacttagattcgtctctggaagtactgggtctctt
R F E Q T G R D S Y L D S L W K Y W S P
acctggaagtataccgaaaaagatatcagtaagaccagagccagattgagtgatcacaga
T W K Y T E K D I S K T R A R L S D H R
atcatggatgctaccacagcctattacagagccatcttcaaccgattaaccttattaac
I M D A T T A Y Y R A I F N P I N L I N
ggcaagtctaaatggcccgttgacttcagccaagttccacatatatttatagggtggagcc
G K S K W P V D F S Q V P T Y F I G G A
caagacggttgatgaccagcaaattgatgaatgggaaagagagttggttgaaggacgaa
Q D G C M T S K L Y E W E R E L L K D E
cccaataatcaagaccactatgttggccaacctggggccattttcttacatcgagaagaacc
P N I K T T I L P N L G H F L H R E E P
caaaaagttgctgagttagcgattgagttcttcgaaaagtactcttccaaggctaccagt
Q K V A E L A I E F F E K Y S S K A T S
agtgcggccgcccagcttttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcggc
S A A A S F L E Q K L I S E E D L N S A
gtcgaccatcatcatcatcatcattga
V D H H H H H H -
```

Os plasmídeos foram então linearizados com a enzima de restrição *DraI* antes da transformação em *P. pastoris*. O resultado da reação pode ser visualizado na Figura 12.



M

Figura 12. Fotodocumentação do gel de eletroforese analítico da reação de linearização dos vetores com *Dral*. M: Padrão de peso molecular; à direita: amostras.

Prosseguimos com a transformação em *P. pastoris* X-33 e KM71H eletrocompetentes utilizando as amostras linearizadas. A transformação foi aliquotada (200  $\mu$ L) em placas de Petri contendo meio sólido (YPDS-ágar) adicionado de Zeocina 100  $\mu$ g/mL, sendo possível a observação de diversas colônias após 4 dias de incubação a 28°C.

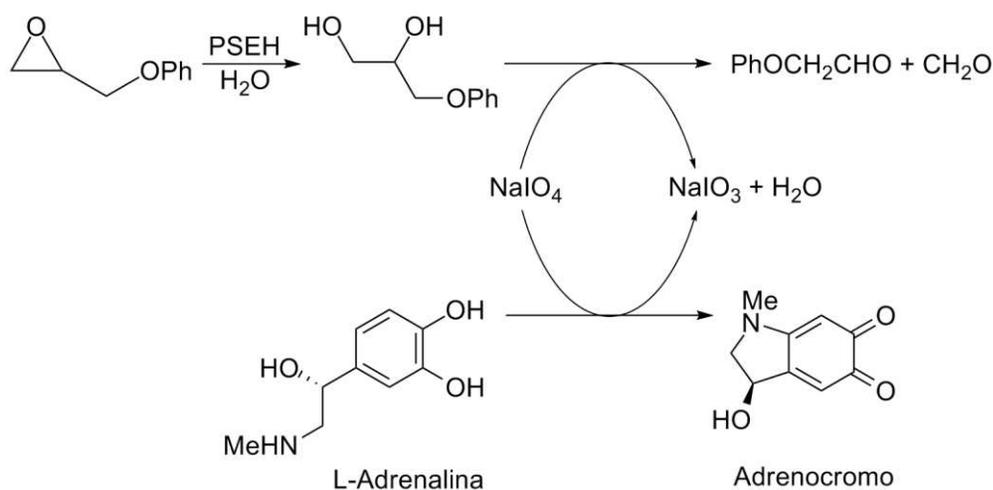
Foram selecionadas 94 colônias de cada tipo (*P. pastoris* X-33 + pPICZ $\alpha$ A – *SEH E*, *P. pastoris* KM71H + pPICZ $\alpha$ A – *SEH E*, *P. pastoris* X-33 + pPICZ B – *SEH I* e *P. pastoris* KM71H + pPICZ B – *SEH I*) para a triagem enzimática de alto desempenho em placa contendo meio sólido e 2 ou 3 mM do substrato fenil glicidil éter. Foi possível observar o crescimento de grande parte das colônias quando a concentração de substrato era de 2 mM, mas não houve crescimento na concentração 3 mM.

Dessa forma, estas construções foram utilizadas em ensaios para a detecção da atividade enzimática, tanto em análise por SDS-PAGE (12%) de frações coletadas a diferentes tempos de indução, quanto no teste de adrenalina.

Foi efetuado o teste iniciando a expressão em um valor de absorbância maior ( $A_{600nm} = 3$ ), utilizando as linhagens X-33 e KM71H de *P. pastoris* e os plasmídeos pPICZ $\alpha$  A – *SEH 2* (que havia apresentado uma banda interessante no teste anterior), pPICZ $\alpha$  A – *SEH E* e pPICZ B – *SEH I*, além dos vetores sem o inserto (para o controle da expressão endógena). As alíquotas coletadas foram concentradas com TCA (ácido tricloroacético) e foi efetuada a eletroforese em gel de poliacrilamida. Porém, não foi encontrado nenhum sinal de expressão da enzima de interesse, além disso, a baixa quantidade de enzimas, até mesmo nas

amostras de lisado celular, indica uma possível degradação, o que pode ter levado a um falso negativo.

Adicionalmente, efetuamos o teste de adrenalina<sup>41</sup>, um método colorimétrico baseado na retrotitulação do periodato de sódio, no qual, durante ou após a reação enzimática, uma quantidade conhecida deste reagente é adicionada ao meio para reagir com o diol, gerado pela ação da enzima sobre o epóxido. O periodato de sódio remanescente é então retrotitulado pela adição de um excesso de adrenalina, que reage quantitativamente com o periodato de sódio para formar o adrenocromo de coloração vermelha (Esquema 8). Assim, a formação do adrenocromo, quantificado espectrofotometricamente, é inversamente proporcional à atividade enzimática.



Esquema 8. Representação esquemática do teste de adrenalina para detecção da epóxido hidrolase de *P. stipitis* (PSEH)<sup>41</sup>.

No caso da expressão extracelular, é conveniente utilizar o sobrenadante no teste de adrenalina. Porém, observamos que o meio utilizado para induzir a expressão interfere na leitura dos valores de absorbância, não sendo possível determinar a atividade de epóxido hidrolase. Assim, tentamos modificar as

<sup>41</sup> Reymond, J.; Wahler, D. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1277.

condições do teste utilizando a menor quantidade de sobrenadante possível (partindo de 80  $\mu$ L e chegando a 30  $\mu$ L), modificando o pH no teste (6; 7,5 e 8) e alterando a concentração de periodato de sódio (1 a 10 mM), para diferentes valores de conversão, mas nenhuma dessas alterações se mostrou eficaz. A Tabela 3 apresenta os valores de absorbância obtidos no teste da influência da concentração de periodato. Quando apenas a solução tampão é adicionada ao teste, é possível observar uma queda acentuada do valor da absorbância mesmo para o menor valor de conversão testado (5%). Já quando o meio BMMY é adicionado, os valores de absorbância medidos para 0 a 100% de conversão ficam muito próximos, mesmo em diferentes concentrações de periodato de sódio.

Tabela 3. Valores de absorbância obtidos no teste de adrenalina utilizando diferentes concentrações de periodato de sódio

Conversão (%)	0	5	10	25	50	60	80	95	100
Solução tampão/1 mM	0,753	0,343	0,333	0,497	0,448	0,469	0,317	0,366	0,364
BMMY/1 mM	0,970	0,899	1,011	0,856	0,713	0,667	0,771	0,749	0,722
BMMY/2 mM	0,900	0,869	0,974	0,837	0,767	0,662	0,659	0,700	0,736
BMMY/3 mM	0,905	0,841	0,961	0,865	0,716	0,692	0,666	0,709	0,785
BMMY/4 mM	0,857	0,872	0,951	0,864	0,738	0,704	0,686	0,725	0,781
BMMY/5 mM	0,740	0,813	0,958	0,912	0,763	0,690	0,664	0,701	0,790
BMMY/6 mM	0,781	0,766	0,907	0,898	0,807	0,678	0,689	0,692	0,808
BMMY/7 mM	0,823	0,820	0,876	0,846	0,825	0,599	0,670	0,705	0,737
BMMY/8 mM	0,779	0,804	0,363	0,823	0,832	0,670	0,667	0,727	0,750
BMMY/9 mM	0,684	0,727	0,846	0,836	0,810	0,621	0,648	0,677	0,728
BMMY/10 mM	0,669	0,784	0,844	0,802	0,789	0,632	0,656	0,711	0,708

Dessa forma, testamos uma nova abordagem, efetuamos o teste utilizando células íntegras ressuspensas em solução tampão adequada<sup>42</sup>, tanto para a expressão intra quanto para a extracelular. Neste caso, é necessário fazer uma medida para descontar a interferência das células. Para tanto, medimos a absorbância a  $\lambda = 490$  nm imediatamente antes da adição da solução de

<sup>42</sup> Kahakeaw, D.; Reetz, M. T. *Chem. Asian J.* **2008**, 3, 233.

adrenalina, dessa forma, é possível obter a absorbância corrigida subtraindo este valor da medida obtida após a adição da adrenalina. Para cada amostra foi feito também um controle positivo, adicionando-se à reação o diol, e não o epóxido.

Os valores de absorbância corrigidos foram então comparados ao valor do controle positivo, e pudemos observar que mesmo no caso do controle negativo (células transformadas com o plasmídeo vazio), os valores são muito próximos, além disso, os valores apresentam uma variação muito grande entre as duplicatas, o que pode ser um indício da interferência das células na leitura (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de absorbância corrigidos obtidos no teste de interferência de células

	C. P.	C. N.	C. N. 1	C. N. 2	C. N. 3	C. N. 4
1ª duplicata	0,010	0,810	0,224	0,190	0,024	0,034
2ª duplicata	0,011	0,900	0,032	0,063	0,207	0,185

Onde, C. P. é o controle positivo; C. N. é o controle negativo utilizando apenas a solução tampão, sem a presença de células; C. N. 1 é o controle negativo utilizando células de *P. pastoris* X-33 transformadas com o pPICZ $\alpha$  A; C. N. 2 é o controle negativo utilizando células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o pPICZ $\alpha$  A; C. N. 3 é o controle negativo utilizando células de *P. pastoris* X-33 transformadas com o pPICZ B; C. N. 4 é o controle negativo utilizando células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o pPICZ B.

Assim, é necessário aperfeiçoar as condições do teste para chegar a uma conclusão sobre a atividade enzimática.

#### 4.1. Análises *in silico*

O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MW) teóricos calculados para todas as enzimas que serão citadas nas discussões subseqüentes, encontram-se na Tabela 5, identificadas pelo nome e/ou código utilizado no RCSB PDB.

Tabela 5. Ponto Isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) teóricos das enzimas citadas nesse trabalho

Código no PDB	Nome	pI	MW (kDa)
	PSEH	6,52	36,7
3KDA, 3PI6, 3KD2	EH de <i>P. aeruginosa</i>	6,18	34,0
3I28, 1ZD4	EH humana	5,91	62,6
1EK1	EH de <i>M. musculus</i>	5,85	62,5
1EHY	EH de <i>A. radiobacter</i>	5,18	34,0
1QO7	EH de <i>A. niger</i>	5,22	44,0
3G02	EH de <i>A. niger</i> melhorada	5,71	46,0

A estrutura da EH de *P. stipitis* (PSEH) foi modelada pelo servidor I-TASSER<sup>36</sup>, que permite ao usuário gerar automaticamente previsões de alta qualidade da estrutura tridimensional e da função biológica de proteínas a partir de sua sequência de aminoácidos. Como resultado foram obtidos 5 modelos (Figura 13), que possuem uma pontuação de confiabilidade (C-score) variando de -5 a 2, sendo que uma maior pontuação indica uma melhor previsão estrutural.

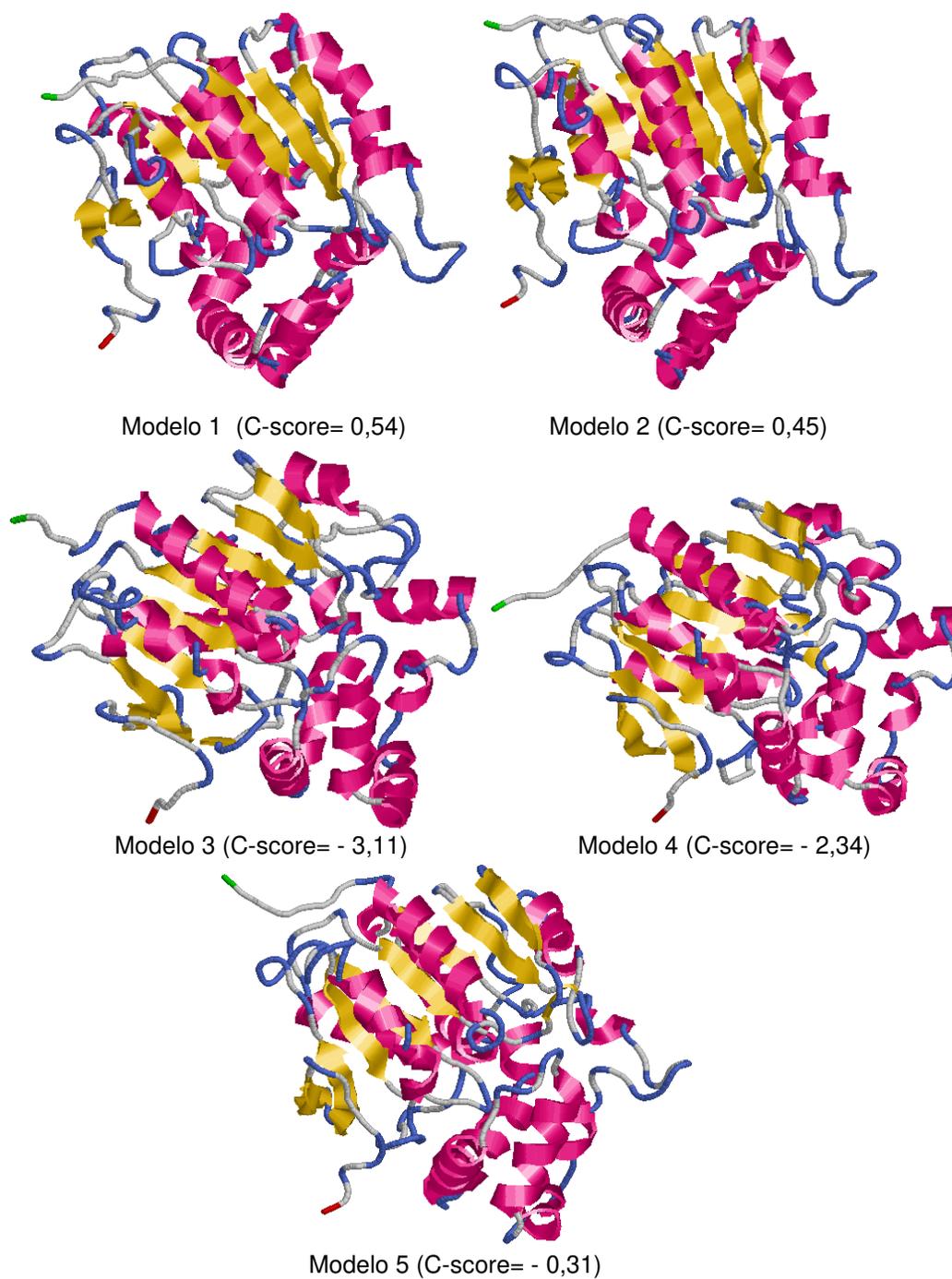


Figura 13. Modelos obtidos para a PSEH, destacando as hélices  $\alpha$  (em rosa), as folhas  $\beta$  (em amarelo) e os resíduos N-terminal (em vermelho) e C-terminal (em verde).

Os valores de TM-score e Root Mean Square Deviation (RMSD) são parâmetros correlacionados ao C-score, que são utilizados para indicar a similaridade entre estruturas, neste caso, entre a estrutura modelada e os moldes utilizados. O servidor I-TASSER, fornece os valores de TM-score e RMSD apenas para o modelo com maior C-score, por considerar que, apenas nesse caso os valores são significativos<sup>43</sup>.

O valor de RMSD corresponde à distância média de todos os resíduos correspondentes nas duas estruturas, de forma que, um erro local irá elevar muito seu valor, apesar da topologia global estar correta. Já no caso do TM-score, considera-se que as pequenas distâncias têm maior peso que as grandes, eliminando o problema do erro local. Valores de TM-score maiores do que 0,5 indicam um modelo de topologia correta, enquanto valores menores que 0,17 indicam que a similaridade é aleatória. O modelo 1 (Figura 13), previsto para a PSEH apresentou TM-score de  $0,79 \pm 0,09$ , RMSD de  $5,2 \pm 3,3 \text{ \AA}$  e o maior C-score dentre os modelos gerados, por este motivo, ele foi selecionado para as discussões subsequentes.

Cabe ressaltar, que os modelos foram construídos tanto para a EH selvagem, cujas informações foram obtidas a partir do sequenciamento dos fragmentos amplificados, quanto para a enzima contendo o fator  $\alpha$  e cauda de histidina. Dessa forma, podemos concluir que os resíduos adicionados ao N- e ao C-terminal da enzima não devem influenciar em sua atividade, já que os mesmos ficam posicionados em uma região externa (Figura 14).

---

<sup>43</sup> Zhang, Y. *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, 40.

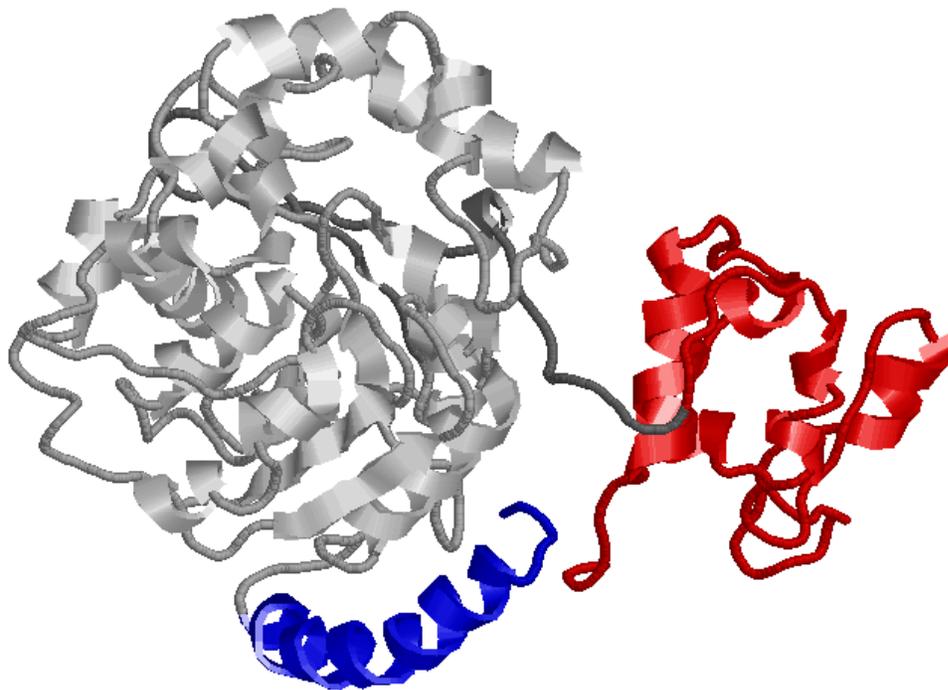


Figura 14. Representação da estrutura da PSEH, destacando a localização do fator  $\alpha$  (em vermelho) e da cauda de histidina (em azul).

Além da estrutura terciária, o I-TASSER fornece uma previsão da estrutura secundária, da atividade desempenhada pela proteína e da acessibilidade de solvente para cada resíduo e, também, o alinhamento da sequência submetida com as sequências das proteínas utilizadas como molde na construção da estrutura terciária.

As estruturas terciárias obtidas são formadas por, aproximadamente, 40% de hélices  $\alpha$  e 12 % de folhas  $\beta$ .

Os moldes utilizados pelo software para a obtenção do modelo final foram as estruturas 3KDA, 3PI6, 3KD2 (EH de *Pseudomonas aeruginosa*), 3I28, 1ZD4 (EH humana) e 1EK1 (EH de *Mus musculus*). Os resíduos do sítio ativo são, no caso da EH de *Mus musculus*, Tyr381, Tyr465, Asp333, Asp495 e His523<sup>44</sup>, na

<sup>44</sup> Argiriadi, M. A.; Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Dowdy, D. L.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 15265.

EH humana, Tyr383, Tyr466, Asp335 e His524<sup>45</sup>, e na EH de *Pseudomonas aeruginosa*, Tyr239, Asp129, Glu153, His297<sup>46</sup>.

Como o espaçamento entre os resíduos do sítio ativo na estrutura primária é praticamente constante (170 a 190 resíduos entre His e o Asp que faz o ataque nucleofílico, 50 resíduos entre este mesmo resíduo de Asp e uma das Tyr que ativam o epóxido, 110 a 130, com relação à segunda Tyr) é possível relacionar os resíduos do sítio ativo das estruturas resolvidas com os resíduos que devem participar do sítio ativo da PSEH, quando as sequências são alinhadas, conforme mostrado a seguir, onde, da primeira a sétima linha tem-se às sequências: PSEH, 3KDA, 3I28, 3KDA, 1ZD4, 3I28, 3PI6, 1EK1, 3KD2, 3KDA e 1EK1 e os resíduos do sítio ativo estão destacados.

```

PSEH  MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTI
3KDA  -----
3I28  CELKMHFDFLIESCQVGMVKPIYKFLLDTLKASPSEVV--FLDDIGA-----NLKPARDLGMVTILVQD
3KDA  -----
1ZD4  LKMHFDFLIESCQVGMVKPEPQIYKFLLDTLKASPSEVVFLDDIGANLKPA-----RDLGMVTILVQD
3I28  SQWIPLMEENCRFDKMLRKKILTNTWLD--DRAEDGLAQLMCELKMHFDFLIEDTLKASPSEVVFLDDIG
3PI6  -----
1EK1  MAARSINRPMQLQAAIALKKKGFTTCKRDSLQMMCELLIGMIKPEPQIYNFLDLTLKAKPNEVVFLDDFG
3KD2  -----
3KDA  -----
1EK1  GDKRDSLQMMCELQHFDFLIESCQVGDTLKAPNEVV--FLDDFGSN-----LKPARDMGMVTILVHN

PSEH  ASIAAKEEGVSLEKREAEAEFTERFVIKLT HGSRSFTTFSNYSEQDVFKGAGTKWTRVIFLLHGFDPDENS
3KDA  -----AEEFPVPNGFESAYREVDGVK LHYVKGGQG----PLVMLVHGFQGTWY
3I28  TALKEL EKVTGIQLLNTPAPLPTSC--NPSDM SHGYVTVKRVR LHFVVELGSG----PAVCLCHGFPESWY
3KDA  -----AEEFPVPNGFESAYREVDGVK-----LHYV--KGG--QGPLVMLVHGFQGTWY
1ZD4  TALKEL EKVTGIQLLNTPAPLPTSC----NPSDM SHGYVTVPRVRLHFVVELG--SGPAVCLCHGFPESWY
3I28  ANLKARDLGMQLLNLPTSCNPSDM SHGYVKPRVR-----LHFVEL--G--SGPAVCLCHGFPESWY
3PI6  -----AEEFPVPNGFESAYREVDGVK LHYVKG----QGPLVMLVHGFQGTWY
1EK1  SNLKPARDASALRELEKVTGTQFP EAPLPVPC--NPNDV SHGYVTVKPGI-RLHFVEMG--ALCLCHGFPESWF
3KD2  -----AEEFPVPNGFESAYREVDGVK LHYVKGGQP----LVMLVHGFQGTWY
3KDA  -----AEEFPVPNGFESAYREVDGVK LHYVKGG----QGPLVMLVHGFQGTWY
1EK1  TASALRELEKVTGTQFP EAPLPVPC--NPNDV SHGYVTVKPGI-RLHFVEMG--SGPALCLCHGFPESWF

```

<sup>45</sup> Eldrup, A. B.; Soleymanzadeh, F.; Taylor, J. S.; Muegge, I.; Farrow, N. A.; Joseph, D.; McKellop, K.; Man, C. C.; Kukulka, A.; De Lombaert, S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5880.

<sup>46</sup> Bahl, C. D.; Morisseau, C.; Bomberger, J. M.; Stanton, B. A.; Hammock, B. D.; O'Toole, G. A.; Madden, D. R. *J. Bacteriol.* **2010**, *7*, 1785.

PSEH SYDEAWPHLAQGFNPNEKGLLLLLLAPLLRGYEELSLGPDEYSTHDVAGDVGAWIKQINPSNKVPVHILGHDW  
 3KDA EWHQLMPELAK-----RFTVIA~~PDLPGLGQSEPPKTYSGEQVAVY~~LHKLARQFS~~PDR~~---PFDLVAHDI  
 3I28 SWRYQIPALAQA-----GYRVLAMDMKGYGESSAPPEEY~~CMEVLC~~KEMVTFLDKLGLSQA---VFIGHDW  
 3KDA EWHQLMPELAK-----RFTVIA~~PDLPGLGQSEPPKTYSGEQVAVY~~LHKLARQFS~~PDR~~---PFDLVAHDI  
 1ZD4 SWRYQIPALA-----QAGYRVLAMDMKGYGESSAPPEEY~~CMEVLC~~KEMVTFLDKLGLS---QAVFIGHDW  
 3I28 SWRYQIPALAQA-----GYRVLAMDMKGYGESSAPPEEY~~CMEVLC~~KEMVTFLDKLGLSQ---AVFIGHDW  
 3PI6 EWHQLMPELA-----KRFTVIA~~PDLPGLGQSEPPKTYSGEQVAVY~~LHKLARQFS~~PDRP~~---FDLVAHDI  
 1EK1 SWRYQIPALAQA-----GFRVLAIDMKGYGDS~~SSPPEEY~~AMELLCKEMVTFLDKLGIPQ---AVFIGHDW  
 3KD2 EWHQLMPELA-----KRFTVIA~~PDLPGLGQSEPPKTYSGEQVAVY~~LHKLARQFS~~PDRP~~---FDLVAHDI  
 3KDA EWHQLMPELAK-----RFTVIA~~PDLPGLGQSEPPKTYSGEQVAVY~~LHKLARQFS~~PDRP~~---FDLVAHDI  
 1EK1 SWRYQIPALAQ-----AGFRVLAIDMKGYGDS~~SSPPEI~~YAMELLCKEMVTFLDKLGIPQ---AVFIGHDW

PSEH GAITAFKTASRFPPELVTSIVTLAIPYLNTNVPWKLAWNVPEQLYYSSY~~MVTMQLSFLY~~RSRFEQTGRDSY  
 3KDA GIWNTYPMVVKNQADIARLVYMEAPI~~PDARIYR~~FPAFTAQGESLVWHF~~SFFAADDR~~LAETLIAGKER~~FFL~~  
 3I28 GGMLVWYMAFY~~PERVRAVASLNT~~PFIPANPNMSPLESIK-ANPVFDY~~QLYFQEPGVAEAELEQ~~NLSRTF  
 3KDA GIWNTYPMVVKNQADIARLVYMEAPI~~PDARIYR~~F-PAFTAQGESLVWHF~~SFFAADDR~~LAETLIAGKER~~FFL~~  
 1ZD4 GGMLVWYMAFY~~PERVRAVASLNT~~PFIPANPNMSPL-ESIKANPVFDY~~QLYFQEPGVAEAELEQ~~NLSRTF  
 3I28 GGMLVWYMAFY~~PERVRAVASLNT~~PFIPANPNMSPLESI-KANPVFDY~~QLYFQEPGVAEAELEQ~~NLSR-T  
 3PI6 GIWNTYPMVVKNQADIARLVYMEAPI~~PDARIYR~~FPAFTAQGESLVWYF~~SFFAADDR~~LAETLIAGKER~~FFL~~  
 1EK1 AGVMVWNMAFY~~PERVRAVASLNT~~PFMPDPD-VSPMKVIRSIPVFNY~~QLYFQEPGVAEAELEK~~NMSRTF  
 3KD2 GIWNTYPMVVKNQADIARLVYMEAPI~~PDARIYR~~FPAFTAQGESLVWHF~~SFFAADDR~~LAETLIAGKER~~FFL~~  
 3KDA GIWNTYPMVVKNQADIARLVYMEAPI~~PDARIYR~~FPAFTAQGESLVWHF~~SFFAADDR~~LAETLIAGKER~~FFL~~  
 1EK1 AGVMVWNMAFY~~PERVRAVASLNT~~PFMPDPDVS-PMKVIRSIPVFNY~~QLYFQEPGVAEAELEK~~NMSRTF

PSEH LDSLWKYWSPTWKYTEKDISKTRARLSDHRIMDATTAYYRAIFNPINLINGKSKWPVDFSQVPTYFIGGA  
 3KDA EHF~~IKSHASNT~~EVFSE~~RLLDLYARSYAKPHSLNASFEYY~~RALNESVRQ---NAELAKTRL~~QMP~~TMTLAGG  
 3I28 KSLFRASD~~SLSRMVTEEE~~IQFYVQQFKKSGF-RGPLN~~WYRN~~MERNW~~KWAC~~---KSLGRKILIPALMVTAE  
 3KDA LEHF~~IKSHANTE~~EVFSE~~RLLDLYARSYAKPHSLNASFEYY~~RALNESVRQ---NAELAKTRL~~QMP~~TMTLAGG  
 1ZD4 KSLFRASDESSRMVTEEEIQFYVQQFKKSGF-RGPLN~~WYRN~~MERNW~~KW~~---ACKSLGRKILIPALMVTAE  
 3I28 FK~~SLFRASS~~LSRMVTEEEIQFYVQQFKKSGF-RGPLN~~WYRN~~MERNW~~K~~---WACKSLGRKILIPALMVTAE  
 3PI6 EHF~~IKSHASNT~~EVFSE~~RLLDLYARSYAKPHSLNASFEYY~~RALNESVRQ---NAELAKTRL~~QMP~~TMTLAGG  
 1EK1 KSFFREDPNLSKITTEEEIEFYIQQFKKTG-FRGLN~~WYRN~~TERNW~~KWS~~---CKGLGRKILV~~P~~ALMVTAE  
 3KD2 EHF~~IKSHASNT~~EVFSE~~RLLDLYARSYAKPHSLNASFEYY~~RALNESVRQ---NAELAKTRL~~QMP~~TMTLAGG  
 3KDA EHF~~IKSHASNT~~EVFSE~~RLLDLYARSYAKPHSLNASFEYY~~RALNESVRQ---NAELAKTRL~~QMP~~TMTLAGG  
 1EK1 KSFFRASDETSKITTEEEIEFYIQQFKKTGF-RGPLN~~WYRN~~TERNW~~KWSCK~~---GLGRKILV~~P~~ALMVTAE

PSEH QDGCMTSKLYEWERELLKDEPNIKTTILPNLGHFLHREEEPQKVAELAIEFFEKYSSKATSSAAASFLEQK  
 3KDA GAGGMG---TFQLEQMKAYAEDVEGHVLP~~GC~~HWLPEE~~CAAPMNRLVIDFLSR~~-----  
 3I28 KDFVLVPQMSQHME---DWI~~PHL~~KRGHIEDCGHWTQMDK~~PTEVNQILIKW~~LDSARN-----  
 3KDA GAGGMGTFQLE---QMKAYAEDVEGHVLP~~GC~~HWLPEE~~CAAPMNRLVIDFLSR~~GRHH-----  
 1ZD4 KDFVLVPQMSQHME---WI~~PHL~~KRGHIEDCGHWTQMDK~~PTEVNQILIKW~~LDS-----  
 3I28 KDFVLVPQMS---QHMEDWI~~PHL~~KRGHIEDCGHWTQMDK~~PTEVNQILIKW~~LDSARN-----  
 3PI6 GHGGMGTFQLEQMKAY---AEDVEGHVLP~~GC~~HWLPEE~~CAAPMNRLVIDFLSR~~GRHH-----  
 1EK1 KDIVLRPEMSKNMEKWI---PFL~~KRGHIEDCGHWTQIEK~~PTEVNQILIKWLQTE-----  
 3KD2 GHGGMGTFQLEQ---MKAYAEDVEGHVLP~~GC~~HWLPEE~~CAAPMNRLVIDFLSR~~-----  
 3KDA GAGGMG---TFQLEQMKAYAEDVEGHVLP~~GC~~HWLPEE~~CAAPMNRLVIDFLSR~~GRHH-----  
 1EK1 KDIVLRPEMS---KNMEKWI~~PFL~~KRGHIEDCGHWTQIEK~~PTEVNQILIKWLQTE~~-----

PSEH	LISEEDLNSAVDHHHHHH
3KDA	-----GRHHH
3I28	-----
3KDA	-----
1ZD4	-----
3I28	-----
3PI6	-----
1EK1	-----
3KD2	-----
3KDA	-----
1EK1	-----

Assim, os resíduos do sítio ativo da PSEH seriam Tyr258, Tyr319, Asp209, Asp352 e His383 (Figura 15).

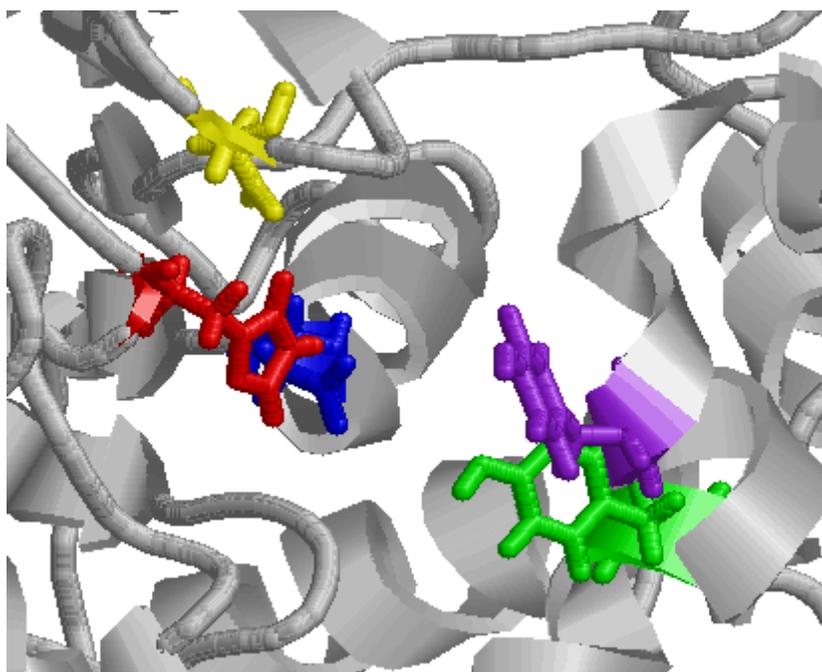


Figura 15. Representação da estrutura da PSEH, com destaque para Tyr258 (em roxo), Tyr319 (em verde), Asp209 (em azul), Asp352 (em amarelo) e His383 (em vermelho).

O servidor I-TASSER identificou a enzima depositada como correspondendo a uma EH e sugeriu os resíduos que possivelmente participam do sítio ativo como sendo os identificados anteriormente, com exceção a Tyr258. Este resíduo encontra-se a 15,6 Å do resíduo Asp209, enquanto nas estruturas resolvidas, a distância das Tyr ao resíduo que efetua o ataque nucleofílico

costuma ser de, aproximadamente, 6 Å. Além disso, ao compararmos a sua posição com a do resíduo equivalente na estrutura resolvida de 1EK1 podemos observar que, na Tyr258, o hidrogênio responsável pela ativação do epóxido aponta para o lado oposto ao do posicionamento do substrato (Figura 16).

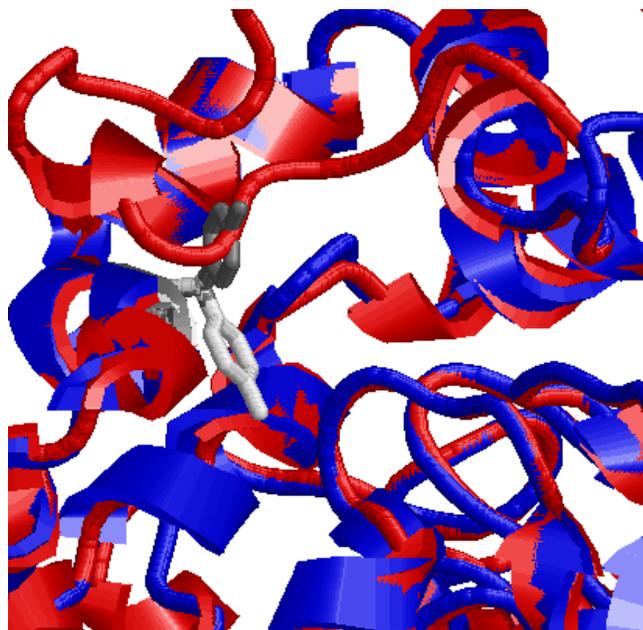


Figura 16. Comparação entre a posição da Tyr381, que faz parte do sítio ativo da 1EK1 (em branco), com a Tyr258 da PSEH (em cinza).

Dessa forma, concluímos que apenas os resíduos Tyr319, Asp209, Asp352 e His383 poderiam, pelos dados obtidos *in silico*, fazer parte do sítio ativo (Figura 17).

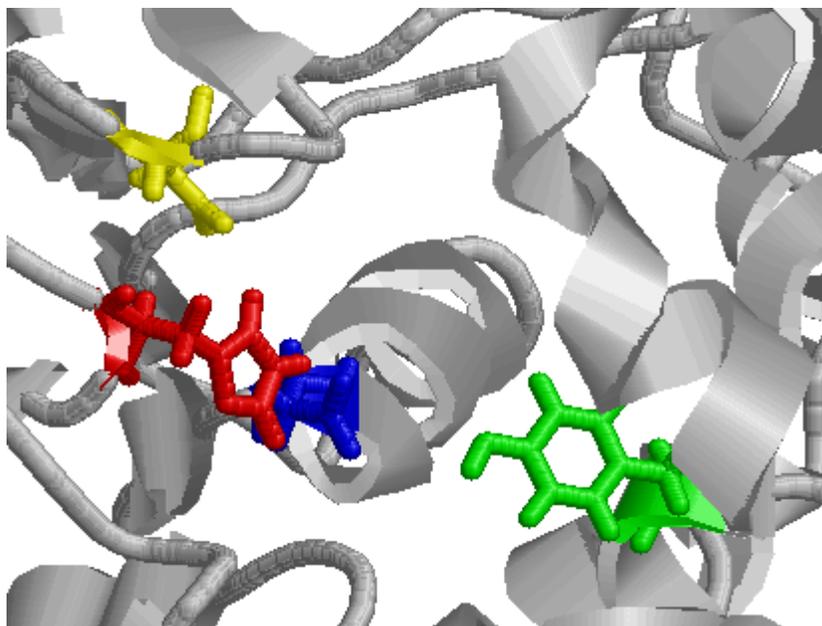


Figura 17. Representação do sítio ativo da PSEH, Tyr319 (em verde), Asp209 (em azul), Asp352 (em amarelo) e His383 (em vermelho).

Conforme citado anteriormente, não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a caracterização da PSEH. Sabe-se apenas que a enzima possui atividade frente à sonda fluorogênica (Esquema 6) que foi utilizada quando sua atividade hidrolítica frente à epóxidos terminais foi detectada pela primeira vez<sup>9</sup>. Desta maneira, uma alternativa para prever possíveis substratos da PSEH é comparar seu sítio ativo ao de outras EHs que estejam descritas na literatura.

Primeiramente, fizemos a sobreposição da PSEH com as enzimas utilizadas como molde pelo I-TASSER. Na Figura 18, observamos o destaque para o sítio ativo na sobreposição com a 1EK1 (EH de *Mus musculus*).

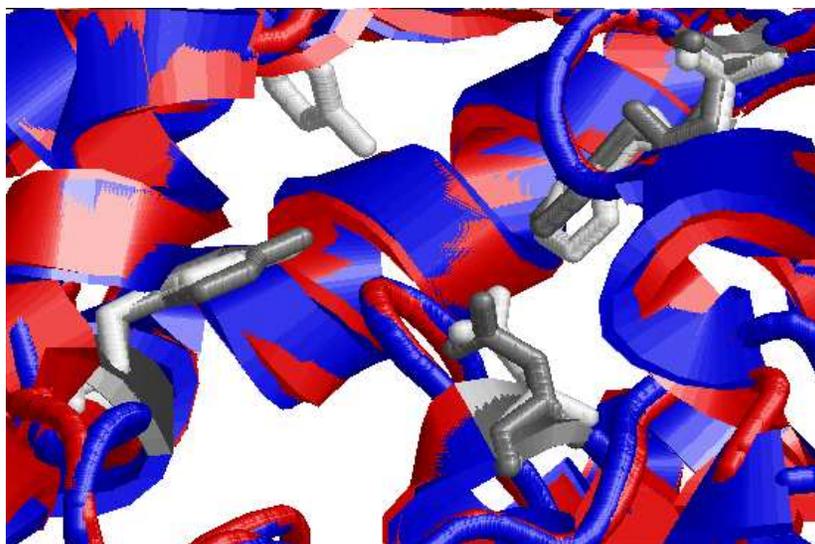
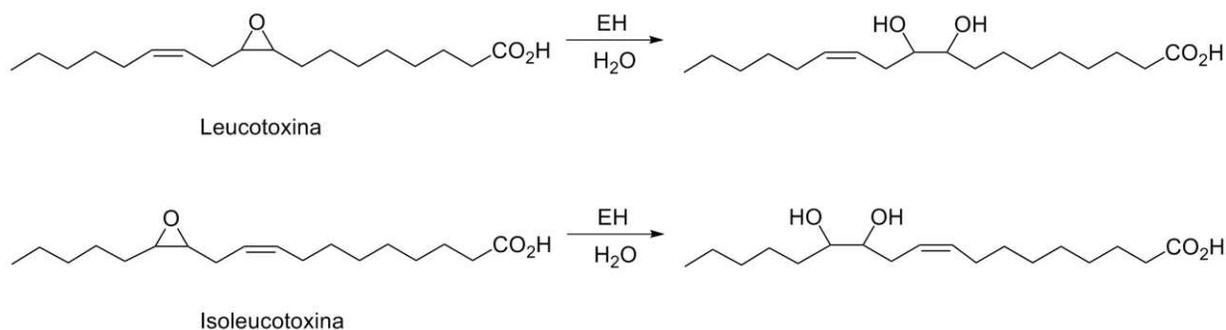


Figura 18. Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com a 1EK1 (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco).

A EH de *Mus musculus* acomoda substratos alifáticos volumosos, como as leucotoxinas. Estas substâncias podem afetar a permeabilidade da membrana e o transporte de íons causando resposta inflamatória. As EHs, que aceitam este substrato, catalisam a hidrólise da leucotoxina e da isoleucotoxina aos seus respectivos dióis (Esquema 9), sendo, portanto, alvo de interesse de estudos para o tratamento de doenças relacionadas a essas substâncias<sup>44</sup>.



Esquema 9. Reação de hidrólise da leucotoxina catalisada por EH<sup>44</sup>.

A sobreposição da PSEH com a 3I28 (EH humana) é apresentada na Figura 19. Esta EH, como a 1EK1, acomoda substratos alifáticos volumosos, inclusive a leucotoxina<sup>45</sup>.

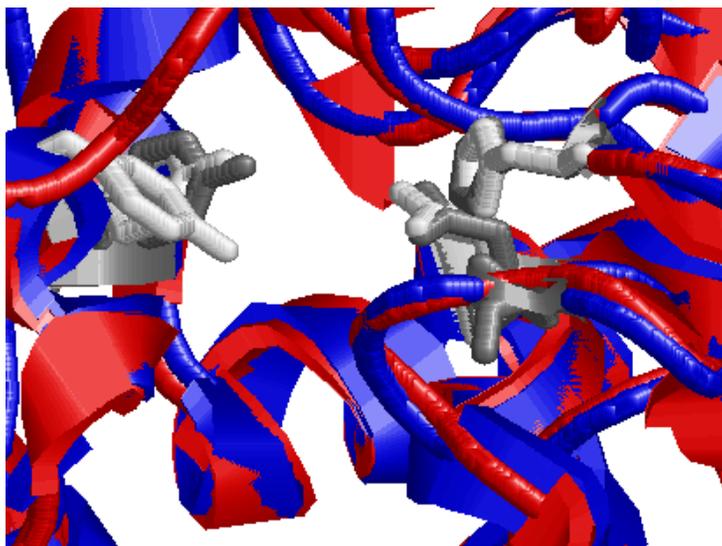


Figura 19. Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com a 3I28 (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco).

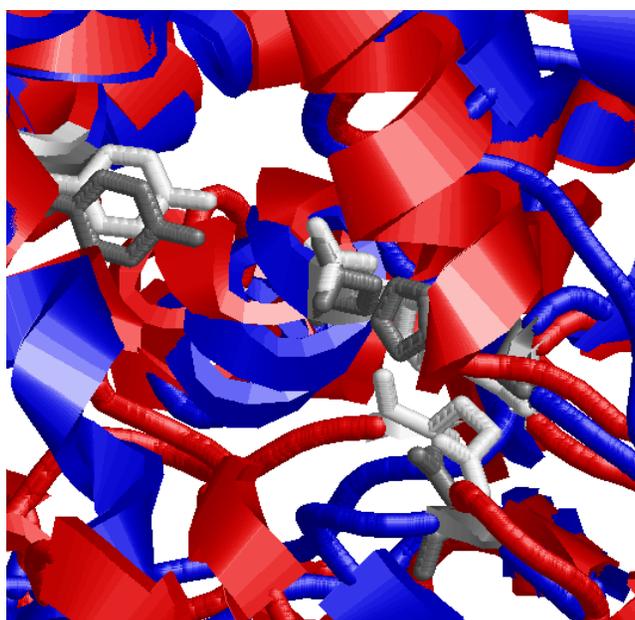


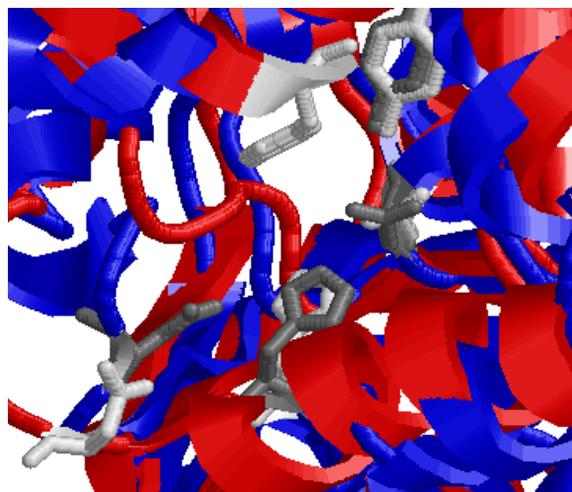
Figura 20. Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com a 3KDA (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco).

Na Figura 20, observamos o destaque para o sítio ativo na sobreposição da PSEH com a 3KDA (EH de *Pseudomonas aeruginosa*). Esta enzima foi descrita como tendo atividade frente ao 1-bromo-2,3-epóxi-propano e ao *cis*-2,3-difeniloxirano (Figura 21). Ou seja, acomoda substratos menos volumosos e aromáticos, diferentemente das enzimas citadas anteriormente. Isto se deve, possivelmente, ao diferente acesso dos substratos ao sítio ativo. Nos dois primeiros casos, o sítio ativo tem duas aberturas, de forma que, o substrato e o produto podem entrar e sair por cavidades diferentes, enquanto na 3KDA, a estrutura apresenta-se na forma de um dímero fazendo com que exista apenas uma abertura disponível. Como consequência, o produto da reação deve deixar o sítio ativo antes que outro substrato possa entrar, limitando a aceitação por substratos desta EH<sup>46</sup>.

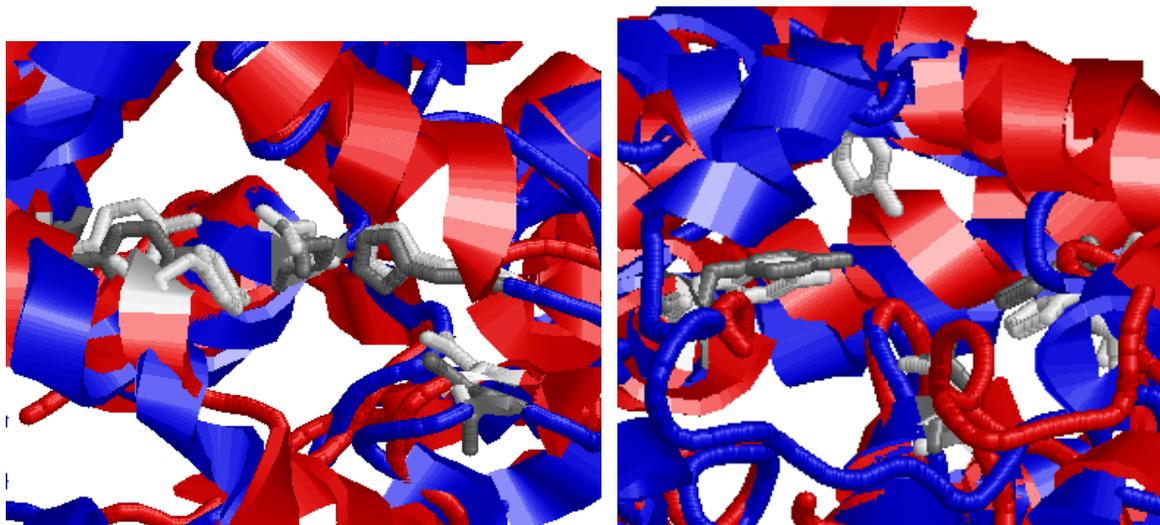


Figura 21. Exemplo do tipo de substrato aceito pela EH de *P. aeruginosa* (A) 1-bromo-2,3-epóxi-propano, (B) *cis*-2,3-difeniloxirano.

Além disso, efetuamos a sobreposição da PSEH com as EHs de *A. radiobacter* (1EHY), *A. niger* (1QO7) e *A. niger* melhorada por evolução dirigida<sup>18</sup> (3G02) (Figura 22).



(A)



(B)

(C)

Figura 22. Sobreposição da PSEH (estrutura em azul e resíduos do sítio ativo em cinza) com outras EHs (estrutura em vermelho e resíduos do sítio ativo em branco), sendo (A) 1EHY, (B) 1QO7 e (C) 3G02.

Sabe-se que a estrutura da ANEH consiste de um dímero<sup>47</sup> e que esta enzima apresenta atividade frente à sonda fluorogênica (Esquema 6)<sup>9</sup>, além de acomodar substratos menos volumosos e aromáticos, assim como a EH de *A. radiobacter*.

<sup>47</sup> Zou, J.; Hallberg, B. M.; Bergfors, T.; Oesch, F.; Arand, M.; Mowbray, S.L.; Jones, T.A. *Structure* **2000**, *8*, 111.

Dessa forma, a partir dessas análises, concluímos que a previsão do tipo de substrato aceito pela PSEH depende também de sua estrutura quaternária, que ainda não foi caracterizada. Uma alternativa foi prever a estrutura quaternária utilizando servidores *web*, utilizamos então, o QuatIdent<sup>37</sup>, que previu que a PSEH é um homodímero.

Assim, nossa hipótese é que os substratos aceitos por essa enzima devem ser similares aos aceitos pelas EHs de *P. aeruginosa*, *A. radiobacter* e *A. niger*, ou seja, pouco volumosos ou aromáticos e a reação de hidrólise deve apresentar algum nível de enantiosseletividade.

## 5. Conclusão

A clonagem do gene *SEH1*, que codifica para a epóxido hidrolase de *P. stipitis*, foi efetuada com sucesso em *P. pastoris*, tanto no vetor pPICZ $\alpha$  A, quanto no vetor pPICZ B, que permitem a expressão da proteína heteróloga extra e intracelularmente, respectivamente. A clonagem da proteína com a cauda de histidina deve auxiliar na detecção da expressão e posterior purificação da enzima.

A detecção de uma proteína de aproximadamente 46 kDa é um indício de que a expressão da enzima SEH (contendo o fator  $\alpha$ ) está ocorrendo, já que o teste com o controle nos levou a concluir que não se trata de uma proteína endógena. Porém, não conseguimos reproduzir este resultado no experimento posterior, devido à degradação das amostras coletadas, mesmo na presença de inibidores de proteases.

Além de determinar se a enzima está sendo expressa, precisamos determinar se a mesma se apresenta funcional, dessa forma, buscamos melhores alternativas para a detecção da atividade enzimática. Neste contexto, o teste de adrenalina utilizando células íntegras pode vir a ser uma ferramenta muito útil, pela sua rapidez e facilidade de realização. Para tanto, precisamos aperfeiçoá-la e confirmar sua validade utilizando outras metodologias, como a análise de frações da expressão por SDS-PAGE. Se esta forma de realizar o teste se mostrar válida, podemos utilizar a mesma abordagem com o ensaio baseado em substrato fluorogênico, que foi descartado, anteriormente, devido à interferência do meio de indução na leitura da fluorescência.

Além disso, efetuamos a modelagem computacional da estrutura 3D da PSEH, utilizando o servidor I-TASSER. O modelo de maior confiabilidade obtido apresentou C-score de 0,54, TM-score de  $0,79 \pm 0,09$ , RMSD de  $5,2 \pm 3,3 \text{ \AA}$  e sua estrutura continha 40% de hélices  $\alpha$  e 12% de folhas  $\beta$ .

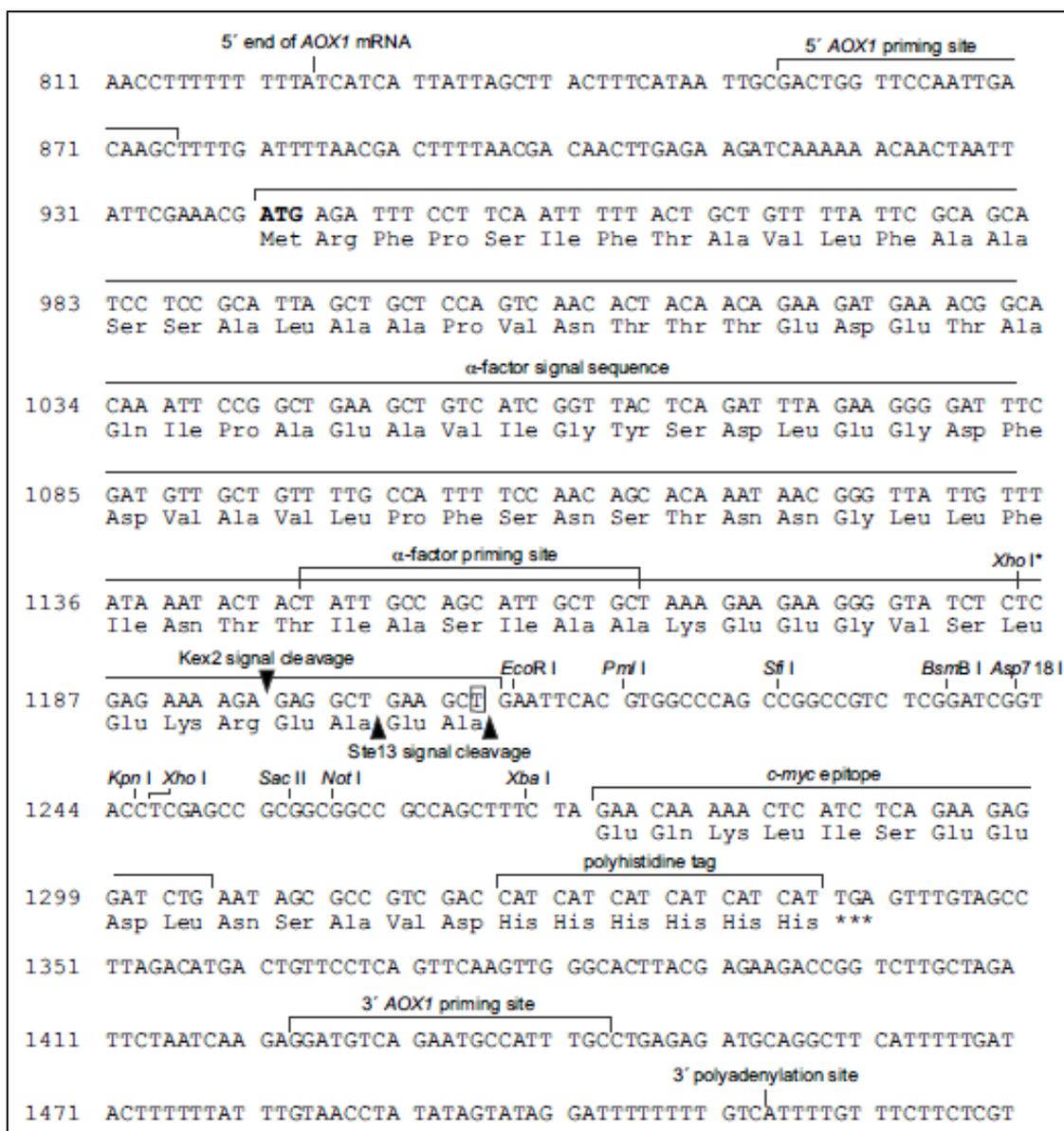
A construção do modelo tridimensional também para a enzima contendo o fator  $\alpha$  e a cauda de histidina revelou que os resíduos adicionados ao N- e ao C-

terminal localizam-se em uma região externa, e, portanto, não devem interferir na atividade enzimática.

A partir do alinhamento da sequência da PSEH com as sequências das proteínas utilizadas como molde pelo servidor e, considerando que, a distância entre os resíduos do sítio ativo de EHs são praticamente constantes na estrutura primária, além de levar em conta a posição e a distância entre os resíduos também na estrutura tridimensional, determinamos que os resíduos Tyr319, Asp209, Asp352 e His383, devem fazer parte do sítio ativo da PSEH.

Para determinar os possíveis substratos aceitos pela PSEH, comparamos seu sítio ativo ao de outras EHs descritas na literatura e, determinamos sua estrutura quaternária com a utilização do servidor QuatIdent. Tendo em vista que a PSEH deve se apresentar na forma de um homodímero com sítio ativo similar ao das EHs de *P. aeruginosa*, *A. radiobacter* e *A. niger*, nossa hipótese é que esta enzima deva hidrolisar epóxidos pouco volumosos e aromáticos com algum nível de enantiosseletividade.

## 6. Anexos



Anexo 1. Sítio múltiplo de clonagem do pPICZ $\alpha$  A (disponível em [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ppiczaa\\_mcs.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ppiczaa_mcs.pdf)).

```

                    5' end of AOX1 mRNA
                    |
811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA
                    |
                    5' AOX1 priming site
                    |
871 CAAGCTTTTGG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT
                    |
                    Sfu I      EcoR I      Pml I      Sfi I      BsmB I Asp718 I Kpn I Xho I
931 ATTCGAAACG AGGAATTCAC GTGGCCAGC CGGCCGTCTC GGATCGGTAC CTCGAGCCGC
                    |
                    Sac II Not I      Xba I      myc epitope
991 GGC GGCCGCC AGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG
                    |
                    Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
                    |
                    Polyhistidine tag
1040 AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC TTAGACATGA
                    |
                    Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
1096 CTGTTCCCTCA GTTCAAGTTG GGC ACTTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA TTCTAATCAA
                    |
                    3' AOX1 priming site
1156 GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATT TTTT GAT ACTTTT TTTAT
                    |
                    3' polyadenylation site
1216 TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTC

```

Anexo 2. Sítio múltiplo de clonagem do pPICZ B (disponível em [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ppiczb\\_mcs.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ppiczb_mcs.pdf)).

### Anexo 3. Lista de Abreviaturas dos Aminoácidos

<u>Nome</u>	<u>Abreviação</u>	<u>Símbolo</u>
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V