UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

LARISSA MARTINS GONÇALVES

Produção e Caracterização de Proteínas Quiméricas
Contendo Fosfatases e Módulo de Ligação à Celulose.

Versão Corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

31/10/2011

LARISSA MARTINS GONÇALVES

Produção e Caracterização de Proteínas Quiméricas
contendo Fosfatases e Módulo de Ligação à
Celulose.

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para
obtenção do *Título de Doutor em:*

Ciências (Bioquímica)

Orientador (a): Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia

Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

São Paulo

2011

Dedico essa tese:

Ao meu amado *Keníchi* pelo companheirismo e apoio diário, e ao nosso filho

Bruno Takezo.

Dedico aos meus pais, *Márcia* e *Antônio*, que me ofereceram todas as possibilidades para chegar onde estou.

Agradecimentos

Não tenho como não começar agradecendo aos meus professores, Profa. Iolanda e Prof. Hernan Chaimovich, meus pais científicos, pessoas maravilhosas que me acolheram no laboratório desde “criancinha”, pesquisadores extraordinários que até hoje me orientam cientificamente. Ao Prof. Sandro Marana, igualmente competente, que se tornou meu orientador permitindo a realização de grande parte desse trabalho. É muito bom ter pessoas competentes como exemplo.

Agradeço aos meus pais Márcia e Antônio, aos meus irmãos Aléssio, Aline e Élcio e ao Kenichi pela paciência, compreensão, amor e carinho durante esse período.

Agradeço ao pessoal que passou pelo B10 nesse período: José, Maira, Valquiria, Nádia, Gabi, Daniela, Cecília, Roberto, Fabio, Caio, Márcia, Flávio, Paula, Ana Maria, Bianca, Debora, Catarina, Kátia, Filipe, Pedro, Gustavo, Carlinha, André, Tiago, Vanessa, Louise, Teresa. Aos alunos Fabiane Chaves Cançado e Lúcio Mario de Mendonça pela paciência e tempo dispendidos em me ensinar as técnicas de Biologia Molecular. E a todos os colegas que me auxiliaram durante esse período. Ao pessoal do Bloco 12, Laboratórios dos Professores Terra e Clélia, Sueli e Aline, e do Bloco 0, Laboratórios dos Professores Chuck e Freddy. Agradeço a Profa. Cida, pela ajuda com o inglês. Ao Prof. Manuel e a Sirlei.

Agradeço aos Professores Walter Colli, Ivan Schumacher, Bayardo e Pedro Soares Araújo, pelos momentos de monitoria que me proporcionaram um enorme conhecimento, além da ótima companhia. Aos funcionários do Instituto de Química.

Agradeço ao CNPq pela Bolsa de Estudo e Reserva Técnica que me proporcionaram segurança durante esses quatro anos de doutorado, a CAPES e a FAPESP que aprovaram projetos promovendo melhores condições de trabalho no laboratório.

“Realizing that we can do nothing totally alone, we turn towards ‘God’ for refuge and when we feel this deeply and knowing that whatever we try to do, is just like a drop of rain on a thirsty world, a sense of peace and true happiness comes to our hearts”

Anônimo, Templo em Kyoto, Japão.

RESUMO

Gonçalves, L.M. **Produção e Caracterização de Proteínas Quiméricas contendo Fosfatases e Módulo de Ligação à Celulose**. 2011. 128p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introdução e Objetivos. Fosfatases são enzimas promissoras para aplicação na degradação de organofosforados. Por exemplo, a enzima paraoxonase 1 (PON1), associada à lipoproteína de alta densidade (HDL), hidrolisa lactonas, ésteres aromáticos e compostos organofosforados (OP) neurotóxicos. "Módulos de ligação a carboidrato" (CBM) têm diversas aplicações biotecnológicas. Nosso objetivo é a obtenção de proteínas quiméricas contendo fosfatases ligadas a um módulo de ligação de celulose, o que possibilitaria a imobilização dessas enzimas em suportes de celulose. **Resultados.** Como prova de conceito, uma proteína quimérica contendo uma "fosfatase ácida" (appA) de *E.coli* e CBM família 2 (CBM2) de uma celulase de *Xanthomonas axonopodis pv citri* foi montada e produzida em *E. coli* como uma proteína recombinante solúvel. appA-CBM2 purificada demonstrou ser totalmente funcional exibindo atividade de ligação à celulose microcristalina (Avicel PH101) e atividade de fosfatase sobre *p*-nitrofenil fosfato. A ligação à Avicel evidenciou um comportamento de saturação descrito por uma "constante de ligação" (K_b) de 26 mg e um "máximo de ligação" (B_{max}) de 4,45 U/ μ g. Além disso, a ligação de appA-CBM2 em Avicel foi maior em pH 2,5 e diminuiu acima de pH 6,5, como observado anteriormente para CBM2. Finalmente, o efeito de concentração de *p*-nitrofenil fosfato na atividade catalítica de appA-CBM2 e appA foi idêntico, exibindo um K_m de 2,8 mM. Portanto, esses dados mostram que o conceito de uma proteína que combina as propriedades da fosfatase e do domínio de ligação à celulose é possível e funcional. De forma similar, os segmentos de DNA que codificam para o CBM2 e

para a PON1 de *Homo sapiens*, foram fusionados resultando em um segmento que codifica para uma proteína quimérica (PON1-CBM2). PON1 nativa e PON1-CBM2 foram produzidas na forma solúvel e ativa em *E.coli* cepa Arctic. Embora não tenha sido viável sua purificação, estas enzimas foram caracterizadas. PON1-CBM2 liga-se em Avicel PH101 com um comportamento de saturação, descrito por uma constante de ligação (K_b) de 27 mg, valor idêntico àquele observado para appA-CBM2, o que sugere que o domínio CBM2 é igualmente funcional nestas duas enzimas quiméricas. PON1-CBM2 também exibe atividade paraoxonásica com K_m similar àquele observado para PON1 nativa (1,3 mM), sugerindo que o “domínio” PON1 encontra-se totalmente funcional na enzima quimérica. **Conclusão.** Uma estratégia para a construção e expressão heteróloga em *E. coli* de PON1 e das enzimas quiméricas appA-CBM2 e PON1-CBM2 foi desenvolvida. As enzimas quiméricas mostraram-se totalmente funcionais e conservaram as propriedades de seus “domínios” constituintes.

Palavras-chave: Quimeras, paraoxonase, fosfatase ácida, domínio de ligação à celulose.

ABSTRACT

Gonçalves, L.M. **Production and characterization of a chimeric protein containing phosphatase and cellulose binding module.** 2011. 128p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introduction and Aims. Phosphatases are promising enzymes for application in the degradation of organophosphates, whereas carbohydrate binding module has significant and demonstrated biotechnological applications. The high-density lipoprotein-associated enzyme paraoxonase 1 (PON1) hydrolyzes lactones, aromatic esters, and neurotoxic organophosphorus (OP) compounds. Our aim is to obtain chimeric proteins containing a phosphatase domain linked to a carbohydrate binding module (CBM), which could be immobilized on a cellulose supports. **Results.** As a proof of concept, a chimeric protein combining an acid phosphatase (appA) from *E.coli* and a CBM family 2 (CBM2) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* was assembled and produced in *E.coli* as a recombinant soluble protein. Purified appA-CBM2 was fully functional, was bound to microcrystalline cellulose and exhibited phosphatase activity upon *p*-nitrophenyl phosphate. The binding to microcrystalline cellulose Avicel PH101 exhibited saturation with a binding constant (K_b) of 26 and a maximum binding (B_{max}) of 4,45 U/ μ g. In addition, the binding was higher at pH 2.5 and decreased above pH 6.5, as previously observed for CBM2. Finally, effect of *p*-nitrophenyl phosphate concentration on appA-CBM2 and native appA activities were identical, exhibiting a K_m of 2.8 mM. Taken together, these data show that the conceptual design of a protein combining the properties and biotechnological advantages of phosphatases and cellulose binding domains is possible and functional. Similarly, DNA segments coding for CBM2 and for PON1 from *Homo sapiens* combined resulting in a

segment coding for a chimeric protein (PON1-CBM2). Native PON1 and PON1-CBM2 were produced as recombinant protein in *E. coli* Arctic. Although purification was not accomplished, these enzymes were characterized. PON1-CBM2 binds to microcrystalline cellulose, exhibiting a saturation behavior described by a K_b of 27 mg. PON1 and PON1-CBM2 have the same K_m for paraoxon (1.3 mM), indicating that the phosphatase domain was fully functional. **Conclusion.** An effective strategy for heterologous expression of the native PON1 and chimeric appA-CBM2 and PON1-CBM2 in *E. coli* was attained. The chimeric enzymes were fully functional and maintained the properties of their original domains.

Keywords: chimera, paraoxonase, acid phosphatase, cellulose binding module.

Abreviaturas

Ache – Acetilcolinesterase;

appA – fosfatase ácida de *E coli*;

CBM – módulo de ligação a carboidrato;

CBM2 – módulo de ligação a carboidrato da família 2;

DTT – ditioneitol;

HDL – high density lipoprotein;

Ni-NTA – resina de agarose carregada com níquel;

OP – organofosforados;

Paraoxon – *p*-nitrofenil dietil fosfato;

PNPDPP – *p*-nitrofenil difenil fosfato;

pNPP – *p*-nitro fenil fosfato;

PON1 – paraoxonase 1;

VX - etil S-2-diisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato;

WHO – World Health Organization;

Xac - *Xanthomonas axonopodis pv. citri*;

Índice

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. ORGANOFOFORADOS E FOSFATASES	21
1.2. MÓDULO DE LIGAÇÃO À CARBOIDRATO (CBM).....	33
1.3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1. CEPAS	38
2.2. PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	39
2.3. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	41
2.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	42
2.5. PLASMÍDEOS.....	43
2.6. QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	45
2.7. INICIADORES.....	46
2.8. AMPLIFICAÇÃO POR PCR	46
2.9. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2 %	48
2.10. PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR	49
2.11. LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO	49
2.12. MINI PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	50
2.13. ESTRATÉGIA PARA TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS	50
2.14. SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO DE DNA	51
2.15. TRANSFORMAÇÃO DE <i>PICHIA PASTORIS</i> POR ELETROPORAÇÃO	52
2.16. PRODUÇÃO DE PON1 E PON1-CBM2 EM <i>PICHIA PASTORIS</i>	52
2.17. MINI INDUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i> ARCTIC EXPRESS	53
2.18. PRODUÇÃO DE APPA E APPA-CBM2 EM <i>E. COLI</i>	54
2.19. PRODUÇÃO DE PON1 E PON1-CBM2 EM <i>E. COLI</i>	55
2.20. LISE CELULAR.....	57
2.21. ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE)	57
2.22. TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	58
2.23. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	58
2.24. DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DO ÁCIDO BICINCHONÍNICO (BCA) MODIFICADO	59
2.25. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	59
2.26. ENSAIO DE LIGAÇÃO A CELULOSE	61
2.27. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOTTING	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1. CLONAGEM DO CBM2 DE XAC	64
3.2. CLONAGEM DA FOSFATASE ÁCIDA (APPA) DE <i>E. COLI</i>	65
3.3. CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA: PRÉ-FUSÃO.....	68
3.4. CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA: FUSÃO.....	70
3.5. RECONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA: PRÉ-FUSÃO	78
3.6. RECONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA: FUSÃO	79
3.7. EXPRESSÃO DE APPA E APPA-CBM2 EM <i>E. COLI</i> BL21-DE3	83
3.8. ATIVIDADE APPA	87
3.9. ENSAIO DE LIGAÇÃO EM DIFERENTES TIPOS DE CELULOSE	88
3.10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE APPA E APPA-CBM2 EM <i>E. COLI</i> BL21(DE3) UTILIZANDO O VETOR PAE	88
3.11. CARACTERIZAÇÃO DE APPA E APPA-CBM2 PURIFICADA	92
3.12. EXPRESSÃO DE PON1 EM <i>PICHIA PASTORIS</i>	95
3.13. EXPRESSÃO DE PON1 NATIVA E PON1-CBM2 EM <i>E. COLI</i> UTILIZANDO O VETOR PAE	98
3.14. CARACTERIZAÇÃO DE PON1-CBM2	109
3.15. PRODUÇÃO DE PON1-CBM2 SOLÚVEL EM BACTÉRIAS RG.....	112
4. CONCLUSÃO	115
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
6. ANEXOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

Índice de Esquemas

Esquema 1 – Fórmula Geral dos ésteres organofosforados.....	21
Esquema 2 – Compostos OPs tóxicos. (A) agentes neurotóxicos do tipo G; (B) agentes neurotóxicos do tipo V; (C) pesticidas e inseticidas.....	22
Esquema 3 – (A) Sítio ativo da enzima acetilcolinesterase; (B) Sítio ativo da AChE inibido por organofosforado (OP) por ligação covalente na Serina 203; (C) Esquema de ligação de OP na serina ativa da enzima AChE.	23
Esquema 4 – Estruturas de agentes químicos de guerra e seus análogos mais comumente utilizados. Em vermelho estão indicadas as ligações hidrolisadas enzimaticamente (McDaniel et al. 2005).	25
Esquema 5 - Estrutura geral da PON1. (A) Vista superior mostrando uma estrutura em β -propeller com 6 pás. São mostradas as extremidades C- e N-, cada uma das seis pás (numeradas de 1 a 6) - formadas por 4 fitas β (marcadas A-D) - e dois átomos de cálcio no túnel central do β -propeller (esferas vermelha e verde). (B) Vista lateral do β -propeller e das 3 α -hélices (H1-H3) no topo da PON1. O íon cálcio de cima (esfera verde) é uma parte importante do sítio ativo da PON1 e as três α -hélices formam uma tampa do sítio ativo (Harel et al. 2004).....	28
Esquema 6 - Modelo proposto para a ancoragem de PON1 na superfície do HDL. Resíduos hidrofóbicos envolvidos na ancoragem ao HDL (cadeias laterais amarelas). O sítio ativo e os resíduos que determinam a seletividade estão em azul e os sítios de glicosilação em vermelho. (Harel et al. 2004)	29
Esquema 7 - Sítio catalítico de PON1, vista superior do β -propeller. (A) Túnel central do propeller com dois átomos de cálcio e a cadeia lateral de alguns resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade esterase e lactonase (laranja) ou fosfotriesterase (amarelo), incluindo a região de polimorfismo Q/R 192 (nesta variante recombinante de PON1 é uma lisina, Lys192). Uma díade catalítica His-His (vermelho) (B) Visão da superfície do sítio ativo. Na parte mais profunda da cavidade se encontra o átomo de cálcio superior (em verde, Ca1) no qual se liga um íon fosfato. (Harel et al. 2004; Harel et al. 2007)	30
Esquema 8 - Resíduos que alteram a seletividade da PON1 humana a substratos promíscuos em azul.	32
Esquema 9 - Estrutura PDB da appA de <i>E. coli</i> (1DKL). A estrutura depositada é um dímero de appA por um efeito de cristalização, a appA estudada é monomérica.....	33
Esquema 10 - Estrutura do CBM da família 2a, CfCBM2, de <i>Cellulomonas fimi</i> (código PDB 1EXG), detalhe para os três triptofanos em azul.....	35
Esquema 11 - Diagrama mostrando a imobilização em celulose de domínio catalítico fusionado a um CBM. Ilustração adaptada de (Carrard et al. 2000).....	36
Esquema 12 – (A) Visão geral do vetor pGEM-T Easy Promega; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (“cloned insert”).	43
Esquema 13 – (A) Visão geral do vetor pCMV6-XL5 Origene Technologies; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (“TrueClone_Insert”).	44
Esquema 14 – (A) Visão geral do vetor pPIC9; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (integração do plasmídeo ao genoma).	44
Esquema 15 - Visão geral do vetor pT7-7;.....	44
Esquema 16 – (A) Visão geral do vetor pAE; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (integração do plasmídeo ao genoma) contendo uma região que codifica 6 histidinas (H), sítio de restrição para <i>XhoI</i> e para <i>EcoRI</i>	45
Esquema 17 – Ensaio de ligação das fosfatases fusionadas a CBM2 em Avicel.	62
Esquema 18 – Estratégia utilizada para a construção de um segmento de DNA que codifique a fusão entre duas diferentes proteínas (produto de fusão).	69

Índice de Figuras

Figura 1. Curva padrão de <i>p</i> -nitrofenolato.....	60
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR da região codificadora do CBM2 (316 pb). Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1 e 2. Produtos de PCR, DNA genômico purificação 1: 10 ng, 25 ng, respectivamente; Raia 3 e 4. Produtos de PCR, DNA genômico purificação 2: 10 ng, 25 ng, respectivamente.	64
Figura 3. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de uma Celulase de <i>Xac</i> disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do CBM2 com o iniciador T7.....	65
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR (Protocolo A) do segmento de DNA que codifica appA. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR contendo várias bandas amplificadas.	66
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR (Protocolo A modificado) do segmento de DNA que codifica appA. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR; uma banda amplificada com cerca de 1.600 pb.....	66
Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo produto amplificado em reação de PCR (Figura 5) com sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento com o iniciador T7.	67
Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo produto amplificado em reação de PCR (Figura 5) com sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento com o iniciador 5appA.....	67
Figura 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado em reação de PCR (Figura 5) com sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento com o iniciador SP6.	67
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de pré-fusão. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto PCR de pré-fusão codificando appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR de pré-fusão codificando CBM2 (~300 pb); Raia 3. Produto de PCR de pré-fusão codificando PON1 (~1.500 pb).	70
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na reação de fusão entre sequências codificadoras de appA ou PON1 com CBM. Protocolo B modificado para temperatura de pareamento 50°C e para 25 ciclos na Janela 2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Controle de tamanho do fragmento de appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR de fusão da appA com o CBM2 (~1.900 pb); Raia 3. Controle de tamanho do fragmento da PON1 (~1.500 pb); Raia 4. Produto de PCR de fusão da PON1 com o CBM2 (~1.800 pb).	71
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de fusão entre sequências codificadoras de appA ou PON1 com CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Controle de tamanho do fragmento de DNA da appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR realizado com o produto de fusão da appA com o CBM2, 35 ciclos (~1.900 pb); Raia 3. Produto de PCR da fusão da appA com o CBM2, realizado anteriormente com 25 ciclos (~1.900 pb); Raia 4. Controle de tamanho do fragmento de DNA da PON1 (~1.500 pb); Raia 5. Produto de PCR realizado com o produto de fusão da PON1 com o CBM2, 35 ciclos; Raia 5. Produto de PCR de fusão da PON1 com o CBM2, realizado anteriormente com 25 ciclos (~1.800 pb).	71
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose de reações de PCR com os DNAs plasmidiais contendo como inserto sequências codificantes dos produtos de fusão appA-CBM2 e PON1-CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR da mini preparação 1 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da appA com o CBM; Raia 2. Produto de PCR da mini preparação 2 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da appA com o CBM2 (~1.900 pb); Raia 3. Produto de PCR da mini preparação 1 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da PON1 com o CBM2 (~1.800 pb); Raia 4. Produto de PCR da mini preparação 2 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da PON1 com o CBM2 (~1.800 pb).	72

Figura 13. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2 com o iniciador T7.	73
Figura 14. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com uma celulase de <i>Xac</i> disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2 com o iniciador SP6.	73
Figura 15. Sequência de nucleotídeos e tradução do segmento de DNA que codifica a fusão appA-CBM2. A marca amarela ilustra o início da sequência do CBM2; a marca verde indica o fim da sequência que codifica appA. No produto de fusão appA-CBM2 estão em fases de leitura diferentes, acima está mostrada apenas a fase de leitura do CBM. Ferramenta de tradução do ExPASy (Consortium; Jain et al. 2009).	74
Figura 16. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador T7.	75
Figura 17. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da appA disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador SP6.	75
Figura 18. Sequência de nucleotídeos e tradução do segmento de DNA que codifica a fusão appA-CBM2. A marca amarela ilustra o início da sequência do CBM2 e a marca verde indica o fim da sequência que codifica appA. Foram detectadas várias mutações (marcadas em vermelho): 3 mutações na região da appA e 2 na região repetitiva TP que corresponde à região intermediária do produto de fusão. Ferramenta de tradução do ExPASy (Consortium; Jain et al. 2009).	75
Figura 19. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador T7.	76
Figura 20. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador SP6.	76
Figura 21. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador T7.	77
Figura 22. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador SP6.	77
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de pré-fusão. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto PCR de pré-fusão da appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR de pré-fusão da PON1 (~1.500 pb); Raia 3. Produto de PCR de pré-fusão do CBM2 (~300 pb).	78
Figura 24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de fusão dos segmentos que codificam appA ou PON1 com CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR da fusão appA-CBM2 diluído 5x (não observado); Raia 2. Produto de PCR da fusão da PON1-CBM2 diluído 5x (~1.800 pb); Raia 3. Produto de PCR de fusão da appA-CBM2 concentrado 2x (~1.900 pb); Raia 4. Produto de PCR de fusão da PON1-CBM2 concentrado 2x (~1.800 pb).	80
Figura 25. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador T7.	81
Figura 26. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 da appA disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador SP6.	81
Figura 27. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da appA disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão APPACBM2, mini preparação 1, com o iniciador 3CBM.	81

Figura 28. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador T7.	82
Figura 29. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com CBM2 da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador SP6.	82
Figura 30. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador 5PON1.....	82
Figura 31. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador 3CBM.	83
Figura 32. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR dos segmentos que codificam appA, appA-CBM2 e CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raias 1. Inserto appA presente no plasmídeo pT7-7 (~1.400 pb); Raias 2. Inserto appA-CBM2 presente no plasmídeo pT7-7(~1.700 pb); Raias 3. Inserto CBM2 presente no plasmídeo pT7-7(~300 pb).	84
Figura 33. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA com o iniciador 5PPA.	84
Figura 34. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA-CBM2 com o iniciador 3cbm.	84
Figura 35. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) realizada com amostras de cultura não induzida (N.I.) e induzida (I.) a expressar appA, appA-CBM2 e CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa Prestained SDS-PAGE Standard Low Range (BioRad); Raias 1 e 2. Fusão appA-CBM; Raias 3 e 4. Enzima appA nativa; e Raias 5 e 6. CBM.	85
Figura 36. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) realizada com amostras de cultura não induzida (N.I.) e induzida (I.) a expressar appA nativa e appA-CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa Prestained SDS-PAGE Standard Low Range (BioRad); Raias 2 a 4. Cultura expressando appA-CBM2 com até 24h indução; Raias 5. Porção solúvel do lisado.....	86
Figura 37. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) realizada com amostras de cultura não induzida (N.I.) e induzida (I.) a expressar appA nativa. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa Prestained SDS-PAGE Standard Low Range (BioRad); Raias 2 a 4. Cultura expressando appA nativa com até 24h indução; Raias 5. Porção solúvel do lisado.	86
Figura 38. Ensaio de atividade enzimática. 10 µL de lisado de células expressando appA (■); appA-CBM2 (●); CBM2 (Δ); transformadas com pT7-7 sem inserto (◇) e expressando beta-glicosidase (○).	87
Figura 39. Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos clonados no plasmídeo pAE. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia 1. Inserto da região codificadora de appA (~1.600 pb); Raia 2. Inserto da região codificadora de appA-CBM2 (~1.900 pb)....	89
Figura 40. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do inserto do vetor pAE codificando para appA com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA com o iniciador 3CBMMATXHOI.....	90
Figura 41. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do inserto do vetor pAE codificando para appA-CBM2 com a sequência de appA e CBM2disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA-CBM2 com o iniciador 3cbm.	90
Figura 42. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS. Padrão Sigma Marker High Range, Cultura não induzida (NI), cultura induzida 3 horas (IND 3h), lisado bacteriano (Lisado), appA purificada a partir do lisado em coluna de afinidade (appA) e appA-CBM2 purificada a partir do lisado em coluna de afinidade (appA-CBM2). .	91
Figura 43. Cromatografia de afinidade em coluna Ni-agarose do lisado de bactérias induzidas a expressarem appA. Atividade específica calculada para cada tubo eluído (1 mL) na purificação de appA a partir do lisado	

bacteriano. A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA e atividade enzimática com p-nitrofenil fosfato. A seta indica o final da lavagem e o início da eluição da amostra com Imidazol 0,200 M.	91
Figura 44. Cromatografia de afinidade em coluna Ni-agarose do lisado de bactérias induzidas a expressarem appA-CBM2. Atividade específica calculada para cada tubo eluído (1 mL) na purificação de appA-CBM2 a partir do lisado bacteriano. A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA e atividade enzimática com p-nitrofenil fosfato. A seta indica o final da lavagem e o início da eluição da amostra com Imidazol 0,200 M.	92
Figura 45 – Efeito de pNPP na atividade enzimática de (A) appA e (B) appA-CBM2.	92
Figura 46. Unidades de enzima ligadas em Avicel por quantidade de Avicel em mg. Unidades de appA-CBM2 ligada (-●-) por mg de Avicel, unidades de appA ligada (-o-) por mg de Avicel, a linha representa um ajuste de curva de saturação da ligação appA-CBM2 por mg de Avicel.	93
Figura 47. (A) Atividade relativa remanescente (%) de appA-CBM2 após incubação em diferentes pHs; (B) Atividade relativa ligada (%) em 50 mg de Avicel incubados em diferentes pHs. Foram usados: tampão Glicina/HCl 0,025 M pH 2,5, tampão Acetato 0,025 M pH 4,5, tampão MES 0,025 M pH 6,5, tampão Tris/HCl 0,025 M pH 8,5 e tampão Glicina/NaOH pH 10.	94
Figura 48. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR da região codificadora de PON1 (~1.500 pb). Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia +. Controle positivo PON1 clonado pGEM-T; Raias 1. Inseto PON1 presente no plasmídeo pPIC9.	96
Figura 49. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR da região codificadora de PON1 (~1.500 pb). Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia +. Controle positivo PON1 clonado pGEM-T; Raias 1, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 18 e 20. Inseto PON1 integrante ao DNA; Raias 2, 3, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 e 19. Ausência de inserto PON1 integrante ao DNA.	96
Figura 50. Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos clonados no plasmídeo pAE. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia 1. Inseto da região codificadora de PON1 (~1.500 pb); Raia 2. Inseto da região codificadora de PON1-CBM2 (~1.800 pb). .	98
Figura 51. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da PON1 com o iniciador 5PONPAEXHOI.	99
Figura 52. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de fusão PON1-CBM2 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da PON1-CBM2 com o iniciador 3cbm.	99
Figura 53 - Eletroforese em gel de policrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias da cepa RP transformadas com vetor para expressão de PON1. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I) e porção solúvel (PS). A seta indica PON1 recombinante.	100
Figura 54 - Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos clonados no plasmídeo pAE a partir diferentes colônias. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1 (~1.400 pb); Raia 1-3. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1 em colônias RG; Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1-CBM2 (~1.700 pb); Raia 4-6. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1-CBM2 em colônias RG.	101
Figura 55 – A. Eletroforese em gel de policrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias RG transformadas com vetor de expressão que codifica PON1. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel (PS) e porção insolúvel (PI). Pode-se visualizar a banda de PON induzida com cerca de 40 KDa na amostra induzida e na porção insolúvel (seta vermelha). B. Coloração com Ponceau S após transferência para membrana de nitrocelulose. C. Presença de proteína recombinante contendo marcador de 6xHis.	102
Figura 56 – Pesquisa por metodologias para renaturar PON1 a partir dos corpos de inclusão. Ferramenta “Refold” disponível no endereço: http://refold.med.monash.edu.au/ (Buckle et al. 2005; Chow et al. 2006a; Chow et al. 2006b).	102
Figura 57 – Alinhamento de sequência de aminoácidos das enzimas PON1 e PON3. Em destaque 3 resíduos de cisteína conservados (setas vermelhas). Ferramenta disponível no endereço: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ (Goujon et al.; Larkin et al. 2007)	103

Figura 58 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa RG. Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel (PS) e porção insolúvel (PI), três lavagens sucessivas com Tris/HCl 0,020 M, NaCl 0,010 M, CaCl ₂ 0,002 M, Triton 0,1 % e Ureia 2 M (U2), uma lavagem com Tris/HCl 0,02M, NaCl 0,010 M, CaCl ₂ 0,002 M, Triton 0,1 % (Tp) e a primeira extração com Tris/HCl 0,020 M, NaCl 0,010 M, CaCl ₂ 0,002 M, DTT 0,020 M e Triton 2 %. As raia que mostram a extração em 4 %, 6 %, 8 % e 10 % de Triton X-100 foram omitidas por não possuir bandas visíveis quando coradas com coomassie blue.	104
Figura 59 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa RG. Cultura induzida (I), proteínas que não se ligaram na resina de níquel (“flow through”; FT), início, meio e fim do gradiente de diluição de ureia (U4-U10) e eluição com imidazol 0,020 M (Im20), 0,080 M (Im80), 0,100 M (Im100) e 0,200 M (Im200).	105
Figura 60 - Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos codificando PON1 clonados no plasmídeo pAE. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1 (~1.400 pb); Raia 1-7. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1 em colônias de Arctic; Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1-CBM2 (~1.700 pb); Raia 8-12. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1-CBM2 em colônias de Arctic.....	106
Figura 61. Ensaio de Atividade paraoxonase de PON1 na porção solúvel do lisado de Arctic.	106
Figura 62 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias Arctic transformadas com vetor pAE codificando para PON1. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa Arctic. Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel (PS), porção insolúvel (PI) e eluição com imidazol 0,200 M (Im200).	107
Figura 63 – Atividade de Paraoxonase (U/μl) durante uma semana de incubação em geladeira em diferentes condições de tampão de lise: sem detergente (■), contendo Tergitol 0,1 % (◆), contendo Triton X-100 0,1 % (▲) e contendo Tween 20 0,1 % (●).	108
Figura 64 – Efeito de paraoxon na atividade enzimática de (A) PON1 e (B) PON1-CBM2.	109
Figura 65 – Unidades de enzima ligadas em Avicel por quantidade de Avicel em mg. Unidades de PON1-CBM2 ligado (■) por mg de Avicel e o controle, unidades de PON ligado (□) por mg de Avicel, a linha representa um ajuste de curva de saturação da ligação PON1-CBM2 por mg de Avicel;.....	110
Figura 66 – (A) Atividade relativa remanescente de PON1-CBM2 em após incubação em diferentes pHs; (B) Atividade Relativa ligada (%) em Avicel em 50 mg inicial de Avicel incubados em diferentes pHs. Foram usados: tampão Glicina/HCl 0,025 M pH 2,5, tampão Acetato 0,025 M pH 4,5, tampão MES 0,025 M pH 6,5, tampão Tris/HCl 0,025 M pH 8,5 e tampão Glicina/NaOH pH 10.	111
Figura 67 – Atividade da PON1-CBM2 na hidrólise de paraoxon. Porção solúvel do lisado de RG (■), PON1-CBM2 purificada de RG (□), porção solúvel do lisado de Arctic (▲) e PON1-CBM2 purificada de Arctic (Δ).....	113
Figura 68 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias Arctic transformadas com vetor pAE codificando para PON1-CBM2. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa RG e Arctic. RG: Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel do lisado (PS), eluição com imidazol 0,200 M (Im200) e 5 μL de resina (RES). Arctic: Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), eluição com imidazol 0,200 M (Im200) e 5 μL de resina (RES).	114

Índice de Tabelas

Tabela 1 – A Comissão Internacional de Enzimas formulou um sistema para classificação, baseada na reação catalisada. Todas as enzimas estão classificadas em uma das seis classes, as quais possuem subclasses e sub-subclasses.	24
Tabela 2 – Existem pelo menos quatro famílias de enzimas que hidrolisam OPs, cada uma possui uma preferência catalítica por um tipo de ligação fosfato. As enzimas Paraoxonase e OPH representam as especificidades mais amplas em relação às enzimas caracterizadas na literatura. (McDaniel et al. 2005)	26
Tabela 3 - Antibióticos requeridos para a manutenção das características de cada cepa de E coli.....	41
Tabela 4 – Iniciadores utilizados para clonagem, expressão e sequenciamento dos produtos gênicos.....	46
Tabela 5. Atividade de fosfatase (U) presente em diferentes frações do ensaio de ligação de appA e appA-CBM2 em celulose cristalina (Avicel PH101).	88

1. Introdução

1.1. Organofosforados e Fosfatases

A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que a incidência de envenenamentos por pesticidas, bastante alta em países em desenvolvimento, dobrou nos últimos dez anos, entretanto, não são conhecidos o número exato e a severidade de casos que ocorrem anualmente em todo o mundo. Segundo dados da WHO, em 1982, os países em desenvolvimento foram responsáveis por 15 % do consumo mundial de pesticidas e mais de 50% dos casos de envenenamentos que ocorreram nesses países poderiam ser evitados (WHO 2006).

Os derivados de organofosforados (OP) são largamente utilizados como inseticidas, pesticidas, gases de guerra e, na forma granulada, clandestinamente como raticidas (Oumar-Mahamat et al. 1999).

O desenvolvimento de agentes químicos de guerra, como os agentes G e V, está intimamente ligado à síntese de inseticidas, como Paraoxon e Paration (Yang et al. 1992).

A fórmula geral dos OP pode ser representada por:

Esquema 1 – Fórmula Geral dos ésteres organofosforados.

As estruturas de agentes químicos neurotóxicos tipicamente utilizados estão mostradas a seguir:

Esquema 2 – Compostos OPs tóxicos. (A) agentes neurotóxicos do tipo G; (B) agentes neurotóxicos do tipo V; (C) pesticidas e inseticidas.

Os OPs inibem a ação da enzima acetilcolinesterase, esquema 3A. Reagem com o centro esterásico da acetilcolinesterase (Ache), esquema 3B e 3C, impossibilitando-a de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina. O acúmulo de acetilcolina nas sinapses provoca uma hiperatividade nervosa e consequente colapso do sistema nervoso (Costa 2006; Lotti 2000).

O uso de inseticidas organofosforados na agricultura e em ambientes urbanos ainda é bastante alto e estima-se que continue, pelo menos, num futuro próximo. Desta forma, seus potenciais efeitos adversos em humanos irão continuar (Costa 2006).

Um grande número de compostos OPs neurotóxicos são potenciais candidatos a detoxificação, desde pesticidas, inseticidas até agentes químicos de guerra. Na detoxificação o agente é quimicamente transformado em compostos não tóxicos ou menos tóxicos. Muitas reações químicas podem ser empregadas para detoxificar agentes químicos de guerra, mas somente algumas na prática podem ser utilizadas em uma neutralização. Isso ocorre porque essas reações precisam ser simples e os reagentes empregados devem ser estáveis e baratos. Apesar das pesquisas nas últimas décadas, a oferta de novos mecanismos químicos de proteção ainda é uma promessa.

Nos últimos anos nosso grupo tem estudado a detoxificação de OPs em micelas e lipossomos. Foi realizada uma análise completa dos fatores que aceleram as reações de degradação de p-nitrofenil difenil fosfato (PNPDPP), um OP modelo, e p-nitrofenil dietil fosfato (Paraoxon), um inseticida, por oximas (nucleófilos funcionalizados) em modelos biomiméticos. Para encontrar o melhor sistema, diversas condições foram consideradas e analisadas, determinando, assim, os melhores fatores de aceleração da oximólise nesses agregados (Goncalves et al. 2009). Entretanto, as oximas, ao reagirem com os OPs, são consumidas na reação, levando a uma limitação na capacidade de detoxificação. Essa limitação pode ser evitada com a utilização de enzimas. A catálise enzimática poderá atingir fatores de aceleração ainda maiores.

Dos seis maiores grupos de enzimas (Tabela 1), aproximadamente 80 % das enzimas industriais são hidrolases. Hidrolases são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N e C-C.

Classe Enzimática	Ação
Oxirredutases	Catalisa reações de óxido-redução
Transferases	Catalisa transferência de grupos funcionais entre doadores e aceptores
Hidrolases	Catalisa a transferência de grupos funcionais para a água
Liasas	Catalisa a adição ou remoção de elementos de H ₂ O, CO ₂ ou NH ₄
Isomerases	Catalisa mudança na geometria ou configuração espacial de uma molécula
Ligases	Catalisa a junção de duas moléculas acompanhada pela hidrólise de uma ligação de alta energia

Tabela 1 – Classificação, segundo a Comissão Internacional de Enzimas, baseada na reação catalisada. Todas as enzimas estão classificadas em uma das seis classes, as quais possuem subclasses e sub-subclasses.

A hidrólise enzimática de OPs ocorre quando o composto é clivado na ligação do grupo fosforil (Esquema 4), resultando em bioprodutos previsíveis totalmente isentos de neurotoxicidade. Por comparação, a hidrólise química é muito menos específica que a enzimática e, no caso de agentes como VX, pode produzir produtos secundários extremamente tóxicos (McDaniel et al. 2005).

Esquema 4 – Estruturas de agentes químicos de guerra e seus análogos mais comumente utilizados. Em vermelho estão indicadas as ligações hidrolisadas enzimaticamente (McDaniel et al. 2005).

Muitos materiais contendo enzimas têm sido preparados para a detoxificação e a proteção contra OPs. As grandes velocidades de catálise e a biodegradabilidade tornaram a detoxificação enzimática uma importante área de pesquisa. O avanço da biotecnologia e da ciência de materiais oferece novas possibilidades de proteção e descontaminação pessoal como: lenços, cartuchos, roupas, tintas e coberturas auto descontaminantes (Russell et al. 2003). Porém, para o sucesso do desenvolvimento de uma nova geração de biocatalisadores com aplicação prática a enzima deve possuir duas características essenciais: baixa especificidade de substratos e estabilidade.

Algumas enzimas foram identificadas como capazes de detoxificar organofosforados, como mostrado na Tabela 2:

Classe Enzimática	Pesticidas Comuns		Sarin, Soman	VX, R-VX	Tabun
	P-C	P-O	P-F	P-S	P-CN
OPH ¹	-	+	+	+	+
OPAA ²	-	-	+	-	+
Paraoxonase ³	+	+	+	-	+
DFPase ⁴	-	-	+	-	-

¹ Organofosfato hidrolase
² Organofosfato anidrolase ácida
³ Enzima de mamíferos que hidrolisa Paraoxon
⁴ Diisopropilfluorofosfonase

Tabela 2 – Existem pelo menos quatro famílias de enzimas que hidrolisam OPs, cada uma possui uma preferência catalítica por um tipo de ligação fosfato. As enzimas Paraoxonase e OPH representam as especificidades mais amplas em relação às enzimas caracterizadas na literatura. (McDaniel et al. 2005)

Idealmente, seria necessário tratar pessoas expostas a agentes neurotóxicos com uma enzima capaz de degradar rapidamente esses compostos tóxicos. Várias hidrolases são candidatas para a degradação de OPs (Tabela 2). As hidrolases mais rápidas para a degradação de OPs são as enzimas bacterianas, a fosfotriesterase (PTE) de *Pseudomonas diminuta* e organofosfato anidrolase ácida de *Alteromonas*. Seus valores de k_{cat} para paraoxon e DFP (ver estrutura no esquema 4) são três ordens de magnitude maiores nessas enzimas em comparação com a paraoxonase. Porém, a enzima de bactéria poderia ser injetada somente uma vez em humanos, porque os anticorpos que se formarão numa primeira injeção neutralizariam injeções futuras. Um segundo perigo seria o desconhecimento de uma potencial toxicidade das enzimas bacterianas. Por outro lado, há argumentos a favor do uso de paraoxonase. Como ela está presente no sangue humano, uma injeção adicional não deve levar a efeitos adversos. Porém, a razão mais forte para se utilizar a paraoxonase é que essa enzima possui melhor eficiência catalítica para soman. Sendo assim, enzimas bacterianas têm pouca vantagem sobre a paraoxonase humana com respeito à hidrólise de agentes neurotóxicos em humanos (Broomfield 1991; Josse et al. 2001).

A família de enzimas Paraoxonase (PON) é encontrada em mamíferos e outros vertebrados e invertebrados. A família PON possui três membros em humanos, PON1, PON2 e PON3. PON1 tem a capacidade de hidrolisar ligações P-C, P-O, P-F e P-CN de compostos organofosforados (inseticidas, agentes químicos de guerra e seus análogos) e uma grande quantidade de substratos incluindo também: ésteres aromáticos, lactonas e ácidos hidroxicarboxílicos (Lenz et al. 2007). PON2 e PON3 praticamente não apresentam atividade hidrolítica sobre OPs (Draganov et al. 2005). Recentes pesquisas em busca da atividade nativa da PON1 indicaram que ela é de fato uma lactonase (Khersonsky and Tawfik 2005) capaz de catalisar eficientemente a hidrólise e a formação de lactonas de cinco a seis membros (Chambers 2008; Gaidukov et al. 2006; Gan et al. 1991; Mackness et al. 1998a). Portanto, ésteres e organofosforados são substratos “promíscuos” (Aharoni et al. 2005; Draganov et al. 2005). Dessa forma, o nome paraoxonase, é puramente histórico, PON1 tem baixa atividade paraoxonásica, enquanto PON2 e PON3 quase não exibem atividade sobre paraoxon (Draganov and La Du 2004; Harel et al. 2004).

A hidrólise de OPs por PON1 é um fator importante para determinar a toxicidade dos organofosforados para o homem (Costa and Furlong 2002; Valiyaveetil et al.). O mapeamento físico posicionou o gene para PON1 humana no meio do braço longo do cromossomo 7 (7q21-22) (Hillier et al. 2003; Humbert et al. 1993; Ota et al. 2004; Primo-Parmo et al. 1996; Scherer et al. 2003). O DNA da PON1 codifica uma proteína de 355 aminoácidos nos quais somente o resíduo metionina amino terminal é removido durante a secreção e maturação (Hassett et al. 1991). A retenção do peptídeo sinal é requerida para a associação de PON1 à partícula HDL (“high density lipoprotein”). PON1 permanece totalmente associado à HDL no plasma humano (Blatter et al. 1993; Sorenson et al. 1999). PON1 é sintetizada no fígado, do qual é liberada por um processo de “ancoragem”, onde as

partículas de HDL transientes associam-se à membrana celular removendo PON1 dessa membrana (Costa et al. 2003b; Deakin et al. 2002). Ela tem sido descrita na literatura por estar envolvida na prevenção de aterosclerose (Rodrigo et al. 2001; Sorenson et al. 1999). A localização da PON1 no HDL é criticamente importante para a sua atividade, pela estabilização da enzima e por fornecer ambiente ótimo para a interação com seus substratos fisiológicos (Blatter et al. 1993; Kelso et al. 1994).

A associação preferencial da PON1 ao HDL é mediada em parte pela manutenção do peptídeo sinal, pela ligação direta a fosfolípidios (Esquema 6) e também pela interação com apo A1. A retenção do peptídeo sinal pode permitir a transferência entre superfícies fosfolípídicas. Também está descrito na literatura que PON1 pode associar-se a agregados fosfolípídicos e a micelas de detergentes *in vitro* (Josse et al. 2002; Nguyen and Sok 2006).

Esquema 5 - Estrutura geral da PON1. (A) Vista superior mostrando uma estrutura em β -propeller com 6 pás. São mostradas as extremidades C- e N-, cada uma das seis pás (numeradas de 1 a 6) - formadas por 4 fitas β (marcadas A-D) - e dois átomos de cálcio no túnel central do β -propeller (esferas vermelha e verde). (B) Vista lateral do β -propeller e das 3 α -hélices (H1-H3) no topo da PON1. O íon cálcio de cima (esfera verde) é uma parte importante do sítio ativo da PON1 e as três α -hélices formam uma tampa do sítio ativo (Harel et al. 2004).

O tamanho da PON1 é de aproximadamente 43 KDa, incluindo os 354 resíduos de aminoácidos e 2 sítios de glicosilação (Esquema 6), Asn 253 e Asn 324 (Bunkenborg et al. 2004; Chen et al. 2009), que auxiliam na estabilidade, porém, não interferem na atividade da enzima (Gan et al. 1991).

Esquema 6 - Modelo proposto para a ancoragem de PON1 na superfície do HDL. Resíduos hidrofóbicos envolvidos na ancoragem ao HDL (cadeias laterais amarelas). O sítio ativo e os resíduos que determinam a seletividade estão em azul e os sítios de glicosilação em vermelho. (Harel et al. 2004)

A PON1 humana tem três cisteínas, duas das quais formam uma ponte de dissulfeto Cys 41-Cys 352 e uma livre Cys 283. A cisteína livre pode ser substituída por alanina sem a perda de atividade da PON1, sugerindo que PON1 não é uma cisteína esterase. Também não é uma serina esterase, pois não é inibida por organofosforados e não possui a sequência consenso GESAG para sítio ativo de serina (Josse et al. 2001; Sorenson et al. 1995). PON1 humana foi identificada como sendo uma esterase cálcio dependente (Draganov and La Du 2004; Draganov et al. 2005; Josse et al. 2001; Josse et al. 1999).

Esquema 7 - Sítio catalítico de PON1, vista superior do β -propeller. (A) Túnel central do propeller com dois átomos de cálcio e a cadeia lateral de alguns resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade esterase e lactonase (laranja) ou fosfotriesterase (amarelo), incluindo a região de polimorfismo Q/R 192 (nesta variante recombinante de PON1 é uma lisina, Lys192). Uma díade catalítica His-His (vermelho) (B) Visão da superfície do sítio ativo. Na parte mais profunda da cavidade se encontra o átomo de cálcio superior (em verde, Ca1) no qual se liga um íon fosfato. (Harel et al. 2004; Harel et al. 2007)

Dois polimorfismos foram observados para a sequência que codifica PON1: uma substituição Gln (Q)/Arg (R) na posição 192 e uma substituição Leu (L)/Met (M) na posição 55 (Adkins et al. 1993; Costa et al. 2003a; Costa et al. 2003b; Hassett et al. 1991; Humbert et al. 1993). As regiões que codificam polimorfismos na PON1 possuem efeitos na eficiência catalítica plasmática sobre a hidrólise de substratos específicos e na quantidade de PON1 humana presente no sangue humano (La Du et al. 1993). O polimorfismo L/M na posição 55 não afeta a eficiência catalítica (Adkins et al. 1993; Davies et al. 1996; Humbert et al. 1993; Li et al. 2000), mas está associado à variabilidade dos níveis plasmáticos de PON1 (Blatter et al. 1993; Brophy et al. 2001a; Brophy et al. 2001b; Leviev et al. 2001; Mackness et al. 1998b). Por outro lado, o polimorfismo Q/R da posição 192 afeta significativamente a eficiência catalítica de PON1. Estudos sugerem que a isoenzima PON1_{R192} tem maior atividade para hidrolisar paraoxon, enquanto que a isoforma PON1_{Q192} hidrolisa mais rapidamente diazoxon, sarin e soman (Adkins et al. 1993; Davies et al. 1996; Humbert et al. 1993),

também está relacionada aos níveis plasmáticos de PON1 (Furlong et al. 1993; Furlong et al. 1991). O genótipo desse polimorfismo pode ser necessário para determinar os indivíduos com maior risco de envenenamento por OPs, uma vez que muitos trabalhadores rurais se expõem a esses produtos, resultando num grande número de mortes anuais (Costa et al. 2003c; Costa et al. 2005; Mackness et al. 1997; WHO 1990).

Experimentos de evolução direta demonstram que uma vez que a função bioquímica está presente, mesmo que em baixos níveis, ela pode ser melhorada através de uma sequência benéfica de mutações simples. A atividade “promiscua” preexistente é utilizada como ponto de partida para muitos experimentos de evolução direta (Aharoni et al. 2005; Bloom and Arnold 2009; Yoshikuni et al. 2006). As fosfotriesterases (PTE) e lactonases, como a PON1 humana (Draganov et al. 2005), são exemplos de enzimas que foram engenheiradas para aumentar a eficiência catalítica para OPs através da seleção de mutações que aumentam funções promiscuas preexistentes (Aharoni et al. 2005; Amitai et al. 2006; Bloom and Arnold 2009; Harel et al. 2004; Masson et al. 1998; Peterson et al. 2011; Yeung et al. 2004; Yoshikuni et al. 2006). Estudos de evolução da PON1 demonstraram que os resíduos que mostraram mudanças drásticas na atividade “promiscua” não fazem parte da estrutura nem da maquinaria catalítica do β -propeller. Mas, os resíduos que alteram a seletividade estão nos cotovelos superiores dessa estrutura e formam a entrada da cavidade de ligação ao substrato (Esquema 8) (Khersonsky et al. 2006).

Esquema 8 - Resíduos que alteram a seletividade da PON1 humana a substratos promíscuos em azul.

Na ausência do ambiente natural, ou mimetizado por detergentes, a PON1 humana é instável e tende a se agregar. A atividade e a estabilidade de PON1 são dramaticamente dependentes do componente ambiental (Golmanesh et al. 2008; Rochu et al. 2007a; Rochu et al. 2007b). Por isso, a expressão e purificação de PON1 humana natural em ambiente bacteriano não havia sido observada até 2008 (Stevens et al. 2008) e muitos estudos de evolução direta foram realizados para permitir a expressão e purificação de PON1 recombinante solúvel em sistemas bacterianos (Aharoni et al. 2004; Aharoni and Tawfik 2004; Harel et al. 2004).

O grande interesse despertado pela PON1 humana quanto a sua capacidade de degradar organofosforados tóxicos e as suas particularidades na interação com superfícies anfifílicas gerou a possibilidade de construir uma enzima bi-funcional, que pudesse manter a atividade catalítica, porém, que adicionasse uma porção não catalítica auxiliar para a sua estabilização ou imobilização.

Como a expressão de PON1 em sistemas bacterianos não é trivial, foi escolhida uma fosfatase de fácil obtenção e expressão, a fosfatase ácida (appA), para servir como modelo de estudo. A appA é uma enzima periplasmática monomérica (53 kDa) de *Escherichia coli* (*E. coli*) que possui um pH ótimo de 2,5 e é codificada pelo gene *appA*

(1.901pb) (Dassa et al. 1982). Está bem descrita na literatura por possuir uma estrutura relativamente simples e ausente de qualquer tipo de modificação pós-traducional da proteína madura. Também hidrolisa eficientemente o substrato sintético p-nitrofenil fosfato (PNPP), que é facilmente detectável, em meio alcalino (Ostanin et al. 1992).

Esquema 9 - Estrutura PDB da appA de *E. coli* (1DKL). A estrutura depositada é um dímero de appA por um efeito de cristalização, a appA estudada é monomérica.

1.2. Módulo de Ligação à Carboidrato (CBM)

Muitas enzimas envolvidas na degradação de biomassa, como as celulasas e hemicelulasas, necessitam se associar forte e especificamente a substratos insolúveis para aumentar a eficiência da sua degradação (Tomme et al. 1996). Essas enzimas apresentam módulos, ou domínios, de ligação a carboidratos, que mediam o efeito de aumento de proximidade da enzima ao substrato (Bolam et al. 1998). Sendo assim, a principal função do CBM é a imobilização da enzima na superfície polimérica aumentando, portanto, a concentração local do substrato e levando a uma catálise mais eficiente (Black et al. 1996; Bolam et al. 1998; Gill et al. 1999).

Módulo de Ligação à Carboidrato é definido como uma sequência contínua de resíduos de aminoácidos contidos em uma enzima com um discreto dobramento o qual

possui atividade de ligação a carboidrato. O requerimento de CBMs existirem como módulos em grandes enzimas coloca essa classe de proteínas, ligantes de carboidratos, separada de outras classes de proteínas, não catalíticas, ligadoras de açúcares como: as lectinas e as proteínas transportadoras de açúcares. Os CBMs foram anteriormente classificados como domínios ligantes de celulose (CBDs) baseando-se na descoberta de vários módulos que ligam celulose. Entretanto, módulos adicionais de enzimas com atividade em carboidratos estão continuamente sendo descobertos por ligarem outros carboidratos além da celulose e que, ainda assim, cumprem o critério de CBM, daí a necessidade de reclassificar esses polipeptídios utilizando uma terminologia mais inclusiva. O termo CBD tem sido usado para descrever a subclasse de CBMs que ligam especificamente celulose (Boraston et al. 2004; Gilkes et al. 1988; Tomme et al. 1988).

Quase todos os CBMs estudados contêm anéis aromáticos expostos na superfície, que tem sido descritos como os principais sítios de interação com polissacarídeos. Esses resíduos formam interações hidrofóbicas de empilhamento face-a-face nos quais interagem anéis de resíduos de triptofano ou de tirosina com a face não polar dos anéis de carboidratos (Boraston et al. 1999; Din et al. 1994; Nagy et al. 1998; Tormo et al. 1996).

Os CBMs são divididos em famílias com base na similaridade da sequência de aminoácidos (Henrissat 1999; Tomme et al. 1995). Atualmente estão definidas 64 famílias de CBMs (Cantarel et al. 2009) que possuem uma variação substancial na especificidade de ligação. São conhecidas as estruturas tridimensionais de apenas 22 famílias de CBMs, somente 15 em complexo com seus oligossacarídeos ligantes (Boraston et al. 2004).

Os CBMs da família 2 possuem entre 90 e 108 Da. CBM2 é a maior família de CBMs de procariotos com mais de 30 membros conhecidos e está subdividida em 2 subfamílias, 2a

e 2b (Linder et al. 1998). O CBM2a possui um cotovelo de 8 resíduos de aminoácidos que está ausente no CBM2b (Henrissat 1999; Tomme et al. 1995). Esse cotovelo tem um triptofano que é conservado nos membros da família 2a e foi demonstrado como sendo um dos anéis aromáticos que interagem com a celulose (Din et al. 1994; Nagy et al. 1998). A diferença entre os CBMs das famílias 2a e 2b, é que todas as proteínas da família 2a ligam celulose cristalina (Gilkes et al. 1992) mesmo quando são originários de xilanases e, por outro lado, todos os módulos da família 2b ligam xilanas (Black et al. 1995; Dupont et al. 1998). Na família 2a existem três resíduos de triptofano expostos formando uma superfície planar idealmente colocada para interagir com celulose cristalina (Xu et al. 1995).

Esquema 10 - Estrutura do CBM da família 2a, CfCBM2, de *Cellulomonas fimi* (código PDB 1EXG), detalhe para os três triptofanos em azul.

Um membro bem conhecido da família 2a é o CBM β -1,4-(exo)glucanase Cex de *Cellulomonas fimi* (*C. fimi*) que possui estrutura publicada (Xu et al. 1995). Na β -1,4-(exo)glucanase Cex de *C. fimi* o CBM encontra-se separado do domínio por uma região repetitiva rica em resíduos treonina-prolina, formando uma sequência PTPPTPTPTPTPTPTPTPT. Essa sequência funciona como um espaçador na porção N-terminal do CBM favorecendo seu dobramento como domínio independente (Creagh et al. 1996). A

família 2a está descrita na literatura por ligar celulose de forma irreversível (Bray et al. 1996; Carrard et al. 2000; Jervis et al. 1997; Ong et al. 1993).

Esquema 11 - Diagrama mostrando a imobilização em celulose de domínio catalítico fusionado a um CBM. Ilustração adaptada de (Carrard et al. 2000).

Devido a sua grande afinidade por celulose, CBMs têm sido utilizados como marcadores de afinidade de proteínas heterólogas fusionadas para purificação e imobilização em suportes de celulose (Ong et al. 1989). Além disso, construções quiméricas de enzimas com CBMs promovem a imobilização em matrizes de celulose, possuindo diversas aplicações biotecnológicas, inclusive biorremediação (Levy and Shoseyov 2002; Richins et al. 2000; Shoseyov et al. 2006; Wang et al. 2005; Wang et al. 2002).

1.3. *Objetivos e Justificativa*

O objetivo deste trabalho foi verificar se o conceito de uma enzima quimérica combinando domínios de “fosfatase” e “CBM” é funcional. Para isso, buscou-se a construção, produção e caracterização funcional de duas enzimas quiméricas: a primeira delas combinando a fosfatase ácida de *E. coli* (appA) com o CBM da família 2a (CBM2) de uma celulase de *Xanthomonas axonopodis pv citri* (Xac), que possui 98 % de semelhança com o CBM2 de *C. fimi*, e a segunda combinou a PON1 humana com o CBM2 de Xac.

Além do desafio de construir uma enzima funcional inédita na natureza, este trabalho justifica-se pela clara possibilidade de utilização das enzimas quiméricas na hidrólise de organofosforados.

2. *Materiais e Métodos*

2.1. *Cepas*

Colônias de *Escherichia coli* cepa BL21 (*E. coli* BL21) foram utilizadas para a extração do DNA genômico. Amostras de DNA genômica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) foram cedidas pelo Dr. Celso Benedetti (LNLS).

Escherichia coli cepa XL-1 *Blue* (XL-1 *Blue*) Stratagene (genótipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lac1^qΔM15 Tn10(Tet^r)*]) foi utilizada para a preparação das construções plasmidiais.

Para a expressão das construções plasmidiais foram utilizadas as seguintes bactérias:

Escherichia coli cepa BL21(DE3) Stratagene (genótipo: *E. coli* B *F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)*).

Escherichia coli cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (**RIL**) Stratagene (genótipo: *E. coli* B *F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]*); plasmídeo pACYC, cloranfenicol resistente, contendo cópias extras de genes de RNA transportador (RNAt) para reconhecimento de códons *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA) de produtos gênicos.

Escherichia coli cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RP (**RP**) Stratagene (genótipo: *E. coli* B *F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]*); plasmídeo pACYC, cloranfenicol resistente, contendo cópias extras de genes de RNAt para reconhecimento de códons *argU* (AGA, AGG), *proL* (CCC) de produtos gênicos.

Escherichia coli cepa Rosetta-gami (DE3) (**RG**) Novagen (genótipo: *E. coli* $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA}$ *PvuII* *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsL* (DE3) $F'[\text{lac}^+ \text{lacI}^q \text{pro} \text{gor522::Tn10} \text{trxB}]$ [Cam^R , Kan^R , Str^R , Tet^R]); plasmídeo pRARE, cloranfenicol resistente, contendo cópias extras de genes de RNAt para o reconhecimento de códons *argU* (AGA, AGG), *proL* (CCC), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA) 1GGA.

Escherichia coli cepa ArcticExpress™ (DE3) (**Arctic**) Stratagene (genótipo: *E. coli* B $F^- \text{ompT} \text{hsdS}(\text{r}_B^- \text{m}_B^-) \text{dcm}^+ \text{Tet}^r \text{gal} \lambda(\text{DE3}) \text{endA}$ Hte [*cpn10* *cpn60* *Gent*^r]); As chaperoninas *cpn10* e *cpn60* de *Oleispira antarctica* são constitutivamente expressas nessas cepas através do plasmídeo pACYC, ColE1 compatível e que contém gene de resistência à gentamicina.

2.2. Preparação dos Meios de Cultura

A Água utilizada foi purificada por combinação das tecnologias de osmose reversa e eletrodeionização contínua em um único sistema (Sistema de Purificação de Água Elix, Millipore). Em alguns casos essa água foi autoclavada para produzir água estéril.

“Luria Broth” (LB líquido): triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 % e NaCl 1 %, pH 7,5 (Sigma L-3522). Foram pesados 25 g de LB líquido e dissolvidos em água para o preparo de 1 litro de solução. A preparação foi esterilizada em autoclave e armazenada em geladeira.

“Luria Broth” Ágar (LB ágar): triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1 % e ágar 1,5 %, pH 7,5 (Sigma, L-3147). Foram pesados 40 g de meio LB ágar e dissolvidos em água para o preparo de 1 litro de solução. A preparação foi esterilizada em autoclave. O meio foi mantido a 48°C para evitar a solidificação, fracionado em alíquotas de 25 mL, adicionado antibiótico (carbenicilina 50 µg/mL) e transferido para placas de petri estéreis (100 mm de diâmetro). As placas foram protegidas com “Parafilm M” (American National Can™) e guardadas em geladeira.

“Yeast Extract Peptone Dextrose Medium” (YPD líquido): extrato de levedura 1 %, peptona 2 % e dextrose 2 % (Sigma, Y1375). Foram pesados 50 g de YPD líquido e dissolvidos em água para o preparo de 1 litro de solução. A preparação foi esterilizada em autoclave e armazenada em geladeira.

“Yeast Extract Peptone Dextrose Medium” Ágar (YPD ágar): extrato de levedura 1 %, peptona 2 % e dextrose 2 % (Sigma, Y1500). Foram pesados 25 g de YPD ágar e dissolvidos em água para o preparo de 1 litro de solução. A preparação foi esterilizada em autoclave. O meio foi mantido a 48⁰C para evitar a solidificação, fracionado em alíquotas de 25 mL e transferido para placas de petri estéreis (100 mm de diâmetro). As placas foram protegidas com “Parafilm M” (American National CanTM) e guardadas em geladeira.

“Minimal Dextrose Medium” Ágar (MD ágar): Yeast Nitrogen Base com sulfato de amônio sem aminoácidos (YNB) 1,34 % (Sigma, Difco 0335-15-9), Biotina 4.10⁻⁵ % (Sigma), dextrose 2 % e ágar 15g/L.

“Buffered Minimal Methanol” (BMM): fosfato de potássio 0,100 M, pH 6,0, YNB 1,34 %, Biotina 4.10⁻⁵ % e metanol 0,5 %.

Meio 2_xTY: triptona 16 g, extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g; adicionado de CaCl₂ 0,11 g e glicerol 2 %. Adicionou-se água ultrapura para 95 % do volume final e foi acertado pH 7,4 com NaOH 2M. Completou-se para de 1 litro de solução com água ultrapura. A preparação foi esterilizada em autoclave e armazenada em geladeira. No caso do meio conter glicose, uma solução fresca de glicose 20 % preparada no dia foi esterilizada por filtração e adicionada ao meio esterilizado para uma concentração final de 1 %.

Meio 2xTY Ágar: triptona 16 g, extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g e Ágar 7,5 g (Sigma). A preparação foi esterilizada em autoclave. O meio foi mantido a 48⁰C para evitar a

solidificação, fracionado em alíquotas de 25 mL, adicionado antibiótico (carbenicilina 50 µg/mL para manutenção vetor de expressão e antibióticos para manutenção da cepa – Tabela 3) e transferido para placas de petri estéreis (100 mm de diâmetro). As placas foram protegidas com “Parafilm M” (American National CanTM), embaladas em papel alumínio e guardadas em geladeira.

<i>Cepa</i>	<i>Antibiótico</i>
RP e RIL	Cloranfenicol 34 µg/mL
Rosetta-gami	Canamicina 15 µg/mL, tetraciclina 12,5 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL
ArcticExpress	Gentamicina 10 µg/mL

Tabela 3 - Antibióticos requeridos para a manutenção das características de cada cepa de E coli.

2.3. *Preparação de Células Competentes*

O protocolo a seguir foi utilizado para preparar lotes de células competentes (Sambrook et al. 1989):

Assepticamente foi inoculada uma colônia com um palito autoclavado em 5 mL de meio LB líquido sem antibiótico. Esta cultura foi mantida por 12-16 horas em agitação contínua a 37°C e 150 rpm. A cultura foi transferida para um frasco cônico de 1 litro autoclavado contendo 100 mL de meio LB líquido sem antibiótico para XL1-Blue, BL21 (DE3) e BL21DE3 Star; ou contendo antibióticos requeridos para a manutenção de cada cepa: 34 µg/mL de cloranfenicol são requeridos para a manutenção do plasmídeo pACYC para as cepas BL21-Codon Plus(DE3)-RP e –RIL e Canamicina 15 µg/mL, tetraciclina 12,5 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL requeridos para a manutenção da Rosetta-gami. As células foram incubadas sob agitação constante a 37°C e 150 rpm por cerca de 1 hora. O crescimento da cultura foi monitorado pela leitura da Absorbância a 600 nm a cada 20 ou 30 minutos, buscando-se atingir cerca de 10⁸ células viáveis por mL. Para BL-21 DE3 e XL-1 *Blue* esta condição foi atingida em Leitura de absorbância a 600 nm de 0,375. Após o crescimento as

células foram transferidas para 2 tubos de polipropileno de 50 mL autoclavados e previamente resfriados. A cultura também foi resfriada a 0°C incubando os tubos em gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas a 4°C e 3.000 rpm por 10 minutos. O meio foi descartado obtendo somente o “pellet” de células, que foi ressuspensão em 10 mL de **solução de CaCl₂ 0,1M** (CaCl₂ 0,060 M (99,5 % Merck); Glicerina 15 % (87 % Merck); Piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfônico] (Sigma, P-1851) PIPES 0,010 M pH 7,0) autoclavada e gelada. A etapa de centrifugação foi novamente realizada. Após o descarte da solução anterior o “pellet” foi ressuspensão em 2 mL de **solução de CaCl₂ 0,1M** autoclavada e gelada (para cada 50 mL de cultura original). Alíquotas de 100 µL de células competentes foram dispensadas em tubos de micro centrífuga estéreis e estocadas a -80°C.

2.4. *Extração de DNA genômico*

Para a extração do DNA genômico foram centrifugados 1,5 mL de cultura de células a temperatura ambiente e 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL de **Tampão de Lise** (Tris-Acetato 0,04 M, pH 7,8 (Sigma, T-1378); NaOAc 0,020 M; EDTA 0,001 M (Grau Biologia Molecular, Promega); SDS 1 % (v/v); água q.s.p 100 mL) e 132 µL de NaCl 2,5 M para a ressuspensão do pellet. A amostra foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo de micro centrífuga novo. Foram adicionados 250 µL de clorofórmio e o tubo foi invertido até a solução ficar leitosa. A amostra foi novamente centrifugada a temperatura ambiente e 10.000 g por 3 minutos. Após a centrifugação a fase orgânica separa-se da fase aquosa. Foi realizada a transferência da porção aquosa superior, a qual contém o DNA genômico, para um tubo de micro centrífuga novo. O DNA genômico foi precipitado utilizando duas vezes o volume de etanol absoluto. Foi centrifugado a 4°C e 10.000 g por 15

minutos. O DNA foi lavado com uma vez o volume de etanol 70 % e novamente centrifugado a 4°C a 10.000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” seco em liofilizador (Heto Lab Equipment - CT 110). O DNA genômico seco foi ressuspensionado em 50 µl de água e autoclavada.

2.5. Plasmídeos

O vetor pGEM-T *easy* (Promega) é um sistema apropriado para clonar produtos de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). O vetor é comercializado clivado pela enzima de restrição *EcoR* V e adicionado de uma timidina 3’ terminal em ambas as extremidades, favorecendo um contato compatível com produtos de PCR gerados por polimerases que adicionam uma adenosina simples às extremidades 3’ dos fragmentos amplificados.

Esquema 12 – (A) Visão geral do vetor pGEM-T *Easy* Promega; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (“cloned insert”).

O DNA codificante (DNAC) da Paraoxonase Humana 1 (PON1) foi adquirido da Origene Technologies. O gene é comercializado clonado no vetor pCMV6-XL5.

Esquema 13 – (A) Visão geral do vetor pCMV6-XL5 Origene Technologies; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (‘TrueClone_Insert’).

Pichia pastoris GS115 foi utilizada para a expressão de PON1 utilizando o plasmídeo pPIC9, o qual quando linearizado integra-se no genoma de *Pichia pastoris* (Figura 2) permitindo a indução da produção da proteína recombinante com metanol.

Esquema 14 – (A) Visão geral do vetor pPIC9; (B) Detalhe da região de clonagem do inserto (integração do plasmídeo ao genoma).

O vetor pT7-7 foi utilizado para expressão de proteínas em *E. coli* (Figura3).

Esquema 15 - Visão geral do vetor pT7-7;

2.7. Iniciadores

Oligonucleotídeos complementares às sequências de DNA de interesse foram desenhados para a amplificação por PCR. A confecção desses oligonucleotídeos foi realizada pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) através da Prodimol Biotecnologia S/A. Os iniciadores foram fornecidos liofilizados e purificados pelo método padrão da IDT. Todos os iniciadores foram ressuspensos em água autoclavada suficiente para a concentração final de 100 μ M. Quando foram utilizados para reações de sequenciamento, procedeu-se a diluição em água para a concentração final de 5 μ M.

<i>Nome</i>	<i>Sequência</i>
APPAF	5'- GTT GTA GTG TTC GCT CTC C -3'
APPAR	5'- ATT ACA AAC TGC ACG CCG G -3'
CBMXACF	5'- GGA ACG GTG AGC AAC AGC ACA C -3'
CBMXACR	5'- TCA ACC TGC TGC GCA GAA GCC GAA C -3'
5CBM	5'- ACA CCG ACG CCA ACG CCG ACC -3'
3CBM	5'- CCG GAA TTC TCA ACC TGC TGC GCA GAA GCC -3'
5APPA	5'- GGG AAT ACC ATA TGA AAG CGA TCT TAA TC -3'
APPACBMREV	5'- GGT CGG CGT TGG CGT CGG TGT CAA ACT GCA CGC CGG TAT GCG -3'
5PON1	5'- ATG GCG AAG CTG ATT GCG CTC -3'
PON1CBMREV	5'- GGT CGG CGT TGG CGT CGG TGT GAG CTC ACA GTA AAG AGC TTT G -3'
APPAEXP3C	5'- CCG GAA TTC ATT ACA AAC TGC ACG CCG G -3'
APPAEXP5C	5'- GGG AAT ACC ATA TGA CAC CGA CGC CAA CGC CGA CC -3'
CBMEXP3C	5'- ATT AAT TCG CGG CCG CTC AAC CTG CTG CGC AGA AGC C -3'
PONEXP5N	5'- TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATG GCG AAG CTG ATT GCG CTC -3'
PONEXP3C	5'- ATT AAT TCG CGG CCG CTT AGA GCT CAC AGT AAA GAG CTT TG -3'
CBMEXP5N	5'- GGG AAT ACC ATA TGA CAC CGA CGC CAA CGC CGA CC -3'
5APPAMATXHOI	5'- TCT <u>CTC GAG</u> CAG AGT GAG CCG GAG CTG AAG -3'
5PONPAEXHOI	5'- TCT <u>CTC GAG</u> ATG GCG AAG CTG ATT GCG CTC -3'
3PONPAEECORI	5'- CCG <u>GAA TTC</u> TTA GAG CTC ACA GTA AAG AGC -3'

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para clonagem, expressão e sequenciamento dos produtos gênicos.

2.8. Amplificação por PCR

Foram realizadas reações de PCR utilizando um termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). Em um microtubo de plástico de 200 μ L foi preparada a reação:

Protocolo A:

- 5,0 µL de tampão da Taq Polimerase 10x concentrado Fermentas;
- 4,0 µL de MgCl₂ 25 mM Fermentas;
- 1,0 µL da mistura de dNTP 10 mM;
- 1,5 µL do iniciador sense 100 µM;
- 1,5 µL do iniciador antisense 100 µM;
- 2,0 µL de DNA (10-100 ng/µL);
- 1,0 µL da enzima Taq polimerase Fermentas;
- 34 µL de H₂O (q. s. p. volume final 50 µL).

Programa do Termociclador:

<i>Etapa</i>	<i>Janela</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº de Ciclos</i>
Desnaturação	1	94 °C	2 minutos	1
Desnaturação		94 °C	1 minuto	
Pareamento dos Iniciadores	2	50 °C	1 minuto	35
Extensão		72 °C	1 minuto	
Extensão Final	3	72 °C	7 minutos	1

4 °C ∞

Protocolo B:

- 5,0 µL de tampão 10x Pfx Amplification Buffer;
- 1,0 µL de MgSO₄ 50 mM Invitrogen;
- 1,5 µL da mistura de dNTP 10 mM;
- 1,5 µL do iniciador sense 100 µM;
- 1,5 µL do iniciador antisense 100 µM;
- 2,0 µL de DNA (10-100 ng/µL);
- 1,0 µL da enzima Platinum Pfx DNA Polymerase Invitrogen;
- 36,5 µL de H₂O (q. s. p. volume final 50 µL).

Programa Termociclador:

<i>Etapas</i>	<i>Janela</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº de Ciclos</i>
Desnaturação	1	94 °C	2 minutos	1
Desnaturação		94 °C	1 minuto	
Pareamento dos Iniciadores	2	50 °C	1 minuto	10
Extensão		72 °C	2,5 minutos	
Extensão Final	3	72 °C	7 minutos	1

4 °C ∞

Protocolo C:

- 5,0 µL de tampão 10x PCR Buffer minus Mg Invitrogen;
- 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM Invitrogen;
- 1,0 µL da mistura de dNTP 10 mM;
- 1,5 µL do iniciador sense 100 µM;
- 1,5 µL do iniciador antisense 100 µM;
- 2,0 µL de DNA (10-100 ng/µL);
- 1,0 µL da enzima Platinum Taq DNA Polymerase Invitrogen;
- 34 µL de H₂O (q. s. p. volume final 50 µL).

Programa Termociclador:

<i>Etapas</i>	<i>Janela</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº de Ciclos</i>
Desnaturação	1	94 °C	2 minutos	1
Desnaturação		94 °C	1 minuto	
Pareamento dos Iniciadores	2	50 °C	1 minuto	35
Extensão		72 °C	1 minuto	
Extensão Final	3	72 °C	7 minutos	1
		4 °C ∞		

Foram realizadas reações de PCR utilizando um termociclador Robocycler Gradient

96 (Stratagene). Em um micro tubo de plástico de 200µL foi preparada a reação:

- 5,0 µL de tampão 10x PCR Buffer minus Mg Invitrogen;
- 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM Invitrogen;
- 1,0 µL da mistura de dNTP 10 mM;
- 1,5 µL do iniciador sense 100 µM;
- 1,5 µL do iniciador antisense 100 µM;
- 2,0 µL de DNA (10-100 ng/µL);
- 1,0 µL da enzima Platinum Taq DNA Polymerase Invitrogen;
- 34 µL de H₂O (q. s. p. volume final 50 µL).

Programa Termociclador:

<i>Etapas</i>	<i>Janela</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº de Ciclos</i>
Desnaturação	1	94 °C	2 minutos	1
Desnaturação		94 °C	1 minuto	
Pareamento dos Iniciadores	2	50 °C	1 minuto	35
Extensão		72 °C	1 minuto	
Extensão Final	3	72 °C	7 minutos	1
		4 °C ∞		

O resultado das reações de PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 2 %.

2.9. Eletroforese em gel de agarose 2 %

O gel de agarose (Grau Biologia Molecular, BioAgency) foi preparado na concentração de 2 % (p/v) em tampão **TAE 1x** (Tris-Acetato 0,04 M e EDTA 2 mM, pH 8,5) e montado sobre a cuba de eletroforese Horizon 58 (Whatman). Foi colocado o tampão de corrida **TAE 1x** até cobrir completamente o gel.

Para o padrão foi preparada uma mistura contendo 2,0 µL de tampão de amostra 6x, 5,0 µL de água deionizada e autoclavada e 5,0 µL de padrão de tamanho molecular “Gene Ruler 1Kb DNA Ladder” (0,5µg/µL) (Fermentas); a amostra foi preparada com 2,0 µL de tampão de amostra 6x e 10µL do produto de PCR; no caso de purificação de um fragmento utilizou-se 8,0 µL de **Tampão de Amostra 6x** (Fermentas) (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; azul de bromofenol 0,03 %; xileno cianol FF 0,03 %, glicerol 60 %; EDTA 0,060 M) adicionado a todo o conteúdo da reação, cerca de 40 µL. A eletroforese foi realizada com 80 V e 180 mA durante 1 hora em fonte para eletroforese (Amersham Pharmacia Biotec EPS301). Após o término da corrida o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 10 minutos. As bandas foram visualizadas em transiluminador a 312 nm (Stratagene 2020E). Os géis foram fotografados para análise e registro dos resultados.

2.10. *Purificação de Produto de PCR*

A banda de interesse foi extraída do gel de agarose e os fragmentos de DNA foram recuperados seguindo o protocolo de purificação do produto “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Corporation). Os fragmentos de DNA purificados foram estocados a -20°C.

2.11. *Ligação e Transformação*

O fragmento extraído foi ligado a um vetor segundo a reação de ligação: 1,0 µL de pGem-T *Easy*; 5,0 µL de tampão de ligação rápida 2x; 3,0 µL do fragmento de PCR purificado; 1,0 µL da enzima DNA T4 ligase (todos os componentes dessa reação foram fornecidos pela Promega Corporation). A reação foi incubada a 4°C durante a noite.

No dia seguinte toda a reação de ligação é transferida para um micro tubo contendo 100 μ L de células XL1-*Blue* competentes congeladas são transformadas por choque térmico como segue: a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, em seguida, foram submetidas a choque térmico por 90 segundos em banho a 42°C e imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos. Foi adicionado 0,5 mL de LB líquido sem antibiótico ao micro tubo contendo as células e incubado sob agitação constante a 37°C e 150 rpm por 1 hora. As células foram então semeadas em placas de LB-Ágar contendo antibiótico (carbenicilina 50 μ g/mL). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 12 horas. No dia seguinte, foi observado o crescimento de colônias transformadas.

2.12. *Minipreparação de plasmídeos*

Foi inoculada uma colônia transformada em 5 mL de LB líquido com antibiótico (carbenicilina 50 μ g/mL) e incubada sob agitação constante a 37°C e 150 rpm por 12-16 horas. Após o crescimento da colônia foi seguido o protocolo de purificação do produto “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega Corporation) para a extração do DNA plasmidial.

2.13. *Estratégia para transferência de plasmídeos*

Os insertos clonados no plasmídeo pGEM-T Easy foram transferidos para vetores de expressão segundo as etapas a seguir:

1. As amostras foram submetidas à amplificação por PCR utilizando iniciadores contendo sítios para digestão por enzimas de restrição;
2. Fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, foram extraídos e purificados;

3. Os fragmentos purificados e os plasmídeos são digeridos, separadamente, com enzimas de restrição a 37°C durante a noite:

<i>Digestão</i>	<i>Inserto</i>	<i>Vetor</i>
Produto PCR purificado (800-1000 ng)	15,0 µL	10,0 µL
Tampão Eco RI (pT7-7)/ 3 (pPIC9) 10x	2,0 µL	1,5 µL
NdeI (pT7-7)/ XhoI (pPIC9)	1,0 µL	1,0 µL
EcoRI (pT7-7)/NotI (pPIC9)	1,0 µL	1,0 µL
H₂O	1,0 µL	1,5 µL

4. Os fragmentos e plasmídeos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, foram extraídos e purificados;
5. Seguiu-se imediatamente reação de ligação, com T4 DNA ligase a 16°C durante a noite:

<i>Ligação</i>	<i>Inserto</i>
Vetor (pT7-7 ou pPIC9) (500-800 ng)	5,0 µL
Produto PCR purificado (200-500 ng)	10,0 µL
Tampão Ligase	2,0 µL
PEG 4.000 50%	2,0 µL
T4 DNA ligase	1,0 µL

6. Colônias XL1-Blue foram transformadas com toda a reação de ligação;
7. Foram realizadas mini preparações de plasmídeos que foram estocadas e utilizadas para transformar os organismos de expressão.

2.14. Sequenciamento Automatizado de DNA

O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM™ 3100 (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se 2mL da mistura da reação Big Dye terminator mix (Applied Biosystems), 100-200ng de DNA, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, Tris-HCl 0,200 M pH 9,0 e MgCl₂ 0,005 M em um volume final de 15mL. A reação foi incubada por 2 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio 1mg/mL,

lavadas com etanol 70%, suspensas em formamida, desnaturadas a 94°C por 5 minutos e aplicadas no sequenciador automatizado.

2.15. *Transformação de Pichia Pastorís por eletroporação*

Uma amostra de 100µL de *Pichia pastoris* GS115 foi cultivada em 500 mL de YPD a 28°C por cerca de 20 horas a 160 rpm até atingir uma $DO_{600nm} = 1,3-1,5$. As células foram coletadas por centrifugação (1.500 g, 5 min, 4°C) e ressuspensas em 500 mL de água autoclavada. Em seguida, as células foram novamente precipitadas e ressuspensas em 250 mL de água autoclavada gelada. Após mais uma etapa de centrifugação as células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1M estéril gelado. Finalmente, as células foram sedimentadas, e em seguida ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1M gelado e divididas em alíquotas de 80 µL. Cerca de 20 µg de plasmídeo foram previamente linearizados com Sal I (New England Biolabs, R0138S) e então adicionados a uma alíquota de *Pichia pastoris* preparada como descrito acima. A mistura homogeneizada foi transferida para uma cubeta de eletroporação estéril, e após 5 minutos no gelo foi submetida à eletroporação nas condições 1.500 V, 25 µF e 200 Ω. Em seguida foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado e alíquotas de 150 µL foram plaqueadas em MD ágar. As placas foram incubadas a 28°C por cerca de 60 horas. Em seguida, as colônias obtidas foram transferidas, isoladamente, para placas de YPD ágar quadriculadas, que foram incubadas por cerca de 18h a 28°C e estocadas em geladeira.

2.16. *Produção de PON1 e PON1-CBM2 em Pichia pastoris*

Com o objetivo de reconhecer as colônias que efetivamente produzem a enzima recombinante, 10 colônias isoladas de *P. pastoris* transformadas com pPIC9 codificando para a PON1 foram inoculadas em 10 mL de YPD e incubadas por 24h a 28°C e 150 rpm. Em

seguida, as células foram coletadas por centrifugação (2.500 g, 4°C, 5 min) e lavadas três vezes com água autoclavada através de ciclos de centrifugação e ressuspensão. Finalmente, as células foram transferidas para 10 mL de BMM e incubadas a 28°C e 150 rpm por 24h. A partir deste momento, alíquotas de 300 µL foram retiradas para detecção da atividade de paraoxonase e alíquotas de 100 µL de metanol foram acrescentadas ao meio de cultura.

2.17. *Minú Indução de proteínas recombinantes em E.coli Arctic Express*

Com um palito autoclavado uma colônia de *E. coli Arctic Express* transformada foi inoculada em 5 mL de meio 2_xTY ágar contendo 10 µg/mL de gentamicina, 0,001 M de CaCl₂, 1 % de glicose e 2 % de glicerol. Esse pré-inóculo foi crescido a 25°C durante 20 horas. No dia seguinte 2 mL da cultura foi transferida para um tubo de polipropileno de 50 mL autoclavado contendo 10 mL de 2_xTY, 50 µg/mL de carbenicilina, 10 µg/mL de gentamicina, 0,001 M de CaCl₂, 2 % de glicerol e 1 % de glicose. O crescimento das células foi acompanhado até atingir Abs_{600nm} = 0,45 – 0,85. Retirou-se, então, uma alíquota de 50 µL (não induzido) para SDS-PAGE. As células foram centrifugadas e ressuspensas no mesmo meio 2_xTY contendo 10 µg/mL de gentamicina, o cálcio e o glicerol, porém, na ausência da glicose. Foram, então, induzidas com IPTG 0,25 mM final e foram incubadas por 24 horas a 10°C, após este período foi retirada uma alíquota de 50 µL (induzido) para SDS-PAGE. Essa etapa foi decisiva para selecionar as colônias de Arctic com melhor desempenho para expressar a proteína recombinante. As células selecionadas foram mantidas congeladas a - 80°C em glicerol 50 %.

2.18. *Produção de AppA e AppA-CBM2 em E. coli*

pT7-7: Foram transformadas colônias de BL21-DE3 competentes com plasmídeos *pT7-7* codificando *appA*, *appA-CBM2* e *CBM2*. As colônias que cresceram em placas de LB ágar e foram estocadas em geladeira. Com um palito autoclavado uma colônia transformada foi inoculada em 2 mL de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de carbenicilina. O crescimento das células foi acompanhado até atingir $Abs_{600nm} = 0,6 - 1,0$. Retirou-se, então, uma alíquota de 50 µL (não induzido) para SDS-PAGE. As células foram induzidas com IPTG 1 mM final e foram incubadas por 3 horas a 25°C, após este período foi retirada uma alíquota de 50 µL (induzido) para SDS-PAGE. Ao fim da indução, os 500 mL da cultura foram centrifugados em garrafas não estéreis por 7.000 g, 4°C, 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado em tubos de centrifuga de 50 mL.

pAE: Foram transformadas colônias de BL21(DE3) competentes com plasmídeos *pAE* contendo *appA* e *appA-CBM2*. As colônias que cresceram em placas de LB ágar e foram estocadas em geladeira. Com um palito autoclavado uma colônia transformada foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de carbenicilina durante a noite. No dia seguinte foi transferida para 500 mL de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de carbenicilina. O crescimento das células foi acompanhado até atingir $Abs_{600nm} = 0,6 - 1,0$. Retirou-se, então, uma alíquota de 50 µL (não induzido) para SDS-PAGE. As células foram induzidas com IPTG 0,4 mM final e foram incubadas por 4 horas a 37°C, após este período foi retirada uma alíquota de 50 µL (induzido 4h) para SDS-PAGE. Ao fim da indução, os 500 mL da cultura foram centrifugados em garrafas não estéreis por 7.000 g, 4°C, 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado em tubos de centrifuga de 50 mL.

2.19. *Produção de PON1 e PON1-CBM2 em E. coli*

Foram transformadas colônias de BL21-CodonPlus (DE3)-RP e -RIL competentes com plasmídeos pAE contendo PON1 e PON1-CBM2. As colônias que cresceram em placas de LB ágar contendo carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL e foram estocadas em geladeira. Com um palito autoclavado uma colônia transformada foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. No dia seguinte foi transferida para 500 mL de meio LB líquido contendo carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. O crescimento das células foi acompanhado até atingir $Abs_{600nm} = 0,45 - 0,85$. Retirou-se, então, uma alíquota de 50 µL (não induzido) para SDS-PAGE. As células foram induzidas com IPTG 0,4 mM final e foram incubadas por: 3 horas a 37°C ou 15 horas a 20°C, após este período foi retirada uma alíquota de 50 µL (induzido) para SDS-PAGE. Ao fim da indução, os 500 mL da cultura foram centrifugados em garrafas não estéreis por 7.000 g, 4°C, 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado em tubos de centrifuga de 50 mL.

Colônias de RG competentes foram transformadas com plasmídeos pAE codificando para PON1 e PON1-CBM2. As colônias que cresceram em placas de 2_xTY ágar contendo carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL, canamicina 15 µg/mL e tetraciclina 12,5 µg/mL e foram prontamente utilizadas (foi observado em nosso laboratório que a incubação em geladeira afeta a capacidade de crescimento dessa cepa). Com um palito autoclavado uma colônia transformada foi inoculada em 20 mL de meio 2_xTY ágar carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL, canamicina 15 µg/mL e tetraciclina 12,5 µg/mL, CaCl₂ 0,001 M, glicose 1 % e glicerol 2 %. Esse pré-inóculo foi crescido a 25°C durante 20 horas. No dia seguinte a cultura foi transferida para 1 L de meio 2_xTY líquido contendo

ágar carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL, canamicina 15 µg/mL e tetraciclina 12,5 µg/mL, CaCl₂ 0,001 M, glicose 1 % e glicerol 2 %. O crescimento das células foi acompanhado até atingir Abs_{600nm} = 0,45 – 0,85. Retirou-se, então, uma alíquota de 50 µL (não induzido) para SDS-PAGE. As células foram centrifugadas e ressuspensas no mesmo meio 2xTY contendo todos os antibióticos, o cálcio e o glicerol, porém, na ausência da glicose. Foram, então, induzidas com IPTG 0,4 mM final e foram incubadas por 15 horas a 20°C, após este período foi retirada uma alíquota de 50 µL (induzido) para SDS-PAGE. Ao fim da indução, a cultura foi centrifugada em garrafas não estéreis por 7.000 g, 4°C, 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado em tubos de centrífuga de 50 mL.

Arctic competentes foram transformadas com plasmídeos pAE contendo PON1 e PON1-CBM2. As colônias que cresceram em placas de 2_xTY ágar contendo carbenicilina 50 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL foram prontamente utilizadas (foi observado em nosso laboratório que a incubação em geladeira afeta a capacidade de crescimento dessa cepa). Com um palito autoclavado uma colônia transformada foi inoculada em 20 mL de meio 2_xTY ágar contendo 10 µg/mL de gentamicina, CaCl₂ 0,001 M, glicose 1 % e glicerol 2 %. Esse pré-inóculo foi crescido a 25°C durante 20 horas. No dia seguinte a cultura foi transferida para 1 L de meio 2_xTY líquido contendo gentamicina 10 µg/mL, CaCl₂ 0,001 M, glicose 1 % e glicerol 2 %. O crescimento das células foi acompanhado até atingir Abs_{600nm} = 0,45 – 0,85. Retirou-se, então, uma alíquota de 50 µL (não induzido) para SDS-PAGE. As células foram centrifugadas e ressuspensas no mesmo meio 2xTY contendo 10 µg/mL de gentamicina, o cálcio e o glicerol, porém, na ausência da glicose. Foram, então, induzidas com IPTG 0,25 mM final e foram incubadas por 24 horas a 10°C, após este período foi retirada uma alíquota de 50 µL (induzido) para SDS-PAGE. Ao fim da indução, a cultura foi centrifugada em garrafas

não estéreis por 7.000 g, 4°C, 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado em tubos de centrífuga de 50 mL.

2.20. *Lise Celular*

Em E coli BL21(DE3), expressão de appA e appA-CBM2, homogeneizou-se o precipitado bacteriano em 20 mL de tampão Tris/HCl 0,020 M pH 7,4 contendo Imidazol 0,020 M. Sonicou-se a amostra em banho de gelo por 5 séries de 30 segundos (Branson Sonifier 450, ciclo constante; 20 W) com intervalo de 3 minutos. Centrifugou-se a 7.000 g, 4°C, por 20 minutos. A porção solúvel do lisado foi armazenada a - 20 °C.

Para as cepas RG e Arctic, expressão de PON1 e PON1-CBM2, homogeneizou-se o precipitado bacteriano em 10 mL de tampão Tris/HCl 0,20 M pH 8,0 contendo Imidazol 0,020 M. Sonicou-se a amostra em banho de gelo por 3 séries de 45 segundos (Branson Sonifier 450, ciclo constante; 10 W) com intervalo de 45 segundos. Centrifugou-se a 7.000 g, 4°C, por 20 minutos. A porção solúvel do lisado foi armazenada a - 20 °C.

2.21. *Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)*

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de separação de 12 % de poliacrilamida e gel de empilhamento de 4,0 % (Laemmli 1970) em placas. As alíquotas foram suspensas em tampão de amostra para eletroforese 1X [Tris 60 mM, pH 6,8; β -mercaptoetanol 5 % (v/v); glicerol 10 % (v/v); SDS 2 % (p/v) e azul de bromofenol 0,05 % (p/v)], fervidas por 3 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 200 V (fonte BioRad modelPowerPac™Basic) até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. As proteínas foram visualizadas através de coloração por coloração com azul de Coomassie R

0,2 % (p/v), preparado em etanol 40 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v), seguido de descoloração com etanol 40 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v).

2.22. *Teste de solubilidade da proteína recombinante*

Homogeneizou-se o precipitado bacteriano correspondente a 1 litro (cerca de 2 g de extrato seco para RP e RG ou 1,5 g para Arctic) em 5 mL de tampão 0,05 M de Tris/HCl pH 8,0, contendo 0,3 M de NaCl, 0,001 M de CaCl_2 e 0,020 M de Imidazol. Sonicou-se a amostra em banho de gelo por 5 séries de 15 segundos (20 W) com intervalos em gelo de 15 segundos em cada pulso (Branson Sonifier 450). Centrifugou-se a 7.000 g, 4°C, por 20 minutos. A porção solúvel (PS) e a porção insolúvel (PI) foram armazenadas a -20 °C. Para o teste de solubilidade uma amostra da PS foi recolhida e a da PI foi suspensa em 1mL do tampão de lise sendo ambos analisados em seguida por SDS-PAGE 12 % e coloração com Coomassie Blue.

2.23. *Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade*

O vetor pAE fusiona seis resíduos de histidina (6xHis) à proteína recombinante, possibilitando a sua purificação por cromatografia de afinidade. A purificação de appA e appA-CBM2 foi realizada em coluna Hi-Trap HP de 5 mL (GE Healthcare) carregada com níquel (Ni^{+2} -Sepharose) utilizando o sistema de bomba peristáltica em fluxo 1 mL/min e coletor de frações (GE Healthcare).

Para PON1 e PON-CBM 2 aproximadamente 1 mL da porção solúvel (PS) do lisado celular foi então incubada com 200µL de resina de Ni^{+2} -NTA agarose (Qiagen), previamente equilibrada com 2,5mL de tampão de lise, a 4°C, por 1 hora e centrifugada a 16.000 xg por 1

min. Foram realizadas 5 lavagens com 1 mL de tampão de lise por centrifugação 16.000 g por 1 minuto. A proteína foi eluída com 250µL de tampão de lise acrescido de 0,080 M, 0,100 M e 0,200 M de imidazol, seguindo-se incubação por 15 minutos com agitação “end-over-end”, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante.

2.24. Dosagem de Proteína pelo Método do Ácido Bícínchonínico (BCA) Modificado

Para BCA modificado (Morton and Evans 1992) foi feita a mistura, no mesmo dia, de 100 volumes de BCA (solução A: 0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO₃, 0,16 % Na₂Tartarato, 2,0 % Na₂CO₃.H₂O, 1,0 % BCA.Na₂, pH 11,25) com 2 volumes de solução de cobre (solução B: 4,0 % CuSO₄.5H₂O). A curva padrão é linear até 30 µg de proteína e foi realizada a cada ensaio com albumina de soro bovino (BSA) 1 mg/mL, padronizada pela leitura de absorbância 0,660 a 280 nm, baseado no coeficiente de extinção molar.

O ensaio foi realizado com 100 µL de volume final de amostra, que contém 8 µL de SDS 25 %, mais 2 mL de reativo. Os tubos são agitados e incubados a 60°C por 30 min. Após atingir temperatura ambiente foi realizada a leitura da curva padrão e das amostras a 562 nm.

2.25. Ensaio de Atividade Enzimática

A atividade da enzima appA foi detectada através de absorbância da degradação de p-nitrofenil fosfato a 405 nm. O ensaio consiste na incubação a 30°C de 125 µL de amostra contendo enzima em 750 µL de tampão Glicina/HCl 0,25 M pH 2,5. A reação foi interrompida com 500 µL de hidróxido de sódio 2,0 M para se determinar a absorbância. A curva padrão de p-nitro fenolato foi construída a partir de uma solução aquosa 5 mM diluída

até 250 nmols. O cálculo $\varepsilon_{\text{amostra}}$ (inclinação do ensaio de atividade em Abs/minuto) $\times (\varepsilon_{\text{curva padrão}})^{-1}$ (inverso da inclinação da curva padrão em nmols/Abs) fornece a quantidade de produto formado em nmols/min.

Segue a padronização do ensaio enzimático. A curva padrão para p-nitro fenol está apresentada abaixo:

Figura 1. Curva padrão de p-nitrofenolato.

As velocidades iniciais de hidrólise foram calculadas utilizando ao menos quatro diferentes tempos.

A atividade da PON1 foi verificada através da hidrólise de paraoxon (p-nitrofenil dietil fosfato) que produz íon fenolato detectado a 405 nm. Os ensaios foram realizados com paraoxon 4 mM em um volume total de 1 mL. A atividade enzimática foi medida em tampão Tris/HCl 0,050 M, NaCl 0,300 M e CaCl_2 0,001 M pH 8,0. A enzima foi adicionada ao tampão e equilibrada para 30°C, então, 15 μL de uma solução estoque de paraoxon em etanol foram adicionados para iniciar a reação. Foi monitorado o aumento de absorbância a 405 nm em

espectrofotômetro Carry 3E (Varian) e a quantidade de p-nitrofenolato foi calculada a partir das velocidades iniciais de hidrólise usando coeficiente de extinção de $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Na determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{\text{máx}}$ foram escolhidos os tempos em que as velocidades se encontravam dentro da faixa de linearidade. Foram determinadas velocidades iniciais de hidrólise (v_o) para pelo menos 10 concentrações diferentes de PNPP em Tampão Glicina/HCl 0,250 M, pH 2,5, para appA e appA-CBM2, e de Paraoxon em tampão Tris/HCl 0,050 M, NaCl 0,300 M, CaCl_2 0,001 M, pH 8,0, para PON1 e PON1-CBM2. A hidrólise de paraoxon foi determinada utilizando-se concentrações entre 0,2 a 4,0 mM. K_m e $V_{\text{máx}}$ foram determinados através de regressão não linear dos valores de v_o versus concentração de substrato segundo a equação de Michaelis-Menten utilizando o software Origin® Pro 8 (Microcal Software Inc., Northampton, MA).

As unidades (U) de atividade enzimática foram expressas em μmol de produto de hidrólise formado por minuto (nmol/min). Os erros dos parâmetros cinéticos foram menores que 8 % e os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata.

2.26. *Ensaio de Ligação a Celulose*

A afinidade da appA-CBM2 e PON1-CBM2 por celulose microcristalina (Avicel PH101, Sigma) foi medida através de ensaio ligação modificado (Najmudin et al. 2006) onde 5 U de appA-CBM2 ou PON1-CBM2 foram incubados “overnight” com diferentes quantidades de Avicel em agitação “end-over-end”, a temperatura ambiente. O volume final da amostra foi de 500 μL . A pré-incubação do Avicel com albumina bovina de soro (BSA) 0,5 % foi realizada para evitar ligações inespecíficas (Linder et al. 1998). appA ou PON1 recombinantes não fusionadas a CBM2 foram usadas como controle negativo.

Segue esquema utilizado para o ensaio de ligação:

Esquema 17 – Ensaio de ligação das fosfatases fusionadas a CBM2 em Avicel.

Após a obtenção do perfil de saturação da ligação de appA-CBM2 à Avicel em pH 2,5, a concentração de Avicel foi mantida em 50 mg para a determinação do efeito do pH na ligação de appA-CBM2 à Avicel. O ensaio foi realizado nos tampões: Glicina/HCl 0,025 M, pH 2,5; Acetato de Sódio 0,025 M, pH 4,5; MES 0,025 M, pH 6,5; Tris/HCl 0,025 M, pH 8,5; Glicina/NaOH 0,025 M, pH 10. Foi medida a recuperação da atividade fosfatase no precipitado final.

Os ensaios para PON1-CBM2 foram realizados com a mesma metodologia padronizada e descrita para appA-CBM2, porém, o tampão escolhido para a obtenção do perfil de saturação da ligação de PON1-CBM2 à Avicel foi o MES 0,025 M, pH 6,5, por ser o de maior relação atividade paraoxonase *versus* ligação a celulose pelo CBM2.

2.27. *Imunodeteccção de proteínas por Western-Blotting*

Após SDS-PAGE, foi feita a transferência eletroforética dos polipeptídios para a membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco como descrito por (Harlow 1988). As membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau-S 0,1 % (p/v) dissolvido em ácido acético 10 % (v/v) para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, as membranas foram descoradas por lavagem com água destilada e incubadas por 1 hora, sob agitação lenta, em TBS 1X (Tris-HCl 0,010 M, pH 7,4, e NaCl 0,150 M) contendo 5 % (p/v) de leite em pó desnatado. Após esta etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal anti-His₆ (Anti-His HRP - Qiagen) acoplado com peroxidase, diluído em TBS 1X contendo 5 % (p/v) de leite em pó desnatado por 16 horas. No dia seguinte, as membranas foram submetidas a seis lavagens de 10 minutos cada com TBS 1X contendo Tween 20 0,1 % (v/v). As proteínas que reagiram com o anticorpo foram detectadas com 4-cloro-naftol utilizando o kit Opti-4CN substrate (Bio-Rad).

3. Resultados e Discussão

3.1. Clonagem do CBM2 de *Xac*

Foram realizadas reações de PCR (Protocolo C) utilizando a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) com amostras de DNA genômico de *Xac* (100 ng) como molde para a amplificação do segmento de DNA que codifica o domínio ligante de celulose (CBM) utilizando os iniciadores CBMXACF e CBMXACR. Não houve amplificação (resultado não mostrado). Procedeu-se então o mesmo método (Protocolo C), porém, aumentando a quantidade de DNA genômico para 300 ng e 500 ng. Essa reação também não resultou em amplificação (resultado não mostrado).

Foram, então, realizadas reações de PCR (Protocolo A) utilizando a enzima Taq Polimerase (Fermentas) com duas amostras distintas contendo menos DNA genômico de *Xac* (10 e 25 ng). A amplificação da região codificadora de CBM2 por PCR foi obtida com sucesso (figura 2).

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR da região codificadora do CBM2 (316 pb). Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1 e 2. Produtos de PCR, DNA genômico purificação 1: 10 ng, 25 ng, respectivamente; Raia 3 e 4. Produtos de PCR, DNA genômico purificação 2: 10 ng, 25 ng, respectivamente.

O fragmento de DNA amplificado (Raia 1), com cerca de 300 pb, foi purificado e ligado a vetor pGem-T Easy. Após a transformação de *E. coli* XL1-Blue, uma colônia foi cultivada em meio líquido. O DNA plasmidial extraído desta colônia foi submetido a sequenciamento para confirmação da integridade do inserto (figura 2). A reação de sequenciamento foi realizada com o iniciador correspondente à sequência da região do promotor T7 (sense) e com o iniciador correspondente à sequência da região do promotor SP6 (antisense). A região da sequência codificadora da celulase correspondente ao CBM2 foi obtida, apresentando 100% de identidade com a sequência equivalente disponível no banco de dados do “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (Johnson et al. 2008) (Figura 3).

```

ref|NP_640965.1| cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]
gb|AAM35501.1| cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]
Length=474
Score = 185 bits (469), Expect = 2e-45
Identities = 106/106 (100%), Positives = 106/106 (100%), Gaps = 0/106 (0%)
Frame = +1

Query 43 GTVSNStptptptptptptptpsAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTNTGTASGNWSISL 222
          GTVSNSTPTPTPTPTPTPTPTPSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTNTGTASGNWSISL
Sbjct 369 GTVSNSTPTPTPTPTPTPTPTPSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTNTGTASGNWSISL 428

Query 223 TVTGTVNNAWNVWTSQSGTTLQASGVDDYNRTLAPGATAEFGFCAAG 360
          TVTGTVNNAWNVWTSQSGTTLQASGVDDYNRTLAPGATAEFGFCAAG
Sbjct 429 TVTGTVNNAWNVWTSQSGTTLQASGVDDYNRTLAPGATAEFGFCAAG 474

```

Figura 3. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de uma Celulase de *Xac* disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do CBM2 com o iniciador T7.

3.2. Clonagem da Fosfatase Ácida (*appA*) de *E. coli*

Após o sucesso da clonagem do CBM2 de *Xac*, partimos para a clonagem do segmento de DNA que codifica a enzima *appA*, a fosfatase ácida de *E. coli*. Para isso, foram realizadas reações de PCR (Protocolo A) utilizando o DNA genômico de *E. coli* BL-21(DE3). As amostras continham 25 ng de DNA molde para a amplificação de *appA* e os iniciadores foram APPAF e APPAR.

A amplificação do segmento de DNA de interesse não pode ser verificada devido à presença de várias bandas visualizadas após a eletroforese em gel de agarose (Figura 4).

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR (Protocolo A) do segmento de DNA que codifica appA. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR contendo várias bandas amplificadas.

A temperatura de pareamento da reação foi aumentada para 52°C e o tempo de extensão para 2,5 minutos (Protocolo A modificado) com o intuito de evitar ligações inespecíficas entre iniciadores e molde. A reação continha 25 ng de DNA molde para a amplificação do segmento que codifica appA e os iniciadores foram APPAF e APPAR. O resultado foi a amplificação de uma única banda (Figura 5).

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR (Protocolo A modificado) do segmento de DNA que codifica appA. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR; uma banda amplificada com cerca de 1.600 pb.

O fragmento amplificado, com cerca de 1.600 pb, foi purificado e ligado ao vetor pGem-T Easy. Após a transformação de *E. coli* XL1-Blue, uma colônia foi identificada e cultivada em meio líquido. O DNA plasmidial extraído desta colônia foi submetido a sequenciamento de DNA e confirmou-se a integridade do inserto que codifica appA (Figuras 6, 7 e 8).

```

ref|YP_668899.1| G phosphoanhydride phosphorylase [Escherichia coli 536]
gb|ABG69998.1| G periplasmic AppA protein precursor [Escherichia coli 536]
Length=446

GENE ID: 4127795 ECP 0885 | phosphoanhydride phosphorylase
[Escherichia coli 536] (10 or fewer PubMed links)

Score = 368 bits (944), Expect = 2e-100
Identities = 198/202 (98%), Positives = 201/202 (99%), Gaps = 0/202 (0%)
Frame = +1

Query 112 MSDMKSGNISMKAILIPFLSLIIPLP+SAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQL 291
Sbjct 1 MSDMKSGNISMKAILIPFLSLIIPLP+SAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQL 60
Query 292 MQDVTDPANFTWPFVGLWLPFGGELIAYLGHYQRLVADGLLAKKGCPSQSQVVAIIAD 471
Sbjct 61 MQDVTDPANFTWPFVGLWLPFGGELIAYLGHYQRLVADGLLAKKGCPSQSQVVAIIAD 120
Query 472 VDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDFLNFPLKTVGCQLDNANVTDAILSRA 651
Sbjct 121 VDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDFLNFPLKTVGCQLDNANVTDAILSRA 180
Query 652 GGSIAFTGHRQTAFRELERVL 717
Sbjct 181 GGSIAFTGHRQTAFRELERVL 202

```

Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo produto amplificado em reação de PCR (Figura 5) com sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento com o iniciador T7.

```

gb|AAW28334.1| AppA [Escherichia coli]
Length=432

Score = 365 bits (938), Expect = 6e-100
Identities = 180/180 (100%), Positives = 180/180 (100%), Gaps = 0/180 (0%)
Frame = +1

Query 1 PFLSLIIPLPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDPANFTWPFVGL 180
Sbjct 7 PFLSLIIPLPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDPANFTWPFVGL 66
Query 181 GWTLPFGGELIAYLGHYQRLVADGLLAKKGCPSQSQVVAIIADVDERTRKTGEAFAAGL 360
Sbjct 67 GWTLPFGGELIAYLGHYQRLVADGLLAKKGCPSQSQVVAIIADVDERTRKTGEAFAAGL 126
Query 361 APDCAITVHTQADTSSPDFLNFPLKTVGCQLDNANVTDAILSRAGGSIAFTGHRQTAFR 540
Sbjct 127 APDCAITVHTQADTSSPDFLNFPLKTVGCQLDNANVTDAILSRAGGSIAFTGHRQTAFR 186

```

Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo produto amplificado em reação de PCR (Figura 5) com sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento com o iniciador 5appA.

```

gb|AAW28334.1| AppA [Escherichia coli]
Length=432

Score = 365 bits (937), Expect = 1e-99
Identities = 194/196 (98%), Positives = 195/196 (99%), Gaps = 0/196 (0%)
Frame = +3

Query 3 QIAFRELERVLNFPQSNLCMKRERQDESCSLTQALPSELKVSADNVSLTGAVSLASHMTE 182
Sbjct 182 QIAFRELERVLNFPQSNLCMKRERQDESCSLTQALPSELKVSADNVSLTGAVSLASHMTE+ 241
Query 183 IFLLQQAQGMPEFGWGRITDSHQWNTLSLHNAQFYLLQRTPEVARSRATPILLOLINTAL 362
Sbjct 242 IFLLQQAQGMPEFGWGRITDSHQWNTLSLHNAQFYLLQRTPEVARSRATPILLOLINTAL 301
Query 363 IFHPPQKQAYGVILPTSVLFIAGHDTNLNLGGALELNLWLPQPDNTFPGGELVFERWR 542
Sbjct 302 IFHPPQKQAYGVILPTSVLFIAGHDTNLNLGGALELNLWLPQPDNTFPGGELVFERWR 361
Query 543 RLSDNSQNIQVSLVFQ 590
Sbjct 362 RLSDNSQNIQVSLVFQ 377

```

Figura 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado em reação de PCR (Figura 5) com sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento com o iniciador SP6.

3.3. Construção da Proteína Quimérica: Pré-fusão

Paralelamente aos experimentos de clonagem de appA e CBM2 foi adquirido junto à OriGene (OriGene Technologies, Inc.) um vetor que continha como inserto a sequência de DNAC que codifica a paraoxonase 1 humana (PON1). Estes materiais foram utilizados para a construção da sequência de DNA que codifica as proteínas quiméricas appA-CBM2 e PON1-CBM2 segundo estratégia descrita no esquema 11.

Esquema 18 – Estratégia utilizada para a construção de um segmento de DNA que codifique a fusão entre duas diferentes proteínas (produto de fusão).

Assim, com a clonagem da sequência codificadora de CBM2 de *Xac*, da appA de *E. coli* e com a obtenção da sequência codificadora da PON1 humana, partimos para a etapa de pré-fusão, ou seja, a preparação para a união dos segmentos de DNA que codificam as enzimas com o CBM2 (Esquema 11). Nessa etapa foi necessária a construção de iniciadores que contivessem sequências complementares na região 3' das enzimas (APPACBMREV e PONCBMREV, para appA e PON1, respectivamente) com a região 5' do CBM2 (5CBM). Também foram desenhados novos iniciadores para a região 5' da appA contendo sítio de restrição para a enzima *NdeI* (5APPA) e para a região 5' da PON1 (5PON1).

Foram realizadas reações de PCR (Protocolo A) utilizando 1 µl de DNA plasmidial contendo o inserto da appA, de PON1 ou de CBM2, adicionando-se 1,5 µl do iniciador sense

5APPA, 5PON1 ou 5CBM, mais 1,5 µl do iniciador antisense APPACBMREV, PONCBMREV ou 3CBM, para appA, PON1 e CBM2, respectivamente.

Em cada uma das reações observou-se a amplificação de uma banda com tamanho previsto, enquanto que outras bandas de maior massa molecular relativa indicam excesso de DNA plasmidial utilizado para a montagem da reação (Figura 9). Os fragmentos de interesse foram purificados e congelados.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de pré-fusão. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto PCR de pré-fusão codificando appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR de pré-fusão codificando CBM2 (~300 pb); Raia 3. Produto de PCR de pré-fusão codificando PON1 (~1.500 pb).

3.4. Construção da Proteína Quimérica: Fusão

Partimos, então, para a fusão dos segmentos de DNA que codificam cada uma das enzimas com o segmento de DNA que codifica o CBM2. Essa etapa não fez uso de novos iniciadores. Foram realizadas reações de PCR utilizando a enzima Taq Polimerase (Fermentas) (Protocolo A modificado para 25 ciclos na Janela 2) utilizando 0,5 µl do inserto purificado na etapa de pré-fusão da appA ou contendo o inserto purificado na etapa de pré-fusão da PON1 mais 0,5 µl do inserto purificado na etapa de pré-fusão do CBM2, adicionando 1,5 µl do iniciador 5APPA ou 5PON1 mais 1,5 µl do iniciador 3CBM.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na reação de fusão entre sequências codificadoras de appA ou PON1 com CBM. Protocolo B modificado para temperatura de pareamento 50°C e para 25 ciclos na Janela 2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Controle de tamanho do fragmento de appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR de fusão da appA com o CBM2 (~1.900 pb); Raia 3. Controle de tamanho do fragmento da PON1 (~1.500 pb); Raia 4. Produto de PCR de fusão da PON1 com o CBM2 (~1.800 pb).

Na análise dos produtos da reação em eletroforese foi reconhecida a banda relativa ao produto de fusão da sequência codificadora de PON1 com o CBM2 (~1.800 pb) (Figura 10). Esta banda foi extraída do gel, purificada e ligada ao vetor pGem-T Easy. Porém, a reação de fusão da appA com o CBM2 não resultou em uma banda reconhecível. Por isso, resolvemos tentar amplificar este produto a partir do resultado da reação anterior. Foi, então, realizada uma nova reação idêntica à anterior, porém, com 35 ciclos na janela 2 (Protocolo A) e utilizando o produto total do PCR anterior como molde (Raia 2 para a appA e Raia 4 para a PON1) (Figura 11).

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de fusão entre sequências codificadoras de appA ou PON1 com CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Controle de tamanho do fragmento de DNA da appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR realizado com o produto de fusão da appA com o CBM2, 35 ciclos (~1.900 pb); Raia 3. Produto de PCR da fusão da appA com o CBM2, realizado anteriormente com 25 ciclos (~1.900 pb); Raia 4. Controle de tamanho do fragmento de DNA da PON1 (~1.500 pb); Raia 5. Produto de PCR realizado com o produto de fusão da PON1 com o CBM2, 35 ciclos; Raia 6. Produto de PCR de fusão da PON1 com o CBM2, realizado anteriormente com 25 ciclos (~1.800 pb).

Essa estratégia resolveu o problema da visualização da banda de fusão da appA com o CBM2 (Figura 11 - Raia 2), a qual foi purificada a partir do gel. Para PON1 foi extraída a banda da eletroforese anterior. Os fragmentos de fusão foram ligados separadamente ao vetor pGem-T Easy.

Após a transformação de *E. coli* XL1-Blue, procedimento realizado separadamente com os dois produtos de fusão ligados ao vetor pGem-T Easy, duas colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo codificando cada produto de fusão foram cultivadas em meio líquido e o DNA plasmidial contendo os insertos foi extraído.

Para verificar a presença do inserto em cada uma destas amostras de plasmídeo, foi então realizada uma nova reação de PCR (Protocolo A) com 1,0 µl de DNA plasmidial extraído das colônias, 1,5 µl do iniciador 5APPA ou 5PON1 mais 1,5 µl do iniciador 3CBM, para a amplificação dos insertos dos DNAs plasmidiais extraídos das colônias transformadas (Figura 12). Essa etapa de verificação se tornou importante, pois, tivemos algumas colônias transformadas com plasmídeo fechado e ausente de inserto, indicativo de que uma porcentagem do vetor pGem-T Easy não foi adequadamente linearizada.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose de reações de PCR com os DNAs plasmidiais contendo como inserto sequências codificantes dos produtos de fusão appA-CBM2 e PON1-CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR da mini preparação 1 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da appA com o CBM; Raia 2. Produto de PCR da mini preparação 2 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da appA com o CBM2 (~1.900 pb); Raia 3. Produto de PCR da mini preparação 1 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da PON1 com o CBM2 (~1.800 pb); Raia 4. Produto de PCR da mini preparação 2 do DNA plasmidial contendo como inserto a sequência codificante do produto da fusão da PON1 com o CBM2 (~1.800 pb).

Todas as amostras de DNA plasmidial apresentaram inserto, porém, a amostra 1 da appA apresentou um inserto com número de pares de bases menor do que o esperado. As amostras foram, então, submetidas ao sequenciamento de DNA para a análise da integridade das sequências. Segue o resultado para a mini preparação 1 do plasmídeo que codifica a fusão appA com o CBM2, appA-CBM2 (Figuras 13 a 15).

gb AAN28334.1 AppA [Escherichia coli]			
Length=432			
Score = 403 bits (1036), Expect = 3e-111			
Identities = 199/200 (99%), Positives = 199/200 (99%), Gaps = 0/200 (0%)			
Frame = +1			
Query	1	PFLSLLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTIPDAWPTWPVKL	180
Sbjct	7	PFLSLLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTIPDAWPTWPVKL	66
Query	181	GWLTPRGGELIAYLGHYQRQRLVADGLLAKKGCPQSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGL	360
Sbjct	67	GWLTPRGGELIAYLGHYQRQRLVADGLLAKKGCPQSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGL	126
Query	361	APDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAFH	540
Sbjct	127	APDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAFR	186
Query	541	ELERVLNFPQSNLCLKREKQ	600
Sbjct	187	ELERVLNFPQSNLCLKREKQ	206

Figura 13. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2 com o iniciador T7.

GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]			
Score = 182 bits (463), Expect = 8e-45			
Identities = 85/85 (100%), Positives = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%)			
Frame = -2			
Query	268	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVINTGTASGNWSISLTVTGTVNNAWNVTWSQSGTTL	89
Sbjct	390	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVINTGTASGNWSISLTVTGTVNNAWNVTWSQSGTTL	449
Query	88	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG	14
Sbjct	450	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG	474

Figura 14. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com uma celulase de Xac disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2 com o iniciador SP6.

Apesar da busca no banco de dados do NCBI identidade com appA e o CBM2 (Figuras 13 e 14), estas sequências não se encontravam na mesma fase de leitura (Figura 15).


```

ggnggggncgcgtaaaancnggggaaccttttccccnggggtggccccggatttgcaataac
X G X R K X G E P X P X G W P R I C N N
cgtacatacccaggnaaatangtccagtcnccgatccgttnattatnctntnaaaactgg
R T Y P X K X V Q S X S V X - X X X N W
cgtttgccaactggataacgcgaangtgactgacgcgatentcagcagggcaggagggtc
R L P T G - R E X D - R D X Q Q G R R V
aattgctgactttaccgggcatcggaacacggcggtttcacgaantggaacgggtgctta
N C - L Y R A S A N G V S R X G N G C L
atttttcngcaatcaaacttggtgccttaaaacgtgagaaacaggacgaaagctgttcatt
I F X Q S N L C L K T - E T G R K L F I
aacgcaggcattaccatcggaactcaaggtgagcgccgacaatgtctcattaaccgggtgc
N A G I T I G T Q G E R R Q C L I N R C
ggtaagcctcgcgtcaatgctgacggagatatttctcctgcaacaagcacagggaatgcc
G K P R V N A D G D I S P A T S T G N A
ggagccgggggtggggaaggatcaccgattcacaccagtggaacaccttgctaagtttgca
G A G V G K D H R F T P V E H L A K F A
Taacgcgcaaattttatttgcacacccgacgccaacgcggacccccacgcgcgacgccaacc
- R A I L F A T P T P T P T P T P T P T
ccaacaccaagcgcggttcggtaccaaggtcatcccgagacacctggaacgggtggc
P T P S A G F G T K V I P D S T W N G G
tactgcaaccgctgcaggtcaccaacacggcaccgcccagcggcaattgggtcgatctcg
Y C N R V Q V T N T G T A S G N W S I S
ctgacagtcaccggcaccgtcaacaacgcctggaacgtcacctggtcacagagcggcacc
L T V T G T V N N A W N V T W S Q S G T
acgctccaggccagcggcggtgactacaacggcacgctggcgcccggtgcaactgcccag
T L Q A S G V D Y N R T L A P G A T A E
ttcggcttcacggcagcaggttgagaattccggaatcactagtgaattcgcgccgcctg
F G F C A A G - E F R N H - - I R G R L
caggtcgaccatattgggagagctnnccaacgcgttggtgcatcactnntgtag
Q V D H M G E X X N A L D A Y X V

```

Figura 15. Sequência de nucleotídeos e tradução do segmento de DNA que codifica a fusão appA-CBM2. A marca amarela ilustra o início da sequência do CBM2; a marca verde indica o fim da sequência que codifica appA. No produto de fusão appA-CBM2 estão em fases de leitura diferentes, acima está mostrada apenas a fase de leitura do CBM. Ferramenta de tradução do Expasy (Consortium; Jain et al. 2009).

O iniciador do PCR de fusão APPACBMREV provavelmente pareou em uma região interna da sequência que codifica appA, justificando assim, um produto amplificado menor que o esperado como acusado no gel de agarose (Figura 12). Na análise do sequenciamento verificou-se a ausência da região final da sequência da appA (cerca de 500 pb). Essa amostra foi descartada.

Foi analisada, então, a mini preparação 2 do plasmídeo que codifica a fusão appA-CBM2 (Figuras 16 e 17). Essa amostra indicou tamanho apropriado na eletroforese em gel de agarose (Figura 12). Porém, mutações foram encontradas tanto na região codificando para appA como CBM2. Como a troca de D176 para G em appA e L399 para Q em CBM2 (Figuras 16 e 17, respectivamente).

Figura 16. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador T7.

Figura 17. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da appA disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador SP6.

Ocorreram três mutações no segmento que codifica appA e duas no CBM2 (Figura 18).

```

ccctgctaaagtgcaaaacggcattttatnttacaacnnngccaaagttgncggcagc
P L L S C K X A X Y X Y N X A K V X X S
cggccaccggttttannatnagacagggtagcggcccccaccgcaaaacagggc
R P P V L X X X R Q G D A P S T A K Q A
tatgggtgacataccacttcagtgctgttttttccggacacgataactatctggcaaat
Y G - H T H F S A V F X G H D T N L A N
ttcggcgccgcaactggagctcaacngacgcttcccggtcagccggataaacacgccgccag
F G G A L E L N X R F P V S R I T R R Q
gtggtgaactggtgtttgaacgctggcgctcggtcaagcagataaacagccagtgattcagg
V V N W C L N A G V G - A I T A S G F R
tttgcgtggtcttcagactttacagcagatgcgtgataaaacgcgctgtcattaaat
S L V F Q T L Q Q M R D K T P L S L N
acggcgcccgagaggtgaaacgaccctggcaggatgtgaagagcgaatgcgcagggc
T P P G E V K T L A G C E E R N A Q G
atgtgttcgttgccaggttttacgcaaatcgatgaatgaagcagcagatacggcggtgcagt
M C S L A G F T Q I V N E A R I P A C S
tgacaccgacgccaacggcaccacggcgacggcccccacacccaagcgcgggc
L T P T P T P T P T P T P T P T P T P S A G
ttcgggtaccaaggtcatcccgacagcacctggaacgggtggtactgcaaccgctgcag
F G T K V I P D S T W N G G Y C N R V Q
gtcaccaacacggcgacggccagcggaattggtcgatctcgctgacagtcacggcgacc
V T N T G T A S G N W S I S L T V T G T
gtcaacaacgctggaacgtcacctgggtcacagagcggcaccacgctccaggccagcggc
V N N A W N V T W S Q S G T T L Q A S G
gtggactacaacggcagctggcgccgggtgcaactgcccaggcttcggtctctgcgagca
V D Y N R T L A P G A T A E F G F C A A
ggttgaagaattccggaatcactagtgaaattcgcgccgctgcaggtgcacatatggga
G - E F R N H - - I R G R L Q V D H M G
gagctcccaacgctgttgatgcnactatng
E L P T R W M X L X

```

Figura 18. Sequência de nucleotídeos e tradução do segmento de DNA que codifica a fusão appA-CBM2. A marca amarela ilustra o início da sequência do CBM2 e a marca verde indica o fim da sequência que codifica appA. Foram detectadas várias mutações (marcadas em vermelho): 3 mutações na região da appA e 2 na região repetitiva TP que corresponde à região intermediária do produto de fusão. Ferramenta de tradução do ExPASy (Consortium; Jain et al. 2009).

Assim, as amostras de mini preparação 1 e 2 do plasmídeo com inserto que codifica para fusão appA-CBM2 não forneceram sequências íntegras e foram descartadas.

Foram, então, verificadas as sequências que codificam para a fusão da PON1 com o CBM2 (PON1-CBM2). A sequência da mini preparação 1 foi comparada com o banco de dados do NCBI (Figuras 19 e 20).

<p>GENE ID: 1154683 <i>engKCA</i> cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]</p> <p>Score = 182 bits (463), Expect = 1e-44 Identities = 85/85 (100%), Positives = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%) Frame = -3</p>	
Query 265	PSAGFGTRVFPDSTWNGGYCHRVQVTHGTASGNWSISLIVTGVNHNANVINSQSGTIL 89
Sbjct 390	PSAGFGTRVFPDSTWNGGYCHRVQVTHGTASGNWSISLIVTGVNHNANVINSQSGTIL 449
Query 88	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGPCAAG 14
Sbjct 450	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGPCAAG 474

<p>GENE ID: 5444 <i>PON1</i> paraoxonase 1 [Homo sapiens]</p> <p>Score = 237 bits (604), Expect = 5e-61 Identities = 113/114 (99%), Positives = 113/114 (99%), Gaps = 0/114 (0%) Frame = -3</p>	
Query 658	LAHKIHVYEKHANDTLPLKSLDFNTLVNLSVDPETGDLWVGCHPNMGKIFFYDSENPP 479
Sbjct 240	LAHKIHVYEKHANDTLPLKSLDFNTLVNLSVDPETGDLWVGCHPNMGKIFFYDSENPP 299
Query 478	ASEVLRIQNILTEEPKVAQVYAENGTVLQGSTVASVYKGLLIGTVFHKALYCE 317
Sbjct 300	ASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTVLQGSTVASVYKGLLIGTVFHKALYCE 353

Figura 19. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador T7.

<p>GENE ID: 5444 <i>PON1</i> paraoxonase 1 [Homo sapiens]</p> <p>Score = 405 bits (1040), Expect = 1e-111 Identities = 199/199 (100%), Positives = 199/199 (100%), Gaps = 0/199 (0%) Frame = +2</p>	
Query 2	MAKLIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQFVELPNCNLVKGIETGSEDMEILPN 181
Sbjct 1	MAKLIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQFVELPNCNLVKGIETGSEDMEILPN 60
Query 182	GLAFISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTF 361
Sbjct 61	GLAFISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTF 120
Query 362	TDEDNAMYLLVVNHPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKTIIRHKLPLNLDIVAVGPEHFYF 541
Sbjct 121	TDEDNAMYLLVVNHPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKTIIRHKLPLNLDIVAVGPEHFYF 180
Query 542	TNDHYFLDPYLQSWEMYLG 598
Sbjct 181	TNDHYFLDPYLQSWEMYLG 199

Figura 20. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador SP6.

Observou-se que o inserto PON1-CBM2 foi ligado de forma invertida no vetor pGem-T Easy. Essa mini preparação poderia ser utilizada desta forma, porém, a ocorrência

de mutação T318 para A em PON1 demonstra a falta de integridade da sequência e impede seu uso.

Como ainda tínhamos outra mini preparação do plasmídeo que codifica a fusão PON1-CBM2 verificou-se a integridade dessa segunda amostra (Figuras 21 e 22).

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]			
Score = 395 bits (1014), Expect(2) = 4e-111			
Identities = 195/200 (97%), Positives = 196/200 (98%), Gaps = 0/200 (0%)			
Frame = +2			
Query	2	MAKLIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGIETGSEDMEILPN	181
Sbjct	1	MAKLIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGIETGSEDMEILPN	60
Query	182	GLAFISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTF	361
Sbjct	61	GLAFISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTF	120
Query	362	TDEDNAMYLLVVNHPDAKSTVELFKFQEEEEKSLLHLKTIIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYG	541
Sbjct	121	TDEDNAMYLLVVNHPDAKSTVELFKFQEEEEKSLLHLKTIIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYG	180
Query	542	TNDHYFLDPYLSWGDVFGV	601
		TNDHYFLDPYLSW G+	
Sbjct	181	TNDHYFLDPYLSWEMYLGL	200

Figura 21. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador T7.

GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]			
Score = 180 bits (456), Expect = 6e-44			
Identities = 84/85 (98%), Positives = 84/85 (98%), Gaps = 0/85 (0%)			
Frame = -3			
Query	268	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTINTGTASGNWSISLTVIGTDNNAWNVWSQSGTTL	89
Sbjct	390	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTINTGTASGNWSISLTVIGT NNAWNVWSQSGTTL	449
Query	88	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG	14
Sbjct	450	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG	474

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]			
Score = 194 bits (494), Expect = 2e-48			
Identities = 94/95 (98%), Positives = 94/95 (98%), Gaps = 0/95 (0%)			
Frame = -3			
Query	598	SLDFNTLVNDNISVDPETGDLWVGCHPNMGKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEPKVTQV	419
Sbjct	261	SLDFNTLVNDNISVDPETGDLWVGCHPNMGKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEPKVTQV	320
Query	418	YAENGTVLQSSSTVASVYKGKLLIGTVFHKALYCEL	314
Sbjct	321	YAENGTVLQSSSTVASVYKGKLLIGTVFHKALYCEL	355

Figura 22. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 2, com o iniciador SP6.

Contudo, ocorreram mutações tanto na sequência codificadora de PON1 quanto na de CBM2 também na amostra 2.

Em suma, os resultados dos sequenciamentos demonstraram que a estratégia utilizada para a fusão dos segmentos de DNA que codificam as fosfatases (appA e PON1) e o CBM2 é viável, porém, foi realizada com uma DNA polimerase de pouca fidelidade, desta forma, causando mutações indesejadas no produto final. Resolvemos, então, proceder à repetição das reações da pré-fusão e da fusão utilizando uma DNA polimerase de maior fidelidade. Também reduzimos o número de ciclos da reação de PCR a fim de minimizar a probabilidade de ocorrência de mutações.

3.5. *Reconstrução da Proteína Quimérica: Pré-fusão*

O procedimento para a obtenção das sequências de DNA que codificam as fusões appA-CBM2 e PON1-CBM2 foi repetido utilizando DNA polimerase de alta fidelidade Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen).

Foram realizadas reações de PCR (Protocolo B) utilizando 1 µl de DNA plasmidial contendo o inserto da appA ou contendo o inserto da PON1 mais 1 µl de DNA plasmidial contendo o inserto do CBM; 1,5 µl do iniciador 5APPA ou 5PON1 mais 1,5 µl do iniciador APPACBMREV ou PONCBMREV (Figura 23).

Figura 23. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de pré-fusão. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto PCR de pré-fusão da appA (~1.600 pb); Raia 2. Produto de PCR de pré-fusão da PON1 (~1.500 pb); Raia 3. Produto de PCR de pré-fusão do CBM2 (~300 pb).

Percebem-se as bandas dos fragmentos desejados, porém, de menor intensidade. Esse é um resultado esperado e causado pela redução do número de ciclos da reação de PCR de 35 para 10. Os fragmentos amplificados foram purificados e congelados para serem utilizados na etapa a seguir. Nessa etapa os fragmentos não foram submetidos ao sequenciamento.

3.6. Reconstrução da Proteína Quimérica: Fusão

Nessa etapa, apesar da maior fidelidade da Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen), foi indispensável o uso da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) para que ocorra a adição de uma adenosina simples às extremidades 3' dos fragmentos amplificados, facilitando posterior clonagem no vetor pGem T - Easy.

Foram realizadas reações de PCR (Protocolo C) utilizando 0,5 µl do fragmento de pré-fusão da appA ou contendo o fragmento de pré-fusão da PON1 mais 0,5 µl de fragmento de pré-fusão do CBM2, 1,5 µl do iniciador 5APPA ou 5PON1 mais 1,5 µl do iniciador 3CBM. Nessas condições não foram verificadas bandas na eletroforese em agarose (resultado não mostrado). Este resultado pode ser consequência da falta ou do excesso de material molde. Assim, foram feitas duas novas tentativas, nas quais dobramos a quantidade dos fragmentos de pré-fusão e também diluímos 5 x a amostra inicial.

Dessa forma, foram realizadas novas reações de PCR (Protocolo C) utilizando 1,0 µl do fragmento de pré-fusão da appA (concentrado 2x e diluído 5x) ou contendo 1,0 µl do fragmento de pré-fusão da PON1 (concentrado 2x e diluído 5x) mais 1,0 µl de fragmento de pré-fusão do CBM2 (concentrado 2x e diluído 5x), 1,5 µl do iniciador 5APPA ou 5PON1 mais 1,5 µl do iniciador 3CBM (Figura 24).

Figura 24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de fusão dos segmentos que codificam appA ou PON1 com CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder; Raia 1. Produto de PCR da fusão appA-CBM2 diluído 5x (não observado); Raia 2. Produto de PCR da fusão da PON1-CBM2 diluído 5x (~1.800 pb); Raia 3. Produto de PCR de fusão da appA-CBM2 concentrado 2x (~1.900 pb); Raia 4. Produto de PCR de fusão da PON1-CBM2 concentrado 2x (~1.800 pb).

Nessas condições não foram verificadas bandas na eletroforese em agarose para a amostra mais diluída da fusão appA-CBM2. Porém, verificou-se a amplificação dos produtos esperados nas reações que continham 1,0 µl dos fragmentos de pré-fusão das fosfatases e do CBM2 (amostras 2x mais concentradas). O resultado indicou que a quantidade de DNA molde utilizado na primeira tentativa, nesse caso, havia sido pequena.

Após a ligação ao vetor pGem-T Easy e a transformação de *E. coli* XL1-Blue, procedimento realizado separadamente com os dois produtos de fusão appA-CBM2 e PON1-CBM2, uma colônia de bactérias transformadas com plasmídeo codificando cada produto de fusão foi cultivada em meio líquido e o DNA plasmidial contendo o inserto foi extraído.

A integridade do segmento de DNA que codifica a fusão appA-CBM2 foi confirmada através do sequenciamento com iniciadores T7 e SP6 do plasmídeo e com o iniciador e 3CBM. (Figuras 25 a 27).

```

gb|AAN28334.1| AppA [Escherichia coli]
Length=432

Score = 329 bits (844), Expect(2) = 2e-99
Identities = 162/162 (100%), Positives = 162/162 (100%), Gaps = 0/162 (0%)
Frame = +1

Query 109 QSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDPDAWPTWPKLGLWLTFRGGELI 288
Sbjct 18 QSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDPDAWPTWPKLGLWLTFRGGELI 77
Query 289 AYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQ 468
Sbjct 78 AYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQ 137
Query 469 ADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTG 594
Sbjct 138 ADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTG 179

```

Figura 25. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador T7.

```

GENE ID: 1154683 engXCA | cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]

Score = 182 bits (463), Expect = 1e-44
Identities = 85/85 (100%), Positives = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%)
Frame = -1

Query 343 PSAGFGTKVIPDSTWNGGYNRVQVTINTGTASGNWSISLTVIGTVNNAWNVWSQSGITL 164
Sbjct 390 PSAGFGTKVIPDSTWNGGYNRVQVTINTGTASGNWSISLTVIGTVNNAWNVWSQSGITL 449
Query 163 QASGVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG 89
Sbjct 450 QASGVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG 474

gb|AAN28334.1| AppA [Escherichia coli]
Length=432

Score = 153 bits (387), Expect = 7e-36
Identities = 74/74 (100%), Positives = 74/74 (100%), Gaps = 0/74 (0%)
Frame = -1

Query 610 RWRRLSDNSQWIVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGF 431
Sbjct 359 RWRRLSDNSQWIVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGF 418
Query 430 TQIVNEARIPACSL 389
Sbjct 419 TQIVNEARIPACSL 432

```

Figura 26. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 da appA disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão appA-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador SP6.

```

GENE ID: 1154683 engXCA | cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]

Score = 122 bits (307), Expect = 3e-26
Identities = 55/55 (100%), Positives = 55/55 (100%), Gaps = 0/55 (0%)
Frame = -2

Query 184 PSAGFGTKVIPDSTWNGGYNRVQVTINTGTASGNWSISLTVIGTVNNAWNVWSQ 20
Sbjct 390 PSAGFGTKVIPDSTWNGGYNRVQVTINTGTASGNWSISLTVIGTVNNAWNVWSQ 444

gb|AAN28334.1| AppA [Escherichia coli]
Length=432

Score = 276 bits (706), Expect(2) = 2e-76
Identities = 146/146 (100%), Positives = 146/146 (100%), Gaps = 0/146 (0%)
Frame = -2

Query 667 RSRATPLLDLIKALTLPHPFQKQAYGVLTPTSVLFIAGHDTNlanlggalelnwltlpgqp 488
Sbjct 287 RSRATPLLDLIKALTLPHPFQKQAYGVLTPTSVLFIAGHDTNLANLGGALELNWTLPGQP 346
Query 487 DNTPPGGELVFERWRRLSDNSQWIVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEE 308
Sbjct 347 DNTPPGGELVFERWRRLSDNSQWIVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEE 406
Query 307 RNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL 230
Sbjct 407 RNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL 432

```

Figura 27. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 e da appA disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão APPACBM2, mini preparação 1, com o iniciador 3CBM.

A integridade do segmento de DNA que codifica a fusão PON1-CBM2 foi confirmada através de sequenciamento com iniciadores T7 e SP6 do plasmídeo e com os iniciadores 5PON1 e 3CBM (Figuras 28 a 31).

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]				
Score = 444 bits (1142), Expect = 2e-123				
Identities = 218/218 (100%), Positives = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)				
Frame = +2				
Query	5	LIALTLGLMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGITGSEDMEILPNGLA	184	
Sbjct	4	LIALTLGLMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGITGSEDMEILPNGLA	63	
Query	185	FISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDE	364	
Sbjct	64	FISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDE	123	
Query	365	DNAMYLVLVNHDPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKLTIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYGTND	544	
Sbjct	124	DNAMYLVLVNHDPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKLTIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYGTND	183	
Query	545	HYFLDPYLQSWEMYGLAWSYVYVYSPSEVRVVAEGFD	658	
Sbjct	184	HYFLDPYLQSWEMYGLAWSYVYVYSPSEVRVVAEGFD	221	

Figura 28. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador T7.

GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]				
Score = 182 bits (463), Expect = 7e-45				
Identities = 85/85 (100%), Positives = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%)				
Frame = -3				
Query	268	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTINIGTASGNWSISLIVTGTVNNAWNVTWSQSGTTL	89	
Sbjct	390	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVTINIGTASGNWSISLIVTGTVNNAWNVTWSQSGTTL	449	
Query	88	QASGVVDYNRILAPGATAEFGFCAAG	14	
Sbjct	450	QASGVVDYNRILAPGATAEFGFCAAG	474	

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]				
Score = 157 bits (398), Expect = 2e-37				
Identities = 75/75 (100%), Positives = 75/75 (100%), Gaps = 0/75 (0%)				
Frame = -3				
Query	538	WVGCHPNMGKIFFYDSENPPASEVLRIQNLITEEPKVTQVYAENGTVLQGSIVASVYKKG	359	
Sbjct	281	WVGCHPNMGKIFFYDSENPPASEVLRIQNLITEEPKVTQVYAENGTVLQGSIVASVYKKG	340	
Query	358	LLIGTVFHKALYCEL	314	
Sbjct	341	LLIGTVFHKALYCEL	355	

Figura 29. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com CBM2 da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador SP6.

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]				
Score = 488 bits (1257), Expect = 1e-136				
Identities = 235/238 (100%), Positives = 235/238 (100%), Gaps = 0/238 (0%)				
Frame = +3				
Query	3	ALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGITGSEDMEILPNGLAFISSGLMYPGI	182	
Sbjct	15	ALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGITGSEDMEILPNGLAFISSGLMYPGI	74	
Query	183	KSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDEDNAMYLVLVNH	362	
Sbjct	75	KSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDEDNAMYLVLVNH	134	
Query	363	PDASTVELFKFQEEKSLHLKLTIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYGTNDHYFLDPYLQSW	542	
Sbjct	135	PDASTVELFKFQEEKSLHLKLTIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYGTNDHYFLDPYLQSW	194	
Query	543	EMYLGLAWSYVYVYSPSEVRVVAEGFDFANGINISPDGKVVYIAELLANKIHVYEHHA	716	
Sbjct	195	EMYLGLAWSYVYVYSPSEVRVVAEGFDFANGINISPDGKVVYIAELLANKIHVYEHHA	252	

Figura 30. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador 5PON1.

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]			
Score = 306 bits (783), Expect = 1e-81			
Identities = 148/148 (100%), Positives = 148/148 (100%), Gaps = 0/148 (0%)			
Frame = +2			
Query	2	YSPSEVRVVAEGFDFANGINISPDGKYVYIAELLAHKIHVYEKHANWTLTPLKSLDFNTL	181
Sbjct	208	YSPSEVRVVAEGFDFANGINISPDGKYVYIAELLAHKIHVYEKHANWTLTPLKSLDFNTL	267
Query	182	VDNISVDPETGDLWVGCHPNGMKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTV	361
Sbjct	268	VDNISVDPETGDLWVGCHPNGMKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTV	327
Query	362	LQGSTVASVYK GKLLIGTVFHKALYCEL	445
Sbjct	328	LQGSTVASVYK GKLLIGTVFHKALYCEL	355

GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]			
Score = 160 bits (404), Expect = 4e-38			
Identities = 74/74 (100%), Positives = 74/74 (100%), Gaps = 0/74 (0%)			
Frame = +2			
Query	2	ITPISAGFGIKVIPDSTWNGGYCNRVQVINIGTASGNWSISLIVTGTIVNNAWNVIWSQSG	181
Sbjct	387	ITPISAGFGIKVIPDSTWNGGYCNRVQVINIGTASGNWSISLIVTGTIVNNAWNVIWSQSG	446
Query	182	TTLQASGVVDYNRTL	223
Sbjct	447	TTLQASGVVDYNRTL	460

Figura 31. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com as sequências do CBM2 da PON1 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento do produto de fusão PON1-CBM2, mini preparação 1, com o iniciador 3CBM.

Portanto, estes resultados mostram que a etapa de construção de segmentos de DNA que codificam as proteínas quiméricas appA-CBM2 e PON1-CBM2 foi concluída com sucesso.

A partir deste ponto passaremos a tratar separadamente da produção e caracterização das proteínas quiméricas, iniciando pela appA-CBM2 e em seguida passando para PON1-CBM2.

3.7. Expressão de appA e appA-CBM2 em *E. coli* BL21-DE3

Para a expressão de appA, appA-CBM2 e CBM2 em BL21-DE3 escolheu-se o vetor de expressão pT7-7, por estar disponível no nosso laboratório e ter demonstrado eficiência em processos anteriores. Sendo assim, a primeira etapa foi a transferência dos insertos que codificam appA, appA-CBM2 e CBM2 do pGEM-T Easy para o pT7-7 através da digestão com enzimas de restrição e ligação no vetor de expressão. Em seguida foi realizado um PCR com os plasmídeos para conferir a presença dos insertos no vetor pT7-7 (Figura 34).

Figura 32. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR dos segmentos que codificam appA, appA-CBM2 e CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raias 1. Inseto appA presente no plasmídeo pT7-7 (~1.400 pb); Raias 2. Inseto appA-CBM2 presente no plasmídeo pT7-7 (~1.700 pb); Raias 3. Inseto CBM2 presente no plasmídeo pT7-7 (~300 pb).

Em seguida os plasmídeos pT7-7 foram sequenciados para confirmar a integridade dos insertos (Figuras 33 e 34).

gb AAN28334.1 AppA [Escherichia coli]	
Length=432	
Score = 342 bits (878), Expect = 7e-93	
Identities = 169/171 (98%), Positives = 169/171 (98%), Gaps = 0/171 (0%)	
Frame = +3	
Query 24	QSFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTPDWPTWPKLGLWLTFRGG 203
Sbjct 15	QSFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTPDWPTWPKLGLWLTFRGG 74
Query 204	ELIAYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPSGQVVAIIADVDERTKTGEAFAAGLAPDCAITV 383
Sbjct 75	ELIAYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPSGQVVAIIADVDERTKTGEAFAAGLAPDCAITV 134
Query 384	HTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAF 536
Sbjct 135	HTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAF 185

Figura 33. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA com o iniciador 5PPA.

gb AAN28334.1 AppA [Escherichia coli]	
Length=432	
Score = 181 bits (460), Expect = 1e-44	
Identities = 99/99 (100%), Positives = 99/99 (100%), Gaps = 0/99 (0%)	
Frame = -3	
Query 298	FEVARSRATPLLDLIKALTTPHPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNlanlggalelnWTL 119
Sbjct 283	FEVARSRATPLLDLIKALTTPHPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNLANLGGALElnWTL 342
Query 118	PGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQWIQVSLVFQTLQQ 2
Sbjct 343	PGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQWIQVSLVFQTLQQ 381

GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]	
Score = 160 bits (404), Expect = 4e-38	
Identities = 74/74 (100%), Positives = 74/74 (100%), Gaps = 0/74 (0%)	
Frame = +2	
Query 2	TTPSAGFGIKVIPDSTWNGGVCNVRVQVINTGTASGNWSISLTVIGTVNNAWNVIWSQSG 181
Sbjct 387	TTPSAGFGIKVIPDSTWNGGVCNVRVQVINTGTASGNWSISLTVIGTVNNAWNVIWSQSG 446
Query 182	TTLQASGVVDYNRTL 223
Sbjct 447	TTLQASGVVDYNRTL 460

Figura 34. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência da appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA-CBM2 com o iniciador 3cbm.

Posteriormente, dada à ausência de mutações nos insertos, os plasmídeos foram utilizados para transformar BL21-DE3. As colônias transformadas foram empregadas na produção das proteínas recombinantes utilizando 6 h de indução na temperatura 37°C. As amostras de células não induzidas e induzidas quanto à expressão de appA nativa, appA-CBM2 e CBM2 foram testadas por SDS-PAGE (Figura 35).

Figura 35. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) realizada com amostras de cultura não induzida (N.I.) e induzida (I.) a expressar appA, appA-CBM2 e CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa Prestained SDS-PAGE Standard Low Range (BioRad); Raias 1 e 2. Fusão appA-CBM; Raias 3 e 4. Enzima appA nativa; e Raias 5 e 6. CBM.

A princípio não foi observada uma banda diferente ou mais pronunciada na região de massa molecular relativa da appA-CBM2 (~57 kDa), da appA (~47 kDa) ou do CBM2 (~10 kDa) quando são comparadas as amostras não induzidas (N.I) e induzidas (I.).

Assim, decidiu-se aumentar o tempo de indução para 24 horas e a temperatura para 37°C. Esse procedimento foi realizado com as colônias transformadas com o vetor para expressão de appA-CBM2 e appA nativa (Figuras 36 e 37, respectivamente).

Figura 36. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) realizada com amostras de cultura não induzida (N.I.) e induzida (I.) a expressar appA nativa e appA-CBM2. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa Prestained SDS-PAGE Standard Low Range (BioRad); Raias 2 a 4. Cultura expressando appA-CBM2 com até 24h indução; Raias 5. Porção solúvel do lisado.

Figura 37. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) realizada com amostras de cultura não induzida (N.I.) e induzida (I.) a expressar appA nativa. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa Prestained SDS-PAGE Standard Low Range (BioRad); Raias 2 a 4. Cultura expressando appA nativa com até 24h indução; Raias 5. Porção solúvel do lisado.

Novamente não foi observada a presença da proteína induzida, talvez devido a um “vazamento” de produção das proteínas recombinantes desde tempos iniciais ou então porque o acúmulo de appA nativa e appA-CBM2 seja deletério para as bactérias. Assim, optamos por tentar detectar a atividade das enzimas recombinantes, supondo que elas estariam presentes, mas que não teriam se acumulado significativamente.

3.8. Atividade *appA*

Foram testadas as atividades enzimáticas de fosfatase para lisados de bactérias *æs* induzidas a produzirem *appA*, *appA*-CBM2 e CBM2 e também os controles transformados com pT7-7 sem inserto e pT7-7 contendo sequência codificadora para uma beta-glicosidase que passaram pelo mesmo processo de indução (Figuras 38).

Figura 38. Ensaio de atividade enzimática. 10 μL de lisado de células expressando *appA* (■); *appA*-CBM2 (●); CBM2 (Δ); transformadas com pT7-7 sem inserto (◇) e expressando beta-glicosidase (○).

A hidrólise espontânea do substrato durante o experimento foi da ordem de 0,00028 μmol por minuto, cerca de 10% do valor obtido nos experimentos contendo lisado.

As atividades observadas foram 0,24 U/ μL para *appA*, 15 U/ μL *appA*-CBM2, 0,13 U/ μL para CBM2, 0,16 U/ μL para pT7-7 sem inserto e 0,15 U/ μL para “beta-glicosidase”. A significativa diferença observada para amostra contendo *appA*-CBM2 em relação aos controles negativos indicaram que este material poderia ser usado para verificar a funcionalidade de CBM2 em testes de ligação em celulose.

3.9. Ensaio de ligação em diferentes tipos de celulose

As amostras de lisado appA-CBM2 e appA, como controle negativo, foram utilizadas em ensaio de ligação a celulose. A tabela 5 abaixo resume os dados obtidos.

	appA	appA-CBM2
ATIVIDADE INICIAL TOTAL (U)	3,40	0,89
SOBRENADANTE 1	3,20	0,40
SOBRENADANTE 2	0,10	0,00
SOBRENADANTE 3	0,00	0,00
SOBRENADANTE TOTAL (U)	3,30	0,40
RECUPERAÇÃO SOBRENADANTE (U)	97,1%	44,9%
RECUPERAÇÃO SEDIMENTO (U)	2,9%	55,1%

Tabela 5. Atividade de fosfatase (U) presente em diferentes frações do ensaio de ligação de appA e appA-CBM2 em celulose cristalina (Avicel PH101).

Nota-se que a quantidade de appA-CBM2 recuperada no sedimento final é significativamente maior do que a recuperação de appA. Este resultado sugere que além de atividade de fosfatase appA-CBM2 também tem atividade de ligação à celulose.

Portanto, apesar de não permitir a produção de grandes quantidades, o sistema bacteriano é eficiente para a produção de appA-CBM2 ativa. Contudo, para a caracterização desta enzima quimérica foi necessário ainda separá-la da appA bacteriana.

3.10. Expressão e purificação de appA e appA-CBM2 em *E. coli* BL21(DE3) utilizando o vetor pAE

As sequências que codificam para appA e appA-CBM2 clonadas no vetor pT7-7 foram transferidas para o plasmídeo pAE. Foi escolhido o plasmídeo pAE (Ramos et al. 2004), um vetor derivado do sistema pET de tamanho pequeno e de grande número de cópias por célula (200 – 250 cópias), para a inclusão de um marcador de 6 histidinas na porção N-terminal da proteína expressa, o que possibilita o isolamento das proteínas recombinantes.

Como o CBM2 será expresso na porção C-terminal da proteína, a cauda de seis His será montada na porção N-terminal e, desta forma, foi necessária a retirada do peptídeo sinal da appA para o espaço periplasmático. Foi construído iniciador específico para essa transferência, 5APPAMATXHOI. Sendo assim, as sequências que codificam appA e appA-CBM2 foram amplificadas em PCR, eficientemente digeridos utilizando enzimas *XhoI* e *EcoRI* da linha Fast Digest (Fermentas) e a seguir ligados ao vetor pAE linearizado com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação foi usada para transformar bactérias competentes, plasmídeos foram extraídos das colônias transformadas e finalmente foi realizada uma amplificação por PCR com os plasmídeos para conferir a presença dos insertos (Figura 39).

Figura 39. Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos clonados no plasmídeo pAE. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia 1. Inseto da região codificadora de appA (~1.600 pb); Raia 2. Inseto da região codificadora de appA-CBM2 (~1.900 pb).

Os vetores pAE contendo inserto também foram sequenciados para garantir a integridade dos segmentos codificando para appA e appA-CBM2 (Figuras 40 e 41)

gb AAN28334.1 AppA [Escherichia coli]			
Length=432			
Score = 342 bits (878), Expect = 7e-93			
Identities = 169/171 (98%), Positives = 169/171 (98%), Gaps = 0/171 (0%)			
Frame = +3			
Query	24	QSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDPDAWPTWPKLGWLTFRGG	203
Sbjct	15	QSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDPDAWPTWPKLGWLTFRGG	74
Query	204	ELIAYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPQSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITV	383
Sbjct	75	ELIAYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPQSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITV	134
Query	384	HTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAF	536
Sbjct	135	HTQADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAF	185

Figura 40. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do inserto do vetor pAE codificando para appA com a sequência de appA disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA com o iniciador 3CBMMATXHOI.

GENE ID: 946206 appA phosphoanhydride phosphorylase [Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (Over 10 PubMed links)			
Score = 405 bits (1042), Expect = 6e-138			
Identities = 213/213 (100%), Positives = 213/213 (100%), Gaps = 0/213 (0%)			
Frame = +1			
Query	199	LKVSADNVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQWNILLSLHNAQFYLL	378
Sbjct	220	LKVSADNVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQWNILLSLHNAQFYLL	279
Query	379	QRTPEVARSRATPLLDLIKALTTPHPPQKQAYGVTLPSTVLFIAGHDTNLANLGGALELN	558
Sbjct	280	QRTPEVARSRATPLLDLIKALTTPHPPQKQAYGVTLPSTVLFIAGHDTNLANLGGALELN	339
Query	559	WTLPGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQNIQVSLVFQTLQMRDKTPLSLNTPPGEVKL	738
Sbjct	340	WTLPGQPDNTPPGGELVFERWRRLSDNSQNIQVSLVFQTLQMRDKTPLSLNTPPGEVKL	399
Query	739	TLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL	837
Sbjct	400	TLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL	432

ref NP_640965.1 G cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]			
Length=474			
GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306] (10 or fewer PubMed links)			
Score = 157 bits (397), Expect = 3e-41			
Identities = 73/73 (100%), Positives = 73/73 (100%), Gaps = 0/73 (0%)			
Frame = +1			
Query	886	SAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVINTGTASGNWSISLIVTGTVNNAWNVTWSQSGTTLQ	1065
Sbjct	391	SAGFGTKVIPDSTWNGGYCNRVQVINTGTASGNWSISLIVTGTVNNAWNVTWSQSGTTLQ	450
Query	1066	ASGVDYNRILAPG	1104
Sbjct	451	ASGVDYNRILAPG	463

Figura 41. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do inserto do vetor pAE codificando para appA-CBM2 com a sequência de appA e CBM2 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da appA-CBM2 com o iniciador 3cbm.

Para a expressão células BL21(DE3) competentes foram transformadas com vetor pAE contendo insertos que codificam para appA e appA-CBM2, separadamente. As amostras de células não induzidas e induzidas quanto à expressão de appA e appA-CBM2 foram testadas por SDS-PAGE (Figura 42). Como antes observado, as proteínas induzidas não se

acumulam de forma evidente. Interessantemente, outro trabalho que também tratou da expressão de appA recombinante em bactérias não apresentou uma figura com comparação das bactérias induzidas e não induzidas (Ostanin et al. 1992).

Figura 42. Eletroforese em gel de policrilamida 12 % SDS. Padrão Sigma Marker High Range, Cultura não induzida (NI), cultura induzida 3 horas (IND 3h), lisado bacteriano (Lisado), appA purificada a partir do lisado em coluna de afinidade (appA) e appA-CBM2 purificada a partir do lisado em coluna de afinidade (appA-CBM2).

Porém, utilizando a “cauda de His” foi possível isolar appA e appA-CBM2 através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-agarose (Figuras 43 e 44), conforme evidenciado em análise em SDS-PAGE (Figura 42).

Figura 43. Cromatografia de afinidade em coluna Ni-agarose do lisado de bactérias induzidas a expressarem appA. Atividade específica calculada para cada tubo eluído (1 mL) na purificação de appA a partir do lisado bacteriano. A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA e atividade enzimática com p-nitrofenil fosfato. A seta indica o final da lavagem e o início da eluição da amostra com Imidazol 0,200 M.

Figura 44. Cromatografia de afinidade em coluna Ni-agarose do lisado de bactérias induzidas a expressarem appA-CBM2. Atividade específica calculada para cada tubo eluído (1 mL) na purificação de appA-CBM2 a partir do lisado bacteriano. A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA e atividade enzimática com *p*-nitrofenil fosfato. A seta indica o final da lavagem e o início da eluição da amostra com Imidazol 0,200 M.

As atividades de fosfatase encontradas anteriormente a eluição com Imidazol 0,200 M foram atribuídas à appA bacteriana.

3.11. Caracterização de appA e AppA-CBM2 purificada

Com appA e appA-CBM2 purificadas, procedeu-se então sua caracterização, inicialmente através do ensaio para verificar o efeito do substrato *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) na atividade fosfatásica (Figura 45).

Figura 45 – Efeito de pNPP na atividade enzimática de (A) appA e (B) appA-CBM2.

O K_m observado nos dois casos foi de 2,8 mM com desvio menor que 8 %, indicando que a presença do domínio CBM2 não interferiu no funcionamento do domínio appA.

Então, a partir das amostras purificadas seguiu-se ensaio de ligação a celulose cristalina (Avicel PH101). As amostras de appA purificada foram utilizadas como controle e ensaiadas simultaneamente as amostras de appA-CBM2. O primeiro ensaio foi realizado variando-se a quantidade inicial de Avicel e mantendo-se a quantidade inicial em unidades de enzima (5U) (Figura 46).

Figura 46. Unidades de enzima ligadas em Avicel por quantidade de Avicel em mg. Unidades de appA-CBM2 ligada (-●-) por mg de Avicel, unidades de appA ligada (-○-) por mg de Avicel, a linha representa um ajuste de curva de saturação da ligação appA-CBM2 por mg de Avicel.

Os resultados demonstram um perfil de saturação da ligação de appA-CBM2 com relação à quantidade inicial de celulose, mg de Avicel. Este perfil não é resultado de “ligação inespecífica”, uma vez que appA nativa não se liga significativamente à Avicel em nenhuma das concentrações testadas. Os parâmetros de ajuste dos dados experimentais em um “modelo michaeliano” com auxílio do software Microcal Origin 8 foram: “ B_{max} ” = 4,45 U/μg ±

0,22 e " K_b " = 26 mg $\pm$ 3, onde " B_{max} " representa a quantidade de enzima na saturação máxima (ligação máxima) e " K_b " representa a quantidade de Avicel para se obter metade da ligação máxima.

Passou-se então a determinação do efeito do pH no funcionamento de CBM2. Assim, fixou-se a quantidade inicial de Avicel em 50 mg e manteve-se a quantidade inicial em 5 U de enzima e incubou-se as amostras durante a noite em diferentes pHs. Em seguida ensaios foram realizados em tampão glicina/HCl 0,25 M pH 2,5, condição ótima para atividade da appA. Paralelamente os experimentos foram executados na ausência de Avicel e a atividade fosfatásica remanescente foi determinada em cada pH (Figura 47).

Figura 47. (A) Atividade relativa remanescente (%) de appA-CBM2 após incubação em diferentes pHs; (B) Atividade relativa ligada (%) em 50 mg de Avicel incubados em diferentes pHs. Foram usados: tampão Glicina/HCl 0,025 M pH 2,5, tampão Acetato 0,025 M pH 4,5, tampão MES 0,025 M pH 6,5, tampão Tris/HCl 0,025 M pH 8,5 e tampão Glicina/NaOH pH 10.

Os resultados da ligação em diferentes condições de pH demonstram que a ligação de appA-CBM2 à Avicel é favorecida em valores de pH próximos de 2,5, acima desse valor claramente ocorre diminuição na afinidade. Contudo, esta queda não está relacionada à inativação do domínio appA, cuja atividade foi usada como indicador de ligação, pois como visto o perfil do efeito do pH na atividade remanescente de appA não é paralelo ao efeito do pH na atividade de ligação de CBM2. Deve ser comentado que a mudança de tampão nos diferentes pHs introduz o risco de diferenças quantitativas de força iônica que poderiam influenciar na ligação de CBM2 à celulose. Entretanto, um padrão geral de dependência da ligação ao pH se torna claro e semelhante aos resultados obtidos na literatura para outros domínios de ligação a celulose (Linder et al. 1998).

Em resumo, a proteína quimérica appA-CBM2 apresenta seus dois “domínios” inteiramente funcionais, demonstrando que a estratégia de construção desta enzima inédita na natureza foi inteiramente bem sucedida.

3.12. *Expressão de PON1 em Píchia Pastorís*

A utilização da levedura *Pichia pastoris* como um sistema de expressão apresenta inúmeros benefícios, pois combina as vantagens dos sistemas de expressão de procariotos (expressão em altos níveis, fácil aumento de escala e meios de crescimento baratos) e de eucariotos (capacidade de realizar modificações pós-traducionais) (Cereghino & Cregg, 2000). Assim, considerando que se buscava a produção de uma proteína humana, o sistema em *P. pastoris* foi inicialmente escolhido.

A primeira parte do trabalho foi a transferência do inserto de DNA que codifica para PON1 e PON1-CBM2 do plasmídeo estoque pGEM-T Easy (Figuras 28 a 31) para o vetor

de expressão pPIC9. Concluída esta etapa foi realizado um PCR com os plasmídeos pPIC9 obtidos para conferir a presença dos insertos (Figura 48).

Figura 48. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR da região codificadora de PON1 (~1.500 pb). Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia +. Controle positivo PON1 clonado pGEM-T; Raias 1. Inseto PON1 presente no plasmídeo pPIC9.

Após a confirmação do inserto em pPIC9 procedeu-se a transformação em *Pichia pastoris* por eletroporação. As colônias de *Pichia pastoris* foram testadas quanto à presença da sequência de DNA que codifica para PON1 nativa através de amplificação por PCR modificada (tempo de desnaturação inicial de 10 minutos) (Figura 49). Desta forma, foram escolhidas, para a fase de expressão, colônias positivas quanto à presença dos insertos integrados ao genoma de *Pichia pastoris*.

Figura 49. Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR da região codificadora de PON1 (~1.500 pb). Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia +. Controle positivo PON1 clonado pGEM-T; Raias 1, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 18 e 20. Inseto PON1 integrante ao DNA; Raias 2, 3, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 e 19. Ausência de inseto PON1 integrante ao DNA.

As colônias que apresentaram insertos (raias 1, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 18 e 20) foram, então, selecionadas para indução da produção de PON1. Após indução por 24 h em meio contendo metanol não foi detectada nenhuma atividade de paraoxonase no meio de cultura. Várias tentativas frustradas de produção de PON1 ativa seguiram-se com tempos de indução de até 170 horas.

Analisando a literatura sobre a atividade paraoxonase da PON1 verificou-se que o Ca^{2+} é importante para a catálise (Harel et al. 2004), por isso, foi verificada a presença de cálcio em todos os tampões. Outro fator importante é que a presença de fosfato tem ação inibidora sobre fosfatases (Chaimovich and Nome 1970), sendo assim, substituiu-se o tampão fosfato 0,1 M do meio de indução (BMM) por tampão Tris 0,05 M pH 8,0 ou tampão MES 0,05 M pH 6,0 e foram cultivadas, nestas novas condições, cinco colônias transformadas com o vetor contendo inserto para PON1. As colônias foram induzidas por 170 h, o que não resultou em atividade de paraoxonase. O resultado foi confirmado em gel de SDS-PAGE pela ausência da proteína no meio de cultura (dado não mostrado).

A literatura registra a expressão de PON1 em *Pichia pastoris* (Albeck et al. 2005), como parte de um projeto de determinação da estrutura tridimensional de proteínas relacionadas à saúde humana pelo “The Israel Structural Proteomics Center” (ISPC). Entretanto, entrando em contato com o autor do artigo fomos informados de que a PON1 utilizada no trabalho é mutante, contendo cerca de 30 mutações aleatórias, dado que não consta na publicação. De fato, outro trabalho cita que é possível expressar PON1 contendo mutações diversas e aleatórias em *E. coli* (Aharoni et al. 2005).

Ficou claro que, apesar da levedura ser um eucarioto, ela se mostrou incapaz de expressar a paraoxonase humana PON1. Em 2008 foi publicado um artigo demonstrando

pela primeira vez na literatura a expressão de PON1 nativa em *E. coli* (Stevens et al. 2008). O sucesso se deveu à introdução do plasmídeo pRARE (Invitrogen) que codifica tRNAs para códons mais comumente encontrados no sistema de transcrição de mamífero (Stevens et al. 2008).

3.13. *Expressão de PON1 nativa e PON1-CBM2 em E. coli utilizando o vetor pAE*

As sequências que codificam para PON1 e PON1-CBM2 foram clonadas no vetor pAE (Ramos et al. 2004) para a inclusão de um marcador de 6 histidinas na porção N-terminal da proteína, possibilitando o isolamento das proteínas recombinantes.

Sendo assim, as sequências que codificam PON1 e PON1-CBM2 foram amplificadas em PCR, eficientemente digeridas utilizando as enzimas *Xho*I e *Eco*RI da linha Fast Digest (Fermentas) e a seguir ligadas ao vetor pAE linearizado com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação foi usada para transformar bactérias competentes, plasmídeos foram extraídos das colônias transformadas e finalmente foi realizada uma amplificação por PCR com os plasmídeos para conferir a presença dos insertos (Figura 50).

Figura 50. Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos clonados no plasmídeo pAE. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia 1. Inseto da região codificadora de PON1 (~1.500 pb); Raia 2. Inseto da região codificadora de PON1-CBM2 (~1.800 pb).

Os vetores pAE contendo inserto também foram sequenciados para garantir a integridade dos segmentos codificando para PON1 e PON1-CBM2 (Figuras 51 e 52)

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]				
Score = 444 bits (1142), Expect = 2e-123				
Identities = 218/218 (100%), Positives = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)				
Frame = +2				
Query	5	LIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGIETGSEDMEILPNGLA	184	
Sbjct	4	LIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVLPNCNLVKGIETGSEDMEILPNGLA	63	
Query	185	FISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDE	364	
Sbjct	64	FISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDE	123	
Query	365	DNAMYLLVVNHPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKTIKHLKLLPNLNDIVAVGPEHFGTND	544	
Sbjct	124	DNAMYLLVVNHPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKTIKHLKLLPNLNDIVAVGPEHFGTND	183	
Query	545	HYFLDPYLQSWEMYGLAWSYVVYSPSEVRVVAEGFD	658	
Sbjct	184	HYFLDPYLQSWEMYGLAWSYVVYSPSEVRVVAEGFD	221	

Figura 51. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de PON1 disponível no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da PON1 com o iniciador 5PONPAEXHOI.

GENE ID: 5444 PON1 paraoxonase 1 [Homo sapiens]				
Score = 157 bits (398), Expect = 2e-37				
Identities = 75/75 (100%), Positives = 75/75 (100%), Gaps = 0/75 (0%)				
Frame = -3				
Query	538	WVGCHPNGMKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTVLQGSTVASVYKKG	359	
Sbjct	281	WVGCHPNGMKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTVLQGSTVASVYKKG	340	
Query	358	LLIGTVFHKALYCEL	314	
Sbjct	341	LLIGTVFHKALYCEL	355	

GENE ID: 1154683 engXCA cellulase [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]				
Score = 182 bits (463), Expect = 7e-45				
Identities = 85/85 (100%), Positives = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%)				
Frame = -3				
Query	268	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYNRVQVINTGTASGNWSISLTVTGTVNNAWNVTWSQSGTTL	89	
Sbjct	390	PSAGFGTKVIPDSTWNGGYNRVQVINTGTASGNWSISLTVTGTVNNAWNVTWSQSGTTL	449	
Query	88	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG	14	
Sbjct	450	QASGVVDYNRTLAPGATAEFGFCAAG	474	

Figura 52. Alinhamento da sequência de aminoácidos obtida a partir do polinucleotídeo amplificado com a sequência de fusão PON1-CBM2 disponíveis no banco de dados do NCBI. Resultado do sequenciamento da PON1-CBM2 com o iniciador 3cbm.

Considerando que para expressão de PON1 são necessários RNAt raros em *E.coli* (Stevens et al. 2008), as sequências de DNA que codificam PON1 e PON1-CBM2 clonadas no vetor de expressão pAE foram introduzidos em três cepas de *E. coli* com potencial para expressar estas enzimas: RIL ou RP que contém 4 tipos de RNAt raros diferentes em cada cepa; RG que contém 7 tipos de RNAt raros e promove a formação de ponte dissulfeto; e Arctic que permite indução a baixas temperaturas. Além disso, frente às prováveis dificuldades optou-se por concentrar os esforços na expressão de PON1, lembrando que a

padronização de um procedimento para sua expressão seria prontamente aplicável para PON1-CBM2.

Primeiramente foram transformadas as cepas RP e RIL, a cepa RP mostrou-se muito mais eficiente para expressar PON1. Portanto, seguimos com a cepa RP. Na tentativa de evitar produção da proteína recombinante antes da adição do indutor (“vazamento”), passamos a utilizar 0,5 % de glicose durante o crescimento bacteriano (Figura 53).

Figura 53 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias da cepa RP transformadas com vetor para expressão de PON1. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I) e porção solúvel (PS). A seta indica PON1 recombinante.

Verifica-se a presença da proteína recombinante induzida com cerca de 40 kDa, porém mesmo utilizando a glicose no pré-inóculo e inóculo pode-se notar que a amostra não-induzida (NI) já possui quantidade apreciável de proteína recombinante. Outra observação é que mesmo após todos os cuidados com o meio, e a temperatura de indução, a porção solúvel do lisado não apresentou a banda referente à PON1 ou atividade paraoxanásica.

Frente a estes resultados e considerando que para proteínas que contém diversos resíduos de cisteína, como a PON1, a formação de pontes de dissulfeto impróprias no ambiente redutor do citoplasma da *E. coli* contribui para o dobramento incorreto e a formação de corpos de inclusão, passou-se à utilização da cepa Rosetta-gami (RG).

Como a cepa RG apresenta crescimento muito lento em LB-ágar (demora cerca de dois dias para formar colônias) e se estocada em geladeira perde a capacidade de crescimento, optou-se por trabalhar com colônias recém-transformadas e cultivadas em 2_xTY ágar (meio no qual as colônias crescem em aproximadamente 20 horas). Após a transformação com o vetor codificando para PON1, verificou-se a presença de inserto através de reação de PCR realizada com 2 µL do pré-inóculo (Figura 54).

Figura 54 - Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos clonados no plasmídeo pAE a partir diferentes colônias. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1 (~1.400 pb); Raia 1-3. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1 em colônias RG; Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1-CBM2 (~1.700 pb); Raia 4-6. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1-CBM2 em colônias RG.

Foram selecionadas colônias de RG que se mostraram positivas para a presença de inserto que codifica PON1.

Foram várias as tentativas até conseguir a melhor condição possível para expressão de PON1. Assim para evitar a produção de PON1 durante a etapa de crescimento (“vazamento”), as bactérias RG foram cultivadas a 25°C com a adição de glicose ao meio de cultura na concentração final de 1 %. Quando as células atingiram A_{600nm} de 0,450 a 0,650 foram centrifugadas e um novo meio sem glicose foi adicionado e, então, começou a indução com IPTG na temperatura de 20°C.

Para confirmar a identidade de PON1 recombinante foi realizado *western blot* usando um anticorpo comercial anti-*His tag*. Porém, mesmo após todos os cuidados acima citados, ao fazer a lise celular, a porção solúvel não apresentava a banda da PON1 e nem atividade paraoxonásica, apenas pode-se detectar a presença de PON1 no lisado e na fração precipitada do lisado bacteriano (Figura 55).

Figura 55 – A. Eletroforese em gel de policrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias RG transformadas com vetor de expressão que codifica PON1. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel (PS) e porção insolúvel (PI). Pode-se visualizar a banda de PON induzida com cerca de 40 KDa na amostra induzida e na porção insolúvel (seta vermelha). B. Coloração com Ponceau S após transferência para membrana de nitrocelulose. C. Presença de proteína recombinante contendo marcador de 6xHis.

Portanto, novamente a PON1 foi produzida pelo sistema *E. coli*, porém, de forma insolúvel. Buscando uma maneira de recuperá-la foi feita uma busca de informações de renaturação de proteínas no site “refold” (Figura 56).

Figura 56 – Pesquisa por metodologias para renaturar PON1 a partir dos corpos de inclusão. Ferramenta “Refold” disponível no endereço: <http://refold.med.monash.edu.au/> (Buckle et al. 2005; Chow et al. 2006a; Chow et al. 2006b).

Foi localizada uma metodologia que se referia à recuperação a partir de corpos de inclusão da paraoxonase 3 (PON3) expressa em cepa RG (Amitai et al. 2006). Como PON1 e PON3 possuem estrutura primária e atividade bastante similares (Figura 57) poderia haver uma chance de o método funcionar para a PON1.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

paraoxonase1  MAKLIATLLGMLALFRNHQSSYQTRLNALREVQVPELPNCNLVKGIGTGSSEDLLEILPN 60
paraoxonase3  MGKLVALLVGLSLVGEMLAFRERVNASREVEPVEFENCHLIEELESSESSEDIDILPS 60
               *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
               :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

paraoxonase1  GLAFISSGLKYPGKISFNPNPSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTF 120
paraoxonase3  GLAFISSGLKYPGMPNFAPDEPGKIFLMDLNEQNPAQALEISGG-FDKELFNPHGISIF 119
               *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

paraoxonase1  TDEDNAMYLLVNHHPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKTIHKKLLPNLNDIVAVGPEHFY 180
paraoxonase3  IDKDNITVLYVNHHPMKSTVEIFKFEEQQSLVYLKTIKHELLKSVNDIVVLGPEQFY 179
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

paraoxonase1  TNDHYFLDPYLSWEMYGLAWSYVYVSPSEVRVVAEGDFANGINISPDGKYVYIAEL 240
paraoxonase3  TRDHYFTNSLLSFFEMILDLRWITYVLFYSPREVKVVAKGFCANGITVSADQKYVYVADV 239
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

paraoxonase1  LAHKIHVYEKHNWILTPLKSLDFNTLVNLSVDPETGLWVGCHPNMGKIFFYDSENPP 300
paraoxonase3  AAKNIHIMEKHDNWDLTQLKVIQLGLVDNLTVDPATGDILAGCHPNPMKLLNYPEDPP 299
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

paraoxonase1  ASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTVLQGSTVASVYKGLLIGTVFHKALYCEL 355
paraoxonase3  GSEVLRIQNVLSKPRVSVYANNNGSVLQGSTVASVYHGLILIGTVFHKALYCEL 354
               *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 57 – Alinhamento de sequência de aminoácidos das enzimas PON1 e PON3. Em destaque 3 resíduos de cisteína conservados (setas vermelhas). Ferramenta disponível no endereço: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (Goujon et al.; Larkin et al. 2007)

O procedimento consiste na lise celular através de 20 pulsos de 15 segundos de sonicação com 15 segundos de intervalo no gelo, realizados em tampão de lise contendo 1 % de Triton X-100. Segundo o artigo, cerca de 10 % de PON3 era recuperada ativa na porção solúvel. Posteriormente, a porção insolúvel é lavada três vezes com tampão contendo 0,1% de Triton-X100 e ureia 2 M, seguida de mais uma lavagem somente com tampão contendo 0,1% de Triton-X100; essas etapas são realizadas com o intuito de isolar os corpos de inclusão. Após a recuperação dos corpos de inclusão, é realizada uma extração seriada com tampão contendo 2,4 ditiotretol (DTT) e concentrações de Triton X-100 de 2 %, 4 %, 6 %, 8 % e 10 % até que a maior parte dos corpos de inclusão esteja dissolvida. Para PON3 a solubilização ocorreu com 4 % de Triton X-100 (Lu et al. 2006).

Contudo, a metodologia se mostrou ineficiente para PON1, pois apesar de haver PON1 na porção solúvel (Figura 58), não foi encontrada atividade enzimática sobre paraoxon. A extração com detergente a partir dos corpos de inclusão não se mostrou eficiente. Apenas, verificou-se a extração de parte de PON1 nas lavagens com ureia 2 M (Figura 58).

Figura 58 – Eletroforese em gel de policrilamida 12 % SDS. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa RG. Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel (PS) e porção insolúvel (PI), três lavagens sucessivas com Tris/HCl 0,020 M, NaCl 0,010 M, CaCl₂ 0,002 M, Triton 0,1 % e Ureia 2 M (U2), uma lavagem com Tris/HCl 0,02M, NaCl 0,010 M, CaCl₂ 0,002 M, Triton 0,1 % (Tp) e a primeira extração com Tris/HCl 0,020 M, NaCl 0,010 M, CaCl₂ 0,002 M, DTT 0,020 M e Triton 2 %. As raia que mostram a extração em 4 %, 6 %, 8 % e 10 % de Triton X-100 foram omitidas por não possuir bandas visíveis quando coradas com coomassie blue.

Uma nova indução foi realizada com o intuito de investigar se a proteína presente nos corpos de inclusão poderia ser extraída e renaturada. Os corpos de inclusão formam solubilizados em ureia 8 M e esta amostra foi imobilizada em resina NTA-Níquel. A seguir, um gradiente linear de diluição de ureia foi aplicado na tentativa de renaturar a enzima imobilizada na resina. Essa estratégia é sugerida pelo fabricante da resina (Qiagen) para evitar a agregação durante a renaturação. Logo após PON1 foi eluída com imidazol (Figura 59).

Figura 59 – Eletroforese em gel de policrilamida 12 % SDS. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa RG. Cultura induzida (I), proteínas que não se ligaram na resina de níquel (“flow through”; FT), início, meio e fim do gradiente de diluição de ureia (U4-U10) e eluição com imidazol 0,020 M (Im20), 0,080 M (Im80), 0,100 M (Im100) e 0,200 M (Im200).

A eluição mostrou a pureza da amostra de PON1 após o procedimento de cromatografia de afinidade, porém, as amostras eluídas não apresentaram atividade enzimática. Esse resultado mostrou que é possível purificar a enzima, mas que a sua renaturação é improvável. Assim, o ideal seria obter PON1 ativa na porção solúvel.

Uma observação relevante é a que para PON3 foram induzidos 6 litros de cultura de *E. coli* cepa RG para se detectar enzima ativa na porção solúvel (Lu et al. 2006). Em outro artigo a purificação de PON1 ativa na porção solúvel demandou 12 litros de cultura de *E. coli* cepa SE Eurogentec (Stevens et al. 2008). Assim, é provável que apenas uma pequena parte da PON1 recombinante permaneça na fração solúvel do lisado bacteriano, porém, dependendo do volume da cultura não é o suficiente para se detectar a sua atividade enzimática. De fato, a figura 59 indica presença de PON1 solúvel.

Procurando uma cepa que pudesse expressar a enzima a temperaturas abaixo de 20°C encontramos o sistema de expressão em Arctic. Assim, bactérias Arctic competentes foram transformadas com o vetor pAE codificando para PON1 e PON1-CBM2. Em seguida foram selecionadas as colônias de Arctic que se mostraram positivas para a presença de inserto de DNA que codificam PON1 e PON1-CBM2 (Figura 60).

Figura 60 - Eletroforese em gel de agarose 2 % do produto da amplificação por PCR de insertos codificando PON1 clonados no plasmídeo pAE. Padrão. Marcador de Massa molecular relativa 1 kb DNA Ladder (Fermentas); Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1 (~1.400 pb); Raia 1-7. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1 em colônias de Arctic; Raia PON. Controle positivo, estoque de pAE contendo região codificadora para PON1-CBM2 (~1.700 pb); Raia 8-12. Conferência da presença de inserto da região codificadora para PON1-CBM2 em colônias de Arctic.

Assim, o crescimento e indução em baixa temperatura (10°C), o controle de “vazamento” da proteína recombinante durante as etapas de pré-inóculo e pré-indução através de glicose 1 % no meio de cultura, a redução da concentração de IPTG para 0,25 mM durante a fase de indução e a presença das chaperonas ativas em baixa temperatura produzidas pelas bactérias Arctic, levaram ao controle da expressão de PON1 e finalmente a porção solúvel apresentou uma banda corresponde à PON1 que apresentou atividade de paraoxonase (Figura 61).

Figura 61. Ensaio de Atividade paraoxonase de PON1 na porção solúvel do lisado de Arctic.

Mas, durante a purificação por cromatografia de afinidade em Ni-NTA (Figura 62) a enzima perdeu a atividade.

Figura 62 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias Arctic transformadas com vetor pAE codificando para PON1. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa Arctic. Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel (PS), porção insolúvel (PI) e eluição com imidazol 0,200 M (Im200).

Na tentativa de manter PON1 ativa começamos, então, investigando a melhor condição de lise celular. Foram realizadas quatro lises simultâneas com o mesmo tampão de lise, porém, uma amostra sem detergente, outra com Tergitol 0,1 %, uma terceira com Triton X-100 0,1 % e finalmente com Tween 0,1 %. Este experimento teve o intuito de verificar se algum tipo de detergente poderia estabilizar PON1 ativa em micelas.

Todas as lises extraíram PON1 de forma solúvel e ativa. Sendo assim, realizou-se um estudo de estabilidade dessas amostras. A porção solúvel sem detergente e as outras amostras contendo detergente foram guardadas em geladeira e atividade paraoxonásica foi verificada ao longo do tempo para monitorar a estabilidade de PON1 (Figura 63).

A princípio a amostra de PON1 contendo o detergente tween 20 demonstrou a maior atividade, porém, após uma semana de incubação em geladeira ela estava inativada. As amostras com tergitol e aquela que não recebeu detergente começaram exibindo atividades bastante parecidas, porém no decorrer dos 8 dias a amostra com tergitol inativou-se, enquanto que a amostra sem detergente manteve-se estável. Por fim, a amostra

contendo triton X-100 mostrou-se um pouco mais estável, dentre aquelas que continham detergente, chegando ao oitavo dia de incubação em geladeira com cerca de 50 % da atividade inicial.

Figura 63 – Atividade de Paraoxonase (U/ μ l) durante uma semana de incubação em geladeira em diferentes condições de tampão de lise: sem detergente (■), contendo Tergitol 0,1 % (◆), contendo Triton X-100 0,1 % (▲) e contendo Tween 20 0,1 % (●).

Portanto, os resultados mostraram que PON1 produzida em bactérias Arctic é solúvel, ativa e estável, não explicando o motivo da inativação durante a purificação (Figura 62). Contudo, comparando nossos resultados com a literatura podemos verificar que a expressão de PON1 nativa de forma solúvel e ativa em bactérias havia sido descrita somente uma vez (Stevens et al. 2008). Porém, naquela ocasião foram necessários 12 litros de cultura (cerca de 200g de cultura seca) para a purificação de quantidade apreciável de enzima solúvel ativa, enquanto que nossos resultados foram obtidos utilizando apenas 125 mL de cultura. Portanto, isso mostra que a nossa técnica disponibiliza maior quantidade de enzima solúvel e ativa.

3.14. Caracterização de PON1-CBM2

Utilizando-se o vetor de expressão pAE que codifica a PON1-CBM2 previamente construído (página 78) e introduzido em *E. coli* Arctic (página 85) e aproveitando as condições desenvolvidas para expressão de PON1 em *E. coli* Arctic (página 86), a enzima quimérica PON1-CBM2 foi produzida nesta bactéria. Contudo, considerando que PON1 inativou-se durante a purificação em resina Ni-NTA (Figura 62), optou-se pela utilização do lisado para caracterização de PON1-CBM2. Esta opção é válida uma vez que *E. coli* não possui atividade paraoxonásica e, portanto, este tipo de atividade enzimática pode ser usado como um indicador seguro da presença de PON1 e PON1-CBM2.

Inicialmente foi determinado o efeito da concentração de paraoxon na atividade enzimática de PON1 e PON1-CBM2 (Figura 64).

Figura 64 – Efeito de paraoxon na atividade enzimática de (A) PON1 e (B) PON1-CBM2.

Observou-se que os K_m de PON1 e PON1-CBM2 para paraoxon são similares, $1,31 \pm 0,07$ e $1,36 \pm 0,08$ mM, respectivamente, sugerindo que a presença do domínio CBM2 não afetou função catalítica do domínio PON1.

Posteriormente, buscou-se a caracterização do “domínio” CBM2 através de ensaios de ligação em celulose microcristalina (Avicel) (Figura 65).

Figura 65 – Unidades de enzima ligadas em Avicel por quantidade de Avicel em mg. Unidades de PON1-CBM2 ligado (■) por mg de Avicel e o controle, unidades de PON ligado (□) por mg de Avicel, a linha representa um ajuste de curva de saturação da ligação PON1-CBM2 por mg de Avicel;

Os resultados demonstram um perfil de saturação da ligação de PON1-CBM2 com relação à quantidade inicial de celulose, mg de Avicel. Este perfil não é resultado de “ligação inespecífica”, uma vez que PON1 nativa não se liga significativamente à Avicel em nenhuma das concentrações testadas. Os parâmetros de ajuste dos dados experimentais em um “modelo michaeliano” foram $B_{\max} = 10,3 \pm 0,5$ e $K_b = 27 \pm 3$, onde $B_{\max}$ representa a quantidade de enzima na saturação máxima (ligação máxima) e K_b representa a quantidade de Avicel na qual se obtém metade da ligação máxima. É interessante notar que o K_b de PON1-CBM2 para Avicel é igual aquele de appA-CBM2 (26 mg; Figura 46 – página 73), sugerindo que CBM2 apresenta-se igualmente funcional nestas duas enzimas quiméricas. A comparação com a afinidade deste CBM2 por celulose cristalina na celulase nativa de *Xac* não foi possível, pois esta enzima ainda não foi caracterizada.

Finalmente avaliou-se o efeito do pH na estabilidade de PON1 e na atividade de ligação à celulose de CBM2 (Figura 66).

Figura 66 – (A) Atividade relativa remanescente de PON1-CBM2 em após incubação em diferentes pHs; (B) Atividade Relativa ligada (%) em Avicel em 50 mg inicial de Avicel incubados em diferentes pHs. Foram usados: tampão Glicina/HCl 0,025 M pH 2,5, tampão Acetato 0,025 M pH 4,5, tampão MES 0,025 M pH 6,5, tampão Tris/HCl 0,025 M pH 8,5 e tampão Glicina/NaOH pH 10.

Os resultados da ligação de appA-CBM2 à Avicel em diferentes condições de pH demonstraram que a ligação é favorecida em valores de pH próximos de 2,5, acima desse valor claramente ocorre diminuição na afinidade. Esse comportamento também foi observado para PON1-CBM2 (Figura 66B), embora estas condições de pH não sejam favoráveis para PON1-CBM2, porque PON1 não é estável em pH abaixo de 6,5 (Figura 66A).

De qualquer modo, os dados mostram que a quantidade de PON1-CBM2 ligada em Avicel em meio ácido é maior que em meio básico.

Em conclusão, apesar de PON1-CBM2 não ter sido isolada, sua caracterização revela uma enzima totalmente funcional, com seus dois “domínios” exibindo atividade de paraoxonase e ligação à celulose cristalina semelhante aos respectivos “domínios” nativos, demonstrando mais uma vez a viabilidade da construção de enzimas quiméricas combinando domínios de fosfatase e ligação em celulose.

3.15. *Produção de PON1 -CBM2 solúvel em bactérias RG*

Considerando o interesse em estudar PON1, mesmo após a caracterização de PON1-CBM2 foram mantidos esforços para sua produção em maior quantidade e rapidez em *E.coli*. Conforme visto acima, as tentativas de expressar PON1 em RG levaram apenas à formação de corpos de inclusão insolúveis. Porém, ao repetir os experimentos com PON1-CBM2, verificamos no lisado destas bactérias uma grande quantidade de enzima solúvel e ativa (Figura 67 e 68). Inclusive, a atividade total de PON1-CBM2 obtida na porção solúvel do lisado foi maior em RG do que em Arctic.

Figura 67 – Atividade da PON1-CBM2 na hidrólise de paraoxon. Porção solúvel do lisado de RG (■), PON1-CBM2 purificada de RG (□), porção solúvel do lisado de Arctic (▲) e PON1-CBM2 purificada de Arctic (△).

A figura 68 apresenta um comparativo entre a expressão de PON1-CBM2 em RG e Arctic. Em ambos os casos a expressão ocorreu em meio 2xTY (Sigma) contendo 1% de glicose, 0,001 M de CaCl_2 e antibióticos. Os pré-inóculo e o inóculo foram crescidos a 20°C e a indução com 0,4 mM de IPTG e 2 % de glicerol, por 24 horas, foi iniciada em $\text{Abs}_{600 \text{ nm}}$ de 0,6, a 20°C, para RG e a 10°C, para Arctic. Posteriormente, o lisado destas bactérias foi usado para purificação de PON1-CBM2 em coluna de Ni-NTA. Fica clara a obtenção de proteína recombinante solúvel em grande quantidade a partir de ambas as linhagens. Nota-se ainda que as porções eluídas (E200) mostram bandas de com migração anômala para PON1-CBM2, fenômeno já observado na expressão de PON3 em RG (Lu et al. 2006). Ensaio de atividade sobre paraoxon mostraram atividades similares para PON1-CBM2 purificada a partir de RG e Arctic (Figura 67).

Figura 68 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS das proteínas de bactérias Arctic transformadas com vetor pAE codificando para PON1-CBM2. Padrão BioRad Broad Molecular Weight standards, Indução em cepa RG e Arctic. RG: Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), porção solúvel do lisado (PS), eluição com imidazol 0,200 M (Im200) e 5 μ L de resina (RES). Arctic: Cultura não induzida (NI), cultura induzida (I), eluição com imidazol 0,200 M (Im200) e 5 μ L de resina (RES).

Deste modo, supomos que o fato de PON1 estar fusionada a CBM2 aumentou sua solubilidade em bactérias RG induzidas a 20°C (Figuras 67 e 68). Situação semelhante foi encontrada na literatura para a fusão de uma exoglucanase com uma fitase (Reddy et al. 2009). Logo, ao final desse trabalho temos a indicação de mais uma aplicação interessante para o CBM2, auxiliar a solubilização de proteínas recombinantes.

4. Conclusão

O processo de montagem das sequências codificadoras das proteínas quiméricas appA-CBM2 e PON1-CBM2 por meio de “PCR com sobreposição” é viável, sendo contudo aconselhável o uso de DNA polimerase de alta fidelidade e baixo número de ciclos nas reações de “pré-fusão” e “fusão” para evitar a introdução de mutações indesejadas e trocas de “fase de leitura”.

A produção de appA e appA-CBM2 foi bem sucedida usando os vetores pT7-7 e pAE, contudo as proteínas recombinantes não se acumulam de forma visível na bactéria BL21(DE3), sendo necessária sua detecção através de ensaio de atividade de fosfatase. Neste sentido, o vetor pAE é mais apropriado, pois permitiu a purificação de appA e appA-CBM2 recombinantes, separando-as da appA bacteriana, em cromatografia com resina Ni-NTA.

A enzima quimérica appA-CBM2 purificada demonstrou ser totalmente funcional, exibindo atividade de ligação à celulose microcristalina (Avicel PH101) e atividade de fosfatase sobre *p*-nitrofenil fosfato. A ligação a Avicel evidenciou um comportamento de saturação descrito por uma “constante de ligação” (K_b) de 26 mg e um “máximo de ligação” (B_{max}) de 4,45 U/ μ g. Além disso, a ligação de appA-CBM2 em Avicel foi maior em pH 2,5 e diminuiu acima de pH 6,5, como observado anteriormente para CBMs da família2. O efeito de concentração de *p*-nitrofenil fosfato na atividade catalítica de appA-CBM2 e appA foram idênticos, exibindo um K_m de 2,8 mM.

A produção de PON1 e PON1-CBM2 solúveis e ativas é possível em *E.coli* cepa Arctic cultivada em meio com glicose 1%, visando à redução de “vazamento” de expressão de proteína recombinante na etapa de pré-indução, e com indução em baixa temperatura (10°C) e redução da concentração de IPTG para 0,25 mM. Na ausência do ambiente natural,

ou mimetizado por detergentes, a PON1 humana é instável e tende a se agregar. A atividade e a estabilidade de PON1 são dramaticamente dependentes do componente ambiental (Golmanesh et al. 2008; Rochu et al. 2007a). Por isso, a expressão e purificação de PON1 humana nativa em ambiente bacteriano não havia sido observada até 2008 (Stevens et al. 2008) e muitos estudos de evolução direta foram realizados para permitir a expressão e purificação de PON1 recombinante ativa e estável em sistemas bacterianos. A caracterização de PON1 e PON1-CBM2 somente foi possível empregando o lisado bruto, pois estas enzimas inativam-se durante o procedimento de purificação em coluna Ni-NTA. PON1-CBM2 liga-se em Avicel PH101 com um comportamento de saturação, descrito por uma constante de ligação (K_b) de 27 mg, valor idêntico àquele observado para appA-CBM2, o que sugere que o domínio CBM2 é igualmente funcional nestas duas enzimas quiméricas. PON1-CBM2 também exibe atividade paraoxonásica com K_m similar àquele observado para PON1 nativa (1,3 mM), sugerindo que o “domínio” PON1 encontra-se totalmente funcional na enzima quimérica.

Portanto, o conceito de uma proteína quimérica que combina as propriedades de fosfatase e de um domínio de ligação à celulose é funcional.

5. *Referências Bibliográficas*

- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. 1993. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 52(3):598-608.
- Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Gould SM, Roodveldt C, Tawfik DS. 2005. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nature Genetics* 37(1):73-76.
- Aharoni A, Gaidukov L, Yagur S, Toker L, Silman I, Tawfik DS. 2004. Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(2):482-7.
- Aharoni A, Tawfik DS. 2004. Directed evolution of recombinant serum paraoxonase (PON) variants. *Discov Med* 4(21):120-4.
- Albeck S, Burstein Y, Dym O, Jacobovitch Y, Levi N, Meged R, Michael Y, Peleg Y, Prilusky J, Schreiber G and others. 2005. Three-dimensional structure determination of proteins related to human health in their functional context at The Israel Structural Proteomics Center (ISPC). *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:1364-1372.
- Amitai G, Gaidukov L, Adani R, Yishay S, Yacov G, Kushnir M, Teitlboim S, Lindenbaum M, Bel P, Khersonsky O and others. 2006. Enhanced stereoselective hydrolysis of toxic organophosphates by directly evolved variants of mammalian serum paraoxonase. *FEBS J* 273(9):1906-19.
- Black GW, Hazlewood GP, Millward-Sadler SJ, Laurie JI, Gilbert HJ. 1995. A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem J* 307 (Pt 1):191-5.
- Black GW, Rixon JE, Clarke JH, Hazlewood GP, Theodorou MK, Morris P, Gilbert HJ. 1996. Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates. *Biochem J* 319 (Pt 2):515-20.
- Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 211(3):871-9.
- Bloom JD, Arnold FH. 2009. In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 Suppl 1:9995-10000.

- Bolam DN, Ciruela A, McQueen-Mason S, Simpson P, Williamson MP, Rixon JE, Boraston A, Hazlewood GP, Gilbert HJ. 1998. Pseudomonas cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J* 331 (Pt 3):775-81.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382(Pt 3):769-81.
- Boraston AB, McLean BW, Kormos JM, Alam M, Gilkes NR, Haynes CA, Tomme P, Kilburn DG, Warren RAJ. 1999. Carbohydrate-binding modules: diversity of structure and function. In: Gilbert HJ, Svensson B, Davies G, Henrissat B, editors. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. p 202-211.
- Bray MR, Johnson PE, Gilkes NR, McIntosh LP, Kilburn DG, Warren RA. 1996. Probing the role of tryptophan residues in a cellulose-binding domain by chemical modification. *Protein Sci* 5(11):2311-8.
- Broomfield CA. 1991. Hydrolysis of nerve agents by plasma enzymes. In: Massoulié J, editor. *Cholinesterases*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. 2001a. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 11(1):77-84.
- Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. 2001b. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 68(6):1428-36.
- Buckle AM, Devlin GL, Jodun RA, Fulton KF, Faux N, Whisstock JC, Bottomley SP. 2005. The matrix refolded. *Nat Methods* 2(1):3.
- Bunkenborg J, Pilch BJ, Podtelejnikov AV, Wisniewski JR. 2004. Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry. *Proteomics* 4(2):454-65.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37.
- Carrard G, Koivula A, Soderlund H, Beguin P. 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19):10342-7.
- Chaimovich H, Nome F. 1970. Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. *Arch Biochem Biophys* 139(1):9-16.

- Chambers JE. 2008. PON1 multitasks to protect health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35):12639-40.
- Chen R, Jiang X, Sun D, Han G, Wang F, Ye M, Wang L, Zou H. 2009. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res* 8(2):651-61.
- Chow MK, Amin AA, Fulton KF, Fernando T, Kamau L, Batty C, Louca M, Ho S, Whisstock JC, Bottomley SP and others. 2006a. The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue):D207-12.
- Chow MK, Amin AA, Fulton KF, Whisstock JC, Buckle AM, Bottomley SP. 2006b. REFOLD: an analytical database of protein refolding methods. *Protein Expr Purif* 46(1):166-71.
- Consortium TU. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D214-9.
- Costa LG. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366(1-2):1-13.
- Costa LG, Cole TB, Furlong CE. 2003a. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol* 41(1):37-45.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. 2003b. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 54:371-92.
- Costa LG, Furlong CE. 2002. PON1 and Organophosphate toxicity. In: Academic K, editor. *Paraoxonase (PON1) in Health and disease: Basic and Clinical Aspects*. p 234.
- Costa LG, Richter RJ, Li WF, Cole T, Guizzetti M, Furlong CE. 2003c. Paraoxonase (PON 1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers* 8(1):1-12.
- Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. 2005. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 69(4):541-50.
- Creagh AL, Ong E, Jervis E, Kilburn DG, Haynes CA. 1996. Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22):12229-34.
- Dassa E, Cahu M, Desjoyauxcherel B, Boquet PL. 1982. The Acid-phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia-Coli* - Physiological and Biochemical-Study. *Journal of Biological Chemistry* 257(12):6669-6676.

- Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 14(3):334-6.
- Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. 2002. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 277(6):4301-8.
- Din N, Forsythe IJ, Burtnick LD, Gilkes NR, Miller RC, Jr., Warren RA, Kilburn DG. 1994. The cellulose-binding domain of endoglucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol Microbiol* 11(4):747-55.
- Draganov DI, La Du BN. 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369(1):78-88.
- Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research* 46(6):1239-1247.
- Dupont C, Roberge M, Shareck F, Morosoli R, Kluepfel D. 1998. Substrate-binding domains of glycanases from *Streptomyces lividans*: characterization of a new family of xylan-binding domains. *Biochem J* 330 (Pt 1):41-5.
- Furlong CE, Costa LG, Hassett C, Richter RJ, Sundstrom JA, Adler DA, Disteché CM, Omiecinski CJ, Chapline C, Crabb JW and others. 1993. Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chem Biol Interact* 87(1-3):35-48.
- Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb JW. 1991. Purification of rabbit and human serum paraoxonase *Biochemistry* 30(42):10133-10140.
- Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. 2006. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 47(11):2492-502.
- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, Ladu BN. 1991. Purification of Human Serum Paraoxonase Arylesterase - Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities. *Drug Metabolism and Disposition* 19(1):100-106.
- Gilkes NR, Jervis E, Henrissat B, Tekant B, Miller RC, Jr., Warren RA, Kilburn DG. 1992. The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *J Biol Chem* 267(10):6743-9.

- Gilkes NR, Warren RA, Miller RC, Jr., Kilburn DG. 1988. Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J Biol Chem* 263(21):10401-7.
- Gill J, Rixon JE, Bolam DN, McQueen-Mason S, Simpson PJ, Williamson MP, Hazlewood GP, Gilbert HJ. 1999. The type II and X cellulose-binding domains of *Pseudomonas xylanase* A potentiate catalytic activity against complex substrates by a common mechanism. *Biochem J* 342 (Pt 2):473-80.
- Golmanesh L, Mehrani H, Tabei M. 2008. Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1. *J Biochem Biophys Methods* 70(6):1037-42.
- Goncalves LM, Kobayakawa TG, Zanette D, Chaimovich H, Cuccovia IM. 2009. Effects of micelles and vesicles on the oximolysis of p-nitrophenyl diphenyl phosphate: A model system for surfactant-based skin-defensive formulations against organophosphates. *J Pharm Sci* 98(3):1040-52.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W695-9.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L and others. 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11(5):412-9.
- Harel M, Brumshtein B, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL. 2007. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol* 58(3):347-53.
- Harlow EL, D. . 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. 1991. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 30(42):10141-9.
- Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active Enzymes: An Integrated Database Approach. In: Gilbert HJ, Svensson B, Davies G, Henrissat B, editors. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. p 3-12.
- Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, Graves TA, Pepin KH, Wagner-McPherson C, Layman D, Maas J, Jaeger S, Walker R and others. 2003. The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature* 424(6945):157-64.

- Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. 1993. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3(1):73-6.
- Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek BE, Martin MJ, McGarvey P, Gasteiger E. 2009. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* 10:136.
- Jervis EJ, Haynes CA, Kilburn DG. 1997. Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem* 272(38):24016-23.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36(Web Server issue):W5-9.
- Josse D, Ebel C, Stroebel D, Fontaine A, Borges F, Echalié A, Baud D, Renault F, le Maire M, Chabrieres E and others. 2002. Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1). *Journal of Biological Chemistry* 277(36):33386-33397.
- Josse D, Lockridge O, Xie WH, Bartels F, Schopfer LM, Masson P. 2001. The active site of human paraoxonase (PON1). *Journal of Applied Toxicology* 21:S7-S11.
- Josse D, Xie WH, Renault F, Rochu D, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. 1999. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry* 38(9):2816-2825.
- Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. 1994. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 33(3):832-9.
- Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik DS. 2006. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr Opin Chem Biol* 10(5):498-508.
- Khersonsky O, Tawfik DS. 2005. Structure-Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest that Its Native Activity Is Lactonase. *Biochemistry* 44: 6371-6382.
- La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. 1993. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact* 87(1-3):25-34.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R and others. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-8.

- Lenz DE, Yeung D, Smith JR, Sweeney RE, Lumley LA, Cerasoli DM. 2007. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology* 233(1-3):31-39.
- Leviev I, Deakin S, James RW. 2001. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 42(4):528-35.
- Levy I, Shoseyov O. 2002. Cellulose-binding domains biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 20(3-4):191-213.
- Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lusis AJ, Furlong CE. 2000. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics* 10(9):767-79.
- Linder M, Nevanen T, Soderholm L, Bengs O, Teeri TT. 1998. Improved immobilization of fusion proteins via cellulose-binding domains. *Biotechnol Bioeng* 60(5):642-7.
- Lotti M. 2000. Organophosphorus compounds. In: Spencer PS, Schaumburg H, Ludolph AC, editors. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. 2 Edition ed. USA: Oxford University Press. p 1352.
- Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. 2006. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Protein Expr Purif* 46(1):92-9.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. 1998a. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 31(3):329-36.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. 1997. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 122(2):265-8.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN. 1998b. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139(2):341-9.
- Masson P, Josse D, Lockridge O, Viguie N, Taupin C, Buhler C. 1998. Enzymes hydrolyzing organophosphates as potential catalytic scavengers against organophosphate poisoning. *J Physiol Paris* 92(5-6):357-62.
- McDaniel CS, McDaniel J, Wales ME, Wild JR. 2005. Smart Coating Biocatalytic. *Paint & Coating Industry*:26-33.

- Morton RE, Evans TA. 1992. Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical Biochemistry* 204(2):332-334.
- Nagy T, Simpson P, Williamson MP, Hazlewood GP, Gilbert HJ, Orosz L. 1998. All three surface tryptophans in Type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Lett* 429(3):312-6.
- Najmudin S, Guerreiro CI, Carvalho AL, Prates JA, Correia MA, Alves VD, Ferreira LM, Romao MJ, Gilbert HJ, Bolam DN and others. 2006. Xyloglucan is recognized by carbohydrate-binding modules that interact with beta-glucan chains. *J Biol Chem* 281(13):8815-28.
- Nguyen SD, Sok DE. 2006. Preferable stimulation of PON1 arylesterase activity by phosphatidylcholines with unsaturated acyl chains or oxidized acyl chains at sn-2 position. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758(4):499-508.
- Ong E, Gilkes NR, Miller RC, Jr., Warren RA, Kilburn DG. 1993. The cellulose-binding domain (CBD(Cex)) of an exoglucanase from *Cellulomonas fimi*: production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide. *Biotechnol Bioeng* 42(4):401-9.
- Ong E, Greenwood JM, Gilkes NR, Kilburn DG, Miller Jr RC, Warren RAJ. 1989. The cellulose-binding domains of cellulases: tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 7(9):239-243.
- Ostanin K, Harms EH, Stevis PE, Kuciel R, Zhou MM, Vanetten RL. 1992. Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid-phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 267(32):22830-22836.
- Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K and others. 2004. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36(1):40-5.
- Oumar-Mahamat H, Slebocka-Tilk H, Brown RS. 1999. Long chain beta-aminoethanols as micellar catalysts for the hydrolysis of diphenyl-p-nitrophenyl phosphate. The observation of an unusual enhancement of catalysis in the presence of added polyols. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 77(10):1577-1588.
- Peterson MW, Fairchild SZ, Otto TC, Mohtashemi M, Cerasoli DM, Chang WE. 2011. VX hydrolysis by human serum paraoxonase 1: a comparison of experimental and computational results. *PLoS One* 6(5):e20335.

- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33(3):498-507.
- Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37(8):1103-9.
- Reddy VA, Venu K, Rao DE, Rao KV, Reddy VD. 2009. Chimeric gene construct coding for bi-functional enzyme endowed with endoglucanase and phytase activities. *Arch Microbiol* 191(2):171-5.
- Richins RD, Mulchandani A, Chen W. 2000. Expression, immobilization, and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 69(6):591-596.
- Rochu D, Chabriere E, Masson P. 2007a. Human paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology* 233(1-3):47-59.
- Rochu D, Renault F, Elias M, Hanne S, Clery-Barraud C, Chabriere E, Masson P. 2007b. Functional states, storage and thermal stability of human paraoxonase: Drawbacks, advantages and potential. *Toxicology* 233(1-3):226-226.
- Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. 2001. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 354(Pt 1):1-7.
- Russell AJ, Berberich JA, Drevon GE, Koepsel RR. 2003. Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annual Review of Biomedical Engineering* 5:1-27.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA, Carson AR, Parker-Katiraei L, Skaug J, Khaja R and others. 2003. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 300(5620):767-72.
- Shoseyov O, Shani Z, Levy I. 2006. Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2):283-+.
- Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. 1999. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(9):2214-25.

- Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. 1995. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7187-91.
- Stevens RC, Suzuki SM, Cole TB, Park SS, Richter RJ, Furlong CE. 2008. Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35):12780-4.
- Tomme P, Creagh AL, Kilburn DG, Haynes CA. 1996. Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry* 35(44):13885-94.
- Tomme P, Van Tilbeurgh H, Pettersson G, Van Damme J, Vandekerckhove J, Knowles J, Teeri T, Claeyssens M. 1988. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur J Biochem* 170(3):575-81.
- Tomme P, Warren RA, Miller RC, Jr., Kilburn DG, Gilkes NR. 1995. Cellulose-binding domains: classification and properties. In: Saddler JN, Penner M, editors. *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides*. Washington: American Chemical Society.
- Tormo J, Lamed R, Chirino AJ, Morag E, Bayer EA, Shoham Y, Steitz TA. 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO J* 15(21):5739-51.
- Valiyaveetil M, Alamneh Y, Biggemann L, Soojhawon I, Farag HA, Agrawal P, Doctor BP, Nambiar MP. 2011. In vitro efficacy of paraoxonase 1 from multiple sources against various organophosphates. *Toxicol In Vitro* 25(4):905-13.
- Wang AA, Chen W, Mulchandani A. 2005. Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized dual functional biocatalysts in a cellulose hollow fiber bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 91(3):379-386.
- Wang AJA, Mulchandani A, Chen W. 2002. Specific adhesion to cellulose and hydrolysis of organophosphate nerve agents by a genetically engineered *Escherichia coli* strain with a surface-expressed cellulose-binding domain and organophosphorus hydrolase. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4):1684-1689.
- WHO. 1990. *Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2006. www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html. New Delhi, India: World Health Organization.

- Xu GY, Ong E, Gilkes NR, Kilburn DG, Muhandiram DR, Harris-Brandts M, Carver JP, Kay LE, Harvey TS. 1995. Solution structure of a cellulose-binding domain from *Cellulomonas fimi* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34(21):6993-7009.
- Yang YC, Baker JA, Ward JR. 1992. Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews* 92(8):1729-1743.
- Yeung DT, Josse D, Nicholson JD, Khanal A, McAndrew CW, Bahnson BJ, Lenz DE, Cerasoli DM. 2004. Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1702(1):67-77.
- Yoshikuni Y, Ferrin TE, Keasling JD. 2006. Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature* 440(7087):1078-82.