

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química  
Grupo de Engenharia Genômica

**Modelagem Estrutural da PHA Sintase de  
*Chromobacterium violaceum* para Estudos de Mutação  
Sítio-Dirigida**

LUCIANI TATSCH PIEMOLINI  
Engenheira de Alimentos

Dissertação submetida à  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)  
Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antônio (BQM/UFSC)

Florianópolis, SC, 19 de fevereiro de 2004

# **Modelagem Estrutural da PHA Sintase de *Chromobacterium violaceum* para Estudos de Mutação Sítio-Dirigida**

por

**Luciani Tatsch Piemolini**

Essa dissertação foi julgada para a obtenção do título de  
**Mestre em Engenharia Química**

Especialidade **Engenharia Química**

Área de Concentração  
**Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Vasconcellos Antônio  
Co-Orientadora

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Vasconcellos Antônio  
Co-Orientadora

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
Membro interno

---

Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima  
Membro externo

**Florianópolis, SC, 19 de fevereiro de 2004**

*Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal de Santa Catarina. Parte desta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Física Biológica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – na Universidade Federal do Rio de Janeiro.*

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Walter e Núria, e ao meu noivo, Flávio, por todo amor e carinho transmitidos nos momentos em que meus objetivos pareciam tão distantes e inatingíveis.*

## Agradecimentos

Ao professor Luismar Porto, pela orientação e por ter me confiado a realização deste trabalho;

À professora Regina Antônio, pela co-orientação, amizade e pela incansável ajuda, compreensão e dedicação;

Ao professor Paulo Bisch, pela acolhida em seu laboratório, no Rio de Janeiro;

Minha especial e sincera gratidão àquela que sempre recordarei com bastante carinho, por sua disponibilidade em me ajudar, minha amiga Shaila;

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia, na figura do professor Edmundo Grisard, pelas diferentes formas de contribuição dadas a este trabalho;

À Coordenadoria de Pós-Graduação em Engenharia Química, e ao Edivilson, pelo carinho;

Àqueles que sempre serão o motivo de minha andança e exemplos de vida e persistência em meus ideais, MEUS PAIS;

Ao meu noivo, Flávio, pelo seu apoio e incentivo, pela paciência, que mesmo longe esteve sempre ao meu lado;

Aos colegas do laboratório, IntelLAB e LBBMM, pelo convívio ao longo destes dois anos, e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Um carinho especial aos amigos: Derce, Claudimir, Cris e Artiva;

Ao Cauê, pelos cansativos dias de experimentos e pelas palavras de consolo quando tudo parecia desabar;

À minha amiga Tati, pelo carinho e por me ouvir quando eu precisei desabafar nos momentos mais difíceis. Também à Mel, pelo carinho e amizade;

Aos meus amigos, em especial aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, entre eles, Rodrigo e Ariane;

Aos colegas de turma, Rafael, Débora, Isaura, Marcelo, Letícia e Dirlei, pela amizade;

À professora Eliana Furlong, pela amizade que temos desde a graduação.

## Resumo

Uma classe de polímeros bacterianos que se destaca pela proximidade de suas características com as de plásticos de origem petroquímica são os polihidroxialcanoatos (PHA's). PHA sintases são enzimas chave para a biossíntese destes polímeros. A PHA sintase de *Chromobacterium violaceum*, que é do tipo I, utiliza como substrato hidroxiaçil-CoA (HA-CoA) de 3 a 5 carbonos, enquanto a PHA sintase do tipo II de *Pseudomonas aeruginosa*, utiliza HA-CoA contendo de 6 a 14 carbonos. Com o objetivo de modificar a especificidade da PHA sintase de *C. violaceum*, buscou-se determinar sítios específicos para mutação, por técnica de DNA recombinante, de maneira a torná-la capaz da biossíntese de copolímeros contendo HA's de cadeia curta e média. O conhecimento da estrutura terciária, e particularmente, do sítio ativo da proteína, é uma etapa importante para o estudo de possibilidades de mudança de sua especificidade. Com base neste propósito, o modelo teórico para a PHA sintase de *C. violaceum* foi obtido através das técnicas de modelagem por homologia, utilizando-se uma lipase gástrica humana como referência (Depositada no PDB, *Protein Data Bank*, com o código de acesso 1HLG). O modelo foi desenvolvido baseado no alinhamento entre as seqüências primárias da PHA sintase de *C. violaceum* e *P. aeruginosa*, e a lipase, e validado através do gráfico de Ramachandran, apresentando 94% e 96% dos resíduos modelados com ângulos espacialmente possíveis, respectivamente para *C. violaceum* e *P. aeruginosa*. A estrutura 3D resultante apresenta uma díade catalítica composta pelos aminoácidos C292 e H478. O aminoácido D448, proposto como uma base geral catalítica que ativa o grupamento 3-hidroxil do HB-CoA para formar o intermediário tioéster pode, na verdade, ter o papel de auxiliar no transporte do substrato e na estabilização do estado de transição. Não foi possível confirmar que este faz parte de uma tríade catalítica, conforme sugerido na literatura. Os resultados obtidos pela modelagem da estrutura serviram de base para a escolha de mutações sítio-específicas, testadas neste trabalho. O gene *phaC<sub>Cv</sub>* do genoma da *C. violaceum* (ATCC12472) foi amplificado por PCR, utilizando-se um par de oligonucleotídeos complementares às extremidades 3' e 5' do gene *phaC* contendo sítios de restrições apropriados à ligação ao vetor. O plasmídeo pBHR69 continha, além do gene de resistência à ampicilina, os genes *phaA* e *phaB*, codificando para a β-cetotiolase e acetoacil-CoA redutase de *R. eutropha*, respectivamente. O produto de PCR foi purificado e ligado ao pBHR69 previamente digerido com SmaI/BamHI; uma alíquota da reação de ligação foi utilizada para transformar as células competentes DHα5<sup>TM</sup>-TR. Os transformantes foram selecionados através da utilização de meio agar LB contendo ampicilina. A sintase de *C. violaceum* clonada e expressa em *E. coli* produziu PHB, e a diferença na produção de PHB pela PHA sintase não mutada e nos mutantes sugere uma possível mudança na afinidade enzima-substrato.

## Abstract

An important class of bacterial polymers that calls attention for its similarities with plastics from petrochemical origin is of the polyhydroxyalcanoates (PHA's). PHA synthases are key enzymes for their biosynthesis. The PHA synthase of *Chromobacterium violaceum*, which is of type I, uses hydroxyacyl-CoA (HA-CoA) of 3 and 5 carbons, whereas the PHA synthase of type II of *Pseudomonas aeruginosa* uses HA-CoA with 6 to 14 carbon atoms. With the objective of modifying the specificity of the PHA synthase of *C. violaceum*, we tried particular sites where mutation would turned it into a producer of co-polymers having HA's of short and medium length. Knowledge of the tertiary structure and, particularly, of the active site of the protein is therefore of fundamental importance. A theoretical model for the PHA synthase of *C. violaceum* was obtained by homology modeling techniques, taking a human gastric lipase as a reference (PDB, *Protein Data Bank*, access code 1HLG). The model was developed based on the alignment between primary sequences of PHA synthases of *C. violaceum* and *P. aeruginosa* and the reference lipase. The models were validated by Ramachandran plots, resulting in 94% and 96% of their modeled residues, respectively, with possible feasible spatial angles for *C. violaceum* and *P. aeruginosa*. The structure of *C. violaceum* presents a catalytic dyad involving residues C292 and H478. The amino acid D448 has been proposed by others as a general catalytic base that activates the 3-hydroxyl group of HB-CoA to form a thiol ester intermediate. D448, however, may be only associated in the transport of the substrate to the catalytic site or playing a role in stabilizing the transition state; we were not able to confirm its place as a third amino acid in a catalytic triad. Specific mutation points have then been tested. The *phaCCv* was amplified from *C. violaceum* (ATCC12472) genomic DNA by PCR, using a pair of oligonucleotides primers complementary to the 5' and 3' ends of the gene. These primers had additionally the restriction sites ends (SmaI and BamHI) in order to enable its cloning into a plasmidial vector. The plasmid pBHR69 harboured, in addition to ampicilin resistance gene, *phaA* and *phaB*, encoding respectively 3-ketothiolase and NAPH dependent acetoacetyl-CoA reductase, from *Ralstonia eutropha*. The purified PCR product was ligated to previously SmaI/BamHI digested pBHR69. An aliquot of the ligation reaction was used to transform *Escherichia coli* DH $\alpha$ 5<sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup> competent cells. Agar LB medium plates containing ampicilin and glucose performed the cloning selection. Only the recombinant *E. coli* containing the plasmid pRLC (with the *phaC<sub>Cv</sub>* gene) was able to grow in that selective medium and to present an opaque phenotype. The PHA synthase of *C. violaceum* cloned and expressed in *E. coli* produced PHB and the difference in the production of PHB by PHA sintase from the not mutated and mutated clones, suggests possible changes in the affinity between the enzyme and its substrate.

# Sumário

CAPÍTULO I.....	1
Introdução, Motivação e Justificativa.....	1
CAPÍTULO II .....	5
Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Bioplásticos .....	5
2.2 Estrutura e Ocorrência dos Polihidroxialcanoatos .....	6
2.3 Histórico dos Polihidroxialcanoatos .....	7
2.4 Propriedades e Aplicações dos Polihidroxialcanoatos .....	8
2.5 Biossíntese de Polihidroxialcanoatos.....	10
2.5.1 $\beta$ -Cetotiolase.....	14
2.5.2 Acetoacetil-CoA redutase.....	15
2.5.3 PHA Sintase.....	15
2.6 <i>Chromobacterium violaceum</i> como Organismo Modelo.....	17
2.7 Determinação de Estruturas Terciárias .....	17
2.7.1 Principais Ferramentas utilizadas para Análise de Seqüências.....	21
2.7.1.1 Banco de Dados.....	22
2.7.1.2 Fontes de Estruturas Molde .....	25
2.7.1.3 Alinhamento de Seqüências.....	27
2.7.1.4 Modelagem por Homologia.....	29
2.7.1.5 Construção do Modelo.....	31
2.7.1.6 Validação do Modelo.....	32
CAPÍTULO III .....	35
Material e Métodos.....	35
3.1 Materiais.....	35
3.1.1 Cepas e Plasmídios utilizados .....	35
3.1.2 Meios de Cultivo.....	37
3.1.3 Soluções.....	38
3.1.4 Kits e Oligonucleotídios Empregados nos Experimentos .....	38
3.2 Métodos.....	38
3.2.1 Procedimento Computacional .....	38
3.2.1.1 Modelagem por Homologia.....	39
3.2.2 Procedimento com material biológico .....	42
3.2.2.1 Extração do DNA genômico de <i>C. violaceum</i> .....	43
3.2.2.2 Gel de Agarose para Eletroforese .....	43
3.2.2.3 Amplificação por PCR do gene de interesse .....	44
3.2.2.4 Purificação do DNA .....	44
3.2.2.5 Preparo de células competentes para transformação .....	45
3.2.2.6 Transformação de células competentes.....	45



3.2.2.7 Seleção dos transformantes.....	46
3.2.2.8 Extração de DNA plasmidial.....	46
3.2.2.9 Mutações sítio dirigidas .....	47
3.2.2.10 Produção de PHA's .....	49
3.2.2.11 Determinação da produção de PHA's .....	49
 CAPÍTULO IV.....	 50
Resultados e Discussão.....	50
4.1 PHA Sintase.....	50
4.2 Alinhamento das Seqüências .....	50
4.3 Modelagem da Estrutura.....	55
4.3.1 Identificação e Seleção da Proteína-Molde .....	55
4.3.2 Alinhamento das Seqüências .....	56
4.2.3 Construção do Modelo.....	58
4.2.4 Validação do Modelo .....	61
4.4 Mutações Sítio Dirigidas.....	64
 CAPÍTULO V .....	 69
Conclusões e Sugestões .....	69
5.1 Conclusões.....	69
5.2 Sugestões para trabalhos futuros .....	70
 CAPÍTULO VI.....	 71
Referências Bibliográficas .....	71

# Índice de Figuras

Figura 1: Fórmula geral de poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos (PHA's) (LEE, 1996b). 6	6
Figura 2: Grânulos de polihidroxialcanoatos (PHA's), (preparação e fotomicrografia eletrônica realizadas por Rita de Cássia Paro Alli, Agrupamento de Biotecnologia, DQ, IPT)..... 7	7
Figura 3: Degradação de P(3HB-co-3HV) em condições aeróbicas (MADISON e HUISMAM, 1999)..... 10	10
Figura 4: Exemplo de vias metabólicas para a produção de polihidroxibutirato a partir de diferentes substratos. .... 11	11
Figura 5: Via de biossíntese de P(3HB) em <i>R. eutropha</i> (Aaptado de DOI, 2000) ..... 12	12
Figura 6: Via de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de glicose e propionato apresentada por DOI (1990)..... 13	13
Figura 7: Crescimento exponencial do GenBank, mostrando o aumento acelerado de seqüências depositadas no banco de dados ( <a href="http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/genbankstats.html">http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/genbankstats.html</a> ; 28/01/04)..... 24	24
Figura 8: Esquema geral da modelagem de proteínas por homologia (Adaptado de MARTY-RENOM <i>et al.</i> , 2000) ..... 30	30
Figura 9: O grau de rotação na ligação entre os átomos de nitrogênio e carbono $\alpha$ da cadeia principal é chamado <i>phi</i> ( $\phi$ ), e a rotação na ligação entre o carbono $\alpha$ e o da carbonila é chamado <i>psi</i> ( $\psi$ ). ..... 33	33
Figura 10: Gráfico de Ramachandran mostrando os valores permitidos de $\phi$ e de $\psi$ (LASKOWSKI <i>et al.</i> , 1993). ..... 34	34
Figura 11: Plasmídio pBHR69. Na figura, <i>phaA</i> e <i>phaB</i> são genes codificando, respectivamente, para $\beta$ -cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase de <i>R. eutropha</i> . Amp: gene conferindo resistência à ampicilina. .... 36	36
Figura 12: Plasmídio pRLC construído neste trabalho. Na figura, <i>phaC</i> é o gene codificando para a PHA sintase de <i>C. violaceum</i> ; <i>phaA</i> e <i>phaB</i> são genes codificando, respectivamente, para $\beta$ -cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase de <i>R. eutropha</i> . Amp: gene conferindo resistência à ampicilina. .... 37	37
Figura 13: Etapas seguidas na construção do modelo, indicando o programa utilizado para a realização de cada etapa. .... 40	40
Figura 14: Metodologia empregada na obtenção do plasmídio pRLC ( <a href="http://fire.biol.wvu.edu/acevedo/BIOL101/Web120503-GeneticEngineering.ppt">fire.biol.wvu.edu/acevedo/BIOL101/ Web120503-GeneticEngineering.ppt</a> /Fev/04) 42	42
Figura 15: Esquema para reação de mutação (Fonte: Kit para mutação, BIOGEN, Biotecnologias e Químicas)..... 47	47
Figura 16: Resultado do alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de PHA sintases bacterianas do tipo II de <i>Pseudomonas oleovorans</i> (PhaC1Po e PhaC2Po), de	

<i>Pseudomonas putida</i> (PhaC1Pp e PhaC2Pp) e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PhaC1Pa e PhaC2Pa); elas apresentam, cada uma, duas sintases, codificadas pelos genes <i>phaC1</i> e <i>phaC2</i> e PHA sintases bacterianas do tipo I de <i>Ralstonia eutropha</i> (PhbCRe) e de <i>Chromobacterium violaceum</i> (PhaCCv). Aminoácidos idênticos são identificados por (*); aminoácidos similares por (: ou (.); aminoácidos diferentes ( ), enquanto (-) indicam <i>gaps</i> adicionados às seqüências. ....	53
Figura 17: Estrutura terciária da 1HLG. Verde - estrutura de alças, vermelho - $\alpha$ -hélices e ciano -folhas- $\beta$ .....	55
Figura 18: Tríade catalítica da lipase 1HLG, (Ser153, His353, Asp324). Os átomos dos aminoácidos representam: Carbono (cinza), Nitrogênio (azul), e Oxigênio (vermelho). 56	
Figura 19: Resultado do alinhamento das seqüências para a construção do modelo. Molde para a construção do modelo: 1hlg_a (lipase gástrica humana). Proteínas problemas: sin1Pa e sin2Pa (PHA sintases bacterianas do tipo II de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , codificadas pelos genes <i>phaC1</i> e <i>phaC2</i> ) e sinCv (PHA sintase bacteriana do tipo I de <i>Chromobacterium violaceum</i> , codificada pelo gene <i>phaC</i> ). (-) indicam <i>gaps</i> adicionados às seqüências.....	57
Figura 20: PHA sintase de <i>C. violaceum</i> , gerada neste trabalho através da modelagem por homologia. Verde - as estruturas de alças, vermelho - $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ .....	59
Figura 21: PHA sintase 1 de <i>P. aeruginosa</i> , gerada neste trabalho através da modelagem por homologia. Verde - as estruturas de alças, vermelho - $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ . .	59
Figura 22: PHA sintase 2 de <i>P. aeruginosa</i> , gerada neste trabalho através da modelagem por homologia. Verde - as estruturas de alças, vermelho - $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ . .	60
Figura 23: Comparação entre os sítios catalíticos na PHA sintase. (a) resíduos cys292-his478-asp448 de <i>C. violaceum</i> ; (b) resíduos cys296-his479-asp451 de <i>P. aeruginosa</i> I; (c) resíduos cys296-his480-asp452 de <i>P. aeruginosa</i> II. Os átomos dos aminoácidos representam: C (cinza), N (azul), S (amarelo) e O (vermelho).....	61
Figura 24: Gráfico de Ramachandran para a 1HLG .....	62
Figura 25: Gráfico de Ramachandran para a PHA sintase de <i>C. violaceum</i> .....	62
Figura 26: Gráfico de Ramachandran para a PHA sintase I de <i>P. aeruginosa</i> .....	63
Figura 27: Gráfico de Ramachandran para a PHA sintase II de <i>P. aeruginosa</i> .....	63
Figura 28: Eletroforese em gel de agarose. (a) Ladder marcador padrão de peso molecular; (b) plasmídio pRLC; (c) plasmídio pRLC carregando MUT1 (A272D); (d) plasmídio pRLC carregando MUT2 (M347R); (e) plasmídio pRLC carregando MUT3 (D448H); (f) plasmídio pRLC carregando MUT4 (A455Y).....	65

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipos de PHA sintases bacterianas. ....	16
Tabela 2: Abreviaturas dos aminoácidos. ....	19
Tabela 3: Alguns programas e servidores da Internet úteis na modelagem de proteínas. ....	22
Tabela 4: Cepas e Plasmídios utilizados neste estudo. ....	35
Tabela 5: Condições para a reação de PCR. ....	44
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados no estudo de mutação. ....	48
Tabela 7: Condições para a reação de PCR com a mutação. ....	48
Tabela 8: Resíduo de cisteína conservado nas PHA sintases bacterianas. ....	54
Tabela 9: Produção de polímero pelos recombinantes e seus mutantes, em percentual de PHB em relação à massa seca. ....	65

# CAPÍTULO I

## **Introdução, Motivação e Justificativa**

Em resposta à crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica, bem como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Portanto, estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente.

Os polihidroxialcanoatos (PHA's) são biopolímeros produzidos por inúmeras bactérias, sob condições apropriadas de cultivo. Fisiologicamente, são materiais de reserva energética, geralmente acumulados intracelularmente pelas bactérias nativas produtoras, sob limitação de um nutriente essencial, como nitrogênio, fosfato, enxofre ou oxigênio e na presença de suficiente fonte de carbono. Estes biopolímeros apresentam características muito interessantes como propriedades termoplásticas, moldabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, o que os tornam de grande aplicabilidade. São considerados uma alternativa aos materiais plásticos convencionais porque, além de serem biodegradáveis, possuem propriedades físico-químicas muito similares aos vários plásticos de origem petroquímica e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis de carbono.

As aplicações destes poliésteres são bastante amplas, não se restringindo apenas a utilização como matéria plástica convencional. A biocompatibilidade e a

baixa dissolução dos PHA's em ambientes biológicos (*in vivo*) os tornam úteis na medicina, no fabrico de materiais de sutura e próteses ósseas. Podem ainda ser utilizados na indústria farmacêutica (na produção de cápsulas para a liberação controlada de fármacos) e de alimentos (aditivos alimentares ou embalagens) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

No entanto, a biossíntese de PHA's, envolve etapas metabólicas controladas e que em última análise dependem da atividade de enzimas chaves, neste processo. A principal enzima controlando a biossíntese de PHA's, encontrada em todos os organismos produtores é a PHA sintase. Embora todas as bactérias estudadas apresentem pelo menos uma PHA sintase, alguns gêneros apresentam duas sintases, ambas capazes de catalisa a formação de uma ligação éster entre os grupos hidroxila e carbonila dos substratos hidroxiacil-coenzimaA (HA-CoA).

Muitas PHA sintases de diferentes organismos foram clonadas e sequenciadas (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992). A estrutura primária deduzida a partir destes sequenciamentos tem mostrado uma grande identidade entre seus resíduos de aminácidos (PIEMOLINI *et al.*, 2003). Contudo apresentam especificidades diferentes sendo, portanto, classificadas de acordo com suas especificidade, bem como peso molecular. Assim, as sintases classificam-se como do tipo I e II, as quais utilizam HA-CoA's de 3 a 5 carbonos e 6 a 14 carbonos, respectivamente. Sintases do tipo III também são relatadas, sendo que estas utilizam HA-CoA's de 3 a 5, porém apresentam pesos moleculares inferiores às das sintases do tipo I (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992).

A comparação entre seqüências primárias deduzidas a partir do sequenciamento de genes, que codifiquem proteínas de mesma função em diferentes organismos, é uma ferramenta poderosa para a construção de novas proteínas (enzimas), com características definidas, através de técnicas de engenharia genética. No entanto, as proteínas geralmente apresentam uma estrutura tridimensional muito mais complexa do que a de um polímero linear

simples (BERG *et al.*, 2001), o que torna sua análise tridimensional (3D) atraente. Sabe-se que a estrutura tridimensional está muito mais relacionada à função da proteína do que a estrutura primária. Portanto, modificações provocadas artificialmente (por mutação sítio específica) na estrutura primária de uma proteína implicarão em alterações da sua estrutura terciária que, quando drásticas, levarão a perda de funcionalidade. Do contrário, sutis o suficiente, pode levar à construção de proteínas com atividade modificada. Assim, uma etapa importante para a produção de novas proteínas com funções desejáveis é a identificação de sítios a serem manipulados, de maneira a melhor direcionar o projeto de novas moléculas, minimizando tempo e custo.

A função de uma proteína é determinada tanto pela sua conformação, quanto pela interação com outras moléculas (SÁNCHEZ e ŠALI, 1999). Informações cruciais sobre a função de proteínas podem ser obtidas a partir das suas estruturas tridimensionais. Determinar a estrutura terciária das proteínas codificadas no genoma é o objetivo da genômica estrutural (BAKER e ŠALI, 2001), utilizando para isso as técnicas de cristalografia de Raios-X e de Ressonância Magnética Nuclear (NMR), combinadas com técnicas teóricas de construção de modelos por homologia (ŠALI e KURIYAN, 1999).

Tendo em vista que a Rede Nacional de Sequenciamento de DNA (Projeto MCT-CNPq) finalizou o sequenciamento do genoma de *Chromobacterium violaceum*, e que uma das motivações para este sequenciamento foi o seu potencial biotecnológico, o presente trabalho objetiva o estudo comparativo das estruturas terciárias de PHA sintases, com diferentes especificidades pelo substrato, a fim de propor potenciais sítios para mutação na PHA sintase de *C. violaceum*, que implicariam na ampliação da utilização de substratos por esta enzima. A manipulação dos genes que codificam estas proteínas visando à modificação da especificidade das PHA sintases do tipo I ou tipo II pode propiciar a síntese de copolímeros constituídos de monômeros de cadeia curta e média, os quais seriam

polímeros totalmente novos com propriedades estruturais e funcionais de grande interesse.



## CAPÍTULO II

# Revisão Bibliográfica

### 2.1 Bioplásticos

Consumidores de plásticos têm demonstrado preocupação com respeito ao acúmulo destes materiais no meio ambiente e seu conseqüente impacto ambiental (LEE, 1996b). Indústrias buscam ativamente maneiras de reduzir o uso desnecessário de plásticos como forma de complementar programas de reciclagem ou de reutilização. Outras trabalham em novos materiais ou na modificação de materiais antigos para reduzir o impacto ambiental de plásticos (LUZIER, 1992).

Bioplásticos podem ser usados para a manufatura de inúmeros artigos, especialmente embalagens, substituindo plásticos provenientes da indústria petroquímica. Uma classe de polímeros bacterianos que se destaca pela proximidade de suas características com plásticos de origem petroquímica são os Polihidroxicanoatos (PHA's) (BYROM, 1987; DOI, 1990).

Os polihidroxicanoatos, chamados genericamente PHA's, constituem um grupo diversificado de poliésteres acumulados por inúmeras bactérias, como material de reserva de carbono e energia (BRANDL *et al.*, 1990). PHA's apresentam propriedades termoplásticas, são completamente biodegradáveis, produzidos a partir de matérias-primas renováveis e podem ser reciclados e incinerados sem a geração de produtos tóxicos (BYROM, 1987; HÄNGGI, 1995; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Possuem ainda, propriedades físico-químicas muito similares aos vários plásticos de origem petroquímica e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis de carbono (BYROM, 1987).

## 2.2 Estrutura e Ocorrência dos Polihidroxicanoatos

Polihidroxicanoatos (PHA's) são polímeros de hidroxicanoatos e/ou hidroxicenóicos, cuja estrutura geral é mostrada na Figura 1, que são acumulados como materiais de reserva de carbono e/ou energia em uma variedade de microrganismos usualmente em condições limitantes de elementos essenciais tais como, nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio, ou magnésio, na presença de fonte de carbono em excesso (DAWES e SENIOR, 1973; ANDERSON e DAWES, 1990). A variação das posições do grupo hidroxila (n) e do radical R nas unidades monoméricas, bem como o grau de polimerização, influem nas propriedades físicas do polímero (STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1991).

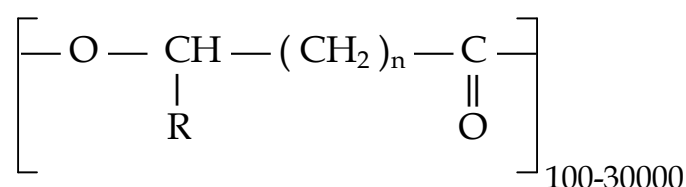


Figura 1: Fórmula geral de poliésteres de ácidos hidroxicanóicos (PHA's) (LEE, 1996b).

De acordo com o comprimento das cadeias carbônicas de suas unidades monoméricas, os PHA's foram classificados em dois grupos: PHA's constituídos por unidades de ácidos hidroxicanóicos de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub> = PHA *short chain lenght*), ou seja, aqueles que possuem cadeia carbônica constituída de 3 a 5 átomos de carbono, e os PHA's constituídos por unidades de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub> = PHA *medium chain lenght*), apresentando de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992; STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

*Ralstonia eutropha* é a bactéria mais estudada dentre as produtoras de PHA's. Quando cultivada sobre condições limitantes de crescimento, como a falta de um ou mais nutrientes essenciais, e excesso de fonte de carbono, pode produzir grande quantidade de PHA, chegando a acumular 80% de seu conteúdo celular seco (DOI *et al.*, 1990). A *C. violaceum*, quando cultivada sob condições limitantes de nitrogênio e na presença de glicose, produz o homopolímero poli-3-

hidroxibutirato (P(3HB)). Quando ácido valérico é adicionado, sob as mesmas condições, ocorre a produção do copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (P(3HB-co-3HV)). Quando apenas o ácido valérico é a fonte de carbono, a produção do homopolímero poli-3-hidrovalerato (P(3HV)) é predominante, demonstrando assim, uma alta afinidade da PHA sintase de *C. violaceum* por unidades de hidroxivalerato, a que pode ser explorado visando a produção de copolímeros (STEINBÜCHEL *et al.*, 1993).

De modo geral, os PHA's são depositados intracelularmente na forma de grânulos (Figura 2). Estudos com vários organismos têm mostrado que os grânulos típicos de P(3HB) têm um diâmetro de 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$  e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios cuja espessura é de 2 nm (SUDESH *et al.*, 2000).

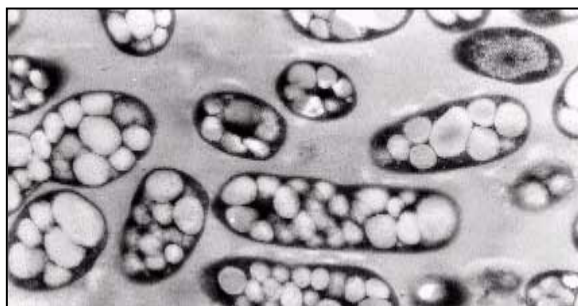


Figura 2: Grânulos de polihidroxicanoatos (PHA's), (preparação e fotomicrografia eletrônica realizadas por Rita de Cássia Paro Alli, Agrupamento de Biotecnologia, DQ, IPT).

### 2.3 Histórico dos Polihidroxicanoatos

Como uma classe de polímeros, os PHA's são relativamente novos, dos quais muitos dos diferentes tipos tendo sido descobertos durante os últimos 20 anos. O homopolímero poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) foi o primeiro PHA identificado por Lemoigne em 1926, e é também o mais abundante e conhecido dentre os polímeros já existentes. Mais de 125 ácidos hidroxicanoicos foram identificados como monômeros constituintes de PHA produzidos por uma variedade de bactérias (STEINBÜCHEL e VALENTIM, 1995). Desde então, estes e

outros poli-3-hidroxicanoatos (PHA's) tem sido extensivamente estudados por cientistas que chegaram na conclusão que bactérias estocam poli(3HB) como reserva de energia na mesma via em que os mamíferos acumulam gordura.

Em 1976, a Imperial Chemical Industries (ICI) da Inglaterra iniciou suas pesquisas em P(3HB) e em 1980 registrou patentes para a produção de PHA's através de vários processos. O copolímero P(3HB-co-3HV) foi produzido comercialmente pela empresa ZENECA Bioproducts, na Inglaterra, a partir de glicose e ácido propiônico, empregando-se uma linhagem mutante de *Ralstonia eutropha*. O poliéster obtido deste processo foi lançado no mercado, com o nome de BIOPOL (BYROM, 1992).

O BIOPOL é utilizado desde 1990 na Alemanha para manufaturar frascos de xampu para a indústria de cosméticos Wella (BRAUNEGG *et al.*, 1998). Outros produtos como aparelhos de barbear descartáveis, também feitos de BIOPOL foram testados no Japão. Copos feitos de PHA puro ou de papel revestido internamente com um filme de BIOPOL, como impermeabilizante, já foram usados. Misturas de PHA com plásticos convencionais, como polipropileno, também foram testados (BYROM, 1992). Atualmente a empresa Monsanto (USA) possui o direito de patente deste produto.

## 2.4 Propriedades e Aplicações dos Polihidroxicanoatos

Os PHA's são não-tóxicos, biocompatíveis, termoplásticos biodegradáveis que podem ser produzidos a partir de recursos renováveis. Eles têm um alto grau de polimerização, são altamente cristalinos, opticamente ativos e isotático (i.e. possuem regularidade estereoquímica em repetidas unidades), piezoelétrico e insolúveis em água. Estas estruturas os fazem altamente competitivos com o polipropileno, e outros plásticos derivados da petroquímica (KALIA, 2003).

A repetição das unidades na estrutura dos PHA's depende das espécies bacterianas e do comprimento da cadeia da fonte de carbono alimentada durante a síntese. Contudo, muitos dos precursores usados para crescimento celular e síntese do polímero podem conter uma ampla variedade de grupos funcionais que, quando inseridos à cadeia polimérica, geram um polímero quimicamente funcional, permitindo modificar as propriedades do material (FULLER, 1999).

Devido às características que possuem os polihidroxicanoatos, estes polímeros foram inicialmente usados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis, bem como, sacos de proteção para plantas. Além disso, filmes de PHA's podem ser aplicados em papel ou papelão para formar uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável, o que é uma alternativa aos materiais compostos não biodegradáveis preparados a partir de, por exemplo, papelão mais polietileno ou alumínio (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Inúmeras aplicações para os PHA's vêm sendo propostas e estudadas. O principal interesse industrial nos PHA's está na sua utilização como plásticos biodegradáveis, principalmente no setor de embalagens e produtos de descarte rápido, colaborando para a redução do problema ambiental causado pelos resíduos de plásticos não biodegradáveis (HOLMES, 1985). Do ponto de vista físico-químico, os PHA's são termoplásticos e/ou elastômeros biodegradáveis de alto peso molecular e insolúveis em água. Devido as suas características, os PHA's podem ser empregados em diversas áreas, tais como na medicina, agricultura e indústria química (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

O P(3HB) é um material biocompatível, degradado lentamente dentro do corpo humano, podendo ser utilizado como dosador controlado de drogas. Sua aplicação vem sendo estudada na medicina, uma vez que pode ser implantado nos tecidos sem causar reação inflamatória ou rejeição, além de não resultar em produto tóxico para a célula.

Poli-3-hidroxibutirato e outros PHA's podem ser completamente degradados a dióxido de carbono e água (e metano sob condições anaeróbicas) pelos microrganismos no ambiente, sendo facilmente degradado no solo (GROTHER *et al.*, 1999). O tempo de degradação do produto formado por P(3HB) é da ordem de poucos meses (digestão anaeróbica) a anos (água do mar). A Figura 3 mostra a degradação de P(3HB-co-3HV) em condições aeróbicas (MADISON e HUISMAN, 1999).



Figura 3: Degradação de P(3HB-co-3HV) em condições aeróbicas (MADISON e HUISMAN, 1999).

## 2.5 Biossíntese de Polihidroxialcanoatos

Os genes envolvidos na biossíntese de PHA's de várias bactérias foram clonados e analisados ao nível molecular (STEINBÜCHEL, *et al.* 1992). Os genes melhor estudados e caracterizados têm sido os envolvidos na biossíntese do poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)), da bactéria Gram-negativa *Ralstonia eutropha*. Neste microrganismo os genes estruturais *phaC*, *phaA* e *phaB* codificando, respectivamente, para as enzimas P(3HB) sintase (polihidroxibutirato sintase),  $\beta$ -cetotiolase e acetoacetyl-CoA redutase dependente de NADPH, estão organizados em um único operon (PEOPLES e SINSKEY, 1989; SLATER *et al.*, 1988). A *R. eutropha* é capaz de realizar a biossíntese de poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) e do

copolímero poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P(3HB-co-3HV)), como já citado anteriormente. Esta bactéria pode utilizar vários compostos orgânicos como única fonte de carbono, entre os quais estão incluídos a glicose (espécie mutante) (Ver Figura 4), frutose, formato, acetato, propionato, lactato, gluconato, succinato, fenol, benzoato, entre outros. Não pode utilizar para este fim, o etanol, glicerol e dissacarídeos. O piruvato assim produzido pode ser utilizado para a biossíntese e para a oxidação via ciclo do ácido tricarboxílico, para fornecimento de energia.

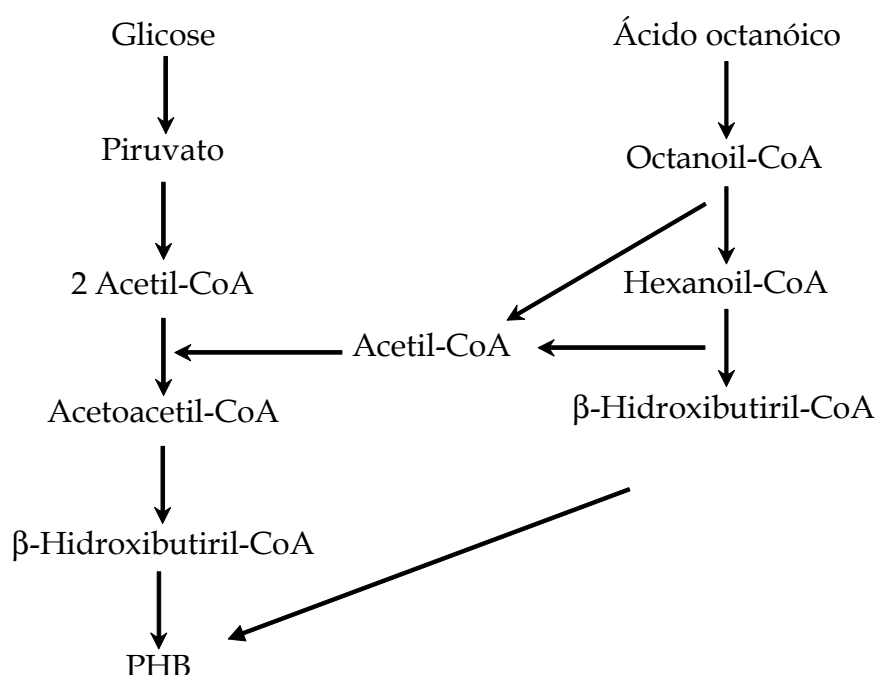


Figura 4: Exemplo de vias metabólicas para a produção de polihidroxi-butilato a partir de diferentes substratos.

A via da biossíntese de P(3HB) em *R. eutropha* (Figura 5) consiste de três reações enzimáticas catalisadas por três enzimas diferentes. A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) em acetoacetil-CoA pela enzima  $\beta$ -cetotilase (codificada por *phbA*). A segunda reação é a redução de acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxi-butilil-CoA pela acetoacetil-CoA redutase (codificada por *phbB*). Finalmente, os monômeros (R)-3-hidroxi-butilil-CoA são polimerizados em PHB pela enzima PHA sintase, codificada por *phbC* (HAYWOD *et al.*, 1988; MADISON e HUISMAM, 1999).

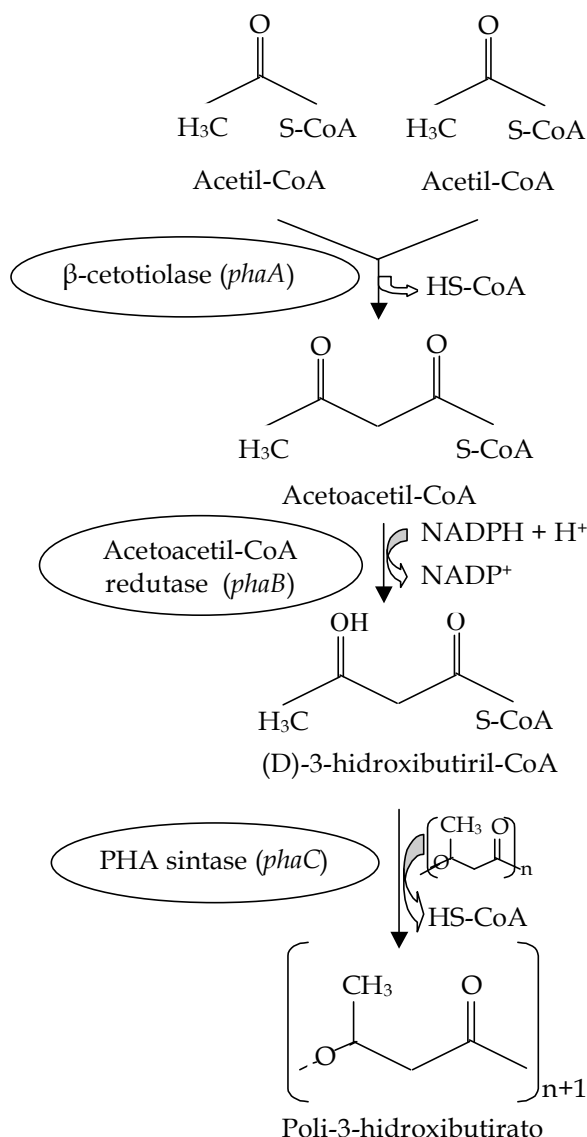


Figura 5: Via de biossíntese de P(3HB) em *R. eutropha* (Aaptado de DOI, 2000)

Esta bactéria acumula P(3HB-co-3HV) unicamente na presença de substratos como propionato e valerato, precursores deste polímero. Estas fontes de carbono são degradadas a propionil-CoA ou 3-hidroxi valeril-CoA. Estes substratos devem ser utilizados na presença de outros como frutose e glicose (STEINBÜCHEL e PIEPER, 1992). A via de produção do copolímero a partir de glicose e propionato é ilustrada na Figura 6. As reações são catalisadas pelas mesmas enzimas que na produção de P(3HB).



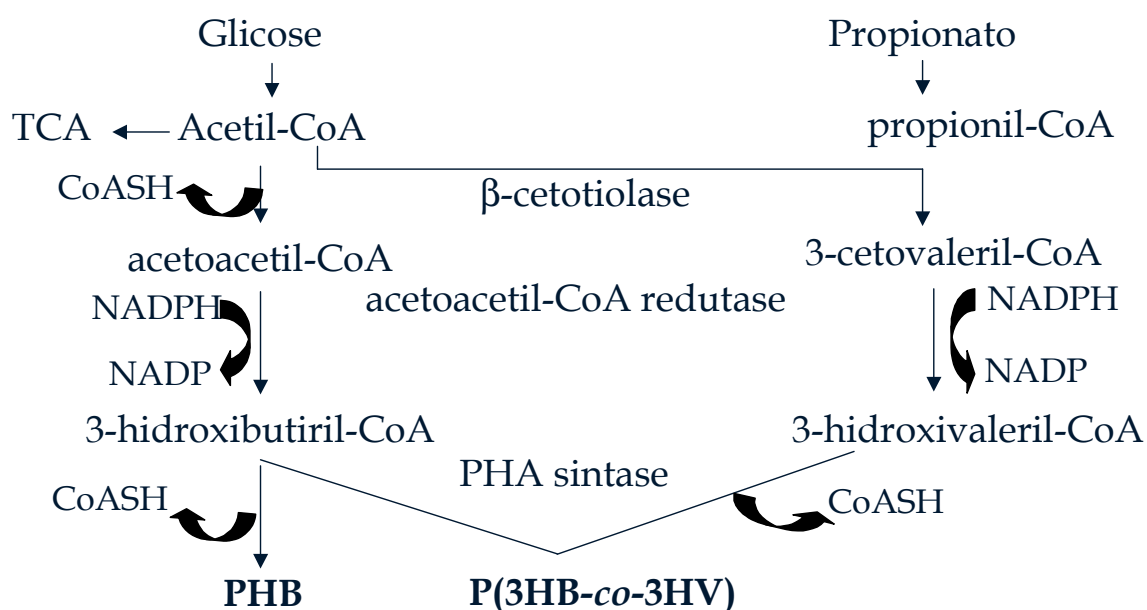


Figura 6: Via de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de glicose e propionato apresentada por DOI (1990).

Na bactéria *C. violaceum*, os genes *phaA*, *phaC* e uma ORF4 (*open reading frame* ou quadro aberto de leitura) supostamente envolvida na regulação da biossíntese de PHA, encontram-se em um “cluster” gênico. Os resultados do sequenciamento do genoma completo da bactéria *C. violaceum*, indicaram também a presença do gene *phaB*. A *C. violaceum*, além da produção de poli-3-hidroxi-3-valerato (P(3HB)) e poli-3-hidroxi-3-valerato-co-3-hidroxi-3-valerato (P(3HB-co-3HV)), é um dos poucos microrganismos capazes de sintetizar o homopolímero poli-3-hidroxi-3-valerato (P(3HV)) (VASCONCELOS *et al.*, 2003). No genoma das bactérias *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas aeruginosa*, encontra-se no genoma dois genes diferentes que codificam para a PHA sintase, os quais estão separados pelos genes que codificam a enzima PHA despolimerase (REHM e STEINBÜCHEL, 1999).

As principais enzimas envolvidas na biossíntese de PHA em bactérias são a  $\beta$ -cetotiolase, a acetoacetil-CoA redutase e a PHA sintase. Estas enzimas foram isoladas e caracterizadas quanto à sua estrutura e especificidade pelo substrato (REHM e STEINBÜCHEL, 1999).

### 2.5.1 $\beta$ -Cetotiolase

A  $\beta$ -cetotiolase (acetil-CoA acetiltransferase) catalisa a reação reversível:



Esta enzima, codificada pelo gene *phaA*, atua tanto na biossíntese como na degradação de P(3HB). A regulação da reação de condensação ocorre pela concentração celular de coenzima A. Assim, altas concentrações de coenzima A fazem com que a reação ocorra no sentido contrário ao da biossíntese de PHA (OEDING e SCHLEGEL, 1973).

HAYWOOD e colaboradores (1988a) descobriram a existência de dois tipos de  $\beta$ -cetotiolase, que possuem especificidades diferentes de acordo com o substrato. A enzima denominada tipo A é ativa somente para os substratos com C<sub>4</sub> a C<sub>5</sub>, enquanto que a outra, denominada tipo B, é ativa para substratos de cadeia de C<sub>4</sub> a C<sub>10</sub>. Estudos *in vitro*, com as enzimas purificadas mostraram que as duas podem ser ativas na síntese de P(3HB). Estes autores consideraram a hipótese de que a 3- $\beta$ -cetotiolase do tipo B deve possuir uma outra função além daquela relacionada com a síntese de PHA, sendo, provavelmente, uma enzima degradativa relacionada com o metabolismo dos ácidos graxos.

### 2.5.2 Acetoacetil-CoA redutase

Esta enzima reduz o substrato a hidroxibutiril-CoA através da reação:



Dois tipos de acetoacetil-CoA redutase foram isoladas e estudadas por HAYWOOD e colaboradores (1988b) em *R. eutropha*, cada um com um substrato distinto e coenzima específica. Ambas foram estudadas quanto à sua atividade na reação reversa (oxidação), onde foi demonstrado que a enzima NADPH dependente catalisa a oxidação de D(-)-3-hidroxiacil-CoA de cadeia com 4 a 6 átomos de carbono enquanto que a enzima NADH dependente, é ativa com moléculas de D(-) e L(+) 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta e média (C<sub>4</sub> e C<sub>10</sub>). No entanto, na reação de redução, esta enzima forma apenas moléculas de L(+)-3-hidroxibutiril-CoA, portanto não participa da via de biossíntese de PHA, uma vez que não forma o substrato da enzima seguinte.

Na biossíntese de P(3HB), a enzima acetoacetil-CoA redutase, codificada pelo gene *phaB*, é a enzima responsável pela redução estereoespecífica da molécula D(-)-3-hidroxiacil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA.

### 2.5.3 PHA Sintase

A PHA sintase, codificada pelo gene *phaC*, é considerada a enzima chave para o acúmulo de polihidroxialcanoatos (PHA's), pois catalisa o passo principal da via, a polimerização de unidades D(-)-3-hidroxiacil-CoA, formando o polímero de PHA. Já foram clonados e caracterizados até agora os genes de pelo menos 38 PHA sintases, de um total de 31 microrganismos (REHM e STEINBÜCHEL, 1999). Três diferentes tipos de PHA sintases podem ser distinguidos, baseados na seqüência primária e na especificidade pelo substrato (Tabela 1) (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992).

Tabela 1: Tipos de PHA sintases bacterianas.

Tipo de PHA sintase	Substrato	Bactéria
I	HA <sub>SCL</sub> -CoA	<i>Ralstonia eutropha</i>
II	HA <sub>MCL</sub> -CoA	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
III	HA <sub>SCL</sub> -CoA	<i>Allochromatium vinosum</i>

As PHA sintases do tipo I são específicas para monômeros de ácido hidroxialcanóicos de cadeia curta, contendo de 3 a 5 átomos de carbono como substrato (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992), incluindo como representante deste grupo a PHA sintase de *R. eutropha* (PEOPLES e SINSKEY, 1989).

O tipo II inclui PHA sintases de *P. oleovorans* e *P. aeruginosa* (TIMM e STEINBÜCHEL, 1992), ambas catalisando a polimerização de monômeros de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia média, contendo de 6 a 14 átomos de carbono.

PHA sintases do tipo III são encontradas nas bactérias *Allochromatium vinosum* e *Thiocapsa violaceae*. Estas bactérias possuem a mesma especificidade para substratos que a enzima do tipo I, apesar de se diferenciarem em sua estrutura primária (STEINBÜCHEL, 1993). Neste caso, a enzima possui duas subunidades, ao contrário das enzimas do tipo I e II, que são constituídas por uma só unidade (LIEBERGESELL e STEINBÜCHEL, 1993).

STEINBÜCHEL e colaboradores (1992) determinaram que a seqüência de todas as PHA sintases continha um *motif* característico de lipases (G-X-[S/C]-X-G) em que o sítio ativo serina de lipases é trocado por uma cisteína em PHA sintases bacterianas. Estudos de mutação revelaram que a PHA sintase de *R. eutropha* possui uma díade catalítica essencial (Cisteína<sup>319</sup> - Histidina<sup>508</sup>), na qual a Cisteína<sup>319</sup> está envolvida na catálise covalente, e a Histidina<sup>508</sup> atua como uma base geral catalítica (JIA *et al.*, 2001). O ácido aspártico 480, em *R. eutropha*, que corresponde ao resíduo D302 de PHA sintase do tipo III de *A. vinosum*, foi

proposto como uma base geral catalítica que ativa o grupamento 3-hidroxil do HB-CoA para formar o intermediário tioéster (JIA *et al.*, 2000).

## 2.6 *Chromobacterium violaceum* como Organismo Modelo

Com o sequenciamento do genoma da *C. violaceum* por um consórcio de laboratórios brasileiros (VASCONCELOS *et al.*, 2003), o Brasil se incluiu entre os países com interesse no DNA deste microrganismo e em estudos pós-genômicos, uma vez que os produtos de alguns genes apresentam grande potencial biotecnológico. A *C. violaceum* é classificada como uma bactéria saprófita, isto é, que se alimenta de animais e plantas em decomposição, não patogênica, Gram-negativa, aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solos e águas de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes (DURÁN e MENCK, 2001). Ocasionalmente esta bactéria pode atuar como um patógeno oportunista em animais e humanos – provocar septicemia (infecção generalizada) fatal de lesões na pele com abscessos no fígado e pulmão.

Esta bactéria destaca-se também por ser um dos poucos microrganismos até agora estudados, capaz da biossíntese do homopolímero de 3-hidroxicaproato (polihidroxicaproato ou PHV), quando cultivada na presença de caproato como única fonte de carbono, e concentrações limitantes de nitrogênio, bem como outros tipos de polihidroxicanoatos (PHA's) (STEINBÜCHEL *et al.*, 1993).

## 2.7 Determinação de Estruturas Terciárias

Proteínas são polímeros constituídos de alguns dos diferentes aminoácidos interligados por ligações peptídicas. O grupo carboxílico (COOH) de um aminoácido é conectado, pela perda de uma molécula de água, ao grupo amino (NH<sub>2</sub>) do próximo, resultando na formação da ligação peptídica (LEHNINGER *et al.*, 2000).

As unidades estruturais básicas das proteínas são os aminoácidos. As cadeias laterais dos aminoácidos diferem em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio e reatividade química. Podem ser agrupados como a seguir: (1) cadeias laterais alifáticas – glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e prolina; (2) cadeias laterais alifáticas hidroxiladas – serina e treonina; (3) cadeias laterais aromáticas – fenilalanina, tirosina e triptofano; (4) cadeias laterais básicas – lisina, arginina e histidina; (5) cadeias laterais ácidas – ácido aspártico e glutâmico; (6) cadeias laterais amídicas – asparagina e glutamina; (7) cadeias laterais sulfuradas – cisteína e metionina (STRYER, 1996).

Os aminoácidos são freqüentemente designados por uma abreviação de três letras, ou por um símbolo de uma letra (Tabela 2). As abreviações dos aminoácidos são as três primeiras letras de seus nomes, exceto para triptofano (Trp), asparagina (Asn), glutamina (Gln) e isoleucina (Ile) (LEHNINGER *et al*, 2000).

Tabela 2: Abreviaturas dos aminoácidos.

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

Fonte: LEHNINGER *et al.*, 2000.

Citam-se frequentemente quatro níveis de estrutura na arquitetura das proteínas. A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos propriamente dita. A estrutura secundária, refere-se ao arranjo espacial dos radicais de aminoácidos que estão próximos uns dos outros na seqüência linear. A estrutura terciária, refere-se ao arranjo espacial de aminoácidos que estão bem longe na seqüência linear. As proteínas que contêm mais de uma cadeia polipeptídica exibem mais um nível de organização estrutural. Cada cadeia polipeptídica em tal proteína é

chamada de uma subunidade. A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial de tais subunidades e à natureza de seus contatos (STRYER, 1996).

A Cristalografia de Raios-X e a Ressonância Magnética Nuclear (NMR) são os métodos experimentais mais utilizados na biologia estrutural para a obtenção de coordenadas para a estrutura tridimensional de proteínas. Porém, a obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios necessários é, em muitos casos, bastante difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho experimental (somente uma em cada vinte proteínas, aproximadamente, produz cristais adequados), de acordo com MAGGIO e RAMNARAYAN (2001).

Projetos de sequenciamento de genomas estão produzindo seqüências lineares de aminoácidos, mas o entendimento completo do papel biológico destas proteínas requererá o conhecimento de sua estrutura e função. Embora métodos experimentais para determinação da estrutura estejam fornecendo estruturas de alta resolução sobre um subconjunto de proteínas, métodos computacionais para predição de estruturas irão fornecer informações válidas de uma grande fração de seqüências cuja estrutura não foi determinada experimentalmente (BAKER e ŠALI, 2001).

A função de uma proteína é determinada tanto pela sua conformação, quanto pela sua interação com outras moléculas (SÁNCHEZ e ŠALI, 1999). O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína constitui uma informação importante para a determinação de sua função, permitindo a identificação de domínios importantes tais como seus sítios catalíticos (PIEMOLINI *et al.*, 2004a; PIEMOLINI *et al.*, 2004b)

A modelagem molecular é uma forma alternativa, não experimental, que permite, com base nos conhecimentos da estereoquímica dos aminoácidos e nas informações contidas nas estruturas terciárias resolvidas experimentalmente,



prever a conformação de proteínas a partir da seqüência primária de seus aminoácidos. Fazer a predição de estruturas terciárias das proteínas codificadas no genoma a partir da seqüência de aminoácidos é o objetivo da genômica estrutural (BAKER e ŠALI, 2001).

A comparação entre estruturas terciárias de proteínas homólogas mostra que estruturas tridimensionais se conservam mais durante o processo evolutivo do que as estruturas primárias (GIBAS e JAMBECK, 2001). Homologia é uma hipótese de cunho evolutivo, e não possui gradação. Duas seqüências são homólogas caso derivem de um ancestral comum ou, caso esta hipótese não se comprove, simplesmente não são homólogas. A semelhança entre as seqüências de aminoácidos em proteínas homólogas expressa pelo grau de identidade, é menos preservada do que a semelhança entre estruturas tridimensionais.

### **2.7.1 Principais Ferramentas utilizadas para Análise de Seqüências**

A bioinformática é um novo e crescente ramo da ciência que utiliza abordagens computacionais para responder questões biológicas relacionadas à coleção, organização e análise de dados biológicos. A análise e o sequenciamento sistemático de genomas por laboratórios distribuídos em diversos países é possível com a utilização de ferramentas de bioinformática. Para cada um dos passos seguidos no processo de modelagem existe um grande número de métodos, programas e servidores específicos disponíveis na rede mundial de computadores (Internet), alguns dos quais são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Alguns programas e servidores da Internet úteis na modelagem de proteínas.

<b>Programa</b>	<b>Endereço na Internet</b>
<b>Banco de Dados</b>	
GenBank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank">www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank</a>
PDB	<a href="http://www.rcsb.org/pdb">www.rcsb.org/pdb</a>
<b>Fontes de Estruturas- molde</b>	
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast">www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast</a>
3D PSSM	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/">www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/</a>
<b>Alinhamento de sequências</b>	
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/ClustalW">www.ebi.ac.uk/ClustalW</a>
T-Coffee	<a href="http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/T_COFFEE/">www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/T_COFFEE/</a>
<b>Modelagem de Proteínas</b>	
MODELLER	<a href="http://www.salilab.org/modeller/modeller.html">www.salilab.org/modeller/modeller.html</a>
<b>Visualização da Estrutura</b>	
Rasmol e SPDBViewer	<a href="http://www.expasy.ch">www.expasy.ch</a>
<b>Validação do Modelo</b>	
Procheck	<a href="http://www.biochem.ucl.ac.uk/roman/procheck/procheck.html">www.biochem.ucl.ac.uk/roman/procheck/procheck.html</a>

Estas ferramentas serão brevemente discutidas a seguir.

#### 2.7.1.1 Banco de Dados

##### **GenBank**

Devido à enorme quantidade de seqüências gênicas produzidas anualmente, houve a necessidade de se criar bancos de dados que facilitassem o acesso dessas seqüências à comunidade científica. Com esse intuito, vários países criaram bancos de dados que disponibilizam gratuitamente milhares de seqüências, além de ferramentas para sua análise (BENSON *et al.*, 2000).

Na segunda metade da década de 90, com o surgimento dos seqüenciadores automáticos de DNA, houve uma explosão na quantidade de seqüências a serem armazenadas exigindo recursos computacionais cada vez mais eficientes. Além do

armazenamento ocorria, paralelamente, a necessidade de análise destes dados, o que tornava indispensável a utilização de plataformas computacionais eficientes para a interpretação dos resultados obtidos. Foi daí então que nasceu a bioinformática, uma nova ciência que une diversas linhas de conhecimento: a engenharia de softwares, a matemática, a estatística, a ciência da computação e a biologia molecular (PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

Os bancos de dados envolvendo seqüências de nucleotídeos, de aminoácidos ou estruturas de proteínas podem ser classificados em bancos de seqüências primários e secundários. Os primeiros são formados pela deposição direta de seqüências de nucleotídeos, aminoácidos ou estruturas protéicas, sem qualquer processamento ou análise. O mais conhecido banco de seqüências primárias é o GenBank. Construído e administrado pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dos Estados Unidos. Inicialmente ele foi feito com o objetivo de abrigar seqüências submetidas diretamente pelos autores de publicações científicas. No entanto, houve uma grande oferta de seqüências, não só de autores como de centros de pesquisa, que passaram a depositar regularmente seus dados. Outros bancos de dados como o europeu EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e o banco de dados de DNA do Japão (DDBJ, *DNA Database of Japan*) atualizam seus dados periodicamente com o GenBank (BENSON *et al.*, 2000).

Os bancos de dados secundários são aqueles que derivam dos primários, ou seja, foram formados utilizando as informações depositadas nos bancos primários. Por exemplo, o SWISS-PROT é um banco de dados onde as informações sobre seqüências de proteínas foram anotadas e associadas a informações sobre função, domínios funcionais, proteínas homólogas e outras (STOESSER *et al.*, 2001).

O crescimento do GenBank é exponencial como mostrado na Figura 7. Só no ano de 1998 cerca de 2,1 milhões de novas seqüências foram depositadas. Atualmente, estima-se que a cada 15 meses o banco dobre de tamanho. Seqüências

relativas à cerca de 55.000 espécies já haviam sido catalogadas em 1999, sendo adicionadas informações sobre cerca de 1250 novas espécies a cada mês (BENSON *et al.*, 2000).

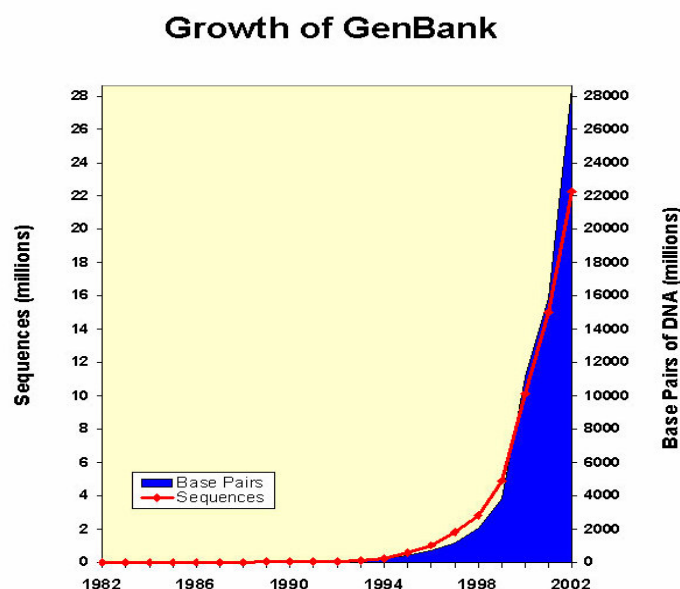


Figura 7: Crescimento exponencial do GenBank, mostrando o aumento acelerado de seqüências depositadas no banco de dados (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/genbankstats.html>; 28/01/04).

## PDB

Ao contrário do NCBI, o Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)) é responsável por apenas um tipo de dados moleculares: estruturas de proteínas e, cada vez mais, os conjuntos de dados subjacentes, a partir dos quais as estruturas moleculares foram modeladas (GIBAS e JAMBECK, 2001). O Protein Data Bank (PDB) foi estabelecido no *Brookhaven National Laboratories* (BNL) em 1971, como um repositório para estruturas de cristais de biologia macromolecular (WESTBROOK *et al.*, 2000).

Apesar de a primeira estrutura protéica ter sido determinada décadas antes da primeira seqüência de DNA, o banco de dados de estrutura protéica cresceu mais lentamente nesse ínterim do que o banco de dados de seqüências (GIBAS e JAMBECK, 2001). Há hoje cerca de 230.000 seqüências depositadas no banco de dados SwissProt, enquanto que o PDB (Banco de Dados de Proteínas) contém a estrutura 3D de menos de 10.000 cadeias de proteínas com seqüências distintas (PEITSCH *et al.*, 2000). Apenas cerca de três mil estruturas protéicas exclusivas foram conhecidas (exceto as estruturas de proteínas que são mais do que 95% idênticas na seqüência). Aproximadamente mil dessas estruturas são de proteínas substancialmente diferentes umas das outras (não mais do que 25% idênticas em seqüência).

#### 2.7.1.2 Fontes de Estruturas Molde

### **BLAST**

O BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) compreende uma família de programas desenvolvidos com o objetivo de alinhar e comparar seqüências depositadas em bancos de dados (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), é a ferramenta mais popular para a busca de seqüências depositadas em banco de dados. Ele executa comparações entre duas seqüências, buscando regiões de similaridades locais através do algoritmo de alinhamento Smith-Waterman (SMITH e WATERMAN, 1981). Esse programa é subdividido de acordo com o tipo de seqüência de entrada (nucleotídeo ou aminoácido) e com o tipo de resultado esperado. As principais variantes do BLAST são:

- BLASTn: compara seqüências de nucleotídeos com o banco de dados de nucleotídeos.

- BLASTp: compara seqüências de aminoácidos com o banco de dados de proteínas. Este programa identifica também possíveis domínios conservados nas proteínas analisadas.
- BLASTx: compara seqüências de nucleotídeos com a base de dados de proteínas.
- tBLASTn: traduz uma seqüência de aminoácidos para nucleotídeos e compara com o banco de dados de genes.
- tBLASTx: traduz uma seqüência de nucleotídeos para aminoácidos e compara com o banco de proteínas.
- RPS-BLAST: efetua uma busca por alinhamentos com domínios conservados conhecidos.
- BLAST 2 Sequences: produz um alinhamento comparativo entre duas seqüências fornecidas.

O BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) compara a seqüência alvo com cada uma das seqüências depositadas em um banco de dados utilizando o alinhamento entre pares de seqüências. O PSI-BLAST (*Position Specific Iterative BLAST*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) utiliza o alinhamento múltiplo de seqüências para identificar regiões conservadas seqüencialmente em proteínas homólogas. O PSI-BLAST é um aprimoramento do programa BLAST original que implementa perfis para aumentar a especificidade das pesquisas de bancos de dados. Iniciando com uma única seqüência, o PSI-BLAST pesquisa um banco de dados à procura de alinhamentos locais, utilizando o BLAST com intervalos (*gaps*), e constrói um alinhamento múltiplo e um perfil com o comprimento da seqüência da consulta original (GIBAS e JAMBECK, 2001).

Para identificar a seqüência depositada no banco de dados mais similar à seqüência de interesse, o BLAST utiliza valores de pontuação ou *score* e parâmetros. Para o cálculo de *score*, o BLAST alinha a seqüência de interesse com as seqüências depositadas nos bancos de dados e calcula valores obtidos através

do somatório das identidades, similaridades, e pelo somatório dos valores dos *gaps*. Quanto maior for este valor, maior similaridade existe entre as seqüências.

O “e-value” fornece informações sobre a probabilidade de que uma determinada seqüência de alinhamento seja importante. Este dado estatístico indica o quanto é provável as seqüências serem similares ao acaso, ou seja, se o “e-value” é igual a zero, existe 0% de probabilidade das seqüências serem similares ao acaso. Quanto mais próximo de zero for o valor do “e-value”, mais significância biológica tem o resultado do BLAST (GIBAS e JAMBECK, 2001).

### 3D PSSM

O 3D-PSSM é um programa para análise estrutural que utiliza a metodologia conhecida como “*threading*”, termo que foi primeiramente empregado em 1991 por David Jones, juntamente com Janet Thornton e Willie Taylor. Nos casos em que a identidade entre as seqüências for inferior a 25%, a melhor maneira de inferir sobre o problema é utilizar métodos de busca seqüência-estrutura (BOWIE *et al.*, 1991). O princípio básico consiste em ajustar a seqüência de aminoácidos em estruturas tridimensionais de proteínas. A sua função é identificar a conformação de uma seqüência de proteínas utilizando estruturas conhecidas que poderão ser utilizadas como molde para a construção de um modelo através da modelagem comparativa.

#### 2.7.1.3 Alinhamento de Seqüências

O alinhamento de seqüências é um método de comparação que procura determinar o grau de similaridade entre duas ou mais seqüências, ou a similaridade entre fragmentos destas seqüências. Este alinhamento pode ser global ou local. Alinhamentos globais necessitam utilizar *gaps* (representando inserção/deleção), enquanto o alinhamento local pode evitá-los, alinhando regiões entre os *gaps*. O alinhamento múltiplo (global) é considerado mais confiável que o

alinhamento simples (local), o qual envolve apenas duas seqüências (PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

O alinhamento local alinha apenas algumas regiões de duas seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos. Alinham-se somente as regiões mais conservadas, independente da localização relativa de cada região em sua seqüência. É geralmente usado na procura por seqüências homólogas em banco de dados. No alinhamento global, é feito o alinhamento de duas seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos sobre seu comprimento inteiro. As seqüências envolvidas devem ser alinhadas de um extremo ao outro, dando origem a apenas um resultado. É freqüentemente utilizado para determinar regiões mais conservadas de seqüências homólogas.

A qualidade de um alinhamento é determinada pela soma dos pontos obtidos pela unidade pareada (*match*) menos as penalidades pela introdução de *gaps* e posições não pareadas (*mismatch*). Existem vários programas de computador que realizam esta tarefa de alinhamento de seqüências e a grande maioria deles pode ser utilizada *on-line*, sem a necessidade de instalação. Como exemplo temos os programas: ClustalW e T-Coffee.

### **ClustalW**

ClustalW é um programa inteiramente automático para alinhamento global múltiplo de seqüências de DNA ou proteína biologicamente significativos. Este calcula o melhor alinhamento para as seqüências selecionadas, e alinha estas seqüências de modo que as identidades, similaridades e diferenças podem ser vistas. Árvores filogenéticas podem ser calculadas a partir do alinhamento múltiplo. O programa tem alguns parâmetros ajustáveis com “defaults” razoáveis (THOMPSON *et al.*, 1994).



## T-Coffee

O T-Coffee também é um programa de alinhamento múltiplo. Este programa é utilizado quando a identidade da seqüência a ser modelada e a seqüência da proteína molde for maior do que 35%. A grande vantagem de programas como este é a construção de alinhamento global com regiões localmente alinhadas (NOTREDAME, 2000).

### 2.7.1.4 Modelagem por Homologia

A modelagem por homologia pode ser útil quando não se tem estruturas de proteínas determinadas experimentalmente por cristalografia de Raios-X ou NMR. A modelagem de proteínas por homologia tem sido particularmente importante nos estudos relacionados com o genoma. Isto é, parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas, com estruturas tridimensionais conhecidas (proteínas-molde), implica em similaridade estrutural entre elas.

A modelagem comparativa é uma metodologia confiável para a obtenção de proteínas (SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Todo método de modelagem comparativa consiste basicamente de quatro passos seqüenciais:

- Identificação e seleção de proteínas-molde;
- Alinhamento das seqüências alvo-molde;
- Construção das coordenadas do modelo;
- Validação do modelo.

O fluxograma apresentado na Figura 8 mostra os passos que devem ser seguidos para a construção de um modelo pela modelagem por homologia ou modelagem comparativa.

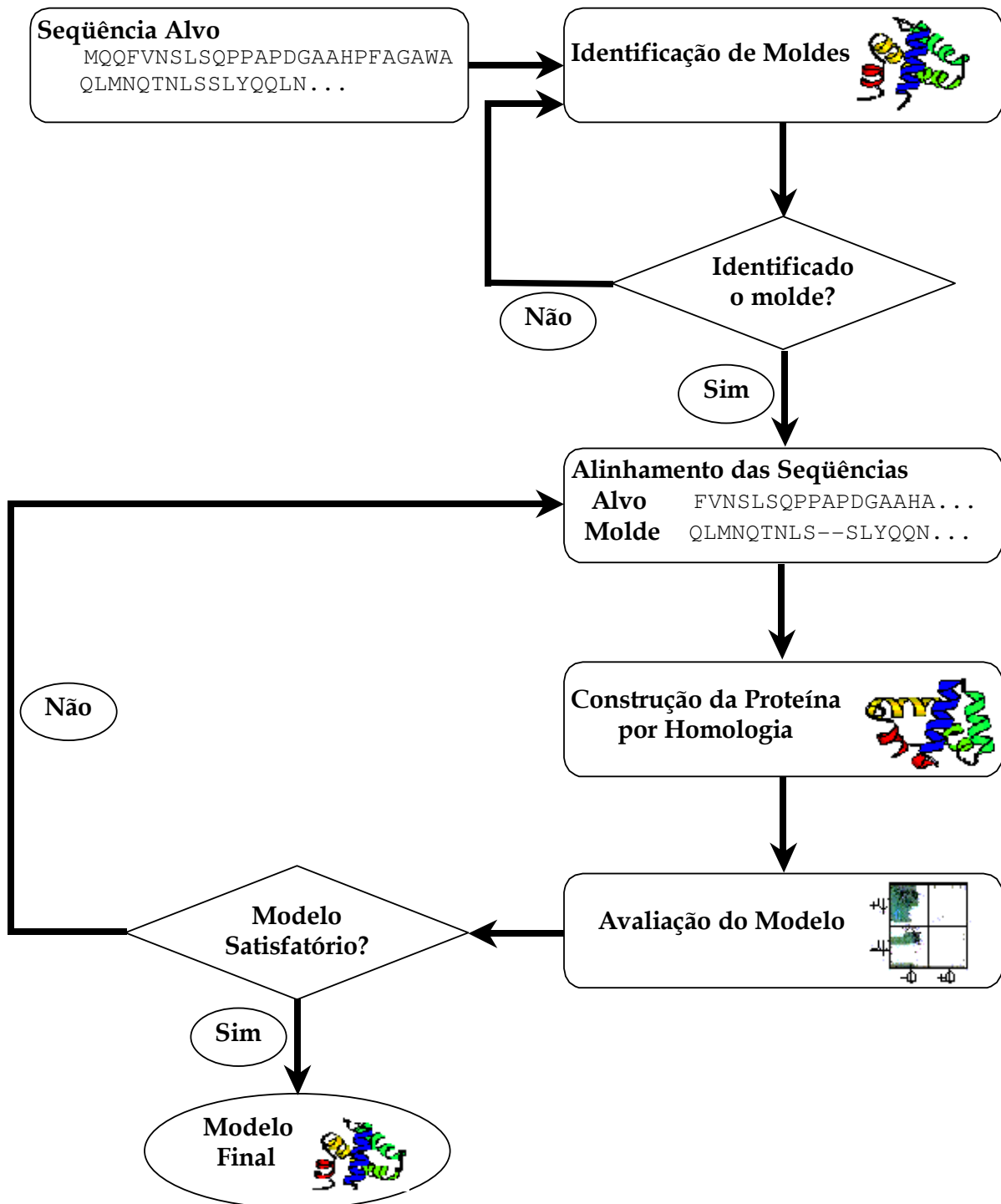


Figura 8: Esquema geral da modelagem de proteínas por homologia (Adaptado de MARTY-RENOM *et al.*, 2000)

### 2.7.1.5 Construção do Modelo

#### **Swiss-Model**

O SWISS-MODEL é um servidor, automatizado na Web, de modelagem por homologia, baseado no Instituto Suíço de Bioinformática. O SWISS-MODEL permite que você submeta uma seqüência e receba de volta, automaticamente, uma estrutura. É necessário fornecer uma seqüência desconhecida para iniciar uma execução do SWISS-MODEL em seu modo First Approach (GIBAS e JAMBECK, 2001).

#### **Modeller**

O MODELLER é usado para modelagem por homologia ou comparativa de uma estrutura tridimensional de proteínas (MARTI-RENOM *et al.*, 2000). Apesar do Modeller incorporar ferramentas do alinhamento de seqüências e até mesmo da busca pelo banco de dados, o ponto inicial para o Modeller é um alinhamento seqüencial múltiplo entre a seqüência alvo e as seqüências protéicas do modelo (GIBAS e JAMBECK, 2001). Ele utiliza estruturas molde para construir um modelo tridimensional da seqüência de interesse. Ele gera, a partir da estrutura de referência, um conjunto de restrições que são aplicadas à seqüência a ser modelada. Estas restrições limitam, por exemplo, a distância entre dois resíduos no modelo que está sendo construído, sendo esta distância baseada naquela entre os dois resíduos equivalentes na estrutura molde. Esse cálculo de restrições também é aplicado nas ligações angulares (entre três átomos) e nos ângulos diedrais (entre quatro átomos). O cálculo das restrições é baseado em análises estatísticas entre estruturas comparativas. Além dessas restrições um campo de forças também controla as propriedades estereoquímicas entre os átomos, aplicando restrições químicas, adicionais na conformação molecular 3D.

### 2.7.1.6 Validação do Modelo

A validação é uma etapa essencial, a qual pode ser executada em diferentes níveis de organização estrutural. A qualidade estereoquímica do modelo é de importância fundamental. O programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, o PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não-ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran (Ver Figura 9).

#### **Procheck**

O PROCHECK é um pacote popular de software para verificação da qualidade da estrutura da proteína (LASKOWSKI *et al.*, 1993). Produz representações coloridas em formato PostScript, facilmente interpretadas, descrevendo a estrutura tridimensional de uma proteína. O PROCHECK é executado em sistemas UNIX e Windows (GIBAS e JAMBECK, 2001). O software gera gráficos de Ramachandran, que possibilitam a avaliação da qualidade estereoquímica da estrutura.

RAMACHANDRAN e colaboradores (1963) descreveram exatamente a gama de conformações disponíveis para os aminoácidos em uma cadeia peptídica. A conformação da cadeia peptídica é descrita pelos valores dos ângulos diedros na estrutura principal da proteína (isto é, o ângulo descrito pelos quatro átomos ao redor da ligação N-C $\alpha$  e o ângulo descrito pelos átomos ao redor da ligação C $\alpha$ -C) como pode ser visualizado na Figura 9. Esses ângulos são denominados  $\phi$  e  $\psi$ , respectivamente. O mapa de Ramachandran, é simplesmente uma representação gráfica de  $\psi \times \phi$  para a estrutura completa de uma proteína.

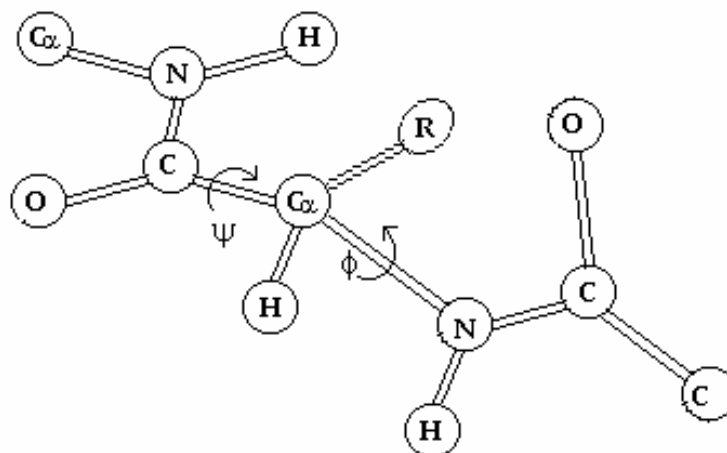


Figura 9: O grau de rotação na ligação entre os átomos de nitrogênio e carbono  $\alpha$  da cadeia principal é chamado *phi* ( $\phi$ ), e a rotação na ligação entre o carbono  $\alpha$  e o da carbonila é chamado *psi* ( $\psi$ ).

A conformação da cadeia principal é completamente definida quando forem especificados  $\phi$  e  $\psi$  para cada radical na cadeia. Ramachandran reconheceu que um aminoácido em uma cadeia peptídica não pode ter qualquer par de valores de  $\phi$  e  $\psi$ . Certas combinações não são acessíveis devido ao impedimento estérico. As faixas permitidas de  $\phi$  e  $\psi$  podem ser previstas prontamente e visualizadas em diagramas de contorno estérico chamados de gráficos de Ramachandran (Figura 10). O gráfico de Ramachandran é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963).

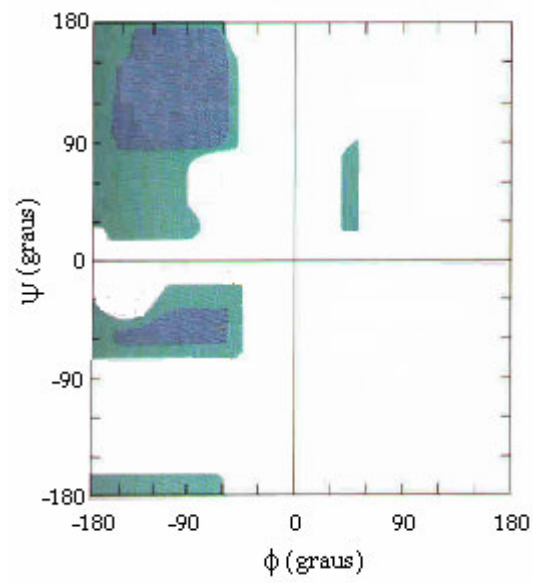


Figura 10: Gráfico de Ramachandran mostrando os valores permitidos de  $\phi$  e de  $\psi$  (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

## CAPÍTULO III

# Material e Métodos

Neste Capítulo estão descritas as ferramentas utilizadas para a execução do trabalho na etapa de modelagem da estrutura da proteína PHA sintase, bem como as mutações propostas e procedimentos adotados para as etapas de clonagem e mutação sítio específica.

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Cepas e Plasmídios utilizados

As cepas utilizadas neste estudo bem como o plasmídio previamente existente e o construído neste trabalho estão listados na Tabela 4. Algumas das características relevantes para este trabalho, encontram-se descritas na mesma tabela.

Tabela 4: Cepas e Plasmídios utilizados neste estudo.

Cepas/Plasmídios	Característica Relevante
<b>Cepas</b>	
<i>Escherichia coli</i> JM101	Organismo de trabalho
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> -T1 <sup>R</sup>	Organismo de trabalho
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Organismo Modelo
<b>Plasmídios</b>	
pBHR69 Tamanho (bp): 5420	Plasmídio derivado do pBluescript SK- contendo os genes <i>phaA</i> <sub>Re</sub> e <i>phaB</i> <sub>Re</sub> (SPIEKERMANN <i>et al.</i> , 1999)
pRLC Tamanho (bp): 7124	pBHR69 mais o gene <i>phaC</i> <sub>Cv</sub>

O plasmídio pBHR69 foi gentilmente cedido pelo Dr. Alexander Steinbüchel, do Instituto de Microbiologia da Westfälische Wilhelms Universität Münster, Münster, Alemanha. Após preparados, os plasmídios foram mantidos sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O plasmídio pBHR69 é mostrado na Figura 11 e o plasmídio pRLC construído neste trabalho pode ser visualizado na Figura 12. Para o desenho destes plasmídios foi utilizado o programa *Plasmid Processor*, criado por KIVIRAUMA *et al.* (1996).

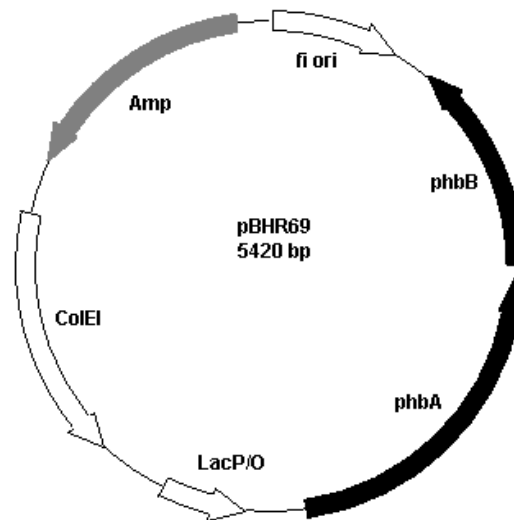


Figura 11: Plasmídio pBHR69. Na figura, *phaA* e *phaB* são genes codificando, respectivamente, para  $\beta$ -cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase de *R. eutropha*. Amp: gene conferindo resistência à ampicilina.



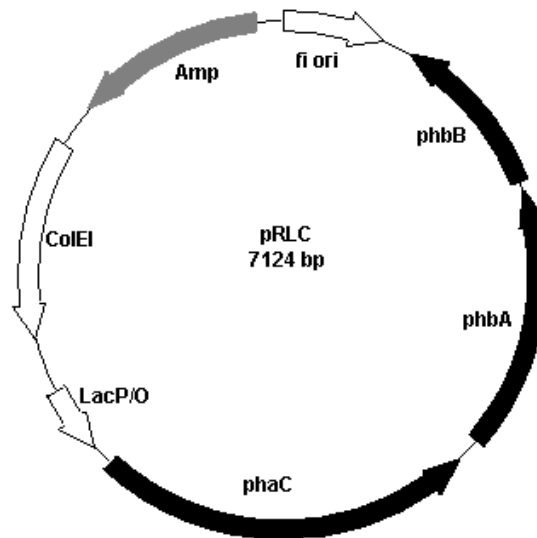


Figura 12: Plasmídeo pRLC construído neste trabalho. Na figura, *phaC* é o gene codificando para a PHA sintase de *C. violaceum*; *phaA* e *phaB* são genes codificando, respectivamente, para  $\beta$ -cetotiolase e acetoacetyl-CoA redutase de *R. eutropha*. Amp: gene conferindo resistência à ampicilina.

Observe que o plasmídeo pRLC construído neste trabalho contém o gene *phaC* codificando para a PHA sintase de *C. violaceum*, ausente no plasmídeo pBHR69, no qual estão presentes somente os genes *phaA* e *phaB* codificando, respectivamente, para  $\beta$ -cetotiolase e acetoacetyl-CoA redutase de *R. eutropha*.

### 3.1.2 Meios de Cultivo

Meio Luria-Bertani - LB (SAMBROOK *et al.*, 1989):

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	10 g
H <sub>2</sub> O Destilada	1000 mL

Para preparo das placas, adicionou-se 15g.L<sup>-1</sup> de ágar.

### 3.1.3 Soluções

Tampão Tris-EDTA:

Tris-HCl, 25 mM, pH 8,0

EDTA 1 mM

Tampão de Lise:

SDS 10%, 0,5 mL

NaOH 10 M, 0,1 mL

Tampão Tris-EDTA, 10 mL

Tampão TBE (10X):

Tris 108 g

Ácido bórico 55 g

EDTA 0,5 M 40 mL

H<sub>2</sub>O completar 1000 mL

### 3.1.4 Kits e Oligonucleotídeos Empregados nos Experimentos

Oligonucleotídeos ou *primers*, utilizados nos experimentos em que se empregou PCR e reações de mutações, foram adquiridos junto à BIOGEN, Biotecnologias e Químicas.

Os *kits* para extração do DNA plasmidial (*Concert Rapid Plasmid Miniprep System - 50 reactions*) e purificação do gel de agarose (*S.N.A.P. UV-FREE Gel Purification Kit*) foram adquiridos, respectivamente, da Gibco BRL e da Invitrogen.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Procedimento Computacional

A seqüência de aminoácidos da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* foi submetida a uma análise comparativa através do programa BLAST

([www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST)), sendo alguns dos microrganismos encontrados na busca submetidos ao programa de alinhamento múltiplo de seqüências.

### ***3.2.1.1 Modelagem por Homologia***

A metodologia de modelagem por homologia implica basicamente em quatro etapas sucessivas: identificação e seleção da proteína-molde; alinhamento das seqüências; construção das coordenadas, e validação do modelo, como indicado no fluxograma apresentado na Figura 13.

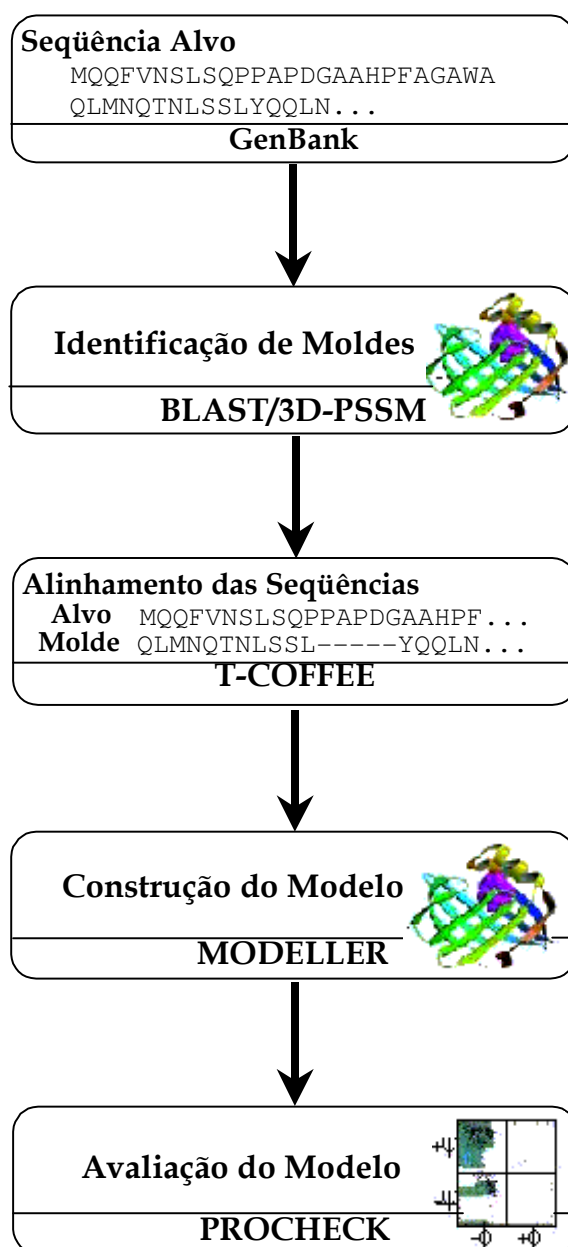


Figura 13: Etapas seguidas na construção do modelo, indicando o programa utilizado para a realização de cada etapa.

A primeira etapa consistiu em identificar proteínas relacionadas à sequência de aminoácidos da PHA sintase (sequência alvo), para identificarmos qual será utilizada como molde para a construção do modelo. Num primeiro ensaio utilizou-se o BLASTp que comparou a sequência alvo com cada uma das sequências depositadas no *Protein Data Bank* - PDB. Se, através da comparação sequencial não foi possível identificar proteínas que possam ser utilizadas como

molde, o passo seguinte foi utilizar programas que ajustam a seqüência de aminoácidos em estruturas tridimensionais conhecidas de proteínas. Neste caso foi utilizado o programa 3D-PSSM, que conseguiu identificar uma proteína para ser utilizada como molde.

Identificadas às seqüências que serão utilizadas como molde, métodos de alinhamento global entre as seqüências foram aplicados, o que é a segunda etapa da modelagem por homologia. O alinhamento entre as seqüências foi gerado pelo programa T-COFFEE.

A terceira etapa da modelagem é a construção do modelo, a qual foi baseada na informação contida no alinhamento gerado entre as seqüências. A construção do modelo foi feita através do programa MODELLER (ŠALI e BLUNDELL, 1993). É a modelagem que utiliza a satisfação das restrições espaciais, utilizando distâncias geométricas e técnicas de otimização para satisfazer as restrições espaciais das proteínas molde dadas através do alinhamento. A visualização da estrutura foi realizada com o programa Swiss PDBViewer (GUEx e PETISCH, 1997).

A qualidade do modelo 3D gerado foi validada pelo gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963) feita através do programa PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1998), que avalia a estrutura tridimensional da proteína indicando a sua qualidade estereoquímica. A qualidade do modelo está ligada à escolha do molde e à construção do alinhamento que servirá de referência para a construção dos átomos que compõem a proteína. Caso não se tenha obtido um modelo satisfatório, o modelador pode mexer no alinhamento para melhorá-lo.

### 3.2.2 Procedimento com material biológico

A metodologia utilizada para a construção do plasmídio pRLC está indicada no fluxograma apresentado na Figura 14, com os detalhamentos de cada etapa dados a seguir.

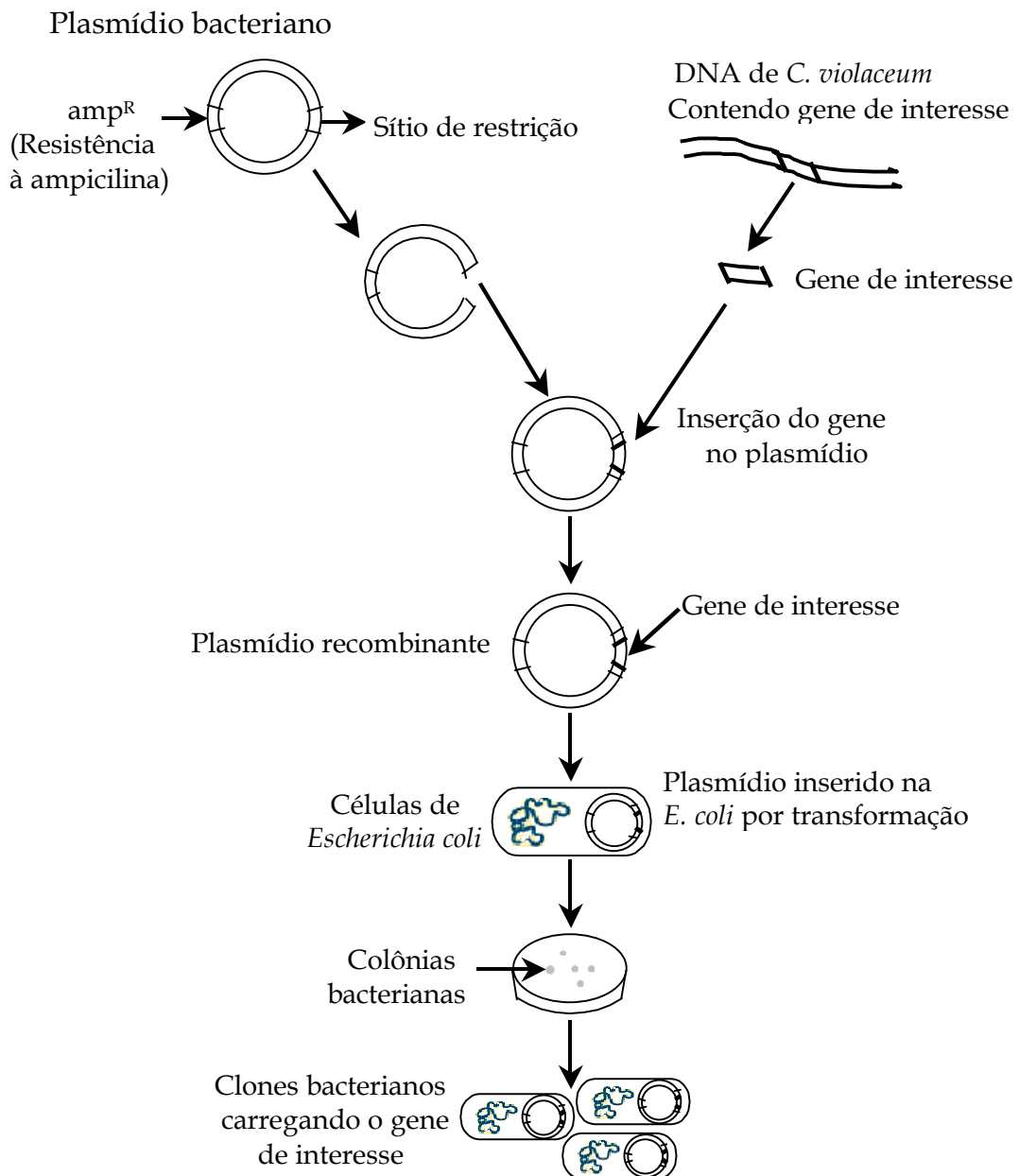


Figura 14: Metodologia empregada na obtenção do plasmídio pRLC  
([fire.biol.wvu.edu/acevedo/BIOL101/ Web120503-GeneticEngineering.ppt/Fev/04](http://fire.biol.wvu.edu/acevedo/BIOL101/Web120503-GeneticEngineering.ppt/Fev/04))

### 3.2.2.1 Extração do DNA genômico de *C. violaceum*

A extração do DNA genômico de *C. violaceum* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por B. Gemmil (Manual de Laboratório de Análise Genômica, vol. 1, 1997). Para isto, inoculou-se 100 µL de cultura bacteriana em 5 mL de meio LB, e foram incubadas por 24 horas a 30°C/200 rpm. Após o cultivo, as células foram colocadas em gelo por 15 minutos, sendo em seguida centrifugadas por 10 minutos, a 4°C/8000 rpm (centrífuga Sigma, modelo 2K15). Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas adicionando 50 µL de solução isotônica e, após nova centrifugação (10 minutos, a 4°C/8000 rpm), foram ressuspensas em 1/50 do volume de solução isotônica. Adicionou-se um volume de solução de lise de célula bacteriana igual ao volume do precipitado ressuspensado, misturadas por inversão e colocadas em gelo por 5 minutos. Extraíu-se com um volume de fenol (Fenol saturado com Tris-HCl 1 M), centrifugou-se por 5 minutos/12000 rpm e descartou-se a fase orgânica. Para remover o fenol adicionou-se um volume de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1, misturou-se por inversão, centrifugou-se como anteriormente, e descartou-se a fase orgânica. Precipitou-se o DNA na fase aquosa com 1/3 do volume de acetato de amônio (7,5 M), misturou-se por inversão, adicionou-se 2,5 vezes o volume de etanol, misturou-se novamente por inversão, e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente; centrifugou-se por 15 minutos /12000 rpm, descartou-se o sobrenadante; adicionou-se 1 mL de álcool 70%, centrifugou-se por 5 minutos/12000 rpm, descartou-se o sobrenadante, e secou-se a temperatura ambiente. Finalmente o DNA foi dissolvido em tampão TE.

### 3.2.2.2 Gel de Agarose para Eletroforese

Tanto o DNA plasmidial com as mutações quanto o DNA plasmidial não mutado foram analisados em gel de agarose 0,8% (p/v). Utilizou-se tampão TBE 1X, como tampão da corrida de gel. As amostras foram aplicadas no gel com corante. As corridas eletroforéticas em gel foram realizadas a 70 V.

### 3.2.2.3 Amplificação por PCR do gene de interesse

O gene estrutural de interesse *phaC* (1704 bp), do genoma da *C. violaceum* cujo número de acesso no NCBI é gi: 34332849 foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase - PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando como *primers*, oligonucleotídeos de 30 pb, 5'-ggatccatgcagcagttcgtcaact-3' e 5'-ggatccttgaggctggcggcgacg-3' desenhados a partir do gene *phaC<sub>CV</sub>*, contendo sítios de restrição (SMAI e BamHI) apropriados à ligação ao vetor. Foi utilizado como molde o DNA genômico total isolado de *C. violaceum*. A amplificação do DNA por PCR foi realizada em volumes de 50 µL contendo: 20 µL de PCR *mix*, 1 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA molde, 5 µL de cada *primer* utilizado, completou-se o volume com H<sub>2</sub>O. As condições de reação para a amplificação estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições para a reação de PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	10 minutos	
51 °C	2 minutos	1
72 °C	2 minutos	
94 °C	20 segundos	
51 °C	45 segundos	35
72 °C	2 minutos	
72 °C	5 minutos	1

### 3.2.2.4 Purificação do DNA

Após análise em gel de agarose, o produto de PCR foi isolado e purificado de acordo com o protocolo do fabricante. O kit de purificação de DNA (S.N.A.P. UV-FREE gel purification kit) foi adquirido junto a INVITROGEN. O DNA foi suspenso em volume adequado de tampão TE (Tris-EDTA).



### 3.2.2.5 Preparo de células competentes para transformação

O preparo de células competentes para transformação foi baseado no método descrito por HANAHAN (1983). A partir de uma placa de Petri, transferiu-se uma única colônia da cepa a ser transformada para 25 mL de meio LB. Incubou-se a 37°C sob agitação de 150 rpm até que a absorbância do caldo de cultivo estivesse entre 0,5 e 0,6 (aproximadamente 3 h). Foi coletado 1 mL num microtubo plástico esterilizado, e centrifugou-se por 10 min a 4000 rpm (4°C) em microcentrífuga de bancada (Sigma, modelo 2K15). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado. Procedeu-se nova centrifugação, e as células foram ressuspendidas em 0,1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado.

### 3.2.2.6 Transformação de células competentes

A transformação das células competentes foi baseada no método descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Em 200 µL de suspensão de células competentes, preparadas como descrito no item anterior, adicionou-se 10 µL da reação de ligação. Incubou-se a mistura em banho de gelo por 30 min, submetendo-a, em seguida, a um choque térmico a 42°C por 45 segundos e, resfriando-a imediatamente em banho de gelo por 5 min. Adicionou-se, então, 800 µL de meio LB e incubou-se por 1 h a 37°C para recuperação das células. Após este período, centrifugou-se a suspensão celular por 10 min a 4000 rpm (4°C), descartou-se o sobrenadante, e as células foram ressuspendidas em 100 µL de meio LB. Alíquotas de 50 µL desta suspensão foram transferidas e espalhadas em placas contendo ampicilina (50 µg/mL de meio de cultura), para a seleção dos transformantes de interesse. Incubou-se por 24 horas a 37°C.

### 3.2.2.7 Seleção dos transformantes

Os transformantes foram selecionados através da utilização de meio ágar LB contendo ampicilina, antibiótico apropriado à seleção das colônias recombinantes ancorando o plasmídeo, o qual carrega gene que confere resistência a este antibiótico. Coletou-se uma das colônias das placas contendo os transformantes, com o auxílio de uma ponteira esterilizada, manipulada pelo uso uma pinça (flambada ao rubro). Transferiu-se para um tubo de vidro com tampa rosqueada contendo 5 mL de meio LB adicionado de 10 µL de ampicilina, e incubou-se a 37°C sob agitação de 150 rpm durante uma noite. Etapas posteriores consistiam na extração e análise do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, e análise através da digestão por enzimas de restrição apropriadas. Os géis de eletroforese obtidos foram analisados através de sistema de fotodocumentação de gel de eletroforese.

### 3.2.2.8 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada com o *kit* (*Concert Rapid Plasmid Miniprep System - 50 reactions*) para isolamento do DNA plasmidial segundo o fabricante Gibco BRL. O preparo do pré-inoculo para a extração do DNA plasmidial consistiu em repicar uma única colônia de uma placa de Petri contendo a linhagem desejada e transferi-la para um tubo contendo 5 mL de meio LB, suplementado com antibiótico ampicilina (50 µg/mL de meio de cultura). Os cultivos foram realizados sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 37°C, durante 24 h. Desta cultura recolheu-se 1 mL, centrifugou-se por 10 minutos, 10000 rpm (4°C). Descartou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se em tampões apropriados para a retirada de impurezas. Após esta etapa o DNA suspenso em volume adequado de tampão TE.

### 3.2.2.9 Mutações sítio dirigidas

As mutações sítio dirigidas no gene *phaC* de *C. violaceum*, foram feitas utilizando o kit para mutação (Gene Tailor Site Directed Mutagenesis System - 16 mutagenesis reactions) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante BIOGEN, Biotecnologias e Químicas. O esquema seguido para a reação de mutação está apresentado na Figura 15.

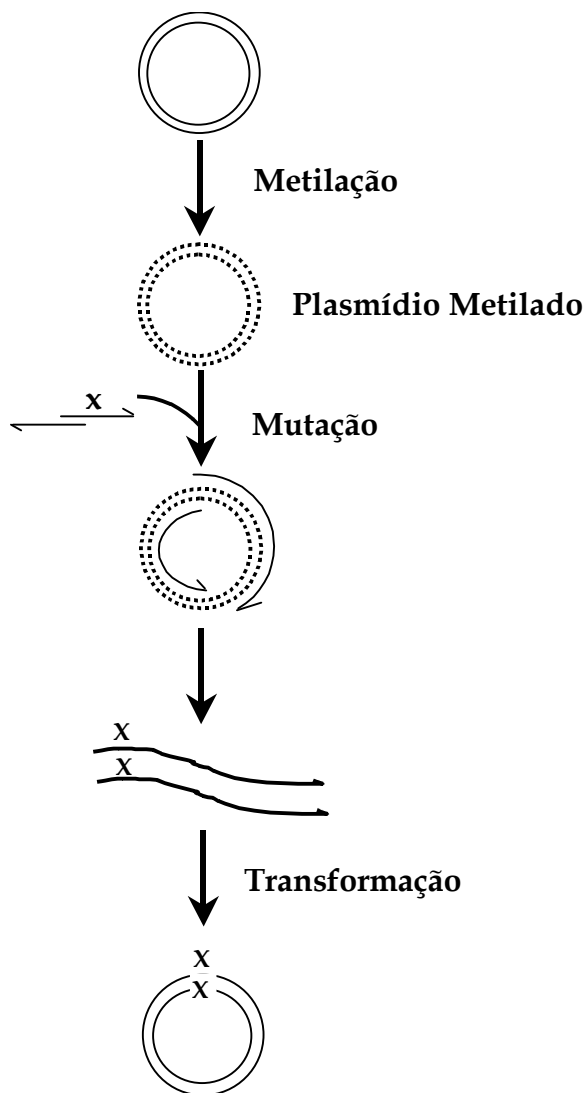


Figura 15: Esquema para reação de mutação (Fonte: Kit para mutação, BIOGEN, Biotecnologias e Químicas).

Primeiramente, o DNA plasmidial (plasmídio pRLC, contendo o gene de interesse) foi metilado com DNA metilase a 37°C por 1 hora. Após a metilação do DNA plasmidial, o plasmídio foi amplificado em uma reação de mutagênese com os dois *primers* sobrepostos, um dos quais contém a mutação alvo. Os *primers* utilizados com as devidas mutações estão indicados na Tabela 6. A amplificação do plasmídio por PCR foi realizada em volumes de 50 µL contendo: 5 µL de tampão 10X, 1,5 µL de dNTPs, 1 µL de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 25 µL de DNA metilado, 1,5 µL de cada *primer* utilizado, completou-se o volume com H<sub>2</sub>O. As condições utilizadas para a reação de PCR estão colocadas na Tabela 7. O produto do PCR foi utilizado para a transformação em *E. coli* DH5α<sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup>, a qual contém endonucleases que destroem o DNA metilado. Após a seleção dos transformantes, extraiu-se o DNA plasmidial, e seguiu-se para a etapa de produção do polímero.

Tabela 6: *Primers* utilizados no estudo de mutação.

Mutante	<i>Primer</i> com o sítio de mutação sublinhado
A272D	3' cgcacaag <u>ctg</u> cgccgctt 5' 5' gagaaaggcgtgttc 3'
M347R	3' cttcggtt <u>ccct</u> cggtcgccg 5' 5' ggccgcgaagccaag 3'
D448H	3' cgcgcgctg <u>ggt</u> ggtgtagcac 5' 5' ttcgccgcgcgcgag 3'
A455Y	3' acctcgaggat <u>ga</u> agaggccg 5' 5' gtgctgtggagcagg 3'

Tabela 7: Condições para a reação de PCR com a mutação.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	2 minutos	1
94 °C	30 segundos	
55 °C	30 segundos	20
68 °C	8 minutos	
68 °C	10 minutos	1

Manter a reação a 4°C após o ciclo.

### 3.2.2.10 Produção de PHA's

O preparo do pré-inóculo consistiu em recolher uma única colônia de uma placa de Petri contendo a linhagem desejada e transferi-la para um tubo contendo 5 mL de meio LB, suplementado com antibiótico ampicilina. Os cultivos foram realizados sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 37°C, durante 24 h.

A etapa de pré-cultivo foi realizada em frascos erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL meio LB e ampicilina na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> de meio, sob agitação a 150 rpm, à temperatura de 37°C, durante 24 h.

A etapa de cultivo foi realizada em frascos erlenmeyers 250 mL, contendo 50 mL de meio LB e ampicilina na concentração 100mg.L<sup>-1</sup>, e os demais substratos, glicose (1,0% do volume total de meio) ou ácido octanóico (0,1% do volume total do meio), sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 37°C, durante 72 h. A massa celular seca (MCS) foi determinada pela pesagem da massa celular obtida pela centrifugação do caldo de cultivo e secagem. O conteúdo de PHA na MCS foi determinado por cromatografia líquida (HPLC).

### 3.2.2.11 Determinação da produção de PHA's

A produção de PHA na massa celular seca foi determinada através de cromatografia em fase líquida (HPLC) segundo KARR e colaboradores, 1983. Para a análise foi utilizado polihidroxibutirato como padrão. A coluna utilizada para a análise foi: Nucleosil C18 - Supelco<sup>R</sup>.

A 10 mg de massa celular seca adicionou-se 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, e levou-se a 80°C por 1 hora, colocou-se 9,5 mL de água, filtrou-se a amostra, sendo os ácidos hidroxialcanóicos (HA's) analisados por cromatografia líquida. As áreas e os tempos de retenção obtidos para os padrões, nas concentrações definidas, foram utilizadas para o cálculo do percentual de PHA's acumulados nas amostras.

## CAPÍTULO IV

# Resultados e Discussão

### 4.1 PHA Sintase

A seqüência de aminoácidos da PHA sintase de *C. violaceum* foi submetida a uma busca comparativa, através do programa BLASTp, com as demais seqüências depositadas no GenBank. Os resultados indicaram 46% de identidade entre a PHA sintase de *C. violaceum* e a PHA sintase de *R. eutropha* (SCHUBERT *et al.*, 1988) e em torno de 39% de identidade com as PHA sintases de *Pseudomonas*. Note-se que as PHA sintases de *R.eutropha* são do tipo I e as de *Pseudomonas* do tipo II, por isso a diferença existente entre as identidades das seqüências. Estudos anteriormente publicados têm mostrado que a maioria das PHA sintases bacterianas, quando comparadas entre si, apresentam semelhanças entre as suas seqüências primárias (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992; REHM e STEINBÜCHEL, 1999).

### 4.2 Alinhamento das Seqüências

É notório que a PHA sintase exerce um papel importante na biossíntese de PHA's e também no tipo de polímero sintetizado, uma vez que esta catalisa a polimerização das moléculas de tioésteres hidroxiacil-CoA, para a formação do polímero. A PHA sintase de *C. violaceum*, a qual é codificada pelo gene *phaC<sub>CV</sub>*, utiliza como substrato apenas 3-hidroxibutirato ou 3-hidroxivalerato, dependendo da fonte de carbono alimentada, tendo sido relatada como uma das poucas sintases capazes da biossíntese de homopolímero de hidroxivalerato (PHV). Por outro lado, as *Pseudomonas* são capazes de utilizar apenas 3-hidroxialcanoatos de 6 a 14 átomos de carbono como substrato. Neste estudo, as PHA sintases do tipo II

(PHA sintases 1 e 2 de *P. aeruginosa*, as PHA sintases 1 e 2 de *P. oleovorans*, e as PHA sintases 1 e 2 de *P. putida*) foram analisadas juntamente com as PHA sintases do tipo I (PHA sintase de *R. eutropha* e a PHA sintase de *C. violaceum*). O alinhamento destas seqüências foi gerado pelo programa T-Coffee (NOTREDAME *et al.*, 2000), conforme mostrado a seguir (Figura 16); neste alinhamento podem ser observadas as regiões conservadas na estrutura primária dessas enzimas.

phaC2Pp	-----MTDKPAKGS-----TTLPATRMNVQNAIILGLRGRDLLSTLRN	37
phaC2Po	-----MKDKPAKGT-----PTLPATSMNVQNAIILGLRGRDLISTLRN	37
phaC2Pa	-----MREKQESGS-----VPVPAEFMSAQSAIVGLRGKDLLTTVRS	37
phaC1Pp	-----MSNKNNDEL-----QRQASENTMGLNPVIGIRRKDLLSSART	37
phaC1Po	-----MSNKNNDEL-----QRQASENTLGLNPVIGIRRKDLLSSART	37
phaC1Pa	-----MSQKNNNEL-----PKQAAENTLNLNPVIGIRGKDLLTSARM	37
phaCCv	-----MQQFVNSLS-----QPPAPDGAHPFAGAWAQLMNQTN	33
phbCRE	MATGKGAAASTQEGKSQPFKVTGPFDPATWLEWSRQWQTEGNHAAASGIPGLDALAG	60
	:	
phaC2Pp	VGRHGLRHPLHTAHLLALGGQLGRVMLGDTQPYQPNPRDARFSDPTWSQNPFFYRRGLQAY	97
phaC2Po	VSRQSLRHPLHTAHLLALGGQLGRVILGDTPLQPNPRDPRFSDPTWSQNPFFYRRGLQAY	97
phaC2Pa	LAVHGLRQPLHSARHLVAFGGQLGKVLGDTLHQPNDARFQDPQSWRLNPFYRRTLQAY	97
phaC1Pp	VLRQAVRQPLHSARHVAFHGLELKNVLLGKSSSLAPDSDDRRFNDPAWSNNPLYRRLQTY	97
phaC1Po	VLRQAVRQPLHSARHVAFHGLELKNVLLGKSSSLAPESDDRRFNDPAWSNNPLYRRLQTY	97
phaC1Pa	VLLQAVRQPLHSARHVAFHGLELKNVLLGQSELRPGDDRRFSDPAWSQNPPLYKRYMQTY	97
phaCCv	QLFALQSSLYQQQLNLWSQFLGQAAGQEAEEAGAKPADRRFASPEWNEHPFYNFLKQSY	93
phbCRE	VKIAPAQLGDIQQRYMKDFALWQAMAEGKAEATGPLHDDRDFAGDAWRNLNLPYRFAAFY	120
	:	
	: . : * * . * : *	
phaC2Pp	LAWQKQTRQWIDESHLDNDDRRARAHFLFNLINDALAPSNSLLN-PQAVKGLFNTGGQSLV	156
phaC2Po	LAWQKQTRLWIEESHLDNDDRRARAHFLFNLINDALAPSNSLLN-PLAVKELFNSGGQSLV	156
phaC2Pa	LAWQKQLLAWIDESNLDCCDRARARFLVALLSDAVAPSNSLIN-PLALKELFNTGGISLL	156
phaC1Pp	LAWRKELQDWVSSDLSPODISRGQFVINLMTTEAMAPTNTLSN-PAAVKRFFETGGKSLL	156
phaC1Po	LAWRKELQDWIGNSDLSPODISRGQFVINLMTTEAMAPTNTLSN-PAAVKRFFETGGKSLL	156
phaC1Pa	LAWRKELHSHWISDLSPODISRGQFVINLMTTEAMAPTNTLSN-PAAVKRFFETGGKSLL	156
phaCCv	LQTSKWMELVDKTLQDEDAKDKLAFATRQYLDAMSPSNFMLTNPVVKRAIETKGESLV	153
phbCRE	LLNARALTELADAVEADAKTRQIRFAISQWVDAMSPANFLATNPEAQRLLIESGGESLR	180
	* : . . . : * : * * * : . * . : : * * *	
phaC2Pp	RGVAHLDDLRHNDGLPRQVDERAFEVGNLAATPGAVVFRNELLELIQYSPMSEKQHAR	216
phaC2Po	RGVAHLDDLRHNDGLPRQVDERAFEVGNLAATAGAVVFRNELLELIQYKPMSEKQHAR	216
phaC2Pa	NGVRHLLLEDLVHNGGMPQVKNKTAFEIGRNLATTQAVVFRNEVLELIQYKPLGERQYAK	216
phaC1Pp	DGLSNLAKDMVNNGGMPQVNMDAFEVGNLGTSEGAVVYRNDVLELIQYSPITEQVHAR	216
phaC1Po	DGLSNLAKDLVNNGGMPQVNMDAFEVGNLGTSEGAVVYRNDVLELIQYKPIQVHAR	216
phaC1Pa	DGLGHLAKDLVNNGGMPQVNDMAFEVGNLATTGAVVFRNDVLELIQYRPIQVHAR	216
phaCCv	EGMKNMLDDFQK--GHISPEKSLARFCLRSQQQTFIISWRNPTKAQREWGLSTYIEK	211
phbCRE	AGVRNMMEDLTR--GKISQTDSEAFVGRNVAVTEGAVVFEYFQLLQYKPLTKVHAR	238
	* : . * : * * * : . * * * : * * * : * * * : * * * : * * *	
phaC2Pp	PLLIVPPQINRFYIFDLSATNSFVQYMLKSGLQVFMVSWSNPDRHREWGLSSYVQ-ALE	275
phaC2Po	PLLIVPPQINKFYIFDLSSTNSFVQYMLKNGLQVFMVSWRNPDPRHREWGLSSYVQ-ALE	275
phaC2Pa	PLLIVPPQINKYYIFDLSPEKSFVQYALKNNLQVFIISWRNPDAQREWGLSTYIE-ALD	275
phaC1Pp	PLLIVPPQINKFYVFDLSPEKSLARFCLRSQQQTFIISWRNPTKAQREWGLSTYID-ALK	275
phaC1Po	PLLIVPPQINKFYVFDLSPEKSLARYCLRSQQQTFIISWRNPTKAQREWGLSTYID-ALK	275
phaC1Pa	PLLIVPPQINKFYVFDLSPDKSLARFCLRNGVQTFIVSWRNPTKSQREWGLTTYIE-ALK	275
phaCCv	PLLFVPPCINKYYLMDLQPDNSMVRHFVAQGYRVFLISWRSVAEMKHTWTETYIEKGVF	271
phbCRE	PLLMVPPCINKYYILDLPESLVRHVVQGHVFLVSWRNPDASMGSTWDDYIEHAAI	298
	* * * . * * * * * : * * * * * . * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	

(continua...)

(...continuação)

phaC2Pp	EALNACRSISGNRDPNLMGACAGGLTMAALQGHLOAKKQLRRVRSATYLVSLDLSKFESP	335
phaC2Po	EALNACRSISGNRDPNLMGACAGGLTMAALQGHLOAKKQLRRVRSATYLVSLDLSKFESP	335
phaC2Pa	QAIEVSREITGSRVNLGACAGGLTVAALLGHLQVRRQLRKVSSVTYLVSLDLSQMESP	335
phaC1Pp	EAVDAVLSITGSKDLNMLGACSSGITCTALVGHYAALGEN-KVNAITVLVSVLDTTMDNQ	334
phaC1Po	EAVDAVLAITGSKDLNMLGACSSGITCTALVGHYAALGEN-KVNAITLTVSVLDTTMDNQ	334
phaC1Pa	EAIEVVLSITGSKDLNMLGACSSGITATLVGHYVASGEK-KVNAFTQLVSVLDFELNTQ	334
phaCCv	AAAEAVQKITKQPTMNVLGFVCGVILTTALCVAQAKGLK-YFDSATFMTSLIDHAEPGE	330
phbCRe	RAIEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTALAVLAARGEH-PAASVTLLTLLDFADTGI	357
	* :. * : . * : * * ** : : . : * : : : : *	
phaC2Pp	ASLFADEQTI EAAKRRSYQRG-----VLDGGEVARIFAWMRPNDLIWNWVNNYLLGKTP	390
phaC2Po	ASLFADEQTI EAAKRRSYQRG-----VLDGAEVARIFAWMRPNDLIWNWVNNYLLGKTP	390
phaC2Pa	AMLFADEQTI LESSKRRSYQHG-----VLDGRDMAKVFAWMRPNDLIWNWVNNYLLGRQP	390
phaC1Pp	VALFVDEQTI EAAKRHSYQAG-----VLEGSEMAKVFAWMRPNDLIWNWVNNYLLGNEP	389
phaC1Po	VALFVDEQTI EAAKRHSYQAG-----VLEGSEMAKVFAWMRPNDLIWNWVNNYLLGNEP	389
phaC1Pa	VALFADEKTI EAAKRHSYQSG-----VLEGKDMAKVFAWMRPNDLIWNWVNNYLLGNQP	389
phaCCv	ISFFIDESVAVAGREAKMASGG-----IISGKEIGRTFASLRANDLVWNYVNNYLLGKTP	385
phbCRe	LDVDFVDEGHVQLREATLGGGAGAPCALLRGLLELANTFSFLRPNDLVWNYVVDNYLKGNTP	417
	. * ** : : . : : * : : . . * : : * . * . * * * * * . * *	
phaC2Pp	PAFDILYWNADSTR LPAALHGDLLEFFKLN-PLTYASGLEVCCTPIDLQQVNIDSFTVAG	449
phaC2Po	PAFDILYWNADSTR LPAALHGDLLEFFKLN-PLTHPAGLEVCCTPIDLQKVELDSFTVAG	449
phaC2Pa	PAFDILYWNNDNTR LPAAFHGELDLDFKHN-PLTRPGALEVSGTAVDLGKVAIDSFHVAG	449
phaC1Pp	PVFDILFWNNDTR LPAAFHGDLIEMFKSN-PLTRPDALKVCGTAIDLKQVKCDIYSLAG	448
phaC1Po	PVFDILFWNNDTR LPAAFHGDLIEMFKSN-PLTRPDALVCGTPIIDLKQVKCDIYSLAG	448
phaC1Pa	PAFDILYWNNDTR LPAALHGFEVLEFKSN-PLNRPGALEVSGTPIIDLKQVTCDFYCVAG	448
phaCCv	APFDLLFWNNDVADLPLPMHTFLLRQFYMNALVVRGAI T LCGVPI D IAKIDVPVYMFVA	445
phbCRe	VPFDLLFWNGDATNLPGPWYCWL RH TYLQNELKVPKLTVCVGPVVDLASIDVPTIYIYS	477
	** : * * * * * . * * . : : : * . : : * . * : : * . * : : . .	
phaC2Pp	SNDHITPWDAVYRSALLLGGE--RRFVLANSNGHIQSI INPPGNPKAYYLANPKLSSDPRA	507
phaC2Po	SNDHITPWDAVYRSALLLGGD--RRFVLANSNGHIQSI INPPGNPKAYYLANPKLSSDPRA	507
phaC2Pa	ITDHI TPWDAVYRSALLLGGQ--RRF ILSNSNGHIQSI LNPPGNPKACYFENDKLSDDPRA	507
phaC1Pp	TNDHITPWQSCYRSAHLFGGK--IEFVLSNSNGHIQSI LNPPGNPKARFMTGADRPDPVA	506
phaC1Po	TNDHITPWQSCYRSAHLFGGK--IEFVLSNSNGHIQSI LNPPGNPKARFMTGADRPDPVA	506
phaC1Pa	LNDHITPWESCYKSARLLGGK--CEF ILSNSNGHIQSI LNPPGNPKARFMTNPELPAEPKA	506
phaCCv	RDDHIVLWSSAFSGLKYLQGAPSRRFVLGASNGHIAGSINPVTKDKRNYWANDTLPLHAE	505
phbCRe	REDHIVPWTAAYASTALLANK--LRFVLGASNGHIAGVINPPAKNKRSHWTNDALPESPO	535
	** . * : : . : . * : * . * * * . : * * : * . . . .	
phaC2Pp	WFHDAKRSEGSWWPLWLEWITARSGLLKAPRTELGNATYPLLGPAPGTYYLTR-----	560
phaC2Po	WLHDAKRSEGSWWPLWLEWITARSGLPKAPRSELGNATYPLLGPAPGTYYLTR-----	560
phaC2Pa	WYYDAKREEGSWWPVWLQWLGWQERSGELGNPDFNLGSAAHPPLEAAPGTYYVHIR-----	560
phaC1Pp	WQENAIKHADSWWLHWQSWLGERAGALKKAPTRLGNRTYAAGEASPGTYVHER-----	559
phaC1Po	WQENATKHADSWWLHWQSWLGERAGELEKAPTRLGNRAYAAGEASPGTYVHER-----	559
phaC1Pa	WLEQAGKHADSWWLHWQWLAERSGKTRKAPASLGNKTYPAGEAAPGTYYVHER-----	559
phaCCv	WLESASRPGSWWWDWAWLAPQSGKQVAAPKSLGNKEFPPLLAAPGSYVLAKAMPVAA	565
phbCRe	WLAGAIEHHSWWPDWTAWLAGQAGAKRAAPANYGNARYRAIEPAPGRYVKA-----	589
	* * . * * * * * : : * . * . . : * * * * :	

(continua...)



(...continuação)

phaC2Pp	---
phaC2Po	---
phaC2Pa	---
phaC1Pp	---
phaC1Po	---
phaC1Pa	---
phaCCv	SLQ 568
phbCRe	---

Figura 16: Resultado do alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de PHA sintases bacterianas do tipo II de *Pseudomonas oleovorans* (phaC1Po e phaC2Po), de *Pseudomonas putida* (phaC1Pp e phaC2Pp) e de *Pseudomonas aeruginosa* (phaC1Pa e phaC2Pa); elas apresentam, cada uma, duas sintases, codificadas pelos genes *phaC1* e *phaC2* e PHA sintases bacterianas do tipo I de *Ralstonia eutropha* (phbCRe) e de *Chromobacterium violaceum* (phaCCv). Aminoácidos idênticos são identificados por (\*); aminoácidos similares por (: ou (.); aminoácidos diferentes ( ), enquanto (-) indicam *gaps* adicionados às seqüências.

A Figura 16 mostra o alinhamento das seqüências de PHA sintases do tipo II de *P. oleovorans* (Po), *P. putida* (Pp) e *P. aeruginosa* (Pa). Elas apresentam, cada uma, duas sintases, codificadas pelos genes *phaC1* e *phaC2*. Também são apresentados os alinhamentos das PHA sintases do tipo I de *R. eutropha* (Re) e *C. violaceum* (Cv). A porção inicial das seqüências compreendendo os 100 primeiros aminoácidos, não apresenta uma similaridade significativa destes aminoácidos, principalmente quando enzimas de tipo diferentes são comparadas. Segundo SCHUBERT e colaboradores (1991), esta região não deve ter uma participação importante na atividade destas enzimas. O alinhamento das seqüências confirma a presença de um resíduo de cisteína altamente conservado entre todas as PHA sintases bacterianas até agora estudadas, como mostrado na Tabela 8. Este resíduo de cisteína vem sendo reportado como parte fundamental do sítio ativo das enzimas PHA sintases (GERNGROSS *et al.*, 1994). A cisteína exerce um papel essencial na função da enzima, formando um grupamento tiol necessário para a catálise covalente da polimerização. Já foi comprovado, *in vitro*, que uma mutação neste resíduo torna a enzima de *R. eutropha* inativa (REHM e STEINBÜCHEL, 1999). STEINBÜCHEL e colaboradores (1993), verificaram que todas as PHA sintases contêm um *motif* característico de lipases (G-X-[S/C]-X-G), em que o sítio ativo serina de lipases é trocado por uma cisteína em PHA sintases bacterianas.

Tabela 8: Resíduo de cisteína conservado nas PHA sintases bacterianas.

<b>Linhagem</b>	<b>Posição</b>	<b>Seqüência</b>
<i>C. violaceum</i>	292	...MNVLGF <span style="background-color: #cccccc;">C</span> VGGVILTT...
<i>R. eutropha</i>	319	...INVLGF <span style="background-color: #cccccc;">C</span> VGGTIVST...
<i>P. putida</i> 1	296	...LNMLGAC <span style="background-color: #cccccc;">C</span> SGGITCTA...
<i>P. putida</i> 2	296	...PNLMGA <span style="background-color: #cccccc;">C</span> AGGLTMAA...
<i>P. oleovorans</i> 1	296	...LNMLGAC <span style="background-color: #cccccc;">C</span> SGGITCTA...
<i>P. oleovorans</i> 2	296	...PNLMGA <span style="background-color: #cccccc;">C</span> AGGLTMAA...
<i>P. aeruginosa</i> 1	296	...LNLLGAC <span style="background-color: #cccccc;">C</span> SGGITTTAT...
<i>P. aeruginosa</i> 2	296	...VNLAGA <span style="background-color: #cccccc;">C</span> AGGLTVAA...

A análise do alinhamento permitiu identificar as regiões mais e menos conservadas e as regiões de consenso entre as PHA sintases do tipo I de *C. violaceum* e de *R. eutropha* e as do tipo II de diferentes *Pseudomonas*. Assume-se que as regiões de consenso e/ou muito similares não são as responsáveis pela diferença da especificidade destes dois tipos de sintase. Destaca-se ainda que as PHA sintases *PhaC2*, além de catalisarem efetivamente a biossíntese de PHA's, parecem estar relacionadas com o alongamento de cadeias poliméricas pré-existentes, uma vez que a sua inativação implica na biossíntese de polímeros mais curtos (QI *et al.*, 1997).

Sabe-se que a estrutura tridimensional está muito mais relacionada à função da proteína do que a estrutura primária. Portanto, fez-se então um estudo computacional a fim de modelar a estrutura da PHA sintase do tipo I de *C. violaceum*, já que esta não possui sua estrutura 3D determinada experimentalmente, e comparar com a estrutura tridimensional de uma PHA sintase do tipo II, sendo a PHA sintase de *P. aeruginosa* escolhida para este estudo. Com base na comparação das estruturas tridimensionais das PHA sintases do tipo I e II, sugeriu-se as mutações sítio-dirigidas que poderiam ser feitas na estrutura de *C. violaceum*, em função da sobreposição das estruturas.

## 4.3 Modelagem da Estrutura

### 4.3.1 Identificação e Seleção da Proteína-Molde

A primeira etapa do método foi a identificação e seleção de pelo menos uma proteína de estrutura conhecida, que serviu de molde para a determinação da estrutura da proteína alvo, *phaC* de *C.violaceum*, *phaC1* e *phaC2* de *P. aeruginosa*. Num primeiro ensaio buscou-se por similaridade seqüência *versus* seqüência utilizando BLASTp contra o PDB (banco de dados de proteínas). Este resultado mostrou-se negativo para ambas proteínas alvo, visto que a identidade entre as seqüências era menor que 20%. Quando a identidade entre as seqüências é menor que 20%, a melhor maneira para identificar a proteína molde é utilizar métodos de busca por similaridade seqüência *versus* estrutura, metodologia conhecida como 'threading'. Este ensaio foi positivo, indicando que as três estruturas alvo possuem relação com uma lipase gástrica humana, a qual possui estrutura determinada experimentalmente e está depositada no PDB com o código de acesso 1HLG (Ver Figura 17).

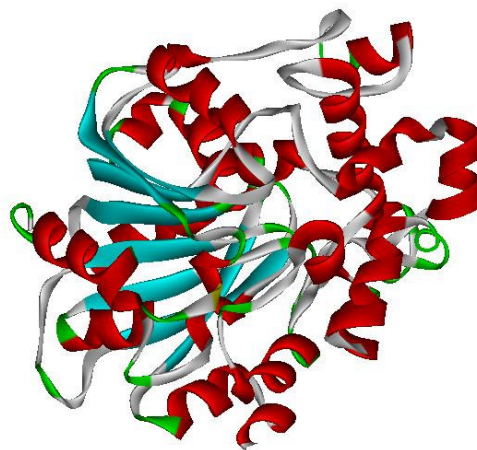


Figura 17: Estrutura terciária da 1HLG. Verde - estrutura de alças, vermelho -  $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ .

A Figura 17 mostra a estrutura tridimensional da lipase 1HLG. Esta lipase, com 371 resíduos de aminoácidos apresenta um domínio central pertencente à família de  $\alpha/\beta$  hidrolase. Esta apresenta ainda uma tríade catalítica clássica em lípases (Ser153, His353, Asp324), como pode ser visualizada na Figura 18 (Russel, *et al.*, 1999).

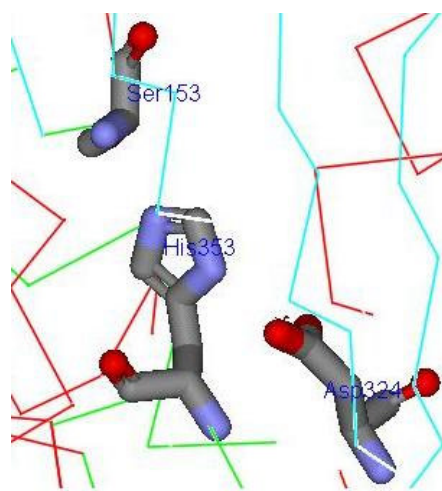


Figura 18: Tríade catalítica da lipase 1HLG, (Ser153, His353, Asp324). Os átomos dos aminoácidos representam: Carbono (cinza), Nitrogênio (azul), e Oxigênio (vermelho).

#### 4.3.2 Alinhamento das Seqüências

Uma vez identificado o molde, as seqüências alvo devem ser alinhadas com a seqüência molde. O objetivo do alinhamento é justapor resíduos estruturalmente equivalentes levando em consideração características estruturais comuns como, por exemplo, a estrutura secundária. O alinhamento é apresentado na Figura 19. Este alinhamento deverá ser submetido como um arquivo .ali para o programa de construção do modelo, o Modeller.

```

1hlg_a -----
sin1Pa -----MSQKNNNELPKQAENTLNLNPVIGIRGKDLLTSARMVLLQAVRQPLHSARH
sin2Pa -----MREKQESGSVPVPAEFMSAQSIAIVGLRGKDLLTTVRSLAVHGLRQPLHSARH
sin Cv -----MQQFVNLSLQPPAPDGAHPFAGAWAQLMNQTNQ----LFALQSSLYQ--QQL

1hlg_a -----
sin1Pa VAHFSLELKN-----VLLGQSELRPGDDDRRFSDPAWSQNPLYKRYMQTYLAWRKE
sin2Pa LVAFGGQLGK-----VLLGDTLHQPNDARFQDPSWRNLNPFYRRTLQAYLAWQKQ
sin Cv NLWSQFLGQAAG-----QEAAAEAGAKPADRRFASPEWNEHPFYNFLKQSYLQTS

1hlg_a -----
sin1Pa LHSWISHSDLSPQDISRGQFVINLLTEAMSPNLSLN--PAAVKRFFETGGKSLLDGLGHLAKDLVNN
sin2Pa LLAWIDESNLDCDDRARARFLVALLSDAVAPSNLIN--PLALKELFNTGGISLLNGVRHLLLEDLVHN
sin Cv KWMMELVDKTQLDEDAKDKLAFATRQYLDAMSPSNFMLTNPDVVKRAIETKGESLVEGMKNMLDDFQ

1hlg_a -PEVTMNISQMITYW-GYPNEEYEVVTEGDYILEVNRIPYGKKNSGQRPVVFLQHGLLASATNWI SNLPNNSLAF
sin1Pa GGMP SQVMDDAFEVVGKNLATTEGAVVFRNDVLELIQYRPITESVHE-RPLLVV-PPQINKFYVFDLS-PDKSLAR
sin2Pa GGMP SQVNKTAFAEIGRNLATTQGA VVFRNEVLELIQYKPLGERQYA-KPLLIV-PPQINKYIFDLS-PEKSFVQ
sin Cv KGHISMSDESKFEIGKNLVVTPGQVVFRNELIELIQYTPTTDKVYE-KPLLFV-PPCINKYYLMDLQ-PDNSMVR

1hlg_a ILADAGYDVWLGNSRGTWARRNLYYSPDSVEFWAFSDEMAYDLPATIDFIVKKTGQKQLHYVGHSGQTTIGF
sin1Pa FCLRNGVQTFIVSWRN-----PTK-SQREWGLTTYI-EALKEAIEVVL SITGSKDLNLLGACSGGITTA
sin2Pa YALKNNLQVVFVSWRN-----PDA-QHREWGLSTYV-EALDQAIEVSREITGSRSVNLGACAGGLTVA
sin Cv HFVAQGYRVFLISWRS-----AVA-EMKHFTWETYIEKGVFAAAEAVQKITKQPTMNVLGFCVGGVILT

1hlg_a IAFSTNPSLA-KRIKTFYALAPVATVKYTKSLINKLRFVPSLKFIFGDKIFYPHNFFDQFLATEVCSREMLNL
sin1Pa TLVGHYVASGEKKVNAFTQLVSVLDFELNTQVALFADEKTLAAKRRSYQS----GVLEGKDMAKVFAMWRPNL
sin2Pa ALLGHLQVRRQLRKVSSVTYLVSLLDSPQMESPA MLFADEQTLES SKRRSYQ----HGVL DGRDMAKVFAMWRPNL
sin Cv TALCVAQAKGLKYFDSATFMTSLIDHAEPGEISFFIDESV VAGREAKMASG----GIISGKEIGRTFASLRANDL

1hlg_a LCSN-ALFII CGFDSKNFNTSRDLVYL--SHNPAGTSVQNMFWHTQAVKSGKFQAYDWGSPVQNRMHYDQSPPY
sin1Pa IWNYWVNNYLLGNQPPAF-DILYWNNDTRRLPAALHGEFVELFKSNPLNRPGALEVS GTP--IDLKQVTCDFYCV
sin2Pa LIWNYWVNNYLLGRQPPAFDILYWNNDTRRLPAAFHGE LLDLFLKHNPLTRPGALEVS GTA--VDLGKVAIDSFHV
sin Cv VWNVYVNNYLLGKTPAPF-DLLFWNNDVLDLPLMHTFLLRQFYMNALVVRPGAITLCGV--PIDIAKIDVPVYM

1hlg_a YNVTAMNVP IAVWNGGKDLLAD--PQDVGLLLPKLPNLIYHKEIPFYNHLDFIWAMDAPQEVYNDIVSMISEDKK
sin1Pa AGLNDHITPWESCYKS-----ARLLGGKCEFILSN SGHIQSILNPPGNPKARFMTNPELPAEPKAW
sin2Pa AGITDHI TPWDVYRSALLG-----GQ-RRF ILSNSGHIQSILNPPGNPKAC YFENDKLS SDPR
sinCv FAARDHIVLWSSAFSGLKYL-----QGAPSRRFVLGASGHIAGSINPVTKDKRNYWANDTLPLHAE

1hlg_a -----
sin1Pa WLEQAGKHADSWWLHWQQLAERSGKTRKAPASLGNKTYPAGEAAPGTYVHER-----
sin2Pa AWYYDAKREEGSWWPVWLGWLQERSGELGNPDFNLGSA AHPPLEAAPGTYVHIR-----
sinCv EWLESAESRPGSWWKDWDALAPQSGKQVAAPKSLGNKEFPPLLAAPGSYVLAKAMPSVAASLQ

```

Figura 19: Resultado do alinhamento das seqüências para a construção do modelo. Molde para a construção do modelo: 1hlg\_a (lipase gástrica humana). Proteínas problemas: sin1Pa e sin2Pa (PHA sintases bacterianas do tipo II de *Pseudomonas aeruginosa*, codificadas pelos genes *phaC1* e *phaC2*) e sinCv (PHA sintase bacteriana do tipo I de *Chromobacterium violaceum*, codificada pelo gene *phaC*). (-) indicam gaps adicionados às seqüências.

Deve-se salientar que a lipase tem 371 resíduos de aminoácidos, e que a PHA sintase de *C. violaceum* tem 568 resíduos de aminoácidos, enquanto que as PHA sintase 1 e 2 de *P. aeruginosa* têm respectivamente 559 e 560 resíduos de aminoácidos e, portanto somente a região central das PHA sintases pode ser modelada, retirando-se 164 aminoácidos iniciais e 64 finais de *C. violaceum* e, 169

aminoácidos iniciais e 53 aminoácidos finais das PHA sintases de *P. aeruginosa* para a construção do modelo estrutural. Como já foi discutido anteriormente, os 100 primeiros aminoácidos não apresentam papel importante na atividade destas enzimas, logo pode-se afirmar que a exclusão destes aminoácidos não terá influência na função da proteína.

#### 4.2.3 Construção do Modelo

Neste estudo foi gerado o modelo para uma PHA sintase do tipo I, a PHA sintase de *C. violaceum*, e para uma PHA sintase do tipo II, a PHA sintase de *P. aeruginosa*, sendo que este microrganismo possui duas PHA sintases (1 e 2). O modelo foi gerado com base na homologia com uma lipase gástrica humana, cuja estrutura foi determinada experimentalmente por cristalografia de Raios-X (ROUSSEL *et al.*, 1999). Foram geradas as coordenadas da estrutura através do programa MODELLER, e estas foram visualizadas com o programa de visualização de estruturas Swiss PDB Viewer e estão apresentadas nas Figuras 20, 21 e 22.

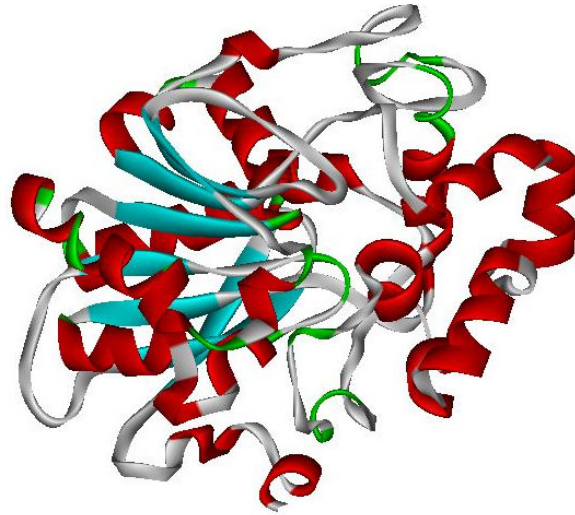


Figura 20: PHA sintase de *C. violaceum*, gerada neste trabalho através da modelagem por homologia. Verde - as estruturas de alças, vermelho -  $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ .



Figura 21: PHA sintase 1 de *P. aeruginosa*, gerada neste trabalho através da modelagem por homologia. Verde - as estruturas de alças, vermelho -  $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ .

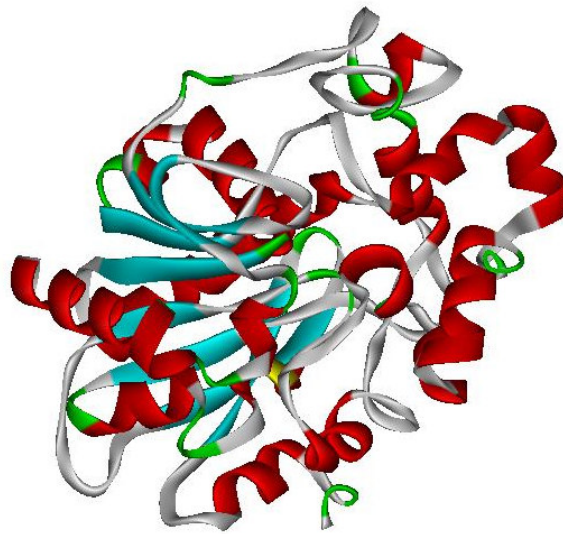


Figura 22: PHA sintase 2 de *P. aeruginosa*, gerada neste trabalho através da modelagem por homologia. Verde - as estruturas de alças, vermelho -  $\alpha$ -hélices e ciano - folhas- $\beta$ .

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das PHA sintases do tipo I e II revela que os resíduos C319, H508 e D480 na PHA sintase de *R. eutropha*, correspondem aos resíduos C292, H478 e D448 na PHA sintase de *C. violaceum*, C296, H479 e D451 na PHA sintase 1 de *P. aeruginosa* e C296, H480 e D452 na PHA sintase 2 de *P. aeruginosa*. Estudos de mutação revelam que a PHA sintase de *R. eutropha* possui uma díade catalítica (C319-H508), em que a C319 é um sítio ativo essencial para a catálise covalente (GERNGROSS *et al.*, 1994) e o H508 serve como uma base geral catalítica (JIA *et al.*, 2001). O modelo proposto por REHM e colaboradores (2002), para a PHA sintase de *R. eutropha*, mostrou que o sítio ativo C319, e os resíduos conservados H508 e D480, formam uma tríade catalítica. Nas PHA sintases modeladas neste trabalho, parece ser confirmada a formação de uma díade catalítica formada pelos resíduos C292-H478 em *C. violaceum*, C296-H479 na PHA sintase 1 de *P. aeruginosa* e C296-H480 na PHA sintase 2 de *P. aeruginosa*, como mostrado na Figura 23. O resíduo D480 em *R. eutropha*, que corresponde ao resíduo D302 de PHA sintase do tipo III de *A. vinosum*, foi proposto como uma base geral catalítica que ativa o grupamento 3-hidroxil do HB-CoA para formar a ligação éster (JIA *et al.*, 2000). Os aminoácidos D448, D451 e D452, presentes



respectivamente em, *C. violaceum*, *P. aeruginosa* 1 e 2 no modelo, podem, no entanto, estar apenas associados ao transporte do substrato até o sítio catalítico.

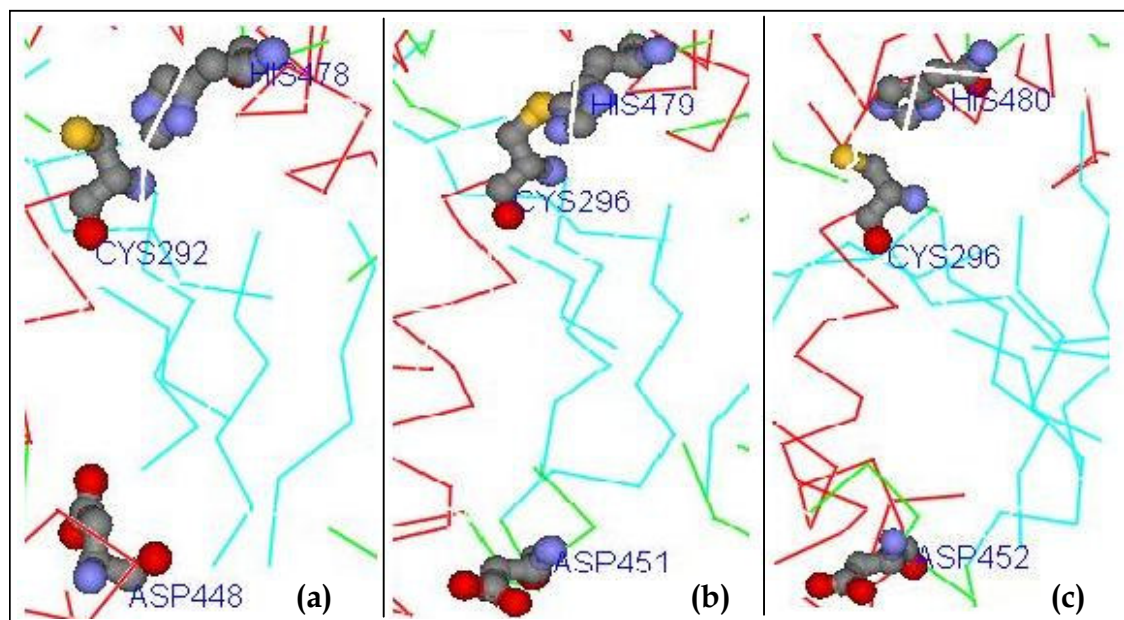


Figura 23: Comparação entre os sítios catalíticos na PHA sintase. (a) resíduos cys292-his478-asp448 de *C. violaceum*; (b) resíduos cys296-his479-asp451 de *P. aeruginosa* I; (c) resíduos cys296-his480-asp452 de *P. aeruginosa* II. Os átomos dos aminoácidos representam: C (cinza), N (azul), S (amarelo) e O (vermelho).

#### 4.2.4 Validação do Modelo

O gráfico de Ramachandran indica boa qualidade para os modelos propostos, uma vez que mais de 94% dos resíduos de aminoácidos modelados apresentam ângulos espacialmente possíveis, ou seja, estão dentro das regiões energeticamente favoráveis do gráfico. A Figura 24 mostra o gráfico de Ramachandran para o molde utilizado na modelagem, que mostra que 99,1% dos resíduos de aminoácidos estão dentro das regiões favoráveis do gráfico. A estrutura modelada para a PHA sintase de *C. violaceum* e a PHA sintase 1 e 2 de *P. aeruginosa* apresentaram respectivamente 94%, 96,2% e 96,0% dos resíduos modelados com ângulos espacialmente possíveis, conforme mostrado nas figuras 25, 26 e 27.

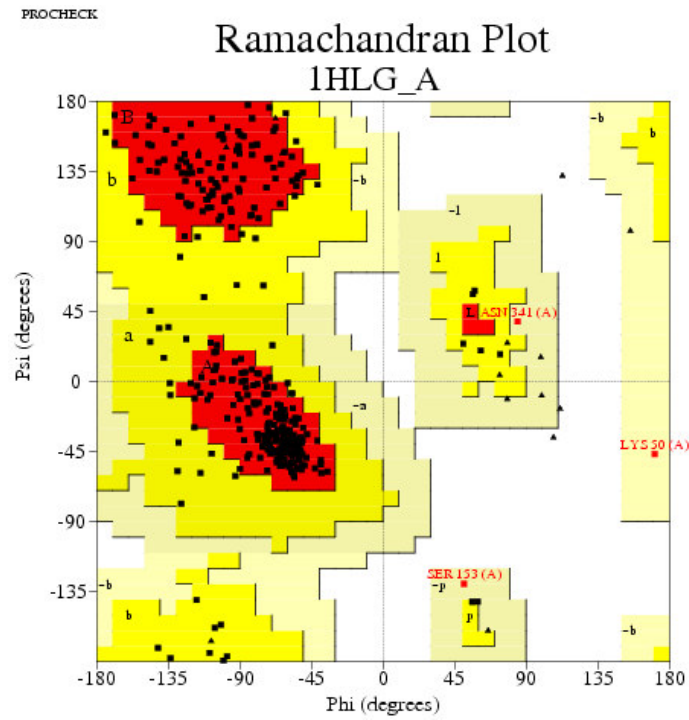


Figura 24: Gráfico de Ramachandran para a 1HLG

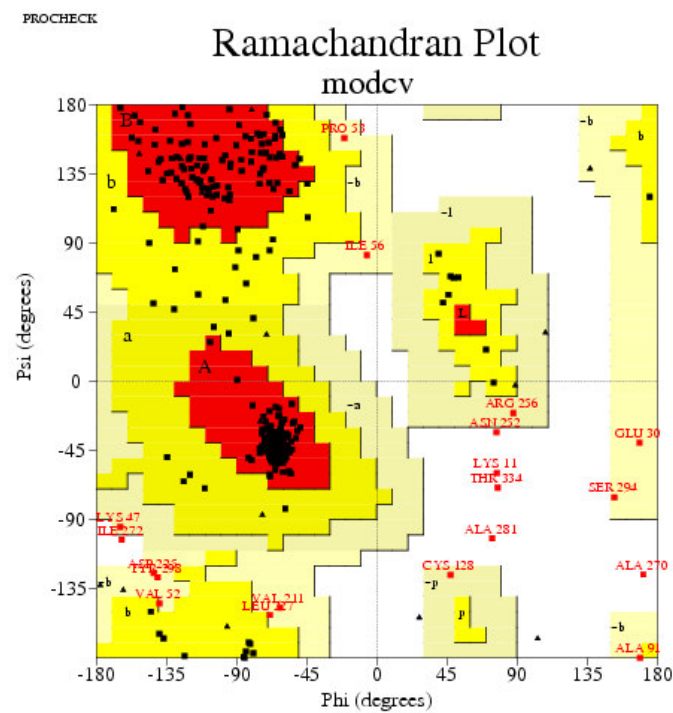


Figura 25: Gráfico de Ramachandran para a PHA sintase de *C. violaceum*

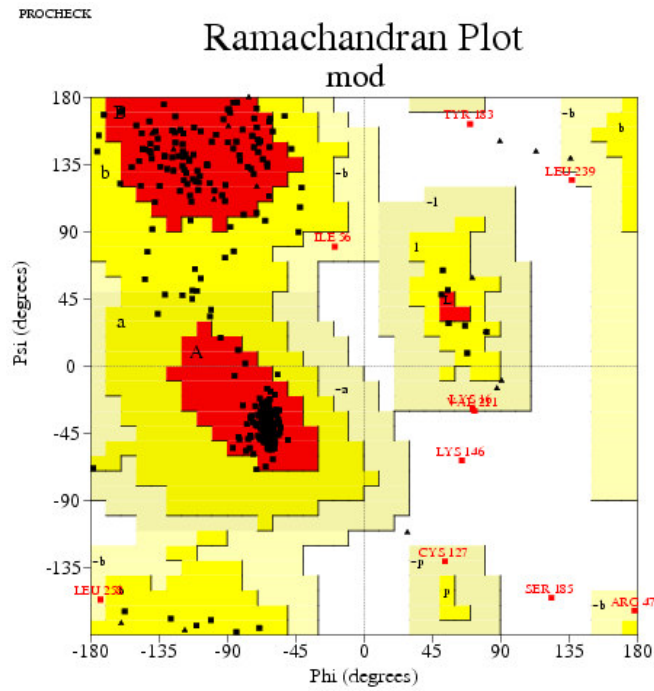


Figura 26: Gráfico de Ramachandran para a PHA sintase I de *P. aeruginosa*

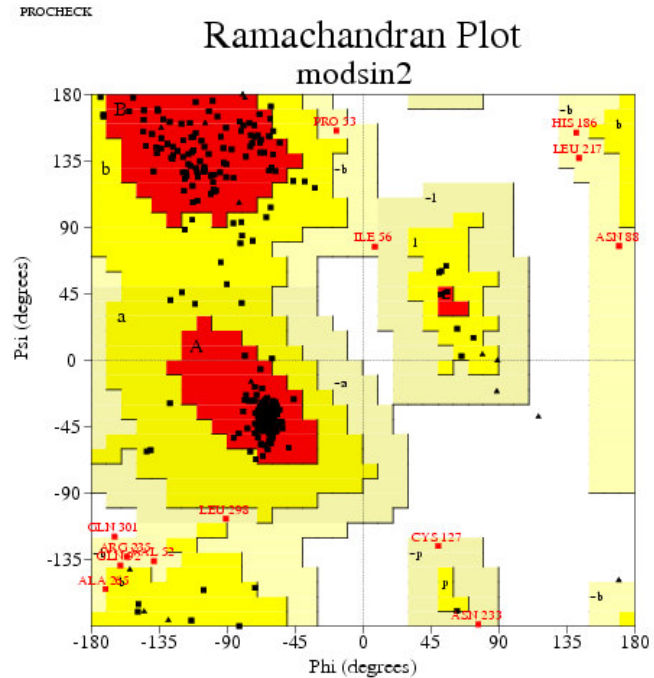


Figura 27: Gráfico de Ramachandran para a PHA sintase II de *P. aeruginosa*

#### 4.4 Mutações Sítio Dirigidas

Com base na sobreposição dos modelos construídos da PHA sintase de *C. violaceum* e *P. aeruginosa*, percebeu-se uma notável conservação dos resíduos, em função de uma excelente sobreposição. Levou-se em consideração o desvio de mínimos quadrados (“rmsd”) entre os aminoácidos para a identificação dos potenciais sítios de mutação na PHA sintase de *C. violaceum*. Os seguintes aminoácidos: alanina (A272), metionina (M347), ácido aspártico (D448) e alanina (A455) foram escolhidos para mutação sítio dirigida. Em função das características dos aminoácidos, as seguintes mutações foram realizadas: A272D (alanina na posição 272 por um ácido aspártico), M347R (metionina na posição 347 por uma arginina), D448H (ácido aspártico na posição 448 por uma histidina) e A455Y (alanina na posição 455 por uma tirosina).

O gene *phaC* de *C. violaceum* foi clonado e expresso em *E. coli*. Foi demonstrado que o conjunto de genes responsáveis pelas enzimas envolvidas na biossíntese de PHA em *R. eutropha* e outras bactérias podem ser clonados e expressos em *E. coli* (SCHUBERT *et al.*, 1988; PEOPLES e SINSKEY, 1989). Com o plasmídio construído foi feita a reação de mutagênese, e o resultados dos plasmídios carregando a mutação e o plasmídio não mutado foram analisados em gel de agarose, como pode ser visualizado na Figura 28.

Após a obtenção dos plasmídios carregando as mutações, partiu-se para a produção de polímero com linhagens de *E. coli*, cada uma carregando um plasmídio mutante diferente. A produção de polímero pelos recombinantes e seus mutantes é apresentada na Tabela 9.

(a) (b) (c) (d) (e) (f)

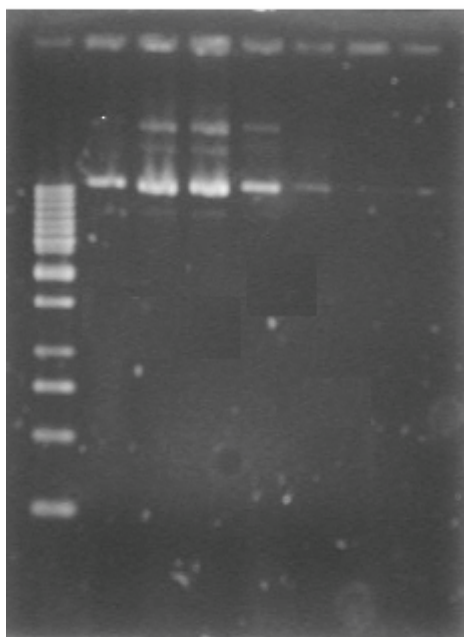


Figura 28: Eletroforese em gel de agarose. (a) Ladder marcador padrão de peso molecular; (b) plasmídeo pRLC; (c) plasmídeo pRLC carregando MUT1 (A272D); (d) plasmídeo pRLC carregando MUT2 (M347R); (e) plasmídeo pRLC carregando MUT3 (D448H); (f) plasmídeo pRLC carregando MUT4 (A455Y).

Tabela 9: Produção de polímero pelos recombinantes e seus mutantes, em percentual de PHB em relação à massa seca.

Plasmídios (Mutação)	Substrato	% PHB
pRLC	Glicose	1,48 ± 0,66
	Ácido octanóico	3,36 ± 0,12
pRLC - MUT1 (A272D)	Glicose	2,35 ± 0,71
	Ácido octanóico	1,42 ± 0,54
pRLC - MUT2 (M347R)	Glicose	2,20 ± 0,39
	Ácido octanóico	ND
pRLC - MUT3 (D448H)	Glicose	2,40 ± 0,48
	Ácido octanóico	2,16 ± 0,09
pRLC - MUT4 (A455Y)	Glicose	ND
	Ácido octanóico	ND

ND: não detectado

Estudos prévios publicados por KOLIBACHUK e colaboradores (1999) mostram que esses autores não observaram produção significativa de PHA, quando clonaram e expressaram um fragmento de DNA de 6,3 kbp (6.300 pares de base), contendo o gene *phaC<sub>Cv</sub>* em *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup>. A construção feita pelo grupo, continha além do gene *phaC<sub>Cv</sub>* (codificando para a PHA sintase de *C. violaceum*), o gene *phaA<sub>Cv</sub>* (que codifica para a enzima  $\beta$ -cetotiolase de *C. violaceum*), e os genes *phaA<sub>Re</sub>* e *phaB<sub>Re</sub>* (que codificam para  $\beta$ -cetotiolase e acetoacil-CoA redutase de *R. eutropha*, respectivamente). Contudo, o plasmídeo pRLC, construído para nosso estudo, é diferente da construção feita por KOLIBACHUK e colaboradores, uma vez que este plasmídeo contém os genes *phaC<sub>Cv</sub>*, *phaB<sub>Re</sub>* e *phaA<sub>Re</sub>*. Observou-se neste caso a produção de PHB, tanto quando foi utilizado glicose quanto ácido octanóico como substrato, conforme pode ser verificado nos resultados apresentados na Tabela 9.

Em resumo, os resultados mostrados na Tabela 9 indicam que o mutante 4 (pRLC-MUT4) compromete completamente a expressão do gene; o mutante 2 (pRLC-MUT2) exibe uma clara diferença de especificidade com relação ao substrato, e as variações obtidas nos mutantes 1 e 3 (pRLC-MUT1 e pRLC-MUT3) estão dentro da margem de erro dos ensaios, não podendo-se afirmar neste caso que as mutações correspondentes alterem significativamente a expressão e/ou a atividade catalítica.

A  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos pode prover substratos à produção de polihidroxibutirato tanto a partir de acetil-CoA, através da atividade da cetotiolase e, posteriormente, da acetoacil-CoA redutase, bem como pela utilização do próprio intermediário hidroxibutiril-CoA (Figura 4). Este fato pode explicar, na PHA sintase não mutada, o maior acúmulo de polímero obtido nos cultivos onde a fonte de carbono utilizada foi o ácido octanóico, quando comparados àqueles nos quais utilizou-se glicose como única fonte de carbono. Tal afirmação deriva do conhecimento de que a glicose somente é capaz de prover substratos à síntese de

polihidroxibutirato pela formação de acetil-CoA. A mudança do acúmulo de PHB pelos mutantes sugere que ocorreram alterações pelo menos na afinidade enzima-substrato, uma vez que as concentrações de glicose e ácido octanóico foram as mesmas utilizadas no controle (não mutado).

A partir dos dados apresentados não é possível sugerir mudança na especificidade da enzima com relação ao comprimento da cadeia lateral dos PHA's, uma vez que não foram avaliados os percentuais de acúmulo de PHA de cadeia média. Esta análise necessitaria o emprego de padrões de cadeia média, não realizados neste trabalho.

Embora as mutações devam ser confirmadas pelo sequenciamento do gene da PHA sintase, o acúmulo de polímero encontrado nos diferentes mutantes sugere que apenas a mutação 4 (pRLC-MUT4) produziu inativação da PHA sintase, observada pela não detecção de acúmulo de polímero e, portanto, que o resíduo de alanina na posição 455 é essencial para a atividade enzimática.

O modelo gerado por REHM e colaboradores (2002) sugere uma tríade catalítica formada pelos resíduos C319, H508, e D480 em *R. eutropha*. Por outro lado, o modelo gerado neste trabalho para a PHA sintase de *C. violaceum* nos indica, no entanto, uma díade catalítica formada pelos resíduos C292 e H478. Logo, estes resultados não confirmam a hipótese de REHM e colaboradores (2002).

JIA e colaboradores (2000) sugeriram que o aminoácido D302 de *C. vinosum* atuaria como uma base geral catalítica ativando grupamento 3-hidroxil do HA-CoA para formar a ligação éster, visto que este aminoácido quando mutado implicou em uma grande redução da atividade da enzima. No presente trabalho, mudou-se no gene *phaC<sub>v</sub>* o ácido aspártico (D) na posição 448 por uma histidina (H), com o objetivo de se analisar a proposta de JIA e colaboradores. Observe-se que esta mutação na posição correspondente ao ácido aspartático é equivalente à mutação produzida por JIA e seu grupo, que afirmam que, embora o resíduo de

ácido aspártico não faça parte do sítio catalítico que contribuiria para a formação de uma tríade, ele pode ter um papel importante na atividade enzimática, que envolve a ativação do grupo 3-hidroxil do HBCoA para o ataque nucleofílico sobre a ligação tioéster do intermediário catalítico, desprotonando o grupo 3-hidroxil do HBCoA.

Observe-se que tanto o ácido aspártico quanto a histidina possuem hidrogênios ionizáveis na cadeia lateral. No entanto, eles possuem caráter ácido-base diferentes, o que pode explicar as diferenças observadas na expressão de PHB para diferentes substratos em nossos ensaios. O mutante obtido neste trabalho foi capaz de acumular PHB nos mesmos níveis do gene não mutado, para glicose como substrato, conforme mostrado na Tabela 9; com ácido octanóico, houve pequena redução no acúmulo de PHB, o que sugere que a mutação produzida pode ter alterado a afinidade da enzima pelo substrato.



## CAPÍTULO V

# Conclusões e Sugestões

### 5.1 Conclusões

A modelagem por homologia da PHA sintase de *C. violaceum* e das PHA sintases 1 e 2 de *P. aeruginosa*, empregando a estrutura 1HLG como molde, foi bem sucedida, permitindo obter as estruturas das enzimas com 94%, 96,2% e 96,0% respectivamente, dos resíduos em ângulos possíveis, segundo o gráfico de Ramachandran.

Através da estrutura 3D gerada foi possível visualizar o sítio catalítico de ambas estruturas, fazendo parte deste uma díade catalítica identificada como: C292 e H478 de *C. violaceum*, C296 e H479 na PHA sintase 1 de *P. aeruginosa*, e C296 e H480 na PHA sintase 2 de *P. aeruginosa*. Nossos dados, portanto, não confirmam a tríade catalítica proposta em estudos anteriores, publicados na literatura; por outro lado, estão de acordo com as evidências também encontradas na literatura sobre o papel da díade aqui sugerida.

A sintase de *C. violaceum* clonada e expressa em *E. coli* produziu PHB (Plasmídio pRLC e mutantes).

A diferença na produção de PHB pela PHA sintase não mutada e nos mutantes sugere que há pelo menos mudança na afinidade enzima-substrato (Seletividade pelo substrato).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a modelagem e estudo do sítio ativo podem prover importantes informações sobre a especificidade e expressão/atividade da enzima PHA sintase, sendo uma ferramenta útil para os

estudos de mutação sítio dirigida. Trabalhos desta natureza podem reduzir o número de ensaios necessários para a otimização da enzima, através das técnicas de DNA recombinante.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Como continuidade deste trabalho, para que se possa ampliar as conclusões com os dados obtidos até o momento, sugere-se:

- Utilização de um software que simule o encaixe de substratos de cadeia curta e média na estrutura como ferramenta para propor novas mutações, visando a mudança na especificidade das enzimas.
- Aprofundamento dos estudos de avaliação da expressão das PHA sintases mutantes em *E. coli*.

## CAPÍTULO VI

### Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W., LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*, 54, 450-472.

ANTÔNIO, R.V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B.H.A. (2000) Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 111-117.

BAKER, D.; ŠALI, A. (2001) Protein structure prediction and structural genomics. *Nature*, 294, 93-96.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.L. (2000) GenBank. *Nucl Acid Res*, 28, 15-18.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. (2001) *Biochemistry*: 5<sup>th</sup> ed., W. H. Freeman and Company, New York.

BLUNDELL, T.L.; SIBANDA, B.L.; STERNBERG, M.J.E.; THORNTON, J.M. (1987) Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 326, 347-352.

- BOWIE, J.U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 253, 164-170.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. (1990) Plastics from and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 41, 77-93.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65, 127-161.
- BYROM, D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol*, 5, 246-250.
- BYROM, D. (1992) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microb. Reviews.*, 103, 247-250.
- CHOTHIA, C.; LESK, A.M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.*, 5, 823-826.
- DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 10, 135-266.
- DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO T. (1990) Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromol*, 23, 26-31.
- DURÁN, N.; MENCK, C.F.M. (2001) *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27, v. 3, p. 201-222.
- FULLER, R. C. (1999) Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25, 21-29.

GERNGROSS, T.U.; SNELL, K.D.; PEOPLES, O.P.; SINKEY, A.J.; CSUHAI, E.; MASAMUNE, M.; SUBBE, J. (1994) Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalkanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*. Evidence for a required posttranslational modification for catalytic activity. *Biochemistry*, 33, 9311-9320.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. (2001) Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia. Tradução Milarepa Ltda.-Rio de Janeiro: Campus.

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. (1999) Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 132-141.

GUERX, N.; PEITSCH, M.C. (1997), SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714-2723.

HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.

HÄNGGI, U.J. (1995) Requiriments on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. *FEMS Microbiol. Reviews*. 16, 213-220.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU L.; DAWES, E.A. (1988a) Characterization of two 3-ketothiolases processing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett*, 52, 91-96.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. (1988b) The role of NADH and NaDPH linked acetoacetyl-COA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett*, 52, 91-96.

HOLMES, P.A. (1985) Applications of PHB - a microbioally produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.*, 16, 32-36.

JIA, Y.; KAPPOCK, T.J.; FRICK, T.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. (2000) Lipases Provide a New Mechanistic Model for Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthases:

Characterization of the Functional Residues in *Chromatium vinosum* PHB Synthase. *Biochemistry*, 39, 3927-3936.

JIA, Y.; YUAN, W.; WODZINSKA, J.; PARK, C.; SINSKEY, A.J.; STUBBE, J. (2001) Mechanistic Studies on Class I Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthase from *Ralstonia eutropha*: Class I and III Synthases Share a Similar Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, 40, 1011-1019.

KALIA, V.C.; REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; RASHMI. (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, 137-146

KIVIRAUMA, T.; OIKARI, P.; SAARELA, J. (1996) Software Plasmid Processor. Department of Computer Sciences and Applied Mathematics, University of Kuopio, Finland.

KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. (1999) Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (*phaC*) gene from *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8), 3561-3565.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS D.S.; THORNTON, J.M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.

LEE, S.Y. (1996a) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 1-14.

LEE, S.Y. (1996b) Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.*, 14, 431-438.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. (2000). Principles of biochemistry. 3rd. ed. New York: Worth Publishers.

LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. (1993) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 38, 493-501.

LUZIER, W.D. (1992) Materials derived from biomass biodegradable materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 839-842.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. (1999) Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21-53.

MAGGIO, E.T.; RAMNARAYAN, K., (2001) Recent developments in computational proteomics. *Trends Biotechnol.*, 19, 996-1004.

Manual de Laboratório de Análise Genômica, vol. 1, 1997.

MARTY-RENOM, M.A.; STUART, A.C.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; ŠALI, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29, 291-325.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, 302, 205-217.

OEDING V.; SCHLEGEL HG. (1973)  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134, 239-48

PARK, S. J.; PARK, J. P.; LEE, S. Y. (2002) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of mediumchain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. *FEMS Microbiology Letters*, 214, 217-222.

PEITSCH, M.C.; SCHWEDE, T.; DIEMAND, A.; GUEX, N. (2000) Protein structure computing in the genomic era. *Res. Microbiol.*, 151, 107-112.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.*, 264, 15293-15297.

PIEMOLINI, L.T.; CLEMENTE, R.G.; ANTÔNIO, R.V.; PORTO, L.M. (2003) Identificação de Sítios de PHA Sintases para Estudos de Controle de Comprimento de Cadeia de Polihidroxialcanoatos. SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações

PIEMOLINI, L.T.; ROSSLE, S.C.; BISCH P.M.; ANTÔNIO R.V.; PORTO, L.M. (2004a) Mutação Sítio Específica da PHA Sintase de *Chromobacterium violaceum* a partir da

Modelagem Estrutural da Proteína. XV COBEQ - Congresso Brasileiro de Engenharia Química: A Engenharia Química e o Crescimento Sustentável (Resumo aceito).

PIEMOLINI, L.T.; VALE, C.M.; PORTO, L.M.; ANTÔNIO, R.V. (2004) Cloning and Heterologous Expression of the PHA Synthase Gene of *Chromobacterium violaceum*. XXXIII Reunião Anual da SBBq - Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

PIEMOLINI, L.T.; ROSSLE, S.C.; BISCH, P.M.; ANTÔNIO, R.V.; PORTO, L.M. (2004) Study of the Active Site of PHA Synthase from a Structural Comparative Modeling Approach. XXXIII Reunião Anual da SBBq - Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNECK, E.; SILVA, A.F.; REIS, A.N.; JUNQUEIRA, A.C.M.; SANTOS, A.C.F.; NHANI JR., A.; WUST, C.I.; FILHO, F.C.; KESSEDJIAN, J.L.; PETRETSKI, J.H.; CAMARGO, L.P.; FERREIRA, R.G.M.; PEREIRA, M.R.; LIMA, R. P.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V.S.; FLATSCHART, A.V.F. (2003) Bioinformática, Manual do usuário. Biotecnol. Ciência e Desenv., 29, 12-25.

QI, Q.S.; REHM, B.H.A.; STEINBÜCHEL, A. (1997) Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa* : comparison of *PhaC1* and *PhaC2*. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 155-162.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN C.; SASISEKHARAN, V. (1963), Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations. *Journal of Molecular Biology*, 7, 95-99.

REHM, B.H.A.; ANTONIO, R.V.; SPIEKERMANN, P.; AMARA, A.A.; STEINBÜCHEL, A. (2002) 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. *Biochim. Biophys. Acta*, 1594, 178-190.

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



ROUSSEL, A.; CANAAN, S.; EGLOFF, M.P.; RIVIERE, M.; DUPUIS, L.; VERGER, R.; CAMBILLAU, C. (1999) Crystal Structure of Human Gastric Lipase and Model of Lysosomal Acid Lipase, Two Lipolytic Enzymes of Medical Interest. *J.Biol.Chem.* 274, 16995-17002.

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

ŠALI, A.; KURIYAN, J. (1999) Challenges at the frontiers of structural biology. *TCB*, 9, 20-24.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

SÁNCHEZ, R.; PIEPER, U.; MELO, F.; ESTAR, N.; MARTÍ-RENOM, M.A.; MADHUSUDHAN, M.; MIRKOVIC, N.; ŠALI, A. (2000) Protein structure modeling for structural genomics. *Nature Struct. Biol. Supplement*, 986.

SÁNCHEZ, R.; ŠALI, A. (1999) Comparative protein structure modeling in genomics. *J. Comp. Physics*, 151, 388-401.

SCHUBERT, P.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. (1991) Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutiric acid)-PHB-, biosynthetic operon: the N-terminus of PHB synthase and identification of the promoter. *J.Bacteriol.*, 173, 168-175.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHELEGEL, H.Y. (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 5837-5847.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. (1971) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 125, 55-66.

SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.*, 170, 4431-4436.

SMITH, T.F.; WATERMAN, M.S. (1981) Overlapping genes and information theory. *J. Theor. Biol.*, 91, 379-380.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHUEER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. (1999) 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.*, 171, 73-80.

STEINBÜCHEL, A.; DEBZI, E.M.; MARCHESSAULT, R.H.; TIMM, A. (1993) Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 443-449.

STEINBÜCHEL, A.; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. (1992) Molecular-basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 103, 217-230.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* 16, 419-427.

STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. (1992): Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the gram positive bacterium *Rhodococcus ruber*. *FEMS Microbiol. Lett.* 96, 73-80.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. (1991) Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acids) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molec Microbiol.* 5(3), 535-542.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 219-228.

STOESSER, G.; BAKER, W.; BROEK, A.V.D.; CAMON, E.; GARCIA-PASTOR, M.; KANZ, C.; KULIKOVA, T.; LOMBARD, V.; LOPEZ, R.; PARKINSON, H.; REDASCHI, N.; STERK, P.; STOEHR, P.; TULI, M.A. (2001) The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.*, 29, 17-21.

STRYER, L. *Biochemistry*. (1996), 2nd. ed. New York: W. H. Freeman.

SUDESH, K.; ABE, H.; Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polymer. Sci.*, 25, 1503-1555.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) genes locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.*, 209, 15-30.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

VASCONCELOS *et al.*, Brazilian National Genome Project Consortium (2003) The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11660-11665.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; JAIN, S.; BHAT, T.N.; THANKI, N.; RAVICHANDRAN, V.; GITTITAND, G.L.; BLUHM, W.; WISSIG, H.; GREER, D.S.; BOURNE, P.S.; BERMAN, H.M. (2002) The protein databank: unifying the archive. *Nucleic Acids Res.*, 30, 245-248.