

Figura 6.12: Perfil proteico, em gel desnaturalante, para HXYN2r após os ensaios de purificação com membranas de ultrafiltração com corte de peso molecular de 10 e 30 kDa. Amostras preparadas com precipitante TCA e coradas com nitrato de prata. A amostra purificada foi diluída sete vezes em comparação ao sobrenadante inicial.

6.4 Ensaios de cristalização das proteínas.

Ensaios robóticos foram realizados no Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (Robolab/LNBio/CNPEM) em Campinas, que é um laboratório nacional multi-usuário. Foram utilizadas amostras contendo a enzima CBH1.2r com concentração $1,358 \pm 0,005 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Nestes ensaios não foram obtidos cristais, porém pode-se notar em algumas condições que houve a formação de estruturas de precipitados granulares, como podem ser vistos na Figura 6.13.

Ainda para a enzima CBH1.2r, foram realizados ensaios robóticos de cristalização no Laboratório de Cristalografia do IFSC/USP. Nesses ensaios, foram obtidos aglomerados de pequenos cristais em forma de agulha para a condição G1 do kit Classic da Quiagen. Tal condição de cristalização é composta por: 0,1 M HEPES sodium salt pH 7,5, 2%(v/v) PEG 400 e 2 M Sulfato de Amônio. A partir dessa condição, foram realizados ensaios manuais no Laboratório de cristalografia do IF/UFG.

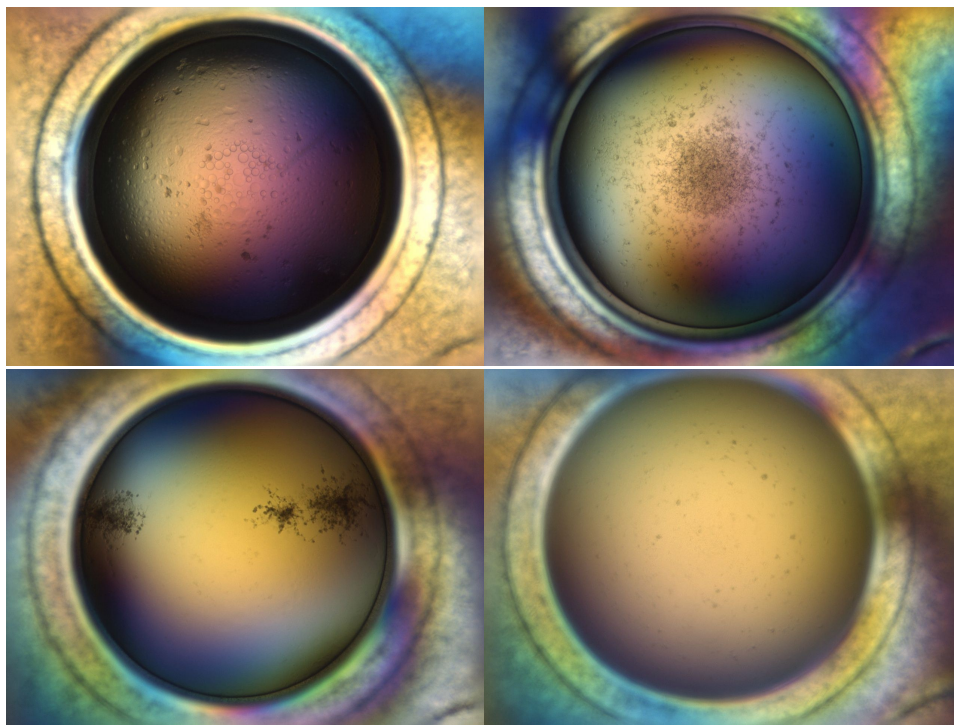


Figura 6.13: Precipitados granulares obtidos nos ensaios robóticos de cristalização no Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (Robolab/ LNBio/ CNPEM) em Campinas - SP, para a enzima CBH1.2r.

A amostra para a realização do ensaio manual foi preparada com adição 32% de sulfato de amônio apenas, e, logo após, esta foi concentrada com membrana de ultrafiltração com corte de peso molecular de 30 kDa, até a concentração de $3,099 \pm 0,005 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para estes ensaios manuais, cristais foram obtidos após duas semanas, e, assim como no ensaio robótico, estes cristais tinham o aspecto de aglomerados de pequenos cristais em forma de agulha. As Figuras 6.15 e 6.14 mostram os cristais obtidos utilizando na solução precipitante tampão HEPES e tampão Tris-HCl respectivamente. Até o momento, não foram obtidos cristais para a enzima CBH1.2r com tamanho suficiente para a coleta de dados de difração de raios X no equipamento disponível no instituto.

Para a enzima HXYN2r, também foram realizados ensaios robóticos de cristalização no Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (Robolab/ LNBio/ CNPEM). Nesses ensaios, a concentração proteica da amostra era de $3,8 \pm 0,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, e foram utilizados os kits: Crystal Screen HT da Hampton Research, JCSG+ suite da Quiagem, PACT suite da Quiagem, Wizard Precipitant Synergy da Rigaku, SaltRx HT da Hampton Research e Wizard Classic I e II da Rigaku. Até o momento, não foram obtidos cristais para a enzima HXYN2r.

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1.2 Resultados e Discussões

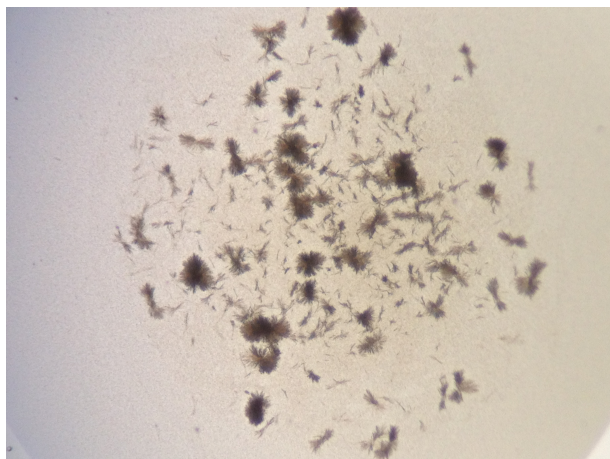


Figura 6.14: Cristais obtidos em ensaios manuais utilizando como solução precipitante 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 2%(v/v) PEG 400 e 2 M Sulfato de Amônio.

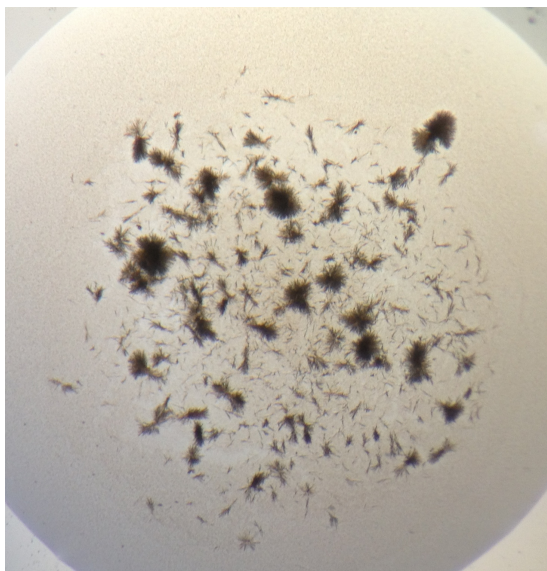


Figura 6.15: Cristais obtidos em ensaios manuais utilizando como solução precipitante 0,1 M HEPES sodium salt pH 7,5, 2%(v/v) PEG 400 e 2 M Sulfato de Amônio.

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1.2 de *H. grisea*

Devido a problemas técnicos no laboratório, o transformante de *P. pastoris* produtor da enzima CBH1.2 de *H. grisea* foi perdido. Assim, para a obtenção de novas amostras de CBH1.2r, foram realizados novos processos de transformação da levedura *P. pastoris* com o gene da enzima CBH1.2 de *H. grisea*. Para essa nova transformação, foram utilizadas duas linhagens da levedura *P. pastoris*, a linhagem GS115 (a mesma linhagem previamente transformada) e a linhagem SMD1168. Convém destacar que:

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1.2 Resultados e Discussões

- A linhagem GS115 apresenta deficiência do gene histidina desidrogenase, permitindo a utilização desta característica como marca de seleção para os transformantes;
- A linhagem SMD1168 apresenta, além da mesma deficiência do gene histidina desidrogenase da linhagem anterior, possui uma deficiência da enzima vacúolo peptidase A, a qual é responsável pela ativação das proteases carboxipeptidase Y e B1. Assim, esta linhagem é deficiente nessas proteases.

6.5.1 Transformação de células de *E. coli*

A transformação das células de *E. coli* foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 5.2.4, utilizando o vetor pHIL-D2 previamente montado com o inserto (Figura 6.17). As placas foram cultivadas em meio LA (seção 5.1.6.3) contendo ampicilina por aproximadamente 16 horas a 37 °C. Desta placa foram obtidos seis clones.

O cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* possui 1353 pb, adicionando as terminações para o sítio da enzima de restrição EcoR I, o inserto terá um tamanho total de 1363 pb (Figura 6.5.1 e Figura 6.16).

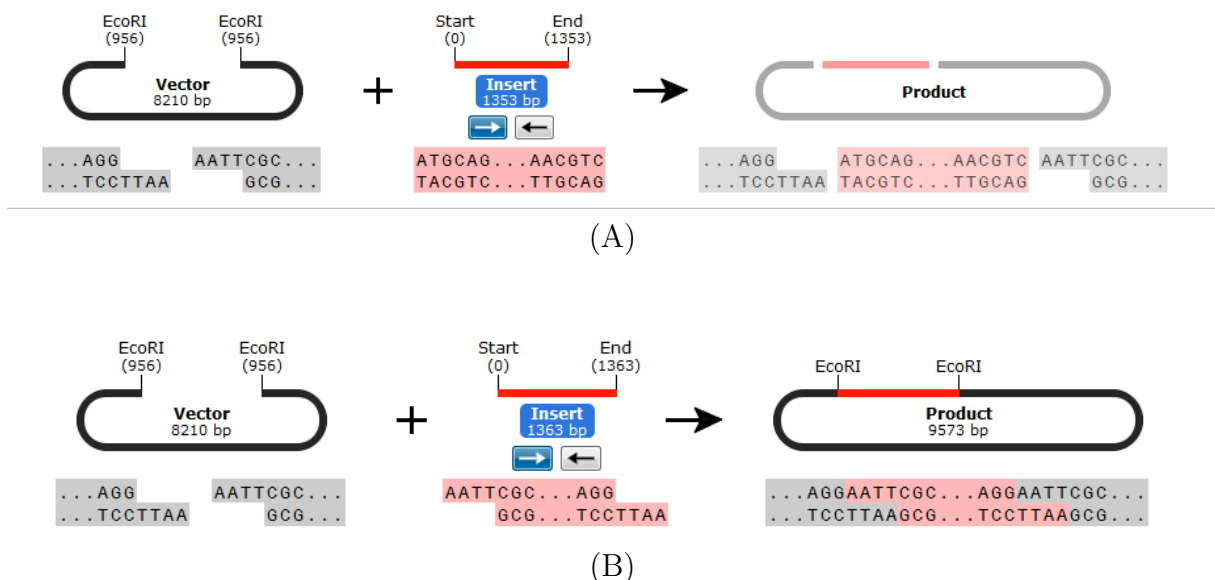


Figura 6.16: (A) Vetor aberto no sítio de reconhecimento da enzima de restrição EcoR I com inserto de cDNA (sticky ends). (B) Vetor aberto no sítio de reconhecimento da enzima de restrição EcoR I com inserto de cDNA com extremidades compatíveis com EcoR I.

O DNA plasmidial dos seis clones (contendo o cDNA da enzima CBH1.2 (Figura 6.17) montado de acordo com a Figura 6.16) foi extraído utilizando o procedimento

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1. Resultados e Discussões

de mini-preparação mostrado na seção 5.2.5 e logo após submetido a digestão utilizando-se a enzima EcoR I - Fast Digest, de acordo com o método mostrado na seção 5.2.2 para confirmação da integração do inserto.

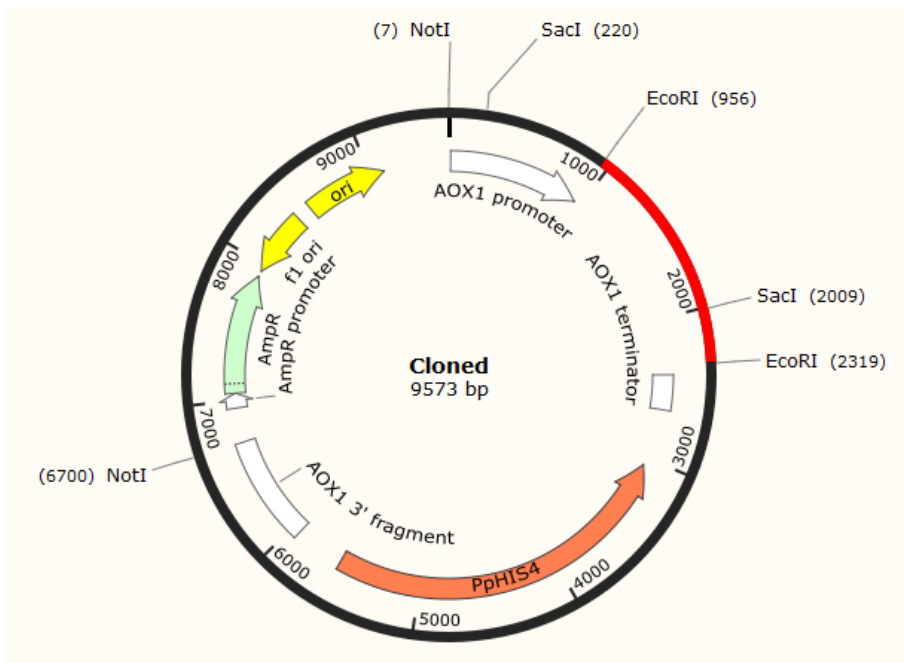


Figura 6.17: Vetor com inserto de cDNA com extremidades compatíveis com EcoR I no sítio de reconhecimento da enzima de restrição EcoR I. O inserto contendo o cDNA da enzima de interesse se encontra em vermelho.

O produto da digestão foi então analisado utilizando eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose (seção 5.2.15). A simulação do perfil de fragmentos de DNA e a foto do gel de agarose obtidos desta digestão podem ser vistos na Figura 6.18 (A) e (B) respectivamente. Através da digestão com a enzima Sac I, é possível a determinação da orientação do cDNA em relação ao promotor AOX1, pois, como pode ser observado na Figura 6.17, o plasmídeo pHIL-D2 contendo o inserto na orientação correta é clivado pela enzima Sac I em duas posições, liberando 2 fragmentos correspondentes a 7781 e 1781pb. O vetor pHIL-D2 contendo o cDNA na orientação incorreta deve liberar 2 fragmentos correspondentes a 1042 e 8520pb (Figura 6.17). Esta enzima pode ainda ser utilizada para verificar a existência do inserto, já que o vetor sem inserto, digerido com SacI é clivado em apenas uma posição (221pb), ocorrendo a linearização do mesmo.

Após a confirmação da integração do inserto no vetor, as células do clone 1 (Figura 6.18) foram cultivadas em 5 mL de meio LB a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Após este período, as células foram retiradas e submetida a maxi-preparação de

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1. Resultados e Discussões

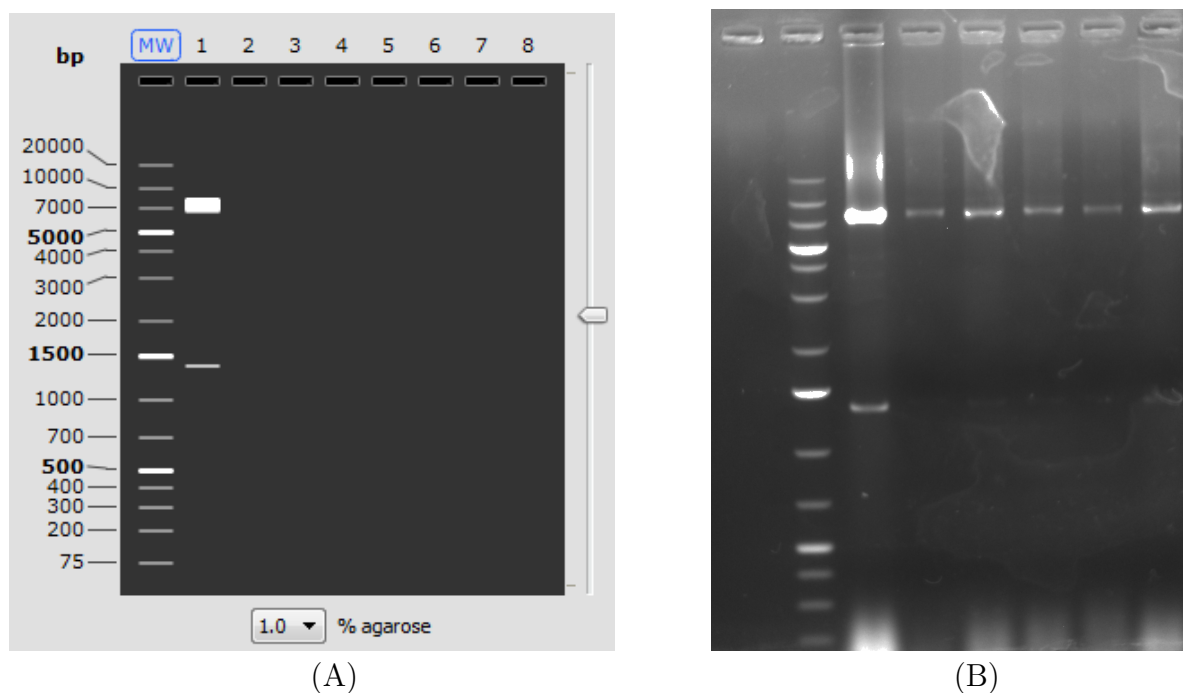


Figura 6.18: (A) Simulação do perfil de fragmentos de DNA em gel de agarose após a digestão do vetor pHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de EcoR I. Esta simulação foi realizada com o programa SnapGene [100]. (B) Gel de agarose contendo o produto da digestão do vetor pHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de EcoR I revelado utilizando a incidência de luz ultravioleta no sistema Gel DocTM EZ System da Bio-Rad. Foi utilizado o marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder5.1.10.3.

acordo com a seção 5.2.6 para extração do DNA plasmidial. Após extração, o DNA plasmidial foi submetido a digestão utilizando-se a enzima Not I (seção 5.1.3) e o produto da digestão analisado por eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose (seção 5.2.15). Nesta digestão, espera-se que seja observado um fragmento de 2880 pb que contém a parte do vetor com seleção para cultivo em bactéria, e um fragmento de 6693 pb que contém o promotor AOX1, o cDNA da enzima de interesse e a marca de seleção HIS4-. Novamente, as simulações e a foto deste gel podem ser vistos na Figura 6.19 (A) e (B) respectivamente.

O fragmento de DNA de interesse (contendo o cDNA da enzima CBH1.2) foi então eluído do gel de agarose utilizando o kit de eluição de DNA descrito em 5.2.8 e precipitado como descrito em 5.2.9. Esta amostra foi mantida a -20 °C para ser posteriormente utilizada na transformação das células da levedura *P. pastoris*.

6.5.2 Transformação de células de *P. pastoris*

Os fragmentos de DNA obtidos ao final do processo descrito na subseção anterior foram utilizados para transformação das linhagens GS115 e SMD1168 da levedura *P.*

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1.2 Resultados e Discussões

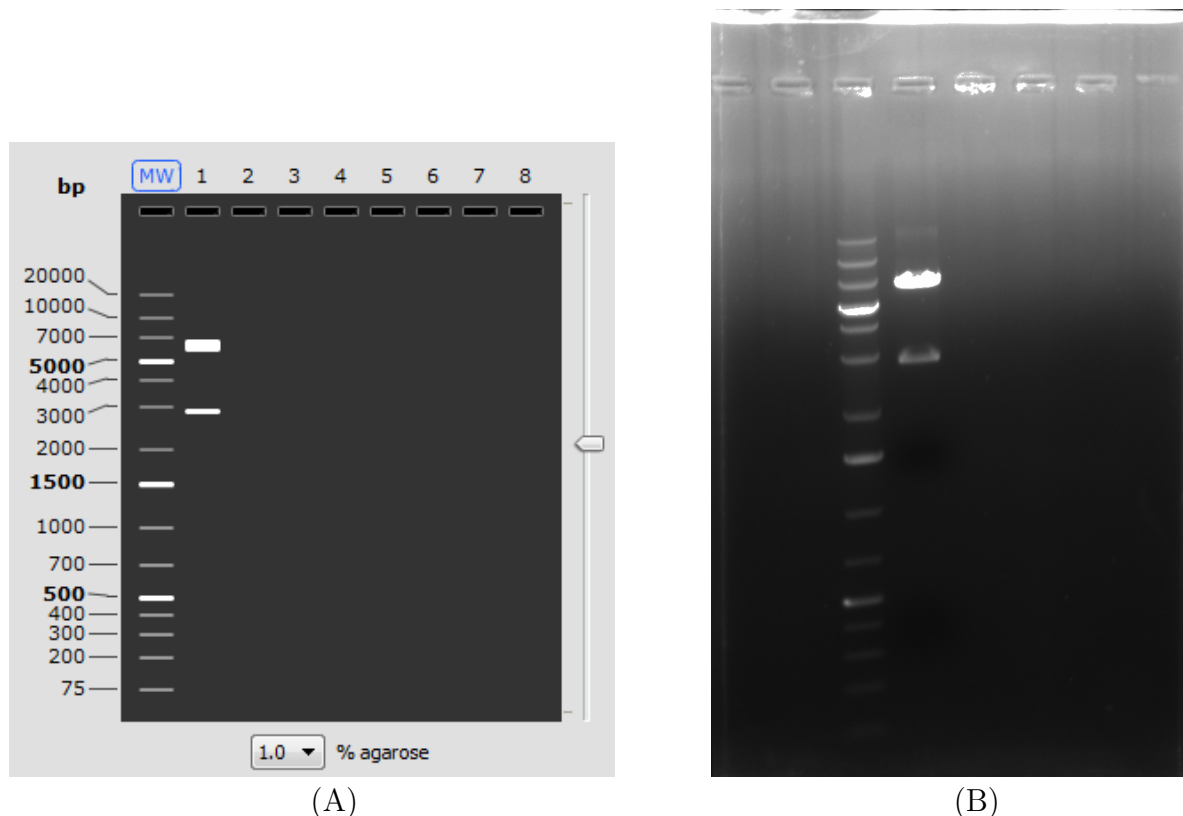


Figura 6.19: (A) Simulação do perfil de fragmentos de DNA em gel de agarose após a digestão do vetor pPHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de Not I. Esta simulação foi realizada com o programa SnapGene [100]. (B) Gel de agarose contendo o produto da digestão do vetor pPHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de Not I revelado utilizando a incidência de luz ultravioleta no sistema Gel DocTM EZ System da Bio-Rad. Foi utilizado o marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder5.1.10.3.

pastoris de acordo com o procedimento apresentado em 5.2.10. Desta transformações foram obtidos 8 transformantes na linhagem SMD1168 e 19 transformantes na linhagem GS115. Estes transformantes foram selecionados quanto a produção de enzimas ativas de acordo com o descrito na seção 5.2.11 (Figura 6.20).

A produção em placas do tipo “deepwell” normalmente levam a baixas produções de enzimas devido a baixa aeração entre outros fatores. Por esta razão é mais recomendado analisar o produto desta utilizando ensaios com p-nitro-fenil, que são mais sensíveis para detecção do que a detecção de açúcares redutores através do método de DNS. Porém, pela natureza da atividade enzimática da CBH1.2, seria necessário utilizar reagentes do tipo p-nitrofenil β -D-Celobiosídeo, que contém uma celobiose conectada ao p-nitrofenil, este reagente não estava disponível nas dependências do laboratório, por esta razão foi realizada a análise da atividade das enzimas provenientes dos transformantes utilizando-se o método de açúcares redutores com reagente DNS (seção 5.2.13).

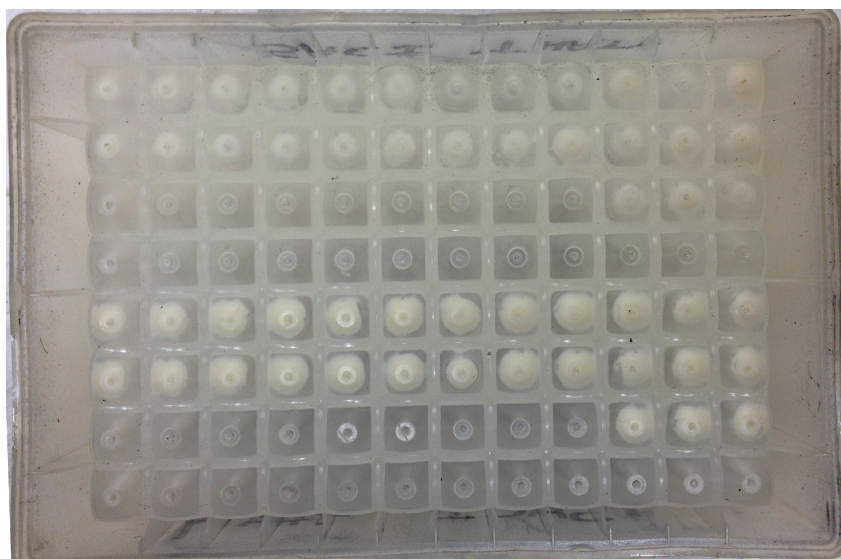


Figura 6.20: Produção de transformantes de *P. pastoris* em placa deepwell.

6.5.3 Seleção dos melhores transformantes produtores de enzimas ativas

Da análise da atividade da enzima CBH1.2r produzida pelos transformantes obtidos em ambas as linhagens através do método de açúcares redutores com reagente DNS, foram considerados que os transformantes 2, 7, 20, 25 e 26 (sendo os dois primeiros da linhagem SMD1168 e os outros 3 da linhagem GS115) seriam os melhores produtores das enzimas ativas.

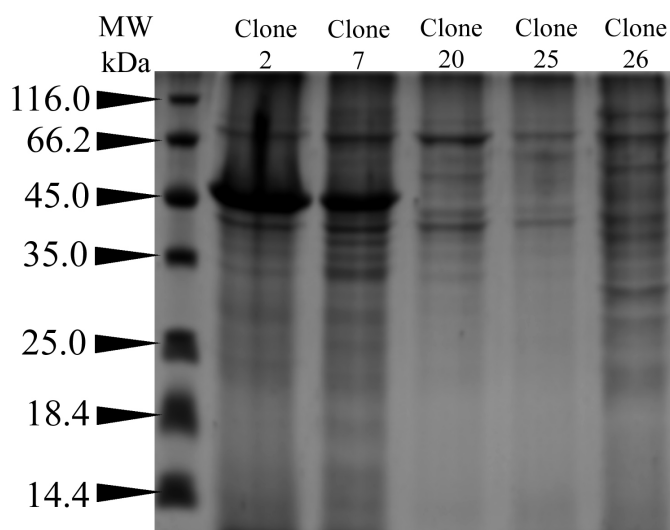


Figura 6.21: Perfil proteico dos sobrenadantes de cultura dos transformantes 2, 7, 20, 25 e 26 da nova transformação da levedura *P. pastoris* produtores da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas com precipitante TCA e coradas com azul de coomassie.