

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCELO MÜLLER DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA ESTERASE HALOFÍLICA DE**  
*Haloarcula marismortui*

**CURITIBA**

**2009**

**MARCELO MÜLLER DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA ESTERASE HALOFÍLICA DE**

*Haloarcula marismortui*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Nadia Krieger

Co-orientadores: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Prof. Dr. David Alexander Mitchell

**CURITIBA**

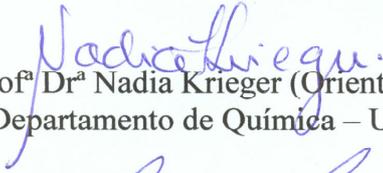
**2009**

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

### Caracterização Bioquímica de uma Esterase Halofílica de *Haloarcula marismortui*

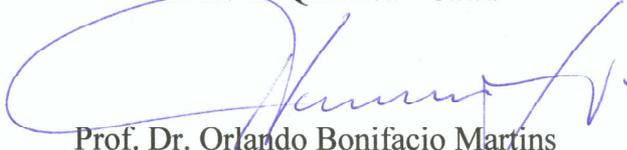
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger (Orientadora)  
Departamento de Química – UFPR

  
Prof. Dr. Luciano Fernandez Huergo  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Valente  
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Maria Guimarães Freire  
Instituto de Química - UFRJ

  
Prof. Dr. Orlando Bonifacio Martins  
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Curitiba, 19 de março de 2009

Dedico este trabalho à minha mãe que sempre me ajudou e apoiou nos momentos mais difíceis.

Por sua dedicação e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, que mesmo sem entender das mirabolantes estratégias da bioquímica e da biologia molecular, sempre me incentivou.

Aos meus orientadores:

À professora Nadia Krieger e aos professores Emanuel Maltempi de Souza e David Alexander Mitchell pelo companheirismo, incentivo, atenção e confiança. Por tudo que me ensinaram, e por terem preparado minha mente para o que ainda vou aprender sou muito grato a vocês.

Ao Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, e a todos os seus professores pesquisadores. Em especial ao professor Fabio de Oliveira Pedrosa, que permitiu que eu trabalhasse junto com o grupo e sempre se interessou por esse trabalho.

Aos funcionários do núcleo Dona Julieta Pie, Roseli Prado e Valter Antonio de Baura. A ajuda destas pessoas tão queridas e prestativas foi imprescindível.

A todos os colegas de laboratório. Em especial, aos colegas do laboratório do anexo por momentos de trabalho e descontração nas horas vagas: Anelis Marin, Arnaldo Glogauer, Bruno Aquino, Eduardo Balsanelli, Helisson Faoro, Marco Aurélio Schüler, Maria Augusta Schmidt, Michele Tadra, Stefania Petruziello e Viviane Martini. Ao amigo e doutorando Marco Antonio Seiki Kadowaki, pelas discussões e ajuda sobre estrutura de proteínas.

A professora Rose Adele Monteiro, pelos seus conselhos científicos e pessoais e a Dr. Fabiane Gomes de Moraes Rego pela amizade e incentivo.

Aos colegas do laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química. Em especial, a Dayane Alberton, por ser minha companheira de todos os dias, por me ajudar, me apoiar e me compreender. Sou muito feliz de ter você ao meu lado.

À Valéria Marta Gomes de Lima, por ter sido minha primeira supervisora ainda na iniciação científica, por ter me ajudado de forma decisiva a seguir a carreira científica e por ter me chamado a atenção em diversas vezes quando eu merecia; é uma pena que não esteja aqui trabalhando conosco.

Ao Dr. Frédéric Carrière chefe do Laboratório de Enzimologia Interfacial e Lipólise (EIPL) do CNRS de Marselha – França, por ter participado deste trabalho e ter me acolhido no seu laboratório durante o estágio de doutorado sanduíche. Além disso, por seus ensinamentos sobre estrutura e atividade de lipases e esterases.

Ao Dr. Stéphane Canaan do EIPL por sua supervisão tão próxima e compartilhamento de seus conhecimentos científicos.

A Dr. Sonia Longhi por ter participado das discussões deste trabalho, no auxílio com os espectros de dicroísmo circular, com a modelagem molecular e em especial por seus ensinamentos sobre estruturas protéicas intrinsecamente desordenadas.

Aos demais membros do EIPL, em especial, a Jorge Alberto Rodríguez González e Sylvie Fernandez, por terem sido minha família na França, nunca me esquecerei da cordialidade e ajuda que me prestaram. Também ao Dr. Vincent Arondel, Isabelle Douchet, Delphine Pucinelli, Rabeb Dhouib, Jean Claude Bakala N’Goma e Damien Maurin, por momentos de trabalho e descontração nas horas vagas.

Aos amigos que fiz na França e que não me esquecerei, Daniel Chehata, Daniela Mendoza, Marco Tarabini, Chiara Stefani, Badreddine Douzi, Adriana Piñeda Vasquez, Federico Andreoli, Astrid Wahl, Melissa Sivaneson, Benjamin Rocher e Nour Edinne.

Ao Dr. Tej Bhatnagar e Prof. Jacques C. Baratti pela recepção e ajuda na minha chegada a França.

À CAPES-COFECUB pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a professora Leda Satie Chubatsu, e aos professores Guilherme Lanzi Sasaki, Leonardo Magalhães Cruz, Luciano Fernandes Huergo e Wanderson Duarte da Rocha pela amizade e por sempre estarem dispostos a conversar e dar sugestões.

Aos amigos do departamento e aqueles que já passaram: em especial ao Lauro Mera de Souza, Rodrigo Otávio de Faria, Marcelo Calide Barga, Wellington Balmant, Graciele Viccini, Diogo Ducatti e todos aqueles que não citei o nome mas que sabem que foram igualmente importantes.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, representada em boa parte do período da tese pela Prof<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu e atualmente pelo Prof. Miguel Daniel Nosedá, igualmente a todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por nos estimularem e fazer deste Departamento um excelente lugar para se trabalhar.

À Senhora Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-graduação em Ciências: Bioquímica, pelos favores prestados diversas vezes.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de doutorado e concessão de taxa de bancada.

A todos que, de modo direto ou indireto, foram importantes para a realização deste trabalho e para meu amadurecimento científico deixo meu verdadeiro agradecimento.

Trate bem a terra. Ela não foi doada a você pelos seus pais.

Ela foi emprestada a você pelos seus filhos.

*Provérbio antigo do Quênia.*

## RESUMO

O gene *lipC* que codifica uma provável lipase/esterase de *Haloarcula marismortui*, uma arquea halofílica isolada do Mar Morto, foi clonado e superexpresso em *Escherichia coli*. A proteína recombinante (LipC – *Haloarcula marismortui* esterase) foi purificada e bioquimicamente caracterizada. Tanto a atividade enzimática de LipC como o seu enovelamento exibiram uma grande dependência da concentração de sal no meio. LipC apresentou preferência por ésteres lineares e monoacilgliceróis de cadeia curta e foi inibida pelos compostos E600 e PMSF, confirmando a identificação de LipC como uma serina carboxilesterase (E.C. 3.1.1.1). Além disso, LipC foi inibida pelo composto 7600, um inibidor com alta especificidade para esterases e lipases da família das lipases hormônio-sensíveis (HSL). Essa inibição confirmou os resultados obtidos pelo alinhamento de seqüências de aminoácidos que sugeriam que LipC pertencesse à família HSL. A atividade ótima de LipC foi obtida na presença de 3 mol.L<sup>-1</sup> de KCl e nenhuma atividade foi detectada na ausência de sal. Os experimentos de dicroísmo circular mostraram que LipC está totalmente desnaturada em meio sem sal e que suas estruturas secundárias começam a se formar na presença de 0,25 a 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de KCl. Quando KCl foi adicionado para concentração final de 2 mol.L<sup>-1</sup> a uma solução de LipC, a proteína foi capaz de recuperar 60% de sua atividade inicial. Um modelo estrutural comparativo de LipC foi construído e a superfície da proteína que é acessível ao solvente foi analisada, mostrando maior número de resíduos ácidos em paralelo com uma diminuição de resíduos básicos. Essa distribuição peculiar de cargas na superfície está de acordo com estruturas tridimensionais de proteínas halofílicas já determinadas e permite uma estabilidade ótima da proteína em ambientes com alta concentração de sal. Este trabalho descreve pela primeira vez a caracterização bioquímica de uma esterase oriunda de uma arquea halofílica, sendo assim, ele representa um primeiro esforço no sentido de se conhecer mais sobre a atividade e a estrutura destas enzimas e igualmente gerar uma base de estudos para suas aplicações no futuro.

## ABSTRACT

The *lipC* gene encoding for an esterase from *Haloarcula marismortui*, a halophilic archaeon from the Dead Sea, was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the recombinant protein (LipC) was biochemically characterized. LipC exhibits a preference for short chain fatty acids and monoesters, and is inhibited by E600 and PMSF, supporting its identification as a serine carboxylesterase (E.C. 3.1.1.1). Moreover, LipC was inhibited by the compound 7600, an inhibitor with a high specificity for the esterases and lipases of the hormone-sensitive lipase (HSL) family. This finding confirmed analysis obtained from sequence alignments, which suggested that LipC belongs to the HSL family. The enzymatic activity of LipC was shown to exhibit a salt-dependency through a salt-dependent folding. The LipC activity was highest in the presence of 3 mol.L<sup>-1</sup> KCl and no activity was detected in the absence of salts. Far-UV circular dichroism showed that LipC is totally unfolded in salt-free medium and that secondary structure starts to appear in the presence of 0.25-0.5 mol.L<sup>-1</sup> KCl. Following salt depletion, the protein was able to recover 60% of its initial activity when KCl was added at a final concentration of 2 mol.L<sup>-1</sup>. A 3D model of LipC was built. An analysis of the properties of the accessible surface of the modeled protein identified an enrichment in acidic residues paralleled by a depletion in basic residues. This peculiar charge repartition at the surface agrees with 3D structures of other halophilic proteins and allows a better stability of the protein in a high salt environment. This is the first time that the activity of an esterase from a halophilic archaeon has been described. The present work lays the basis for future studies of possible applications of such enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	DIVISÃO DO DOMÍNIO ARCHAEA E SUAS PRINCIPAIS FAMÍLIAS.....	17
FIGURA 02 -	MODELO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA GLUCOSE DESIDROGENASE DE <i>Haloferax mediterranei</i> .....	22
FIGURA 03 -	HIDRÓLISE DE LIGAÇÃO ÉSTER CATALISADA POR LIPASES OU CARBOXILESTERASES.....	26
FIGURA 04 -	HIDRÓLISE DE TRIACETINA PELA LIPASE PANCREÁTICA E ESTERASE HEPÁTICA DE PORCO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....	27
FIGURA 05 -	MECANISMO CATALÍTICO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....	29
FIGURA 06 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DOBRAMENTO $\alpha/\beta$ HIDROLASE.....	30
FIGURA 07 -	MODELO DA REPULSÃO PELA CATAPULTA ELETROSTÁTICA RESPONSÁVEL PELA RÁPIDA EJEÇÃO DO PRODUTO DO SÍTIO ATIVO.....	32
FIGURA 08 -	ESTRATÉGIA APLICADA NESTE TRABALHO.....	35
FIGURA 09 -	PLASMÍDEOS UTILIZADOS PARA CLONAGEM DO GENE <i>lipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	42
FIGURA 10 -	PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTRUÍDOS NESTE TRABALHO.....	43
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE RECOMBINAÇÃO NO SISTEMA DE CLONAGEM GATEWAY.....	48
FIGURA 12 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA OXADIAZOLONA INIBITÓRIA - COMPOSTO 7600.....	60
FIGURA 13 -	ESTRUTURA QUÍMICA DOS INIBIDORES PMSF E E600.....	61
FIGURA 14 -	REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO ÉSTER BUTIRATO DE VINILA.....	62
FIGURA 15 -	REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO ÉSTER BUTIRATO DE <i>p</i> -NITROFENILA.....	63
FIGURA 16 -	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE LipC COM SEQÜÊNCIAS DE ENZIMAS DA FAMÍLIA DAS LIPASES HORMÔNIO-SENSÍVEIS.....	71
FIGURA 17 -	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE LipC COM OLIGOPEPTIDASES DE ARQUEA.....	73
FIGURA 18 -	TOPOLOGIA DA ESTRUTURA DA ACILPEPTÍDEO HIDROLASE DE <i>Aeropyrum pernix</i> .....	74
FIGURA 19 -	DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>lipC</i> EM <i>Escherichia coli</i> POR IMMUNOBLOT.....	82
FIGURA 20 -	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DE LipC PURIFICADA POR CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE E SUPEREXPRESSA A PARTIR DO	

	PLASMÍDEO pDEST14/lipC.....	85
FIGURA 21 -	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DO TESTE DE EXPRESSÃO DE LipC EM <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pET-14b/lipC.....	86
FIGURA 22 -	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES SOLÚVEL E INSOLÚVEL DE LipC EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pET14b/lipC.....	87
FIGURA 23 -	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DE LipC PURIFICADA POR AFINIDADE E INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.....	90
FIGURA 24 -	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS NA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	93
FIGURA 25 -	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA RENATURAÇÃO DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> ..	96
FIGURA 26 -	ANÁLISE CINÉTICA DA RENATURAÇÃO DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	97
FIGURA 27 -	ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE SAL.....	100
FIGURA 28 -	ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE SAL.....	101
FIGURA 29 -	EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	103
FIGURA 30 -	TERMOESTABILIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	105
FIGURA 31 -	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> POR INIBIDORES SERÍNICOS.....	111
FIGURA 32 -	MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	119
FIGURA 33 -	GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA O MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	121
FIGURA 34 -	ANÁLISE DE DESORDEM NA SEQÜÊNCIA DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	123
FIGURA 35 -	REPRESENTAÇÃO DA SUPERFÍCIE ELETROSTÁTICA DO MODELO DE LipC.....	125

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....	39
TABELA 02 -	MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	40
TABELA 03 -	ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES DE USO.....	41
TABELA 04 -	ESQUEMA UTILIZADO NA TRIAGEM DE SUPEREXPRESSION DO GENE <i>lipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> EM <i>Escherichia coli</i> .....	53
TABELA 05 -	GENES DE LIPASES/ESTERASES E FOSFOLIPASES PUTATIVAS ENCONTRADOS NOS GENOMAS DE <i>Haloarcula marismortui</i> E <i>Natronomonas pharaonis</i> .....	68
TABELA 06 -	ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADA PELO GENE <i>lipC</i> .....	69
TABELA 07 -	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DA SEQÜÊNCIA DE <i>LipC</i> E SEQÜÊNCIAS RELACIONADAS ENCONTRADAS PELO BLAST.....	76
TABELA 08 -	GENES PARÁLOGOS E ORTÓLOGOS AO GENE <i>lipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	77
TABELA 09 -	ANÁLISE DOS RESULTADOS DE TRIAGEM DE EXPRESSÃO DE <i>lipC</i> EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> .....	83
TABELA 10 -	ANÁLISE DOS RESULTADOS DE TRIAGEM DE EXPRESSÃO DE <i>lipC</i> PELA DETERMINAÇÃO DOS ESCORES ACUMULADOS.....	84
TABELA 11 -	PURIFICAÇÃO DE <i>LipC</i> RECOMBINANTE.....	89
TABELA 12 -	ATIVIDADE CATALÍTICA DE <i>LipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS.....	107
TABELA 13 -	ESTABILIDADE DE <i>LipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> FRENTE A SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA.....	114
TABELA 14 -	ESTRUTURAS MOLDES ENCONTRADAS PARA A MODELAGEM DE <i>LipC</i> DE <i>H. marismortui</i> .....	118
TABELA 15 -	ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E DA SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE DO MODELO DE <i>LipC</i> E EST2.....	126

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

7600	5-metóxi-3-(4-fenóxifenil)-3H-[1,3,4]oxadiazol-2-ona
Å	angstrom
Abs.	Absorvância
Abs. <sub>410</sub>	Absorvância a 410 nm
Amp	Ampicilina
Amp <sup>R</sup>	Ampicilina resistente
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
a <sub>w</sub>	Atividade de água
BLAST	<i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i>
BSA	albumina de soro bovino
Cm	Cloramfenicol
Cm <sup>R</sup>	Cloramfenicol resistente
Da	dalton
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleosídeos trifosfato
DO	Densidade ótica
DO <sub>600</sub>	Densidade ótica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
E600	Dietil- <i>p</i> -nitrofenil fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
× g	aceleração
GenBank	Banco de seqüências de genes e proteínas do <i>National Institutes of Health</i> (EUA)
HCCA	ácido α-ciano-4-hidroxiamínico
Hm GlcD	Glucose desidrogenase de <i>Haloferax mediterranei</i>
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilodalton
KEGG	enciclopédia Kyoto de genes e genomas
Km	Canamicina
Km <sup>R</sup>	Canamicina resistente
kΩ	quiloohms
kV	quilovolts
MALDI-ToF	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de Vôo
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NORS	<i>non regular secondary structure</i>
ORF	região codificadora de proteína
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPB	<i>p</i> -nitrofenol butirato
pI	ponto isoelétrico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila

RNase A	Ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Sm	estreptomicina
Sm <sup>R</sup>	estreptomicina resistente
TAT	sistema de translocação de argininas geminadas
tRNA	ácido ribonucléico transportador
t <sub>1/2</sub>	tempo de meia vida
Tris	Tris hidróxi-metil-aminometano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 MICRORGANISMOS HALOFÍLICOS .....	16
2.2 <i>Haloarcula marismortui</i> .....	18
2.3 ENZIMAS HALOFÍLICAS .....	19
2.4 ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS HALOFÍLICAS .....	20
2.5 BIOCATÁLISE E ENZIMAS HALOFÍLICAS .....	23
2.6 CARACTERÍSTICAS CATALÍTICAS E MOLECULARES DE ESTERASES E LIPASES .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 ESTRATÉGIA DO TRABALHO .....	35
4.2 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO GENE <i>LIPC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> . ....	36
4.2.1 KEGG.....	36
4.2.2 BLAST .....	36
4.2.3 Análise de Domínios Conservados .....	37
4.2.4 Análise de Seqüência Peptídeo Sinal e Domínios Transmembrana .....	38
4.3 MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANTIBIÓTICOS.....	38
4.3.1 Microrganismos.....	38
4.3.2 Meios de Cultivo.....	40
4.3.3 Condições de Cultivo .....	40
4.3.4 Antibióticos.....	41
4.4 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	41
4.4.1 Plasmídeos .....	41
4.4.2 Transformação Bacteriana .....	44
4.4.2.1 Preparo de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente .....	44
4.4.2.2 Transformação por eletrochoque .....	45
4.4.3 Purificação de Plasmídeos por Lise Alcalina.....	45
4.4.4 Eletroforese de DNA em Gel de Ágar ou Agarose .....	46
4.4.5 Reações com Enzimas de Restrição.....	46
4.4.6 Extração do DNA genômico de <i>Haloarcula marismortui</i> .....	47
4.4.7 Clonagem do gene <i>lipC</i> de <i>Haloarcula marismortui</i> .....	47
4.4.7.1 Clonagem Utilizando Sistema Gateway .....	48
4.4.7.2 Clonagem do gene <i>lipC</i> de <i>Haloarcula marismortui</i> em pET-14b .....	50
4.4.8 Reação de Ligação do gene <i>lipC</i> em pET-14b.....	51
4.4.9 Triagem de Plasmídeos Recombinantes por <i>Rapid Prep</i> .....	52
4.5 SUPEREXPRESSÃO DO GENE <i>lipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> EM <i>Escherichia coli</i> .....	52
4.5.1 Triagem de Superexpressão com Anticorpos Anti-cauda de Histidinas ....	52
4.5.2 Superexpressão do gene <i>lipC</i> em <i>E. coli</i> a partir do vetor pET14b/ <i>lipC</i> ....	54
4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	55
4.7 SEQÜENCIAMENTO N - TERMINAL DE PEPTÍDEOS .....	56
4.8 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	56
4.9 ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR .....	57
4.10 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	58

4.10.1 Efeito da Concentração Salina na Atividade .....	58
4.10.2 Efeito da Concentração Salina na Recuperação da Atividade .....	58
4.10.3 Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima .....	58
4.10.4 Efeito do pH na Atividade Enzimática .....	59
4.10.5 Especificidade ao Substrato .....	59
4.11 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....	60
4.12 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> FRENTE A SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA .....	61
4.13 OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	62
4.13.1 Ensaio de Determinação de Atividade Enzimática .....	62
4.13.1.1 Método Titulométrico .....	62
4.13.1.2 Método Espectrofotométrico .....	63
4.13.2 Determinação da Concentração de Proteínas pelo Método de Bradford .....	64
4.13.3 Eletroforese Desnaturante de Proteínas .....	64
4.14 MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	65
4.15 VALIDAÇÃO DO MODELO MOLECULAR .....	66
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
5.1 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO GENE <i>lipC</i> DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	67
5.2 CLONAGEM E SUPEREXPRESSION DE <i>lipC</i> .....	80
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	92
5.4.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SAL NA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	92
5.4.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NO GRAU DE ENOVELAMENTO DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	98
5.4.3 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	102
5.4.4 TERMOESTABILIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	104
5.4.5 ATIVIDADE CATALÍTICA DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS .....	106
5.4.6 EFEITO DE INIBIDORES SERÍNICOS NA ATIVIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	110
5.5 ESTABILIDADE DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> FRENTE A SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA .....	113
5.6 MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE <i>Haloarcula marismortui</i> .....	117
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	129
<b>7 TRABALHOS FUTUROS</b> .....	131
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	132

## 1 INTRODUÇÃO

A procura por enzimas que sejam capazes de se adaptar a condições não-convencionais de catálise, como, por exemplo, altas temperaturas e presença de solventes orgânicos, é cada vez maior (FERRER *et al.*, 2007). Algumas enzimas podem apresentar uma extraordinária resistência e, também ser ativas em solventes orgânicos e altas temperaturas. Em meios de solventes orgânicos, ou seja, em baixa concentração de água livre, as lipases e esterases, por exemplo, catalisam reações de esterificação que são de grande interesse para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002).

Entretanto, a atividade e a estabilidade da maioria das enzimas em meios aquo-restritos, compostos principalmente por solventes polares, são menores se comparada àquelas apresentadas em meios aquosos, sendo esta uma dificuldade na substituição dos catalisadores químicos por enzimas (BURTON; COWAN; WOODLEY, 2002). Muito disto deve-se ao fato de que os solventes orgânicos causam interferência nas interações químicas na estrutura das proteínas e também no padrão de solvatação, levando-as à perda da sua conformação cataliticamente ativa (EPPLER *et al.*, 2006). Modificações moleculares já foram propostas para aumentar a estabilidade das enzimas em solventes orgânicos, no entanto, do ponto de vista econômico trazem maior custo para o processo e muitas vezes não são tão eficientes no aumento da estabilidade (HUDSON; EPPLER; CLARK, 2005). A imobilização em diferentes tipos de suportes também é vista como uma alternativa viável, no entanto, é uma etapa que eventualmente pode modificar as propriedades catalíticas da enzima devido a fatores de interação da enzima com o suporte, impedimento estérico, fenômenos de difusão e eletrostáticos dependendo da natureza do suporte (KHEIROLOMOOM; KHORASHEH; FAZELINIA, 2002). Outra possibilidade é a utilização de enzimas na forma de pó liofilizado; sabe-se que na forma liofilizada as enzimas adquirem uma camada de hidratação externa que as protege da desnaturação ao longo da reação (HALLING, 2000). Entretanto, o processo de liofilização em larga escala pode representar um alto custo econômico e energético ao processo. Portanto, o ideal seria encontrar enzimas que naturalmente

fossem estáveis a solventes orgânicos, sem exigir qualquer etapa prévia de modificação molecular.

Com este objetivo, diferentes abordagens são utilizadas para a obtenção de novos biocatalisadores, que possam ser mais bem adaptados a solventes orgânicos. Entre elas estão: 1) a evolução dirigida de genes de enzimas já conhecidas; 2) a triagem de bibliotecas metagenômicas e 3) a busca na biodiversidade por microrganismos produtores de enzimas com propriedades especiais.

Dentro da última abordagem, encontramos a busca dentre os microrganismos halofílicos, ou seja, aqueles que obrigatoriamente colonizam ambientes com alta concentração salina (acima de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Estes microrganismos produzem enzimas conhecidas como halofílicas, que são naturalmente adaptadas a trabalhar em um ambiente com baixa concentração de água livre, o que pode ser uma propriedade importante para a manutenção da atividade e estabilidade em solventes orgânicos. As enzimas halofílicas ainda não foram plenamente estudadas, principalmente no que diz respeito à sua aplicação em sistemas de catálise não-convencional (ou sistemas orgânicos, onde o teor de água livre é muito baixo).

Portanto, este trabalho é um primeiro esforço para verificar o desempenho de uma enzima halofílica em sistemas de biocatálise, reportando-se a clonagem, superexpressão em *Escherichia coli*, a purificação e a caracterização bioquímica de uma carboxilesterase não-lipolítica de *Haloarcula marismortui*, uma arquea halofílica isolada do Mar Morto. Os resultados a serem apresentados são promissores e abrem o caminho para se estudar detalhadamente a relação estrutura-função e estrutura-estabilidade de uma esterase halofílica em meios de solventes orgânicos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MICRORGANISMOS HALOFÍLICOS

As águas de salinas constituem uma das mais extremas condições de vida na Terra (PAŠIĆ *et al.*, 2005). Por exemplo, a concentração de NaCl em uma salina pode ser até dez vezes maior do que a concentração deste mesmo sal na água do mar (250 - 300 g.L<sup>-1</sup>) (OREN, 1994; BHATNAGAR *et al.*, 2005). Nestes ambientes, somente alguns microrganismos são capazes de se adaptar e crescer. Os ambientes hipersalinos são comumente habitados por microrganismos halofílicos, entre eles, as arqueas halofílicas da família *Halobacteriaceae* (OREN, 2002) e em menor porcentagem, por algumas bactérias (ANTÓN *et al.*, 2000), fungos (KOGĀJ *et al.*, 2004) e protistas halofílicos (ESTEBAN; FINLAY, 2003).

Nesta revisão, serão abordadas as arqueas halofílicas da família *Halobacteriaceae*, que são os microrganismos envolvidos neste trabalho. Também será feita uma distinção entre os termos Archaea e arquea, sendo Archaea aplicada para se referir ao domínio constituído por estes microrganismos e arquea o termo para se referir a somente um membro do domínio.

Atualmente, todos os organismos vivos são divididos em três domínios: Eukarya, Bacteria e Archaea. O domínio Archaea foi proposto por Woese, Kandler e Wheelis (1990) a partir de estudos de análise filogenética com padrões de migração eletroforética diferencial de rRNA 16S. Este domínio está dividido em quatro filos, sendo estes: Crenarcheota, Euryarcheota, Nanoarcheota e Korarcheota (Figura 1). A família *Halobacteriaceae* faz parte do filo Euryarcheota e contém, até o momento, 26 gêneros e 91 espécies (OREN, 2008).

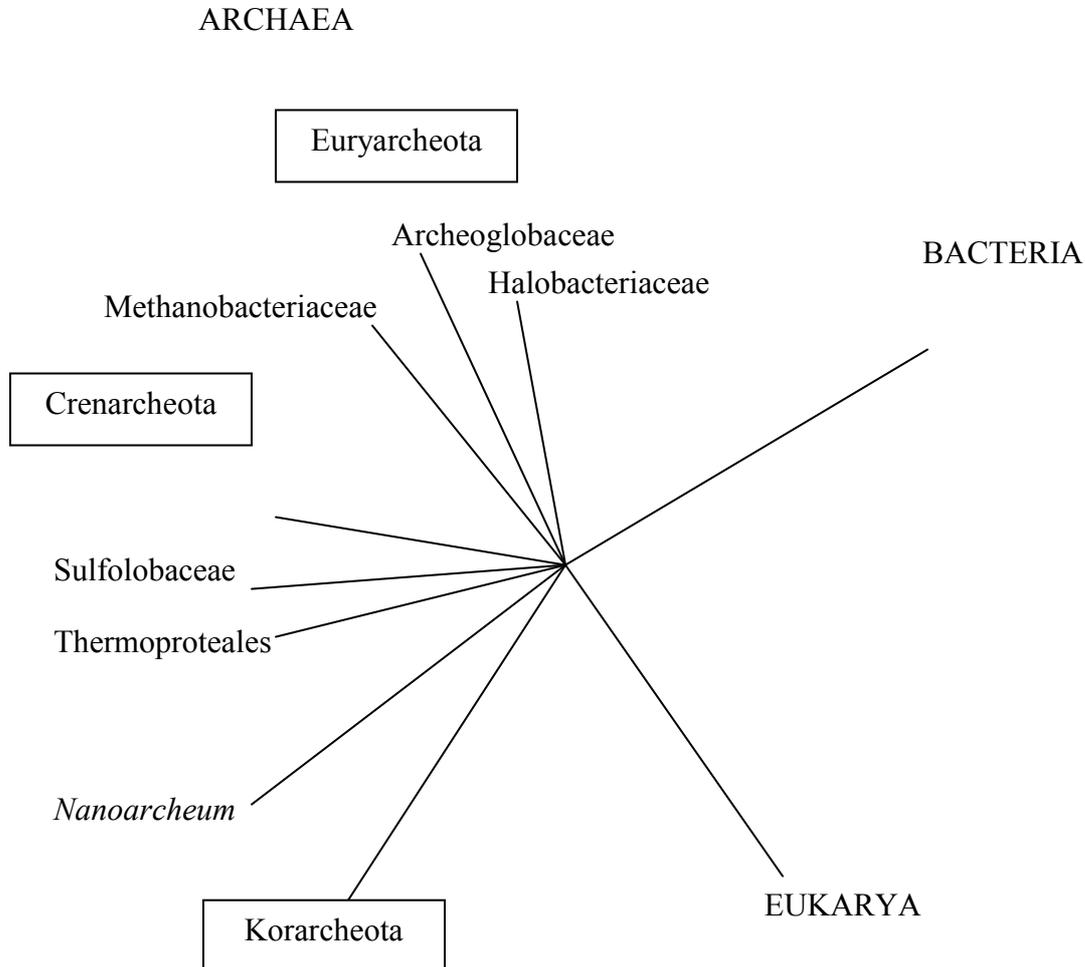


FIGURA 1 – DIVISÃO DO DOMÍNIO ARCHAEA E SUAS PRINCIPAIS FAMÍLIAS.

Árvore filogenética mostrando os quatro filios do reino Archaea e suas principais famílias. Adaptado de CIARAMELLA; PISANI; ROSSI, 2002.

A principal característica das arqueas halofílicas é a produção de pigmentos carotenóides, por exemplo,  $\alpha$ -bacterioruberina e outros derivados com cadeias acima de 50 carbonos (OREN, 2002). Estes compostos são encontrados na membrana e, em alguns casos, podem estar ligados a proteínas de membrana, denominadas rodopsinas (OREN, 2002). São conhecidos três tipos de rodopsinas em arqueas halofílicas: 1) bacteriorodopsina (associada a uma bomba de prótons); 2) halorodopsina (associada a uma bomba de cloro) e 3) rodopsinas fotosensoras (participam do mecanismo de fototaxia) (OESTERHELT, 1998). Através destas

rodopsinas, as arqueas halofílicas são capazes de contrabalançar as altas concentrações extracelulares de sal, acumulando KCl no interior da célula em concentrações próximas da saturação (OREN, 1994). Devido à alta concentração de KCl, a atividade de água ( $a_w$ ) no citoplasma é relativamente baixa, quando comparada a um citoplasma de um microrganismo mesofílico. Portanto, as enzimas produzidas por arqueas halofílicas necessitaram desenvolver mecanismos moleculares de adaptação à falta de água livre (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000).

## 2.2 *Haloarcula marismortui*

*H. marismortui* é uma arquea da família *Halobacteriaceae*, isolada do Mar Morto e que requer alta concentração salina para crescer (OREN *et al.*, 1990). Esta arquea foi primeiramente classificada como *Flavobacterium* (ou *Halobacterium*) *marismortui* por Benjamim Elazari Volcani em seus estudos pioneiros na Universidade Hebráica de Jerusalém, na década de 40 (OREN; VENTOSA, 1999). Em 1990, Oren *et al.* publicaram uma reclassificação desta mesma arquea, sugerindo o nome *Haloarcula marismortui* já que esta se diferenciava das demais espécies classificadas no gênero *Halobacterium* (OREN *et al.*, 1990).

*H. marismortui* requer no mínimo  $1,7 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl para crescer, porém a concentração ótima para o seu crescimento é de  $3,4$  a  $3,9 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl. A temperatura ótima para o seu crescimento é de  $40$  a  $50^\circ\text{C}$ . Esta arquea é aeróbica organotrófica e utiliza várias fontes de carbono, tais como glucose, frutose, xilose, sacarose, glicerol, acetato, (succinato e malato); porém, também pode crescer em anaerobiose na presença de nitrato (OREN *et al.*, 1990).

Em 2004, o genoma desta arquea foi seqüenciado e publicado (BALIGA *et al.*, 2004). Analisando o genoma de *H. marismortui* ATCC 43049, foi encontrada a ORF *rrnAC0088* originalmente anotada como *lipC*, que codificaria para uma provável lipase ou uma esterase. Uma análise dos domínios conservados feita pelos programas PROSITE (SIGRIST *et al.*, 2002; HULO *et al.*, 2007) e Pfam (FINN *et al.*,

2008), mostrou que de fato, a partir da seqüência de aminoácidos, existia um domínio esterase conservado na proteína. Este é um domínio bem conservado e que também aparece em outras esterases e lipases já caracterizadas (PLEISS *et al.*, 2000; FISCHER; PLEISS, 2003). Entretanto, até aquele momento não havia resultados experimentais que mostrassem claramente que esta *ORF* codificaria de fato uma lipase ou esterase.

### 2.3 ENZIMAS HALOFÍLICAS

MADERN *et al.* (2000) classificaram as enzimas halofílicas como aquelas que são extraídas de microrganismos que requerem altas concentrações de sal para crescerem. Nestas condições, existem três principais grupos de microrganismos: (1) arqueas halofílicas aeróbicas; (2) arqueas halofílicas anaeróbicas metanogênicas e (3) bactérias halofílicas (KAMEKURA, 1998). O grupo que tem o maior número de proteínas purificadas e estudadas é o grupo das *Halobacteriaceae*, composto, na sua maior parte, por arqueas halofílicas aeróbicas.

A principal propriedade da estrutura primária das enzimas halofílicas é o alto número de resíduos de aspartato e glutamato (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000). MADERN *et al.* (1995) fizeram uma análise estatística da estrutura primária de 26 proteínas produzidas por microrganismos halofílicos e encontraram um alto teor de aspartato e glutamato, um baixo teor de lisina e maior freqüência de aminoácidos hidrofóbicos pequenos (glicina, alanina e valina). Esta parece ser uma propriedade que ocorre em grande parte das proteínas halofílicas, no entanto, o número de proteínas halofílicas com estrutura tridimensional resolvida ainda é pequeno, necessitando mais estudos estruturais para que se possa entender melhor a adaptação halofílica.

Além do interesse em se estudar os artifícios moleculares que estas proteínas desenvolveram para resistir a tal concentração de sal, outro importante aspecto diz respeito a sua estabilidade em solventes orgânicos. Por exemplo, uma solução saturada de NaCl, que é o principal ambiente das arqueas halofílicas, tem um  $a_w$

comparado a uma mistura de DMF (dimetilformamida) com água a 60 % (v/v), resultando em um valor igual a 0,75. Isto fez com que alguns autores sugerissem que enzimas halofílicas podem ter desempenhos melhores em solventes orgânicos, pois seriam mais estáveis que enzimas mesófilas nestas condições (ADAMS; PERLER; KELLY, 1995; SELLEK; CHAUDHURI, 1999; EICHLER, 2001). A maior estabilidade pode ser justificada pelo fato de enzimas halofílicas possuírem camadas de solvatação em que a água não está interagindo diretamente com a proteína, mas sim por complexos de íons hidratados (DANSON; HOUGH, 1997; MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000; EBEL; ZACCAI, 2004, GLOSS *et al.*, 2008). Portanto, esta camada de solvatação poderia interagir mais fortemente com a proteína e assim manter a sua estrutura nativa por mais tempo na presença de solventes orgânicos.

## 2.4 ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS HALOFÍLICAS

Algumas estruturas tridimensionais de proteínas halofílicas já foram resolvidas através de difração de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN). Alguns exemplos são: a malato desidrogenase de *H. marismortui* (E.C. 1.1.1.37) (DYM; MEVARECH; SUSSMAN, 1995; IRIMIA *et al.*, 2003), a ferredoxina de *H. marismortui* (FROLOW *et al.*, 1996), a glucose desidrogenase de *Haloferax mediterranei* (E.C. 1.1.1.47) (BRITTON *et al.*, 2006), a dihidrofolato redutase de *Haloferax volcanii* (E.C. 1.5.1.3) (PIEPER *et al.*, 1998; BINBUGA *et al.*, 2007), a nucleosídeo difosfato quinase de *Halobacterium salinarum* (E.C. 2.7.4.6) (BESIR *et al.*, 2005), uma flavoproteína de *Halobacterium salinarum* denominada dodecina (BIEGER; ESSEN; OESTERHELT, 2003), a amilase de *Halothermothrix orenii* (E.C. 3.2.1.1) (SIVAKUMAR *et al.*, 2006), a catalase-peroxidase de *H. marismortui* (E.C. 1.11.1.6) (YAMADA *et al.*, 2002) e a bacteriorodopsina de *Halobacterium salinarum* (MITSUOKA *et al.*, 1999).

De todas as estruturas de proteínas halofílicas já resolvidas, a que atingiu a melhor resolução através de difração de raios X, e que trouxe maior informação estrutural, foi a estrutura da glucose desidrogenase de *H. mediterranei* (Hm GlcD).

Os resultados obtidos com a resolução da estrutura de Hm GlcD confirmaram alguns resultados que já eram esperados como o enriquecimento de resíduos carregados negativamente na superfície (Figura 2A). Além disso, com uma resolução de 1,6 Å, os autores puderam descrever com maior detalhe a camada de solvatação em torno da superfície da proteína. Os resultados apontaram que esta enzima tem o maior grau de hidratação quando comparada às demais proteínas do PDB (*Protein Data Bank*) com estruturas resolvidas com resoluções entre 1,65 a 1,55 Å. Além disso, também foi observado que a relação entre o fator B das moléculas de água e o fator B dos átomos da proteína era menor se comparada às demais proteínas do PDB. O fator B, também chamado de fator Debye-Waller ou fator de temperatura, é conhecido em estudos estruturais de proteínas como um valor que aponta a diminuição da intensidade da difração de raios X causada pela desordem no cristal, que muitas vezes é causada pela agitação térmica (BLOW, 2001). Portanto, o fator B pode ser interpretado como o grau de mobilidade de uma molécula na rede cristalina: quanto maior o fator B de uma molécula, maior será sua mobilidade. No caso da Hm GlcD, o fato de que o fator B das moléculas de água na sua superfície sejam menores do que o fator B usual, sugere uma organização especial destas moléculas de água na camada de solvatação, de acordo com BRITTON *et al.* (2006). De fato, os autores determinaram que a primeira camada de solvatação da proteína está em grande parte arranjada em anéis pentagonais, sendo que foram encontrados agregados de 15 anéis pentagonais de moléculas de água interagindo entre si em 10 sítios da proteína (Figura 2C). Surpreendentemente, somente cinco íons  $K^+$  interagem com a Hm GlcD quando se esperava uma superfície rica em íons  $K^+$  devido a alta concentração de sal no meio. No entanto, os autores sugerem que a presença de outros sítios móveis de ligação a  $K^+$  não pode ser descartada.

Apesar de esta estrutura ser a única entre as proteínas halofílicas resolvidas com resolução suficiente para se observar a camada de solvatação em detalhes, sabe-se que o alto grau de hidratação é um fator preponderante para manter suas estruturas nativas em alta concentração de sal (MADERN *et al.*, 2000). Futuramente, novas estruturas com resoluções superiores e experimentos de enovelamento estrutural aplicando RMN poderão trazer mais conhecimento para se entender melhor o mecanismo de adaptação à alta concentração de sal, ou halofilia.

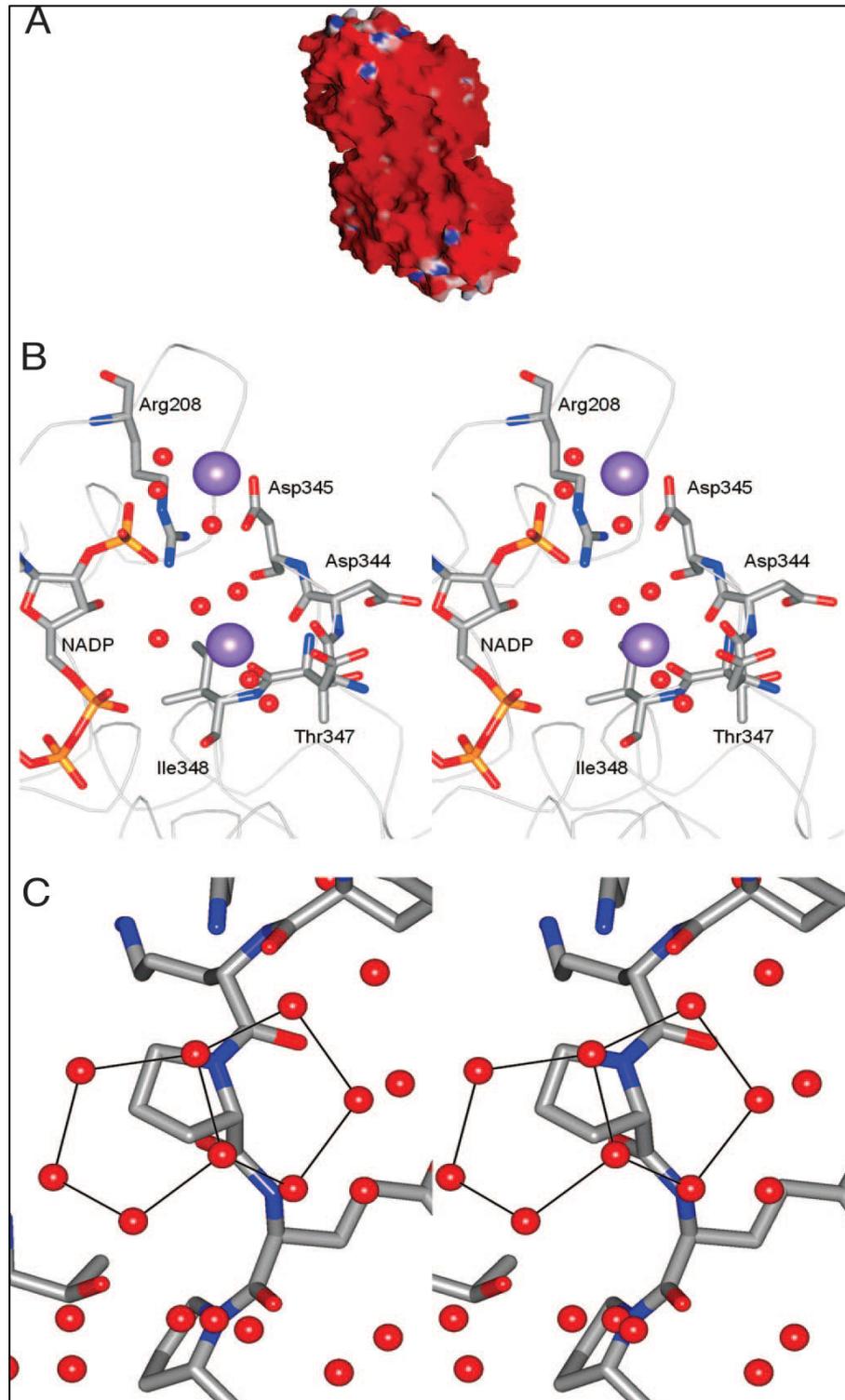


FIGURA 2 – MODELO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA GLUCOSE DESIDROGENASE DE *Haloferax mediterranei*. Fonte: Britton *et al.*(2006).

(A) Superfície eletrostática do dímero de Hm GlcD; cargas negativas em vermelho e cargas positivas em azul. (B) Visão do sítio de ligação de dois íons  $K^+$  (esferas em lilás), moléculas de água são representadas por esferas vermelhas e o NADP é visto interagindo juntamente com o sítio de ligação a  $K^+$ . (C) Arranjo de moléculas de água em anéis pentagonais ao redor de resíduos de prolina.

## 2.5 BIOCATÁLISE E ENZIMAS HALOFÍLICAS

Entende-se por biocatálise todos os processos biotecnológicos que usam catalisadores biológicos em etapas de conversão química. Estes catalisadores são, em geral, enzimas ou células inteiras de microrganismos. Além disso, também foram relatadas na literatura reações catalisadas por anticorpos e um tipo específico de RNA conhecido como RNA catalítico (WALSH, 2001).

Um grande impulso foi dado à biocatálise quando se descobriu a possibilidade de utilizar enzimas para catalisar um grande número de reações em meios não-convencionais, como solventes orgânicos (KLIBANOV, 2001). Isto foi possível através das observações, inicialmente feitas pelo grupo de Alexander M. Klibanov, que enzimas imobilizadas ou liofilizadas catalisavam reações que não ocorreriam em meio aquoso (ZAKS; KLIBANOV, 1985, 1988). Por exemplo, a síntese de um éster por uma lipase (triacilglicerol éster hidrolase, E.C 3.1.1.3) que, em meio aquoso, hidrolisa diversos ésteres. Além disso, outras vantagens são apresentadas, como o reconhecimento de uma grande variedade de substratos, atividade catalítica assimétrica enantiosseletiva e regioseletiva, diminuição de reações laterais e, principalmente, catálise efetiva em condições energéticas brandas (KRIEGER *et al.*, 2004).

Apesar de todo o conhecimento que vem sendo produzido na área, poucos processos têm chegado à escala industrial (SCHMID *et al.*, 2001). Muito disto deve-se a alguns problemas que não foram ainda inteiramente solucionados, como catálise lenta contra substratos não-naturais, baixa estabilidade, pouca atividade em meios não aquosos e/ou requerimento de cofatores de custo elevado (FARINAS *et al.*, 2001, SCHMID *et al.*, 2001; SCHOEMAKER *et al.*, 2003).

Existem diferentes abordagens para a procura de enzimas que consigam se adaptar às condições utilizadas em biocatálise. A mais conhecida e utilizada é a bioprospeção de microrganismos isolados de diferentes ambientes. Também vêm sendo utilizadas a evolução dirigida de biocatalisadores e a triagem de bibliotecas metagênicas (LUETZ *et al.*, 2008, STEELE *et al.*, 2009).

Um grupo de microrganismos importantes para a bioprospecção de enzimas são os extremófilos, microrganismos que se adaptam a condições extremas para a vida. O domínio Archaea constitui a maior parte dos extremófilos, dentre os quais estão as arqueas halofílicas. Alguns trabalhos, envolvendo sistemas de biocatálise e, que avaliaram principalmente a atividade e estabilidade das enzimas produzidas por estes microrganismos, já foram publicados.

Lanyi e Steveson (1969) avaliaram a estabilidade da catalase de *Halobacterium cutirubrum* na presença de DMSO (dimetilsulfóxido) e observaram que concentrações como  $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$  deste solvente foram capazes de ativar a enzima e, mesmo com  $5 \text{ mol.L}^{-1}$ , a enzima ainda manteve 100% da sua atividade. Por outro lado, a protease de *Haloferox mediterranei* na presença de 10% (v/v) de n-propanol manteve apenas 1% de sua atividade, enquanto que com 10% (v/v) de DMF, 30% da atividade foi mantida (STEPANOV *et al.*, 1992). Ryu *et al.* (1994) avaliaram a atividade da protease de *Halobacterium halobium* na presença de 80% de DMF:água (v/v) e encontraram que, além da enzima ter mantido sua atividade, ainda houve uma ativação de cerca de 80 vezes da atividade esterásica em relação à atividade amidase.

O sistema de micelas reversas também é uma possibilidade para aplicação de enzimas halofílicas em meios de solventes orgânicos, pois parece que, mesmo em baixas concentrações de sais, estas são ativas neste sistema. As micelas reversas são compostas por um surfactante dissolvido em um solvente apolar, onde a enzima não está diretamente em contato com o solvente, porém solubilizada em tampão aquoso localizado no interior da micela (CARVALHO; CABRAL, 2000). Marhuenda-Egea *et al.* (2000) solubizaram a *p*-nitrofenilfosfatase alcalina (*p*NPPase) de *Halobacterium salinarum* em um sistema de micelas reversas. Na presença de tampão com  $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl, a enzima mostrou maior estabilidade à temperatura que em sistema aquoso, além de manter sua atividade e os parâmetros cinéticos inalterados (MARHUENDA-EGEA *et al.*, 2000). Testando a atividade da malato desidrogenase de *H. salinarum* no mesmo meio de micelas reversas, encontrou-se que, mesmo em baixa concentração salina ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl), a enzima foi capaz de manter sua atividade. No entanto, quando a atividade foi testada somente em tampão, com a mesma concentração salina, nenhuma atividade

foi verificada (PIERA-VELÁZQUEZ *et al.*, 2001). Os autores não propuseram uma explicação para tal efeito e até o momento nada foi encontrado na literatura.

Apesar de estes trabalhos apontarem a viabilidade da utilização de enzimas halofílicas em solventes orgânicos, até o momento, nenhuma esterase/lipase de um microrganismo halofílico foi testada em sistemas de biocatálise.

## 2.6 CARACTERÍSTICAS CATALÍTICAS E MOLECULARES DE ESTERASES E LIPASES

Esterases ou ainda esterases não-lipolíticas (E.C. 3.1.1.1) e lipases (E.C. 3.1.1.3 – triacilglicerol hidrolases) são ambas pertencentes a uma grande família de enzimas denominadas de carboxilesterases. Ambas são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de ligações do tipo éster como representado na Figura 3. No entanto, a diferenciação entre estas enzimas não é simples. Normalmente é aceito que esterases hidrolisam ligações éster em ésteres e triacilgliceróis de cadeia carbônica curta e, por isso também são denominadas esterases não-lipolíticas (CHAHINIAN *et al.*, 2005) ou somente carboxilesterases (BORNSCHEUER, 2002). Já as lipases hidrolisam preferencialmente triacilgliceróis de cadeia longa (>10 carbonos). Além disso, as lipases geralmente apresentam o fenômeno de ativação interfacial quando atuam em substratos emulsificados em água o que não ocorre em esterases não-lipolíticas (VERGER, 1997). Ao longo da Tese, ao nos referirmos a esterases deve ser subentendido esterases não-lipolíticas. Para obter-se um melhor entendimento desta diferenciação, neste tópico será apresentada uma comparação entre as propriedades catalíticas e as bases estruturais de lipases e de esterases.

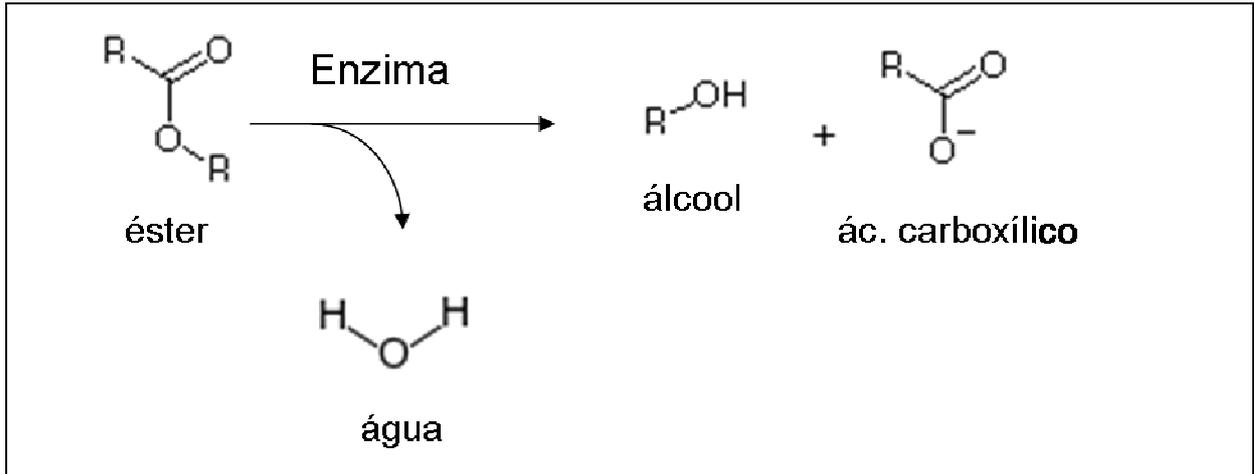


FIGURA 3 – HIDRÓLISE DE LIGAÇÃO ÉSTER CATALISADA POR LIPASES OU CARBOXILESTERASES.

As lipases são enzimas hidrossolúveis que atuam no metabolismo e digestão de triacilgliceróis (SVENDSEN, 2000; ALOULOU *et al.*, 2006). Há muito tempo se sabe que lipases apresentam baixa atividade ou até mesmo são inativas contra substratos solúveis em soluções aquosas. Entretanto, estas enzimas apresentam maior atividade quando a concentração do substrato é alta suficiente para formar agregados micelares ou emulsões (SARDA; DESNUELLE, 1958). Esse aumento de atividade na presença de micelas ou emulsões deve-se ao fenômeno conhecido como ativação interfacial (REIS *et al.*, 2008). Este fenômeno pode ser facilmente observado quando se avalia o efeito da concentração de substrato na atividade enzimática, como mostrado na Figura 4.

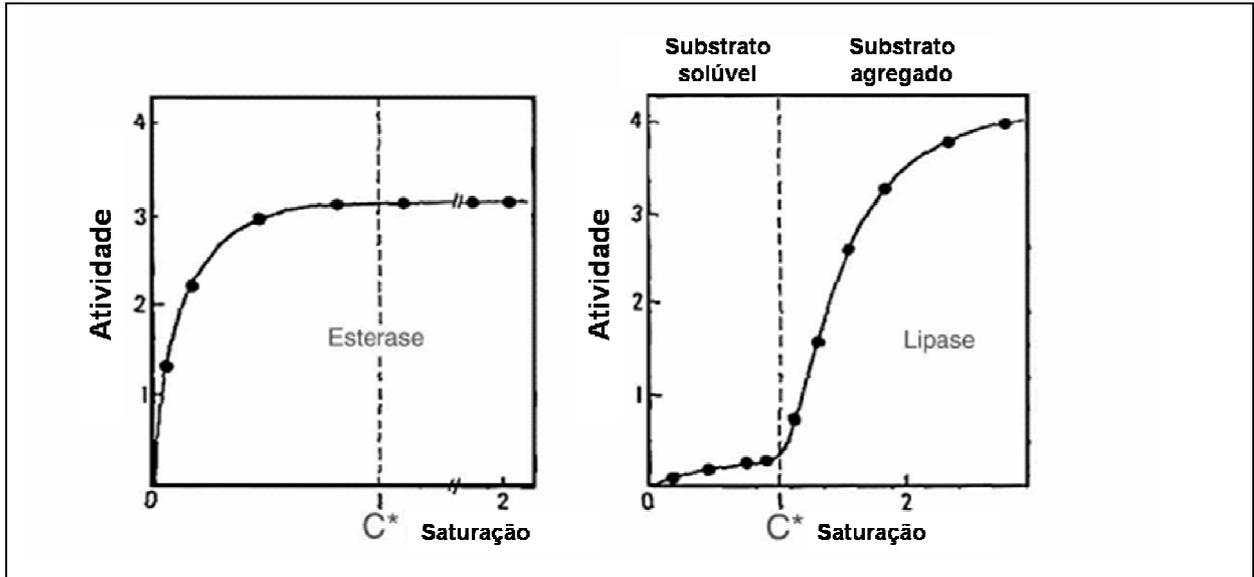


FIGURA 4 - HIDRÓLISE DE TRIACETINA PELA LIPASE PANCREÁTICA E ESTERASE HEPÁTICA DE PORCO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO. Adaptado de Sarda e Desnuelle (1958).

Na parte a esquerda da figura, observa-se o perfil de atividade da esterase hepática de porco frente a triacetina em concentrações solúveis e além do seu limite de solubilidade, conforme indicado pela concentração arbitrária ( $C^*$ ). Na parte a direita, observa-se o perfil de atividade da lipase pancreática de porco frente a triacetina. Concentrações abaixo do limite de solubilidade são indicadas como substrato no estado solúvel e concentrações acima deste limite são denominados como substrato no estado agregado. Os valores de atividade são arbitrários e devem ser interpretados apenas como uma tendência de aumento na atividade e não como os valores absolutos descritos no trabalho original de Sarda e Desnuelle (1958).

Quando uma lipase está na fase aquosa na ausência de uma emulsão ou em baixa concentração de um substrato lipídico (abaixo do seu limite de solubilidade), normalmente há uma hélice que cobre o sítio ativo; esta hélice é denominada de motivo *lid*. Diz-se que, a lipase que está com a *lid* cobrindo o seu sítio ativo está em uma conformação fechada. Na presença de uma emulsão, ao entrar em contato com a interface formada pelo lipídio, as lipases sofrem uma mudança conformacional na região da *lid* expondo o seu sítio ativo para a hidrólise das moléculas de triacilglicerol (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000). Quando as lipases estão com o sítio ativo exposto e interagindo com a interface lipídica, diz-se que a enzima está em uma conformação aberta. Porém, algumas lipases não apresentam o motivo *lid* e algumas ainda não apresentam o fenômeno de ativação interfacial, como no caso das lipases de *Candida antarctica*, *Pseudomonas glumae* e *Pseudomonas aeruginosa* (VERGER,

1997). Portanto, somente a ocorrência destas duas características não pode ser usada para a diferenciação entre lipases e esterases. Sendo assim, normalmente é aceito que uma lipase é uma enzima capaz de hidrolisar triacilgliceróis de cadeias longas, por exemplo, trioleína (VERGER, 1997).

Apesar de apresentarem diferenças estruturais e catalíticas, lipases e esterases são enzimas hidrolíticas que possuem uma tríade catalítica, normalmente composta por resíduos de serina, histidina, aspartato ou glutamato. Além disso, esterases e lipases são inibidas pelo composto dietil-*p*-nitrofenil fosfato (E600), o que as classifica como serina hidrolases (CHAPUS; SÉMÉRIVA, 1976).

Os mecanismos envolvidos na catálise de serina hidrolases que foram inicialmente propostos por BRADY *et al.* (1990) são ilustrados na Figura 5. A primeira etapa consiste da desprotonação da serina, mecanismo no qual os resíduos de histidina e aspartato são requeridos (Figura 5A). O grupo hidroxil do resíduo de serina ataca o carbono do grupo carbonila do substrato formando um intermediário de enzima acilado (Figura 5B). A presença de uma fenda oxianion contribui para a estabilização da distribuição de carga e também para redução da energia mínima de formação do intermediário tetraédrico. A última etapa é denominada de deacilação, pois o grupo acil transferido para a enzima é liberado pelo ataque de um nucleófilo (p. ex.: H<sub>2</sub>O) e assim o sítio catalítico da enzima é regenerado (Figura 5C).

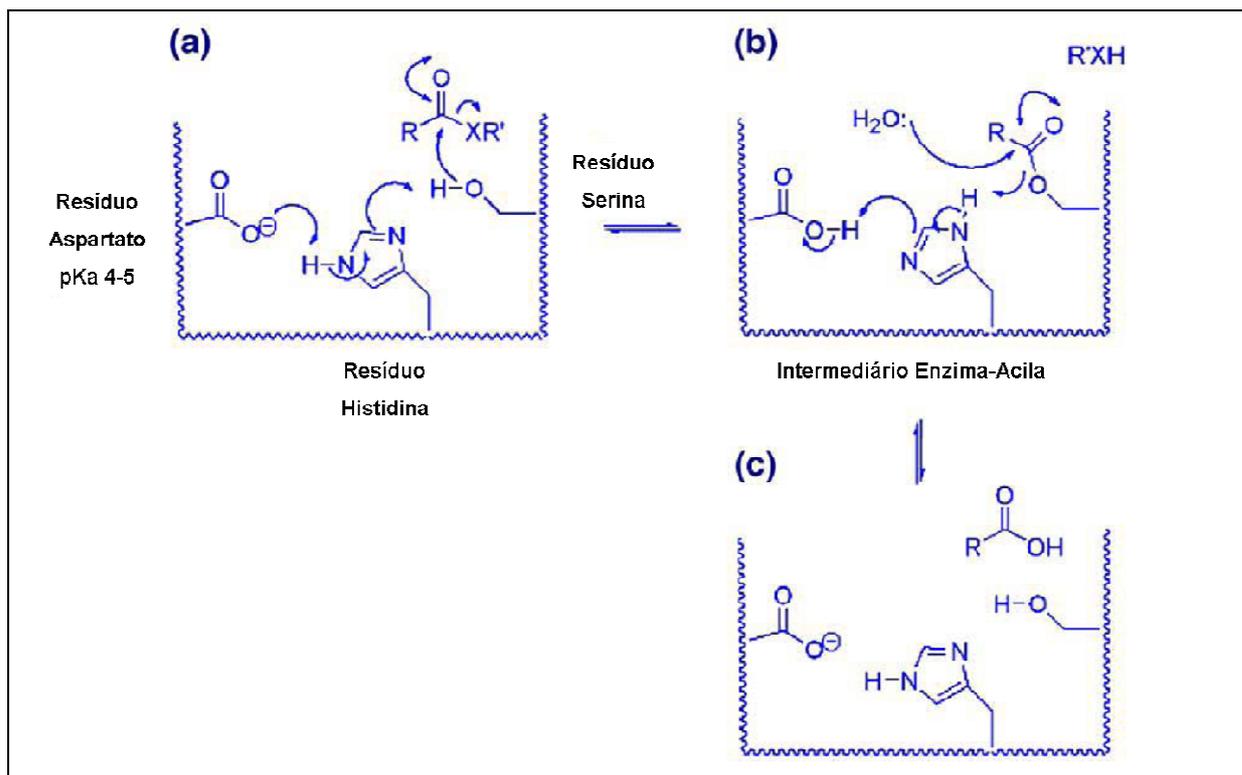


FIGURA 5 – MECANISMO CATALÍTICO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS. Adaptado de REIS *et al.*, 2008.

(a) O esquema representa o ataque da hidroxila da serina a carbonila eletrofílica do éster. As flechas curvas indicam o deslocamento de par eletrônico. Os resíduos que formam a tríade catalítica são mostrados (Serina, Aspartato e Histidina). O valor de pKa para o resíduo de aspartato também é mostrado. Na estrutura do substrato, R representa uma cadeia carbônica genérica, X um elemento genérico que no caso de ésteres é oxigênio e R' uma segunda cadeia carbônica genérica. (b) O esquema mostra a formação do intermediário enzima-acila que é hidrolisado na presença de água e regenera o sítio ativo como mostrado em (c). Em (b) também é mostrado a saída do álcool como subproduto da primeira reação ( $\text{R'XH}$ ) e em (c) a formação do ácido carboxílico como produto final.

Além de apresentarem o mesmo mecanismo reacional, carboxilesterases e lipases apresentam algumas semelhanças estruturais. A principal delas é a presença do dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase, sendo composto por várias  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  intercaladas (Figura 6). Este é um dobramento bastante comum a hidrolases, sendo também encontrado em outras famílias de enzimas como epóxido hidrolases (E.C. 3.3.2.3) (ARAND *et al.*, 2005) e haloperoxidases (E.C. 1.11.1.-) (HOLFRICHTER; ULLRICH, 2006).

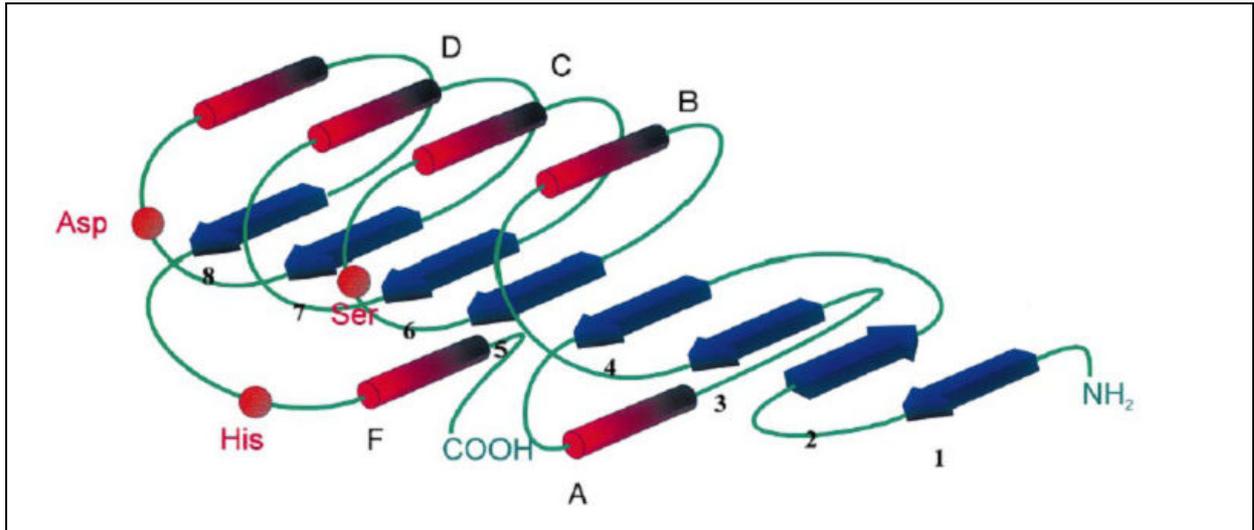


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DOBRAMENTO  $\alpha/\beta$  HIDROLASE.

As folhas  $\beta$  são mostradas em azul, enquanto as  $\alpha$ -hélices em vermelho. Os resíduos que formam a tríade catalítica estão representados pelas esferas vermelhas. A região aminoterminal é indicada por  $\text{NH}_2$  no início da cadeia e a região carboxiterna por  $\text{COOH}$  no final da cadeia (BORNSCHEUER, 2002).

A tríade catalítica é composta normalmente pelos aminoácidos Ser-Asp-His, porém glutamato pode estar no lugar do aspartato em algumas lipases. O resíduo de serina que participa da tríade catalítica normalmente encontra-se em um pentapeptídeo conservado com uma seqüência consenso (Gly-X-Ser-X-Gly), onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos. Alguns bancos de dados de domínios conservados, por exemplo, o PROSITE (SIGRIST *et al.*, 2002; HULO *et al.*, 2007) e o Pfam (FINN *et al.*, 2008) utilizam a seqüência do pentapeptídeo e da região ao seu redor para classificar se uma determinada seqüência de aminoácidos codifica para uma lipase ou esterase. De fato, somente a seqüência desta região tem se mostrado insuficiente para diferenciar entre estes dois tipos de enzimas e, portanto, novos métodos de diferenciação têm sido sugeridos (FOJAN *et al.*, 2000).

Fojan *et al.* (2000) propuseram um método de comparação baseado em uma análise da composição de aminoácidos e também na superfície eletrostática de diferentes lipases e esterases. Os autores analisaram regiões de 10 Å ao redor da serina do sítio ativo de várias lipases e esterases e encontraram que a distribuição dos aminoácidos em ambas as enzimas é em geral similar. No entanto, os autores observaram que, em esterases, a presença de resíduos de tirosina na região do sítio

ativo foi duas vezes maior do que em lipases. Porém, quando analisaram a distribuição de aminoácidos nas diferentes faixas do sítio ativo em relação à exposição ao solvente, os autores verificaram um padrão diferente entre as duas classes de enzimas. Na região que não tem acesso ao solvente (p. ex.: no fundo do sítio ativo), foi encontrado um número similar de resíduos não-polares em ambas as enzimas, no entanto, na região que é 100% exposta ao solvente, ou seja, no topo do sítio ativo, foi encontrado duas vezes mais resíduos não-polares em lipases. Além disso, o trabalho de Fojan *et al.* (2000) mostrou que esterases atingem a atividade ótima em valores de pH entre 5,5 a 7,5, pois nestes valores de pH o sítio ativo de esterases tem um potencial eletrostático negativo. Enquanto para lipases este potencial negativo somente ocorre em valores de pH entre 8 a 9. Sabe-se que esterases e lipases somente são ativas quando o sítio ativo tem um potencial eletrostático negativo, conforme o mecanismo da catapulta eletrostática proposto por Petersen, Fojan e Petersen (2001) (Figura 7).

Pleiss, Fischer e Schmid (1998) compararam a estrutura dos sítios ativos de diversas lipases e esterases e, como principal conclusão, observaram que os sítios de lipases são normalmente mais largos e profundos do que os sítios presentes em esterases, o que explicaria a capacidade que lipases possuem de reconhecer substratos mais substituídos e com cadeias mais longas (p.ex.: trioleína).

Sendo assim, os trabalhos de Fojan *et al.* (2000), Petersen, Fojan e Petersen (2001) e Pleiss, Fischer e Schmid (1998) mostram que a composição do sítio ativo, bem como sua organização estrutural são fundamentais para se diferenciar entre uma esterase não-lipolítica e uma lipase. Além da análise estrutural, outro método que se dispõe para discriminar entre as duas atividades é a caracterização bioquímica da enzima.

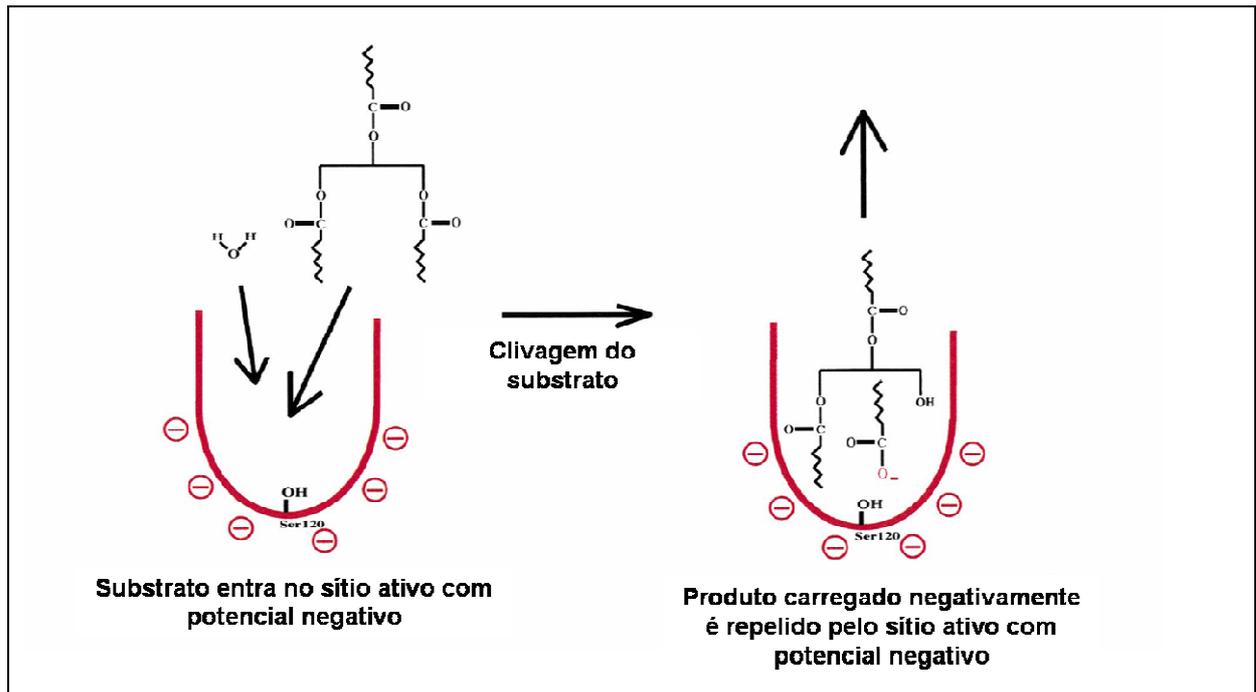


FIGURA 7 - MODELO DA REPULSÃO PELA CATAPULTA ELETROSTÁTICA RESPONSÁVEL PELA RÁPIDA EJEÇÃO DO PRODUTO DO SÍTIO ATIVO.

Fonte: PETERSEN et al.(2001).

Como conclusão, pode-se afirmar que enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar substratos pouco solúveis ou insolúveis em água tais como triacilgliceróis de cadeia longa, são denominadas de esterases lipolíticas ou, mais comumente, lipases. Já as esterases que não hidrolisam substratos de cadeia longa, ou ainda aqueles que formam agregados insolúveis, por exemplo, a trioleína, são denominadas de esterases não-lipolíticas ou carboxilesterases.

### 3 OBJETIVOS

Atualmente, a utilização de enzimas em diversos processos biotecnológicos é ampla. A aplicação de enzimas para a resolução de misturas racêmicas de compostos químicos de interesse econômico vem atraindo a atenção de empresas dos ramos de química fina e farmacêutica. Entre as enzimas mais utilizadas, as lipases e esterases microbianas lideram, apresentando um grande número de artigos na literatura, patentes e aplicações em larga escala. No entanto, a busca por enzimas que melhor se adaptem às condições de catálise não-convencionais ainda é presente. Isto ocorre devido ao fato de que nem todas as enzimas têm mostrado atividade e estabilidade suficiente para serem aplicadas com sucesso em biocatálise. Estudos estruturais e funcionais têm mostrado que as enzimas halofílicas têm grande potencial para se adaptarem à presença de solventes orgânicos, representando um importante grupo de enzimas para utilização em biocatálise.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi o de caracterizar bioquimicamente a esterase de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 e confirmar experimentalmente sua característica halofílica e através de modelagem molecular comparativa, com vistas a verificar a possibilidade de utilização desta enzima em sistemas de biocatálise.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar *in silico* genes de interesse (lipases e esterases) em genomas de arqueas halofílicas;

Identificar os genes através de análise bioinformática;

Clonar um gene de interesse, no caso a ORF rrnAC0088 de *H. marismortui* anotada como uma lipase/esterase putativa e otimizar a sua superexpressão em *E. coli*;

Purificar a enzima para posteriores estudos de caracterização cinética e halofílica;

Avaliar o efeito da concentração de sal na atividade da enzima;

Avaliar o efeito da concentração de sal na recuperação da atividade enzimática;

Avaliar o efeito da concentração de sal na formação de estruturas secundárias da enzima;

Avaliar a preferência da enzima frente a diferentes substratos;

Realizar ensaios de inibição para classificar a enzima conforme seu mecanismo de catálise;

Gerar um modelo estrutural computacional da enzima usando a técnica de homologia estrutural;

Estudar comparativamente as características estruturais do modelo, tais como a distribuição de aminoácidos na superfície e o seu potencial eletrostático.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTRATÉGIA DO TRABALHO

Primeiramente, será apresentado um fluxograma contendo a estratégia que foi adotada durante o trabalho e em seqüência será detalhado o conjunto de protocolos utilizados em cada etapa (Figura 8).

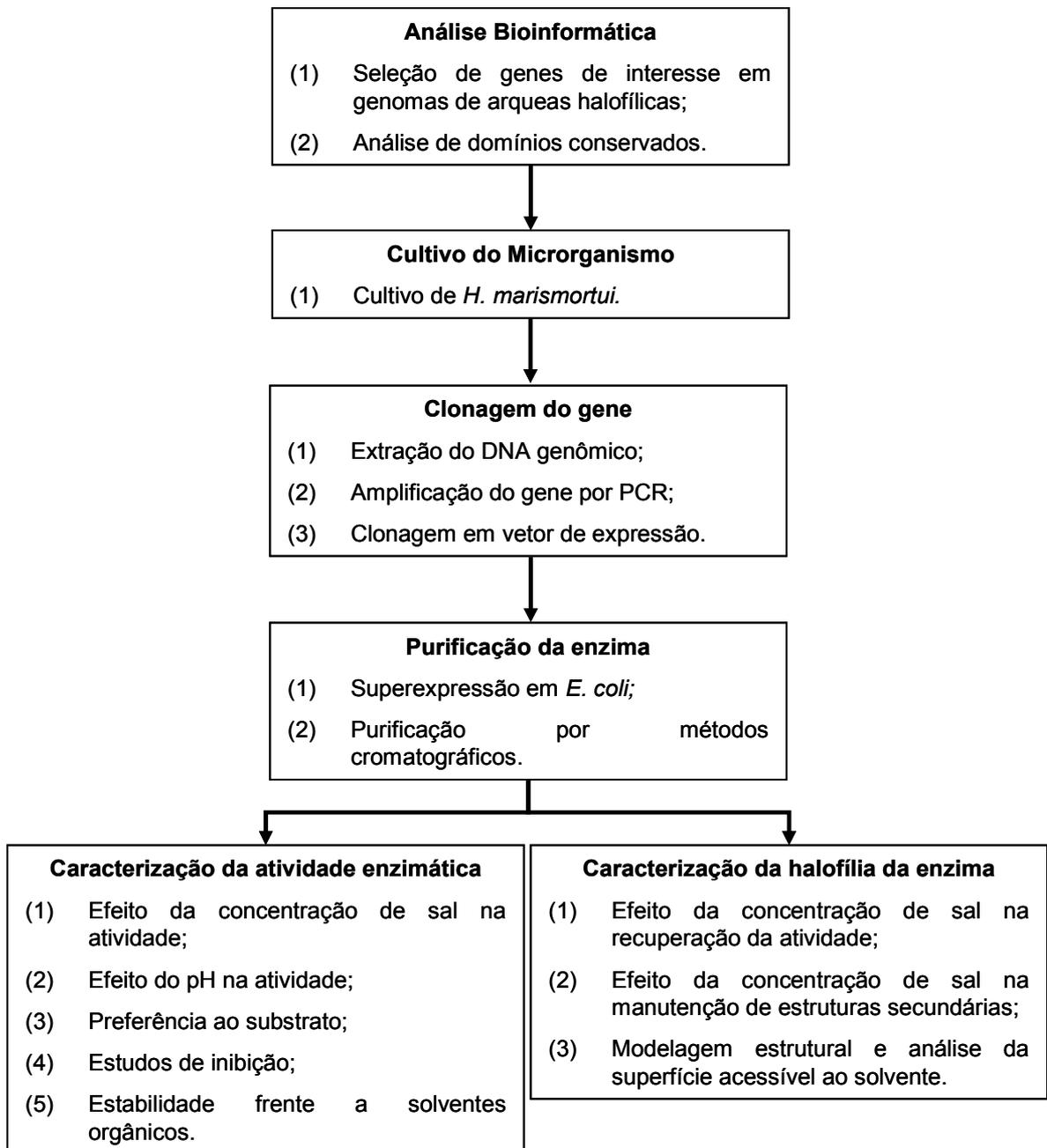


FIGURA 8 – ESTRATÉGIA APLICADA NESTE TRABALHO

## 4.2 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO GENE *lipC* DE *Haloarcula marismortui*.

Para um melhor entendimento das análises *in silico* que foram realizadas neste trabalho, no próximo tópico serão descritas as ferramentas de bioinformática que foram utilizadas e suas finalidades.

### 4.2.1 KEGG

O KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>) é um banco de dados de genomas, genes, vias metabólicas, reações enzimáticas e classificação de enzimas e diversos compostos (KANEHISA *et al.*, 2008). O banco de dados do KEGG foi utilizado para a busca de genes de lipases/esterases no genoma de arqueas halofílicas. Especificamente, três genomas foram analisados: (1) *Halobacterium* sp. NRC-1 (NG *et al.*, 2000), (2) *Haloarcula marismortui* (BALIGA *et al.*, 2004) e (3) *Natronomonas pharaonis* (FALB *et al.*, 2005). A busca pelos genes foi feita usando palavras-chave tais como *lipase*, *esterase* e *hydrolase*. Os genes encontrados também foram analisados quanto à ocorrência de genes ortólogos e parálogos usando a ferramenta KEGG/SSDB (*Sequence Similarity DataBase*) (SATO *et al.*, 2001).

### 4.2.2 BLAST

Para verificar a homologia existente entre o gene *lipC* de *H. marismortui* e os demais genes depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) o programa BLAST foi utilizado.

O programa BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) é um algoritmo desenvolvido para alinhar seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos de acordo

com a similaridade existente entre a seqüência alvo e as seqüências depositadas no banco de dados (ALTSCHUL *et al.*,1990). Ao final de cada alinhamento, o BLAST gera uma lista de seqüências mais similares à seqüência alvo e classifica cada alinhamento individual utilizando dois valores: o *escore* e o *E-value*.

O *escore* é um valor que indica o número de semelhança entre duas seqüências. Especificamente, em seqüências de aminoácidos existem três tipos de pareamentos: (1) aminoácidos idênticos, (2) aminoácidos similares e (3) aminoácidos diferentes. Cada pareamento tem um peso atribuído e a somatória de todos os pareamentos é o *escore*.

O *E-value* é um valor estatístico que indica a expectativa de que outra seqüência com *escore* idêntico ou maior ao valor obtido em um determinado alinhamento seja encontrada. Portanto, seqüências com alto *escore* exibem um baixo *E-value*, e seqüências idênticas possuem *E-value* igual a zero.

#### 4.2.3 Análise de Domínios Conservados

Domínios conservados são regiões com características estruturais similares que ocorrem em diferentes proteínas e que podem ser classificadas por análise comparativa. A análise de domínio conservado pode indicar se uma determinada seqüência de aminoácidos possui uma região que de fato representa um domínio encontrado em outras proteínas já conhecidas. Neste trabalho, foram utilizados dois programas para a análise de domínios conservados: (1) PROSITE – My Hits (HULO *et al.*, 2007) e (2) Pfam (FINN *et al.*, 2008). Ambos os programas geram uma lista de domínios conservados reconhecidos e atribuem a cada um deles um *escore* e um valor de *E-value*.

#### 4.2.4 Análise de Seqüência Peptídeo Sinal e Domínios Transmembrana

A predição de seqüência peptídeo sinal em LipC foi realizada pelos programas SignalP 3.0 (BENDTSEN *et al.*, 2004) e TatP 1.0 (BENDTSEN *et al.*, 2005). A predição de domínios transmembrana foi feita pelo programa DAS – *Dense Aligment Surface* (CSERZO *et al.*, 1997).

### 4.3 MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANTIBIÓTICOS

#### 4.3.1 Microrganismos.

A estirpe de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 foi gentilmente cedida pelo professor Francisco Rodríguez-Valera, da Universidade Miguel Hernández, Alicante, Espanha. As estirpes de *E. coli* utilizadas ao longo do trabalho estão mostradas na Tabela 1.

Para manutenção dos plasmídeos e etapas de clonagem, foi utilizada a estirpe *Escherichia coli* DH10B. Para superexpressão do gene *lipC* foram utilizadas as estirpe de *E. coli* BL21(DE3) e Rosetta(DE3) pLysS. As estripes de *E. coli* BL21(DE3), Rosetta(DE3) pLysS, Origami(DE3) pLysS e C41(DE3)pRARE, uma estirpe na qual foi introduzido o plasmídeo pRARE, foram utilizadas para a triagem de superexpressão com anticorpos anti-cauda de histidinas.

TABELA 1 – ESTIRPES DE *Escherichia coli* UTILIZADAS NESTE TRABALHO

<b>Estirpe</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Procedência</b>
DH10B	Sm <sup>R</sup> , F' [proAB <sup>+</sup> <i>lacZΔM15</i> ]	Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal</i> <i>dcm</i> λ(DE3) pLysS (Cm <sup>R</sup> )	Novagen, Gibbstown, NJ, EUA
Origami(DE3)pLysS	F' λ (DE3) <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> (Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Novagen, Gibbstown, NJ, EUA
Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal</i> <i>dcm</i> λ(DE3) pLysSRARE (Cm <sup>R</sup> )	Novagen, Gibbstown, NJ, EUA
C41(DE3)pRARE	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cm <sup>R</sup> )	(MIROUX; WALKER, 1996)

### 4.3.2 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados estão dispostos na Tabela 2.

TABELA 2 – MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Meio	Composição (g.L <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Halobaculum gomorrense</i> <sup>a</sup>	NaCl, 125; MgCl <sub>2</sub> , 160; K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5; CaCl <sub>2</sub> dihidratado, 0,1; casaminoácidos, 1; extrato de levedura, 1 e amido, 2.	OREN <i>et al.</i> , 1995
LB <sup>b</sup>	extrato de levedura 5, NaCl 10, triptona 10.	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
SOB <sup>b</sup>	triptona 20, extrato de levedura 5, NaCl 0,5.	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
SB <sup>b</sup>	triptona 30, extrato de levedura 20, MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico)] 10.	
TB <sup>b</sup>	triptona 12, extrato de levedura 24, glicerol 4 ml, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9,4, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,2	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989

a- O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) previamente à autoclavagem (15 min, 120°C). As placas de meio sólido continham 2 % (m/v) de Agar bacteriológico. Para preparo do meio sólido, NaCl e MgCl<sub>2</sub> foram autoclavados na forma de sal separadamente e depois misturados com o meio contendo agar.

b - Previamente à autoclavagem (20 min, 120°C), o pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH (0,1 mol.L<sup>-1</sup>).

### 4.3.3 Condições de Cultivo

A cultura líquida de *H. marismortui* foi cultivada em meio líquido sob agitação a 160 rpm e 37°C, em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio. O crescimento foi acompanhado por determinação de densidade óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>). A estirpe *E. coli* DH10B foi cultivada a 37°C com agitação de 160 rpm. Os cultivos em meio sólido foram feitos em placas de Petri, com a mesma composição

do meio LB, acrescido de ágar a 1,5 % (m/v) (meio LA). Ambas as culturas, em meio líquido e sólido, foram crescidas na presença dos antibióticos apropriados.

#### 4.3.4 Antibióticos

Os antibióticos e as concentrações utilizadas estão mostrados na Tabela 3.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES DE USO

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentração no Estoque (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração no Meio de Cultivo (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
Ampicilina <sup>a</sup>	250	100
Canamicina <sup>a</sup>	100	50
Estreptomicina <sup>a</sup>	80	80
Cloramfenicol <sup>b</sup>	34	34

a - ambos antibióticos foram dissolvidos em água e filtrados por membranas de 0,2 µm; b - dissolvido em etanol absoluto e filtrado por membrana de 0,2 µm.

## 4.4 MANIPULAÇÃO DE DNA

### 4.4.1 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão mostrados na Figura 9. Os plasmídeos pDONR221 e pDEST14 fazem parte dos sistemas de clonagem Gateway<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), como será descrito mais adiante no item de clonagem gênica. Outro plasmídeo utilizado para a superexpressão do gene *lipC* foi o pET-14b (Novagen, Gibbstown, Nova Jérsei, EUA) (Figura 9C). Na Figura 10 estão dispostos os plasmídeos recombinantes obtidos neste trabalho.

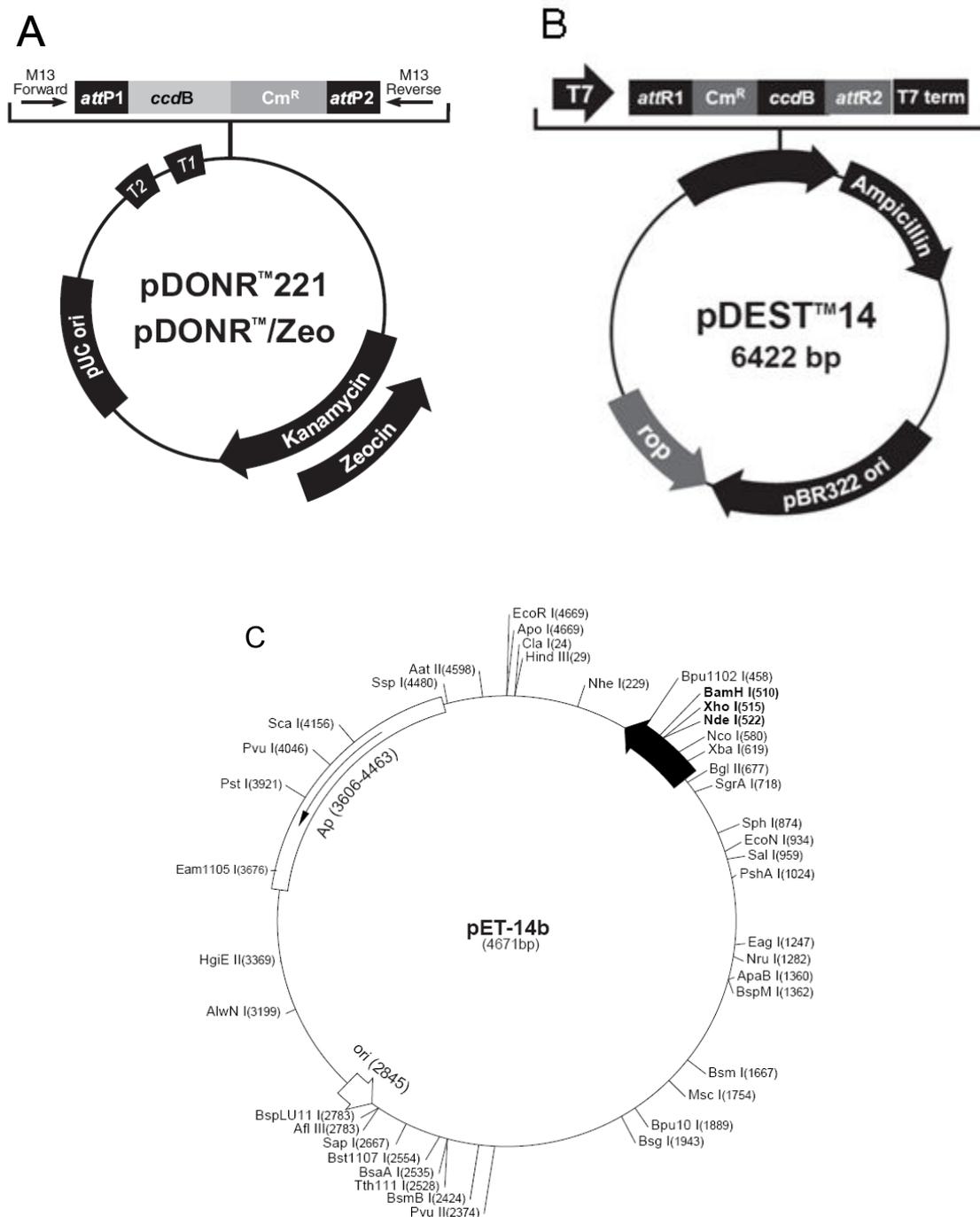


FIGURA 9 – PLASMÍDEOS UTILIZADOS PARA CLONAGEM DO GENE *lipC* DE *Haloarcula marismortui*

(A) plasmídeo pDONR221 – a região onde o gene de interesse foi inserido está destacada acima do vetor: *attP1* e *attP2* são os sítios de recombinação, *ccdB* codifica para uma proteína tóxica e *Cm<sup>R</sup>* refere-se ao gene de resistência a cloramfenicol. (B) plasmídeo pDEST14 - a região onde o gene de interesse foi inserido está destacada acima do vetor: *attR1* e *attR2* são os sítios de recombinação, o promotor e terminador T7 estão à montante e à jusante do gene, respectivamente. (C) plasmídeo pET-14b – o sítio de policlonagem corresponde à flecha em preto (sítios entre *NdeI* e *BamHI*). Os sítios *NdeI* e *BamHI* que foram utilizados para a clonagem do gene *lipC* encontram-se nesta região do plasmídeo.

No plasmídeo pET-14b, a expressão do gene de interesse está sob controle do promotor forte do bacteriófago T7. Além disso, este plasmídeo contém uma seqüência que codifica para seis histidinas à montante do gene de interesse. Sendo assim, a proteína recombinante contém uma fusão de seis histidinas, mais uma seqüência de dez aminoácidos (SSGLVPRGSH) antes da sua porção N-terminal. Nesta seqüência de dez aminoácidos, também encontramos um sítio de proteólise reconhecido por trombina entre os resíduos de arginina e glicina.

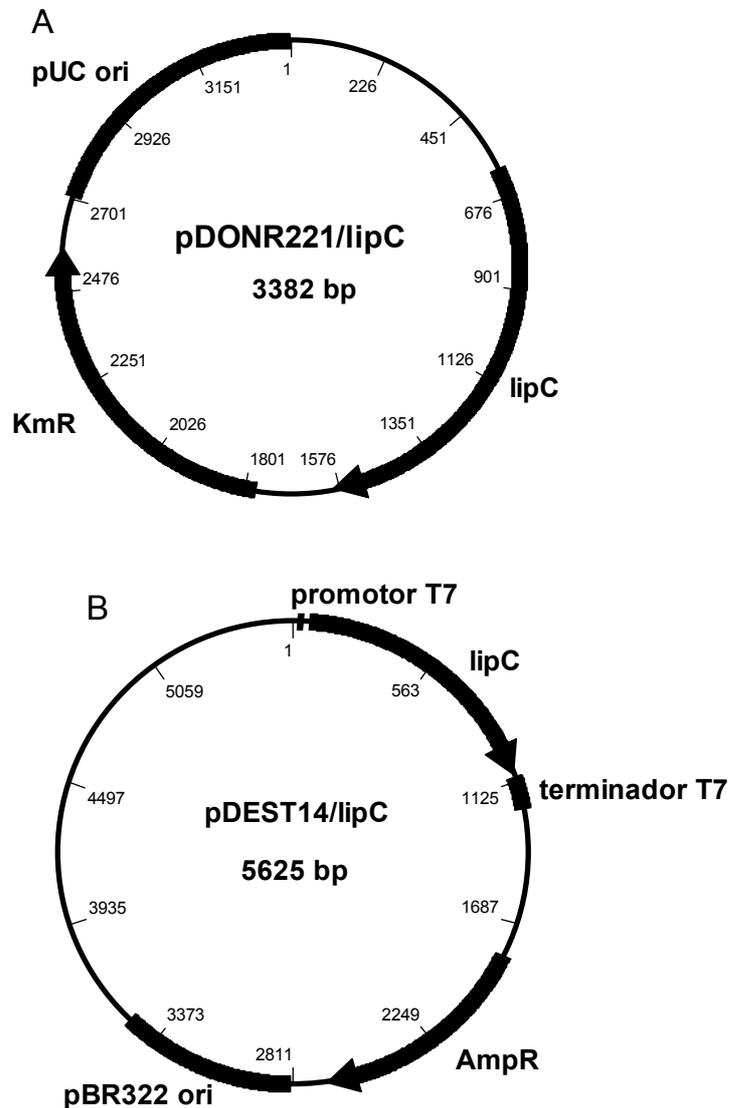


FIGURA 10 – PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTRUÍDOS NESTE TRABALHO

(A) – plasmídeo pDONR221/lipC – clone de entrada com o sistema Gateway. (B) – plasmídeo pDEST14/lipC - vetor para superexpressão do gene *lipC* sob controle do promotor T7.

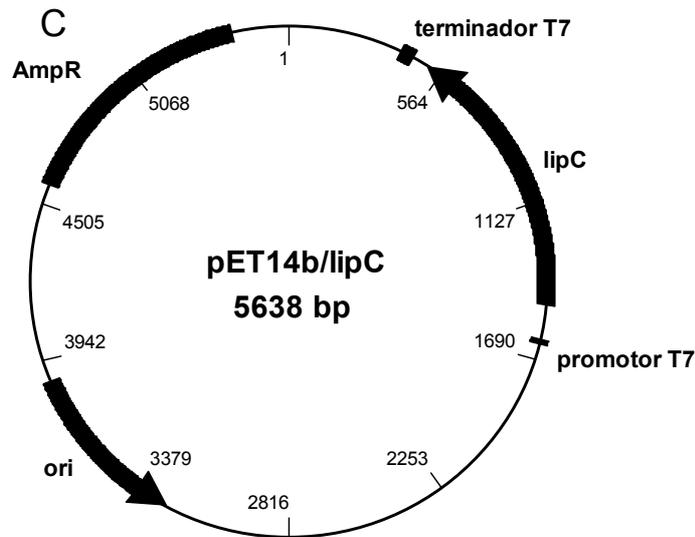


FIGURA 10 – PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTRUÍDOS NESTE TRABALHO

(C) – plasmídeo pET14b/lipC – plasmídeo da família pET para superexpressão do gene *lipC* sob controle do promotor T7.

#### 4.4.2 Transformação Bacteriana

##### 4.4.2.1 Preparo de *Escherichia coli* eletrocompetente

Colônias isoladas de *E. coli* DH10B foram inoculadas em 3 mL de meio LB. O inóculo foi incubado a 37 °C sob agitação de 160 rpm por 12 h. Inoculou-se 100 mL de meio SOB em Erlenmeyer de 500 mL. A cultura foi incubada nas mesmas condições que o inóculo, até D.O.<sub>600</sub> de 0,8. Quando a cultura atingiu este estágio, foi colocada no gelo, durante 30 min. O meio foi transferido para os tubos de centrifuga gelados e centrifugados a 3.500×g durante 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com o mesmo volume de água ultra-pura gelada. Este procedimento foi repetido mais uma vez com meio volume de água. Após a última centrifugação, as células foram lavadas com glicerol 10% (m/v) com 25% do volume total do tubo e ressuspendidas em 400 µL de glicerol 10% (m/v). As células foram transferidas para tubos eppendorfs (30 µL) e armazenadas a -70 °C.

#### 4.4.2.2 Transformação por eletrochoque

Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes foram descongeladas, em banho de gelo, anteriormente à eletroporação. Na câmara de eletroporação foram pipetadas a solução de bactéria eletrocompetente (30  $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  da amostra contendo o DNA a ser transformado. As células foram submetidas a choque de 1.800 volts (25  $\mu\text{F}$  e 200  $\Omega$ ), e depois transferidas para 1 mL de meio SOC e incubadas a 37 °C durante 1 h para recuperação. Após este período, 100  $\mu\text{L}$  da mistura foram plaqueados em meio LA contendo o antibiótico apropriado. Após 16 h de crescimento a 37 °C foi observada a formação de colônias.

#### 4.4.3 Purificação de Plasmídeos por Lise Alcalina

A purificação de plasmídeos foi feita seguindo o protocolo de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). De uma cultura saturada coletou-se 1,5 mL e centrifugou-se por 1 min a 10.000 $\times g$ . O precipitado de células foi ressuspenso em 150  $\mu\text{L}$  de solução GET (glucose 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , EDTA 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  e Tris-HCl 25  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0) e a mistura foi brevemente homogeneizada em Vortex. Acrescentaram-se 150  $\mu\text{L}$  de solução de lise (NaOH 0,2  $\text{mol.L}^{-1}$  e SDS 1%, (m/v)) e a mistura foi homogeneizada invertendo-se o tubo lentamente até observação do aumento de sua viscosidade. Incubou-se a mistura à temperatura ambiente durante 5 minutos para ocorrer lise completa. Após a lise, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de Kacf (acetato de potássio 3  $\text{mol.L}^{-1}$  e ácido fórmico 1,8  $\text{mol.L}^{-1}$ ) e foi homogeneizado por inversão. A mistura foi incubada por 5 min em gelo e centrifugada por 5 min a 10.000 $\times g$ . O sobrenadante foi coletado e, a ele 100  $\mu\text{L}$  de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)(v/v/v) foram adicionados. A solução foi misturada em vortex e centrifugada por 5 minutos a 10.000  $g$ . À fase aquosa coletada foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol e a solução foi incubada à temperatura ambiente por 25 minutos para precipitação do DNA. Centrifugou-se por 15 min a 10.000 $\times g$  e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80 %

(v/v) e centrifugado por 5 min a  $10.000\times g$ . Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi secado a vácuo. Após secagem, o precipitado foi solubilizado em 20  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura.

#### 4.4.4 Eletroforese de DNA em Gel de Ágar ou Agarose

A eletroforese de DNA foi realizada de acordo com a técnica descrita por SAMBROOK *et al.* (1989). O gel foi preparado fundindo-se agarose a 1% (m/v) em tampão TBE 1X (Tris  $89\text{ mmol.L}^{-1}$ , ácido bórico  $89\text{ mmol.L}^{-1}$  e EDTA  $2\text{ mmol.L}^{-1}$ ; pH 8). Para a corrida utilizou-se o mesmo tampão. O DNA a ser analisado (5  $\mu\text{L}$ ) foi misturado com 3  $\mu\text{L}$  de solução FSUDS (azul de bromofenol 0,8% (m/v); ficol 10% (m/v); xileno cianol 0,4% (m/v), SDS 1% (m/v), EDTA  $1,8\text{ mmol.L}^{-1}$ ; Tris-HCl  $65\text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0) e aplicado no gel de agarose. As eletroforeses foram realizadas sob voltagem constante de 60 V. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídeo a  $0,5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  para revelação das bandas de DNA. Incubou-se o gel por 30 min, lavando-o em água por mais 10 min para eliminação do excesso do corante. As bandas foram visualizadas em um sistema de documentação de imagens (UVP UltraViolet Products ) irradiando o gel com UV no comprimento de onda de 312 nm.

#### 4.4.5 Reações com Enzimas de Restrição

Para a digestão de plasmídeos e produtos de PCR dois sistemas foram utilizados: (1) reações de 100  $\mu\text{L}$  para preparação de fragmentos de DNA ou vetores para posterior ligação, ou (2) reações de 20  $\mu\text{L}$  para análise de fragmentos de DNA durante as etapas de clonagem. Todas as reações foram feitas em tubos Eppendorfs de 1,5 mL de capacidade. Os sistemas de 100  $\mu\text{L}$  foram compostos de 73  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura, 10  $\mu\text{L}$  do tampão 10X apropriado para a enzima e fornecido pelo fabricante, 15  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial (0,2 a 1  $\mu\text{g}$  de DNA), 1  $\mu\text{L}$  de RNase A livre de DNase e 1  $\mu\text{L}$  da enzima de restrição de escolha (10 U de enzima).

Os sistemas de 20  $\mu\text{L}$  foram formados pelos mesmos componentes, porém, calculando-se as suas quantidades para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . A temperatura e tempo de incubação foram ajustados de acordo com a enzima utilizada, seguindo as especificações do fabricante.

#### 4.4.6 Extração do DNA genômico de *Haloarcula marismortui*

O DNA genômico de *H. marismortui* foi obtido por lise das células, através de choque osmótico em água e o DNA liberado foi extraído 3 vezes com 1 volume de fenol equilibrado com tampão Tris-HCl 100  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0. Após extração, a fase aquosa foi misturada com 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio a 3  $\text{mol.L}^{-1}$ , a mistura foi incubada por 12 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  e centrifugada por 10 min a 10.000  $g$  e  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado de DNA foi lavado três vezes com etanol a 80% (v/v) em água e solubilizado com água ultra-pura. A concentração do DNA obtido foi determinada utilizando o sistema Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), como descrito em 4.4.4. O grau de pureza foi verificado determinando a absorvância da amostra de DNA a 260 e 280 nm. O valor da relação  $\text{Abs}_{.260} / \text{Abs}_{.280}$  foi igual a 1,9.

#### 4.4.7 Clonagem do gene *lipC* de *Haloarcula marismortui*

Dois sistemas de clonagem foram utilizados, sendo estes: 1) clonagem pelo método de recombinação – Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2) clonagem clássica através de digestão do produto de PCR e ligação em vetor de expressão.

#### 4.4.7.1 Clonagem Utilizando Sistema Gateway

O sistema Gateway é um método de clonagem universal baseado na recombinação sítio-específica do bacteriófago lambda. Para clonar produtos de PCR com este sistema, é necessário inserir nas regiões flanqueadoras do gene sítios de reconhecimento denominados attB. Os sítios attB das regiões flanqueadoras interagem com sítios attP no vetor de interesse (Figura 11A). Esta primeira reação, chamada de BP, é catalisada por uma mistura de clones de *E. coli* e do bacteriófago lambda; o vetor que recebe o produto de PCR é chamado de vetor de doação e o clone gerado é denominado clone de entrada (Figura 11A). Os sítios attB do produto de PCR, após a recombinação, são transformados em sítios attL (Figura 11B). Na segunda reação, os sítios attL do clone de entrada se recombinam com os sítios attR do vetor de destino (Figura 11B). Esta reação é chamada de LR, gerando um clone final para expressão do gene de interesse.

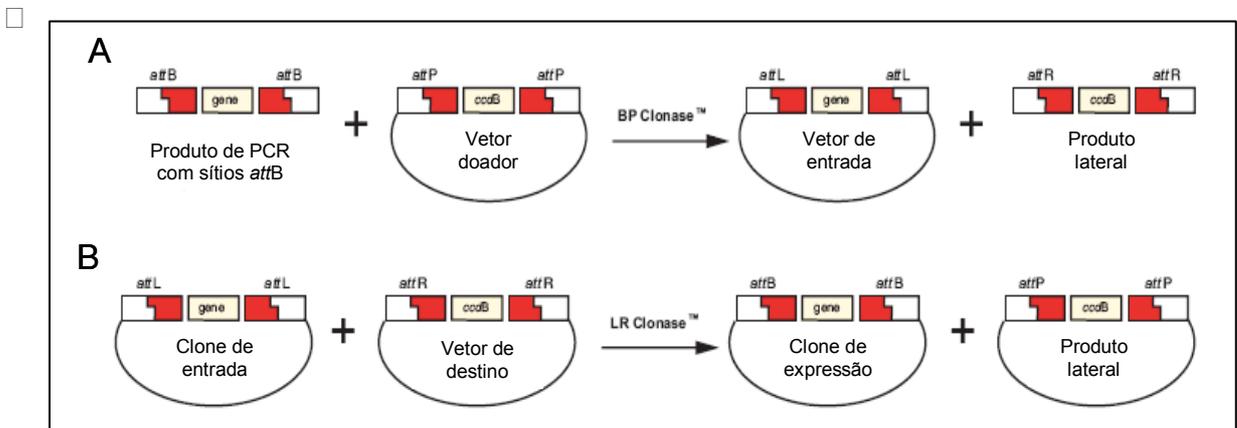


FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE RECOMBINAÇÃO NO SISTEMA DE CLONAGEM GATEWAY

O gene *lipC* de *H. marismortui* foi amplificado por reação de PCR com dois oligonucleotídeos para as seqüências 5' e 3' do gene contendo os sítios attB1 e attB2, respectivamente. Os sítios attB1 e B2 estão sublinhados enquanto os códons de início e término de tradução estão destacados em negrito abaixo:

Oligonucleotídeos:

(1) FW*lip*CHm\_GW

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCGAAGGAGATAGAACC**ATGTCCA**  
CGACGGCCCGACC

(2) REV*lip*CHm\_GW

GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGGITCAATGATGATGATGATGATGGAATC  
CGGGGCCGTCGCGG

Os sítios *att*B1 e B2 permitem a clonagem por recombinação utilizando os vetores “doadores” (pDONR) e de “destino” (pDEST). A reação de PCR, conduzida em tubos Eppendorf de 200  $\mu$ L, foi preparada com os seguintes componentes: H<sub>2</sub>O ultra-pura para um volume final de 50  $\mu$ L, 5  $\mu$ L de tampão de reação 10X concentrado, 10  $\mu$ L de mistura de dNTP 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, 15 pmol de cada oligonucleotídeo, 500 ng de DNA genômico de *H. marismortui* e 2 unidades de *Pfu* DNA Polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Os seguintes ciclos de temperatura foram utilizados: desnaturação inicial (95°C; 2 min) x 1 ciclo, [desnaturação (95°C; 1 min), anelamento (69,8°C; 30 s) e extensão (74°C, 4 min)] x 35 ciclos, extensão final (74°C, 5min). Ao final da reação, 10  $\mu$ L foram aplicados em gel de agarose 1% (m/v) para verificação do produto de PCR, com cerca de 1 kb. Os 40  $\mu$ L restantes também foram aplicados para posterior extração da banda correspondendo ao gene *lipC* e purificação pelo kit *PureLink™ Gel Extraction* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A reação de BP foi realizada com 100 ng de produto de PCR, 2  $\mu$ L de pDONR221 (150 ng/ $\mu$ L), 4  $\mu$ L de BP *Clonase Enzyme Mix* e tampão TE (pH 8) para um volume de 16  $\mu$ L. Após 12 h de reação a 25°C, foram adicionados 2  $\mu$ L de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a reação incubada por 10 min a 37°C. Após digestão com proteinase K, 5  $\mu$ L da reação foram transformados por choque térmico na estirpe de *E. coli* DH10B, sendo toda a reação de transformação plaqueada em LB agar com canamicina a 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> e incubada por 12 h a 37°C. Uma reação controle sem o produto de PCR foi realizada em paralelo. Nenhuma

colônia foi visualizada após 12 h de cultivo. Das colônias que cresceram na reação principal, seis foram coletadas e seus plasmídeos purificados com o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha). A identidade do plasmídeo recombinante foi primeira analisada por restrição e após por sequenciamento de DNA, pelo método de SANGER *et al.* (1977).

O plasmídeo gerado pela reação BP foi denominado pDONR221//*lipC* e utilizado em uma seguinte reação de recombinação, a reação LR, que transfere o gene para um vetor de “destino”, pDEST-14. A reação foi realizada com 300 ng de pDONR221//*lipC*, 300 ng de pDEST14, 4 µL de LR *Clonase Enzyme Mix* e tampão TE (pH 8) para um volume de 16 µL. A reação foi incubada, tratada com proteinase K e transformada em *E. coli* DH10B. Das colônias que cresceram, seis foram coletadas e seus plasmídeos purificados com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen, Hilden, Alemanha). A identidade dos plasmídeos recombinantes foi analisada por restrição e seqüenciamento de DNA. O plasmídeo pDEST14 contém o promotor T7 à montante do gene e, portanto foi utilizado para superexpressar o gene *lipC* em *E. coli* que expressam a T7 RNA polimerase (p. ex.: estirpes BL21(DE3)pLysS e Rosetta(DE3)pLysS).

#### 4.4.7.2 Clonagem do gene *lipC* de *Haloarcula marismortui* em pET-14b

O gene *lipC* de *H. marismortui* foi amplificado por reação de PCR com dois oligonucleotídeos específicos para as sequências 5' e 3' do gene contendo os sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, respectivamente.

Oligonucleotídeos:

(1) FW/*lipC*Hm:

5' GTCGGGCATATGTCACGACGGCCCGACC 3'

*NdeI*

(2) REV/*lipC*Hm:

5' TCGACCGGATCCTCAGAATCCGGGGCCGT 3'

*BamHI*

A reação de PCR, em tubos Eppendorf de 200  $\mu\text{L}$ , foi preparada com os seguintes componentes: água ultra-pura para um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 10X concentrado, 10  $\mu\text{L}$  de mistura de dNTP 2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 15 pmol de cada oligonucleotídeo, 500 ng de DNA genômico de *H. marismortui* e 2 unidades de *Pfu* DNA Polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Os seguintes ciclos de temperatura foram utilizados: desnaturação inicial (95°C; 2 min), [desnaturação (95°C; 1 min), anelamento (69,8°C; 30 s) e extensão (74°C, 4 min)] x 35 repetições, extensão final (74°C, 5 min). Ao final da reação, 10  $\mu\text{L}$  foram aplicados em gel de agarose 1% (m/v) para verificação do produto de PCR, com cerca de 1 kb. Os 40  $\mu\text{L}$  restantes também foram aplicados para posterior extração da banda correspondendo ao gene *lipC* e purificação pelo kit *PureLink™ Gel Extraction* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

O produto de PCR purificado foi concentrado por centrifugação e secagem a vácuo (*speedvac*), 30 min a 10.000 $\times g$  e sua concentração foi determinada utilizando o sistema Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após concentração, o produto de PCR foi digerido com as enzimas *NdeI* durante 12 h e mais 12 h com a enzima *BamHI* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O plasmídeo pET-14b foi digerido 12 h com a enzima de restrição *NdeI* e após 12 h com a enzima *BamHI*. A reação de restrição foi precipitada com 0,01 volume de acetato de sódio 3  $\text{mol.L}^{-1}$ ; pH 5,2 e dois volumes de etanol absoluto a 4°C. A mistura foi incubada a -80 °C durante 30 min e depois centrifugada a 10.000 $\times g$  por 15 min. O precipitado foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v), seco em estufa a 37°C e ressuspendido em 10  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura. A concentração do plasmídeo digerido foi determinada usando o sistema Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

#### 4.4.8 Reação de Ligação do gene *lipC* em pET-14b

A reação de ligação de DNA foi feita de acordo com o protocolo da Promega (Madison, Wisconsin, EUA) fabricante da ligase utilizada. O sistema reacional foi composto de 100 ng do vetor (pET-14b digerido), 108 ng do inserto digerido, 1  $\mu\text{L}$  do tampão para ligase 10 X concentrado, 1 unidade Weiss de T4 DNA ligase e água

ultra-pura para 10  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada durante 12 h a 4°C e desta, 1  $\mu\text{L}$  foi transformado por eletrochoque em *E. coli* DH10B, sendo a reação de transformação plaqueada em agar LA contendo ampicilina (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### 4.4.9 Triagem de Plasmídeos Recombinantes por *Rapid Prep*

Os clones foram analisados por *Rapid prep* segundo o método descrito por BEUKEN *et al.* (1998). As colônias que cresceram em ágar LA foram coletadas e cultivadas em 5 mL de meio LB durante 16 h (37°C, 250 rpm), na presença de antibiótico para seleção. Após crescimento, 150  $\mu\text{L}$  de cada cultura foram coletados e centrifugados a 10.000 $\times g$  durante 30 s. O sobrenadante foi removido e ao precipitado adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de azul de bromofenol 0,1% (m/v) e sacarose 6% (m/v), e 14  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio 1:1 (v/v). Os tubos foram agitados com um pulso de 5 s em vortex para lise das células. O lisado foi centrifugado durante 3 min a 10.000 $\times g$  para separação das fases. Para verificação dos clones, 10  $\mu\text{L}$  da fase aquosa foram aplicados diretamente em um gel de agarose 1% (m/v). Como controle, foi aplicado na primeira linha do gel o plasmídeo de origem, que não continha o inserto. Os plasmídeos que migraram com um tamanho superior ao plasmídeo de origem foram selecionados para posterior análise de restrição e seqüenciamento.

### 4.5 SUPEREXPRESSÃO DO GENE *lipC* DE *Haloarcula marismortui* EM *Escherichia coli*

#### 4.5.1 Triagem de Superexpressão com Anticorpos Anti-cauda de Histidinas

Neste método, a expressão da proteína é realizada em quatro estirpes de *E. coli*, três meios de cultivo e três temperaturas, resultando em um plano experimental

de 36 combinações que foi computacionalmente gerado pelo programa SAmBA (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/samba/>) (AUDIC *et al.*, 1997; VINCENTELLI *et al.*, 2005).

Um pré-inoculo foi feito em placa do tipo *Deep Well* de 24 poços, com 5 mL de meio LB e ampicilina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), esta cultura foi desenvolvida a  $37^{\circ}\text{C}$  e 250 rpm por 16 h. Após obtenção do pré-inoculo, três placas *Deep Well* de 24 poços foram preparadas com os meios LB, TB e SB, na ordem representada na Tabela 4. As placas foram inoculadas com o pré-inóculo e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  até a D.O.<sub>600</sub> de 0,4.

TABELA 4 – ESQUEMA UTILIZADO NA TRIAGEM DE SUPEREXPRESSÃO DO GENE *lipC* DE *Haloarcula marismortui* EM *Escherichia coli*

Estirpe	Placa 1	Placa 2	Placa 3
	37°C	25°C	17°C
BL21(DE3)pLysS <sup>a</sup>	LB	TB	SB
Rosetta(DE3)pLysS <sup>b</sup>	LB	SB	TB
Origami(DE3)pLysS <sup>c</sup>	SB	TB	LB
C41(DE3)pRARE <sup>d</sup>	TB	LB	SB

Cada condição foi realizada com uma estirpe em três diferentes temperaturas e meios. a – estirpe de *E. coli* utilizada para a superexpressão de genes sob controle do promotor T7, b – estirpe de *E. coli* utilizada para a expressão de genes que contém códons raros, ou aqueles que são utilizados em baixa frequência por *E. coli*, c- estirpe de *E. coli* que contém algumas mutações que favorece a expressão de proteínas que possuem muitas pontes dissulfeto e d – estirpe derivada da BL21(DE3) que é capaz de expressar proteínas tóxicas.

Atingida a D.O.<sub>600</sub> de 0,4, IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado para a concentração final de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . As placas planejadas para indução a  $37^{\circ}\text{C}$  foram incubadas por mais 4 h nesta temperatura, sendo que as placas planejadas para indução a 17 e  $25^{\circ}\text{C}$  foram incubadas nestas temperaturas durante mais 16 h. Logo após o início da indução, uma alíquota de 1,5 mL foi pipetada, centrifugada ( $10.000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e as células foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após o tempo de indução, uma alíquota de volume variável foi coletada e tratada como anteriormente. O volume da alíquota após indução foi pipetado levando em

consideração a D.O.<sub>600</sub> determinada no momento da coleta. Assumiu-se que para uma D.O.<sub>600</sub> de 0,4; 1,5 mL de cultura foi coletado. Quando a cultura atingiu valores de D.O.<sub>600</sub> superiores a 0,4, volumes menores de meio foram coletados, sempre respeitando a proporção de 0,4 para 1,5 mL conforme definida inicialmente.

As amostras foram centrifugadas e as células foram congeladas a -20°C. Após descongelamento, foram adicionados DNase e lisozima para uma concentração final de 10 µg.mL<sup>-1</sup> e 20 mmol.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>. Após meia hora a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (10.000×g, 4°C, 10 min) para separação das frações solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuspenso em 300 µL de tampão Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8 com 8 mol.L<sup>-1</sup> de uréia. Volumes de 250 µL de cada fração foram depositados em uma membrana de nitrocelulose (Biorad, Hercules, CA, EUA) e bloqueadas 2 h com solução de soroalbumina bovina a 3% (m/v) em tampão TBS (20 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCL pH 8,0, 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl). Após isto, a membrana foi lavada duas vezes durante 10 min com tampão TBS contendo Tween 20 0,1% (v/v). Uma lavagem adicional de 10 min foi feita com tampão TBS. A membrana foi incubada com anticorpo anti-cauda de histidinas conjugado à *Horseradish* peroxidase (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) na diluição de 1:5.000 por 2 h. Para assegurar a remoção de todo o anticorpo não ligado, a membrana foi lavada duas vezes (10 min) com tampão TBS + Tween 20 0,1% (m/v) e uma vez com tampão TBS (10 min). As membranas foram incubadas com o reativo ECL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) e reveladas por luminescência com exposição a um filme fotográfico por 10 s.

Para cada condição de expressão foi atribuído um valor de 0 a 3 dependendo da intensidade da amostra por análise visual. Somente as frações solúveis foram avaliadas.

#### 4.5.2 Superexpressão do gene *lipC* em *E. coli* a partir do vetor pET14b/*lipC*

A estirpe de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen, Gibbstown, NJ, EUA) foi transformada com o plasmídeo contendo o gene *lipC* clonado em pET14b e

cultivada por 12 h em meio LA com  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina e  $34 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloramfenicol. Após crescimento, as colônias foram transferidas para 10 mL de meio LB, contendo os mesmos antibióticos, para cultivo do pré-inóculo (16 h,  $37^\circ\text{C}$ ). A cultura obtida como pré-inóculo foi reinoculada em 1 L de meio LB para uma  $\text{DO}_{600}$  de 0,1 e cultivada até a  $\text{DO}_{600}$  de 0,4, a 250 rpm e  $37^\circ\text{C}$ . Quando atingida a  $\text{DO}_{600}$  de 0,4, IPTG foi adicionado para concentração final de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . As células foram incubadas por mais 4 h e após este tempo foram centrifugadas ( $10.000\times g$ , 5 min) e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LipC DE *Haloarcula marismortui*

A cultura induzida como descrito no item anterior foi descongelada e ressuspensa em 40 mL de tampão de lise (Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8,0; KCl  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , Triton X-100 0,1% (m/v)). A suspensão de células foi sonicada com 6 pulsos de 10 s intercalados por incubação de 10 s em gelo. O lisado de células foi centrifugado por 15 min a  $12.000\times g$ . O sobrenadante foi coletado e denominado como fração solúvel, sendo analisado por eletroforese desnaturante SDS-PAGE, por atividade enzimática e concentração de proteína total pelo método de Bradford. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna cromatográfica do tipo *HiTrap Chelating 5* mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) carregada com  $\text{Ni}^{2+}$  e pré-equilibrada com tampão A (Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8,0, KCl  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , imidazol  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Após a injeção do sobrenadante, a coluna foi lavada com 25 mL de tampão A e a proteína recombinante foi eluída com um gradiente crescente linear de imidazol com 10 volumes de coluna, até atingir a concentração de  $500 \text{ mmol.L}^{-1}$ . As frações eluídas foram analisadas por eletroforese desnaturante SDS-PAGE e a atividade enzimática foi determinada. As frações que apresentaram atividade foram reunidas e aplicadas em uma coluna com uma matriz hidrofóbica Octyl-Sepharose CL 4B (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Foram utilizadas colunas Biorad *Poly-Prep Column* (Biorad, Hercules, CA, EUA) preenchidas com 1 mL de matriz. O gel foi equilibrado com tampão (Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8,0, KCl  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e a proteína, na concentração de  $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , foi aplicada, sendo a eluição feita por gravidade. As frações

coletadas foram reunidas analisadas por eletroforese SDS-PAGE e as atividades enzimáticas foram determinadas. Após esta etapa de purificação, a proteína foi concentrada por centrifugação com tubos Amicon<sup>®</sup> Ultra com membranas de exclusão de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA). A fração final foi analisada quanto a sua pureza e atividade enzimática. O grau de pureza foi determinado por densitometria de géis corados com Azul de Coomassie pelo programa ImageQuantTM.

#### 4.7 SEQÜENCIAMENTO N - TERMINAL DE PEPTÍDEOS

A enzima purificada foi digerida com trombina para liberar a cauda N-terminal de 6 histidinas e carregada em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Após migração, a banda foi transferida para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) em sistema de transferência semi-seco (Biorad, Hercules, CA, EUA) e corada com vermelho de Ponceau. A banda foi cortada da membrana e descorada com lavagens sucessivas com água destilada. A análise de seqüência N-terminal foi feita na plataforma de Proteômica do IBSM (*Institut de Biologie Structurale e Microbiologie*, Instituto de Biologia Estrutural e Microbiologia do CNRS, Marselha, França), usando um seqüenciador automático Applied Biosystem modelo 473A (Foster City, CA, EUA).

#### 4.8 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As análises por espectrometria de massa foram feitas na plataforma de Proteômica do IBSM-CNRS, Marselha, França por espectrometria do tipo MALDI-TOF, usando um espectrômetro Voyager DE-RP (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA, EUA). Como amostras, foram utilizadas solução de proteínas dialisadas contra água, para remoção do sal e componentes do tampão. Em um

poço de uma placa para MALDI-TOF foram depositados 1  $\mu\text{L}$  da amostra e 1  $\mu\text{L}$  da solução de matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) saturada em 50% de acetonitrila (v/v) e 0,1% de ácido trifluoracético (v/v). Após co-cristalização da amostra de proteína com a matriz, as amostras foram analisadas em modo linear positivo. O espectro resultante foi acumulado após 100 tiros de *laser* com duração de 5 ns. As condições de aquisição foram: voltagem de aceleração de 20 kV com um intervalo de 250 ns entre o pulso de laser e a aplicação da voltagem. Foram realizadas somente análises de massa para a proteína inteira.

#### 4.9 ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR

Os espectros de dicróismo circular de LipC (0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram coletados em tampão fosfato de sódio a 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,0 e na presença de concentrações crescentes de KCl, a 20°C em um espectropolarímetro Jasco 810 (Easton , Maryland, EUA). Cubetas de quartzo de 1 mm de espessura foram utilizadas. Os espectros foram medidos entre 200 a 260 nm a 0,2 nm/min, em triplicata. A interferência do tampão foi removida do espectro experimental. Os espectros foram atenuados usando o procedimento de *means-movement* implementado pelo programa *Spectra Manager* (Jasco, Easton , Maryland, EUA). Os valores de elipticidade média por resíduo ( $[\Theta]$ ) foram calculados como  $[\Theta] = 3300 \times m \times \Delta A / (l \times c \times n)$ , onde  $m$  é a massa molecular da proteína (36.168 Da),  $\Delta A$  é a diferença entre luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita,  $l$  é o caminho óptico (0,1 cm),  $c$  é a concentração de proteína (0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $n$  é o número de resíduos (349). Os dados experimentais no intervalo de 200 a 260 nm foram analisados usando o programa *DICHROWEB* (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>). O método de deconvolução K2d foi utilizado para estimar o conteúdo em  $\alpha$ -hélices (ANDRADE *et al.*, 1993).

#### 4.10 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

##### 4.10.1 Efeito da Concentração Salina na Atividade

O ensaio de atividade foi realizado pelo método titulométrico com vinil butirato ( $73,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em concentrações crescentes de NaCl (0 a  $5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e KCl (0 a  $4 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no tampão de reação, como descrito no item (5.10.1). As reações foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e pH 7,0.

##### 4.10.2 Efeito da Concentração Salina na Recuperação da Atividade

A enzima purificada (2 mL) foi dialisada contra 1 L de tampão Tris-HCl pH 8,0,  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  sem sal durante 16 h. A atividade específica da proteína dialisada foi determinada como descrito no item 4.13.1.1. A concentração de KCl na solução de proteína dialisada foi ajustada para 2 ou  $3 \text{ mol.L}^{-1}$  e incubada a  $4^\circ\text{C}$ . Amostras foram coletadas ao longo da incubação para determinação da atividade enzimática.

##### 4.10.3 Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima

A enzima foi incubada em banho-maria, em tubos Eppendorf de 1,5 mL, em uma concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , em tampão Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0 e  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl. As estabilidades em temperaturas de 40, 50 e  $60^\circ\text{C}$  foram analisadas determinando a atividade inicial e após 2 h de incubação. A atividade residual em cada temperatura foi determinada como a relação entre as atividades específicas após 2 h de incubação e a atividade específica inicial.

#### 4.10.4 Efeito do pH na Atividade Enzimática

O efeito de pH na atividade enzimática foi estudado na faixa de pH 4,0 a 9,0, usando butirato de vinila como substrato e  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl. Como o valor de  $pK_a$  do ácido butírico é 4,8, as medidas de atividade esterásica em baixos valores de pH foram realizadas por titulação em pH 9, após um período de reação de 3 min no pH do ensaio. Quando as titulações foram realizadas em pH 9, após a reação, ensaios-controle sem a enzima foram realizados para determinar a quantidade de NaOH requerida para aumentar o pH para 9 na ausência de ácidos livres. Esse valor foi subtraído dos valores obtidos para as reações catalisadas.

#### 4.10.5 Especificidade ao Substrato

Para determinar a especificidade da enzima a diferentes substratos, foram utilizados diferentes ésteres vinílicos, mono-, di- e triacilgliceróis. A atividade foi determinada nas condições descritas no item 4.13.1.1. Os substratos utilizados foram os seguintes: acetato de vinila, propionato de vinila, butirato de vinila, laurato de vinila, monocaprilina, dicaprilina, monocaprina, dicaprina, monolaurina, triacetina, tributirina, tricaprilina, tricaprina e trioleína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Hexanoato de vinila, octanoato de vinila, decanoato de vinila, miristato de vinila e palmitato de vinila foram obtidos da TCI-Europe (Antuérpia, Bélgica) e monobutirina da Acros Organics (Geel, Bélgica). A dibutirina foi preparada no laboratório EIPL-CNRS (Marselha, França) por hidrólise enzimática de tributirina com lipase pancreática humana e purificação por cromatografia em camada delgada preparativa.

#### 4.11 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A inibição da enzima foi testada com uma oxadiazolona denominada composto 7600 (5-metóxi-3-(4-fenóxifenil)-3H-[1,3,4]oxadiazol-2-ona), uma molécula previamente descrita como sendo um inibidor das enzimas da família HSL (lipase hormônio-sensível) (BEN ALI *et al.*, 2006) (Figura 12).

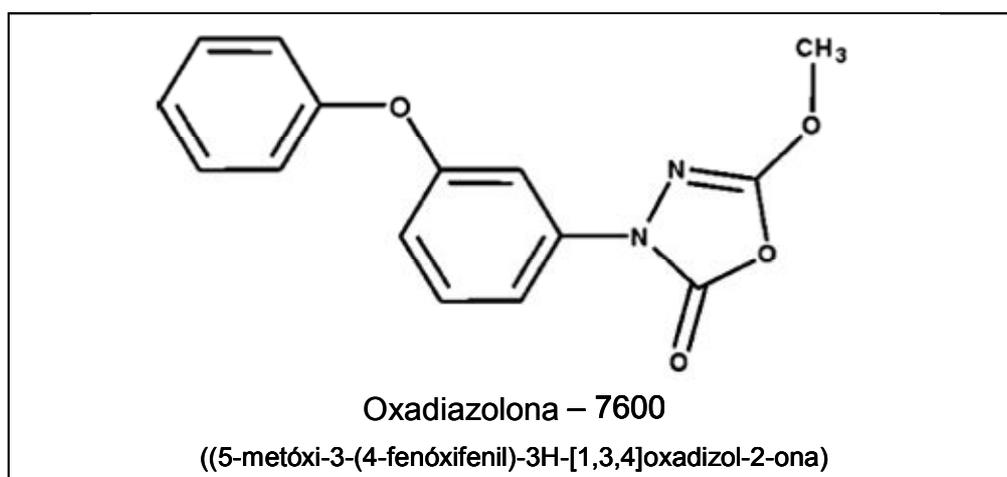


FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DA OXADIAZOLONA INIBITÓRIA - COMPOSTO 7600. Fonte: BEN ALI *et al.* (2006).

O composto 7600 foi gentilmente cedido pelo Dr. Stefan Petry (Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Alemanha). Os ensaios de inibição foram feitos em meio aquoso e na ausência de substrato (RANSAC *et al.*, 1997). A solução de enzima, com uma concentração de  $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $11 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), foi preparada em tampão Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0,  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl. Uma solução estoque a  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  do composto 7600 foi preparada em DMSO (dimetilsulfóxido) e uma alíquota de  $20 \text{ } \mu\text{L}$  foi adicionada para  $180 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de enzima. A concentração final de 7600 foi de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , resultando uma razão molar de inibidor:enzima igual a 100:1 e 10% de DMSO (v/v). A atividade residual foi determinada em vários tempos de incubação, usando butirato de vinila como substrato nas condições padrão (Tris-HCl  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl). Um ensaio controle sem o inibidor, mas na presença de DMSO a 10% (v/v) foi realizado para verificar que não houve perda de atividade causada por desnaturação do solvente durante o ensaio de inibição. A inibição com

os compostos E600 (dietil-*p*-nitrofenil fosfato) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfona) (Figura 13) foi avaliada de maneira similar, exceto que a razão molar inibidor:enzima foi de 10:1.

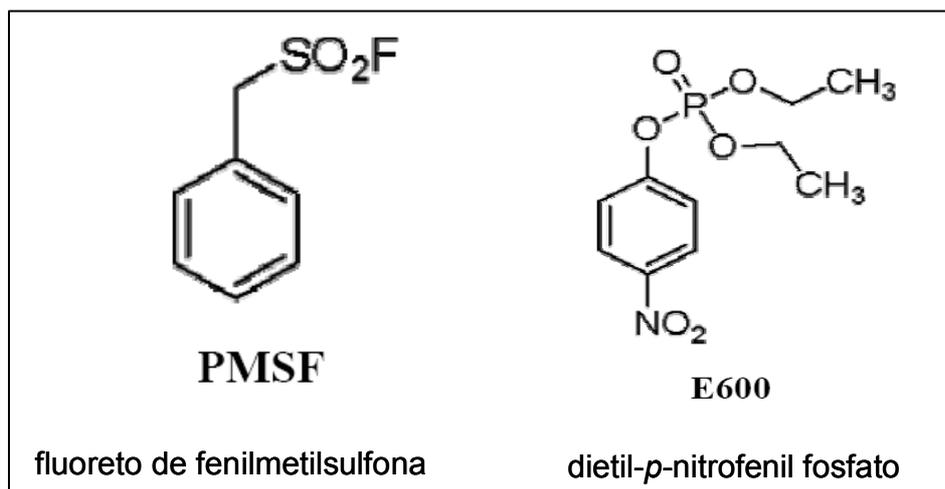


FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS INIBIDORES PMSF E E600

#### 4.12 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui* FRENTE A SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA

Para verificar a estabilidade da esterase de *H. marismortui* a solventes miscíveis em água, a enzima foi incubada à temperatura ambiente por 16 h em soluções contendo Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8, com 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl ou 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl. Quando se utilizou 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl no tampão, a concentração final de solvente foi de 30% (v/v) e quando com 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl, a concentração final de solvente foi de 60% (v/v). As atividades inicial e final foram medidas pelo método espectrofotométrico como descrito no item 4.13.1.2.

## 4.13 OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.13.1 Ensaio de Determinação de Atividade Enzimática

#### 4.13.1.1 Método Titulométrico

O método padrão para determinação da atividade enzimática foi o titulométrico, usando como substrato um éster vinílico, o butirato de vinila como representado na Figura 14.

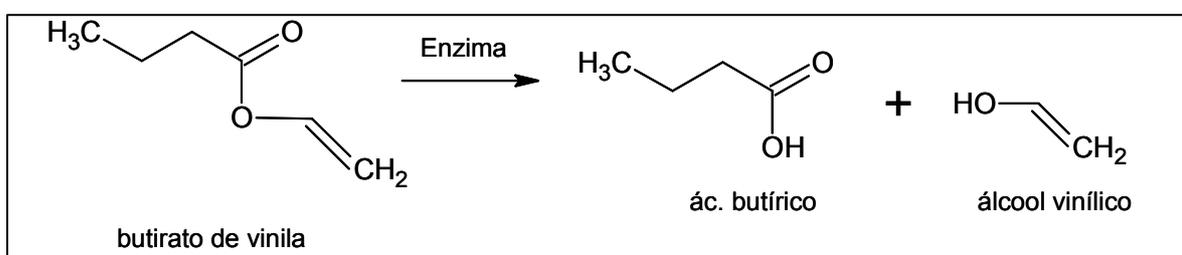


FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO ÉSTER BUTIRATO DE VINILA

A atividade foi determinada pela titulação do ácido liberado na reação de hidrólise do éster. A mistura reacional consistia de 150  $\mu\text{L}$  de substrato, 15 mL de tampão Tris-HCl 2,5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 com diferentes concentrações de sal em um reator termostaticado, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição da solução de enzima. A reação foi titulada automaticamente com NaOH 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  por um titulador automático do tipo pH-Stat (Metrohm, Herisau, Suíça). O resultado da titulação foi registrado em uma folha de papel graduada através de um registrador acoplado ao titulador (Amersham, Uppsala, Suécia). A atividade inicial foi calculada através da inclinação da reta, sendo que assumiu-se como unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima que gera 1  $\mu\text{mol}$  de produto por min.

#### 4.13.1.2 Método Espectrofotométrico.

Neste método utilizou-se o butirato de *p*-nitrofenila como substrato. A hidrólise deste composto libera um composto cromogênico, o *p*-nitrofenol que, em pH alcalino, tem forte cor amarela e, portanto, absorve a luz visível na região de 410 nm (Figura 15).

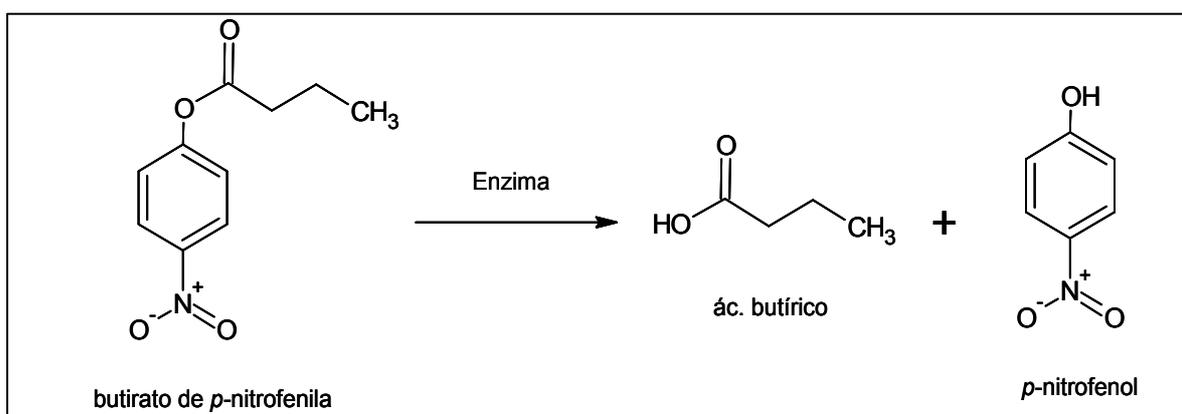


FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO ÉSTER BUTIRATO DE *p*-NITROFENILA

As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços, com um volume reacional de 200  $\mu\text{L}$ . O tampão de reação era composto dos seguintes componentes: Tris-HCl 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 8,0, 3  $\text{mol.L}^{-1}$  de KCl, 0,36% Triton X-100 (m/v) e isopropanol 2% (v/v). A solução estoque de substrato foi preparada na concentração de 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  em isopropanol. Cada poço da placa continha 200  $\mu\text{L}$  da mistura de tampão de reação mais substrato para concentração de 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 40  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 2  $\text{mol.L}^{-1}$  de KCl, pH 8,0 e 10  $\mu\text{L}$  da solução de enzima. As reações foram incubadas em uma sala com temperatura controlada de 20°C. O progresso das reações foi acompanhado em modo cinético a 410 nm em leitor de microplacas BIO-TEK, Modelo ELX800 (Highland Park, Vermont, EUA), sendo que uma unidade de atividade enzimática equivale à formação de 1  $\mu\text{mol}$  do produto por min.

#### 4.13.2 Determinação da Concentração de Proteínas pelo Método de Bradford

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (1976) em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram pipetados 30  $\mu\text{L}$  da amostra mais 170  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. A placa foi incubada 2 min à temperatura ambiente e absorvância das amostras foi medida a 595 nm. O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg de azul brilhante de Coomassie G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol a 95% (v/v), 100 mL de ácido fosfórico 85% (m/v) e diluído para 1 L de água destilada. Após dissolução, o corante foi filtrado através de papel filtro qualitativo. O padrão utilizado para as curvas de calibração foi soroalbumina bovina ( $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As curvas de calibração foram feitas com concentrações entre 0,6 a 6  $\mu\text{g}$  de proteína por poço. As amostras foram diluídas para terem absorvâncias correspondentes às absorvâncias obtidas na curva de calibração.

Nas amostras de proteína purificada, a concentração foi determinada por leitura direta a 280 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar teórico ( $\epsilon$ ) igual a  $25.900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , conforme calculado utilizando o programa ProtParam (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>).

#### 4.13.3 Eletroforese Desnaturante de Proteínas

A eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) foi feita em gel de poliacrilamida segundo LAEMMLI (1970), usando o gel de empilhamento com 5% de poliacrilamida (m/v) e o gel de separação com 12% de poliacrilamida (m/v). As proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05% (m/v) e descoradas com uma mistura de metanol:ácido acético:água (5/1/4, v/v/v). Para estimativa da massa foi utilizado um marcador com os seguintes padrões de massa molar: 116; 66,2; 45; 35; 25; 16,4 e 14,4 kDa (Fermentas Int., Burlington, Ontario, Canadá).

#### 4.14 MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA LipC DE *Haloarcula marismortui*

Para gerar um modelo molecular teórico e comparativo para a estrutura da esterase de *H. marismortui*, foi usado o servidor *on-line* SAM-T06, que utiliza métodos baseados nos modelos escondidos de Markov (HMM do inglês – *Hidden Markov Methods*) para a construção de perfis de famílias de proteínas usando somente a informação da seqüência (KARPLUS *et al.*, 2001; KARCHIN *et al.*, 2003; KARPLUS *et al.*, 2003; KARCHIN; KLINE; KARPLUS, 2004; KARPLUS *et al.*, 2005).

Este servidor é um método automatizado para gerar um modelo tridimensional fazendo uso de um conjunto de estruturas homólogas. Para tanto, a seqüência de aminoácidos é submetida ao servidor e, após algum tempo de processamento, este retorna uma lista com os melhores moldes encontrados. O servidor SAM T-06 utiliza um procedimento em etapas: 1) busca iterativa no banco de dados PDB por seqüências homólogas à seqüência alvo usando os algoritmos SAM-T2K e SAM-T04 (BERMAN *et al.*, 2000); 2) predição de propriedades estruturais locais usando redes neurais; 3) identificação de possíveis moldes de enovelamento usando métodos de HMM de duas e três filas; 4) geração de alinhamentos com os moldes identificados; 5) construção de uma biblioteca de fragmentos específica para a seqüência alvo usando o programa interno FRAGFINDER; 6) empacotamento de fragmentos e alinhamentos que tenham enovelamento reconhecido para construir um modelo estrutural usando o programa interno UNDERTAKER.

A minimização de energia do modelo estrutural gerado pelo SAM-T06 foi feita usando o programa GROMOS96, implementado pelo Swiss PDB Viewer (VAN GUSTEREN *et al.*, 1995). Para tal, foram realizadas 400 etapas de minimização pelo método *steepest-descent*.

#### 4.15 VALIDAÇÃO DO MODELO MOLECULAR

A qualidade final do modelo foi avaliada pelo programa WHAT IF (<http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>) (VRIEND, 1990). O programa para gráficos moleculares PyMol foi utilizado para visualização e manipulação do modelo (DELANO, 2002).

Os cálculos de potencial eletrostático foram realizados resolvendo a equação de Poisson-Boltzmann com o programa DelPhi (ROCCHIA *et al.*, 2001). Os cálculos foram realizados utilizando constantes dielétricas padrões de 2 e 80 para a proteína e o solvente, respectivamente. Um tamanho de grade de 240 x 240 x 240 foi utilizado para os cálculos, como também o esquema de cargas de Klapper *et al.* (1986). Os mapas de representação eletrostática foram manipulados no PyMol.

Os cálculos da superfície acessível do modelo foram feitos com o programa Turbo Frodo (ROUSSEL; CABBILLAU, 1991).

O alinhamento entre a LipC de *H. marismortui* e sua melhor estrutura molde, a proteína EST2, uma esterase termofílica da bactéria *Alicyclobacillus acidocaldarius* (código no PDB – 1U4N), foi feito pelo servidor SSM (*Secondary Structure Matching*), que gera alinhamentos de estruturas tridimensionais de proteínas (KRISINEL; HENRICK, 2004). O alinhamento foi desenhado usando o programa ESPript 2.0 (GOUET *et al.*, 1999).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, o gene que codifica a esterase/lipase putativa de *H. marismortui* será referido como *lipC* e a proteína que é codificada por esse gene, como LipC.

### 5.1 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO GENE *lipC* DE *Haloarcula marismortui*

Para localizar genes anotados como possíveis lipases/esterases em genomas de arqueas halofílicas, fez-se necessária uma busca nos genomas que até então estavam seqüenciados. Após seleção dos genes candidatos, estes foram analisados quanto à homologia existente com outras lipases e esterases e também, quanto à presença de domínios conservados característicos a esta família de enzimas.

Para tal, foi feita uma busca em genomas de arqueas halofílicas que estavam seqüenciados e publicados até o momento da análise (julho de 2005), que no total eram apenas três genomas: (1) *Halobacterium* sp. NRC-1 (NG *et al.*, 2000), (2) *Haloarcula marismortui* (BALIGA *et al.*, 2004) e (3) *Natronomonas pharaonis* (FALB *et al.*, 2005). Utilizando os recursos disponíveis no sítio do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>) e palavras-chave tais como *lipase*, *esterase* e *hydrolase*, não foi encontrado nenhum gene candidato em *Halobacterium* sp. NRC-1, no entanto, no genoma de *Haloarcula marismortui* e *Natronomonas pharaonis* foram localizados alguns genes potenciais que estão listados na Tabela 5.

Em *N. pharaonis* foram encontrados três genes alvos, sendo que apenas 1 gene poderia codificar para uma lipase/esterase. No entanto, como já se possuía a estirpe de *H. marismortui*, resolveu-se por investir na clonagem apenas de genes desta arquea.

No genoma de *H. marismortui* foram encontrados seis genes candidatos a codificar para uma lipase, esterase ou fosfolipase. Dos seis genes analisados, o único que apresentou os domínios conservados similares a lipases (esterase e domínio  $\alpha/\beta$  hidrolase 3) foi o gene *lipC*, que foi anotado pelo projeto genoma de *H. marismortui* como uma possível lipase/esterase. Entretanto, a indicação de lipase/esterase foi obtida somente por análise de seqüências, sem confirmação de atividade.

TABELA 5 – GENES DE LIPASES/ESTERASES E FOSFOLIPASES PUTATIVAS ENCONTRADOS NOS GENOMAS DE *Haloarcula marismortui* E *Natronomonas pharaonis*

Organismo	ORF - Identificação do gene <sup>a</sup>	Anotação <sup>b</sup>
<i>Haloarcula marismortui</i>	rrnAC0088 – <i>lipC</i>	lipase/esterase
	rrnAC0167	fosfolipase putative do tipo patatina
	rrnAC1163 – <i>estA</i>	fosfolipase / carboxilesterase
	rrnAC1442 – <i>pld</i>	fosfolipase D
	rrnB0107	fosfolipase putativa responsiva a carboidrato
	rrnAC0790 – <i>est</i>	Carboxilesterase
<i>Natronomonas pharaonis</i>	NP0858A	lipase/esterase
	NP3226A	Proteína homóloga a fosfolipase D
	NP5378A	Proteína homóloga a hidrolase com dobramento alfa/beta hidrolase

a – Número da ORF como anotada em cada genoma e a identificação dada ao gene disponível no sítio do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Quando não há uma identificação acompanhada do número da ORF deve-se assumir que nenhuma identificação foi dada ao referido gene. b – Definição da função do gene conforme definida pela anotação do genoma de cada microrganismo e disponível no sítio do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Além de *lipC* foram encontrados no genoma de *H. marismortui*, genes de fosfolipases e em especial uma fosfolipase do tipo patatina. Patatina é uma glicoproteína de estoque em batata, que foi primeiramente isolada dos tubérculos

deste vegetal e que também apresenta uma baixa atividade lipolítica (BANEJI; FLIEGER, 2004). Em *Pseudomonas aeruginosa* foi confirmado que a citotoxina ExoU, que atua no processo de infecção por esta bactéria, é uma patatina que apresenta atividade lipolítica e fosfolipásica A (SATO *et al.*, 2003). O fato de esta proteína apresentar alta homologia com patatinas de plantas, fez com que tenha sido classificada como a primeira patatina bacteriana caracterizada e uma das poucas que se tem conhecimento até o momento. Especificamente em Archaea, até o momento, não se tem conhecimento de nenhuma patatina que tenha sido estudada, mostrando que o gene *rrnAC0167* de *H. marismortui* representa uma boa oportunidade para o estudo desta proteína.

TABELA 6 – ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADA PELO GENE *lipC*

Identificação do domínio <sup>a</sup>	Posição na seqüência de aminoácidos <sup>b</sup>	Escore normalizado	E-value
Esterase <sup>c</sup>	49-143	12,8	3,7 x 10 <sup>-6</sup>
$\alpha/\beta$ hidrolase 3 <sup>d</sup>	51-141	21,2	1,4 x 10 <sup>-14</sup>
Peptidase S9 : família das proliil oligopeptidases <sup>d</sup>	160-239	18,9	2,8 x 10 <sup>-12</sup>

a – A análise foi feita pelos programas Pfam (FINN *et al.*, 2008) e Prosite (HULO *et al.*, 2007). Apenas os domínios que foram considerados significativos pelos programas foram considerados nesta análise. b – Os números referem-se as posições de início e término da região localizada como um domínio conservado. c – Domínio conservado detectado pelo programa Prosite. d – Domínios conservados detectados tanto pelos programas Prosite quanto Pfam.

Dos genes apresentados na Tabela 5, optou-se pelo gene *lipC*, devido a análise de domínios conservados, como apresentada na Tabela 6. O domínio Esterase localizado entre os resíduos 49-143 é um domínio amplo, reconhecido em diversas famílias de proteínas, sendo estas carboxilesterases, lipases e tioesterases.

O mesmo ocorre para o domínio  $\alpha/\beta$  hidrolase-3, que é largamente encontrado em esterases e lipases. O número 3 que acompanha o nome do domínio indica a topologia do dobramento, já que  $\alpha/\beta$  hidrolases também podem ter dobramentos alternativos 1 e 2, dependendo da disposição das  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  que compõem a parte central do dobramento (OLLIS *et al.*, 1992). A propriedade comum do dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase é que este é organizado como uma seqüência de folhas- $\beta$  intercaladas por  $\alpha$ -hélices. A topologia geral das proteínas que possuem este dobramento é altamente variável, principalmente devido às diferenças nas voltas que conectam as estruturas secundárias entre si (ØSTERLUND, 2001). De fato, o dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase-3 foi proposto a partir da determinação da estrutura de algumas esterases de origem bacteriana e de arquea. No banco de dados do Pfam (FINN *et al.*, 2008), foram encontradas quatro estruturas tridimensionais de esterases bacterianas e de arqueas classificadas como sendo da família  $\alpha/\beta$  hidrolase-3, sendo estas: (1) uma acetil esterase HerE de *Rhodococcus* sp. (ZHU *et al.*, 2003), (2) uma carboxilesterase de *Archaeoglobus fulgidus* (DE SIMONE *et al.*, 2001), (3) uma carboxilesterase isolada de uma biblioteca metagenômica (BYUN *et al.* – resultados não publicados) e (4) uma carboxilesterase EST2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (DE SIMONE *et al.*, 2000). As principais propriedades estruturais entre estas proteínas é que todas possuem um dobramento central composto por oito folhas- $\beta$  e um número variável de  $\alpha$ -hélices de 9 a 11 e, somente com a exceção da EST2, todas formam dímeros. Além destas características, a presença freqüente deste dobramento em algumas lipases tal como as lipases da família HSL (lipase hormônio-sensível) humana e de rato foi preponderante para a seleção do gene *lipC* para posterior clonagem e caracterização.

Outra característica importante observada na seqüência de LipC é a presença de duas regiões bem conservadas entre as proteínas que fazem parte da família HSL: (1) o pentapeptídeo G-X-S-X-G, cobrindo os resíduos 126-130 e contendo a serina do sítio ativo (128) e, (2) a fenda oxianion que cobre os resíduos 55 e 58 (Figura 16).

		<b>fenda oxiânion</b>		<b>A</b>
LipC	50	VAVLVR <b>GGGA</b> FTSGDKGE	66	
EST2	76	ALVYYH <b>GGG</b> WVVGDLT	92	
Af EST	81	VLVYYH <b>GGG</b> FVICSI	97	
Rv1399c	83	VVYYH <b>GGG</b> WSLGGLDT	99	
Brefeldine A	120	GLVYTH <b>GGG</b> MTILTDDN	136	
Rh EST	81	VLLWIH <b>GGG</b> FAIGTAES	97	
Sv AH	68	--LYLH <b>GG</b> SVALGSPQS	84	
rHSL	644	LVVHIH <b>GGG</b> FVAQTSKS	660	
hHSL	646	LIVHFH <b>GGG</b> FVAQTSRS	662	

		<b>pentapeptídeo</b>		<b>B</b>
LipC	121	RVVGV <b>GHSAG</b> NLIVLA	137	
EST2	153	KIFV <b>GDSAG</b> GNLAAAV	169	
Af EST	148	RIAV <b>GDSAG</b> GNLAAVT	164	
Rv1399c	155	RIAV <b>GDSAG</b> GNISAVM	171	
Brefeldine A	195	-VVV <b>QGESG</b> GNLAIAT	211	
Rh EST	153	RIAV <b>GGESAG</b> GGLAAGT	169	
Sv AH	136	RITF <b>AGDSAG</b> AGLAVAA	152	
rHSL	716	RICL <b>AGDSAG</b> GNLCITV	732	
hHSL	718	RICL <b>AGDSAG</b> GNLCFTV	734	

FIGURA 16 – ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE LipC COM SEQÜÊNCIAS DE ENZIMAS DA FAMÍLIA DAS LIPASES HORMÔNIO-SENSÍVEIS

(A) fenda oxiânion e (B) seqüência do pentapeptídeo contendo a serina do sítio catalítica. Esterase de *Haloarcula marismortui* (LipC, acesso no GenBank - YP\_134872) (BALIGA *et al.*, 2004) esterase de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (EST2 - 1EVQ\_A) (DE SIMONE *et al.*, 2000), esterase de *Archaeoglobus fulgidus* (Af EST - 1JJIA) (MANCO *et al.*, 2000), esterase de *Mycobacterium tuberculosis* (Rv1399c - CAB02180) (CANAAN *et al.*, 2004), esterase Brefeldina A de *Bacillus subtilis* (Brefeldine A - 1JKM\_A) (WEI *et al.*, 1999), heroína esterase de *Rhodococcus* sp. (Rh EST - AAC45283) (RATHBONE *et al.*, 1997), acetil hidrolase de *Streptomyces viridochromogenes* (Sv AH - Q57146) (WOHLLEBEN *et al.*, 1988), lipase hormônio-sensível de rato (rHSL - P15304) (HOLM *et al.*, 1988) e lipase hormônio-sensível humana (hHSL - Q05469) (LANGIN *et al.*, 1993). Os resíduos marcados em negrito delimitados pela caixa indicam os resíduos mais conservados. A serina catalítica está indicada com um asterisco (\*).

O grau de similaridade entre LipC e outras lipases e esterases da família HSL sugeriu que LipC também pertença à esta família, apesar de algumas diferenças pontuais terem sido observadas nas regiões da fenda oxianion e do pentapeptídeo. Com respeito à fenda oxianion, a seqüência HGGG é inteiramente conservada entre os membros da família HSL, entretanto, em LipC foi encontrada a seqüência RGGA. Em relação ao pentapeptídeo (GX SXG), o segundo resíduo desta região em LipC é uma histidina (posição 127), enquanto em outras enzimas da família HSL normalmente há um resíduo de aspartato ou glutamato nesta posição (Figura 16).

Além disso, também foi observado entre os resíduos 160 a 239 um domínio relacionado a peptidases do tipo S9, que ocorre freqüentemente em prolil oligopeptidases (E.C. 3.4.21.26). Estas enzimas recebem este nome porque hidrolisam ligações peptídicas ligadas à carboxila de resíduos de prolina (POLGÁR, 2002). Elas também apresentam o dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase e possuem uma serina catalítica, como ocorre em esterases e lipases, no entanto, diferentemente de endopeptidases e exopeptidases, não são capazes de hidrolisar peptídeos com mais do que 30 aminoácidos (REA; FÜLÖP, 2006). Polgár (1992) comparou as seqüências de prolil oligopeptidases com lipases de diferentes origens e, encontrou homologia entre estas duas famílias de enzimas com relação aos resíduos que compõe a tríade catalítica (serina – aspartato – histidina). Em oligopeptidases, a tríade catalítica também é organizada com a seqüência serina – aspartato – histidina. Por este motivo, o autor sugeriu que prolil oligopeptidases e lipases são evolutivamente relacionadas. Mesmo sendo distantes, estas duas famílias parecem mostrar alguma relação evolutiva baseada em três principais características: (1) homologia de seqüências das regiões envolvidas na catálise, (2) topologia similar da tríade catalítica e (3) o sítio ativo de oligopeptidases também não é inteiramente aberto (POLGÁR, 1992). Na Figura 17 é mostrada uma comparação entre a região do domínio peptidase S9 (160 a 239) encontrado em LipC com a seqüência do domínio peptidase S9 de duas oligopeptidases de arquea já caracterizadas, sendo estas: (1) a prolil oligopeptidase (POP) de *Pyrococcus furiosus* (HARRIS *et al.*, 2001) e (2) a acilpeptídeo hidrolase (APH) de *Aeropyrum pernix* K1 (GAO *et al.*, 2003; BARTLAM *et al.*, 2004).

LipC	212	DAPPTLLLHGSE <b>DDVVPP</b> SQSELLADAL-	239
POP Pfu	549	-YPPTLIYTGLH <b>DDRVHP</b> AHALKFFMKLK	575
APH Ape	512	IKEPLALIHPQ <b>ND</b> SRTPLKPLLRLMGELL	540

FIGURA 17 – ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE LipC COM OLIGOPEPTIDASES DE ARQUEA

A posição do resíduo de aspartato do sítio ativo está indicada pelo asterisco (\*). A região vizinha ao aspartato do sítio ativo está destacada em negrito. LipC – lipase/esterase de *Haloarcula marismortui* (BALIGA *et al.*, 2004), POP Pfu – prolil oligopeptidase de *Pyrococcus furiosus* (HARRIS *et al.*, 2001) e APH Ape – acilpeptídeo hidrolase de *Aeropyrum pernix* K1 (GAO *et al.*, 2003; BARTLAM *et al.*, 2004).

Apesar das seqüências apresentarem certa semelhança ao redor do resíduo de aspartato 224 em LipC, 560 na POP Pfu e 524 na APH APE, é válido salientar que há uma substituição de uma valina (resíduo 226 em LipC) por uma arginina (resíduos 562 na POP Pfu e 526 na APH Ape). Wang *et al.* (2006) mostraram que um resíduo de arginina a dois aminoácidos do aspartato do sítio catalítico é altamente conservado entre acilpeptídeo hidrolases e prolil oligopeptidases. Porém, em lipases e esterases da família HSL, esta posição é sempre ocupada por um resíduo com característica hidrofóbica. Sendo assim, Wang *et al.* (2006) testaram vários mutantes no resíduo de arginina 526 da APH de *Aeropyrum pernix* e observaram que, trocando a arginina 526 por uma valina, a atividade esterásica do mutante aumentou 150 vezes em relação a sua atividade peptidase. Portanto, este resíduo parece ser importante para discriminar entre uma oligopeptidase e uma esterase (WANG *et al.*, 2006). Além disso, outro domínio que normalmente é observado na região N-terminal de oligopeptidases é denominado de “ $\beta$ -propulsor”, pois sua estrutura lembra a de um motor com várias hélices, como um motor de barco (BARTLAM *et al.*, 2004) (Figura 18). Na acilpeptídeo hidrolase de *Aeropyrum pernix*, este domínio é constituído de sete “lâminas”, sendo que cada uma delas é constituída de quatro folhas- $\beta$  antiparalelas (Figura 18).

O fato de LipC não apresentar o domínio  $\beta$ -propulsor N-terminal e, de apresentar uma valina ao invés de uma arginina na posição que é altamente conservada em oligopeptidases, leva a supor que o domínio conservado peptidase S9 não tenha significado funcional para esta proteína. Provavelmente, este domínio foi detectado pela relação evolutiva que há entre estas duas famílias de proteínas e que já foi anteriormente relatada na literatura (POLGÁR, 1992).

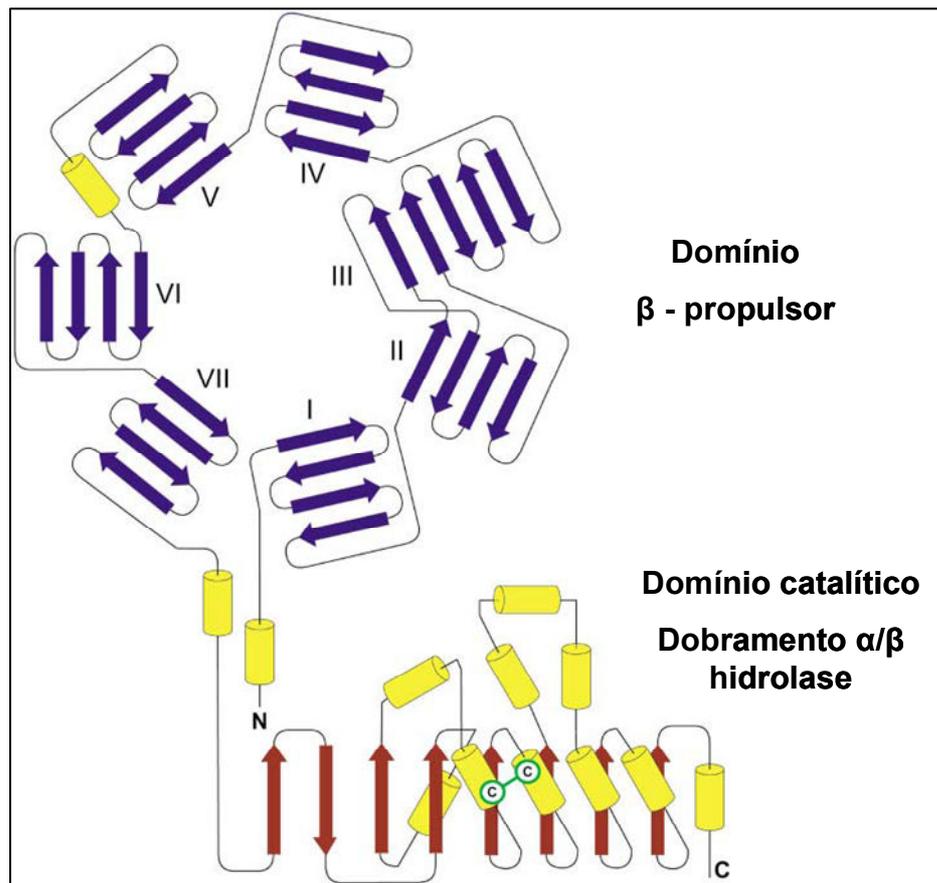


FIGURA 18 – TOPOLOGIA DA ESTRUTURA DA ACILPEPTÍDEO HIDROLASE DE *Aeropyrum pernix*

O domínio N-terminal possui um domínio do tipo  $\beta$ -propulsor enquanto no domínio catalítico C-terminal observa-se um dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase. As  $\alpha$ -hélices são mostradas como cilindros em amarelo, no domínio N-terminal são mostradas em azul e folhas- $\beta$  no domínio C-terminal em vermelho. Dois resíduos de cisteína (C) mostrados em verde no domínio C-terminal formam uma ponte dissulfeto entre duas  $\alpha$ -hélices. Fonte: BARTLAM *et al.* (2004).

Além de analisar os domínios conservados de LipC, a sua seqüência de aminoácidos também foi analisada pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), com o intuito de verificar quais eram as proteínas com maior similaridade. A análise de homologia de LipC com outras proteínas feita pelo BLAST encontrou apenas

seqüências com relativamente baixa identidade no banco de dados do GenBank (BENSON *et al.*, 2008) (Tabela 7). As seqüências encontradas codificam para esterase ou lipases putativas, porém, apresentam apenas entre 32 a 39 % de identidade com a seqüência de LipC.

Uma propriedade interessante que foi identificada pela análise bioinformática de LipC foi o seu baixo ponto isoelétrico teórico (pI), calculado em 4,24, sendo que este baixo valor provavelmente seja devido ao maior número de resíduos ácidos (ácido aspártico e glutâmico), que equivalem a 16,8% dos aminoácidos da seqüência (Tabela 7).

O gene *lipC* de *H. marismortui*, além de apresentar somente baixa identidade frente a genes de esterases/lipases putativas, também não apresenta genes homólogos em outras arqueas halofílicas. Através do sítio do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>) fez-se uma análise dos genes ortólogos e parálogos relacionados a *lipC* (Tabela 8). Genes ortólogos são aqueles presentes em diferentes espécies que evoluíram de um ancestral comum e geralmente retém uma função similar ao longo da evolução (GRIGORYEV *et al.*, 2004). Genes parálogos são aqueles homólogos que resultaram de um evento de duplicação gênica dentro de um único genoma. Estes genes podem ter funções diferenciadas (KOONIN, 2005).

A análise mostrou que não há genes homólogos a *lipC* em *H. marismortui* e o gene encontrado com maior identidade foi uma prolil oligopeptidase, mas com apenas 26,3% de identidade. Este resultado reforça o fato de que lipases/esterases e prolil oligopeptidases devam ser mesmo evolutivamente correlacionadas. Também não foram observados genes ortólogos ao gene *lipC* em outras arqueas halofílicas, e observou-se apenas genes ortólogos a *lipC* em bactérias.

TABELA 7 – ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DA SEQÜÊNCIA DE LipC E SEQÜÊNCIAS RELACIONADAS ENCONTRADAS PELO BLAST

Identificação do gene <sup>a</sup>	Domínio Organismo	M.M. (kDa) <sup>b</sup>	Identidade <sup>c</sup> (%)	Anotação	(Asp+Glu) <sup>d</sup>	% (Asp+Glu)/total de aminoácidos	pi teórico <sup>e</sup>
<i>lipC</i> 3128745	Arquea <i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	34,0	100	lipase/esterase	55	16,8	4,24
ZP_01736589	Bacteria <i>Marinobacter</i> sp. ELB17	32,8	39	lipase/esterase	20	6,5	7,17
ABX10578	Bacteria, planctomiceto não-cultivado 5H12 (amostra ambiental)	38,5	32	lipase/esterase	43	12,3	6,50
ZP_01094419	Bacteria <i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	29,5	35	lipase/esterase	23	8,3	6,49
YP_001544283	Bacteria <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	41,9	32	esterase/lipase	29	7,4	5,60

a – identificação do gene disponível no GenBank (NCBI).

b – Massa molecular calculada pelo ProtParam (ExpPasy) baseada na seqüência de aminoácidos codificada pelo gene.

c – Resultados de identidade contra a seqüência de LipC.

d – Número de resíduos carregados negativamente, aspartato e glutamato, calculado pelo ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

e – pi teórico calculado pelo ProtParam baseado na seqüência de aminoácido de cada proteína.

TABELA 8 –GENES PARÁLOGOS E ORTÓLOGOS AO GENE *lipC* DE *Haloarcula marismortui*

Genes Parálogos	Genes Ortólogos
rrnAC0178 – <i>pop</i> (prolil oligopeptidase) - 26,3% <sup>a</sup>	<i>Solibacter usitatus</i> - Acid_1077 – hidrolase contendo domínio alfa/beta – 32,8%
rrnAC2119 – proteína hipotética (provável peptidase S9) - 26,2%	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> - Haur_1511 – lipase/esterase – 32,8%
rrnAC0967 – <i>hypE</i> (formação do complexo da hidrogenase) - 25%	<i>Nocardioides</i> sp. JS614 - Noca_2793 - hidrolase contendo domínio alfa/beta – 34,1%
rrnB0241 – <i>acaA</i> (ACP sintase) – 26,7%	<i>Mycobacterium marinum</i> M -MMAR_0463 – esterase – 34%
rrnAC0538 – proteína hipotética – 24,8%	<i>Mycobacterium ulcerans</i> - MUL_1112 – esterase – 34%
rrnAC2273 – proteína hipotética contendo domínio peptidase e alfa/beta hidrolase – 25,3%	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> - Saro_1585 – dienolactona hidrolase – 36%
rrnAC0293 – proteína hipotética – 26,6%	<i>Mycobacterium smegmatis</i> - MSMEG_0289 - hidrolase contendo domínio alfa/beta – 33,6%
rrnAC3448 – proteína hipotética – 31%	<i>Chlorobaculum parvum</i> NCIB 8327 - Cpar_0065 - hidrolase contendo domínio alfa/beta – 35,6%
pNG5091 – <i>traD</i> – proteína envolvida no processo de transferência de DNA (conjugação) – 25,6%	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11 - TBF_10222 – esterase – 30,6%
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra - MRA_0228 – esterase – 30,6%

Dados obtidos no sítio do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>) no banco de dados do KEGG/SSDB (*Sequence Similarity DataBase*). (a) - O número acompanhando a identificação de cada gene refere-se a identidade com a seqüência de *lipC*.

A análise realizada pelo programa DAS (CSERZO *et al.*, 1997) mostrou que nenhum domínio transmembrana foi identificado na seqüência de LipC. Os domínios transmembrana são encontrados freqüentemente em proteínas de membrana. Estes domínios são estáveis em contato com a membrana celular e assim são capazes de ancorar a proteína através de interações hidrofóbicas (VON HEIJNE, 1994). Portanto, os domínios transmembrana são quase sempre ricos em resíduos hidrofóbicos e podem assumir diferentes conformações como  $\alpha$ -hélice, um complexo de várias  $\alpha$ -hélices ou uma conformação na forma de barril- $\beta$  (VON HEIJNE, 1994). Portanto, este resultado sugere que provavelmente LipC não seja uma proteína integral de membrana em *H. marismortui* e tampouco apresente um domínio de ancoragem na membrana.

A análise realizada pelo programa SignalP 3.0 (BENDTSEN *et al.*, 2004) mostrou que não há nenhum peptídeo sinal na seqüência de LipC, indicando que esta proteína provavelmente seja encontrada no citoplasma de *H. marismortui*. No entanto, como relatado por KWAN, THOMAS e BOLHIUS (2009), em arqueas halofílicas há uma ampla utilização do sistema de secreção do tipo TAT (*Twin Arginine Translocation* – sistema de translocação de argininas geminadas). Portanto, realizou-se uma análise específica para o sistema TAT utilizando o programa TatP 1.0 (BENDTSEN *et al.*, 2005) e nenhuma seqüência reconhecida pelo sistema TAT foi encontrada em LipC, indicando que esta proteína também não é secretada por este sistema. Sendo assim, sugere-se que LipC seja uma proteína citosólica em *H. marismortui*.

Com os resultados da análise bioinformática do gene *lipC* de *H. marismortui* conclui-se que este codifique para uma enzima da família HSL apresentando atividade carboxilesterase, porém, a análise bioinformática foi incapaz de diferenciar se esta atividade seria lipolítica ou não-lipolítica. Sendo assim, uma caracterização da atividade de LipC foi realizada quanto a sua preferência ao substrato e também inibição por um inibidor da família HSL para confirmar experimentalmente os dados obtidos pela análise bioinformática.

Nos próximos tópicos serão descritos os resultados relativos à clonagem, superexpressão e purificação de LipC. Posteriormente, serão relatadas a

caracterização da sua atividade enzimática e, por fim, a modelagem estrutural comparativa.

## 5.2 CLONAGEM E SUPEREXPRESSÃO DE *lipC*

Quando *H. marsimortui* foi cultivada em meio Halobaculum gomorrense contendo tributirina, tricaprilina ou trioleína a 1% (m/v) nenhuma atividade foi detectada contra tributirina, tricaprilina ou trioleína, nem mesmo quando o meio de cultivo *Halobaculum gomorrense* tinha como fonte de carbono somente estes triacilgliceróis, para tentar induzir a expressão da enzima foi detectada atividade. Como a análise bioinformática mostrou que provavelmente LipC se tratava de uma enzima citosólica, foram preparados extratos livres de células por sonicação e novamente, usando este extrato como fonte de enzima, nenhuma atividade foi detectada contra tributirina, tricaprilina ou trioleína.

A maioria dos trabalhos na literatura que envolve a caracterização de proteínas halofílicas, tem optado pela expressão heteróloga em *E. coli* (DÍAZ *et al.*, 2006) ou em *Haloferox volcanii*, que também é uma arquea halofílica (FINE *et al.*, 2006), para a qual já existem alguns vetores de expressão desenvolvidos, além de que entre as arqueas halofílicas maior eficiência de transformação plasmidial tem sido relatada para *H. volcanii* (BERQUIST; MÜLLER; DASSARMA, 2006).

Portanto, decidiu-se clonar o gene *lipC* de *H. marismortui* e expressá-lo em *E. coli*. Para tanto, o gene *lipC* foi clonado por dois métodos: 1) clonagem por recombinação utilizando o sistema Gateway (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 2) clonagem inserindo dois sítios de restrição ao gene por PCR.

A triagem de expressão de *lipC* em *E. coli* a partir da construção pDEST14/*lipC* foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por Vincentelli *et al.* (2005). Neste método, a expressão da proteína é realizada em quatro estirpes de *E. coli*, três meios de cultivo e três temperaturas, resultando em um plano experimental de 36 combinações, que foi computacionalmente gerado pelo programa SAmBA (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/samba/>) (AUDIC *et al.*, 1997).

As frações solúvel e insolúvel obtidas em cada condição de expressão foram depositadas sobre uma membrana e incubadas com anticorpo anti-cauda de histidinas (Figura 19). Das quatro estirpes de *E. coli* testadas, apenas a estirpe Origami expressou *lipC* em baixa quantidade na fração solúvel, sendo que a estirpe BL21(DE3)pLysS o expressou apenas a 37°C. As estirpes Rosetta(DE3)pLysS e C41(DE3)pRARE mostraram bom desempenho na expressão de *lipC*. A estirpe Rosetta é normalmente utilizada para a expressão de proteínas que apresentam códons que são considerados raros em *E. coli*, ou seja, aqueles que normalmente são pouco utilizados por esta bactéria. Esta estirpe contém um plasmídeo denominado pRARE que expressa RNA transportadores (tRNA) para alguns códons considerados problemáticos em *E. coli*, sendo estes: arginina (AGG, AGA), prolina (CCC), isoleucina (AUA), glicina (GGA) e leucina (CUA). Já a estirpe C41, é uma estirpe derivada da estirpe BL21(DE3) (MIROUX; WALKER, 1996), que possui mutações na região promotora do gene que codifica a T7 RNA polimerase e que foram recentemente caracterizadas (WAGNER *et al.*, 2008). Segundo os autores, estas mutações levam a um menor grau de transcrição do gene da T7 RNA polimerase, o que como efeito global aumenta a sua capacidade de expressar proteínas tóxicas e proteínas de membrana. Analisando a Figura 19, para a intensidade de cada ponto, foi atribuído um *escore*, sendo que pontos pretos intensos receberam um *escore* 3, enquanto aqueles de menor intensidade *escores* entre 2 e 1 e aqueles imperceptíveis *escore* 0. Somente foram atribuídos *escores* para a fração solúvel de cada condição de expressão. Na Tabela 9 é mostrada uma análise de determinação de *escores* de cada condição de expressão e na Tabela 10, é mostrada a análise dos *escores* acumulados.

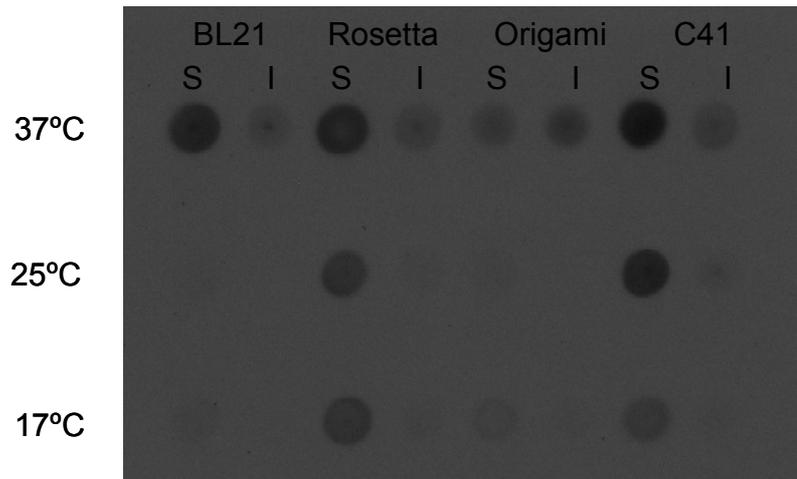


FIGURA 19 – DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE *lipC* EM *Escherichia coli* POR IMMUNOBLOT

Expressão do gene *lipC* a partir do vetor pDEST14/*lipC* utilizando diferentes estirpes de *E. coli*. Os extratos protéicos foram obtidos conforme descrito em Material e Métodos a partir de culturas induzidas a 17, 25 e 37°C. A proteína LipC foi detectada através da utilização de anticorpos anti-cauda de histidinas e sistema de quimioluminescência. S indica fração solúvel e I fração insolúvel do extrato celular. As estirpes utilizadas foram BL21(DE3) pLysS, Rosetta(DE3) pLysS, Origami(DE3) pLysS e C41(DE3) pRARE. Os meios utilizados foram LB, TB e SB conforme apresentados na Tabela 9 e na seção de Material e Métodos.

A melhor condição de expressão de LipC encontrada, analisando os *escores*, foi para a estirpe Rosetta(DE3)pLysS, 37°C em meio LB. Ensaio de superexpressão e purificação por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup> foram realizados conforme descrito em Material e Métodos e uma banda de proteína massa molar de aproximadamente 50 kDa foi obtida (Figura 20). Entretanto, o rendimento após a etapa de purificação por afinidade à cauda de histidinas foi muito baixo, atingindo cerca de 0,5 mg de proteína recombinante por litro de cultura. Este resultado indicou uma baixa expressão de LipC recombinante, apesar de o vetor utilizado possuir o promotor T7, um promotor conhecido pela forte ativação da transcrição (STUDIER; MOFFATT, 1986).

Para se confirmar a identidade da banda purificada, a mesma foi retirada do gel e sua seqüência N-terminal foi determinada pelo método de Degradação de Edman. A seqüência dos cinco primeiros aminoácidos da banda de 50 kDa (SerThrThrAlaArg) foi 100% idêntica a LipC de *H. marismortui* foi encontrada. No entanto, acredita-se que a baixa expressão deva ser por consequência específica da

construção pDEST14//lipC, já que em outros casos, como na expressão de uma monoacilglicerol hidrolase de *Mycobacterium tuberculosis*, rendimentos ao redor de 4 mg de proteína purificada por litro de cultura foram obtidos, expressando a proteína a partir de pDEST14 (CÔTES *et al.*, 2007). Porém, na Figura 20, observa-se que, mesmo no extrato solúvel livre de células anterior à purificação na região ao redor de onde migra LipC, há apenas uma banda com baixa concentração, descartando a hipótese que o baixo rendimento seja devido à purificação e reforçando que isto se deve de fato a uma baixa taxa de expressão da proteína.

TABELA 9 – ANÁLISE DOS RESULTADOS DE TRIAGEM DE EXPRESSÃO DE LipC EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Escherichia coli*

Condição	Estirpe	Meio	Temperatura (°C)	Escore <sup>a</sup>
1	BL21(DE3)pLysS	SB	17	1
2	Rosetta(DE3)pLysS	TB	17	3
3	Origami(DE3)pLysS	LB	17	1
4	C41(DE3)pLysS	SB	17	2
5	BL21(DE3)pLysS	TB	25	0
6	Rosetta(DE3)pLysS	SB	25	3
7	Origami(DE3)pLysS	TB	25	0
8	C41(DE3)pLysS	LB	25	3
9	BL21(DE3)pLysS	LB	37	3
10	Rosetta(DE3)pLysS	LB	37	3
11	Origami(DE3)pLysS	SB	37	2
12	C41(DE3)pLysS	TB	37	3

a - o escore para cada condição de expressão foi determinado arbitrariamente classificando a intensidade de cada ponto formado pela fração solúvel, considerando como escore 3 um ponto intenso na fração solúvel, escore 2 e 1 pontos de intensidade intermediária e baixa, respectivamente e escore 0 pontos que eram imperceptíveis.

TABELA 10 – ANÁLISE DOS RESULTADOS DE TRIAGEM DE EXPRESSÃO DE LipC PELA DETERMINAÇÃO DOS ESCORES ACUMULADOS

<b>Variáveis</b>	<b>Escore individual</b>	<b>Escore acumulado</b>
BL21(DE3)pLysS	1,0,3	4
Rosetta(DE3)pLysS	3,3,3	9
Origami(DE3)pLysS	1,0,2	3
C41(DE3)pLysS	2,3,3	8
LB	1,3,3,3	10
SB	1,2,3,1	7
TB	3,0,0,3	6
37 °C	3,3,2,3	11
25 °C	0,3,0,3	6
17 °C	1,3,1,2	7

O *escore* acumulado para uma variável foi determinado somando os *escores* individuais desta variável nas diferentes condições em que estava presente.

A proteína purificada (Figura 20) foi ensaiada quanto a sua atividade esterásica frente a vinil butirato em diferentes concentrações de sal, entretanto nenhuma atividade hidrolítica foi verificada, indicando que talvez a fusão com a cauda de histidinas no domínio C-terminal poderia estar interferindo na atividade da enzima. Assim optou-se pela utilização de outro vetor para a expressão de *lipC* a partir do vetor pET-14b, onde o gene *lipC* foi clonado para ter a fusão da cauda de histidinas no domínio N-terminal.

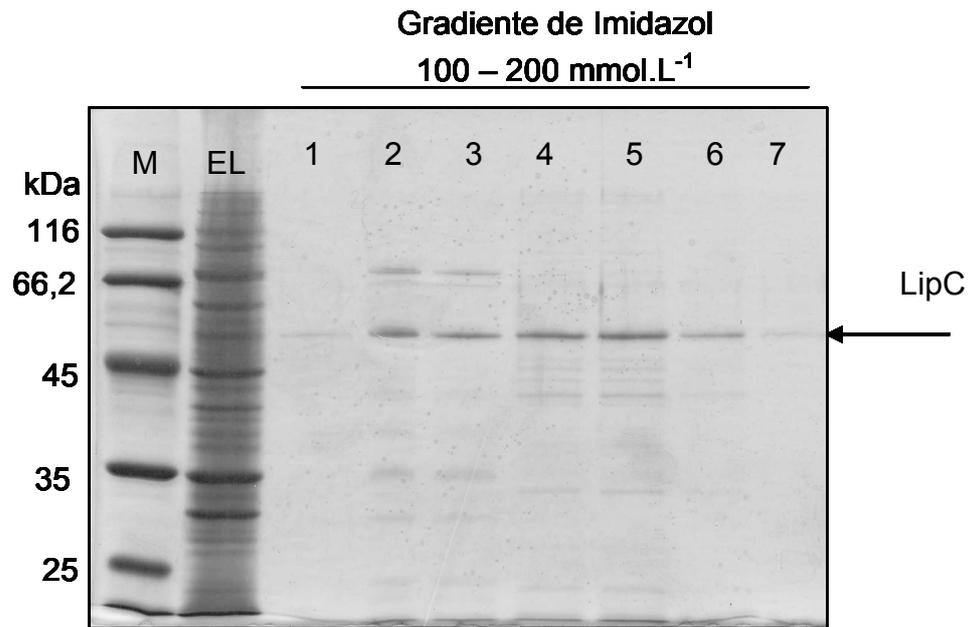


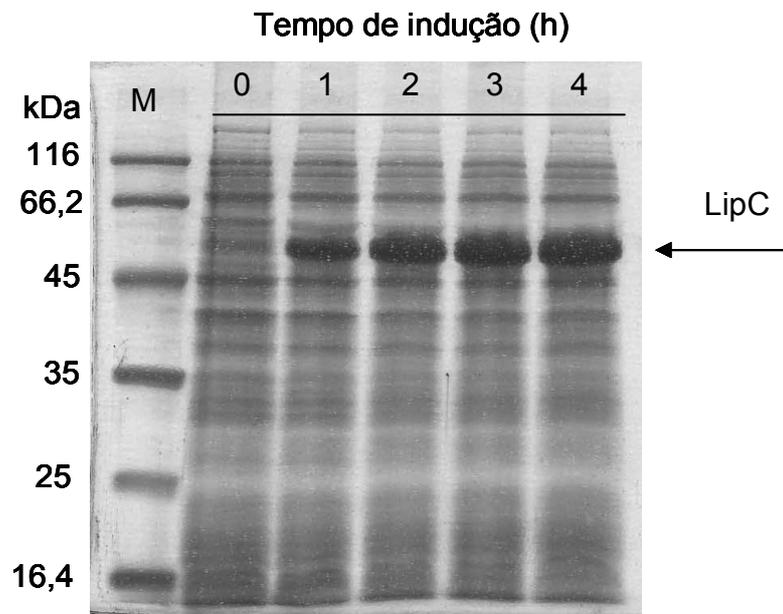
FIGURA 20 – ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DE LipC PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE E SUPEREXPRESSA A PARTIR DO PLASMÍDEO pDEST14/*lipC*

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (m/v) (SDS-PAGE) de frações protéicas obtidas durante o processo de purificação da proteína LipC a partir da expressão em *E. coli*, conforme descrito em Material e Métodos. As linhas 1 a 7 indicam as frações (20  $\mu$ L) eluídas durante o gradiente de imidazol (de 100 a 200  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). EL indica o extrato livre de células (20  $\mu$ g de proteínas) obtido após indução da expressão de *lipC*. M indica marcador de massa molecular, a seta indica a banda correspondente a LipC. As proteínas foram coradas com Comassie Blue.

O gene *lipC* foi amplificado por PCR para inserção de sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente. O produto de PCR foi duplamente digerido com *NdeI* e *BamHI* e ligado em pET-14b digerido pelas mesmas enzimas. Assim, foi obtido um plasmídeo (pET-14b/*lipC*) no qual a expressão do gene *lipC* era controlada pelo promotor T7 (STUDIER; MOFFATT, 1986).

Com o plasmídeo pET-14b/*lipC*, optou-se por testar inicialmente a expressão do gene *lipC* em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Na Figura 21 é mostrada a eletroforese da fração total de proteínas em diferentes tempos de indução. Como pode ser observado, já após uma hora de indução, uma banda superexpressa correspondendo a LipC foi verificada. Este nível de expressão não havia sido obtido

expressando LipC a partir do vetor pDEST14. Além disso, como a estirpe BL21(DE3)pLysS se mostrou capaz de expressar LipC em um bom nível, decidiu-se trabalhar apenas com esta estirpe e não testar a expressão nas demais estirpes de *E. coli*.



**FIGURA 21 – ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DO TESTE DE EXPRESSÃO DE LipC EM *E. coli* BL21(DE3)pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pET-14b//lipC**

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (m/v) (SDS-PAGE) de extrato de células obtidos após indução com 1 mM de IPTG a 37°C. As linhas de 0 a 4 indicam o número de horas da indução. A linha M indica os marcadores de massa molecular. A seta indica a proteína LipC. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

Além de ter sido expressa a partir do vetor pET-14b, um teste de solubilidade mostrou que LipC manteve-se em sua maior parte na fração solúvel, mesmo na presença de 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl (Figura 22).

### 5.3 PURIFICAÇÃO DE LipC RECOMBINANTE

Já que proteínas halofílicas necessitam uma alta concentração de sal para se manter enoveladas e ativas, as metodologias de purificação destas proteínas precisam ser executadas também em alta concentração de sal. Portanto, algumas metodologias, como a cromatografia de troca iônica, não podem ser utilizadas (SOPPA, 2006), sendo recomendada a cromatografia por afinidade, de interação hidrofóbica, interação com hidróxiapatita e gel filtração.

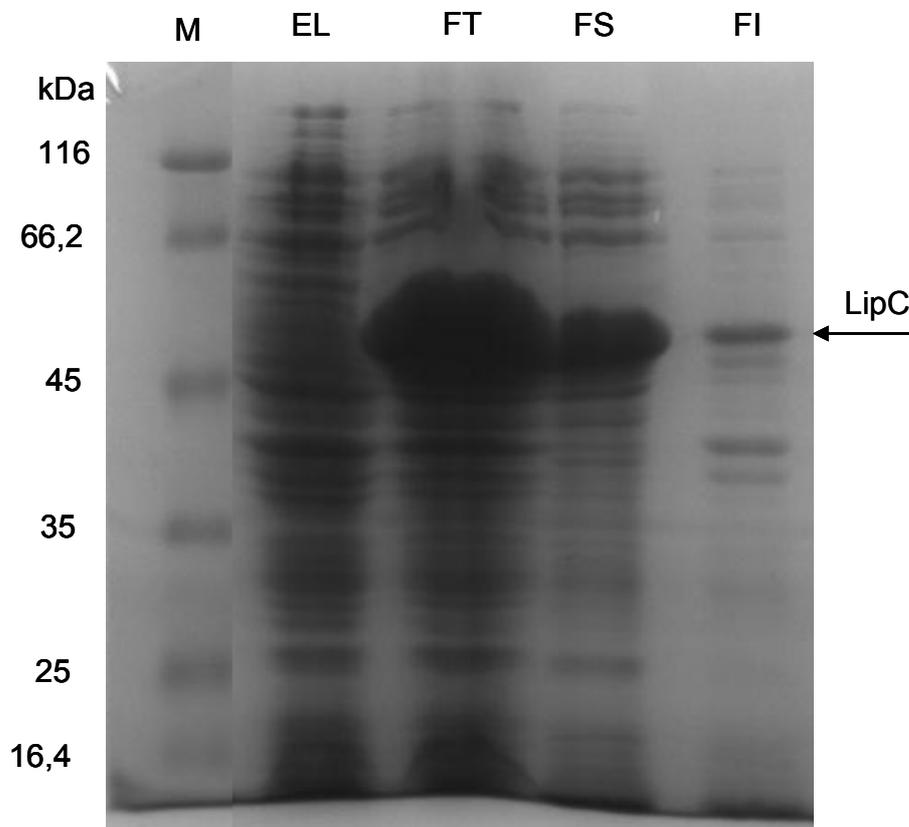


FIGURA 22 - ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES SOLÚVEL E INSOLÚVEL DE LipC EXPRESSAS EM *E. coli* BL21(DE3)pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pET14b/*lipC*

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (m/v) (SDS-PAGE) de extrato de células obtidos após indução com 1 mM de IPTG a 37°C. A seta indica a proteína LipC. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue. EL indica o extrato livre de células (20 µg de proteínas) obtido após indução da expressão de *lipC*. FT – indica a fração total de *E. coli* expressando *lipC*. FS - indica a fração solúvel e FI a fração insolúvel. M- indica o marcador de massa molecular, a seta indica a banda correspondente a LipC. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

Para purificar a proteína LipC de *H. marismortui* foram aplicadas as técnicas de afinidade a metal ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e de interação hidrofóbica. Os resultados de purificação estão resumidos na Tabela 11 e Figura 23. Após a etapa de cromatografia de afinidade ao níquel, o fator de purificação foi de 14, obtendo-se uma atividade específica de  $288 \text{ U.mg}^{-1}$  (contra vinil butirato), observando-se que o conteúdo de proteína diminuiu aproximadamente 10 vezes, mas a atividade total aumentou, com um rendimento em atividade de 136%.

Uma possível explicação para o aumento de atividade encontrado para a expressão de LipC na primeira etapa é que vários compostos do extrato celular podem inibir a atividade da enzima no extrato bruto, até que sejam removidos pela primeira etapa de purificação. Outra explicação seria que LipC seja expressa na forma desenovelada no citoplasma de *E. coli* e que comece a assumir sua conformação nativa somente quando é liberada na solução de lise contendo  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl. Se o processo de enovelamento for um processo lento, é possível que a proteína ainda esteja sendo enovelada durante a primeira etapa de purificação. A cauda de histidinas N-terminal foi removida por tratamento com trombina após a etapa de cromatografia hidrofobia e ultrafiltração e nenhuma modificação da atividade específica de LipC foi observada. A eletroforese SDS-PAGE (Figura 23, linha 2 e 3) mostra uma banda principal de aproximadamente 50 kDa, que corresponde a LipC e pelo menos mais sete bandas contaminantes, mostrando a necessidade de outra etapa de purificação da proteína.

A etapa de cromatografia de interação hidrofóbica utilizando octyl-sepharose mostrou-se de grande importância para remover as contaminações que ainda existiam após a primeira etapa de purificação, pois após esta etapa, nenhuma banda adicional, além de LipC, foi encontrada (Figura 23, linha 3). A atividade específica da fração purificada aumentou para  $570 \text{ U.mg}^{-1}$ , resultando em um fator de purificação de 27,5 e um rendimento em atividade de 80%, considerando o processo global de purificação. A proteína obtida após esta etapa de purificação apresentou um grau de pureza de 98%. Portanto, conclui-se que a purificação final com coluna hidrofóbica foi bem sucedida, retendo majoritariamente os contaminantes, e não retendo LipC, o que provavelmente é devido ao alto grau de cargas negativas na superfície de proteínas halofílicas, como relatado por Britton *et al.* (2006).

TABELA 11 - PURIFICAÇÃO DE LipC RECOMBINANTE

Etapa	Volume (mL)	Proteína Total (mg) <sup>d</sup>	Atividade Total (U)	Atividade específica (U/mg) <sup>e</sup>	Fator de purificação <sup>f</sup>	Rendimento de atividade (%) <sup>g</sup>
Extrato Livre de Células <sup>a</sup>	36	324	6750	21	1,0	100
Cromatografia de afinidade a níquel <sup>b</sup>	32	32	9200	288	13,7	136
Cromatografia de interação hidrofóbica e ultrafiltração <sup>c</sup>	2,5	9,5	5415	570	27,2	80

a - A cultura de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com o plasmídeo pET-14b/lipC na D.O.<sub>600</sub> de 0,4 foi induzida com 1 mM de IPTG, por 4 h a 37°C. O extrato livre de células foi preparado ressuspendendo as bactérias de 1 L de cultura em 40 mL de tampão A (Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl, 0,1% (m/v) de Triton X-100 e 10 mmol.L<sup>-1</sup> de imidazol) e lisando as células por sonicação (6 pulsos de 10 s).

b - A purificação por afinidade ao níquel foi realizada com uma coluna *HiTrap Chelating* (Amersham, Uppsala, Suécia) de 5 mL equilibrada com tampão A, a amostra foi carregada na coluna com um fluxo de 1 mL/min e o gradiente de imidazol partiu de 10 mmol.L<sup>-1</sup> para uma concentração final de imidazol de 0,5 mol.L<sup>-1</sup> em um fluxo de 2,5 mL/min.

c - As frações obtidas a partir de cromatografia por afinidade foram agrupadas de acordo com a atividade hidrofóbica e aplicadas a uma coluna de otil-sepharose equilibrada com Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0 e 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl. As frações eluídas foram concentradas por ultrafiltração utilizando tubos Amicon de limite de exclusão de 10 kDa.

d - A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford utilizando BSA (soroalbumina bovina) como padrão.

e - A atividade específica foi determinada pela relação entre a atividade volumétrica contra vinil butirato pelo método titulométrico em tampão Tris-HCl 2 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl a 37°C e a concentração de proteína da amostra.

f - O fator de purificação foi calculado pela relação da atividade específica obtida ao final de cada etapa com a atividade específica inicial no extrato livre de células.

g - O rendimento de atividade foi calculado pela relação da atividade total ao final de cada etapa com a atividade total inicial no extrato livre de células.

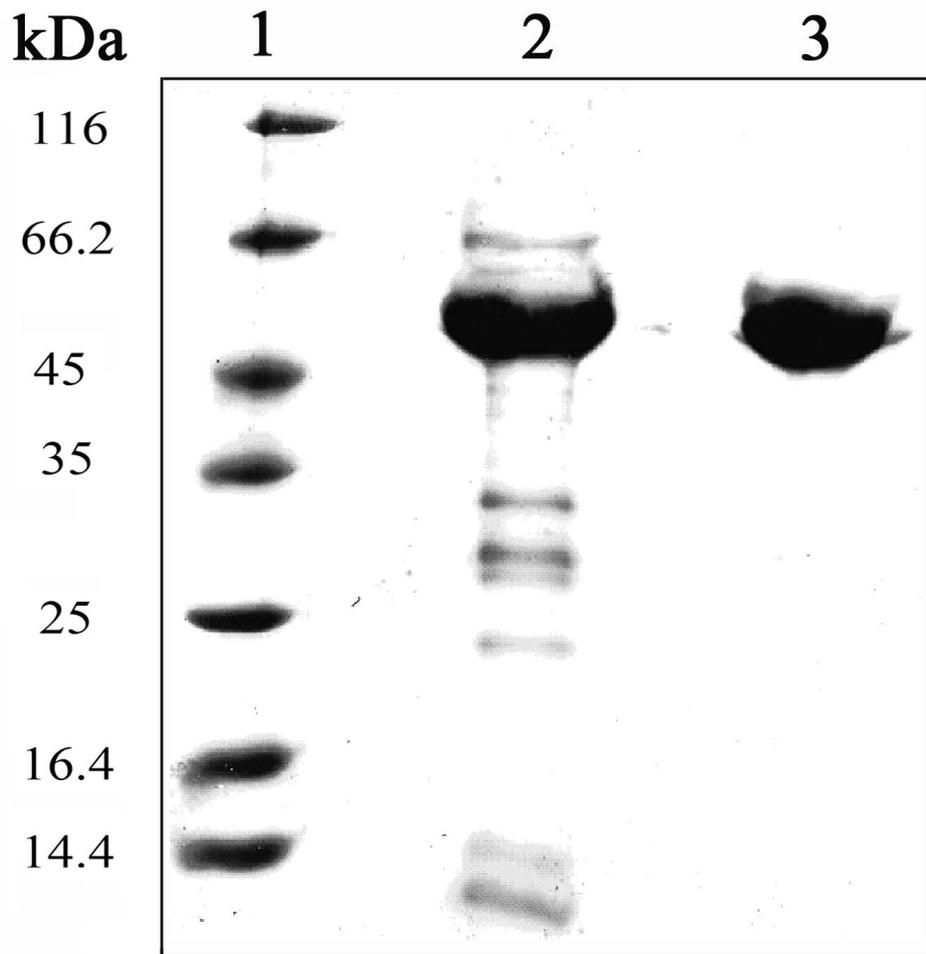


FIGURA 23 – ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) DE LipC PURIFICADA POR AFINIDADE E INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

As amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes. As proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie R-250, sendo aplicados 20  $\mu$ g de proteína por linha. Linha 1: padrões de massa molar, 2: frações agrupadas após cromatografia de interação com níquel, 3: fração contendo LipC com cauda de histidinas após cromatografia de interação hidrofóbica.

Conforme observado nas eletroforeses SDS-PAGE, LipC apresentou uma migração anormal, pois a sua migração foi consistente com uma proteína de cerca de 50 kDa (Figura 23B) e a seqüência do gene *lipC* codifica para uma proteína de 34 kDa (Tabela 7). Portanto, uma análise de massa por MALDI-ToF foi realizada para confirmar se LipC apresentava de fato uma migração diferenciada. A análise de MALDI-ToF de LipC com a cauda de histidinas N-terminal apontou uma massa de 36.176,5 Da, indicando que, de fato, a banda na região de 50 kDa tem um padrão de migração alterado. Esta propriedade é normalmente observada para proteínas

halofílicas e provavelmente ocorre devido à alta proporção de cargas negativas (aspartatos e glutamatos) presentes na proteína (MADERN; ZACCAI, 2004). Este fenômeno pode ser justificado pelo fato de que proteínas halofílicas ligam menor quantidade de SDS, quando comparadas aos marcadores não-halofílicos, tornando assim o complexo proteína-SDS menos móvel, como já foi descrito para outras proteínas halofílicas (EDDY; JABLONSKI, 2000).

Em seguida, a proteína purificada foi tratada com trombina para remover a cauda de histidinas e transferida para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) para posterior análise da sua seqüência N-terminal. A seqüência N-terminal encontrada (GSHMSTTARP) mostrou 100% de identidade com a seqüência de LipC, sendo que os três primeiros aminoácidos são remanescentes da seqüência entre o sítio de clivagem da trombina e o códon de iniciação da proteína.

Como principal conclusão desta etapa do trabalho tem-se que, expressando LipC a partir do plasmídeo pET-14b//lipC em *E. coli* BL21(DE3)pLysS, foi atingido um rendimento em LipC suficiente para purificá-la e dar seqüência aos ensaios de caracterização enzimática. A partir da purificação de LipC, utilizando cromatografia de afinidade ao Ni<sup>2+</sup> e cromatografia de interação hidrofóbica, foi possível obter aproximadamente 9 mg de LipC purificada por litro de cultura.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Tendo estabelecido o protocolo para a produção de LipC recombinante em *E. coli* e a sua purificação por métodos cromatográficos, passou-se à caracterização da atividade de LipC, determinado-se a sua atividade frente a diferentes substratos, bem como o efeito da concentração de sal na atividade e no enovelamento de LipC, o efeito do pH na atividade da enzima. Finalmente, estudou-se a inibição de LipC frente a diferentes inibidores, sendo um deles específico à família HSL, com a qual a análise bioinformática mostrou que LipC possui homologia.

##### 5.4.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SAL NA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

A atividade de LipC foi avaliada em concentrações crescentes de NaCl (0 a 5 mol.L<sup>-1</sup>) e KCl (0 a 4 mol.L<sup>-1</sup>). Para estes ensaios utilizou-se o butirato de vinila como substrato, já que este é um substrato reconhecido tanto por lipases quanto esterases não-lipolíticas. A contribuição da solução de enzima na concentração final de sal no ensaio foi considerada desprezível, pois alíquotas de apenas 10 µL de LipC em tampão com 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl foram adicionadas a um volume de mistura reacional de 15 mL.

A atividade de LipC não foi detectada quando não havia sal no meio reacional (Figura 24). Quando o meio reacional continha NaCl, a atividade máxima alcançada foi de 590 U.mg<sup>-1</sup> com 2 mol.L<sup>-1</sup> deste sal, decrescendo para 74% do valor máximo com o aumento da concentração de NaCl para 5 mol.L<sup>-1</sup>. No caso do KCl, a atividade específica máxima foi de 634 ± 8 U.mg<sup>-1</sup> quando se utilizou 3 mol.L<sup>-1</sup> deste sal. A atividade decresceu para 80% do seu valor máximo com 4 mol.L<sup>-1</sup> de KCl no meio reacional.

Especificamente, não existem muitos trabalhos na literatura que avaliem o efeito da concentração de sal na atividade de esterases e lipases. Amozegar *et al.* (2008) mostraram que uma lipase produzida pela bactéria moderadamente halofílica *Salinivibrio* sp. SA-2 possui tolerância a concentrações de NaCl e KCl de até 2 mol.L<sup>-1</sup>, no entanto, a atividade nestas condições foi 80 e 70%, respectivamente, da atividade sem adição de sal. Este resultado mostrou que esta lipase é halotolerante e mas que não depende de sal para manter sua estrutura nativa e atividade.

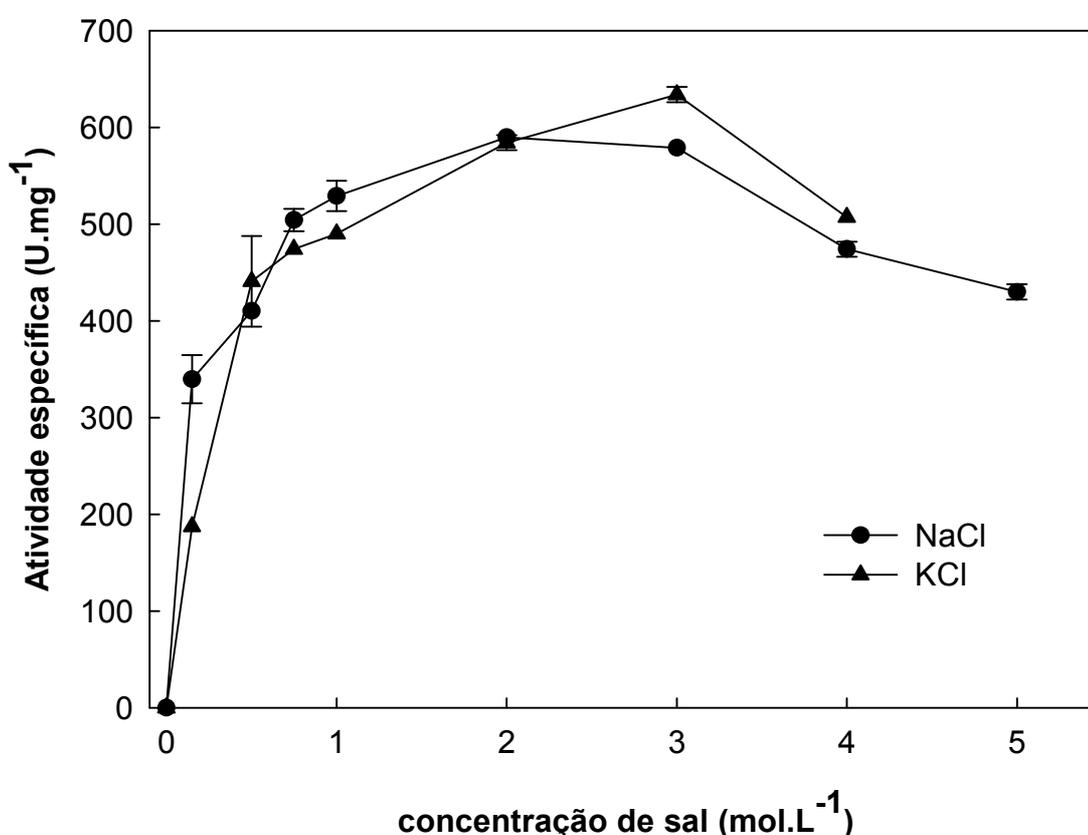


FIGURA 24 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS NA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Os ensaios para determinar a atividade enzimática foram realizados pelo método titulométrico a 37°C em Tris-HCl 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,5 com 73,6 mmol.L<sup>-1</sup> de butirato de vinila. Um controle negativo foi sempre realizado sem a enzima em todas as condições testadas para determinar a velocidade de hidrólise espontânea do substrato. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

Entretanto, há um trabalho de triagem de bibliotecas metagenômicas em amostras de sedimento do fundo do mar Mediterrâneo, especificamente da bacia de

Urânia (Grécia), um ambiente anóxico, hiperbárico e hipersalino, onde foi encontrada uma esterase que apresenta atividade também na presença de altas concentrações de sal (FERRER *et al.*, 2005). Os autores relataram que esta enzima forma um complexo com duas atividades: de esterase e de tioesterase. Em altas concentrações de sal ( $2 - 4 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl) e/ou pressão de 40 MPa, a proteína se apresenta como um homotrímero de 325 kDa. Removendo o sal por diálise ou equilibrando a proteína à pressão atmosférica, o homotrímero se separa em três monômeros de 104 kDa. Tratando o monômero de 104 kDa com ditiotreitól foram obtidos dois fragmentos: um deles de 85 kDa (com atividade tioesterase contra propionil-CoA) e o segundo de 21 kDa (com atividade esterase contra acetato de *p*-nitrofenila). Portanto, esta enzima possui um complexo de duas atividades e que depende das condições ambientais para manter sua estrutura nativa (FERER *et al.*, 2005). Esta esterase/tioesterase apresentou uma atividade de  $573 \text{ U.mg}^{-1}$  (contra acetato de *p*-nitrofenila) na ausência de sal, entretanto, sua atividade aumentou 180 vezes em  $3,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl. O fato de esta enzima mostrar uma necessidade de sal e de alta pressão para manter sua estrutura e atividade indica que esta possa ser um exemplo de uma proteína halofílica e piezófílica, como as originadas de microrganismos que suportam altas pressões (ABE; HORIKOSHI, 2001). Porém, como não se sabe o microrganismo do qual se isolou o gene que codifica para esta enzima, pois ela foi obtida a partir de uma biblioteca metagenômica, não se pode afirmar qual a sua origem.

O perfil de atividade frente a diferentes concentrações de sal observado para LipC de *H. marismortui* também foi observado para outras enzimas de arqueas halofílicas. Bischoff e Rodwell (1996) mostraram que a 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase de *Haloferax volcanii* teve seu máximo de atividade ( $1,2 \mu\text{U.mg}^{-1}$ ) com  $3 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl e que cerca de 70% desta atividade foi encontrada com  $3 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl. O máximo de atividade pode variar conforme a concentração de sal, como foi mostrado por Bonete *et al.* (1996) para a glucose desidrogenase de *Haloferax mediterranei*, que possui seu ótimo de atividade a  $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl e entre  $1,5$  a  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl, com uma redução da atividade em concentrações de sal acima destes valores. Madern e Zaccai (2004) mostraram que, para a malato desidrogenase de *H. marismortui*, o aumento na concentração de sal não muda o Km da enzima pelo NADH, porém aumenta o Km frente ao oxaloacetato, o que pode

levar a uma interpretação errônea de que a enzima perde atividade em altas concentrações de sal por desnaturação. De fato, a malato desidrogenase de *H. marismortui* é estável em altas concentrações de sal (3-5 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl), e aumentando a concentração de oxaloacetato, foi observado que sua atividade é constante entre 1 a 5 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl (MADERN; ZACCAI, 2004). Sendo assim, a redução de atividade observada para LipC acima de 3 mol.L<sup>-1</sup> de KCl ou NaCl pode ser devida ao aumento do Km da enzima pelo substrato vinil butirato, ou que as altas concentrações de sal utilizadas possam interferir com a solubilidade do substrato no meio reacional, já que o vinil butirato é apenas parcialmente solúvel em água.

Como uma propriedade comum de enzimas halofílicas, pode-se citar a ausência de atividade na total ausência de sal, apesar de que algumas exceções já tenham sido relatadas na literatura: (1) as rodopsinas de *Halobacterium salinarum* são estáveis a baixa concentração salina (OESTERHELT, 1998), (2) também são estáveis nesta condição as proteínas de formação de vesículas de gás que ocorrem em *Halobacterium salinarum* (WALSBY, 1994) e (3) as ribuloses-1,5-bifosfato carboxylase (RuBisCO) de *Haloferax mediterranei*, *Haloferax volcanii* e *Haloarcula marismortui* (ALTEKAR; RAJAGOPALAN, 1990). Acredita-se que a ausência de atividade em baixa concentração de sal possa ser justificada pela rápida desnaturação da proteína, causada pelo efeito de repulsão das cargas negativas encontradas na superfície (MEVARECH; FROLOW; GLOSS, 2000). Outro modelo de estabilização sugere que proteínas halofílicas formam uma camada de solvatação envolvendo moléculas de água, íons (principalmente cátions K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>) e grupos carboxílicos oriundos dos aminoácidos aspartato e glutamato (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000), que teria um efeito estabilizador da sua estrutura terciária. Porém, em alguns casos, também foi relatado que algumas proteínas halofílicas são capazes de recuperar a atividade após a remoção de sal quando reintroduzidas em uma solução com alta concentração de sal, mostrando que o dobramento e a manutenção da estrutura nativa são sal-dependentes (MEVARECH; FROLOW; GLOSS, 2000; MADERN *et al.*, 2004).

Para avaliar a hipótese de desnaturação e renaturação de LipC na presença de sal, uma solução de proteína contendo LipC a 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> livre de sal para remover todo o KCl da solução.

Após isto, à solução dialisada foi reintroduzido KCl para concentrações finais de 2 mol.L<sup>-1</sup> e 3 mol.L<sup>-1</sup> de KCl (Figura 10). KCl foi escolhido pois sabe-se que no citoplasma de arqueas halofílicas este sal é encontrado em altas concentrações e que, portanto, o que confere a este sal um papel importante na fisiologia e também na manutenção da estrutura nativa das proteínas citosólicas destes microrganismos (OREN, 1994, 2002).

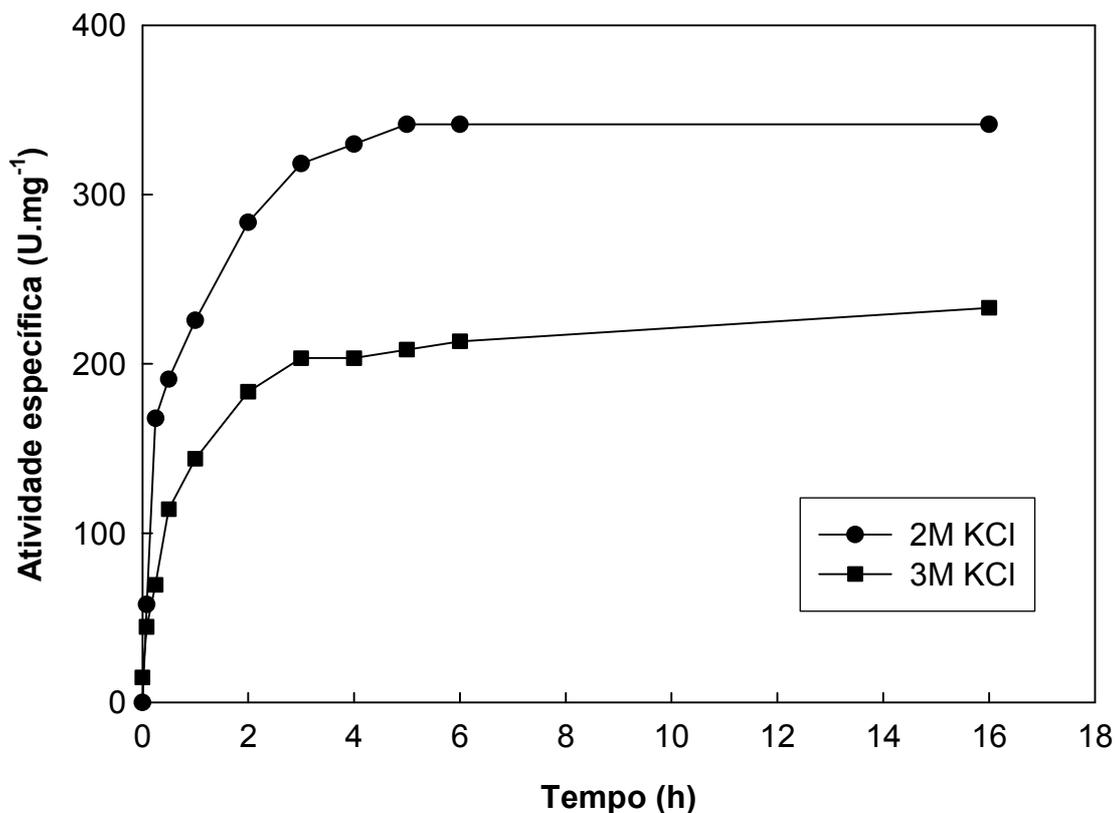


FIGURA 25 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA RENATURAÇÃO DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Duas concentrações de KCl foram avaliadas no ensaio de renaturação: 2 mol.L<sup>-1</sup> e 3 mol.L<sup>-1</sup>. A recuperação de atividade enzimática durante a incubação a 4°C foi acompanhada pelo método titulométrico a 37°C em Tris-HCl 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,5, 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl com 73,6 mmol.L<sup>-1</sup> de butirato de vinila. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

Quando KCl foi adicionado, nenhuma atividade foi detectada na presença de 0,25 a 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de sal. Entretanto, após o aumento da concentração por adição de

2 ou de 3 mol.L<sup>-1</sup> de KCl, houve uma significativa recuperação da atividade (350 U.mg<sup>-1</sup>) após 5 h de incubação (Figura 25). Entretanto, este máximo de atividade residual recuperada não atingiu o valor pré-diálise de 590 U.mg<sup>-1</sup>. Quando foi adicionado KCl para a concentração de 2 mol.L<sup>-1</sup>, a atividade alcançou 58% da atividade pré-diálise e com 3 mol.L<sup>-1</sup>, a atividade recuperada foi 40%. Para ambas as concentrações, a recuperação de atividade durante as primeiras duas horas aproxima-se razoavelmente de uma cinética de primeira ordem, com um tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para a renaturação de aproximadamente 54 min (Figura 26).

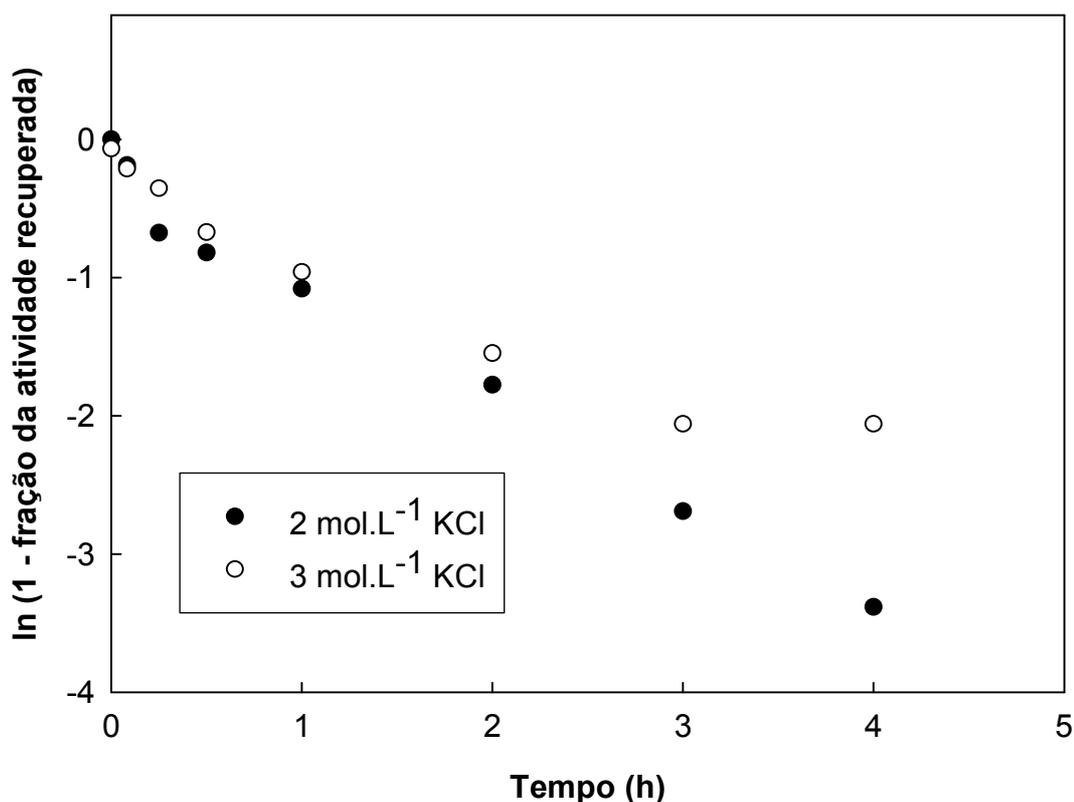


FIGURA 26 – ANÁLISE CINÉTICA DA RENATURAÇÃO DE LipC DE *Halbarcula marismortui*

Para analisar cineticamente a renaturação de LipC assumiu-se que a taxa de renaturação segue uma cinética de primeira ordem, onde o  $t_{1/2}$  é igual a  $\ln(2)/k$ . A constante de renaturação  $k$  foi calculada como sendo a inclinação da reta obtida pelo  $\ln(1 - \text{fração de atividade recuperada})$  pelo tempo em h no período entre o tempo inicial e 2 h de recuperação.

A renaturação incompleta de LipC quando da adição de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl pode ser decorrente do longo tempo de diálise (16 h) ao qual a proteína foi submetida antes do experimento de renaturação. Este resultado está de acordo com os reportados por outros autores. Mevarech *et al.* (2000) relataram que a renaturação da malato desidrogenase de *H. marismortui* foi negativamente correlacionada com o tempo de incubação em baixas concentrações de sal. Shi *et al.* (2006), quando dialisaram uma solução da protease halofílica de *Natrinema* sp. por 9 h, obtiveram 60% da sua atividade inicial após reintrodução de NaCl ( $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Resultados similares foram encontrados por Madern *et al.* (2004) para a isocitrato desidrogenase dependente de NADP de *Haloferax volcanii*. Os autores observaram que, incubando a enzima por 24 h em concentrações de NaCl de 0,6 e  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , quando reintroduzido NaCl para concentração final de  $3,3 \text{ mol.L}^{-1}$ , a enzima apresentou 100% da sua atividade inicial. Entretanto, incubando a enzima por 24 h em  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl, quando reintroduzido NaCl para concentração final de  $3,3 \text{ mol.L}^{-1}$ , apenas 5% da atividade inicial foi determinada.

Em concordância aos resultados obtidos para LipC de *H. marismortui* e os demais relatados na literatura, sugere-se que o processo de desnaturação e renaturação de LipC ocorra em duas etapas: (1) na primeira etapa a proteína perderia sua estrutura secundária, mas permaneceria em um estado que poderia renovar com um tempo de meia-vida ao redor de 1 h, se mais sal for adicionado ao meio e (2) se a proteína for mantida por muito tempo em baixa concentração de sal, ocorreria um aumento do grau de hidratação da proteína, e diminuição no efeito de blindagem das cargas negativas da superfície, criado pelos cátions em solução; assim, a proteína passaria lentamente para uma conformação totalmente estendida e inativa.

#### 5.4.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NO GRAU DE ENOVELAMENTO DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Para verificar se os resultados descritos acima estavam relacionados com o grau de enovelamento de LipC, foram realizados experimentos de dicroísmo circular

na faixa do UV-distante com a enzima na ausência e na presença de concentrações crescentes de KCl (0, 0,25, 0,5 e 2 mol.L<sup>-1</sup>). Nesta técnica, apesar de KF ser preferido ao invés de KCl, devido ao fato de que íons fluoreto não absorverem na faixa do UV-distante, o que ocorre com os íons cloreto, optou-se utilizar KCl por dois motivos: (1) para comparação direta com os dados bioquímicos e cinéticos que já haviam sido coletados e (2) para mimetizar o ambiente fisiológico da enzima, onde os íons K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> prevalecem (MADERN, EBEL, ZACCAI; 2000, MEVARECH, FROLOW, GLOSS; 2000).

O dicroísmo circular é uma importante técnica utilizada para determinar a presença de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos (GREENFIELD, 2006). Esta técnica baseia-se no fenômeno de absorção diferencial da luz circularmente polarizada a esquerda e a direita do plano que algumas biomoléculas apresentam (WHITMORE; WALLACE, 2007). Como proteínas são basicamente estruturas quirais e por isso apresentam absorção diferencial da luz circularmente polarizada, o dicroísmo circular é uma técnica normalmente aplicada para monitorar suas estruturas secundárias, sendo estas  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e alças.

O espectro de dicroísmo circular de LipC na ausência de sal exibiu um padrão típico de uma proteína desenovelada, como é mostrado pela elipticidade acentuadamente negativa a 200 nm e pela elipticidade modestamente negativa na região de 210 a 225 nm (GREENFIELD, 2006) (Figura 27). Embora a adição de concentrações crescentes de KCl tenha causado uma queda na razão sinal:ruído, um fenômeno bem conhecido devido à absorção da luz UV pelos íons cloreto, a análise do espectro de dicroísmo circular mostrou um aumento no conteúdo geral de  $\alpha$ -hélices, o que é evidenciado pelo aumento na elipticidade a 200 nm e pela elipticidade negativa na região de 210-225 nm (HOLZWARTH; DOTY, 1965) (Figura 27). O aumento no conteúdo de  $\alpha$ -hélice foi confirmado pela deconvolução dos espectros e pela estimativa do conteúdo de estrutura secundária, que mostrou um aumento de 7% (0 mol.L<sup>-1</sup> KCl) para 9% (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) no conteúdo de  $\alpha$ -hélices. A deconvolução é um processo matemático baseado em um algoritmo pelo qual é possível desdobrar os resultados obtidos por diferentes tipos de análises sendo estas espectroscópicas ou não. Mais especificamente, a deconvolução reverte o processo de convolução, que é a associação de duas funções no caso de um

espectro de dicroísmo circular, a associação entre elipticidade molar e o comprimento de onda. Para a deconvolução dos espectros obtidos para LipC foi utilizado o algoritmo presente no programa K2d (ANDRADE *et al.*, 1993). Entretanto, deve ser ressaltado que nestas concentrações de KCl, LipC ainda resta predominantemente em um estado desenovelado, como evidenciado pela elipticidade largamente negativa a 200 nm.

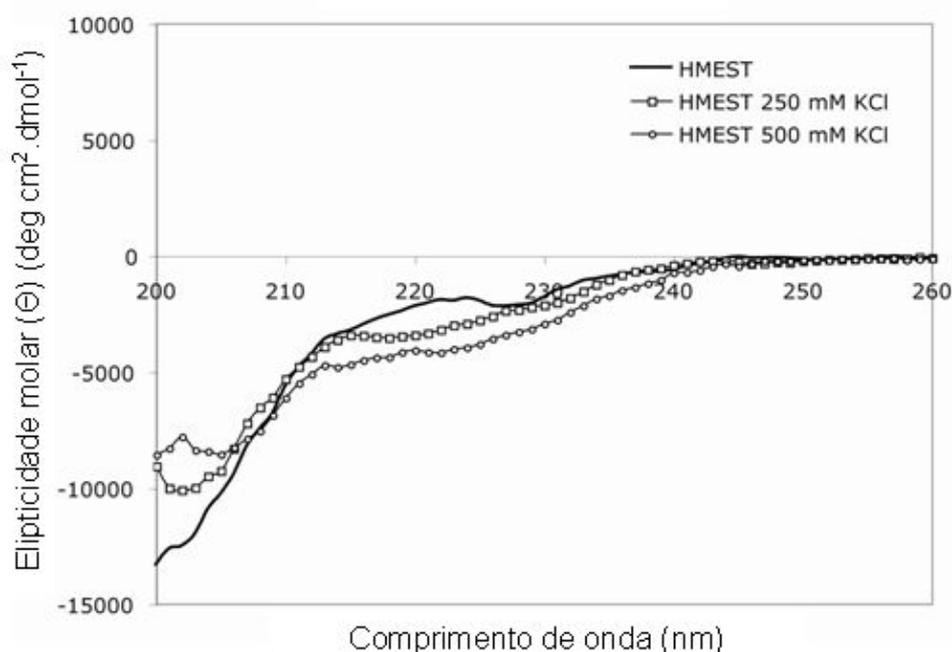


FIGURA 27 – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC DE *Haloarcularia marismortui* NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE SAL

Os espectros de dicroísmo circular de LipC foram realizados em tampão fosfato 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8, na presença de concentrações crescentes de KCl (0, 0,25 mol.L<sup>-1</sup> e 0,5 mol.L<sup>-1</sup>) e com a proteína na concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Cada espectro é uma média de três aquisições independentes.

Esta propensão ao enovelamento dependente de sal foi confirmada na presença de 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl, apesar do espectro de dicroísmo circular mostrar uma razão sinal:ruído muito pobre devido a forte absorção dos íons cloreto (Figura 28). No entanto, é possível observar a elipticidade negativa entre os comprimentos de

onda de 210 – 225 nm, indicando a presença de estruturas secundárias, enquanto que, na ausência de sal, foi observada uma elipticidade positiva, que é relacionada a estruturas desordenadas (VENYAMINOV *et al.*, 1993). Estes resultados reforçam que a falta de atividade na ausência de sal é devida a uma desnaturação total da enzima e que, aumentando a concentração de sal, ocorre o enovelamento da proteína. Além disso, os perfis cinéticos de determinação da atividade (método titulométrico - pH Stat) em concentrações até  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl ou KCl mantiveram-se lineares apenas por tempos muito curtos (p. ex.: 30 s), reforçando a hipótese de que a enzima é instável em baixas concentrações de sal e que deve sofrer uma rápida desnaturação em baixas concentrações de sal.

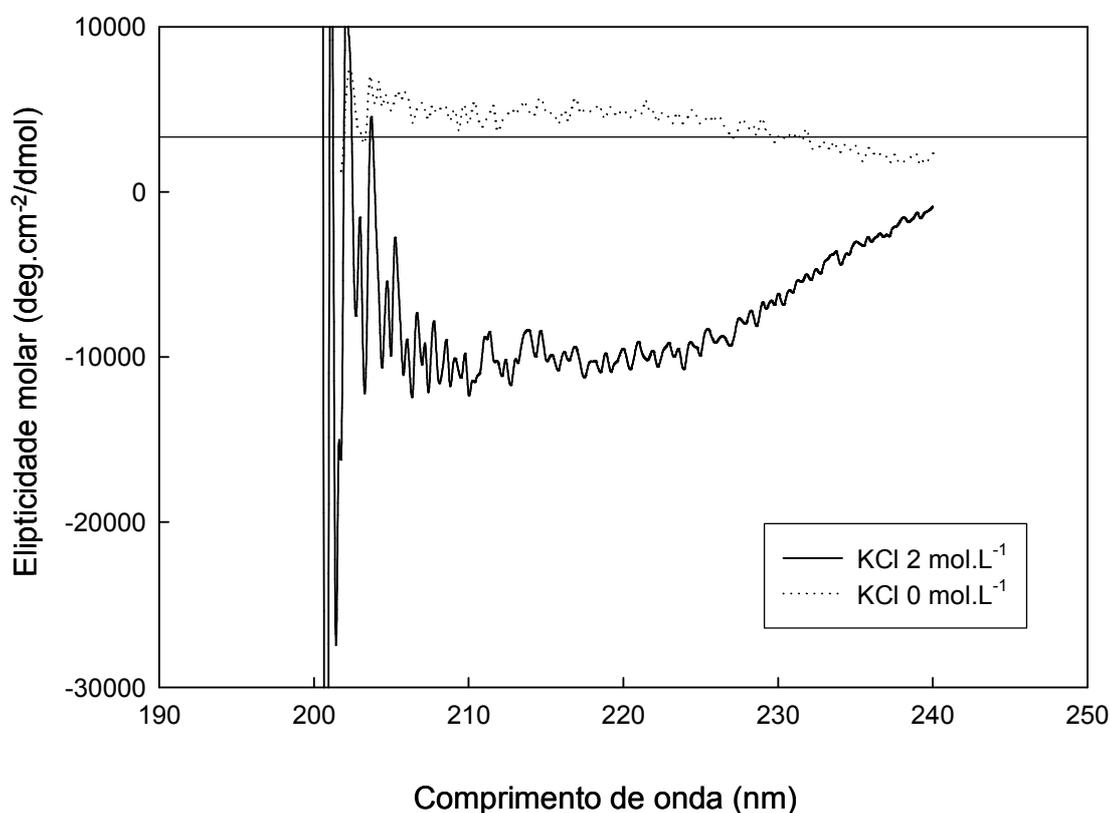


FIGURA 28 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LipC DE *Halobacula marismortui* EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE SAL

Os espectros de dicroísmo circular de LipC foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 na presença de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl. Cada espectro é uma média de três aquisições independentes.

O fenômeno de inativação da enzima em baixa concentração de sal e ativação em alta concentração de sal que foi mostrado para LipC de *H. marismortui*

neste trabalho não havia sido relatado para outras esterases anteriormente. Somente o trabalho de Ferrer *et al.* (2005) relatou uma esterase de uma biblioteca metagenômica com ativação em altas concentrações de sal, porém esta enzima também apresentava atividade na ausência de sal, o que provavelmente indica que esta não apresenta a mesma halodependência e não deve ter semelhança estrutural com LipC. Por outro lado, o fenômeno de ativação na presença de sais foi relatado para outras enzimas halofílicas, como por exemplo, a malato desidrogenase de *H. marsimortui* (MEVARECH; FROLOW; GLOSS; 2000), a glucose desidrogenase de *Haloferax mediterranei* (PIRE *et al.*, 2001), a glutamato desidrogenase de *Halobacterium salinarum* (HAYDEN *et al.*, 2002) e a protease de *Natrinema* sp. (SHI *et al.*, 2006). Pire *et al.* (2001) encontraram que, para o re-novelamento da glucose desidrogenase de *Haloferax mediterranei*, a maior atividade foi obtida com a concentração de sal de 3 mol.L<sup>-1</sup> em NaCl. Já com a mesma concentração de KCl, 80% da atividade máxima foi obtida e incubando a enzima com 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl 60% da atividade máxima foi obtida, um resultado parecido com o observado para LipC.

#### 5.4.3 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Tendo sido verificada a necessidade de sal para as determinações de atividade de LipC, para determinar o efeito do pH na atividade da enzima foi adotada uma concentração de 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl no tampão de reação (Tris-HCl 2,5mmol.L<sup>-1</sup>) em diferentes valores de pH (4 a 9). A baixa concentração do tampão Tris-HCl foi proposital, já que concentrações maiores do agente tamponante podem impedir a mudança de pH que ocorre pela hidrólise do substrato (butirato de vinila) e que é detectada pelo método titulométrico.

LipC apresentou um pH ótimo para atividade em 8,5, com um máximo de atividade de 590 U.mg<sup>-1</sup>. A enzima não foi ativa contra butirato de vinila em valores de pH abaixo de 5 (Figura 29). Já em pH 9, a atividade específica diminuiu para 78% do valor máximo (590 U.mg<sup>-1</sup>). Valores de pH acima de 9 não foram testados devido à alta taxa de hidrólise espontânea do substrato nestes valores de pH.

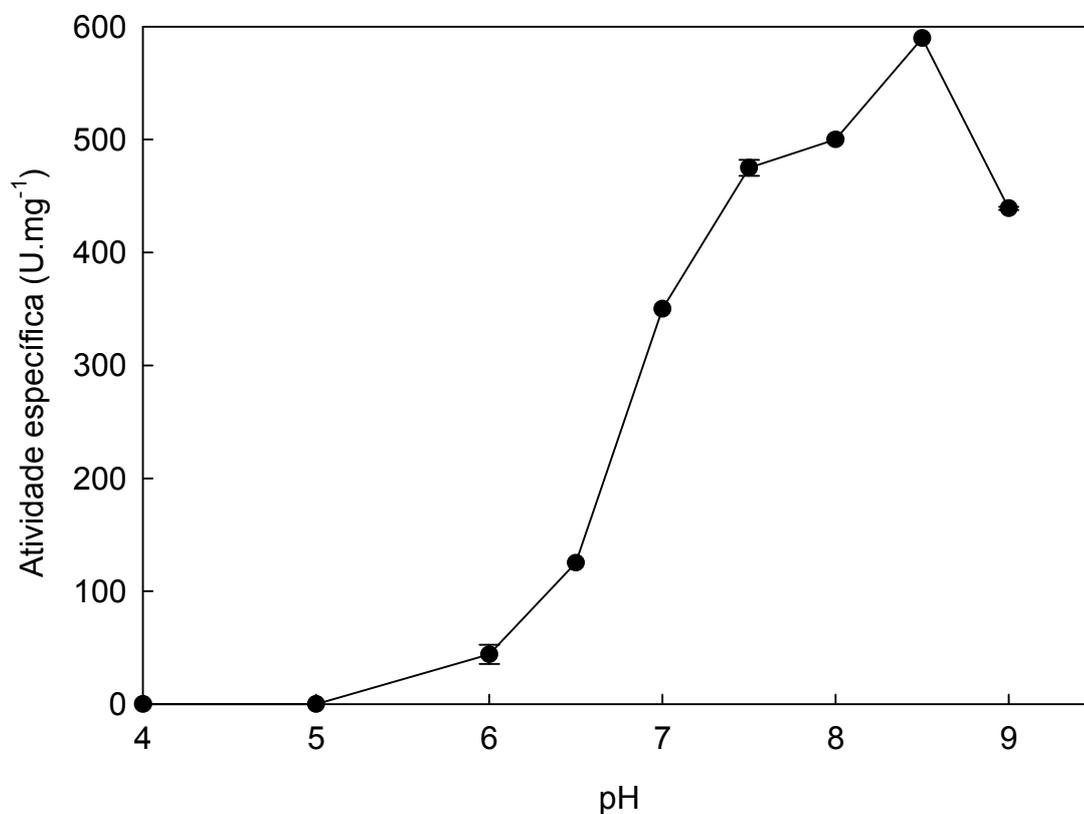


FIGURA 29 – EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Os ensaios para determinar a atividade enzimática foram realizados pelo método titulométrico a 37°C em Tris-HCl 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, em valores de pH de 4 a 9 com 73,6 mmol.L<sup>-1</sup> de butirato de vinila. Um controle negativo foi sempre realizado sem a enzima em todas as condições testadas para determinar a velocidade de hidrólise espontânea do substrato. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

Estes resultados mostram que LipC apresenta um pH ótimo para a atividade mais básico, atípico se comparado à maioria das esterases de arquea que já foram caracterizadas, onde os valores situam-se entre 6 e 7,5, conforme o relatado para esterases de outras arqueas por Huddleston, Yallop e Charalambous (1995) para a esterase de *Sulfolobus shibatae* (pH 6,0), Manco *et al.* (2000) para a esterase de *Archaeoglobus fulgidus* (pH 6,5-7,5), Sehgal *et al.* (2001) para a esterase de *Sulfolobus solfataricus* P1 (pH 7-7,5), Mandrich *et al.* (2004) para a esterase de *Alycyclobacillus acidocaldarius* EST2 (pH 7,1), Kim e Lee (2004) para a esterase de *Sulfolobus solfataricus* P2 (pH 7,4) e Almeida *et al.* (2006) para a esterase de

*Pyrococcus furiosus* (pH 7,0). De fato, este valor de pH ótimo está mais relacionado a lipases bacterianas e fúngicas que normalmente se encontra entre pH 8 a 9, conforme relatado por Petersen, Fojan e Petersen (2001) e Fojan *et al.* (2000). De acordo com estes autores, a distribuição de resíduos ao longo da região do sítio ativo e, principalmente na região acessível ao solvente desempenham um papel importante no pH ótimo para atividade de esterases e lipases. No caso de lipases, um aumento no número de resíduos não-polares como valina, leucina e isoleucina no sítio ativo pode estar relacionado ao aumento no pH ótimo para a atividade, já que estas regiões começam a ser tituladas e aumentam o potencial eletrostático negativo do sítio ativo somente em valores de pH mais básicos, de acordo com Petersen, Fojan e Petersen (2001).

Apesar de não haver muitos relatos na literatura, outras proteínas de *Haloarcula marismortui* já foram caracterizadas quanto aos seus valores de pH ótimos para a atividade em valores que se situam entre 7,5 e 8,3. Por exemplo, a acetil-CoA sintetase tem pH ótimo para a atividade em 7,5 (BRÄSEN; SCHÖNHEIT, 2005), enquanto que a xilose desidrogenase apresentou pH ótimo para a atividade ao redor de 8,3 (JOHNSEN; SCHÖNHEIT, 2004). Já Cendrin *et al.* (1994) relataram, para a catalase-peroxidase um pH ótimo para atividade em 7,5, enquanto para a malato desidrogenase foi reportado um valor de pH de 7,6 (MADERN; ZACCAI, 2004).

#### 5.4.4 TERMOESTABILIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Apesar de não haver relação obrigatória entre as propriedades de halofilia e termofilia, decidiu-se determinar a termoestabilidade de LipC, já que se sabe que arqueas halofílicas são comumente expostas a ambientes quentes, com abundante radiação solar (OREN, 2002).

Para tanto, LipC em uma concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> e 2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl, pH 8, foi incubada durante 2 h a 40, 50 e 60°C. Em 40 e 50°C observou-se uma boa estabilidade térmica de LipC, pois não foi detectada

nenhuma perda de atividade a 40°C, e a 50°C, somente 4,5% de atividade foram perdidos. Entretanto, nenhuma atividade residual foi determinada após a incubação por 2 h a 60°C (Figura 30). Monitorando-se a atividade ao longo dos primeiros minutos, verificou-se que toda a atividade foi perdida já no final de 5 min. Com este resultado, pode-se afirmar que LipC possui uma boa estabilidade entre 40 a 50°C, mas como perde rapidamente sua atividade a 60°C não pode ser classificada como uma enzima termofílica.

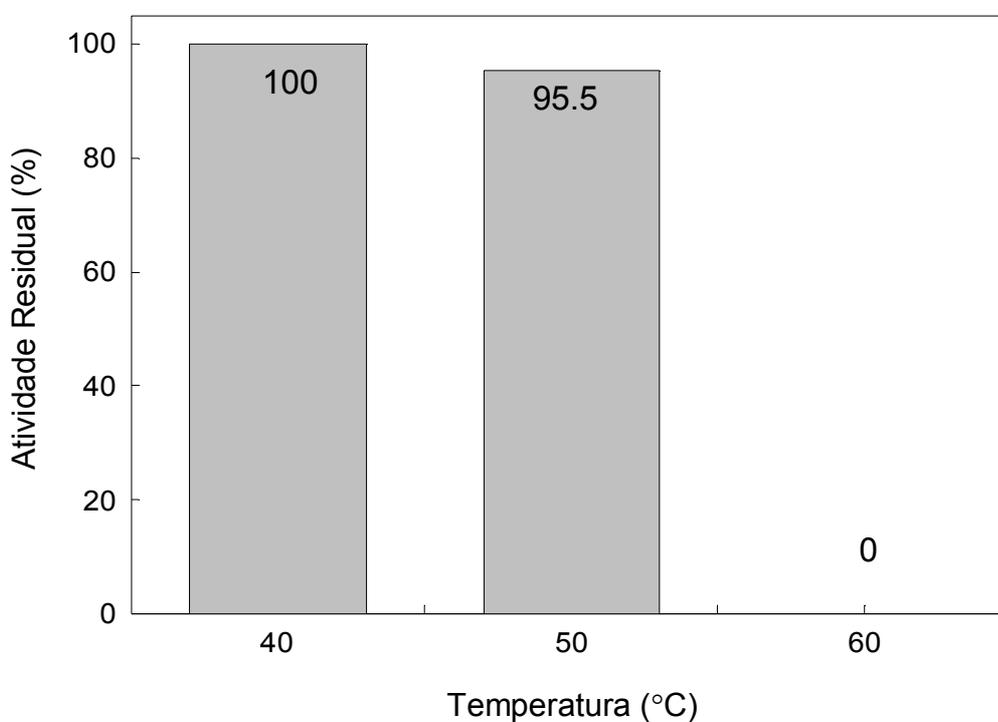


FIGURA 30 - TERMOESTABILIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

LipC a  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em tampão Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl, pH 8, foi incubada durante 2 h a 40, 50 e 60°C. Os ensaios para determinar a atividade enzimática residual foram realizados pelo método titulométrico a 37°C em Tris-HCl  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,5 com  $73,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  de butirato de vinila. Os valores apresentados são uma média dos ensaios realizados em triplicata; o desvio entre os valores foi menor do que 1% do valor da média.

A termoestabilidade é variável em proteínas halofílicas, onde podemos encontrar proteínas com termoestabilidades a temperaturas de 40 a 50°C, até proteínas com elevada termoestabilidade a temperaturas de 80 a 90°C. Martínez-

Espinosa *et al.* (2007) encontraram que a ferredoxina de *Haloferax mediterranei* é altamente estável em altas concentrações de sal (4 mol.L de NaCl) e a 80°C. Vidyasagar *et al.* (2006) caracterizaram uma protease serínica da arquea halofílica *Halogeometricum borinquense* e encontraram que a enzima perde somente 20% de sua atividade após 1 h a 90°C. Tehei *et al.* (2001) mostraram, através de análises de dicroísmo circular, que a malato desidrogenase de *H. marismortui* incubada durante 30 min a 48°C começa a sofrer desnaturação e que a proteína se agrega completamente a 70°C.

#### 5.4.5 ATIVIDADE CATALÍTICA DE LipC DE *Haloarcula marismortui* FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS

Neste ponto do trabalho, já se sabia que LipC apresentava atividade contra um éster de cadeia curta, o butirato de vinila, que foi o substrato padrão utilizado para os experimentos anteriores. Entretanto, como os resultados da análise bioinformática apontavam para a existência de uma atividade putativa de lipase ou de esterase, havia necessidade de determinar qual atividade era realmente presente em LipC. Para tanto, foi determinada a atividade de LipC frente a substratos de cadeia curta e de cadeia longa (vinil ésteres e tri-, di- e monoacilgliceróis) na presença de 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl e em pH 8,5 (Tabela 12).

De um modo geral, observou-se (Tabela 12) que, para todos os substratos, com exceção dos ésteres vinílicos, onde houve um aumento de atividade para substratos de comprimentos de cadeia de C2 até C4, para então decrescer, ou seja, a partir de C4, a atividade de LipC diminuiu com o aumento da cadeia de substrato, o que é um resultado esperado para uma esterase não-lipolítica (CHAHINIAN *et al.*, 2005, JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

TABELA 12 – ATIVIDADE CATALÍTICA DE LipC DE *Haloarcula marismortui* FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS

Substratos (mmol.L <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Atividade relativa <sup>c</sup>
<b>Ésteres vinílicos</b>		
Acetato de vinila C2 <sup>d</sup> (108) <sup>a</sup>	109,4 ± 0	18,5
Propionato de vinila C3 (86,6)	325 ± 35,4	55
Butirato de vinila C4 (73,6)	590 ± 0	100
Hexanoato de vinila C6 (58,4)	400 ± 0	67,8
Octanoato de vinila C8 (48,2)	40 ± 0	6,8
Decanoato de vinila C10 (41,4)	12,8 ± 0,4	2,2
Laurato de vinila C12 (35,9)	3,2 ± 0,3	0,5
<b>Triacilgliceróis<sup>b</sup></b>		
Triacetina C2 (53)	24 ± 1,3	4
Tripropionina C3 (41)	20 ± 0	3,4
Tributirina C4 (34)	5,8 ± 0,6	1
Tricaprilina C8 (20)	2,2 ± 0	0,4
Tricaprina C10 (6)	1,3 ± 0	0,2
<b>Diacilgliceróis</b>		
Dibutirina C4 (45,3)	74,4 ± 11,7	12,6
Dicaprilina C8 (9,6)	2,5 ± 0	0,4
Dicaprina C10 (8,3)	1,1 ± 0,2	0,2
<b>Monoacilgliceróis</b>		
Monobutirina C4 (67,3)	132,3 ± 0	22,4
Monocaprilina C8 (15,3)	26,9 ± 2,9	4,6
Monocaprina C10 (13,5)	4,8 ± 0,2	0,8
Monolaurina C12 (12,2)	1,8 ± 0,2	0,3

Os experimentos foram realizados a 37°C em 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl a pH 8,5 com 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl e com agitação (200 rpm). O número entre parênteses após o nome do substrato corresponde à concentração (mmol.L<sup>-1</sup>) final no ensaio. As quantidades de substrato foram utilizadas acima do limite de solubilidade.

<sup>a</sup> Ensaio com acetato de vinila foram feitos no mesmo tampão porém em pH 7 para evitar hidrólise química do substrato em pH 8.

<sup>b</sup> Atividades com ésteres de glicerol foram determinadas sob as mesmas condições experimentais do que para ésteres vinílicos, porém com 1% de Triton<sup>®</sup> X-100 (concentração final). Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à liberação de um µmol de ácido graxo por min.

<sup>c</sup> A porcentagem de atividade relativa foi calculada usando a atividade contra butirato de vinila como valor referência de 100%.

<sup>d</sup> O número após a letra C indica o comprimento da cadeia carbônica do ácido.

A maior atividade específica de LipC foi obtida contra o butirato de vinila (590 U.mg<sup>-1</sup>), que também foi usado como substrato padrão para os ensaios durante o

estudo desta enzima. Altas atividades específicas foram também determinadas contra outros ésteres vinílicos de cadeia curta, p. ex. propionato de vinila ( $325 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e hexanoato de vinila ( $400 \text{ U.mg}^{-1}$ ). Entretanto, as atividades de LipC contra ésteres vinílicos de cadeia mais longa (octanoato de vinila, decanoato de vinila e laurato de vinila) foram menores. Os substratos com cadeia carbônica acima de 12 carbonos, como o miristato de vinila e oleato de vinila, também foram testados, mas nenhuma atividade foi detectada. As atividades específicas contra tri-, di- e monoacilgliceróis foram menores do que aquelas medidas contra ésteres vinílicos de cadeia curta. Além disso, o grau de esterificação do glicerol teve um importante impacto na diminuição da atividade específica de LipC. Por exemplo, as atividades específicas de LipC contra dibutirina e monobutirina foram 13 e 23 vezes maiores do que a atividade específica contra tributirina (Tabela 12). Estes resultados confirmam que LipC é de fato uma esterase não-lipolítica e reforçam os resultados obtidos anteriormente pela análise bioinformática, mostrando, entretanto, que esta enzima possui apenas atividade esterase e não lipolítica.

De acordo com Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999), a diferença entre a atividade de esterases e lipases está no reconhecimento do substrato, sendo que, de modo geral, esterases reconhecem preferencialmente ésteres com ácidos graxos de cadeias carbônicas menores do que dez carbonos, enquanto lipases reconhecem preferencialmente ésteres com cadeias carbônicas com dez ou mais carbonos. Além disso, assume-se que esterases são enzimas que hidrolisam ésteres de cadeia curta solúveis em água e que lipases especificamente hidrolisam emulsões de triacilgliceróis insolúveis em água (CHAHINIAN *et al.*, 2005). Esta propriedade pode ser explicada observando-se o sítio de ligação ao substrato de esterases e lipases. Como relatado por Pleiss, Fischer e Schmid (1998), quando foram comparados os sítios ativos de duas esterases e oito lipases, observou-se que todas as enzimas apresentavam arquitetura similar e mesmo mecanismo de catálise. Todas apresentavam uma tríade catalítica (serina – aspartato – histidina) e um sítio de ligação ao substrato que acomodava a cadeia acila do éster. Sendo assim, os autores sugeriram que a principal diferença entre estas enzimas estaria na geometria do sítio de ligação ao substrato. As lipases têm um grande sítio hidrofóbico que é capaz de acomodar triacilgliceróis de cadeia longa (p. ex.: trioleína), sendo que o substrato interage com o sítio de ligação em uma

conformação que cada uma das cadeias acilas do éster é acomodada de um lado do sítio de ligação ao substrato. Já as esterases possuem um sítio de ligação do substrato menor do que o de lipases e sem a possibilidade de acomodar as três cadeias de ácidos graxos simultaneamente, como ocorre em lipases (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). Esta propriedade estrutural pode explicar porque LipC apresentou uma atividade decrescente quando se aumentou o número de substituições nos ésteres de glicerol (Tabela 12 – atividades para monobutirina, dibutirina e tributirina). Além disso, como relatado por Fojan *et al.* (2000), nos sítios ativos de esterases a parte que está 50 a 80% acessível ao solvente apresentou um menor número de resíduos não-polares se comparada ao sítio ativo de uma lipase, que é rico em valina, leucina e isoleucina nesta mesma região. Esta propriedade estrutural pode diminuir significativamente a interação da enzima com o substrato, conforme aumente o seu grau de hidrofobicidade, como é o caso na série monobutirina, dibutirina e tributirina.

Outras esterases de arqueas foram caracterizadas quanto à especificidade ao substrato. Manco *et al.* (2000) encontraram que, para a esterase da arquea termofílica *Archaeoglobus fulgidus*, a maior atividade foi contra hexanoato de *p*-nitrofenila. Almeida *et al.* (2006) encontram que, para a esterase (ORF PF2001) da arquea termofílica de *Pyrococcus furiosus*, a maior atividade foi contra heptanoato de metil-umbeliferona. A esterase da arquea termo e acidofílica *Sulfolobus solfataricus* P1 apresentou maior atividade contra caprilato de *p*-nitrofenila. A esterase EST3 de *Sulfolobus solfataricus* P2 apresentou maior atividade contra valerato de *p*-nitrofenila (KIM; LEE, 2004). A esterase/ aminoacil hidrolase da arquea termofílica *Aeropyrum pernix* K1 apresentou maior atividade contra caprilato de *p*-nitrofenila (GAO *et al.*, 2003). A esterase EST2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius* apresentou maior atividade contra hexanoato de *p*-nitrofenila (MANCO; MANDRICH; ROSSI, 2001). Estes resultados mostram que como observado para LipC de *H. marismortui*, as esterases de outras arqueas também mostram especificidade contra substratos de cadeia curta de quatro a oito carbonos.

Infelizmente, a maioria destes trabalhos não determinou a atividade contra os substratos utilizados no presente trabalho, como mono-, di- e triacilgliceróis, o que impossibilita a comparação direta dos resultados. No entanto, Mandrich *et al.* (2005)

apresentaram resultados para uma esterase de *Sulfolobus solfataricus* (ORF SSO2517) que foi capaz de hidrolisar tricaprilina com um valor de atividade específica de  $2,6 \text{ U.mg}^{-1}$ , um valor próximo ao encontrado para LipC ( $2,2 \text{ U.mg}^{-1}$ ). Esta esterase de *S. solfataricus* também possui homologia de seqüência com enzimas da família HSL e comparando sua seqüência com a da esterase EST2, uma deleção de 60 aminoácidos no domínio N-terminal foi observada. Esta região corresponde ao domínio *cap* e foi sugerida por Mandrich *et al.* (2005) como uma estrutura que cobre e protege o sítio ativo de algumas enzimas, entre elas, a esterase EST2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (DE SIMONE *et al.*, 2000), a esterase de *Archeoglobus fulgidus* (DE SIMONE *et al.*, 2001) e a esterase Brefeldina A de *Bacillus subtilis* (WEI *et al.*, 1999). Este domínio *cap* também não é observado na seqüência de LipC, o que poderia justificar o seu reconhecimento por triacilgliceróis de cadeia média, o que não foi observado para outras esterases relacionadas, como a EST2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (DE SIMONE *et al.*, 2000) e a esterase de *Archeoglobus fulgidus* (DE SIMONE *et al.*, 2001).

#### 5.4.6 EFEITO DE INIBIDORES SERÍNICOS NA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui*.

Os resultados da análise bioinformática apontaram que LipC poderia ser membro da família das lipases hormônio-sensíveis (HSL), que foi descrita por Hemila, Koivula e Palva (1994) como uma superfamília de lipases e esterases que engloba desde lipases de mamíferos até lipases e esterases de bactérias e arqueas.

Para confirmar a presença de uma serina no sítio ativo de LipC e se esta enzima faz parte da família HSL, três inibidores de esterases serínicas foram testados: o PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), o E600 (fosfato de dietil-*p*-nitrofenila) e o 7600 (5-metóxi-3-(4-fenóxifenil)-3H-[1,3,4]oxadiazol-2-ona), sendo o último previamente descrito como um inibidor específico para enzimas da família HSL (BEN ALI *et al.*, 2006) (Figura 31).

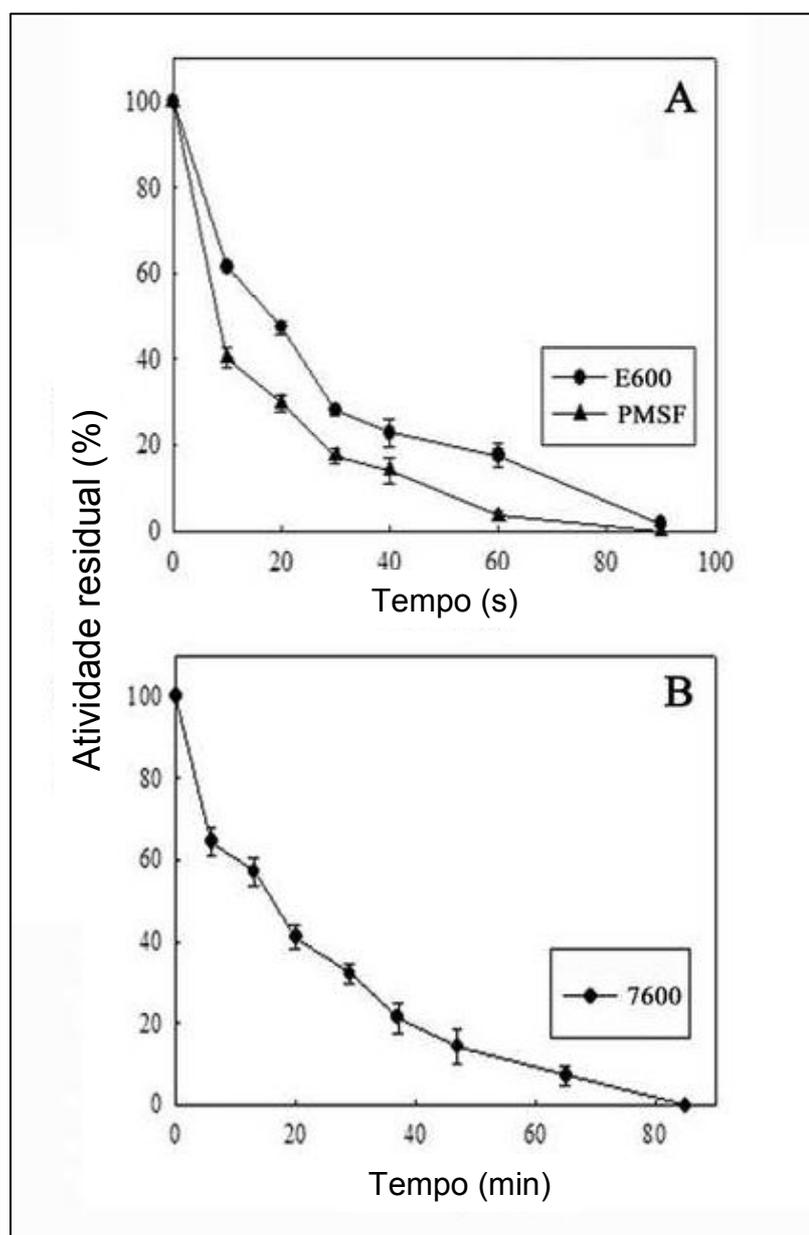


FIGURA 31 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui* POR INIBIDORES SERÍNICOS

(A) incubação com E600 (dietil *p*-nitrofenil fosfato) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) numa razão molar de 10:1 inibidor: enzima e (B) incubação com o inibidor 7600 (5-metóxi-3-(4-fenóxi-fenil)-3H-[1,3,4]oxadiazol-2-ona) numa razão molar de 100:1 inibidor-enzima. A atividade de LipC utilizando como substrato o vinil butirato (73,6 mmol) foi verificada nas condições padrão: a 37°C com 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl em pH 8,5 e 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl e sob agitação de 200 rpm. Os valores são as médias de três experimentos independentes. O valor de atividade específica referência de 100% foi de 590 U/mg determinado na condição padrão.

A inibição de LipC por PMSF ou E600 foi rápida, com um tempo de meia-vida de inativação ( $t_{1/2in}$ ) de 10 s e 20 s, respectivamente, sendo que nenhuma atividade residual foi detectada após 90 s nas condições utilizadas (Figura 31A). A inibição de LipC por 7600 foi muito mais lenta, com um  $t_{1/2in}$  de 15 min, sendo que a inativação completa ocorreu após 85 min (Figura 31B). As inibições por PMSF, E600 e 7600 indicaram que LipC é uma enzima serínica, ou seja, que possui uma serina ativa no sítio catalítico, como já havia sido previsto pelo alinhamento de seqüências (Figura 16). Além disso, a rápida inibição de LipC por PMSF e E600 na ausência de detergentes sugere que LipC tenha um sítio ativo mais acessível ao substrato, uma propriedade estrutural que usualmente diferencia esterases de lipases. Muitas lipases possuem o domínio estrutural *lid*, que normalmente se encontra na conformação fechada na ausência de interface lipídio - água, bloqueando o sítio ativo (BELLE *et al.*, 2007).

A inibição de LipC pelo composto 7600 indicou que esta enzima pertence à família HSL, como outras enzimas desta família que também são inibidas pelo 7600 (BEN ALI *et al.*, 2006). Outras esterases de arqueas previamente caracterizadas, como a esterase de *Archaeoglobus fulgidus* (AFEST) (MANCO *et al.*, 2000) e a esterase EST2 de *Alycyclobacillus acidocaldarius* (MANDRICH *et al.*, 2005), também foram inibidas por 7600. Em concordância com os resultados de alinhamento de seqüências, LipC foi inibida pelo composto 7600, um inibidor com alta especificidade para esterases e lipases da família HSL (BEN ALI *et al.*, 2006). No entanto, a inibição por 7600 foi mais lenta contra LipC quando comparada aos resultados de inibição contra AFEST e EST2 obtidos por Ben Ali *et al.* (2006). Até o momento, não se tem evidência experimental para explicar porque a inibição de 7600 foi mais lenta contra LipC. Porém, acredita-se que os sítios de interação das esterases AFEST e EST2 com este inibidor favoreçam uma interação mais estável do que em LipC, levando a uma rápida inibição. Como mostrado na Figura 16, o alinhamento de seqüências mostrou que, entre os membros da família HSL e LipC, na região da fenda oxianion há uma arginina em uma posição em que normalmente se encontra uma histidina, e na região do pentapeptídeo há uma histidina em uma posição na qual normalmente se encontra um glutamato ou aspartato na família HSL. Portanto, estudos de relação estrutura-função, principalmente da região do

sítio ativo de LipC poderão esclarecer o mecanismo de inibição por 7600 e gerar mais informação para o desenvolvimento de inibidores mais específicos para a família HSL.

## 5.5 ESTABILIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui* FRENTE A SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA

Como mencionado no início deste trabalho, uma das razões pelas quais enzimas halofílicas são estudadas é a possibilidade de sua aplicação em meios com alta concentração de solventes orgânicos (ADAMS; PERLER; KELLY, 1995; SELLEK; CHAUDHURI, 1999; EICHLER, 2001). Portanto, como parte deste trabalho, investigou-se a estabilidade de LipC de *H. marismortui* em vários solventes miscíveis em água. Como nestes experimentos foi utilizada enzima em solução aquosa, não se optou por avaliar a estabilidade contra solventes imiscíveis em água, já que muitas vezes a presença de água no solvente cria um sistema bifásico, que impede o contato da enzima diretamente com o solvente orgânico, o que pode gerar um falso resultado de estabilidade. No entanto, futuramente, a estabilidade de LipC poderá ser estudada em solventes imiscíveis em água utilizando a enzima na forma de pó liofilizado.

A estabilidade a solventes foi verificada incubando LipC por 16 h em tampões com 0,2 ou 1,5 mol.L<sup>-1</sup> de KCl na presença de 60 ou 30% (v/v) de solventes, respectivamente. Em 30% de solvente e 1,5 mol.L<sup>-1</sup> de KCl, somente na presença de dimetilsulfóxido a enzima apresentou boa estabilidade após a incubação (93% de atividade residual) (Tabela 13). Em todas as outras condições houve diminuição da atividade residual da enzima, sendo que, entre elas, a menos agressiva foi a incubação com acetonitrila, quando a enzima ainda apresentou cerca de 22% de atividade residual (Tabela 13).

Surpreendentemente, incubando LipC com 60% de solvente porém com menor concentração salina (0,2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl), valores maiores de atividade

residual foram encontrados, mesmo em solventes conhecidamente desnaturantes como o caso da acetona e do tetrahidrofurano (KIM; DORDICK, 1997). Nestas condições, incubando-se a enzima na presença de 60% de acetonitrila, a atividade manteve-se estável por 16 h.

TABELA 13 - ESTABILIDADE DE LipC DE *Haloarcula marismortui* FRENTE A SOLVENTES ORGÂNICOS MISCÍVEIS EM ÁGUA

Solvente orgânico	logP <sup>a</sup>	Atividade residual (%) <sup>b,c</sup>	
		0 h	16 h
Dimetilsulfóxido 30% / 1,5 M KCl	-1,35	95 ± 2,5	93 ± 1,2
Acetonitrila 30% / 1,5 M KCl	-0,34	45,7 ± 2,9	22,6 ± 4,1
Acetona 30% / 1,5 M KCl	-0,24	27,5 ± 3,7	4,7 ± 0,3
Etanol 30% / 1,5 M KCl	-0,31	14,2 ± 0,5	4,3 ± 0,3
Tetrahidrofurano 30% / 1,5 M KCl	0,46	5,9 ± 0,4	4,7
Dimetilsulfóxido 60% / 0,2 M KCl	-1,35	59 ± 1	11 ± 2
Acetonitrila 60% / 0,2 M KCl	-0,34	103,5 ± 2,8	111 ± 2,5
Acetona 60% / 0,2 M KCl	-0,24	54,8 ± 5,2	37,1 ± 0,8
Etanol 60% / 0,2 M KCl	-0,31	59,2 ± 7	40 ± 1
Tetrahidrofurano 60% / 0,2 M KCl	0,46	43,6 ± 1,6	40 ± 2,5

a - o logP é o logaritmo do coeficiente de partição, P, do solvente entre *n*-octanol e água e é usado como uma medida da polaridade do solvente ([http://www.syrres.com/eSc/est\\_kowdemo.htm](http://www.syrres.com/eSc/est_kowdemo.htm)).

b - a atividade esterásica foi medida em 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8), 3 mol.L<sup>-1</sup> KCl, 0,36 % Triton X-100 e 2 mmol.L<sup>-1</sup> de butirato de *p*-nitrofenila com ou sem solvente orgânico a temperatura ambiente por 5 min.

c - LipC foi pré-incubada na ausência ou presença de solvente orgânico por 16 h em soluções contendo 1,5 ou 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl. A atividade residual foi medida em condições padrão (tampão sem solvente e com 3 mol.L<sup>-1</sup> de KCl), a concentração final de solvente no ensaio foi abaixo de 1,5% (v/v). A atividade residual foi expressa em porcentagem assumindo as condições sem solvente e com 1,5 e 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl como os controles positivos.

Analisando-se os resultados quanto à polaridade dos solventes orgânicos, percebe-se que LipC exibe um comportamento diferente do que é relatado para enzimas em geral, e particularmente para lipases. Normalmente, o reportado em

literatura é que a estabilidade de enzimas é maior para solventes com elevados valores de log P, se comparada à exibida com solventes com log P inferior a zero. Este efeito é atribuído, no caso de um solvente hidrofílico com logP negativo, a sua interação e remoção da água de solvatação da proteína, causando a desnaturação da proteína (SIMON *et al.*, 1998; ROY; GUPTA, 2004; VILLENEUVE, 2007).

Os resultados de estabilidade a solventes orgânicos mostraram que LipC exibe uma característica de ser pouco estável a solventes na presença de altas concentrações de sal (1,5 mol.L<sup>-1</sup> de KCl) e de apresentar uma melhor estabilidade frente aos mesmos solventes em baixas concentrações de sal (0,2 mol.L<sup>-1</sup> de KCl) (Tabela 13). Isto pode ser explicado pelo efeito *salting-out* dos solventes utilizados (ROBINSON; JENCKS, 1965a, b). Por exemplo, o tetrahidrofurano, o solvente com características mais hidrofóbicas (log P = 0,46), apresenta um grande efeito *salting-out*, o que implica dizer que este solvente tem a capacidade de solvatar a parte interna da proteína, que consiste em grande parte de contatos hidrofóbicos, levando-a à desnaturação (KIM; DORDICK, 1997). No entanto, como a superfície eletrostática de proteínas halofílicas é extremamente dependente da interação com o solvente ao seu redor (EBEL *et al.*, 2002), em baixas concentrações de sal existe um efeito denominado de “triagem por cargas negativas”, que ocorre quando apenas uma parte das cargas negativas na superfície é neutralizada pela interação com íons (LANYI, 1974). Sendo assim, pode-se sugerir que, em baixas concentrações de KCl, LipC apresente uma superfície eletrostática mais negativa, desfavorecendo a interação com solventes com característica menos polar, neste caso acetonitrila, acetona, etanol e tetrahidrofurano. Além disso, a alta estabilidade de LipC frente a 60% (v/v) de acetonitrila pode ser evidenciada como uma característica única em proteínas halofílicas descritas até então. Ruiz *et al.* (2007) avaliaram o efeito de solventes na estabilidade de uma protease halofílica de *Natrialba magadii* e especificamente para acetonitrila encontraram apenas 8% de atividade residual na presença de 1,5 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl e nenhuma atividade residual foi determinada com 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl.

Já em altas concentrações de sal, por exemplo, acima de 1 mol.L<sup>-1</sup> acredita-se que todas as cargas na superfície da proteína estejam participando de uma rede de interações com íons K<sup>+</sup> e água, formando, assim, uma camada de solvatação

para manter a estrutura da proteína (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000). Se houver de alguma forma um enriquecimento rápido de moléculas de água, a camada de solvatação será perturbada e a proteína poderá sofrer um processo de desnaturação. Nestas condições, é possível que, de todos os solventes testados, o que tenha a menor ligação com a proteína seja o DMSO, não perturbando a sua estabilidade. Arakawa *et al.* (2007) observaram que o DMSO se liga preferencialmente a proteínas desenoveladas mantendo-as neste estado. Muito disto deve-se ao fato de que este solvente interage mais favoravelmente com as cadeias laterais de alguns aminoácidos do que com as cadeias que normalmente estão na parte interna das proteínas, tais como o triptofano e fenilalanina.

Apesar de estes resultados apontarem um bom potencial para a utilização de LipC em solventes orgânicos miscíveis em água, estes são resultados iniciais e, que, para propor qual o fenômeno biofísico que rege a estabilidade de LipC em acetonitrila e DMSO, outros experimentos precisarão ser feitos e um conjunto maior de dados precisará ser obtido.

## 5.6 MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE *Halobacula marismortui*

Para se obter uma melhor explicação em nível molecular para a atividade e enovelamento de LipC sal-dependentes, gerou-se um modelo tridimensional para a enzima usando o servidor SAM-T06 ([http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM\\_T06/T06-query.html](http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T06/T06-query.html)). Este servidor é um método inteiramente automatizado que integra vários programas para gerar um modelo tridimensional fazendo uso de um conjunto de estruturas homólogas, conforme descrito na seção de Material e Métodos. Para tal, a seqüência de aminoácidos de LipC foi submetida ao servidor e, após o processamento, este retornou uma lista com as melhores estruturas-molde encontradas.

Das dez melhores estruturas-molde encontradas para gerar o modelo de LipC, nove eram esterases e outra, uma peptidase, com valores de *E-value* entre  $5,6 \times 10^{-33}$  (para a melhor estrutura) e  $4,4 \times 10^{-19}$  (para a estrutura menos relacionada) (Tabela 14). O modelo final cobre toda a seqüência de aminoácidos da proteína LipC sobrepondo satisfatoriamente com a estrutura de EST2 de *Alycyclobacillus acidocaldarius* (código no PDB – 1U4N) (DE SIMONE *et al.*, 2004), com um rmsd de 1,65 Å sobre 236 átomos de carbono alfa (Figura 32B e C). O rmsd é a medida da distância média entre os átomos de duas proteínas sobrepostas.

Outro modelo tridimensional para LipC foi gerado pelo método de *threading* usando o servidor Phyre (BENNET-LOVSEY *et al.*, 2008), e um modelo também usando a estrutura de EST2 como molde foi gerado. O modelo gerado pelo Phyre cobriu os resíduos de 10 a 279 e sobrepôs-se bem ao modelo construído pelo SAM-T06 (rmsd 1,71Å sobre 224 átomos de carbonos alfa). Apesar do modelo gerado pelo SAM-T06 possuir uma região C-terminal longa, que não foi vista no modelo gerado pelo Phyre, os dois modelos possuem a mesma topologia central e apenas algumas diferenças estruturais menores envolvendo voltas. A boa concordância entre os dois modelos aponta para um bom nível de realidade em ambas as estruturas preditas para LipC.

TABELA 14 – ESTRUTURAS MOLDES ENCONTRADAS PARA A MODELAGEM DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

<b>Código no PDB<sup>a</sup></b>	<b>Proteína</b>	<b>E-value<sup>b</sup></b>
1U4N – 26%	Carboxilesterase EST2 de <i>Alicyclobacillus</i> <i>Acidocaldarius</i>	$5,6 \times 10^{-33}$
2HM7 – 26%	Mutante G84S da Carboxilesterase EST2 de <i>Alicyclobacillus</i> <i>Acidocaldarius</i>	$2,1 \times 10^{-32}$
2O7R – 19%	Carboxilesterase de <i>Actinidia eriantha</i>	$2,7 \times 10^{-26}$
1AQL – 19%	Lipase biliar bovina ativada por sal	$6,3 \times 10^{-24}$
1C7I – 21%	Esterase termofílica de <i>Bacillus subtilis</i>	$7,3 \times 10^{-24}$
2C7B – 23%	Carboxilesterase de uma biblioteca metagenômica	$2,3 \times 10^{-22}$
2HU5 – 18%	Acilaminoacil peptidase de <i>Aeropyrum pernix</i>	$9,1 \times 10^{-22}$
3BXP – 17%	Carboxilesterase putativa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	$3,2 \times 10^{-21}$
2OGT – 21%	Carboxilesterase de <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	$1,3 \times 10^{-19}$
2PBL – 24%	Tioesterase putativa de <i>Silicibacter sp.</i>	$4,5 \times 10^{-19}$

a – Código da estrutura como depositada no PDB (*Protein Data Bank* - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). A porcentagem acompanhando o código no PDB refere-se a identidade entre as seqüências determinada pelo programa SSM, que gera alinhamentos de estruturas tridimensionais de proteínas (KRISSEL; HENRICK, 2004)

b – O valor de *E-value* é um valor estatístico que indica a expectativa de que outra estrutura com *escore* idêntico ou maior ao valor obtido para um determinado alinhamento seja encontrada.

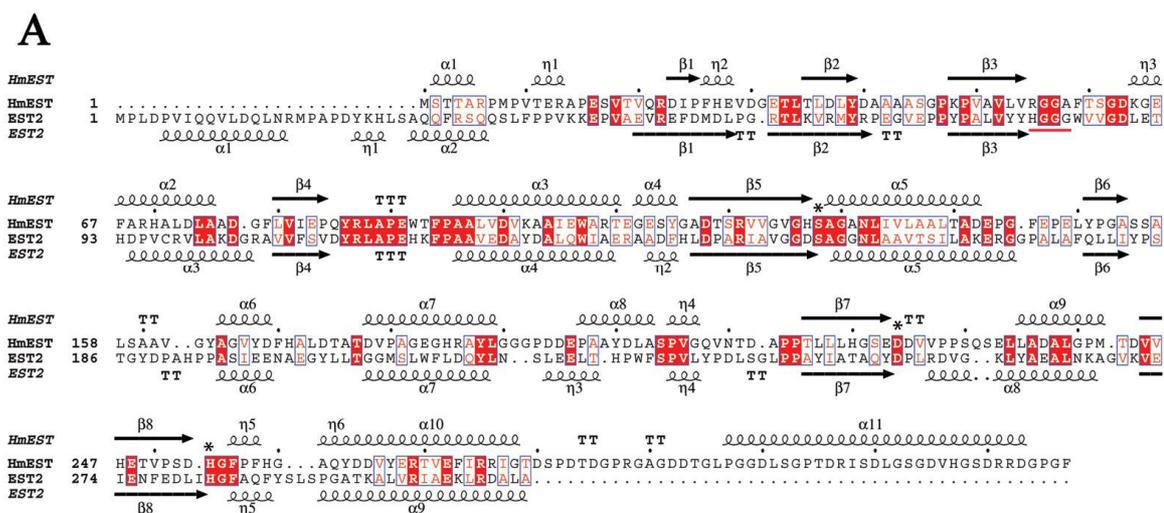


FIGURA 32 – MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE *Halobarcula marismortui*

(A) Alinhamento de seqüências entre LipC (HmEST) e EST2, com 20% de identidade. Os aminoácidos idênticos estão na caixa em vermelho, enquanto aminoácidos relacionados estão em vermelho. Os pontos no alinhamento e nos elementos estruturais indicam *gaps*. Os elementos de estrutura secundária do modelo de LipC e da estrutura cristalográfica de EST2 são mostrados acima e abaixo do alinhamento, respectivamente. Os números no início das linhas indicam a posição dos aminoácidos. Os pontos acima do alinhamento indicam intervalos de dez resíduos. Os resíduos formando a tríade catalítica são indicados por asteriscos, enquanto a fenda oxianion é sublinhada em vermelho.

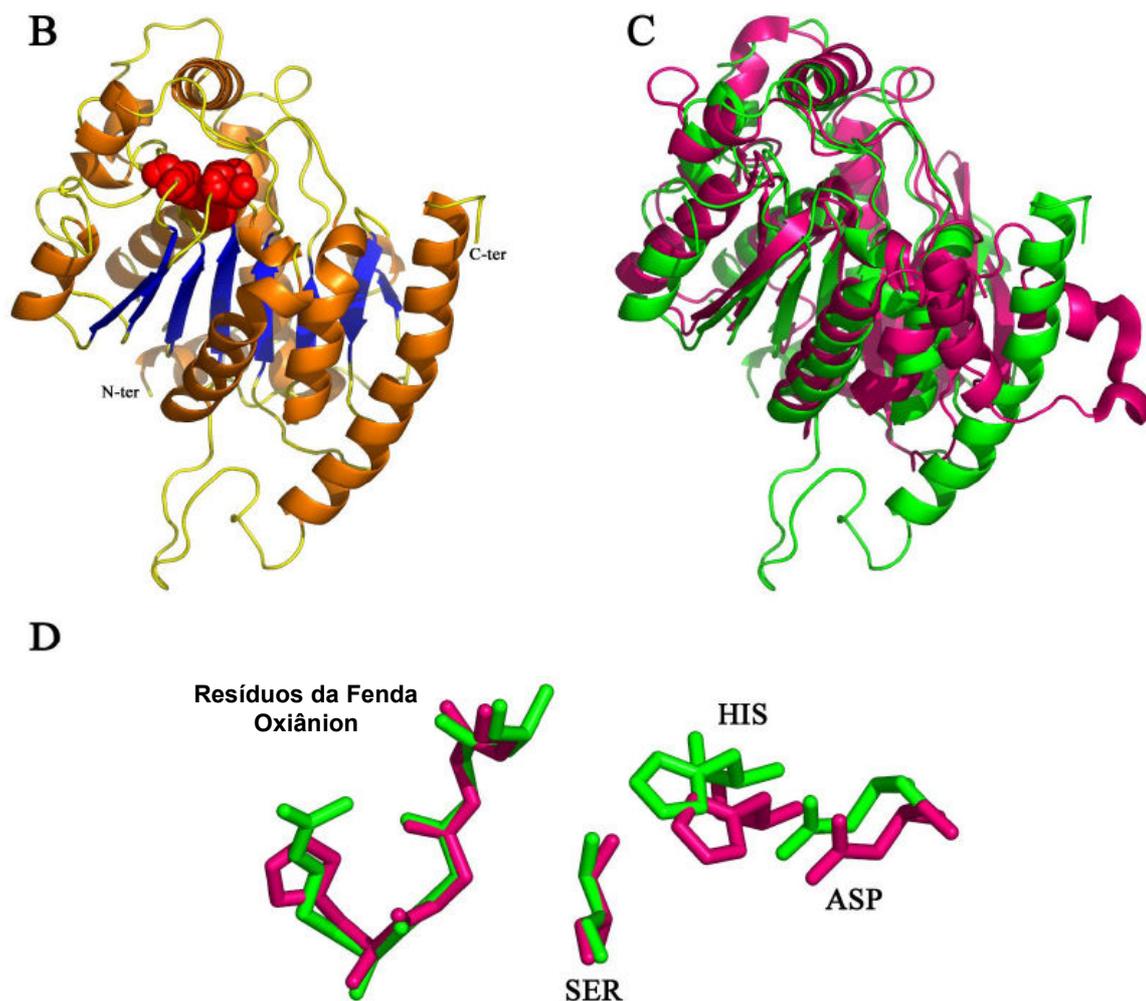


FIGURA 32 – MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE *Haloarcula marismortui* (Legenda na próxima página).

(B) Representação do modelo de LipC como obtido pelo programa SAM-T06.  $\alpha$ -hélices são mostradas em laranja, folhas- $\beta$  em azul e o sítio ativo em vermelho.

(C) Sobreposição entre os modelos de LipC (verde) e a estrutura cristalográfica de EST2 (rosa).

(D) Sobreposição dos resíduos da fenda oxianion e da tríade catalítica de LipC e EST2. As cores foram usadas da mesma maneira que no painel C.

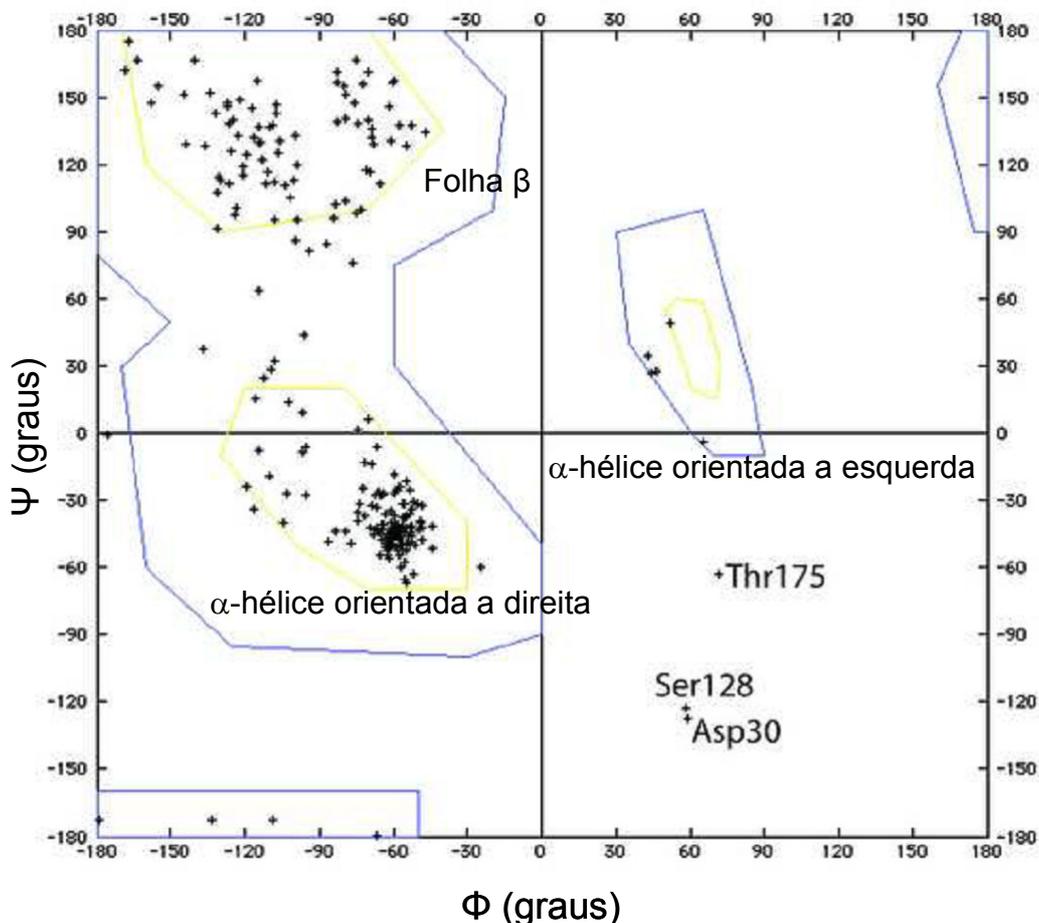


FIGURA 33 – GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA O MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

As regiões estão destacadas de acordo com o tipo de estrutura secundária. Delimitada em amarelo estão as regiões que correspondem a conformações onde não há impedimento estérico são as regiões ditas fisicamente permitidas. As regiões em azul tanto para  $\alpha$ -hélices quanto para folhas  $\beta$  são ditas adicionalmente permitidas. Toda a região que não está delimitada em azul é dita região não-permitida. Estão destacados três aminoácidos que foram encontrados na região não-permitida para o modelo de LipC.

A qualidade do modelo estrutural de LipC gerado pelo SAM-T06 foi verificada pelo gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963) (Figura 33). Esta análise foi realizada pelo programa WHAT IF (VRIEND, 1990). Este programa compara o gráfico de Ramachandran de um arquivo PDB com o gráfico de Ramachandran de cerca de 400 estruturas resolvidas com alta resolução. O Z-score de -2,644 para o gráfico de Ramachandran de LipC, como calculado pelo WHAT IF, está de acordo com estruturas bem refinadas. Como

observado na Figura 33, o gráfico de Ramachandran indica uma boa qualidade do modelo, com somente dois resíduos (treonina 175 e aspartato 30), além da serina catalítica (serina 128), em posições desfavoráveis. Resultado similar sobre a serina do sítio catalítico já foi observado anteriormente para a modelagem de uma esterase de *Pyrococcus furiosus* (ORF PF2001) (ALMEIDA *et al.*, 2006). Esta conformação é devida a uma alça rígida formada pelo pentapeptídeo (Gly – X – Ser – X – Gly) em um motivo folha  $\beta$  – alça –  $\alpha$  - hélice que faz com que a serina do sítio ativo assuma uma conformação desfavorável em relação aos ângulos  $\Phi$  e  $\psi$  da cadeia principal, conforme observado para outras proteínas com dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase (SCHRAG; CYGLER, 1997).

O modelo final de LipC consiste de onze  $\alpha$ -hélices e um *core* contendo oito folhas- $\beta$  ao total (Figura 32B). A fenda oxianion de LipC (resíduos 55 a 58, Figura 31A) sobrepõe-se bem com a fenda oxianion de EST2 (Figura 32A e D). Os esqueletos carbônicos dos resíduos de glicina 56, glicina 57 e alanina 58 foram visualizados bem próximos do sítio ativo e devem estar envolvidos na estabilização do intermediário de reação. Os resíduos de serina 128, aspartato 224 e histidina 254 de LipC sobrepuseram-se bem com os resíduos que formam a tríade catalítica em EST2 (serina 155, aspartato 252 e histidina 282) (Figura 32D).

Apesar de o modelo ter sido bem validado pelo gráfico de Ramachandran, acredita-se que a região da  $\alpha$ -hélice C-terminal (resíduos 297-313) deva ser considerada com certo cuidado. A região cobrindo os resíduos 280 a 327 de LipC foi predita como desordenada de acordo com a análise pelo programa IUPRED, um servidor para predição de desordem em seqüências de aminoácidos (DOSZTÁNYI *et al.*; 2005) (Figura 34A e B). Além disso, esta  $\alpha$ -hélice representa um elemento estrutural adicional com respeito às estruturas das proteínas moldes encontrada pelo SAM-T06 e Phyre.

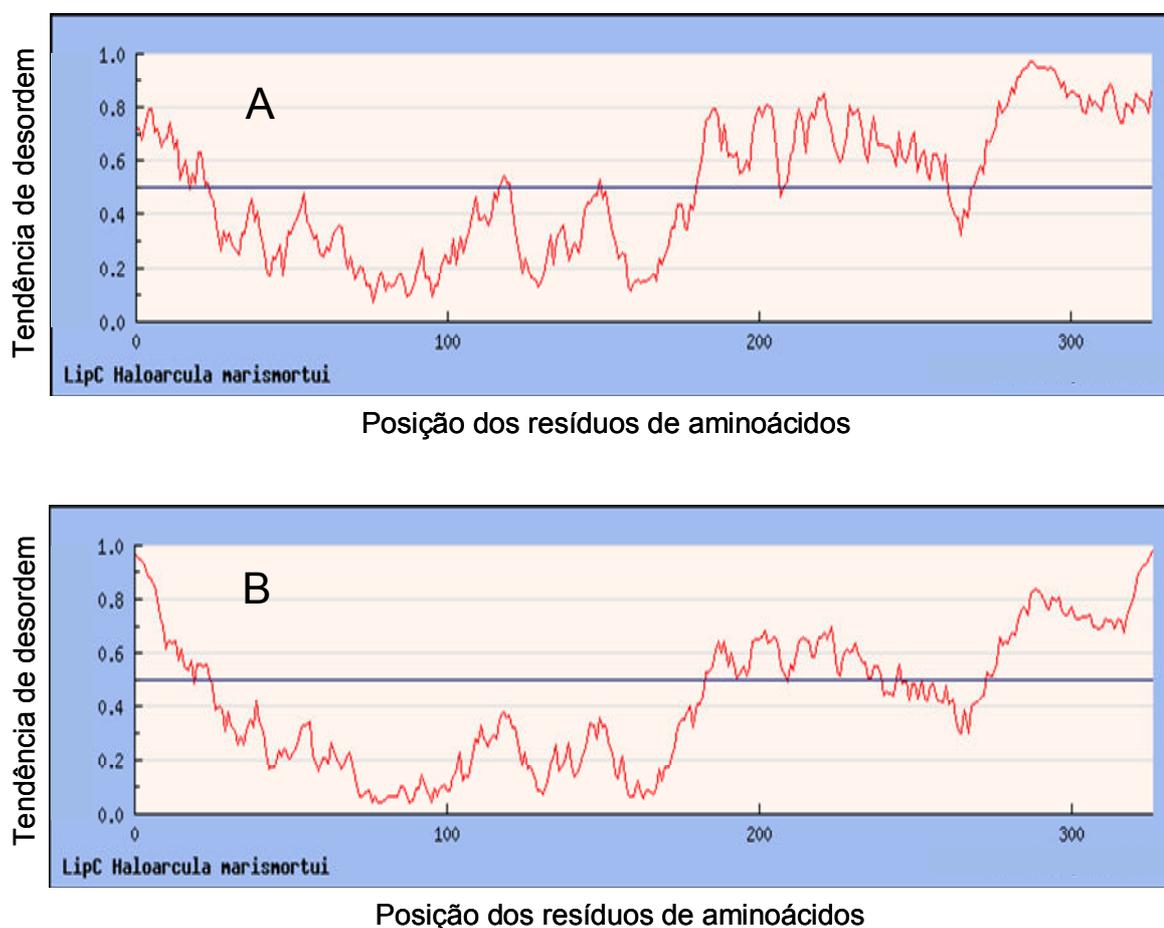


FIGURA 34 – ANÁLISE DE DESORDEM NA SEQÜÊNCIA DE LipC DE *Haloarcula marismortui*

Tendências superiores a 0,5 indicam uma propensão à formação de estruturas desordenadas. A – predição de desordem longa considerando o contexto de seqüências de 100 aminoácidos. B – predição de desordem curta considerando o contexto de seqüências de 25 aminoácidos. Análise realizada pelo IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>).

As coordenadas para a  $\alpha$ -hélice C-terminal (resíduos 297-313) foram geradas pelo SAM-T06 através do método de reconhecimento de enovelamento de estruturas não-relacionadas, seguido pela combinação dos fragmentos gerados em uma única estrutura. Entretanto, é necessário reforçar que a estrutura proposta para esta região é meramente teórica e que esta região pode adotar um enovelamento diferente. Todavia, dada a sua natureza flexível, esta região provavelmente seja exposta ao solvente, como anteriormente mostrado por Liu e Rost (2003), onde

regiões longas, que não possuem estrutura secundária regular (NORS – *non regular secondary structure*), são geralmente acessíveis ao solvente. Portanto, apesar de não se saber exatamente qual a sua conformação, acredita-se que esta região pode ter um importante papel para a interação da proteína com o solvente.

A distribuição de cargas de LipC foi estimada a partir de um cálculo de potencial eletrostático na superfície do modelo (Figura 35A). LipC mostrou um potencial negativo, localizado principalmente na superfície, enquanto o potencial eletrostático para EST2 foi cerca de 1,5 vez menor (Figura 35B). O potencial negativo de LipC provavelmente resulta da presença de agregados de resíduos de aspartato e glutamato na superfície da proteína, considerando que não há agregados de resíduos com cargas positivas. A análise da superfície eletrostática mostrou que a maioria dos resíduos ácidos está localizada na superfície da proteína, sendo assim expostos ao solvente. Este enriquecimento em resíduos ácidos pode favorecer a solvatação, como observado no caso da glucose desidrogenase de *Haloferox mediterranei*, que tem um importante arranjo de moléculas de água interagindo com os resíduos de glutamato e aspartato. Também foi observado que o grau de solvatação da glucose desidrogenase de *H. mediterranei* é o maior entre todas as proteínas com estrutura tridimensional conhecida. Surpreendentemente, somente cinco íons potássio foram observados interagindo com a proteína, o que claramente indica que o papel preponderante dos resíduos ácidos na superfície, além de interagirem com os íons em solução, também seja de manter a solvatação da proteína em condições de altas concentrações de sal (BRITTON *et al.*, 2006).

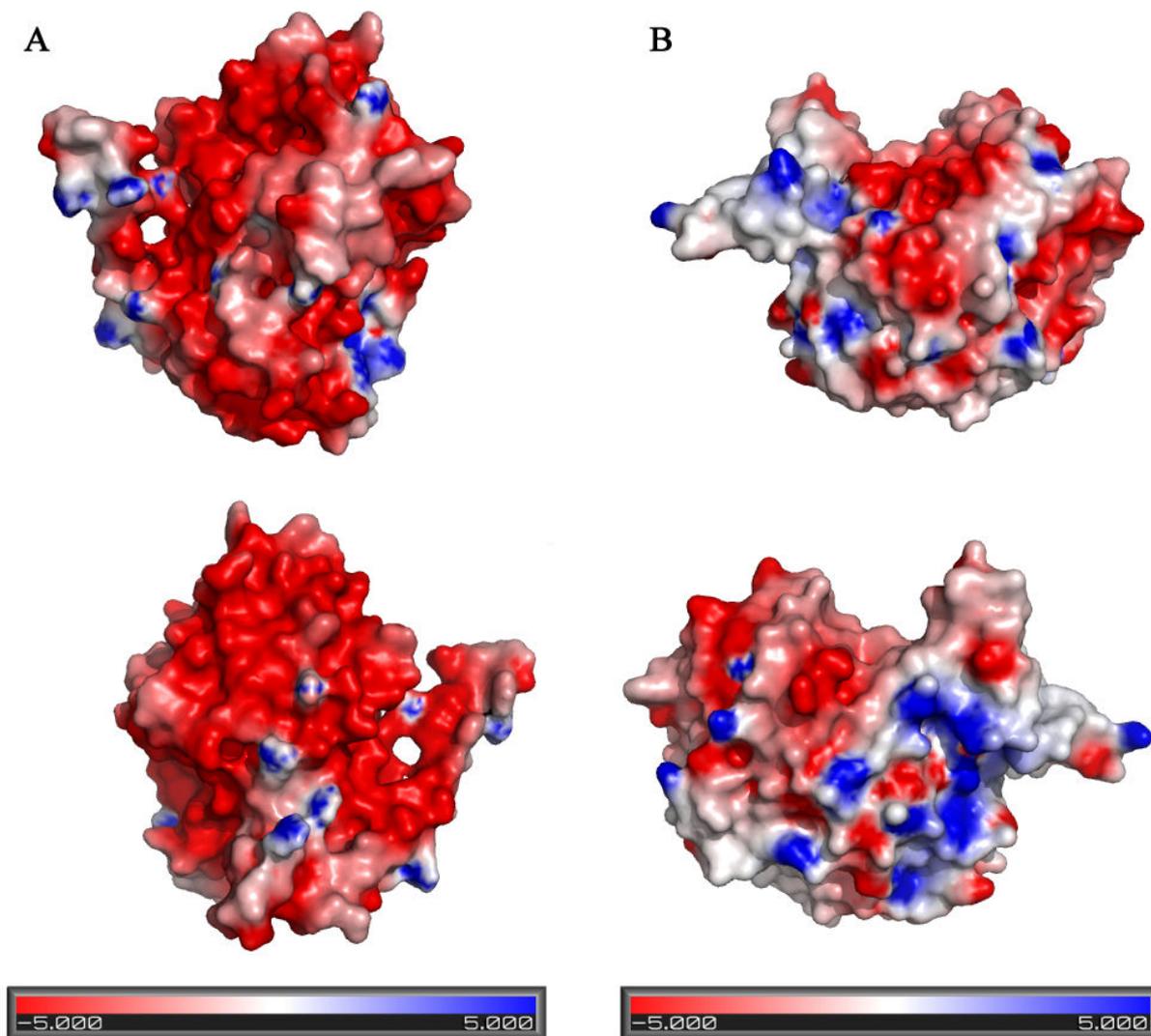


FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO DA SUPERFÍCIE ELETROSTÁTICA DO MODELO DE LipC

Potenciais eletrostáticos na superfície de LipC (A) e EST2 (B) foram obtidos pelo programa Delphi. As estruturas foram graficamente dispostas com o sítio ativo para frente (parte de cima) e em uma rotação horizontal de  $180^\circ$  (parte de baixo). A escala de potencial eletrostático calculada pela equação de Poisson-Boltzmann é de -5 a +5 kbT/e; a superfície em vermelho representa o potencial mais negativo e a superfície em azul o potencial mais positivo.

LipC e EST2 podem ser ambas classificadas como proteínas contendo um alto número de resíduos ácidos, sendo a porcentagem de aspartato e glutamato de 16,8% e 13,2%, respectivamente (Tabela 15).

TABELA 15 – ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E DA SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE DO MODELO DE LipC E EST2

	LipC	EST2	Proteínas globulares <sup>a</sup>
<b>Frequência dos aminoácidos</b>			
Asp+Glu (% dos resíduos totais)	16,8%	13,2%	11,8%
Arg+Lys (% dos resíduos totais)	5,8%	8,7%	10,7%
Razão (Asp+Glu)/(Arg+Lys)	2,9	1,5	1,1
Resíduos hidrofóbicos (% dos resíduos totais)	47,4%	54,2%	44,7%
Razão dos resíduos carregados pelos hidrofóbicos	0,5	0,4	0,5
<b>Frequência dos aminoácidos na superfície</b>			
Superfície acessível total (Å <sup>2</sup> )	15.632	13.611	
Superfície acessível composta por Asp+Glu (Å <sup>2</sup> )	4.387	3.273	
Asp+Glu (% do total da superfície)	28,1%	24,1%	
Superfície acessível composta por Arg+Lys (Å <sup>2</sup> )	2.342	2.354	
Arg+Lys (% do total da superfície)	15,0%	17,3%	
Razão (Asp+Glu)/(Arg+Lys)	1,9	1,4	
Superfície acessível composta por resíduos hidrofóbicos	4.960	5.259	
Resíduos hidrofóbicos (% do total da superfície)	31,7%	38,6%	
Razão resíduos carregados /resíduos hidrofóbicos	1,36	1,07	

a – Dados retirados de TOMPA (2002).

Este conteúdo é maior do que observado em proteínas globulares com estruturas tridimensionais conhecidas (11,8%, Tabela 15). Entretanto, LipC difere de EST2 e de outras proteínas globulares em relação ao seu baixo conteúdo de resíduos básicos (5,8% para LipC contra 8,7% para EST2). A razão entre os resíduos ácidos e básicos é de 2,9 para LipC, sendo muito maior do que em EST2

(1,5) e outras proteínas globulares (1,1; Tabela 15). A razão entre resíduos carregados e hidrofóbicos para LipC (0,5) e EST2 (0,4) é semelhante à encontrada em proteínas globulares (0,5). Entretanto, a superfície hidrofóbica acessível de LipC (31,7% da superfície acessível da proteína) é menor do que em EST2 (38,6%). A razão de resíduos carregados por resíduos hidrofóbicos na superfície acessível de LipC (1,36) é maior do que a observada em EST2 (1,07).

Os resultados encontrados no presente trabalho referentes ao potencial eletrostático de proteínas halofílicas já foram reportados por outros autores. Estas proteínas são caracterizadas por um potencial eletrostático na superfície preponderantemente negativo devido a maior abundância de resíduos de aminoácidos, como o aspartato e glutamato. Acredita-se que esta alta densidade de cargas negativas sirva para estabilizar estas proteínas em ambientes dessecantes, ou seja, com alta concentração de sal, como ocorre no citoplasma de arqueas halofílicas (MADERN, EBEL, ZACCAI; 2000, DAWSON; HOUGH, 1997). Portanto, a adaptação halofílica ou halofilia é melhor explicada pelo modelo de estabilização - solvatação, onde resíduos de aminoácidos com propriedades ácidas ligam-se a íons hidratados, para formar uma camada de solvatação, que prevê a ligação excessiva de água ou sal na superfície da proteína. Este mecanismo manteria a proteína solúvel e devidamente enovelada em altas concentrações de sal (MADERN, EBEL, ZACCAI; 2000, PRENKUMAR *et al.*, 2005).

Fukuchi *et al.*(2003) determinaram que proteínas de arqueas halofílicas têm em média uma maior porcentagem de resíduos de aspartato e glutamato expostos na superfície em comparação a proteínas oriundas de arqueas termofílicas. Em proteínas termofílicas, sugere-se que boa parte destes resíduos esteja interagindo com resíduos positivamente carregados formando pontes salinas. Como esperado, o modelo tridimensional de LipC mostrou uma alta densidade de cargas negativas expostas na superfície da proteína (28% da superfície acessível contra 24% em EST2) (Tabela 15). A alta densidade de cargas negativas na superfície de LipC também explica o baixo valor de pI teórico e migração atípica da proteína ocorrida no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 23). É importante salientar que as proteínas identificadas na procura pelo BLAST que têm maior identidade com LipC são esterases ou lipases putativas de microrganismos marinhos. Estes

microrganismos são adaptados à água do mar, que possui, em média, uma salinidade de 3,5% (m/v) e são classificados como halofílicos moderados (AZAM; MALFATTI, 2007). A análise de seqüência indicou que LipC tem uma proporção de resíduos ácidos (aspartato e glutamato) quase duas vezes maior que as esterases/lipases putativas destas bactérias. Esse resultado confirma que a proporção de resíduos ácidos está positivamente correlacionada com o grau de halofilia da proteína.

Além da diferença na composição de resíduos ácidos, LipC e EST2 também diferem quanto as suas densidades de resíduos básicos nas suas superfícies, sendo a proporção de resíduos básicos menor em LipC (15%) do que em EST2 (17,3%). Esta característica resulta do fato que as duas proteínas têm potenciais eletrostáticos na superfície consideravelmente diferentes, como mostrado na Figura 34. Este resultado sustenta fortemente a hipótese de que a razão entre resíduos ácidos e básicos é extremamente importante para a adaptação halofílica. Por último, especula-se que a extensão C-terminal de LipC possa ter um importante papel na halofilia, servindo como fator estabilizante ao alto teor de sal, como já foi descrito na literatura para outras proteínas halofílicas (PRENKUMAR *et al.*, 2005).

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho caracterizou-se pela primeira vez uma esterase de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 e confirmou-se experimentalmente sua característica halofílica e através de modelagem molecular comparativa, com vistas a verificar a possibilidade de utilização desta enzima em sistemas de biocatálise.

As principais conclusões que suportam esta afirmação, obtidas através dos dados experimentais, são:

- 1) A ORF rrnAC0088 denominada como *lipC* pelo seqüenciamento genômico de *H. marismortui*, sendo uma lipase/esterase putativa é um gene que codifica uma esterase não-lipolítica com preferência para ésteres de cadeias curtas e nomeada aqui de LipC referente a anotação do gene.
- 2) A atividade de LipC mostrou-se dependente de sal, sendo a atividade máxima obtida a 3 mol.L<sup>-1</sup> de KCl e nenhuma atividade foi detectada na ausência de sal.
- 3) A atividade pôde ser recuperada parcialmente quando a enzima foi dialisada contra tampão sem sal e KCl foi reintroduzido na solução de enzima para 2 e 3 mol.L<sup>-1</sup> de concentração final.
- 4) LipC mostrou ser uma enzima membro da família HSL através do alinhamento de seqüências, modelagem estrutural e ensaios de inibição com o composto específico 7600.
- 5) O modelo estrutural tridimensional gerado para LipC mostrou que esta enzima provavelmente possui uma alta densidade de cargas negativas na sua superfície devido a um enriquecimento em resíduos de aspartato e glutamato.
- 6) No modelo estrutural de LipC observou-se uma extensão no domínio C-terminal que poderia ser uma estrutura desordenada. Esta extensão pode ter um papel importante na solvatação e/ou interação de LipC com íons provenientes da solução.

7) Os ensaios de estabilidade de LipC frente a solventes miscíveis em água mostrou que LipC apresentou uma alta estabilidade frente à acetonitrila, mesmo em concentrações de 60% (v/v).

## 7 TRABALHOS FUTUROS

A esterase de *H. marismortui* caracterizada neste trabalho abre uma oportunidade para se aprofundar os estudos da relação estabilidade e presença de solventes orgânicos. Além disso, futuramente uma caracterização estrutural completa através de métodos de cristalografia e difração de raios-X ou por RMN será indispensável para caracterizar de fato a adaptação halofílica desta proteína.

Experimentos de relação estrutura – função envolvendo os resíduos do sítio ativo, bem como resíduos da fenda oxianion e da superfície da proteína deverão ser executados para se aprofundar a caracterização de LipC. Mutagenizando os resíduos de serina, aspartato e histidina envolvidos na catálise e coletando dados de atividade enzimática, os dados de modelagem molecular serão reforçados, confirmando a localização da tríade catalítica. Estudando os resíduos da fenda oxianion se poderá determinar se as substituições observadas em relação a outros membros da família HSL influenciam na inibição pelo composto 7600 e finalmente, a mutagênese de resíduos da superfície da proteína poderá localizar regiões que são envolvidas na ligação de íons  $K^+$ .

Na região C-terminal de LipC foi verificada a presença de uma extensão com alta propensão a assumir uma conformação desordenada. Isto se deve ao alto grau de resíduos carregados negativamente encontrados nesta região. De fato, esta extensão pode ter um papel importante para a adaptação de LipC a altas concentrações de sal. Portanto, planeja-se construir mutantes de LipC sem esta extensão e avaliar a atividade e estabilidade dos mutantes em alta concentração de sal.

Conhecendo melhor as características de LipC e conseguindo produzir razoáveis quantidades da proteína, agora pode-se planejar experimentos de biocatálise em solventes orgânicos para verificar a capacidade desta enzima em catalisar reações de esterificação e de resolução de compostos racêmicos, com vistas a aplicar LipC em processos de biocatálise.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; HORIKOSHI, K. The biotechnological potential of piezophiles. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 102 – 108, 2001.

ADAMS, M.W.W.; PERLER, F.B.; KELLY, R.M. Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. **Biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 662-668, 1995.

ALMEIDA, R.V., ALQUÉRES, S.M.C.; LARENTIS, A.L.; RÖSSLE, S.C.; CARDOSO, A.M.; ALMEIDA, W.I.; BISCH, P.M.; ALVES, T.L.M.; MARTINS, O.B. Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1128 – 1136, 2006.

ALOULO, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDEZ, S.; VAN OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 9, p. 995–1013, 2006.

ALTEKAR, W.; RAJAGOPALAN, R. Ribulose biphosphate carboxylase activity in halophilic *Archaeobacteria*. **Archives of Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 169 – 174, 1990.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403 – 410, 1990.

AMOOZEGAR, M.A.; SALEHGHAMARI, E.; KHAJEH, K.; KABIRI, M.; NADDAF, S. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 160 – 167, 2008.

ANDRADE, M.A.; CHACÓN, P.; MERELO, J.J.; MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. **Protein Engineering**, v. 6, n. 4, p. 383-390, 1993.

ANTÓN, J.; ROSELLÓ-MORA, R.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; AMANN, R. Extremely Halophilic *Bacteria* in Crystallizer Ponds from Solar Salterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3052-3057, 2000.

ARAKAWA, T.; KITA, Y.; TIMASHEFF, S.N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. **Biophysical Chemistry**, v. 131, n. 1 – 3, p. 62 – 70, 2007.

ARAND, M.; CRONIN, A.; ADAMSKA, M.; OESCH, F. Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism, and Assay. **Methods in Enzymology**, v. 400, p. 569 – 588, 2005.

AUDIC, S.; LOPEZ, F.; CLAVERIE, J.M.; POIROT, O.; ABERGEL, C. SAmBA: An Interactive Software for Optimizing the Design of Biological Macromolecules Crystallization Experiments. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 29, n. 2, p. 252 – 257, 1997.

AZAM, F.; MALFATTI, F. Microbial structuring of marine ecosystems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 782 -791, 2007.

BALIGA, N.S.; BONNEAU, R.M.; FACCIOTTI, T.; PAN, M.; GLUSMAN, G.; DEUTSCH, E.W.; SHANNON, P.; CHIU, Y.; WENG, R.S.; GAN, R.R.; HUNG, P.; DATE, S.V.; MARCOTTE, E.; HOOD, L.; NG, W.V. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: A halophilic archaeon from the Dead Sea. **Genome Research**, v. 14, n. 11, p. 2221-2234, 2004.

BANERJI, S.; FLIEGER, A. Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 522 – 525, 2004.

BARTLAM, M.; WANG, G.; YANG, H.; GAO, R.; ZHAO, X.; XIE, G.; CAO, S.; FENG, Y.; RAO, Z. Crystal Structure of an Acylpeptide Hydrolase/Esterase from *Aeropyrum pernix* K1. **Structure**, v. 12, n. 8, p. 1481 – 1488, 2004.

BELLE, V.; FOURNEL, A.; WOULDSTRA, M.; RANALDI, S.; PRIERI, F.; THOMÉ, V.; CURRAULT, J.; VERGER, R.; GUIGLIARELLI, B.; CARRIÈRE, F. Probing the Opening of the Pancreatic Lipase Lid Using Site-Directed Spin Labeling and EPR Spectroscopy. **Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 2205 – 2214, 2007.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783-795, 2004.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; WIDDICK, D.; PALMER, T.; BRUNAK, S. Prediction of twin-arginine signal peptides. **BMC Bioinformatics**, v. 6, n. 167, p. 1 – 9, 2005.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 37, D26-D31, 2008.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-42, 2000.

BERQUIST, B.R.; MÜLLER, J.A.; DASSARMA, S. Genetic Systems for Halophilic Archaea. **Methods in Microbiology**, v. 35, p. 649 – 679, 2006.

BESIR, H.; ZETH, K.; BRACHER, A.; HEIDER, U.; ISHIBASHI, M.; TOKUNAGA, M.; OESTERHELT, D. Structure of a halophilic nucleoside diphosphate kinase from *Halobacterium salinarum*. **FEBS Letters**, v. 579, n. 29, p. 6595–6600, 2005.

BEUKEN, E.; VINK, C.; BRUGGEMAN, C.A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. **Biotechniques**, v. 24, n. 5, p. 748 – 750, 1998.

BHATNAGAR, T.; BOUTAIBA, S.; HACENE, H.; CAYOL, J.L.; FARDEAU, M.L.; OLLIVIER, B.; BARATTI, J.C. Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 2, p. 133-140. 2005.

BIEGER, B.; ESSEN, L.O.; OESTERHELT, D. Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. **Structure**, v. 11, n. 4, p. 375-385, 2003.

BINBUGA, B.; BOROUJERDI, A.F.; YOUNG, J.K. Structure in an extreme environment: NMR at high salt. **Protein Science**, v. 16, n. 8, p. 1783-1787, 2007.

BISCHOFF, K.M.; RODWELL, V.W. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase from *Haloferax volcanii*: Purification, Characterization, and Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 19 – 23, 1996.

BLOW, D. Outline of Crystallography for Biologists. Oxford University Press - Inglaterra. 2001.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73 – 81, 2002.

BONETE, M.J.; PIRE, C.; LLORCA, F.I.; CAMACHO, M.L. Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: Enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. **FEBS Letters**, v. 383, n. 3, p. 227 – 229, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRÄSEN, C.; SCHÖNHEIT, P. AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*: purification, identification and expression of the encoding gene, and phylogenetic affiliation. **Extremophiles**, v. 9, n. 5, p. 355 – 365, 2005.

BRITTON, K.L.; BAKER, P.J.; FISHER, M.; RUZHEINIKOV, S.; GILMOUR, D.J.; BONETE, M.J.; FERRER, J.; PIRE, C.; ESCLAPEZ, J.; RICE, D.W. Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. **PNAS**, v. 103, n. 13, p. 4846-4851, 2006.

BRZOZOWSKI, A.M.; SAVAGE, H.; VERMA, C.S.; TURKENBURG, J.P.; LAWSON, D.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15071 – 15082, 2000.

BURTON, S.G.; COWAN, D.A.; WOODLEY, J.M. The search for the ideal biocatalyst. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 37-45, 2002.

CAMACHO, M.; RODRÍGUEZ-ARNEDO, A.; BONETE, M. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: cloning, sequence determination and overexpression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 209, n. 2, p. 155-160, 2002.

CANAAN, S.; MAURIN, D.; CHAHINIAN, H.; POUILLY, B.; DUROUSSEAU, C.; FRASSINETTI, F.; SCAPPUCCINI-CALVO, L.; CABBILLAU, C.; BOURNE, Y. Expression and characterization of the protein Rv1399c from *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Biochemistry**. v. 271, n. 19, p. 3953 – 3961, 2004.

CARVALHO, C.M.L.; CABRAL, J.M.S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1063-1085, 2000.

CENDRIN, F.; JOUVE, H.M.; GAILLARD, J.; THIBAUT, P.; ZACCAI, G. Purification and properties of a halophilic catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1209, n. 1, p. 1 – 9, 1994.

CHAHINIAN, H.; BEN ALI, Y.; ABOUSALHAM, A.; PETRY, S.; MANDRICH, L.; MANCO, G.; CANAAN, S.; SARDA, L. Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1738, n. 1 - 3, p. 29 – 36, 2005.

CHAPUS, C.; SEMERIVA, M. Mechanism of pancreatic lipase action. 2. Catalytic properties of modified lipases. **Biochemistry**, v. 15, n. 23, p. 4988-4991, 1976.

CIARAMELLA, M.; PISANI, F.M.; ROSSI, M. Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 85–97, 2002.

CÔTES, K.; DHOUB, R.; DOUCHET, I.; CHAHINIAN, H.; DE CARO, A.; CARRIÈRE, F.; CANAAN, S. Characterization of an exported monoglyceride lipase from *Mycobacterium tuberculosis* possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids. **Biochemical Journal**, v. 408, n. 3, p. 417 – 427, 2007.

CSERZO, M.; WALLIN, E.; SIMON, I.; VON HEIJNE, G.; ELOFSSON, A. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. **Protein Engineering**, v. 10, n. 6, p. 673-676, 1997.

DELANO, W.L. The PyMOL User's Manual. San Carlos, CA, USA. DeLano Scientific, 2002.

DE SIMONE, G.; GALDIERO, S.; MANCO, G.; LANG, D.; ROSSI, M.; PEDONE, C. A Snapshot of a Transition State Analogue of A Novel Thermophilic Esterase Belonging to the Subfamily of Mammalian Hormone-sensitive Lipase. **Journal of Molecular Biology**, v. 303, n. 5, p. 761 – 771, 2000.

DE SIMONE, G.; MENCHISE, V.; MANCO, G.; MANDRICH, L.; SORRENTINO, N.; LANG, D.; ROSSI, M.; PEDONE, C. The Crystal Structure of a Hyper-thermophilic Carboxylesterase from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, n. 3, p. 507 – 518, 2001.

DIAZ, S.; PÉREZ-POMARES, F.; PIRE, C.; FERRER, J. BONETE, M.J. Gene cloning, heterologous overexpression and optimized refolding of the NAD-glutamate dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*. **Extremophiles**, v. 10, n. 2, p. 105 – 115, 2006.

DOSZTÁNYI, Z.; CSIZMOK, V.; TOMPA, P.; SIMON, I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3433 – 3434, 2005.

DYM, O.; MEVARECH, M.; SUSSMAN, J.L. Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaebacterium. **Science**, v. 267, n. 5202, p. 1344-1346, 1995.

EBEL, C.; ZACCAI, G. Crowding in extremophiles: linkage between solvation and weak protein–protein interactions, stability and dynamics, provides insight into molecular adaptation. **Journal of Molecular Recognition**, v. 17, n. 5, p. 382 – 389, 2004.

EDDY, M.L.; JABLONSKI, P.E. Purification and characterization of a membrane-associated ATPase from *Natronococcus occultus*, a haloalkaliphilic archaeon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 2, p. 211 – 214, 2000.

EICHLER, J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 4, p. 261-278, 2001.

EPPLER, R.K; KOMOR, R.S.; HUYNH, J.; DORDICK, J.S.; REIMER, J.A. CLARK, D.S. Water dynamics and salt-activation of enzymes in organic media: Mechanistic implications. **PNAS**. v. 103, n. 15, p. 5706-5710, 2006.

ESTEBAN, G.F.; FINLAY, B.J. Cryptic Freshwater Ciliates in a Hypersaline Lagoon. **Protist**, v. 154, n. 3-4, p. 411-418, 2003.

FARINAS, E.T.; BULTER, T.; ARNOLD, F.H. Directed enzyme evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 545-551, 2001.

FERRER, M.; GOLYSHINA, O.V.; CHERNIKOVA, T.N.; KHACHANE, A.N.; MARTINS DOS SANTOS, V.A.P.; YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. Microbial Enzymes Mined from the Urania Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 8, p. 895 – 904, 2005.

FERRER, M.; GOLYSHINA, O.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N. Mining enzymes from extreme environments. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 207-214, 2007.

FINE, A.; IRIHIMOVITCH, V.; DAHAN, I.; KONRAD, Z.; EICHLER, J. Cloning, Expression, and Purification of Functional Sec11a and Sec11b, Type I Signal Peptidases of the Archaeon *Haloferax volcanii*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1911 – 1919, 2006.

FINN, R.D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P.C.; SAMMUT, J.S.; HOTZ, H.R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S.R.; SONNHAMMER, E.L.; BATEMAN, A. The pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v 36, D281-D288, 2008.

FISCHER, M.; PLEISS, J. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 319-321, 2003.

FOJAN, P.; JONSON, P.H.; PETERSEN, M.T.N.; PETERSEN, S.B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1033 – 1041, 2000.

FROLOW, F.; HAREL, M.; SUSSMAN, J.L.; MEVARECH, M.; SHOHAM, M. Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a

halophilic 2Fe-2S ferredoxin. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 5, p. 452-458, 1996.

GAO, R.; FENG, Y.; ISHIKAWA, K.; ISHIDA, H.; ANDO, S.; KOSUGI, Y.; CAO, S. Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaeon *Aeropyrum pernix* K1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24 -25, p. 1 – 8, 2003.

GLOSS, L.M.; TOPPING, T.B.; BINDER, A.K.; LOHMAN, J.R. Kinetic Folding of *Haloferax volcanii* and *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductases: Haloadaptation by Unfolded State Destabilization at High Ionic Strength. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 5, p. 1451 – 1462, 2008.

GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D.I.; METOZ, F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305 – 308, 1999.

GREENFIELD, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876 – 2890, 2006.

GRIGORYEV, D.N.; MA, S.F.; IRIZARRY, R.A.; YE, S.Q.; QUACKENBUSH, J.; GARCIA, J.G.N. Orthologous gene-expression profiling in multi-species models: search for candidate genes. **Genome Biology**, v. 5, n. 5, p. 1 – 13, 2004.

HALLING, P.J. Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 74-80, 2000.

HARRIS, M.N.; MADURA, J.D.; MING, L.J.; HARWOOD, V.J. Kinetic and Mechanistic Studies of Prolyl Oligopeptidase from the Hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19310 – 19317, 2001.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235 – 251, 2006.

HAYDEN, B.M.; BONETE; M.J.; BROWN; P.E.; MOIR; A.J.G.; ENGEL, P.C. Glutamate dehydrogenase of *Halobacterium salinarum*: evidence that the gene sequence currently assigned to the NADP<sup>+</sup>-dependent enzyme is in fact that of the NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, n. 1, p. 37 – 41, 2002.

HEMILÄ, H.; KOIVULA, T.T.; PALVA, I. Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1210, n. 2, p. 249 – 253, 1994.

HOFRICHTER, M.; ULLRICH, R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 71, n. 3, p. 276 – 288, 2006.

HOLM, C.; KIRCHGESSNER, T.G.; SVENSON, K.L.; LUSIS, A.J.; BELFRAGE, P.; SCHOTZ, M.C. Nucleotide sequence of rat adipose hormone sensitive lipase cDNA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 20, p. 9879, 1988.

HOLZWARTH, G.; DOTY, P. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 2, p. 218 – 228, 1965.

HUDSON, E.P.; EPPLER, R.K.; CLARK, D.S. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 637-643, 2005.

HUDDLESTON, S.; YALLOP, C.A.; CHARALAMBOUS, B.M. The identification and partial characterisation of a novel inducible extracellular thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus shibatae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 2, p. 495 – 500, 1995.

HULO, N.; BAIROCH, A.; BULLIARD, V.; CERUTTI, L.; CUCHE, B.A.; DE CASTRO, E.; LACHAIZE, C.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P.S.; SIGRIST, C.J.A. The 20 years of PROSITE. **Nucleic Acid Research**, D245 – D249, 2007.

IRIMIA, A.; EBEL, C.; MADERN, D.; RICHARD, S.B.; COSENZA, L.W.; ZACCAÏ, G.; VELLIEUX, F.M. The Oligomeric states of *Haloarcula marismortui* malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, n. 3, p. 859-873, 2003.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 53, p. 315 – 351, 1999.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JOHNSEN, U.; SCHÖNHEIT, P. Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6198 – 6207, 2004.

KAMEKURA, M. Diversity of extremely halophilic bacteria. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 289-295, 1998.

KANEHISA, M.; ARAKI, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; HIRAKAWA, M.; ITOH, M.; KATAYAMA, T.; KAWASHIMA, S.; OKUDA, S.; TOKIMATSU, T.; YAMANISHI, Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Research**, v. 36, D480 – 484, 2008.

KARCHIN, R.; CLINE, M.; MANDEL-GUTFREUND, Y.; KARPLUS, K. Hidden Markov models that use predicted local structure for fold recognition: alphabets of backbone geometry. **Proteins**, v. 51, n. 4, p. 504 – 514, 2003.

KARCHIN, R.; CLINE, M.; KARPLUS, K. Evaluation of local structure alphabets based on residue burial. **Proteins**, v. 55, n. 3, p. 508 – 518, 2004.

KARPLUS, K.; KARCHIN, R.; BARRETT, C.; TU, S.; CLINE, M.; DIEKHANS, M.; GRATE, L.; CASPER, J.; HUGHEY, R. What is the value added by human intervention in protein structure prediction? **Proteins**, v. 5, p. 86 – 91, 2001.

KARPLUS, K.; KARCHIN, R.; DRAPER, J.; CASPER, J.; MANDEL-GUTFREUND, Y.; DIEKHANS, M.; HUGHEY, R. Combining local-structure, fold-recognition, and new fold methods for protein structure prediction. **Proteins**, v. 53, n. 6, p. 491 – 496, 2003.

KARPLUS, K.; KATZMAN, S.; SHACKLEFORD, G.; KOEVA, M.; DRAPER, J.; BARNES, B.; SORIANO, M.; HUGHEY R. SAM-T04: what is new in protein-structure prediction for CASP6. **Proteins**, v. 61, n. 7, p. 135 - 42, 2005.

KHEIROLOMOOM, A.; KHORASHEH, F.; FAZELINIA, H. Influence of external mass transfer limitation on apparent kinetic parameters of penicillin G acylase immobilized on nonporous ultrafine silica particles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 125-129, 2002.

KIM, J.; DORDICK, J.S. Unusual Salt and Solvent Dependence of a Protease from an Extreme Halophile. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 3, p. 471 - 479, 1997.

KIM, S.; LEE, S.B. Thermostable esterase from a thermoacidophilic archaeon: purification and characterization for enzymatic resolution of a chiral compound. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 11, p. 2289 – 2298, 2004.

KLAPPER, I.; HAGSTROM, R.; FINE, R.; SHARP, K.; HONIG, B. Focusing of electric fields in the active site of Cu-Zn superoxide dismutase: effects of ionic strength and amino-acid modification. **Proteins**, v. 1, n. 1, p. 47-59, 1986.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic chemistry. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 241-246, 2001.

KOGEJ, T.; WHEELER, M.H.; RIŽNER, T.L.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 203-209, 2004.

KOONIN, E.V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 309 – 338, 2005.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; de LIMA, V.M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. v. 60, n. 1, p. 2256-68, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680 685, 1970.

LANGIN, D.; LAURELL, H.; HOLST, L.S.; BELFRAGE, P.; HOLM,C. Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. **PNAS**, v. 90, n. 11, p. 4897-4901, 1993.

LANYI, J.K. Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 38, n. 3, p. 272 – 290, 1974.

LANYI, J.K.; STEVENSON, J. Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase. **Journal of Bacteriology**, v. 98, n. 2, p. 611-616, 1969.

LIU, J.; ROST, B. NORSp: Predictions of long regions without regular secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3833 – 3835, 2003.

LUETZ, S.; GIVER, L.; LALONDE, J. Engineered Enzymes for Chemical Production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 647 - 653, 2008.

MADERN, D.; PFISTER, C.; ZACCAI, G. Mutation at a Single Acidic Amino Acid Enhances the Halophilic Behaviour of Malate Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui* in Physiological Salts. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 3, p. 1088-1095, 1995.

MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles**, v. 4, n. 2, p. 91–98, 2000.

MADERN, D.; ZACCAI, G. Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter rubber* behaves like a non-halophilic protein. **Biochimie**, v. 86, n. 4 – 5, p. 295–303, 2004.

MANCO, G.; GIOSUÈ, E.; D'AURIA, S.; HERMAN, P.; CARREA, G.; ROSSI, M. Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 182-192, 2000.

MANDRICH, L.; MERONE, L.; PEZZULLO, M.; CIPOLLA, L.; NICOTRA, F.; ROSSI M.; MANCO G. Role of the N Terminus in Enzyme Activity, Stability and Specificity in Thermophilic Esterases Belonging to the HSL Family. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, n. 3, p. 501 – 512, 2005.

MARHUENDA-EGEA, F.C.; PIERA-VELÁZQUEZ, S.; CADENAS, C.; CADENAS, E. Enzymatic activity of an extremely halophilic phosphatase from the Archaea *Halobacterium salinarum* in reversed micelles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 6, p. 555–563, 2000.

MARTÍNEZ-ESPINOSA, R.M.; RICHARDSON, D.J.; BUTT, J.N.; BONETE, M.J. Spectropotentiometric properties and salt-dependent thermotolerance of a [2Fe-2S]

ferredoxin-involved nitrate assimilation in *Haloferax mediterranei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 1, p. 50 – 55, 2007.

MIROUX, B.; WALKER, J.E. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 3, p. 289 – 298, 1996.

MITSUOKA, K.; HIRAI, T.; MURATA, K.; MIYAZAWA, A.; KIDERA, A.; KIMURA, Y.; FUJIYOSHI, Y. The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 3, p. 861-882, 1999.

OESTERHELT, D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 4, p. 489-500, 1998.

OLLIS, D.L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG J. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197 - 211, 1992.

OREN, A.; GINZBURG, M.; GINZBURG, B.Z.; HOCHSTEIN, L.I.; VOLCANI, B.E. *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. **International Journal of Systematic Biology**, v. 40, n. 2, p. 209-210, 1990.

OREN, A. The ecology of the extremely halophilic archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 415-439, 1994.

OREN, A.; VENTOSA, A. Benjamin Elazari Volcani (1915–1999): Sixty–three years of studies of the microbiology of the Dead Sea. **International Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 195-198, 1999.

OREN, A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2002.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, v. 4, n. 2, p. 1-13, 2008.

ØSTERLUND, T. Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 7, p. 1899 – 1907, 2001.

PAŠIĆ, L.; BARTUAL, S.G.; ULRIH, N.P.; GRABNAR, M.; VELIKONJA, B. H. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 491-498, 2005.

PETERSEN, M.T.N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S.B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 115 – 147, 2001.

PIEPER, U.; KAPADIA, G.; MEVARECH, M.; HERZBERG, O. Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. **Structure**, v. 15, n. 6, p. 75-88, 1998.

PIERA-VELÁZQUEZ, S.; MARHUENDA-EGEA, F.C.; CADENAS, E. The dependence of a halophilic malate dehydrogenase on  $w_0$  and surfactant concentration in reverse micelles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, n. 1-3, p. 49–55, 2001.

PIRE, C.; ESCLAPEZ, J.; FERRER, J.; BONETE, M.J. Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, n. 2, p. 221 – 227, 2001.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1 – 2, p. 67 – 80, 1998.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; PEIKER, M.; THIELE, C.; SCHMID, R.D. Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **Journal of Molecular Catalytic: B Enzymatic**, v. 10, n. 5, p. 491-508, 2000.

POLGÁR, L. Structural Relationship Between Lipases and Peptidases of the Prolyl Oligopeptidase Family. **FEBS Letters**, v. 311, n. 3, p. 281-284, 1992.

PREMKUMAR, L.; GREENBLATT, H.M.; BAGESHWAR, U.K.; SAVCHENKO, T.; GOKHMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; ZAMIR, A. Three-dimensional structure of a halotolerant algal carbonic anhydrase predicts halotolerance of a mammalian homolog. **PNAS**, v. 102, n. 21, p. 7493 – 7498, 2005.

RATHBONE, D.A.; HOLT, P.J.; LOWE, C.R.; BRUCE, N.C. Molecular analysis of the *Rhodococcus* sp. strain H1 her gene and characterization of its product, a heroin esterase, expressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 2062 – 2066, 1997.

REA, D.; FÜLÖP, V. Structure–Function Properties of Prolyl Oligopeptidase Family Enzymes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, n. 3, p. 349 – 365, 2006.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2008. (No prelo).

ROCCHIA, W.; ALEXOV, E.; HONIG, B. Extending the applicability of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation: Multiple dielectric constants and multivalent ions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 28, p. 6507-6514, 2001.

ROUSSEL, A.; CABBILLAU, C. Turbo Frodo. In: **Silicon Graphics Geometry Partners Directory**. Silicon Graphics Mountain View (Ed.) EUA, 1991.

ROY, I.; GUPTA, M.N. Preparation of highly active  $\alpha$ -chymotrypsin for catalysis in organic media. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 9, p. 2191 – 2193, 2004.

RYU, K.; KIM, J.; DORDICK, J.S. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 266-275, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULDON, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **PNAS**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SATO, Y.; NAKAYA, A.; SHIRAISHI, K.; KAWASHIMA, S.; GOTO, S.; KANEHISA M. SSDB: Sequence Similarity Database in KEGG. **Genome Informatics**, v. 12, n. 1, p. 230 – 231, 2001.

SATO, H.; FRANK, D.W.; HILLARD, C.J.; FEIX, J.B.; PANKHANIYA, R.R.; MORIYAMA, K.; FINCK-BARBANÇON, V.; BUCHAKLIAN, A.; LEI, M.; LONG, R.M.; WIENER-KRONISH, J.; SAWA, T. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 12, p. 2959 – 2969, 2003.

SCHMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 258-268, 2001.

SCHOEMAKER, H.E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M.G. Dispelling the Myths—Biocatalysis in Industrial Synthesis. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1694-1697, 2003.

SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 85 – 107, 1997.

SELLEK, G.A.; CHAUDHURI, J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 6, p. 471-482, 1999.

SEHGAL, A.C.; CALLEN, W.; MATHUR, E.J.; SHORT, J.M.; KELLY, R.M. Carboxylesterase from *Sulfolobus solfataricus* P1. **Methods in Enzymology**, v. 330, p. 461 – 471, 2001.

SHI, W.; TANG, X.F.; HUANG, Y.; GAN, F.; TANG, B.; SHEN, P. An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization. **Extremophiles**, v. 10, n. 6, p. 599 – 606, 2006.

SIGRIST, C.J.A.; CERUTTI, L.; HULO, N.; GATTIKER, A.; FALQUET, L.; PAGNI, M.; BAIROCH, A.; BUCHER, P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 3, n. 3, p. 265-274, 2002.

SIMON, L.M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K.; SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 1-2, p. 41 – 45, 1998.

SIVAKUMAR, N.; LI, N.; TANG, J.W.; PATEL, B.K.; SWAMINATHAN, K. Crystal structure of AmyA lacks acidic surface and provide insights into protein stability at poly-extreme condition. **FEBS Letters**, v. 580, n. 11, p. 2646-2652, 2006.

STEELE, H.L.; JAEGER, K.E.; DANIEL, R.; STREIT, W.R. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25-37, 2009.

STEPANOV, V.M.; RUDENSKAYA, G.N.; REVINA, L.P.; GRYAZNOVA, Y.B.; LYSOGORSKAYA, E.N.; FILIPPOVA, I.Y.; IVANOVA, I.I. A serine proteinase of an

archaebacterium, *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisins. **Biochemical Journal**, v. 285, n. 1, p. 281-286, 1992.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113 – 130, 1986.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, n. 2, p. 223 – 238, 2000.

TEHEI, M.; MADERN, D.; PFISTER, C.; ZACCAI, G. Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. **PNAS**, v. 98, n. 25, p. 14356 – 14361, 2001.

TOMPA, P. Intrinsically unstructured proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 527 – 533, 2002.

VAN GUNSTEREN, W.F.; HÜNENBERGER, P.H.; MARK, A.E.; SMITH, P.E.; TIRONI, I.G. Computer simulation of protein motion. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1-3, p. 305 – 319, 1995.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32 – 38, 1997.

VIDYASAGAR, M.; PRAKASH, S.; LITCHFIELD, C.; SREERAMULU, K. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. **Archaea**, v. 2, n. 1, p. 51 – 57, 2006.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515 – 536, 2007.

VINCENTELLI, R.; CANNAN, S.; OFFANT, J.; CAMBILLAU, C.; BIGNON, C. Automated expression and solubility screening of His-tagged proteins in 96-well format. **Analytical Biochemistry**, v. 346, n. 1, p. 77-84, 2005.

VON HEIJNE, G. MEMBRANE PROTEINS: From Sequence to Structure. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 23, p. 167 - 192, 1994.

VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. **Journal of Molecular Graphics**, v. 8, n. 1, p. 52 – 56, 1990.

WAGNER, S., KLEPSCH, M.M.; SCHLEGEL, S.; APPEL, A.; DRAHEIM, R.; TARRY, M.; HÖGBOM, M.; VAN WIJK, K.J.; SLOTBOOM, D.J.; PERSSON, J.O.; DE GIER, J.W. Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. **PNAS**, v. 105, n. 38, p. 14371 – 14376, 2008.

WALSH, C. Enabling the chemistry of life. **Nature**, v. 409, n. 6839, p. 226-231, 2001.

WALSBY, A.E. Gas Vesicles. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 94 – 144, 1994.

WANG, Q.; YANG, G.; LIU, Y.; FENG, Y. Discrimination of Esterase and Peptidase Activities of Acylaminoacyl Peptidase from Hyperthermophilic *Aeropyrum pernix* K1 by a Single Mutation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18618 – 18625, 2006.

WEI, Y.; CONTRERAS, J.A.; SHEFFIELD, P.; OSTERLUND, T.; DEREWENDA, U.; KNEUSEL, R.E.; MATERN, U.; HOLM, C.; DEREWENDA, Z.S. Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormonesensitive lipase. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 4, p. 340 – 345, 1999.

WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392 – 400, 2008.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.R. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **PNAS**, v. 87, n. 12, p. 4576 - 4579, 1990.

WOHLLEBEN, W.; ARNOLD, W.; BROER, I.; HILLEMANN, D.; STRAUCH, E.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. **Gene**, v. 70, n. 1, p. 25-37, 1988.

YAMADA, Y.; FUJIWARA, T.; SATO, T.; IGARASHI, N.; TANAKA, N. The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 691-695, 2002.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. **Science**, v. 224, n. 4654, p. 1249-1251, 1984.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 7, p. 3194-3201, 1988.

ZHU, X.; LARSEN, N.A.; BASRAN, A.; BRUCE, N.C.; WILSON, I.A. Observation of an Arsenic Adduct in an Acetyl Esterase Crystal Structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, 2008 – 2014, 2003.