



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em  
**BIOTECNOLOGIA**  
mestrado & doutorado

CLEO RODRIGO BRESSAN

**Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum***

Florianópolis, 2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



CLEO RODRIGO BRESSAN

**Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina  
para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA / UFSC)  
Profª. Drª. Rozangela Curi Pedrosa (BQA / UFSC)

Florianópolis, 2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

BRESSAN, Cleo Rodrigo

Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum* / Cleo Rodrigo Bressan – Florianópolis: UFSC / Centro de Ciências Biológicas, 2007. x, 68fl.: il.

Orientadores: Luismar Marques Porto, Rozangela Curi Pedrosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.

1.Ciências Naturais. 2.Biologia. 3.Biologia molecular. 4.Biopolímeros.

Este estudo é parte integrante dos trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido através de uma parceria entre o Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal de Santa Catarina.

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial:

Ao professor Luismar Marques Porto e à professora Rozangela Curi Pedrosa, pela orientação e confiança depositada.

À professora Regina Vasconcellos Antônio, pela sua importante participação na viabilização deste trabalho.

À Capes, pela concessão de uma bolsa durante a realização deste trabalho.

À minha família e a todos os amigos e colegas, que de uma forma ou outra nos auxiliam e nos dão estímulo para perseguir os objetivos.

À Vanessa, pela paciência, compreensão e apoio em todos os momentos.

## Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxicanoato sintase de *Chromobacterium violaceum*

Autor: Cleo Rodrigo Bressan

Orientadores: Luismar Marques Porto; Rozangela Curi Pedrosa

### Resumo

Visando ao desenvolvimento de um sistema heterólogo para produção de polihidroxicanoatos (PHA) em *Escherichia coli*, clonou-se o gene da enzima PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* (*phaC<sub>Cv</sub>*) no plasmídeo pBHR69, o qual continha previamente os genes para as enzimas  $\beta$ -cetotiolase (*phbA*) e acetoacetyl-CoA redutase (*phbB*) do operon de *Cupriavidus necator*, ambas necessárias, juntamente com a PHA sintase, para a biossíntese de PHA em *E. coli*. Para verificação da produção de polímero em *E. coli* foram transformadas com o plasmídeo obtido (pRLC2) as linhagens JM101 e DH5 $\alpha$ . Em cultivos não otimizados utilizando glicose como substrato obteve-se 1,15 e 1,52 g·l<sup>-1</sup> de biomassa com rendimento de 29,6 e 42,6 % de PHA do tipo poli(3-hidroxi-butirato) nas linhagens JM101 e DH5 $\alpha$ , respectivamente. Estes resultados evidenciaram que a PHA sintase de *C. violaceum* apresenta atividade aparentemente normal em *E. coli*, diferentemente do que sugeriram estudos anteriores, permitindo, portanto, a sua utilização para produção heteróloga de PHA nesta bactéria. O modelo estrutural teórico obtido para a enzima *PhaC<sub>Cv</sub>* apresentou uma tríade catalítica similar à observada em lipases e outras enzimas da família  $\alpha/\beta$ -hidrolase, sugerindo que o resíduo de aspartato pertencente à tríade possa também estar associado à estabilização da ligação enzima-substrato. Assim como nas lipases, observou-se também no modelo a ocorrência de uma região possivelmente relacionada à ativação interfacial da enzima junto à superfície hidrofóbica do grânulo de PHA. As estruturas terciárias obtidas na modelagem estrutural sugerem a necessidade de reavaliação dos modelos mecanísticos de síntese atualmente propostos, uma vez que os mesmos pressupõem que o resíduo de aspartato não participaria da estabilização da ligação enzima-substrato, possuindo unicamente a função de ativação do radical hidroxila durante a biossíntese do polímero.

**Palavras-chave:** *Chromobacterium violaceum*, clonagem gênica da polihidroxicanoato sintase, modelagem por homologia da *phaC*.

**Gene cloning, heterologous expression and proposition of a theoretical structural model to *Chromobacterium violaceum* polyhydroxyalkanoate synthase**

Author: Cleo Rodrigo Bressan

Advisors: Luismar Marques Porto; Rozangela Curi Pedrosa

**Abstract**

In this work, the polyhydroxyalkanoate synthase gene (*phaC*) from *Chromobacterium violaceum* was cloned aiming the development of a heterologous system to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) in *Escherichia coli*. The *phaC<sub>Cv</sub>* gene was isolated by PCR using *Chromobacterium violaceum* genomic DNA as template and cloned in pBHR69 plasmid, previously containing  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase genes from *Cupriavidus necator*, both necessary, together with PHA synthase, to PHA biosynthesis in *E. coli*. In order to verify the polymer production in *E. coli*, JM101 and DH5 $\alpha$  strains were transformed with obtained plasmid (pRLC2). Non-optimized cultures using glucose as substrate produced 1.15 and 1.52 g·L<sup>-1</sup> of biomass with 29.6 and 42.6% of poly(3-hydroxybutyrate) in JM101 and DH5 $\alpha$ , respectively. These results show that *C. violaceum* PHA synthase apparently have normal activity in *E. coli*, differently from that has been suggested by previous publications, allowing its utilization to heterologous production of PHA with this bacterium. The structural model constructed for PhaC<sub>Cv</sub> showed a catalytic triad similar to that found in lipases and other enzymes belonged to the  $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily, indicating that the catalytic aspartate of the triad may be involved in the stabilization of the enzyme-substrate bond. Such as in lipases, we found in the structural model a region probably related to interfacial activation of the enzyme together the hydrophobic PHA granule surface. The tertiary structures found in structural modeling suggest revision necessity in the mechanistic models previously reported in the literature for the PHA biosynthesis, since according to these models the catalytic aspartate residue does not participate in the enzyme-substrate bond stabilization.

**Keywords:** *Chromobacterium violaceum*, Polyhydroxyalkanoate synthase gene cloning, Homology modeling of *phaC*.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Polihidroxialcanoatos (PHA) – plásticos biodegradáveis .....	1
1.2 Diversidade estrutural dos PHA.....	3
1.3 Biologia e metabolismo dos PHA.....	8
1.3.1 Mecanismos de biossíntese de PHA.....	8
1.3.2 Estrutura dos grânulos de PHA e proteínas associadas .....	14
1.4 Produção bacteriana de PHA .....	17
1.4.1 Bioprocessos empregando linhagens nativas produtoras de PHA .....	17
1.4.2 Bioprocessos empregando <i>Escherichia coli</i> recombinante para produção de PHA.....	18
1.5 <i>C. violaceum</i> como organismo modelo.....	20
1.6 Objetivos.....	22
1.6.1 Objetivos gerais.....	22
1.6.2 Objetivos específicos.....	22
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>23</b>
MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos .....	23
2.2 Meios de cultura.....	23
2.3 Extração e purificação dos ácidos nucleicos.....	24
2.4 Eletroforese em gel de agarose .....	25
2.5 Desenho dos iniciadores .....	25
2.6 Amplificação do gene <i>phaC<sub>Cv</sub></i> .....	26
2.7 Tratamento com endonucleases de restrição – <i>Bam</i> HI e <i>Xba</i> I.....	27
2.8 Ligaçãõ com DNA ligase T4 .....	28
2.9 Preparo das células competentes e transformação .....	28
2.10 Produção de PHA.....	29
2.11 Análise dos polímeros obtidos: cromatografia gasosa .....	30
2.12 Análise da seqüência e modelagem estrutural da PHA sintase de <i>C. violaceum</i> .....	31
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>32</b>
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1 Isolamento e clonagem do gene <i>phaC<sub>Cv</sub></i> e produção heteróloga de PHA em <i>E. coli</i> .....	33
3.1.1 Análise da seqüência do gene.....	33
3.1.2 Amplificação e clonagem do gene <i>phaC</i> de <i>C. violaceum</i> para produção heteróloga de PHA em <i>E. coli</i> .....	36
3.1.3 Produção heteróloga de PHA em <i>E. coli</i> .....	41
3.2 Análise da seqüência e modelagem estrutural da PHA sintase de <i>C. violaceum</i> .....	44
3.2.1 Análise da seqüência .....	44
3.2.2 Predição da estrutura secundária .....	45
3.2.3 Seleção dos moldes .....	47
3.2.4 Alinhamento e modelagem.....	49
3.2.5 Avaliação do modelo.....	52
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>55</b>
CONCLUSÕES .....	56
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>57</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58



## Lista de Figuras

Figura 1: Fórmula geral e estrutura genérica de alguns tipos de PHA (OJUMU <i>et al.</i> , 2004).....	4
Figura 2: Representação esquemática de PHA de cadeia curta (PHA <sub>scf</sub> ) e média (PHA <sub>mcl</sub> ) (REHM, 2003). .....	4
Figura 3: Alguns exemplos de monômeros que evidenciam a diversidade estrutural dos PHA (adaptado de REHM, 2003).....	6
Figura 4: Ilustração esquemática da biossíntese de PHB em <i>Cupriavidus necator</i> . São destacadas as enzimas envolvidas e a organização dos respectivos genes no operon. A letra “P” indica a localização do promotor do operon (adaptado de Madison e Huisman, 1999).....	9
Figura 5: Representação esquemática da estrutura de um grânulo da PHA e proteínas associadas (adaptado de REHM, 2003).....	15
Figura 6: Grânulos de PHA em células de <i>Cupriavidus necator</i> . (A) organismo com expressão aumentada de PhaP e (B) sem expressão de PhaP (STUBBE <i>et al.</i> , 2005).....	16
Figura 7: Seqüência genômica da região do início do gene <i>phaC</i> de <i>Chromobacterium violaceum</i> . Os códons grifados em vermelho correspondem aos possíveis códons de início do gene, antecidos pelos respectivos sítios de ligação ao ribossomo (verde). A seqüência de aminoácidos apresentada em vermelho corresponde à seqüência adicional proposta neste trabalho. As regiões grifadas em azul correspondem a uma possível região promotora encontrada. A seqüência sublinhada em verde representa o iniciador CCVF2 utilizado para amplificação do gene. ....	35
Figura 8: Representação gráfica da região de ligação inserto-vetor no plasmídeo pRLC2. Os códons grifados em vermelho correspondem aos possíveis códons de início do gene, antecidos pelos respectivos sítios de ligação ao ribossomo (verde). A seqüência de aminoácidos apresentada em vermelho corresponde à seqüência adicional proposta neste trabalho. A seqüência grifada em roxo representa o iniciador CCVF2 destacando em alaranjado o códon de parada para a tradução da β-galactosidase (alaranjado).....	37
Figura 9: Ilustração esquemática do procedimento experimental adotado para clonagem do gene <i>phaC</i> de <i>Chromobacterium violaceum</i> e obtenção da <i>Escherichia coli</i> recombinante. ....	39
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose. 1) Plasmídeo pRLC2 digerido com <i>Bam</i> HI. 2) Plasmídeo pRLC2 digerido com <i>Bam</i> HI e parcialmente com <i>Xba</i> I. A seta indica o fragmento clonado removido do plasmídeo pela dupla digestão. 3) Plasmídeo pBHR69. 4) Gene <i>phaC<sub>Cv</sub></i> amplificado a partir do plasmídeo pRLC2. 5) Gene <i>phaC<sub>Cv</sub></i> amplificado a partir do DNA genômico de <i>Chromobacterium violaceum</i> . PM = marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).....	40
Figura 11: Linha de tendência para quantificação do PHB nas amostras. O valor R <sup>2</sup> próximo de 1 demonstra uma boa correlação entre as duas variáveis. A equação apresentada foi utilizada para quantificação, sendo “y” a massa de PHB e “x” a área do pico obtido na CG. ....	41

Figura 12: Cromatograma de duas amostras analisadas. (A) Amostra positiva para a presença de PBH, indicado pela seta vermelha (DH5 $\alpha$ com plasmídeo pRLC2 e sem adição de IPTG); (B) Amostra negativa para PBH (controle negativo). A seta verde indica o padrão interno de referência. ....	42
Figura 13: Cultivo de <i>Escherichia. coli</i> DH5 $\alpha$ recombinante carreando os plasmídeos pRLC2 e pBHR69 em meio LB. Como substrato para a síntese de PHA foi utilizado glicose a 2% e para visualização do polímero em UV utilizou-se Vermelho do Nilo na concentração de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .....	43
Figura 14: Predição da estrutura secundária para a enzima PhaC <sub>Cv</sub> a partir de diferentes programas de predição. As áreas em azul (letra “H”) representam alfa-hélices e as áreas em vermelho (letra “E”) representam folhas-beta. A seqüência de aminoácidos em vermelho representa corresponde ao fragmento adicional proposto neste trabalho.....	46
Figura 15: Sobreposição dos modelos cristalográficos das lipases gástricas canina (1k8qA) e humana (1hlgA) demonstrando a grande similaridade estrutural entre as duas proteínas.....	48
Figura 16: Alinhamento <i>threading</i> entre a PHA sintase de <i>Chromobacterium violaceum</i> e as lipases gástricas canina (1k8qA) e humana (1hlgA). As setas vermelhas indicam os resíduos da tríade catalítica alinhados. Cores iguais indicam aminoácidos funcionalmente parecidos.....	50
Figura 17: a) Estrutura teórica obtida para a PHA sintase de <i>Chromobacterium violaceum</i> . b) Gráfico da entropia (Hx) e bitmap (1pixel / resíduo) do alinhamento PSI-BLAST para a PhaC <sub>Cv</sub> . A barra horizontal amarela corresponde à região modelada, a barra vermelha corresponde à região que controla a abertura/fechamento do sítio catalítico (“lid”) no modelo obtido. As barras em azul correspondem a regiões mais conservadas na região do “lid”, destacadas em amarelo mais claro nos modelos acima (a).....	51
Figura 18: Tríade catalítica observada nos modelos obtidos para a PhaC de <i>Chromobacterium violaceum</i> . ....	52
Figura 19: Gráficos de Ramachandran para os moldes utilizados e modelos gerados.....	54
Figura 20: Gráfico de Ramachandran para os resíduos de glicina e prolina para os moldes utilizados e modelos gerados. ....	55

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades físicas de alguns tipos de PHA e do polipropileno.....	7
Tabela 2: Classes de PHA sintases e características que as diferenciam. ....	12
Tabela 3: Relação de linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.....	23
Tabela 4: Alinhamento das seqüências promotoras -10 e -35 descritas neste trabalho para o gene <i>phaC</i> de <i>Chromobacterium violaceum</i> com as seqüências descritas na literatura para promotores de genes procarióticos. Para cada base é informado o percentual de promotores em que ela encontra-se conservada, segundo Lewin (2004). ....	36
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e outras características dos iniciadores utilizados (FASTPCR).....	38
Tabela 6: Resultados observados quanto ao acúmulo de polímero nas linhagens transformadas. ....	42
Tabela 7: Valores de identidade e similaridade obtidos em alinhamento CLUSTALW entre as seqüências das lipases 1k8q e 1hlg com a PHA sintase de <i>Chromobacterium violaceum</i> (matriz PAM120). ....	47
Tabela 8: Valores de identidade e similaridade obtidos em alinhamento 3D-PSSM entre as seqüências das lipases 1k8q e 1hlg com a PHA sintase de <i>Chromobacterium violaceum</i> usando método de compatibilidade seqüência-estrutura (Matriz PAM 120). ....	49

## Lista de Abreviações

HA: hidroxialcanoato

LB: Lúria-Bertani

MCS: massa celular seca

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PHA: polihidroxialcanoato

PHA<sub>scf</sub>: polihidroxialcanoato de cadeia curta

PHA<sub>mcl</sub>: polihidroxialcanoato de cadeia média

PHB: mesmo que P(3HB)

PHBV: mesmo que P(3HB-*co*-3HV)

P(3HB): poli(3-hidroxiacetato)

P(3HB-*co*-3HHx): poli(3-hidroxiacetato-*co*-3-hidroxiacetato)

P(3HB-*co*-3HV): poli(3-hidroxiacetato-*co*-3-hidroxiacetato)

P(3HB-*co*-4HB): poli(3-hidroxiacetato-*co*-4-hidroxiacetato)

P(3HO-*co*-3HH): poli(3-hidroxiacetato-*co*-3-hidroxiacetato)

3-HB: 3-hidroxiacetato

3-HV: 3-hidroxiacetato

4-HB: 4-hidroxiacetato

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Polihidroxicanoatos (PHA) – plásticos biodegradáveis

O avançado desenvolvimento que observamos na indústria petroquímica ao longo dos anos tem nos beneficiado, dentre outras coisas importantes, com um número incontável de materiais poliméricos com propriedades bastante variadas e aplicabilidade nas mais distintas áreas. Entretanto, apesar da sua destacada relevância como matéria-prima, os polímeros de origem petroquímica apresentam, de uma forma genérica, uma grande limitação no que se refere ao seu descarte no meio ambiente. Em função da sua difícil degradação, associada a um contínuo aumento no consumo destes materiais, observa-se um acúmulo crescente destes produtos nos mais diferentes ecossistemas, tornando-se um problema ecológico de difícil solução.

Neste contexto, o desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis com características semelhantes aos polímeros de origem petroquímica tem sido apontado como uma das estratégias potencialmente viáveis para a minimização destes impactos (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; GROSS; KALRA, 2002). Dentre os diferentes biopolímeros atualmente em estudo para esta finalidade destacam-se os poliésteres de origem bacteriana denominados polihidroxicanoatos (PHA). Estes polímeros têm despertado grande atenção e têm sido alvo de intensas pesquisas devido ao seu alto grau de similaridade física com os plásticos convencionais, como o polipropileno, polietileno e outros. Grandes esforços vêm sendo feitos em relação à viabilização e ampliação das aplicações dos PHA como

substituintes dos plásticos de origem petroquímica (BRANDL *et al.*, 1990; MADISON; HUISMAN, 1999; REDDY *et al.*, 2003).

Do ponto de vista ecológico é também importante salientar o fato de serem obtidos a partir de fontes renováveis de carbono, permitindo a concepção de projetos de produção sustentáveis e contribuindo para a remoção do CO<sub>2</sub> atmosférico. Além disso, o consumo de energia e principalmente as emissões de CO<sub>2</sub> ocorridas durante o processo produtivo de PHA utilizando sistemas bacterianos são marcadamente menores que os observados para a produção dos polímeros convencionais de origem petroquímica, como o polietileno e o polipropileno (AKIYAMA; TSUGE; DOI, 2003).

As principais aplicações propostas inicialmente para estes polímeros consistiam na sua utilização como alternativa ecológica ao uso de polímeros petroquímicos para fabricação de diversos produtos descartáveis, como embalagens de cosméticos, produtos de higiene, filmes diversos, fios, tecidos descartáveis e outros (BRANDL *et al.*, 1990; MADISON; HUISMAN, 1999; SQUIO; ARAGÃO, 2004). Além destas aplicações visando à substituição de polímeros convencionais, os PHA têm demonstrado uma larga aplicabilidade também na área médica por tratarem-se de polímeros termoplásticos totalmente biocompatíveis e não tóxicos, podendo ser facilmente absorvidos e metabolizados pelo organismo. Aplicações têm sido propostas e testadas principalmente como matéria-prima para fabricação de dispositivos utilizados em intervenções cirúrgicas e outros procedimentos, incluindo próteses ósseas, *scaffolds* e substratos para o desenvolvimento celular *in vitro* e *in vivo*, materiais para reconstituição de vasos sanguíneos, fios de sutura e inúmeros outros dispositivos (CHEN; WU, 2005; REDDY *et al.*, 2003).

Além disso, estes polímeros podem atuar ainda como carreadores biodegradáveis para liberação gradual de diversos medicamentos, hormônios, inseticidas, herbicidas e outros. A utilização de PHA para liberação gradual de fármacos como antibióticos, por exemplo, é

particularmente útil no controle de infecções e da formação de biofilmes bacterianos que podem ocorrer em implantes de próteses. Nestes casos, podem inclusive ser utilizados como um revestimento biodegradável da prótese impedindo o estabelecimento de infecções e a formação de biofilmes durante a regeneração dos tecidos e a fixação da prótese. Os PHA possuem várias características que o tornam um material superior para este fim quando comparado aos demais materiais atualmente utilizados. A taxa de liberação de antibióticos, por exemplo, pode ser parcialmente controlada através da manipulação da composição monomérica do polímero (REDDY *et al.*, 2003; ROSSI; AZGHANI; OMRI, 2004).

Alguns monômeros apresentam ainda um potencial terapêutico. Dentre todos, o monômero que se destaca para estas aplicações é o 4-hidroxiбутирато encontrado em alguns copolímeros e também conhecido como  $\gamma$ -hidroxiбутирато (GHB) (SUDESH; ABE; DOI, 2000). O 4-HB é utilizado como agente anestésico intravenoso na Europa e Japão, como auxiliar no tratamento da narcolepsia e, mais recentemente, também sugerido para o tratamento de síndromes de abstinência de álcool após a descoberta de que o 4-HB aumenta os níveis cerebrais de dopamina. A obtenção do copolímero P(3HB-*co*-4HB), portanto, pode ser muito útil para o isolamento do monômero ou desenvolvimento de dispositivos de liberação gradual de 4-HB no organismo.

## 1.2 Diversidade estrutural dos PHA

Os polihidroxiálcanoatos (PHA) constituem um grupo diversificado de poliésteres. São polímeros lineares constituídos de unidades monoméricas de hidroxiálcanoatos ligadas entre si através de ligações ésteres entre a hidroxila de um monômero, geralmente ligada ao carbono 3, com o grupo carboxílico na posição 1 do monômero seguinte (Figura 1) (ANDERSON; DAWES, 1990; OJUMU; YU; SOLOMON, 2004). Apresentam

características físicas que variam de polímeros termoplásticos a elastômeros em função do comprimento das cadeias laterais, posição da ligação éster e peso molecular médio dos polímeros (MADISON; HUISMAN, 1999; STUBBE *et al.*, 2005; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

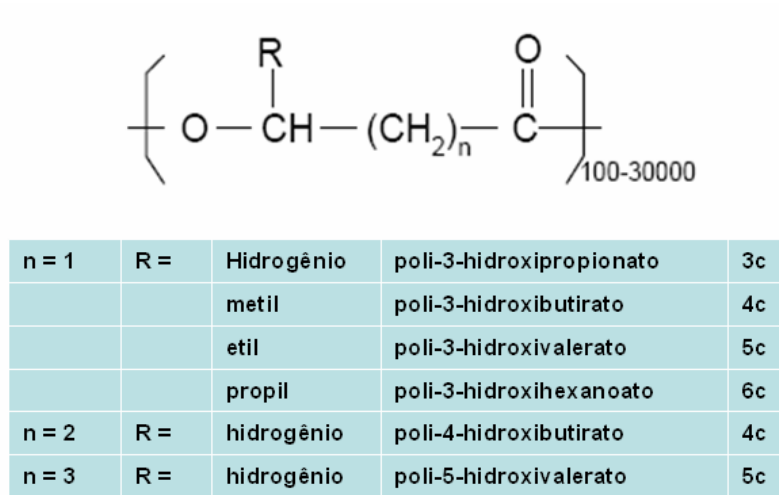


Figura 1: Fórmula geral e estrutura genérica de alguns tipos de PHA (OJUMU *et al.*, 2004).

De uma forma geral, a grande maioria dos polímeros naturais descritos pode ser classificada em dois grupos: PHA formados por monômeros de cadeia curta, com 3 a 5 carbonos (PHA<sub>scl</sub> - PHA *short chain length*), e PHA formados por monômeros de cadeia média, com 6 a 16 carbonos (PHA<sub>mcl</sub> - PHA *medium chain length*) (MADISON; HUISMAN, 1999) (Figura 2).

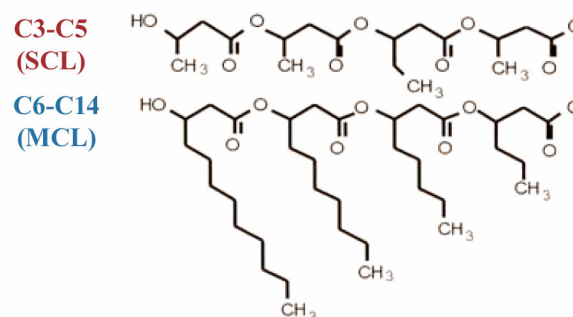


Figura 2: Representação esquemática de PHA de cadeia curta (PHA<sub>scl</sub>) e média (PHA<sub>mcl</sub>) (REHM, 2003).



Uma grande diversidade de monômeros de hidroxialcanoatos já foi identificada na composição de cadeias de PHA (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995) (Figura 3). Até 2003, mais de 150 diferentes tipos de ácidos hidroxialcanóicos já haviam sido descritos como constituintes de PHA, demonstrando o amplo potencial apresentado por estes polímeros para utilização na obtenção de novos materiais (REHM, 2003). A melhoria e diversificação das características físicas destes polímeros para a ampliação e aprimoramento das aplicações dos PHA implicam, portanto, em uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na sua biossíntese, de modo a permitir um controle mais preciso de sua composição monomérica e peso molecular médio das cadeias formadas. Dois fatores são fundamentais para a determinação da composição do polímero: (1) estrutura molecular do substrato disponível para a bactéria, o que irá determinar o tamanho dos monômeros disponíveis para a síntese, e (2) sistema enzimático da célula, em especial em relação à especificidade da PHA sintase presente no organismo, considerada a principal enzima no controle da biossíntese dos PHA, definindo o tipo de monômero preferencialmente incorporado na cadeia (MADISON; HUISMAN, 1999; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

O PHA mais abundante na natureza e produzido comercialmente em maior escala é o poli(3-hidroxiбутирато), também denominado simplesmente P(3HB) ou PHB. É formado de unidades monoméricas de 3-hidroxiбутирато (4 carbonos) e é um dos polímeros obtidos com maior facilidade nos sistemas de produção. O PHB caracteriza-se por ser um polímero termoplástico altamente cristalino (55 – 80% de cristalinidade) que apresenta características físicas semelhantes às do polipropileno. Apresenta-se como produto relativamente quebradiço e pouco maleável, característica esta ainda não completamente compreendida e alvo de muitos estudos que visam à modificação destas características nos polímeros para ampliação das suas aplicações (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

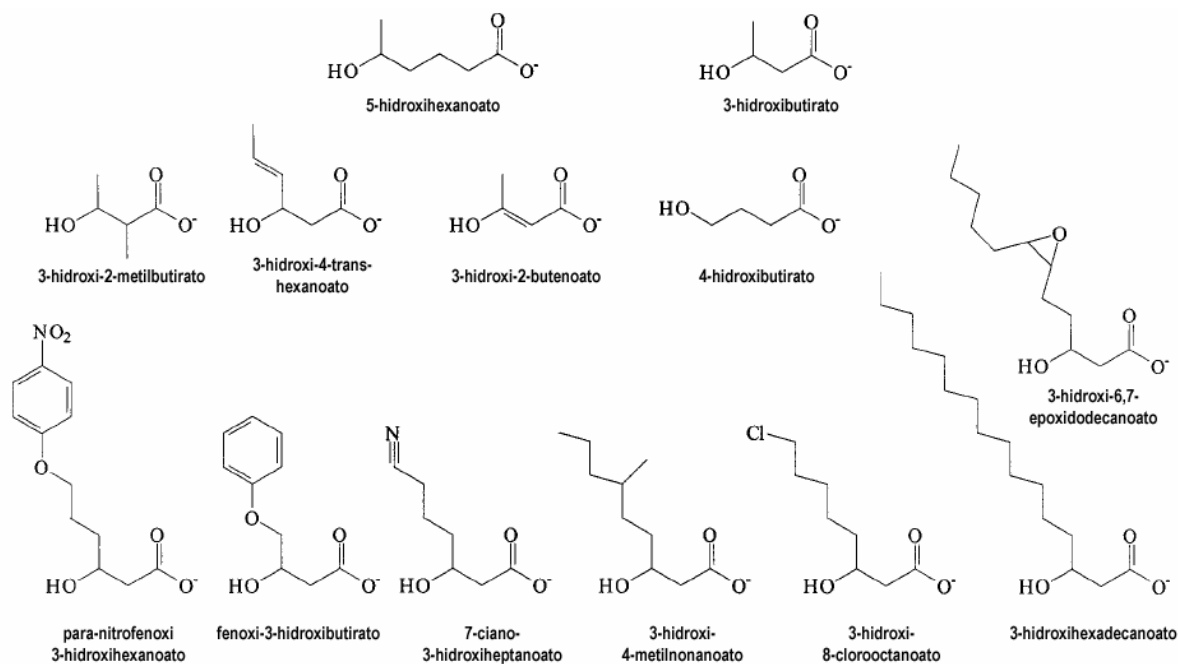


Figura 3: Alguns exemplos de monômeros que evidenciam a diversidade estrutural dos PHA (adaptado de REHM, 2003).

As limitações apresentadas pelo PHB em relação à sua fragilidade e elasticidade reduzida podem ser contornadas pela incorporação no polímero de monômeros com cadeia lateral maior. Estes monômeros contribuem para o aumento da flexibilidade e redução do ponto de fusão e dos níveis de cristalinidade, conferindo a estes polímeros características mais atrativas para a indústria que aquelas observadas para o PHB (MADISON; HUISMAN, 1999) (Tabela 1). De uma forma geral, os PHA variam em função do comprimento de suas cadeias laterais de polímeros termoplásticos (PHA<sub>scl</sub>) a elastômeros (PHA<sub>mcl</sub>) (STUBBE *et al.*, 2005).

Um copolímero também bastante conhecido é o poli(3-hidroxi-3-butenato-*co*-3-hidroxi-valerato) ou P(3HB-*co*-3HV), produzido por diversos microrganismos produtores de PHA<sub>scl</sub> a partir de substrato adequado. Apresenta maior elasticidade e maleabilidade que o P(3HB). Classicamente, a produção deste copolímero ocorre quando há a presença de ácido propiônico no meio de cultura, o metabólito propionil-CoA produzido é convertido em monômeros 3HV pela atividade da β-cetotiolase que o condensa ao acetil-CoA

(ANDERSON; DAWES, 1990; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992). A fração de monômeros 3HV incorporada é definida em função da concentração de ácido propiônico no meio de cultura e, também, pela especificidade da PHA sintase. Entretanto, devido à toxicidade do ácido propiônico e ao baixo índice de conversão do ácido propiônico a 3-HV, a produção de polímeros contendo frações elevadas deste monômero na cadeia polimérica é ainda limitada.

Tabela 1: Propriedades físicas de alguns tipos de PHA e do polipropileno.

	Tipos de polímeros				Polipropileno
	P(3HB)	P(3HB-3HV) 20% 3HV	P(3HB-4HB) 16% 4HB	P(3HO-3HHx) 11% 3HH	
<b>Temperatura de fusão (°C)</b>	177	145	150	61	176
<b>Temperatura de transição vítrea (°C)</b>	2	-1	-7	-36	-10
<b>Cristalinidade (%)</b>	70	56	45	30	60
<b>Alongamento (%)</b>	5	50	444	300	400

Fonte: Adaptado de Madison e Huisman (1999)

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria que possui uma aptidão naturalmente grande à biossíntese de PHA contendo 3-HV, sendo inclusive capaz de sintetizar o homopolímero poli(3-hidroxivalerato) (P(3HV)) quando cultivada em meio contendo unicamente ácido valérico como fonte de carbono (STEINBÜCHEL *et al.*, 1993). Uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese de PHA em *C. violaceum*, bem como o conhecimento de aspectos estruturais das enzimas envolvidas, especialmente da enzima PHA sintase, podem revelar dados importantes para a otimização e a manipulação do processo de biossíntese de polímeros contendo 3HV e outros monômeros de maior peso molecular (KOLIBACHUK; MILLER; DENNIS, 1999; PIEMOLINI, 2004).

### 1.3 Biologia e metabolismo dos PHA

Os polihidroxicanoatos são poliésteres produzidos como substância de reserva energética e de carbono por diversos procaríotos, já tendo sido observada a sua ocorrência em pelo menos 75 gêneros de bactérias gram-positivas e gram-negativas e algumas espécies de arqueas pertencentes à Família Halobacteriaceae (REDDY *et al.*, 2003; REHM, 2003). Nas células, são depositados intracelularmente sob a forma de grânulos citoplasmáticos hidrofóbicos, com cerca de 0,2 a 0,5 µm de diâmetro, sendo geralmente sintetizados, nas linhagens selvagens, em situações onde há limitação de algum elemento essencial ao crescimento microbiano (como nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio ou magnésio) e excesso de carbono disponível. A quantidade acumulada, em alguns casos, chega a ultrapassar 90% do peso seco da célula (MADISON; HUISMAN, 1999; STEINBÜCHEL *et al.*, 1998; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

#### 1.3.1 Mecanismos de biossíntese de PHA

Os mecanismos envolvidos na biossíntese de PHA foram amplamente investigados especialmente em *Cupriavidus necator* (anteriormente *Ralstonia eutropha*), onde as rotas metabólicas e as respectivas enzimas e genes envolvidos na sua biossíntese já foram bem caracterizados e definidos, sendo considerado hoje o organismo modelo para o estudo do metabolismo do PHB e outros polímeros de cadeia curta.

O processo de síntese de PHB a partir da acetil-CoA em *C. necator* envolve uma seqüência de três reações catalisadas, respectivamente, pelas enzimas β-cetotiolase (PhbA)<sup>1</sup>,

---

<sup>1</sup> As siglas “*pha*” e “*phb*” são ambas usadas para referir-se a genes e enzimas relacionadas ao metabolismo de PHA. De um modo geral, para os genes de *C. necator* é utilizada a sigla “*phb*” por pensar-se inicialmente que estes genes estavam relacionados à síntese exclusivamente de PHB. No entanto se sabe hoje que mesmo PHA sintases do tipo I, incluindo a de *C. necator* podem produzir polímeros contendo outros monômeros além de HB.

acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente (PhbB) e PHA sintase (PhbC), enzimas cujos genes encontram-se, em muitas espécies, agrupados no genoma sob a forma de um operon. A reação de síntese encontra-se esquematizada na Figura 4. Entretanto, apesar das seqüências das enzimas serem razoavelmente conservadas entre as espécies, o número de enzimas envolvidas na síntese e a disposição dos respectivos genes nos operons diferem significativamente (MADISON; HUISMAN, 1999; REHM; STEINBÜCHEL, 1999). Em *C. violaceum*, os genes *phaC* (PHA sintase) e *phaA* ( $\beta$ -cetotiolase) encontram-se sob a forma de um operon, enquanto que o gene *phaB* (acetoacetil-CoA redutase) ocorre isoladamente no genoma.

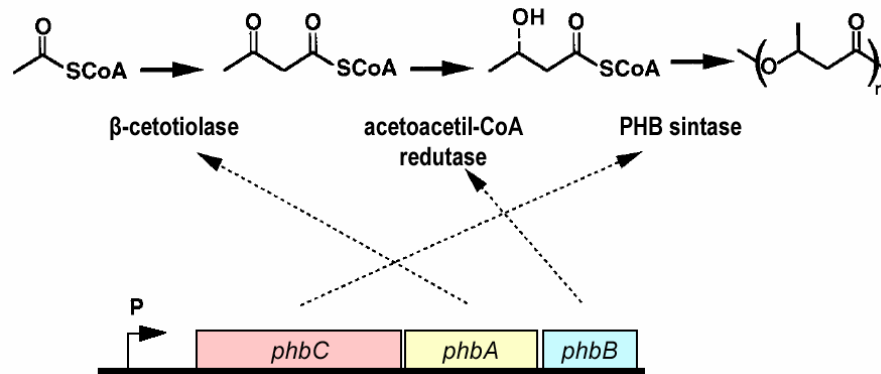


Figura 4: Ilustração esquemática da biossíntese de PHB em *Cupriavidus necator*. São destacadas as enzimas envolvidas e a organização dos respectivos genes no operon. A letra “P” indica a localização do promotor do operon (adaptado de Madison e Huisman, 1999).

A reações de condensação de uma acetil-CoA com um propionil-CoA, formando 3-cetovaleril-CoA, e de redução do 3-cetovaleril-CoA a 3-hidroxicetovaleril-CoA, são também catalisadas por  $\beta$ -cetotiolases e acetoacetil-CoA redutases, respectivamente (STEINBÜCHEL; LUTKE-EVERSLOH, 2003). Em *C. necator*, no entanto, a reação de formação do 3-cetovaleril-CoA é preferencialmente realizada pela enzima  $\beta$ -cetotiolase BktB, ao passo que a  $\beta$ -cetotiolase PhbA encontrada no operon possui atividade quase que totalmente restrita à

---

Assim, atualmente a sigla empregada na descrição de novos genes, independentemente do tipo de PHA sintase, é “*pha*”.

formação de 3-acetoacetyl-CoA, a qual por atividade da acetoacetyl-CoA redutase dependente de NADPH resulta na formação de 3-hidroxiacetyl-CoA (SLATER *et al.*, 1998).

### 1.3.1.1 PHA sintases

Diferentes enzimas participam do processo de biossíntese do polímero. Entretanto, a enzima PHA sintase, responsável pela polimerização dos monômeros de ácidos hidroxiácidos em PHA, é considerada uma enzima-chave no processo, determinando em muitos casos a velocidade de síntese bem como a composição do polímero formado (REHM, 2003; STEINBÜCHEL; LUTKE-EVERSLOH, 2003; STUBBE *et al.*, 2005). A enzima catalisa a reação de esterificação entre o grupo carboxílico de uma unidade monomérica ou polímero em formação e o grupo hidroxila da unidade monomérica a ser incorporada. São encontradas tanto na forma solúvel, quando o acúmulo de PHA é ainda reduzido, como associadas aos grânulos de PHA à medida que estes vão se formando (ANDERSON; DAWES, 1990).

A especificidade pelo substrato apresentada pela PHA sintase é um fator determinante da composição monomérica do polímero formado. Os substratos naturais destas enzimas são tioésteres-CoA de ácidos hidroxiácidos com um grupo hidroxila na posição 3, 4, 5 ou 6 na cadeia de carbono, com variado comprimento de cadeia e uma larga variedade de substituintes (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Em *C. necator*, o substrato preferencialmente utilizado pela enzima é o 3HB; no entanto, foi demonstrado que esta enzima possui uma especificidade mais ampla, podendo incorporar inclusive polímeros de cadeia média como 3-hidroxiocetanoato (3HO) e 3-hidroxiodecanoato (3HDD), formando os copolímeros P(3HB-*co*-HO) e P(3HB-*co*-HO-*co*-HDD) (ANTONIO *et al.*, 2000).

Assim, muitos pesquisadores têm centrado suas atenções nesta enzima visando não apenas a obtenção de células mais eficientes para a síntese de PHA, mas também células capazes de sintetizar novos polímeros (ANTONIO; STEINBÜCHEL; REHM, 2000; KICHISE; TAGUCHI; DOI, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2005). Mais de 60 genes de PHA sintases já foram clonados e seqüenciados em eubactérias e muitos outros são revelados nos bancos de dados de seqüências de procariotos através de buscas por homologia (STEINBÜCHEL; LUTKE-EVERSLOH, 2003).

Pelo menos quatro classes diferentes de PHA sintases podem ser identificadas em relação à sua estrutura primária, especificidade pelo substrato e número de subunidades que as compõem (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005; REHM, 2003). As classes I e II consistem de enzimas com apenas um tipo de subunidade, provavelmente ativas sob a forma dimérica e com massa molecular entre 61 kDa e 73 kDa; entretanto, diferem em relação à especificidade pelo substrato. As enzimas da classe I (*C. necator* e *C. violaceum*, por exemplo) estão relacionadas à síntese de PHA<sub>scl</sub>, enquanto que as enzimas da classe II (diversas espécies de *Pseudomonas*) sintetizam polímeros com cadeia lateral média (PHA<sub>mcl</sub>). As classes III e IV estão representadas por enzimas compostas por duas subunidades distintas: PhaC/PhaE na classe III (*Allochromatium vinosum*) e PhaC/PhaR na classe IV (*Bacillus megaterium*), ambas as classes associadas à síntese de PHA<sub>scl</sub> (Tabela 2). Nas classes III e IV, os dímeros PhaC/PhaE e PhaC/PhaR, respectivamente, correspondem a uma subunidade de PhaC das classes I e II, portanto, nas classes III e IV as enzimas organizam-se formando estruturas tetraméricas equivalentes às estruturas diméricas das classes I e II.

O alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos revela a ocorrência de seis blocos bastante conservados e uma variabilidade elevada na porção N-terminal, região esta não essencial para a atividade da enzima (REHM; STEINBÜCHEL, 1999). Oito resíduos conservados foram identificados em todas as PHA sintases analisadas até o momento e o

perfil de hidrofobicidade entre as diferentes classes é similar, indicando que as diferentes PHA sintases devem possuir topologia semelhante (REHM, 2003; STUBBE *et al.*, 2005).

Tabela 2: Classes de PHA sintases e características que as diferenciam.

<b>Classe</b>	<b>Nº. de subunidades</b>	<b>Tipo de polímero</b>	<b>Organismos modelo</b>
I	2 (PhaC)	PHA <sub>scl</sub>	<i>Cupriavidus necator</i>
II	2 (PhaC1 e PhaC2)	PHA <sub>mcl</sub>	<i>Pseudomonas</i> sp.
III	4 (PhaC/PhaE)	PHA <sub>scl</sub>	<i>Allochromatium vinosum</i>
IV	4 (PhaC/PhaR)	PHA <sub>scl</sub>	<i>Bacillus megaterium</i>

Apresentam um domínio  $\alpha/\beta$ -hidrolase e, assim como outras enzimas relacionadas à catálise de ligações éster, possuem o motivo (G-X-[S/C]-X-G) característico de lipases, que consiste de um resíduo nucleófilo (cisteína nas PHA sintases e serina nas lipases) que se liga covalentemente ao polímero em formação. Além desta cisteína, segundo os modelos mecanísticos atualmente propostos para a síntese de PHA, outros dois resíduos de aminoácidos participam no processo de síntese do polímero: uma histidina e um aspartato. Segundo estes modelos, a histidina atua no processo como uma base catalítica envolvida na ativação do grupo tiol da cisteína, através de um ataque nucleofílico, formando uma díade catalítica essencial. Enquanto o aspartato atuaria como uma base catalítica genérica durante o processo de alongamento, ativando a hidroxila do monômero a ser incorporado na cadeia. Estes três resíduos são conservados em todas as PHA sintases conhecidas e formam uma tríade catalítica responsável pela síntese do polímero. Estudos de mutação sítio dirigida demonstraram que os três resíduos são essenciais para a formação de polímeros (AMARA; REHM, 2003; REHM, 2003; STUBBE *et al.*, 2005).

Acredita-se que o resíduo conservado triptofano (W425 em *C. necator*) esteja relacionado à interação proteína-proteína entre as subunidades (REHM *et al.*, 2002). Em



*Allochromatium vinosum*, espécie que possui PHA sintase pertencente à classe III, estudos *in vitro* evidenciaram a ocorrência de PHA sintases, que nesta espécie ocorrem sob a forma de heterodímeros, formando complexos protéicos na superfície dos grânulos. Estas estruturas estariam formadas possivelmente por 12 subunidades de PHA sintase, formando um complexo protéico hexamérico, já que nesta espécie cada unidade de PHA sintase corresponde a um heterodímero (REHM, 2003).

Modelos estruturais teóricos foram obtidos para diferentes PHA sintases utilizando lipases bacterianas e eucarióticas e uma epóxido hidrolase como molde estrutural. Jia (2000) propôs um modelo estrutural para a PHA sintase da classe III de *Chromatium vinosum* a partir de uma lipase procariótica. Usando método similar, obteve-se um modelo estrutural para a PHA sintase de *C. necator* (classe I) também a partir de lipase procariótica (REHM *et al.*, 2002). Modelos para as enzimas da classe II pertencentes a espécies de *Pseudomonas* foram propostos por Niamsiri *et al.* (2004) e Amara e Rehm (2003) a partir de lipase bacteriana e epóxido hidrolase de rato, respectivamente. Piemolini (2004), utilizando uma lipase gástrica humana, propõe modelos para a região do sítio catalítico das PHA sintases de *C. necator*, *C. violaceum* e *Pseudomonas aeruginosa*. Recentemente, foi descrito um modelo estrutural onde se constata a disposição dos três resíduos catalíticos sob a forma de tríade, disposição idêntica àquela observada em lipases, em um modelo gerado para PHA sintase de *Pseudomonas* sp. USM 4–55, também desenvolvido a partir da lipase gástrica humana (WAHAB *et al.*, 2006).

Os mecanismos envolvidos na regulação da síntese de PHA ainda não estão totalmente compreendidos. Em *C. necator*, porém, os níveis de CoA representam um fator chave na regulação da síntese do polímero. Quando presente em quantidade elevada atua inibindo a ação da enzima  $\beta$ -cetotiolase (PhaA), direcionando o acetil-CoA produzido para outras rotas metabólicas como o metabolismo energético. A redução nos níveis de CoA que ocorre em situações restritivas interrompe a inibição sobre a  $\beta$ -cetotiolase e a síntese de PHA

inicia. Sabe-se também que a presença dos grânulos de PHA na célula, por sua vez, resulta na expressão dos genes envolvidos na síntese através de processos de regulação a nível de transcrição (STUBBE *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Estrutura dos grânulos de PHA e proteínas associadas

De natureza hidrofóbica, os grânulos de PHA encontram-se dispersos no citoplasma delimitados por uma camada simples de fosfolipídios e proteínas associadas à síntese e degradação do polímero e à estabilização do grânulo, evitando a sua coalescência com grânulos vizinhos (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005). O PHA *in vivo* possui natureza amorfa e fluída, no entanto, após a sua extração com solventes orgânicos torna-se altamente cristalino (MADISON; HUISMAN, 1999; SUDESH; ABE; DOI, 2000). Em *E. coli* recombinante a localização celular da PHA sintase e o início da formação dos grânulos se dão nos pólos da célula e na região mediana, que corresponde às futuras regiões polares após a divisão celular (PETERS; REHM, 2005).

Quatro tipos de proteínas são encontradas associadas aos grânulos de PHA durante a sua síntese (Figura 5) (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005): PHA sintase (PhaC), PHA depolimerase (PhaZ), Phasinas (PhaP) e um fator de transcrição R (PhaR).

Recentemente, foi demonstrada em *C. necator* a ocorrência de quatro tipos diferentes de phasinas: PhaP1, PhaP2, PhaP3 e PhaP4 (PÖTTER *et al.*, 2004). As proteínas PhaP2, PhaP3 e PhaP4 ocorrem em concentração muito baixa, sendo a PhaP1 a proteína predominante na superfície do grânulo. Cerca de 30% da superfície do grânulo corresponde à PhaP1. Aparentemente não apresenta atividade enzimática e possui função importante na estabilização da estrutura dos grânulos intracelulares, evitando a coalescência entre grânulos vizinhos. Os níveis de expressão da PhaP1 determinam o número e tamanho dos grânulos

formados, havendo uma relação inversa entre os níveis de expressão da PhaP1 e o tamanho dos grânulos (Figura 6) (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005). Alguns trabalhos também propõem que as phasinas poderiam atuar também como reserva de aminoácidos (MCCOOL; CANNON, 1999).

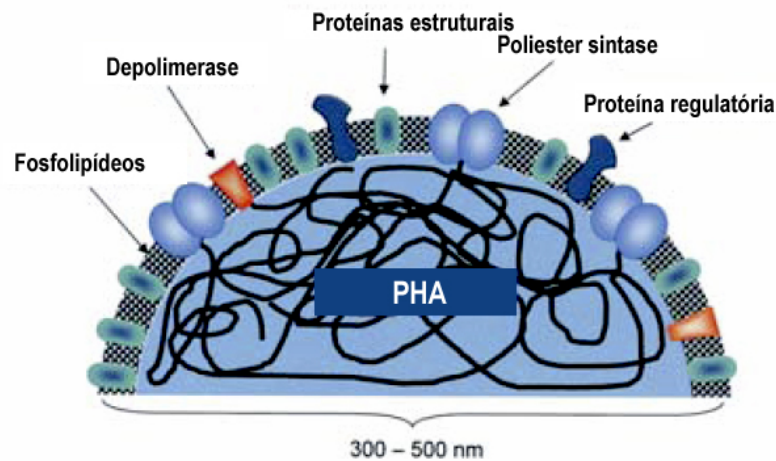


Figura 5: Representação esquemática da estrutura de um grânulo da PHA e proteínas associadas (adaptado de REHM, 2003).

A PhaR é um fator de transcrição que controla negativamente a síntese de Phasina. O mecanismo de controle, demonstrado em *Paracoccus denitrificans*, é bastante simples e aparentemente similar em outros microrganismos. Enquanto não há síntese de PHA, a PhaR liga-se ao DNA em regiões que antecedem os genes *phaP* e *phaR* inibindo a transcrição. No momento em que se inicia a formação dos grânulos de PHA, a PhaR passa a ligar-se aos grânulos baixando os níveis citoplasmáticos da proteína, o que leva por sua vez ao desligamento da PhaR no DNA e início da síntese de PhaP e PhaR, que continuará a ligar-se aos grânulos enquanto houver síntese de polímero. No momento em que a síntese de polímero é interrompida e inicia-se a degradação do PHA, os grânulos reduzem de tamanho, liberando PhaR's que se ligam ao DNA inibindo novamente a síntese de PhaP e PhaR. Como a PhaP

afeta positivamente a síntese de PHA, este sistema constitui um mecanismo de controle da síntese de PHA ao nível do DNA (MAEHARA *et al.*, 2002; YORK *et al.*, 2001).

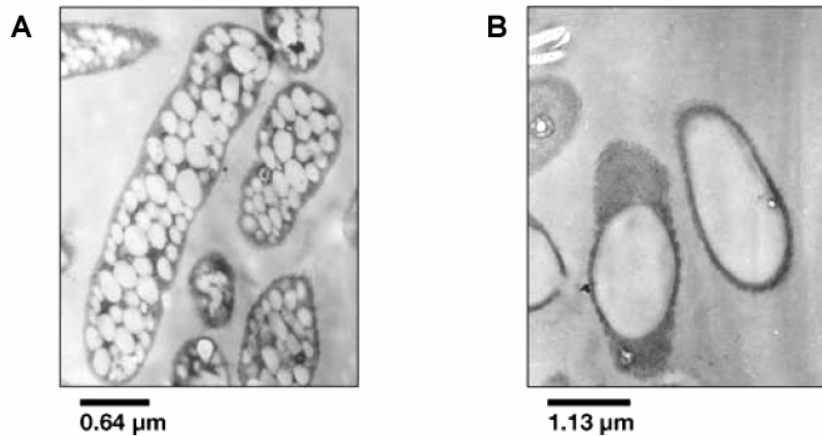


Figura 6: Grânulos de PHA em células de *Cupriavidus necator*. (A) organismo com expressão aumentada de PhaP e (B) sem expressão de PhaP (STUBBE *et al.*, 2005).

A PhaZ representa uma PHA depolimerase intracelular, responsável pela degradação do polímero para utilização no metabolismo celular. Assim como a PHA sintase, encontra-se associada à superfície do grânulo e possui atividade sobre o PHA somente quando este se encontra em estado amorfo, sendo inativa sobre o PHA na sua forma cristalina (STUBBE *et al.*, 2005; SUDESH; ABE; DOI, 2000). A ausência de PhaZ em *E. coli*, já que ela não é um organismo naturalmente produtor de PHA, pode ser um dos fatores para explicar a síntese de polímeros com peso molecular mais elevado nestes organismos (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

## 1.4 Produção bacteriana de PHA

### 1.4.1 Bioprocessos empregando linhagens nativas produtoras de PHA

Diversos sistemas bacterianos foram propostos para a produção de diferentes PHA envolvendo tanto linhagens selvagens de espécies naturalmente produtoras como linhagens recombinantes derivadas de espécies naturalmente produtoras ou não. Os produtores nativos de PHA mais amplamente empregados em bioprocessos de produção incluem: *C. necator*, *Alcaligenes latus* e *Burkholderia sacchari* para a síntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), *Aeromonas hydrophila* e *A. caviae* para obtenção do copolímero P(3HB-co-3HHx) e espécies de *Pseudomonas* para síntese de diferentes PHA de cadeia média (PHA<sub>mcl</sub>).

Em geral, por tratar-se de espécies nativas produtoras de PHA, necessitam de limitação de algum nutriente essencial durante a cultura para induzir ao acúmulo de polímero. Além disso, apresentam ainda a capacidade de degradação do polímero acumulado através da PHA despolimerase intracelular (PhaZ). Estas características exigem que os bioprocessos empregando estas espécies sejam bastante otimizados para potencializar a formação de polímero.

Polímeros com composição variada têm sido obtidos tanto pela manipulação do substrato utilizado para a síntese do polímero como também pela manipulação genética dos organismos produtores (BRANDL *et al.*, 1990; GROSS; KALRA, 2002; STEINBÜCHEL; LUTKE-EVERSLOH, 2003). A estratégia de manipulação do substrato apresenta algumas limitações relacionadas ao custo elevado de muitos substratos, podendo ainda muitos apresentarem toxicidade para a célula. Entre os substratos de baixo custo atualmente avaliados quanto à viabilidade de emprego para síntese de PHA podemos citar sacarose, melão de

cana, açúcar invertido, soro de leite, óleos e gorduras, xilose, hemicelulose hidrolisada e outros (LEE; CHOI; WONG, 1999; SQUIO; ARAGÃO, 2004).

A redução nos custos de produção através da otimização das condições de cultivo e do uso de substratos de baixo custo, bem como pela obtenção de organismos mais eficientes na conversão dos substratos, constitui um aspecto imprescindível para viabilizar a utilização dos PHA em muitas aplicações, já que estes apresentam ainda custos bastante restritivos quando comparados aos polímeros de origem petroquímica. Atualmente, o custo de produção na Europa está em torno de US\$ 10 a 20/kg, sendo os menores custos de produção obtidos no Brasil através integração da produção de PHA com a produção de açúcar e álcool, atingindo custos de produção de aproximadamente US\$ 2,5-5/kg (NONATO, 2001; SQUIO; ARAGÃO, 2004).

#### **1.4.2 Bioprocessos empregando *Escherichia coli* recombinante para produção de PHA**

A produção heteróloga de PHA em *E. coli* vem sendo amplamente pesquisada e apresenta algumas vantagens em relação à produção em organismos naturalmente produtores. Estas vantagens incluem: o vasto conhecimento genético e fisiológico acerca desta bactéria, facilitando a manipulação de rotas metabólicas para o direcionamento de monômeros para a síntese; sua fragilidade celular permitindo métodos de purificação mais simples; possibilidade de utilização de diversos substratos como fonte de carbono; sua capacidade de acumular grandes quantidades de PHA podendo superar 90% da massa celular seca; ausência de PHA despolimerase, impedindo a degradação do polímero formado; dispensa a necessidade de limitação nutricional, apresentando crescimento celular e acúmulo de polímero simultâneos (CHOI, LEE; HAN, 1998; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Por não ser um organismo naturalmente produtor, a síntese de PHA nestas bactérias só é possível através da inserção de genes responsáveis pela síntese do polímero, especialmente a PHA sintase. Classicamente, a produção de PHA<sub>scl</sub> em *E. coli* tem sido obtida pela introdução do operon *phbCAB* de *C. necator*, resultando no acúmulo de grandes quantidades de PHB quando em condições de cultivo ideais. A síntese de outros polímeros, como o P(3HB-*co*-3HV) e, principalmente, PHA<sub>mcl</sub> necessitam modificações adicionais no metabolismo da *E. coli* para capacitá-la à síntese (MADISON; HUISMAN, 1999; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992). A produção de PHA de cadeia média em *E. coli* é obtida com a utilização de linhagens mutantes deficientes no metabolismo de ácidos graxos, direcionando intermediários da via para a síntese de PHA (LANGENBACH; REHM; STEINBÜCHEL, 1997; PARK; CHOI; LEE, 2005; QI; STEINBÜCHEL; REHM, 1998).

Apesar do copolímero P(3HB-*co*-3HV) poder ser obtido a partir de cepas recombinantes de *E. coli* contendo unicamente o operon de *C. necator* quando cultivadas na presença de ácido propiônico ou ácido valérico, a incorporação de 3HV é muito inferior à observada em *C. necator* quando cultivada sob as mesmas condições. Isso se deve ao fato de que em *C. necator* a reação de síntese do  $\beta$ -cetovaleril-CoA a partir de propionil-CoA e acetil-CoA é efetivada por outra  $\beta$ -cetotiolase que não aquela expressa pelo gene *phbA*, denominada  $\beta$ -cetotiolase BktB e expressa pelo gene *bktB* (SLATER *et al.*, 1998).

Diferentes estratégias de produção em *E. coli* já foram descritas para obtenção do copolímero P(3HB-*co*-3HV), sendo mais comumente utilizada a adição de ácido propiônico junto à glicose utilizando *E. coli* com o operon *phbCAB* de *C. necator*. Neste caso, a síntese de  $\beta$ -cetovaleril-CoA ocorre pela participação de uma cetotiolase com ampla especificidade que, em *E. coli*, atua no metabolismo de ácidos graxos. A utilização de ácido propiônico apresenta algumas limitações, pois o mesmo apresenta toxicidade à célula, reduzindo a síntese

de PHA quando em concentrações elevadas, além de ser um substrato com custo mais elevado quando comparado com a glicose, por exemplo.

Somado a isso, a *E. coli* não capta prontamente o ácido propiônico, necessitando de uma adaptação prévia da célula pela indução com ácido acético ou suplementação com ácido oléico (CHOI; LEE, 1999). A restrição à captação de propionato pela *E. coli* se deve ao fato de que em situação normal, os genes responsáveis pela síntese das proteínas relacionadas à sua captação encontram-se reprimidos pela regulação dos genes *atoC* (ativador) e *fadR* (repressor). Linhagens de *E. coli* modificadas para expressão constitutiva de *atoC* e deficientes na expressão de *fadR* possuem a capacidade de captação do propionato sem a necessidade de adaptação prévia da bactéria, facilitando a biossíntese de polímeros contendo o 3HV (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992).

## 1.5 *C. violaceum* como organismo modelo

*C. violaceum* é uma eubactéria gram-negativa com ocorrência comum em regiões tropicais e subtropicais que tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido ao seu alto potencial biotecnológico, o que levou inclusive ao seu seqüenciamento pelo consórcio do Projeto Genoma Nacional Brasileiro (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003; STEPHENS, 2004).

A PHA sintase desta bactéria possivelmente apresenta uma afinidade mais elevada por monômeros 3-HV que a de *C. necator*, sendo capaz de inserir monômeros 3-HV mesmo dispondo unicamente de glicose como fonte de carbono (KOLIBACHUK; MILLER; DENNIS, 1999). Steinbüchel e colaboradores (1993) evidenciaram a eficiência desta bactéria para incorporação de 3-HV, demonstrando a sua aptidão para obtenção do homopolímero



P(3HV) a partir do cultivo de *C. violaceum* tendo o ácido valérico como única fonte de carbono.

Kolibachuk *et al.* (1999) conseguiu verificar expressão da enzima em *C. necator* e *Klebsiella aerogenes*, verificando porém uma produção insignificante de polímero quando expressa em *E. coli* e *P. putida*. Piemolini (2004) também verificou níveis bastante reduzidos de PHA em *E. coli* recombinante contendo a PHA sintase de *C. violaceum*.

*C. violaceum* apresenta patogenicidade ocasional, porém geralmente fatal, o que limita *a priori* a sua utilização direta como organismo produtor de biopolímeros para a área médica. Visando contornar este problema, buscou-se neste trabalho a clonagem do gene da PHA sintase de *C. violaceum* no plasmídeo pBHR69 (vetor de clonagem) para produção de PHA em *E. coli* recombinante, permitindo a obtenção heteróloga de PHA através do cultivo da linhagem recombinante obtida em meio de cultura apropriado.

## 1.6 Objetivos

### 1.6.1 Objetivos gerais

O trabalho apresenta como objetivo central a clonagem do gene da enzima PHA sintase de *C. violaceum* (*phaC<sub>Cv</sub>*) e a expressão heteróloga deste gene em *E. coli*, de forma a permitir a produção de PHA nestas bactérias. Paralelamente, com uso de ferramentas de bioinformática, objetivou-se a construção de um modelo estrutural teórico da enzima PHA sintase de *C. violaceum*.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- Análise da seqüência de bases para orientação do processo de clonagem do gene *phaC<sub>Cv</sub>* via PCR;
- Amplificação do gene *phaC<sub>Cv</sub>* e clonagem no plasmídeo pBHR69, originando o plasmídeo pRLC2;
- Avaliação da expressão do gene clonado e da funcionalidade da PHA sintase resultante através da verificação do acúmulo de PHA em linhagens de *E. coli* transformadas com plasmídeo pRLC2;
- Proposição de um modelo estrutural teórico para a enzima PHA sintase de *C. violaceum*.

## Capítulo 2

### Material e Métodos

#### 2.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos

A Tabela 3 apresenta a relação dos organismos e plasmídeos utilizados no presente trabalho.

Tabela 3: Relação de linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.

Linhagens bacterianas		Características relevantes
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472		Linhagem nativa produtora de PHA.
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$		Expressão constitutiva do repressor LacI normal.
<i>Escherichia coli</i> JM101		Expressão aumentada do repressor LacI.
Plasmídeos	Tamanho	Características relevantes
pBHR69*	5,4 kb	Plasmídeo pBluescript SK- (amp <sup>R</sup> ) contendo os genes <i>phbA</i> e <i>phbB</i> de <i>Cupriavidus necator</i> inseridos sob a regulação do promotor Lac.
pRLC2	7,3 kb	Plasmídeo desenvolvido neste trabalho derivado do pBHR69 contendo o gene <i>phaC</i> de <i>C. violaceum</i> a montante dos genes <i>phbA</i> e <i>phbB</i> de <i>C. necator</i> , todos sob regulação do promotor Lac do plasmídeo.

\* Gentilmente cedido pelo Dr. Alexander Steinbüchel, do Instituto de Microbiologia de Westfälische Wilhelms Universität Münster, Alemanha.

#### 2.2 Meios de cultura

Em todos os experimentos foi utilizado meio de cultura LB (Lúria-Bertani) conforme descrito por Sambrook e Russel (2001) (1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl), acrescentando-se 1,5% de agar agar para obtenção do meio sólido. Para os cultivos com cepas portando o plasmídeo pBHR69 ou pRLC2 adicionou-se ampicilina à concentração final de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Como substrato para a produção de PHA utilizou-se glicose na concentração de 1% nos cultivos em meio líquido e 2% nos cultivos em meio sólido, utilizando-se ainda para o monitoramento da produção de PHA em meios sólidos  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de vermelho do nilo (SPIEKERMANN; REHM, 1999). Quando necessário, foi adicionado IPTG ao meio de cultura na concentração final de 1mM para indução da expressão dos genes clonados sob regulação do promotor Lac no plasmídeo pRLC2.

### **2.3 Extração e purificação dos ácidos nucleicos**

O DNA genômico de *C. violaceum* para as reações de PCR foi obtido utilizando-se kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. O isolamento do DNA plasmidial foi realizado utilizando método clássico de lise alcalina descrito por Sambrook e Russel (2001), não necessitando etapas adicionais de purificação.

A purificação do DNA amplificado para os ensaios enzimáticos foi conduzida em duas etapas: inicialmente purificou-se o DNA em solução utilizando o kit *DNA extraction - Pure Extreme* (Fermentas), que utiliza método baseado na utilização de micropartículas de sílica para adsorção e imobilização do DNA. Em seguida à extração com kit o DNA foi precipitado em etanol e ressuspenso em água ultrapura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) para aumento da pureza e concentração da solução, uma vez que resíduos de reagentes da PCR, especialmente resíduos da *Taq* DNA polimerase, poderiam comprometer a eficiência das endonucleases de restrição nas etapas subsequentes.

Para verificação da concentração aproximada e da integridade do DNA obtido nas extrações de DNA genômico e plasmidial, assim como na PCR, foi utilizado o método de diluição seriada e visualização em gel de agarose.

Os plasmídeos obtidos no trabalho foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e as demais soluções de DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **2.4 Eletroforese em gel de agarose**

Utilizou-se gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X nos ensaios de eletroforese para verificação da presença, integridade e/ou quantidade do DNA nas soluções. A voltagem aplicada foi de  $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$  por aproximadamente 1 hora, utilizando azul de bromofenol como referência para acompanhamento da migração da amostra no gel. Para visualização das bandas de DNA, o gel foi imerso por 20 minutos em solução de brometo de etídio a  $0,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em tampão TAE 1X e posteriormente observado em transluminador com lâmpada de luz UV.

## **2.5 Desenho dos iniciadores**

Para amplificação do gene foi desenhado um iniciador direto (CCVF2) em relação a um iniciador reverso previamente existente (CCVR) e gentilmente disponibilizado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina V. Antônio do LBMM – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (Departamento de Bioquímica – UFSC).

O desenho do iniciador CCVF2 foi realizado com auxílio de ferramentas de bioinformática. Para a escolha inicial de possíveis iniciadores diretos com características similares àquele disponível foi utilizado o programa PERLPRIMER (MARSHALL, 2004). Outras análises complementares em relação às características físico-químicas, formação de dímeros e outras estruturas e, especialmente, em relação à sua especificidade através da

execução de PCR *in silico* sobre o DNA genômico de *C. violaceum*, foram conduzidas utilizando-se o programa FASTPCR (KALENDAR, 2007).

## 2.6 Amplificação do gene *phaC<sub>Cv</sub>*

A amplificação do gene foi realizada inicialmente em condições padrões, conforme reação descrita pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). No entanto, devido ao baixo rendimento de DNA, alterações nos parâmetros de temperatura e tempo, assim como na composição da solução de reação foram testadas (concentração do tampão de reação, quantidade de DNA alvo utilizada, de iniciadores, de enzima e de magnésio). A adição de betaína à concentração final de 1 M também foi testada, obtendo-se um aumento considerável no rendimento da reação.

As condições finais adotadas para a amplificação e isolamento do gene foram as seguintes:

Tampão 10X (fornecido com enzima).....	1 X
MgSO <sub>4</sub> .....	1,5 mM
dNTP .....	0,2 mM cada
DNA genômico <i>C. violaceum</i> .....	~250 ng
Iniciadores CCVF2 e CCVR .....	0,4 µM cada
Betaína .....	1 M
Taq DNA polimerase.....	0,05 U·µl <sup>-1</sup>
Volume final da reação.....	50 µl

Programação do termociclador (temperaturas e tempos de desnaturação, pareamento dos iniciadores e extensão da fita de DNA, respectivamente):

Ciclo inicial ..... 95°C – 1 min / 55°C – 45 s / 72°C – 2 min.

Demais ciclos (35 ciclos)..... 95°C – 40 s / 55°C – 30 s / 72°C – 2 min\*

Extensão final ..... 72°C – 5 min

\* Acréscimo de 2 segundos a cada ciclo.

## 2.7 Tratamento com endonucleases de restrição – *Bam*HI e *Xba*I

Para digestão do DNA amplificado e do DNA plasmidial foram definidos protocolos conforme orientação sugerida pelos fabricantes das enzimas. Em ambos os casos o DNA foi inicialmente tratado com a enzima *Xba*I e, após precipitação em etanol, tratado então com a enzima *Bam*HI.

De forma genérica, as condições de reações adotadas foram as seguintes:

### Digestão com *Xba*I:

DNA amplificado ou plasmidial..... 1,5 µg  
 Tampão 10X (fornecido com enzima)..... 1X  
 BSA 10X (fornecido com enzima) ..... 1X  
 Enzima ..... 30 U  
 Volume da reação ..... 50 µl

Temperatura e tempo de incubação: 37°C – 5h.

### Digestão com *Bam*HI:

DNA amplificado ou plasmidial (*Bam*HI)..... 1,5 µg  
 Tampão com BSA 10X (fornecido com enzima) ..... 1X  
 Enzima ..... 30 U  
 Volume da reação ..... 50 µl

Temperatura e tempo de incubação: 37°C – 2h.

## 2.8 Ligação com DNA ligase T4

Após os tratamentos enzimáticos, as soluções de DNA recuperadas apresentaram as concentrações aproximadas de 100 e 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  para as soluções de DNA amplificado e plasmidial, respectivamente. Em função da baixa recuperação de DNA obtida após tratamento do DNA plasmidial, o DNA amplificado foi diluído 10 vezes para ficar em concentração similar à do vetor.

Três reações de ligação foram montadas com quantidades iguais de vetor (~30 ng) e variando a quantidade de inserto (75, 36 e 18 ng), resultando em relações molares de 1:6, 1:3 e 1:1,5, respectivamente. Foram utilizadas 5U de enzima para um volume final de reação de 20  $\mu\text{l}$ .

Antes da adição do tampão e da enzima, a solução contendo apenas o DNA plasmidial e o gene foi submetida a um tratamento térmico a 65°C por 5 minutos para desnaturação de possíveis pareamentos pré-existentes nas extremidades coesivas do tipo vetor-vetor e inserto-inserto. Após este tratamento e adição da enzima e tampão, a reação foi incubada inicialmente por 10 min a 14°C seguido de 10 horas a 25°C. Os minutos iniciais a 14°C têm por objetivo o favorecimento dos pareamentos entre as extremidades coesivas, seguido então de um período maior com temperatura a 25°C mais adequada para a atividade da enzima.

## 2.9 Preparo das células competentes e transformação

Foi utilizado para o preparo das células competentes o método descrito por Hanahan (1983). O método consiste essencialmente em cultivar as bactérias por



aproximadamente 3 horas até que atinjam o estágio de crescimento exponencial máximo (absorbância entre 0,5 e 0,9) para, em seguida, transferi-las de forma abrupta para uma solução gelada de  $\text{CaCl}_2$ . A transformação foi feita conforme método descrito por Sambrook e Russel (2001), utilizando-se choque térmico sobre as células competentes para permeabilização temporária das membranas ao DNA.

Para seleção das células recombinantes, as células transformadas foram cultivadas em meio sólido contendo ampicilina, uma vez que o plasmídeo utilizado na clonagem apresenta gene de resistência a este antibiótico. O DNA plasmidial foi extraído das cepas isoladas desta forma para confirmação da estrutura do plasmídeo obtido. A confirmação se fez através da análise dos fragmentos de restrição gerados com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I e também através de PCR sobre os plasmídeos isolado utilizando os mesmos iniciadores usados na clonagem.

## **2.10 Produção de PHA**

As linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$  e JM101 foram utilizadas para produção heteróloga de P(3HB) através do plasmídeo pRLC2, sendo os cultivos realizados em duplicata.

Para o preparo do pré-inóculo uma única colônia de uma placa de Petri foi transferida para um tubo contendo 5 ml de meio LB suplementado com ampicilina e cultivada sob agitação à temperatura de 37°C durante 24h. O inóculo foi então cultivado a partir do pré-inóculo em frascos erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio LB e ampicilina, sob agitação de 150 rpm e à temperatura de 30°C durante 24 h. Para produção de polímero foram utilizados frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio LB com adição de glicose à concentração final de 1% como substrato para a síntese de PHA. O volume do inóculo inicial foi de 10 ml. As culturas foram incubadas por 72 h a 30°C sob agitação de 150 rpm.

Como controle negativo da produção de PHA utilizou-se *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada com o plasmídeo pBHR69, portanto, sem PHA sintase e incapaz de produzir polímero.

## 2.11 Análise dos polímeros obtidos: cromatografia gasosa

As análises qualitativas e quantitativas dos polímeros obtidos foram realizadas por cromatografia gasosa utilizando como padrão o polímero PHB (Sigma). A análise quantitativa expressa em termos percentuais a quantidade de polímero acumulado em relação à produção total de biomassa (massa celular seca – MCS).

O preparo do material biológico para a análise por cromatografia gasosa (CG) foi realizada conforme protocolo descrito por Brandl *et al.* (1988). Através da digestão da MCS por metanólise, os PHA intracelulares são degradados às formas metil-ésteres de seus constituintes ácidos  $\beta$ -hidroxialcanóicos, os quais são então identificados na análise cromatográfica. O processo de metanólise consiste na digestão da MCS em solução de metanol e ácido sulfúrico a 15% v/v (preparado em banho de gelo e com adição bastante lenta do ácido sulfúrico para evitar explosão) juntamente com igual quantidade de clorofórmio e aquecida a 100°C por 2 horas. Após a digestão, adiciona-se água para separação da fração inorgânica. A fase orgânica é recuperada para análise cromatográfica.

A quantidade de PHB presente nas amostras foi calculada a partir de uma diluição seriada de 6 pontos, variando a quantidade de PHB nas soluções de 1,5 a 150 mg·ml<sup>-1</sup>. Como padrão de referência interno utilizou-se ácido benzóico à concentração constante de 0,65 mg·ml<sup>-1</sup>. A razão entre o valor de área obtido na cromatografia para o pico do hidroxíácido e o obtido para o padrão de referência interno (ácido benzóico) apresentam uma correlação direta com a massa de hidroxíácido presente na amostra. Assim, a massa de polímero presente na

amostra é calculada plotando-se o valor da razão hidroxiácido / padrão de referência na linha de tendência obtida na diluição seriada. O uso do padrão de referência interno visa essencialmente a compensar as variações de leitura entre uma amostra e outra.

## **2.12 Análise da seqüência e modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum***

Todas as seqüências utilizadas neste trabalho foram obtidas de bancos de dados de domínio público como o GENBANK, UNIPROT (SWISS-PROT +TREMBL), PDB e outras bases correlacionadas. Informações complementares sobre a enzima foram obtidas de bancos de famílias (PFAM) e de domínios (PRODOM) e alinhamentos obtidos com auxílio do BLASTP (ALTSCHUL; GISH; MILLER *et al.*, 1990) e PSI-BLAST (ALTSCHUL; MADDEN; SCHAFFER *et al.*, 1997). A análise de distribuição de cargas foi feita com auxílio do programa SAPS (*Statistical Analysis of Protein Sequences*) disponível para uso on-line (BREDEL; BUCHER; NOURBAKHSI *et al.*, 1992).

Em função dos resultados obtidos optou-se para modelagem da estrutura terciária da enzima pelo método de modelagem por homologia do tipo compatibilidade seqüência-estrutura (método *threading*). Em síntese, o método de modelagem por homologia consiste de quatro etapas distintas e consecutivas:

- a) Identificação da(s) proteína(s) molde(s);
- b) Alinhamento da seqüência alvo com a(s) seqüência(s) molde(s);
- c) Construção do modelo;
- d) Validação do modelo.

No caso do método *threading*, o alinhamento da seqüência alvo com o molde considera não apenas a seqüência de bases, mas também características estruturais preditas a partir da seqüência, como a estrutura secundária.

Na predição da estrutura secundária foram utilizados os programas PSIPRED (JONES, 1999), JNET (CUFF; BARTON, 1999), SPRO (CHENG; RANDALL; SWEREDOSKI *et al.*, 2005), HNN (*Hierarchical Neural Network Secondary Structure Prediction*) (GUERMEUR, 1997) e NN-PREDICT (KNELLER; COHEN; LANGRIDGE, 1990). Para o alinhamento *threading*, o sistema 3D-PSSM (KELLEY; MACCALLUM; STERNBERG, 1999) utilizado considera a seqüência consenso obtida do alinhamento dos resultados fornecidos pelos programas PSIPRED, JNET e SPRO. A busca de moldes e alinhamento foi realizada utilizando os programas SWISS-MODEL (GUEx; PEITSCH, 1997), PSI-BLAST (ALTSCHUL; MADDEN; SCHAFFER *et al.*, 1997), GENTHREADER (JONES, 1999b) e 3D-PSSMM. Para alinhamentos comparativos do tipo seqüência *versus* seqüência utilizou-se o programa CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Para o processo de modelagem estrutural da enzima foi utilizado o programa MODELLER v.8 (ŠALI; BLUNDELL, 1993). A identificação de moldes com estrutura resolvida foi feita buscando-se estruturas homólogas no banco de estruturas PDB utilizando as ferramentas de busca citadas acima.

A avaliação estereoquímica do modelo obtido foi realizada através do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, *et al.* 1963), utilizando-se para geração do gráfico o programa PROCHECK (LASKOWSKI; MACARTHUR; MOSS *et al.*, 1993). O gráfico de Ramachandran avalia os ângulos das ligações  $\Psi$  (Psi) e  $\Phi$  (Phi).

## Capítulo 3

### Resultados e Discussão

#### 3.1 Isolamento e clonagem do gene *phaC<sub>Cv</sub>* e produção heteróloga de PHA em *E. coli*

##### 3.1.1 Análise da seqüência do gene

Duas seqüências distintas encontram-se publicadas no GENBANK para o gene da PHA sintase de *C. violaceum* (número de acesso AF061446 e NC\_005085) com diferenças entre as seqüências que resultam em propostas distintas para o quadro de leitura na região N-terminal da proteína, a qual se encontra depositada no banco de seqüências curadas UNIPROT (SWISS-PROT + TREMBL) sob o número de acesso primário Q9ZHI2. Segundo publicação de Kolibachuk *et al.* (1999), o ponto de início da tradução do gene estaria localizado quatro resíduos a montante daquele proposto atualmente na publicação do genoma de *C. violaceum* (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003), resultando no início da tradução em quadro de leitura diferente. Ambos os genes publicados, no entanto, resultam no mesmo produto a partir do resíduo de aa 57 em consequência de *gaps* de uma seqüência em relação à outra.

A análise das seqüências demonstrou não haver qualquer diferença na região inicial do gene que explique a ligação do ribossomo a códons de início diferentes nas duas linhagens de *C. violaceum* utilizadas. As seqüências apresentam 100% de identidade tanto nas primeiras bases do gene como, mais importante, em uma ampla região anterior aos códons de início propostos, de onde se conclui então que poderia haver algum erro em alguma das duas seqüências publicadas.

Alinhamentos múltiplos com outras PHA sintases reforçam a proposta atual de quadro de leitura, porém o posicionamento do sítio de ligação ao ribossomo observado na análise da seqüência do gene contradiz essas evidências. Observa-se na seqüência que antecede os códons de início propostos um possível sítio de ligação ao ribossomo, 10 (dez) bases a montante do códon de início proposto por Kolibachuk *et al.* (1999), portanto a 14 bases do códon de início indicado na publicação do genoma de *C. violaceum* (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Assim, para que fosse possível a tradução no quadro de leitura proposto atualmente, seria necessário ao ribossomo “ignorar” de alguma forma a primeira seqüência ATG, disponível a uma distância adequada, para ligar-se à segunda seqüência ATG localizada 4 pb após, e mais desfavorecida para a ligação em função da distância elevada em relação ao sítio de ligação ao ribossomo. A distância média de localização dos sítios de ligação ao ribossomo em relação ao códon de início é inferior a 10 bases (LEWIN, 2004). A análise da seqüência, portanto, reforça a proposta de Kolibachuk *et al.* (1999), enquanto que os resultados obtidos nos alinhamentos múltiplos favorecem a proposta atual.

Assim, a revisão dos dados obtidos nos bancos de dados evidenciou a existência de aspectos não esclarecidos na literatura em relação à real posição do códon de início da tradução do gene. Uma análise mais apurada da seqüência visando um melhor esclarecimento em relação a esta questão, informação essencial para possibilitar a orientação correta da tradução nos sistemas heterólogos projetados, levou à constatação de outro potencial códon de início da tradução representado pela seqüência TTG localizado 69 pb a montante daquele considerado atualmente (Figura 7). Observa-se também um possível sítio de ligação ao ribossomo, 7 pb a montante do códon TTG.

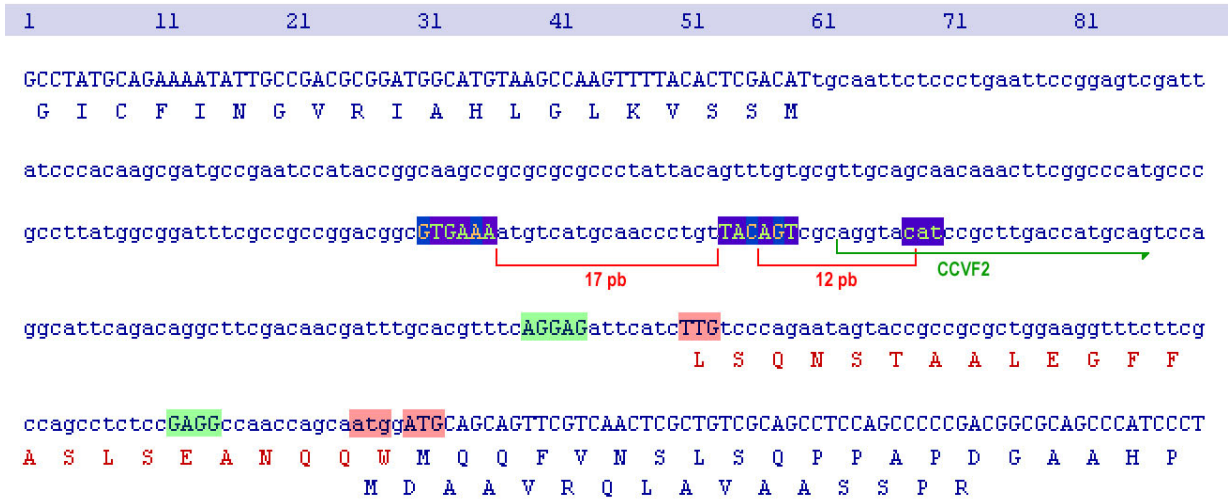


Figura 7: Sequência genômica da região do início do gene *phaC* de *Chromobacterium violaceum*. Os códons grifados em vermelho correspondem aos possíveis códons de início do gene, antecedidos pelos respectivos sítios de ligação ao ribossomo (verde). A sequência de aminoácidos apresentada em vermelho corresponde à sequência adicional proposta neste trabalho. As regiões grifadas em azul correspondem a uma possível região promotora encontrada. A sequência sublinhada em verde representa o iniciador CCVF2 utilizado para amplificação do gene.

Esta possível posição encontrada para o códon de início é também suportada por programas de predição de genes procarióticos, como o GENEMARK-HMM (LUKASHIN; BORODOVSKY, 1998). Assim considerada, a ORF passaria a apresentar 1773 pb ao invés dos 1704 pb propostos atualmente, adicionando à extremidade N-terminal da sequência traduzida os resíduos LSQNSTAALEGFFASLSEANQQW (total de 23 aa). Sob esta concepção, a PHA sintase de *C. violaceum* passaria a apresentar 591 aa (atualmente considera-se 568 aa).

A existência da sequência TTG ao invés de ATG deve proporcionar níveis de tradução inferiores àqueles observados nos genes de PHA sintases que apresentam a sequência ATG como códon de início. Segundo Lewin (2004), genes com códon de início representados pela sequência TTG apresentam aproximadamente  $\frac{1}{4}$  dos níveis de expressão observados em genes iniciados pelo códon ATG.

Através da utilização de programas para predição de promotores como o NNPP (*Neural Network Promoter Prediction*) (BURDEN; LIN; ZHANG, 2005), foi possível localizar também uma potencial região promotora para este novo códon de início, posicionando o início da transcrição 72 pb a montante da ORF descrita neste trabalho. Esta região estaria composta por uma seqüência -10 representada pelas bases TACAGT e uma seqüência -35 representada pelas bases GTGAAA, separadas entre si por um intervalo de 17 bp (Figura 7), o que está de acordo com o esperado uma vez que a distância média entre as duas seqüências é de 16 a 18 pb (LEWIN, 2004). O alinhamento com a seqüência consenso -10 e -35 demonstra que os resíduos mais conservados nos promotores encontram-se quase todos presentes no promotor descrito (Tabela 4).

Tabela 4: Alinhamento das seqüências promotoras -10 e -35 descritas neste trabalho para o gene *phaC* de *Chromobacterium violaceum* com as seqüências descritas na literatura para promotores de genes procarióticos. Para cada base é informado o percentual de promotores em que ela encontra-se conservada, segundo Lewin (2004).

Seqüência -10	consenso	<b>T</b> 80%	<b>A</b> 95%	T 45%	<b>A</b> 60%	A 50%	<b>T</b> 96%
	<i>phaC<sub>Cv</sub></i>	T	A	C	A	G	T
Seqüência -35	consenso	T 82%	<b>T</b> 84%	<b>G</b> 78%	<b>A</b> 65%	C 54%	<b>A</b> 45%
	<i>phaC<sub>Cv</sub></i>	G	T	G	A	A	A

### 3.1.2 Amplificação e clonagem do gene *phaC* de *C. violaceum* para produção heteróloga de PHA em *E. coli*

Em função destas questões não esclarecidas em relação ao efetivo códon de início do gene, optou-se pelo isolamento do gene a partir do DNA genômico de *C. violaceum*



utilizando-se iniciadores na PCR que incluíssem no fragmento amplificado não apenas a ORF proposta neste trabalho mas também o potencial sítio de ligação ao ribossomo. Buscou-se também a inclusão de um códon de parada para a tradução do fragmento  $\alpha$  da  $\beta$ -galactosidase (Figura 8) para permitir que a tradução do gene ocorresse orientada pelo seu próprio sítio de ligação ao ribossomo, resultando assim na expressão da enzima em sua seqüência nativa. A potencial região promotora não foi incluída na região amplificada uma vez que nos estudos de Kolibachuk *et al.* (1999), onde a transcrição do gene clonado era possivelmente orientada pelo promotor do próprio gene da PHA sintase, não se observou expressão significativa da enzima em *E. coli*. Assim, a seqüência dos iniciadores utilizados foi a seguinte :

CCVR (reverso): 5' cgcgatccatagggttgctcattgcaggct 3'

CCVF2 (direto): 5' tactctagaaggtacatccgcttgaccatgcagt 3'

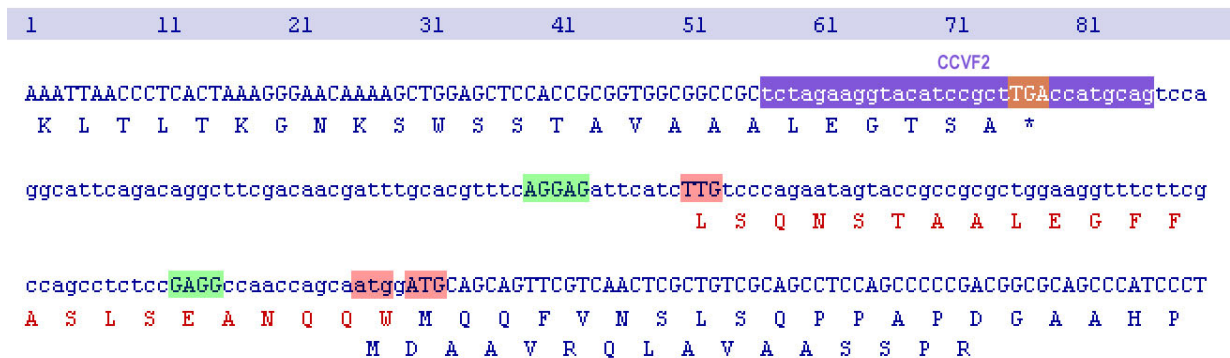


Figura 8: Representação gráfica da região de ligação inserto-vetor no plasmídeo pRLC2. Os códons grifados em vermelho correspondem aos possíveis códons de início do gene, antecedidos pelos respectivos sítios de ligação ao ribossomo (verde). A seqüência de aminoácidos apresentada em vermelho corresponde à seqüência adicional proposta neste trabalho. A seqüência grifada em roxo representa o iniciador CCVF2 destacando em alaranjado o códon de parada para a tradução da  $\beta$ -galactosidase (alaranjado).

Algumas características físico-químicas dos iniciadores são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e outras características dos iniciadores utilizados (FASTPCR).

	CCVF2	CCVR
Sítio de restrição inserido	<i>Xba</i> I	<i>Bam</i> HI
T <sub>m</sub> porção homóloga ao genoma (negrito)	63,9	57,8
T <sub>m</sub> 10*	36,6	37,3
T <sub>m</sub> iniciador completo com DNA genômico (complementaridade parcial)	58,4	56,4
T <sub>m</sub> iniciador completo com produto de PCR (complementaridade total)	63,6	66,9
Conteúdo de CG	47 %	57 %

\* T<sub>m</sub>10: T<sub>m</sub> relativo aos últimos 10 pareamentos na extremidade extensível do iniciador

Para clonagem do gene *phaC<sub>CV</sub>* optou-se pela clonagem unidirecional via PCR. Através do uso de duas endonucleases de restrição, ambas formadoras de extremidades coesivas, foi possível a introdução do gene de forma unidirecional no vetor de expressão. A Figura 9 ilustra o procedimento experimental adotado neste trabalho para a obtenção das cepas recombinantes de *E. coli*.

Após processo de otimização nas condições de amplificação, obteve-se a amplificação do fragmento previsto de 1.881 pb com boa especificidade e rendimento satisfatório (Figura 10), permitindo assim conduzir as etapas subseqüentes sem a necessidade de purificação em gel para eliminação de fragmentos indesejáveis de DNA.

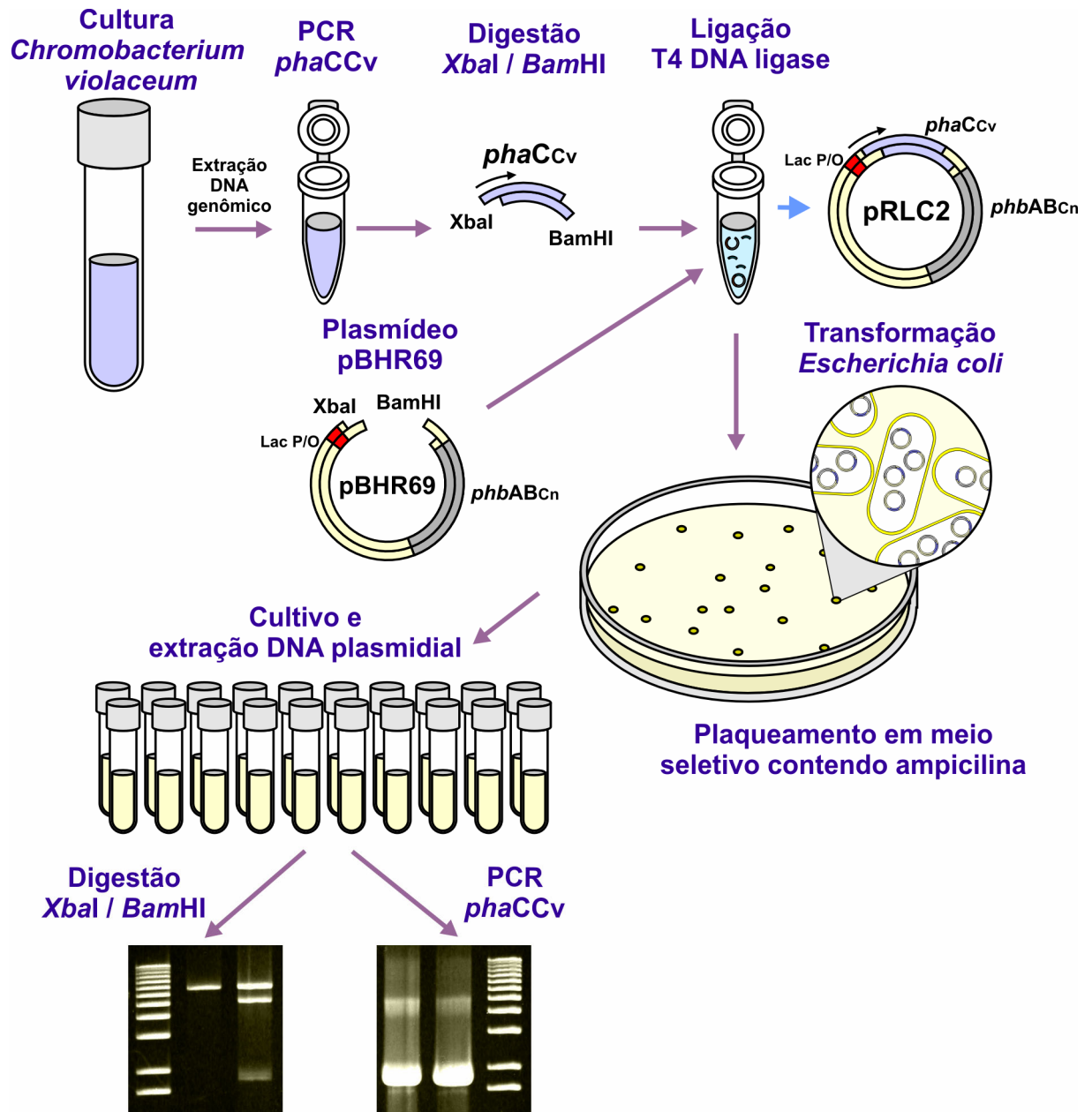


Figura 9: Ilustração esquemática do procedimento experimental adotado para clonagem do gene *phaC* de *Chromobacterium violaceum* e obtenção da *Escherichia coli* recombinante.

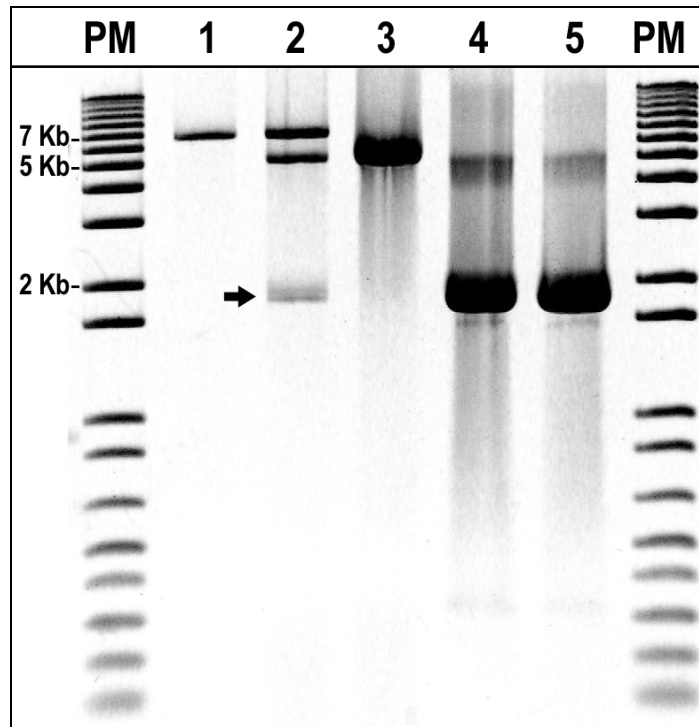


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose. 1) Plasmídeo pRLC2 digerido com *Bam*HI. 2) Plasmídeo pRLC2 digerido com *Bam*HI e parcialmente com *Xba*I. A seta indica o fragmento clonado removido do plasmídeo pela dupla digestão. 3) Plasmídeo pBHR69. 4) Gene *phaC<sub>Cv</sub>* amplificado a partir do plasmídeo pRLC2. 5) Gene *phaC<sub>Cv</sub>* amplificado a partir do DNA genômico de *Chromobacterium violaceum*. PM = marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

As linhagens de *E. coli* JM101 e DH5 $\alpha$  foram transformadas com o plasmídeo pRLC2 para expressão heteróloga da enzima e conseqüente produção e acúmulo de PHA. Uma abordagem similar à adotada neste trabalho para a síntese de PHA em *E. coli* foi proposta por Piemolini (2004). A estratégia proposta neste trabalho difere essencialmente pelo posicionamento do iniciador direto a montante daquele proposto anteriormente, permitindo a inserção do gene de maneira distinta de forma que a tradução seja regulada pelo sítio de ligação ao ribossomo do próprio gene *phaC<sub>Cv</sub>*, expressando assim a enzima provavelmente na sua seqüência nativa. No sistema proposto por Piemolini (2004), apenas a ORF considerada pelo consórcio do Projeto Genoma Nacional Brasileiro foi inserida no plasmídeo, resultando

teoricamente na expressão da enzima fusionada a um pequeno fragmento da  $\beta$ -galactosidase na sua porção N-terminal e sem o fragmento adicional de 23 aa proposto neste trabalho.

### 3.1.3 Produção heteróloga de PHA em *E. coli*

Os polímeros foram quantificados a partir da linha de tendência obtida conforme descrito nos materiais e métodos (figura 11). O valor de R quadrado próximo de 1 indica uma boa correlação para quantificação.

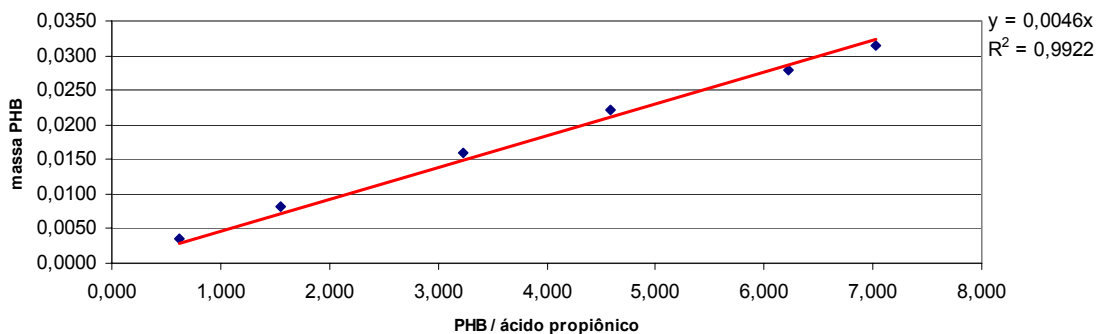


Figura 11: Linha de tendência para quantificação do PHB nas amostras. O valor  $R^2$  próximo de 1 demonstra uma boa correlação entre as duas variáveis. A equação apresentada foi utilizada para quantificação, sendo “y” a massa de PHB e “x” a área do pico obtido na CG.

A figura 12 apresenta dois cromatogramas obtidos, representando uma amostra positiva para a presença de PHB e outra negativa. A ocorrência de atividade de PHA sintase, resultando no acúmulo de polímero em quantidade significativa, indica que a tradução ocorreu no quadro de leitura correto e que, portanto, a estratégia de inserção do códon de parada para a tradução da  $\beta$ -galactosidase no iniciador foi eficaz, uma vez que se ocorresse a tradução da PHA sintase fusionada ao fragmento da  $\beta$ -galactosidase, esta ocorreria em quadro de leitura incorreto.

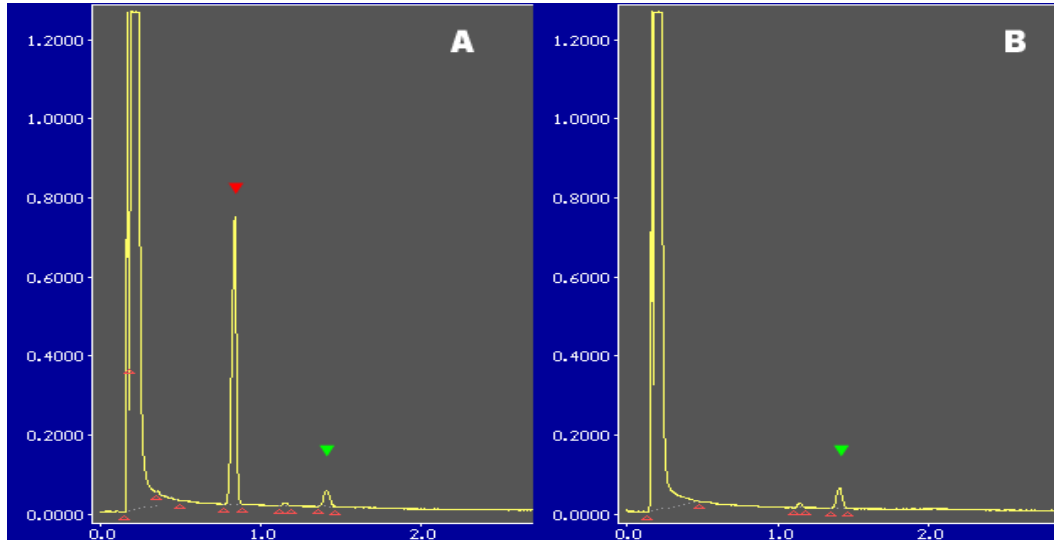


Figura 12: Cromatograma de duas amostras analisadas. (A) Amostra positiva para a presença de PBH, indicado pela seta vermelha (DH5 $\alpha$  com plasmídeo pRLC2 e sem adição de IPTG); (B) Amostra negativa para PBH (controle negativo). A seta verde indica o padrão interno de referência.

Como era esperado, verificou-se a dependência de IPTG nos cultivos com a linhagem JM101 e de expressão constitutiva dos genes na linhagem DH5 $\alpha$  (Tabela 6), demonstrando que o gene está tendo a sua regulação da transcrição mediada pelo promotor Lac do vetor.

Tabela 6: Resultados observados quanto ao acúmulo de polímero nas linhagens transformadas.

	Massa celular seca (g·L <sup>-1</sup> )	Quantidade de PHA (g·L <sup>-1</sup> )	% PHA·MCS <sup>-1</sup>
JM101 / IPTG (+)	1,154	0,342	29,6%
JM101 / IPTG (-)	0,825	0,021	2,5%
DH5 $\alpha$ / IPTG (+)	1,523	0,641	42,6%
DH5 $\alpha$ / IPTG (-)	1,493	0,624	42,1%

A linhagem DH5 $\alpha$  apresentou um maior acúmulo de massa seca e um conteúdo relativo de polímero superior ao observado na linhagem JM101. As duas linhagens diferem entre si em relação aos níveis de expressão do repressor LacI, responsável pela repressão da

expressão do promotor Lac na ausência de lactose. DH5 $\alpha$  apresenta níveis normais de expressão deste repressor, ao passo que a linhagem JM101 apresenta níveis aumentados de expressão. Na linhagem DH5 $\alpha$ , a não-dependência de IPTG (um análogo da lactose) para ativar a expressão dos genes clonados se deve ao grande número de cópias do plasmídeo na célula e à quantidade de repressor expressa constitutivamente ser insuficiente para reprimir a expressão de todos os promotores. No entanto, em linhagens que apresentam expressão aumentada do repressor, como na linhagem JM101, a utilização de IPTG é necessária para que ocorra a ativação da transcrição. Estes resultados confirmam a inclusão do gene sob regulação do promotor Lac do vetor e evidenciam claramente que a PHA sintase de *C. violaceum*, assim como outras PHA sintases, apresenta atividade aparentemente normal em *E. coli*, podendo ser utilizada no desenvolvimento de sistemas heterólogos para produção de biopolímeros.

Na Figura 13 pode-se observar o acúmulo de PHA na linhagem DH5 $\alpha$  carregando o plasmídeo pRLC2. A utilização de Vermelho do Nilo permite a detecção dos PHA acumulados *in vivo* através da visualização da fluorescência emitida sob luz UV quando ligado os polímeros.

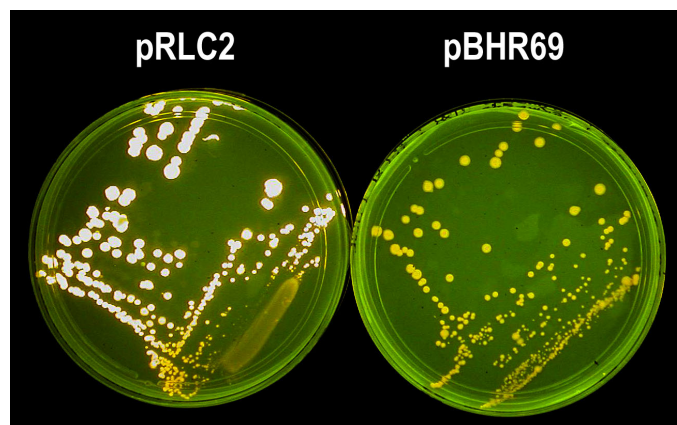


Figura 13: Cultivo de *Escherichia. coli* DH5 $\alpha$  recombinante carregando os plasmídeos pRLC2 e pBHR69 em meio LB. Como substrato para a síntese de PHA foi utilizado glicose a 2% e para visualização do polímero em UV utilizou-se Vermelho do Nilo na concentração de 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

## 3.2 Análise da seqüência e modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum*

### 3.2.1 Análise da seqüência

A seqüência utilizada para análise estrutural corresponde àquela disponível pela base de seqüências curadas UNIPROT (número de acesso primário Q9ZHI2), acrescida de 23 aminoácidos na extremidade N-terminal, conforme discutidos na seção 3.1.1 (representados abaixo em caixa baixa):

```

.....|.....|.....|.....|.....|
lsqnstaalegffaslseanqqwMQQFVNSLSQPPAPDGAAHPFAGAWAQ 50
LMNQTNQLFALQSSLYQQQLNLWSQFLGQAAGQEAAAEEAGAKPADRRFAS 100
PEWNEHPFYNFLKQSYLQTSKWMMELVDKTQLDEDAKDKLAFATRQYLDA 150
MSPSNFMLTNPDVVKRAIETKGESLVEGMKNMLDDFQKGHISMSDESKFE 200
IGKNLVVTPGQVVFERNELIELIQYTPTTDKVYEKPLLFPVPPCINKYYLMD 250
LQPDNSMVRHFVAQGYRVFLISWRSAVAEMKHFTWETYIEKGVFAAAEAV 300
QKITKQPTMNVLGFCVGGVILTALCVAQAKGLKYFDSATFMTSLIDHAE 350
PGEISFFIDESVVAGREAKMASGGIISGKEIGRTFASLRANDLVWNYVVN 400
NYLLGKTPAPFDLLFWNNDVLDLPLMHTFLLRQFYMNALVRPGAITLC 450
GVPIDIADKIDVPVYMFAARDHIVLWSSAFSGLKYLQGAPSRRFVLGASG 500
HIAGSINPVTKDKRNYWANDTLPLHAEWLESAESRPGSWWKDWDWLAP 550
QSGKQVAAPKSLGNKEFPPLLAAPGSYVLAKAMPSVAASLQ* 591

```

A submissão da seqüência a uma busca simples no BLASTP demonstra que a PHA sintase de *C. violaceum* está relacionada estruturalmente às PHA sintases de espécies dos gêneros *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Azoarcus*, *Dechloromonas* e outras PHA sintases da classe I, estando, portanto, relacionada à síntese de PHA<sub>scl</sub>. Apresenta um domínio



característico do tipo  $\alpha/\beta$ -hidrolase em sua metade C-terminal, onde há um motivo característico de lipases denominado “box” lipase, representado pela seqüência G-X-S/C-X-G. Nas lipases a base catalítica está representada por uma serina, enquanto que nas PHA sintases a base catalítica corresponde a uma cisteína.

O alinhamento pseudomúltiplo obtido com auxílio do PSI-BLAST evidencia também a existência de uma região não conservada na extremidade N-terminal da enzima, correspondendo na PhaC<sub>Cv</sub> aos 95 resíduos iniciais. Esta região está formada essencialmente por resíduos neutros, apresentando apenas 6 resíduos com carga, sendo 5 carregados negativamente dispersos pela seqüência e um carregado positivamente já vizinho à região conservada.

### **3.2.2 Predição da estrutura secundária**

A predição da estrutura secundária confirma a estrutura  $\alpha/\beta$ -hidrolase. A região N-terminal da proteína está formada por duas  $\alpha$ -hélices mais extensas. A seqüência N-terminal sugerida neste trabalho, segundo estes resultados, participa na formação da primeira  $\alpha$ -hélice da enzima (Figura 14).



### 3.2.3 Seleção dos moldes

A submissão da seqüência ao SWISS-MODEL não retornou resultado devido à baixa similaridade da PHA sintase com as proteínas disponíveis com estrutura resolvida. No entanto, buscas realizadas utilizando o método de compatibilidade seqüência-estrutura (método *threading*) através da base de dados on-line 3D-PSSM apontam para as lipases gástricas canina e humana, 1k8q e 1hlg, respectivamente, como as estruturas mais adequadas para o processo de modelagem. Alinhamentos iterativos com PSI-BLAST também confirmam estes resultados sugeridos pelo 3D-PSSM. Apenas a região do domínio  $\alpha/\beta$ -hidrolase compreendida entre os resíduos 219 a 502 apresentou similaridade estrutural suficiente para permitir a construção do modelo estrutural.

A Tabela 7 apresenta os graus de identidade e similaridade encontrados para a região modelada da PhaC<sub>Cv</sub> em relação às duas lipases gástricas. De uma forma geral, é recomendável a utilização de métodos *threading* quando o grau de identidade for inferior a 25% (FILHO E ALENCASTRO, 2003).

Tabela 7: Valores de identidade e similaridade obtidos em alinhamento CLUSTALW entre as seqüências das lipases 1k8q e 1hlg com a PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* (matriz PAM120).

	<b>1hlgA</b>	<b>1k8qA</b>
<b>Identidade com PhaC<sub>Cv</sub></b>	16,6%	14,3%
<b>Similaridade</b>	32,8%	32,7%

As lipases 1k8q e 1hlg, com resolução de 2,7 e 3,0 Å, respectivamente, apresentam elevado grau de identidade entre si como pode ser observado pela sobreposição dos modelos (Figura 15). No entanto, a estrutura 1hlg representa a lipase em seu estado inativo (sítio catalítico bloqueado) enquanto que a 1k8q representa a sua forma ativa uma vez que foi

cristalizada complexada a um inibidor fosfonato. Assim, optou-se pela obtenção de dois modelos: um obtido a partir da forma inativa da lipase (1hlg) e outro obtido a partir de sua forma ativa (1k8q).



Figura 15: Sobreposição dos modelos cristalográficos das lipases gástricas canina (1k8qA) e humana (1hlgA) demonstrando a grande similaridade estrutural entre as duas proteínas.

Além destes resultados, outros aspectos fundamentam a utilização de lipases como modelo estrutural para as PHA sintases (JIA *et al.*, 2000; STUBBE *et al.*, 2005):

- a) Lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis e, em solventes orgânicos, podem catalisar a formação de ligações éster como as PHA sintases;
- b) Ativação interfacial possivelmente presente também em PHA sintases;
- c) Ambas pertencem à família  $\alpha/\beta$ -hidrolase;
- d) Apresentam motivo similar: base catalítica ativada por uma histidina - cisteína nas PHA sintases e serina nas lipases (lipase “box”: G-X-C/S-X-G).

### 3.2.4 Alinhamento e modelagem

Foi utilizado o alinhamento por compatibilidade seqüência-estrutura (*threading*) fornecido pelo 3D-PSSM para orientar o processo de modelagem. O 3D-PSSM considera a estrutura secundária consenso entre as predições PSIPRED, JNET e SSPO para orientar o alinhamento com a estrutura da proteína molde. Como o método prioriza o alinhamento de estruturas ao alinhamento das seqüências, os valores de identidade e similaridade obtidos são inferiores àqueles obtidos no alinhamento convencional utilizando CLUSTALW (Tabela 8). No entanto, os resultados obtidos na modelagem são mais satisfatórios do que aqueles obtidos com alinhamento convencional, observando-se inclusive o alinhamento do aspartatos catalíticos das duas enzimas (Figura 16), fato não verificado nos alinhamentos com CLUSTALW.

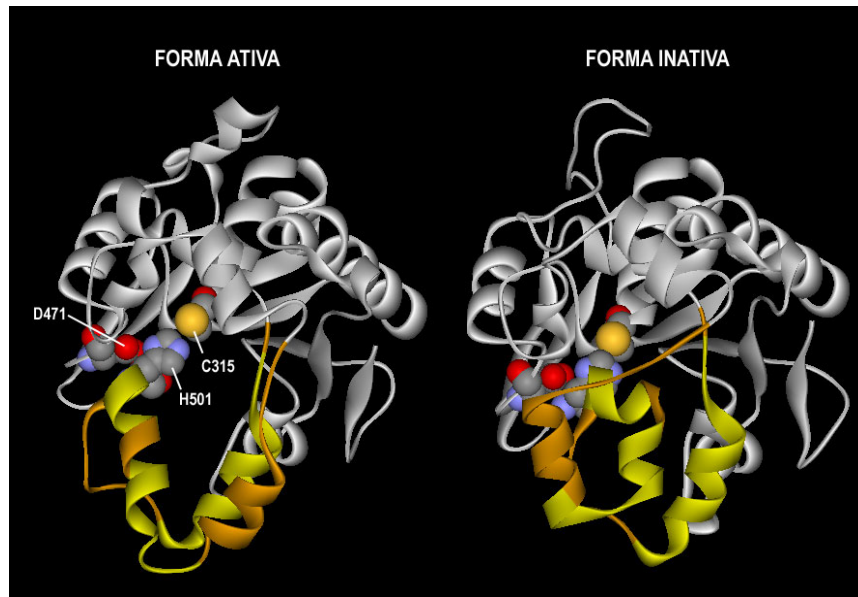
Tabela 8: Valores de identidade e similaridade obtidos em alinhamento 3D-PSSM entre as seqüências das lipases 1k8q e 1hlg com a PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* usando método de compatibilidade seqüência-estrutura (Matriz PAM 120).

	<b>1hlgA</b>	<b>1k8qA</b>
<b>Identidade com PhaC<sub>Cv</sub></b>	9,7%	10,1%
<b>Similaridade</b>	27,0%	27,4%

Ambas as modelagens geradas resultaram em estruturas satisfatórias, indicando que as PHA sintases podem também possuir um mecanismo de ativação do sítio catalítico similar ao das lipases. A estrutura responsável por este mecanismo, segundo os modelos obtidos, está constituída por  $\alpha$ -hélices e está representada pelos resíduos 324 a 417 na PhaC de *C. violaceum* (Figura 17). O processo de ativação/inativação se daria através de mudanças conformacionais ocorridas nesta região da enzima e que resultariam teoricamente na



(a)



(b)

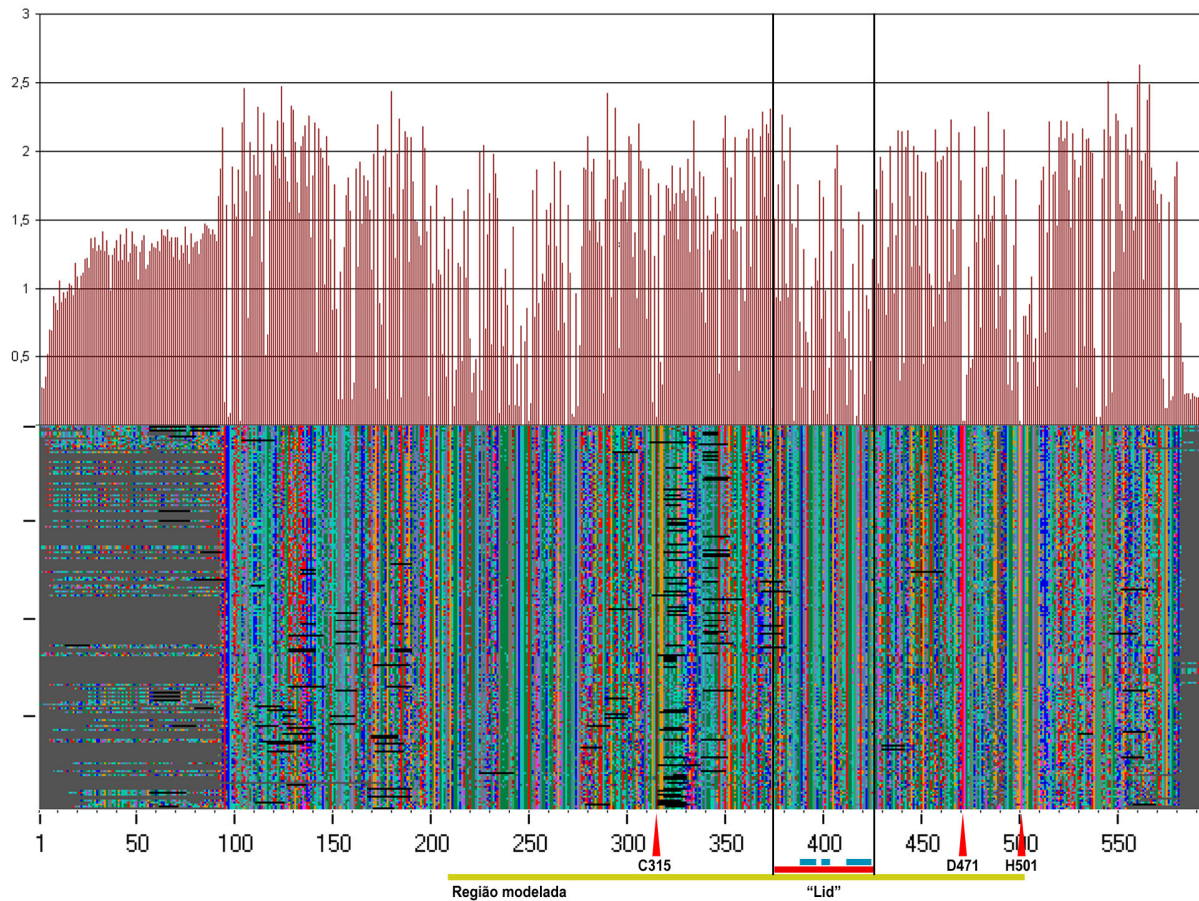


Figura 17: a) Estrutura teórica obtida para a PHA sintase de *Chromobacterium violaceum*. b) Gráfico da entropia (Hx) e bitmap (1pixel / resíduo) do alinhamento PSI-BLAST para a PhaC<sub>Cv</sub>. A barra horizontal amarela corresponde à região modelada, a barra vermelha corresponde à região que controla a abertura/fechamento do sítio catalítico (“lid”) no modelo obtido. As barras em azul correspondem a regiões mais conservadas na região do “lid”, destacadas em amarelo mais claro nos modelos acima (a).

Observou-se também a ocorrência no modelo de uma tríade catalítica orientada de modo muito similar àquela observada em lipases e outras enzimas da família (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2001), correspondendo aos resíduos C315, D471 e H501 (Figura 18). De acordo com este modelo, o aspartato D471 estaria possivelmente atuando também na estabilização histidina H501, responsável por sua vez pela ativação da cisteína catalítica C315 para o ataque nucleofílico ao substrato. Segundo os modelos atualmente propostos para a síntese de PHA, o aspartato estaria relacionado apenas à ativação da hidroxila durante a síntese do polímero (seção 1.3.1.1 ).

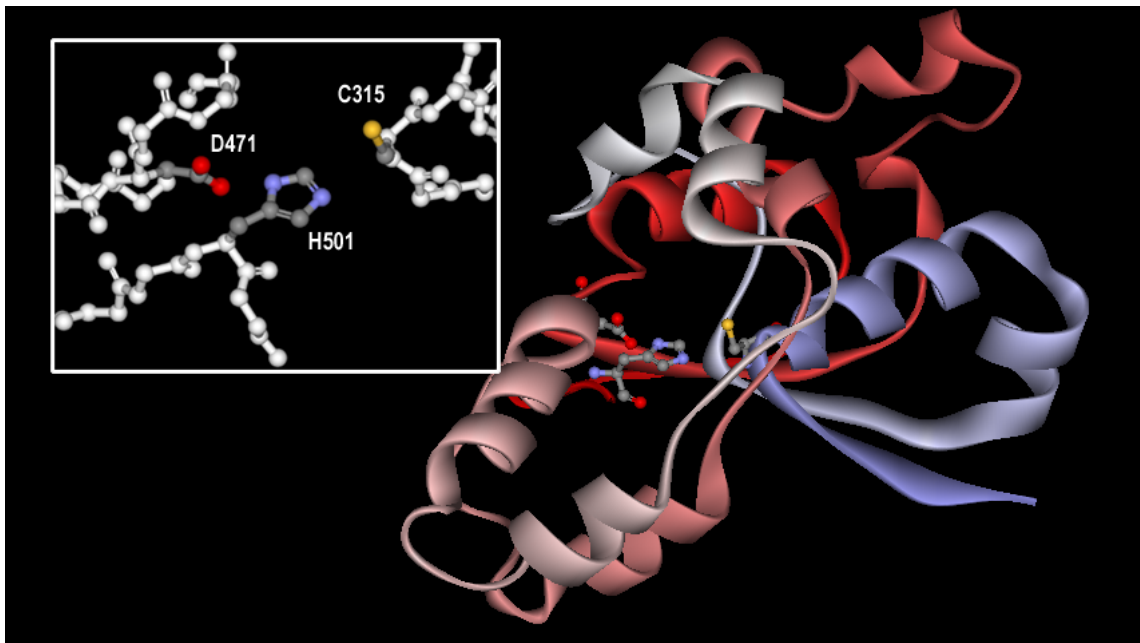


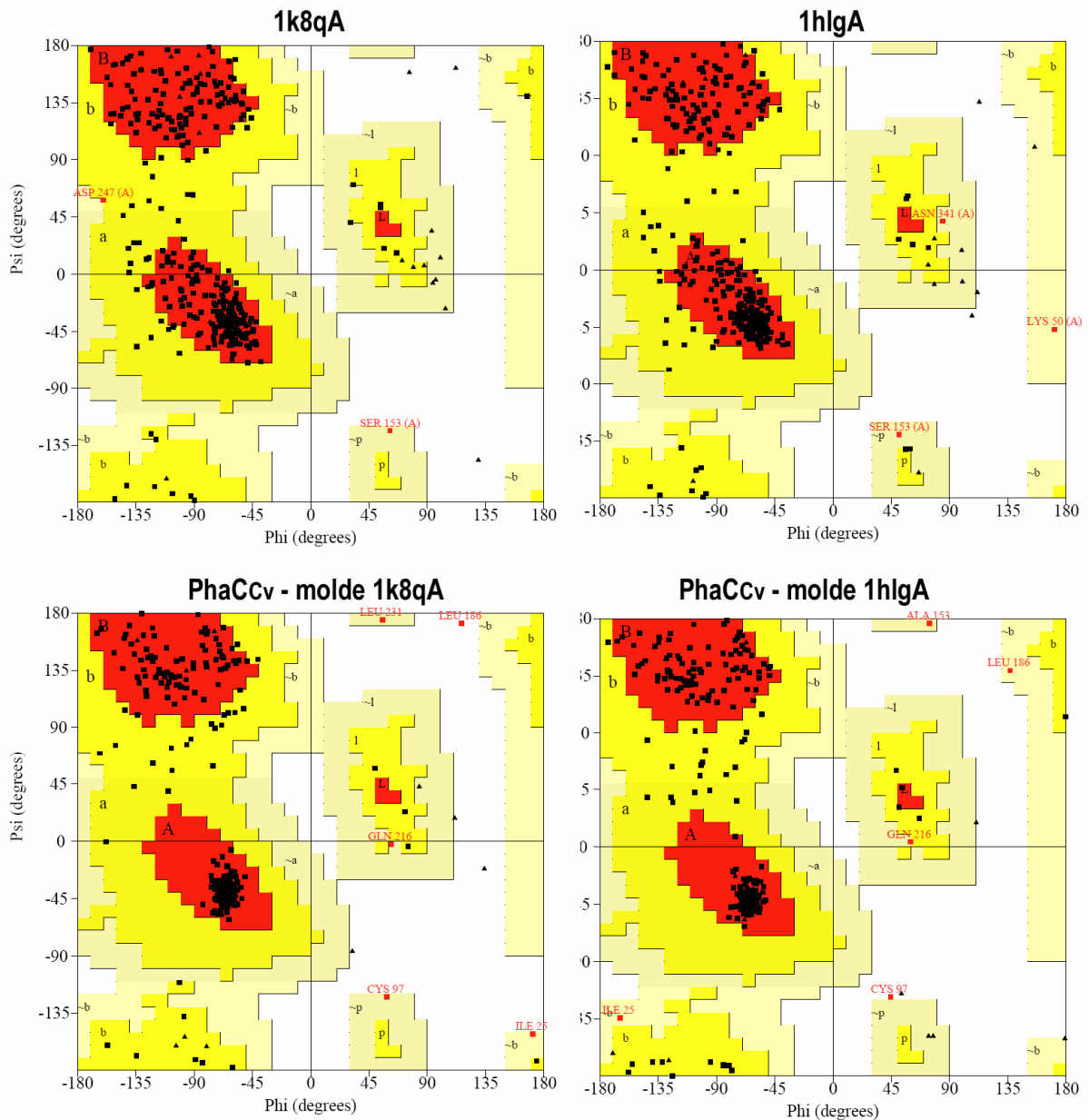
Figura 18: Tríade catalítica observada nos modelos obtidos para a PhnC de *Chromobacterium violaceum*.

### 3.2.5 Avaliação do modelo

A avaliação dos modelos obtidos com o auxílio do programa PROCHECK demonstra que os resultados obtidos são satisfatórios em relação à estrutura estereoquímica. O gráfico de Ramachandran, que avalia os ângulos de torção das ligações *phi* e *psi* nos resíduos da cadeia peptídicas, demonstra que apenas um número reduzido de resíduos não ocorrem em



posições favoráveis, sendo os resultados comparáveis àqueles obtidos para as estruturas moldes (Figura 19). Os gráficos de Ramachandran para os resíduos de glicina e prolina também apresentaram bons resultados (Figura 20).



Regiões do gráfico	1k8qA	1hlgA	PhaC <sub>Cv</sub> molde 1k8qA	PhaC <sub>Cv</sub> molde 1hlgA
Favorável	278 (84 %)	276 (85,2 %)	209 (84,3 %)	211 (85,1 %)
Permitida	51 (15,4 %)	45 (13,9 %)	34 (13,7 %)	32 (12,9 %)
Permissível	2 (0,6 %)	3 (0,9 %)	4 (1,6 %)	4 (1,6 %)
Não permitida	0	0	1 (0,4 %)	1 (0,4 %)
Total	331 (100 %)	324 (100 %)	248 (100 %)	248 (100 %)

Figura 19: Gráficos de Ramachandran para os moldes utilizados e modelos gerados.

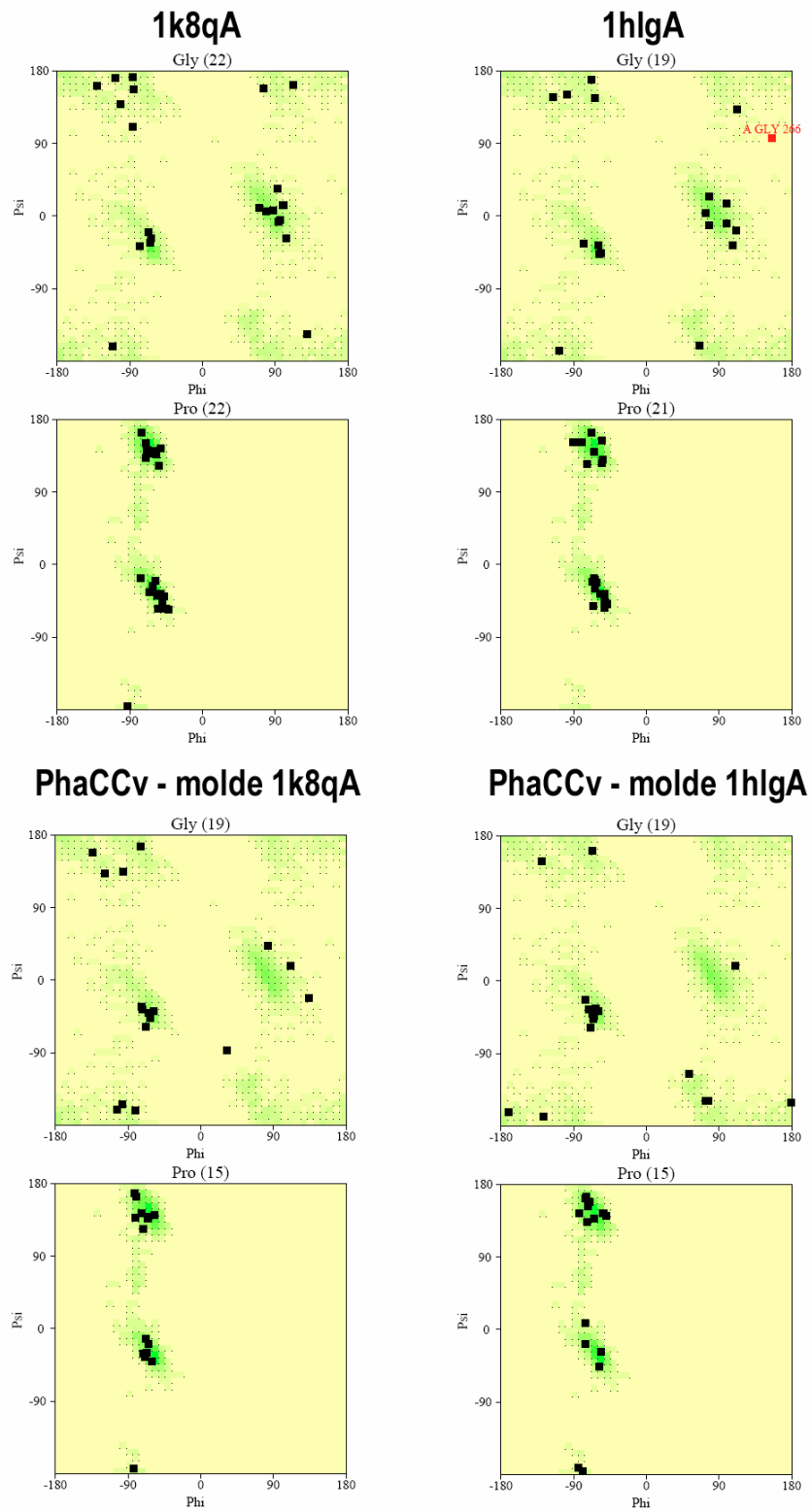


Figura 20: Gráfico de Ramachandran para os resíduos de glicina e prolina para os moldes utilizados e modelos gerados.

## Capítulo 4

### Conclusões

Diferentemente do sugeriram trabalhos anteriores de Kolibachuk *et al.* (1999) e Piemolini (2004), a PHA sintase de *C. violaceum*, assim como as PHA sintases de outras espécies, apresenta atividade aparentemente normal em *E. coli*, podendo ser utilizada para o desenvolvimento de sistemas heterólogos para produção de PHA nestas bactérias.

A posição do ponto de início da tradução do gene *phaC<sub>Cv</sub>* atualmente considerado possivelmente não corresponda à posição real. Dados provenientes da análise da seqüência genômica na região do gene e, em parte, os dados experimentais deste trabalho, sugerem que o início da tradução poderia estar ocorrendo a montante daquele considerado atualmente, adicionando 69 pb à extremidade 5' do gene. Mais dados experimentais, porém, são necessários para que se possa esclarecer com precisão a estrutura da região inicial do gene da PHA sintase de *C. violaceum*.

No sistema proposto neste trabalho, a inserção do gene sob regulação do promotor Lac do plasmídeo foi eficaz, permitindo a manipulação da expressão da PHA sintase com o uso do indutor de expressão IPTG quando em linhagem de *E. coli* adequada para esta finalidade (expressão aumentada do repressor LacI). Os resultados sugerem que os outros dois genes previamente clonados no plasmídeo (*phaA<sub>Cn</sub>* e *phaB<sub>Cn</sub>*) aparentemente não tiveram sua expressão prejudicada pela inserção do gene *phaC<sub>Cv</sub>*, uma vez que houve produção satisfatória de polímero.

A análise estrutural da enzima corrobora em parte os resultados encontrados por Piemolini (2004), caracterizando-se claramente como uma enzima do tipo  $\alpha/\beta$ -hidrolase. No entanto, nos modelos estruturais obtidos neste trabalho, a disposição da tríade catalítica de forma similar àquela observada em lipases sugere que o aspartato catalítico possa também

participar do mecanismo de ativação da cisteína para o ataque nucleofílico durante a formação da ligação covalente enzima-substrato para a biossíntese de polímero.

A análise estrutural revelou também a presença de uma região conservada provavelmente relacionada a um possível mecanismo de ativação interfacial da enzima, que exporia o sítio catalítico quando em contato com a superfície hidrofóbica do grânulo.

## Capítulo 5

### Referências Bibliográficas

AKIYAMA, M.; TSUGE, T.; DOI, Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. **Polymer Degradation and Stability**, v.80, p.183–194. 2003.

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, *et al.* Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p.403-410. 1990.

ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25, p.3389-3402. 1997.

AMARA, A. A.; REHM, B. H. A. Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. **Biochem. J.**, v.374, p.413–421. 2003.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v.54, n.4, p.450-472. 1990.

ANTONIO, R. V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.182, p.111-117. 2000.

BERG, J. M.; TYMOCZKO; STRYER, L. **Biochemistry**. 5ed. New York: W.H. Freeman and Company. 2001

BRANDL, H. *et al.* *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(b-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.8, p.1977-1982. 1988.

\_\_\_\_\_. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, v.41, p.77-93. 1990.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v.65, p.127–161. 1998.

BRENDEL, V., P. BUCHER, *et al.* Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.2002-2006. 1992.

- BURDEN, S., LIN Y. X., *et al.* Improving promoter prediction for the NNPP2.2 algorithm: a case study using *Escherichia coli* DNA sequences. **Bioinformatics**, v.21, n.5, p.601-607. 2005.
- CHEN, G.-Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v.26, p.6565-6578. 2005.
- CHENG, J., A. RANDALL, *et al.* SCRATCH: a Protein Structure and Structural Feature Prediction Server. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.72-76. 2005.
- CHOI, J.-I.; LEE, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4363-4368. 1999.
- CHOI, J.-I.; LEE, S. Y.; HAN, K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.4897-4903. 1998.
- CUFF, J. A. E G. J. BARTON. Application of enhanced multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. **Proteins**, v.40, p.502-511. 1999.
- BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **PNAS**, v.100, n.20, p.11660-11665. 2003.
- FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. D. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim. Nova**, v.26 n.2, p.253-259. 2003.
- GROSS, R. A.; KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. **SCIENCE**, v.297 2002.
- GUERMEUR, Y. **Combinaison de classifieurs statistiques, application à la prédiction de la structure secondaire des protéines**. Université Paris, Paris. 1997.
- GUEX, N. E M. C. PEITSCH. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, p.2714-2723. 1997.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v.166, p.557-580. 1983.
- JIA, Y. *et al.* Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. **Biochemistry**, v.11, n.39(14), p.3927-3936. 2000.
- JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J. Mol. Biol.**, v.292, p.195-202. 1999.
- \_\_\_\_\_. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. **J. Mol. Biol.**, v.287, p.797-815. 1999b.

KALENDAR, R. FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. 2007. ([www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm))

KELLEY, L. A., R. MACCALLUM, *et al.* **Recognition of Remote Protein Homologies Using Three-Dimensional Infation to Generate a Position Specific Scoring Matrix in the program 3D-PSSM.** RECOMB 99, Proceedings of the Third Annual Conference on Computational Molecular Biology. New York: The Association for Computing Machinery. 218-225 p. 1999.

KICHISE, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2411–2419. 2002.

KNELLER, D. G., F. E. COHEN, *et al.* NN-PREDICT - Neural Network based secondary structure prediction. **J. Mol. Biol.**, v.214, p.171-182. 1990.

KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, Molecular Analysis, and Expression of the Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase (phaC) Gene from *Chromobacterium violaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3561–3565. 1999.

LANGENBACH, S.; REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas earuginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.150, p.303-309. 1997.

LASKOWSKI, R. A., M. W. MACARTHUR, *et al.* PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v.26, p.283-291. 1993.

LEE, S. Y.; CHOI, J.-I.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p.31-36. 1999.

LEWIN, B. **GENES VIII.** Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall. 2004.

LUKASHIN, A. V.; BORODOVSKY M. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. **Nucleic Acids Res.**, v.26, n.4, p.1107-1115. 1998.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Reviews**, v.63, n.1, p.21–53. 1999.

MAEHARA, A. *et al.* A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.14, p.3992–4002. 2002.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v.20, n.15, p.2471-2472. 2004.



- MATSUMOTO, K. I. *et al.* Synergistic effects of Glu130Asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight. **Biomacromolecules**, v.6, p.99-104. 2005.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.2, p.585–592. 1999.
- NIAMSIRI, N. *et al.* Engineering of chimeric class II polyhydroxyalkanoate synthases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p.6789-6799. 2004.
- NONATO. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.57, n.(1-2), p.1-5. 2001
- OJUMU, T. V.; YU, J.; SOLOMON, B. O. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.18-24. 2004.
- PARK, S. J.; CHOI, J.-I.; LEE, S. Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.579–588. 2005.
- PETERS, V.; REHM, B. H. A. In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. **FEMS Microbiology Letters** v.248, p.93–100. 2005.
- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- PÖTTER, M. *et al.* The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology**, v.150, p.2301–2311. 2004.
- PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. **Biomacromolecules**, v.6, p.552-560. 2005.
- QI, Q.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid L-oxidation by acrylic acid. **FEMS Microbiology Letters**, v.167, p.89-94. 1998.
- RAMACHANDRAN, G. N. *et al.* Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v.7, p.95-99. 1963.
- REDDY, C. S. K., *et al.* Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v.87, p.137-146. 2003.
- REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v.376, p.15-33. 2003.

REHM, B. H. A., *et al.* Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1594, p.178-190. 2002.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p.3-19. 1999.

ROSSI, S.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.1013-1018. 2004.

ŠALI, A. E T. L. BLUNDELL. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v.234, p.779-815. 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3ed. New York: Cold Spring Harbor. 2001

SLATER, S.; GALLAHER, T.; DENNIS, D. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Applied and environmental microbiology**, v.58, n.4, p.1089-1094. 1992.

SLATER, S. *et al.* Multiple b-ketothiolases mediate poly(b-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.8, p.1979–1987. 1998.

SPIEKERMANN, P. *et al.* A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch Microbiol**, v.171, p.73-80. 1999.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. D. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)por bactérias. **Quim. Nova**, v.27, n.4, p.615-622. 2004.

STEINBÜCHEL, A. *et al.* Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v.39, p.443-449. 1993.

\_\_\_\_\_. Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.177-182. 1998.

STEINBÜCHEL, A.; LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.81-96. 2003.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. MiniReview: Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v.128, p.219-228. 1995.

STEPHENS, C. Microbial genomics: Tropical treasure? **Current Biology**, v.14, p.R65–R66. 2004.

STUBBE, J. *et al.* Nontemplate-dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a Paradigm. **Annu. Rev. Biochem.**, v.74, p.433-480. 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v.25, p.1503-1555. 2000.

THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, *et al.* 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v.22, p.4673-4680.

WAHAB, H. A. *et al.* Sequence analysis and structure prediction of type II *Pseudomonas* sp. USM 4-55 PHA synthase and an insight into its catalytic mechanism. **BMC Structural Biology**, v.6, n.23. 2006.

YORK, G. M. *et al.* Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.14, p.4217 - 4226. 2001.