

UNICAMP

Clonagem e Expressão do Gene EPH1 (epóxido hidrolase) de *Rhodotorula glutinis* em *Pichia pastoris*



Raquel R. Rampasio e Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira

LabiComb – Departamento de Química Orgânica

Instituto de Química - UNICAMP

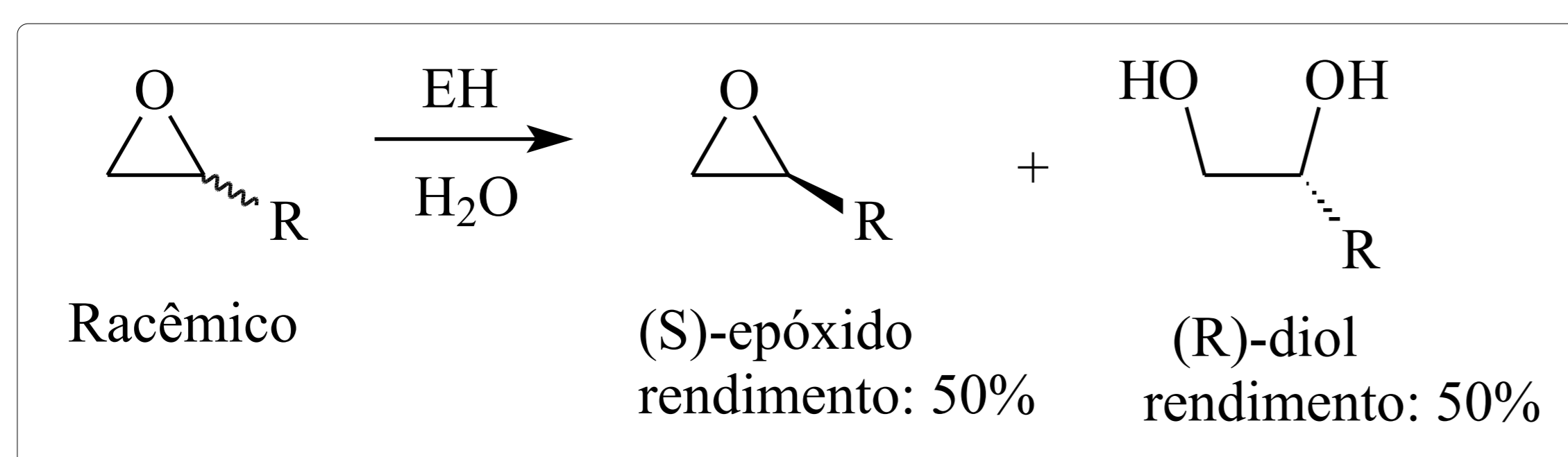
E-mail: raqrampasio@iqm.unicamp.br

Palavras-Chave: Epóxido hidrolase - *Rhodotorula glutinis* - *Pichia pastoris*

Introdução

A demanda pela obtenção de compostos enantiomericamente puros, por indústrias químicas e farmacêuticas, tem aumentado extraordinariamente e promovido uma rápida expansão do mercado mundial para a produção de compostos quirais finos. Os requerimentos para a síntese de compostos opticamente ativos podem ser alcançados via catálise química assimétrica utilizando, por exemplo, biocatálise com a aplicação de enzimas.

Neste contexto, destacam-se as epóxido hidrolases, enzimas que agem sobre uma grande variedade de epóxidos convertendo-os aos respectivos dióis (Esquema 1), podendo levar a formação de dióis quirais (enantioméricos e diastereoisoméricos), os quais constituem blocos de construção de elevada importância na síntese de inúmeras moléculas bioativas.



Esquema 1. Resolução de um epóxido pela ação de uma epóxido hidrolase.

A epóxido hidrolase de *Rhodotorula glutinis* (Figura 1) é conhecida por hidrolisar uma ampla variedade de substratos entre eles epóxidos arílicos, alicíclicos e alifáticos. Devido ao grande potencial desta EPH frente à possibilidade de aplicação em processos biotecnológicos, na busca por novos catalisadores enantio- e diastereosseletivos, o gene de EPH1 de *R. glutinis* foi selecionado no presente trabalho para amplificação, clonagem e expressão.

Metodologia

Como o gene EPH1 no DNA genômico contém introns, a reconstrução na levedura recombinante envolve uma reação de PCR via a enzima transcriptase reversa, que reconstrói o fragmento de DNA dupla fita a partir do mRNA.

Após o isolamento e quantificação do RNA total, o cDNA deve ser sintetizado por uma reação de PCR utilizando uma transcriptase reversa, a qual foi realizada utilizando-se duas condições: primeiramente, foi seguido o protocolo utilizando um método mais específico que usa oligo(dT) para hibridizar os fragmentos poli(A) presentes em grande parte dos mRNA de eucariotos nas extremidades 3'.

O outro protocolo utilizado baseia-se na utilização de *primers* não específicos (*random hexamers*) que são bastante utilizados quando um mRNA é difícil de ser copiado integralmente. Por este método, todos os moldes de RNA podem ser utilizados para a síntese da fita simples e a especificidade é conferida na reação em cadeia da polimerase pela interação específica dos *primers*.

A “biblioteca” de cDNA é utilizada para amplificar o gene EPH1 por PCR empregando *primers* específicos para amplificar a seqüência de interesse. Para determinar as temperaturas adequadas de anelamento as reações foram realizadas em um termociclador gradiente com temperaturas entre 55 e 65 °C. Após a reação em cadeia da polimerase, é feita a eletroforese em gel de agarose para avaliar a formação do DNA dupla fita.

Resultados

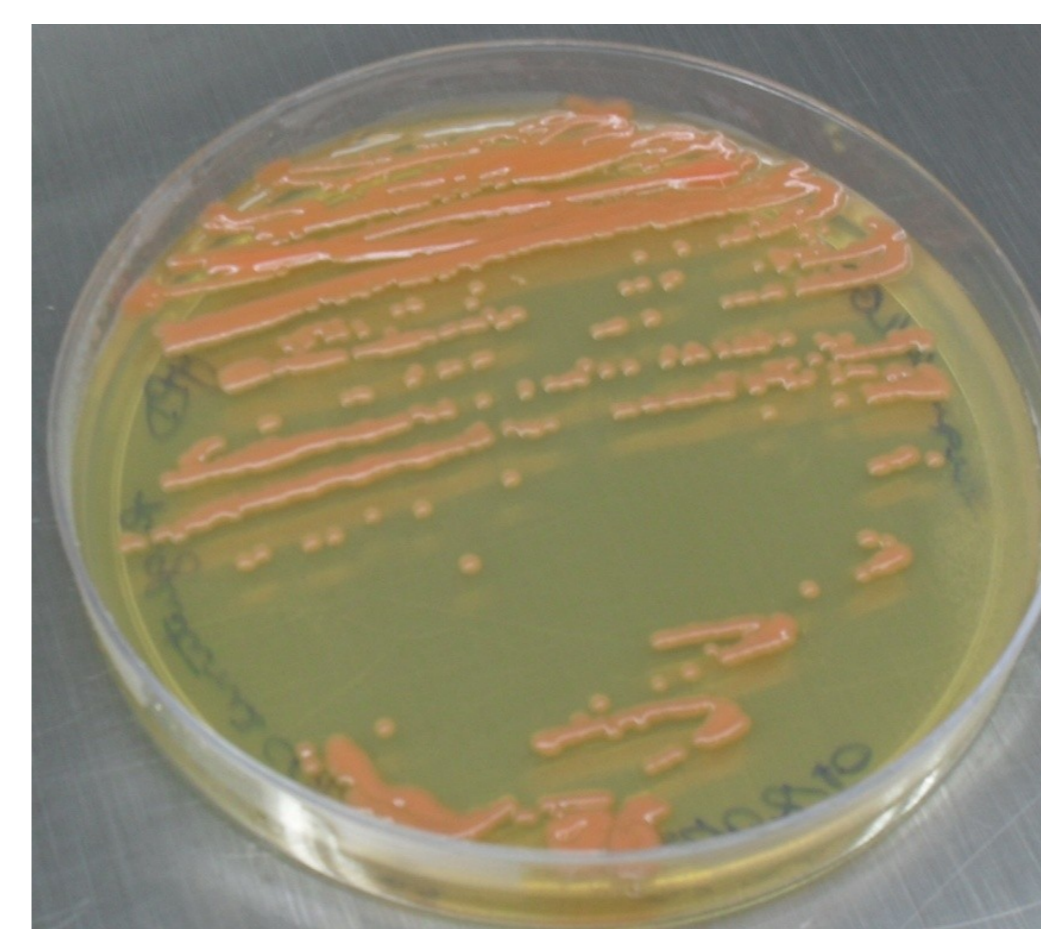


Figura 1. Aspecto das colônias de *Rhodotorula glutinis*.

Amostra	Concentração (ng/μL)
1	20
2	4
3	10

Tabela 1. Concentração do RNA total extraído de *R. glutinis*.

Após a fotodocumentação do gel analítico, verificamos que não foi possível amplificar o gene EPH1 nas condições testadas.

Novas abordagens para efetuar esta reação, como, por exemplo, modificar o gradiente de temperatura para cobrir uma faixa maior de temperaturas, adicionar DMSO ao PCR para diminuir a temperatura de anelamento dos *primers*, dentre outras, estão sendo testadas.

Conclusões

Apesar de ainda não ter sido possível a obtenção do gene EPH1, o projeto possibilitou um importante passo no estudo para atingirmos as melhores condições para a extração de RNA, para a obtenção de cDNA e para a realização do PCR.

Referências Bibliográficas

- Weijers, C. A. G. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 839.
 Weijers, C. A. G. M. *Biotechnol. Lett.* **1998**, 20, 421.
 Kronenburg, N. A. E.; Mutter, M.; Viser, H.; de Bont, J. A. M.; Weijers, C. A. G. M. *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 519.
 Visser, H.; Vreugdenhil, S.; de Bont, J. A. M.; Verdoes, J. C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 53, 415.

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPq
PRP



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico