



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0115877-5 B1

(22) Data do Depósito: 20/11/2001

(45) Data de Concessão: 10/10/2017



(54) Título: ESCHERICHIA COLI TRANSGÊNICAS, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO E PROCESSO PARA FABRICAÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIONICO

(51) Int.Cl.: C12N 9/10; C12N 9/14; C12N 1/20; C12N 15/00; C07H 21/04

(30) Prioridade Unionista: 07/09/2001 US 60/317,845, 20/04/2001 US 60/285,478, 20/07/2001 US 60/306,727, 20/11/2000 US 60/252,123

(73) Titular(es): CARGILL, INCORPORATED

(72) Inventor(es): RAVI R. GOKARN; OLGA V. SELIFONOVA; HOLLY JESSEN; STEVEN J. GORT; THORSTEN SELMER; WOLFGANG BUCKEL

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ESCHERICHIA COLI TRANSGÊNICAS, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO E PROCESSO PARA FABRICAÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO"**.

Campo da Invenção

5 A invenção refere-se a enzimas e processos que podem ser usados para produção de ácidos orgânicos e produtos relacionados.

Referência Cruzada a Pedidos de Patente Relacionados

 Este pedido de patente reivindica prioridade a partir dos seguintes pedidos de patentes provisórios US, que são aqui incorporados por referência: pedido de patente provisório US Nº DE SÉRIE 60/252 123, depositado em 20 de novembro de 2000; pedido de patente provisório US Nº DE SÉRIE 60/285 478, depositado em 20 de abril de 2001; pedido de patente provisório US Nº DE SÉRIE 60/306 727, depositado em 20 de julho de 2001; e pedido de patente provisório US Nº DE SÉRIE 60/317 845, depositado em 15 7 de setembro de 2001.

Fundamento

 Compostos químicos orgânicos tais como ácidos orgânicos, ésteres, e polióis podem ser usados para síntese de materiais plásticos e outros produtos. Para satisfazer a crescente demanda por compostos químicos orgânicos, processos de produção mais eficientes e de custo mais eficaz 20 estão sendo desenvolvidos os quais utilizam materiais brutos baseados em carboidratos antes que hidrocarbonetos. Por exemplo, certas bactérias têm sido usadas para produção de grandes quantidades de ácido láctico usado na produção de ácido poli láctico.

25 Ácido 3-hidróxi propiônico (3-HP) é um ácido orgânico. Embora várias rotas de síntese química tenham sido descritas para produção de 3-HP, somente uma rota biocatalítica foi anteriormente mostrada (WO01/16346 para Suthers, et al.). 3-HP tem utilidade para síntese de especialidades e pode ser convertido a intermediários comercialmente importantes através de técnicas conhecidas na indústria química, por exemplo, ácido 30 acrílico por desidratação, ácido malônico por oxidação, ésteres por reações de esterificação com álcoois, e redução a 1,3-propanodiol.

Sumário

A invenção refere-se a processos e materiais envolvidos em produção de ácido 3-hidróxi propiônico e outros compostos orgânicos (por exemplo, 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, ésteres de 3-HP, e ácido malônico e seus ésteres). Especificamente, a invenção provê moléculas de ácido nucléico, polipeptídeos, células hospedeiras, e processos que podem ser usados para produção de 3-HP e outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, ésteres de 3-HP, e ácido malônico e seus ésteres. 3-HP tem potencial para ser ambos, biológica e comercialmente importante. Por exemplo, a indústria nutricional pode usar 3-HP como um alimento, aditivo de alimentação ou conservante, enquanto os derivados mencionados acima podem ser produzidos a partir de 3-HP. As moléculas de ácido nucléico aqui descritas podem ser usadas para engenheirar células hospedeiras com a habilidade de produzir 3-HP assim como outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, e ésteres de 3-HP. Os polipeptídeos aqui descritos podem ser usados em sistemas livres de células para obtenção de 3-HP assim como outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, e ésteres de 3-HP. As células hospedeiras aqui descritas podem ser usadas em sistemas de cultura para produção de grandes quantidades de 3-HP assim como outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, e ésteres de 3-HP.

Um aspecto da invenção provê células que têm atividade lactil-CoA desidratase e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase, e processos de fabricação de produtos tais como aqueles aqui descritos através de cultura de pelo menos uma das células que têm atividade lactil-CoA desidratase e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Em algumas modalidades, a célula também pode conter uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um ou mais dos seguintes polipeptídeos: um polipeptídeo

tendo atividade ativador E1; um α polipeptídeo E2 que é uma subunidade de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase; e β polipeptídeo E2 que é uma subunidade de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase; e um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Adicionalmente, a célula pode ter atividade CoA transferase, atividade CoA sintetase, atividade poli hidróxi ácido sintase, atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase, atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase, e /ou atividade lipase. Além disso, a célula pode conter pelo menos uma molécula de ácido nucléico exógeno que expressa um ou mais polipeptídeos que têm atividade CoA transferase, atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase, atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase, atividade CoA sintetase, atividade poli hidróxi ácido sintase, e/ou atividade lipase.

Em uma outra modalidade da invenção, a célula que tem atividade lactil-CoA desidratase e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase produz um produto, por exemplo, 3-HP, 3-HP polimerizado, e/ou um éster de 3-HP, tal como hidróxi propionato de metila, hidróxi propionato de etila, hidróxi propionato de propila, e/ou hidróxi propionato de butila. Da mesma maneira, a invenção também provê processos para produção de um ou mais destes produtos. Estes processos envolvem cultura de célula que tem atividade lactil-CoA desidratase e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase sob condições que permitem que o produto seja produzido. Estas células também podem ter atividade CoA sintetase e/ou atividade poli hidróxi ácido sintase.

Um outro aspecto da invenção provê células que têm atividade CoA sintetase, atividade lactil-CoA desidratase, e atividade poli hidróxi ácido sintase. Em algumas modalidades, estas células também podem conter uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um ou mais dos seguintes polipeptídeos: um polipeptídeo tendo atividade ativadora E1; um α polipeptídeo E2 que é uma subunidade de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase; um β polipeptídeo E2 que é uma subunidade de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase; um polipeptídeo tendo atividade CoA sintetase; e um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase.

Em uma outra modalidade da invenção, a célula que tem atividade CoA sintetase, atividade lactil-CoA desidratase, e atividade poli hidróxi ácido sintase pode produzir um produto, por exemplo, acrilato polimerizado.

Um outro aspecto da invenção provê uma célula compreendendo
5 do atividade CoA transferase, atividade lactil-CoA desidratase, e atividade lipase. Em algumas modalidades, a célula também pode conter uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um ou mais dos seguintes polipeptídeos: um polipeptídeo tendo uma atividade CoA transferase; um polipeptídeo tendo atividade ativador E1; um alfa polipeptídeo E2 que é uma
10 subunidade de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase; um beta polipeptídeo E2 que é uma subunidade de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase; e um polipeptídeo tendo atividade lipase. Esta célula pode ser usada, entre outras coisas, para produção de produtos tais como ésteres de acrilato (por exemplo, acrilato de metila, acrilato de etila, acrilato de propila, e acrilato de butila).
15

Em algumas modalidades, 1,3-propanodiol pode ser criado tanto a partir de 3-HP-CoA ou 3-HP via o uso de polipeptídeos tendo atividade enzimática. Estes polipeptídeos podem ser usados in vitro ou in vivo. Quando convertendo 3-HP-CoA a 1,3-propanodiol, polipeptídeos tendo atividade
20 óxido redutase ou atividade redutase (por exemplo, enzimas da classe 1.1.1 de enzimas) podem ser usados. Alternativamente, quando criando 1,3-propanodiol a partir de 3-HP, uma combinação de (1) um polipeptídeo tendo atividade aldeído desidrogenase (por exemplo, uma enzima da classe 1.1.1.34) e (2) um polipeptídeo tendo atividade álcool desidrogenase (por
25 exemplo, uma enzima da classe 1.1.1.32) pode ser usada.

Em algumas modalidades da invenção, produtos são produzidos in vitro (fora de uma célula). Em outras modalidades da invenção, produtos são produzidos usando-se uma combinação de processos in vitro e in vivo (dentro de uma célula). Ainda em outras modalidades da invenção, produtos
30 são produzidos in vivo. Para processos envolvendo etapas in vivo, as células podem ser células cultivadas isoladas ou organismos inteiros tais como plantas transgênicas, mamíferos não-humanos, ou organismos de célula

simples tais como levedura e bactérias (por exemplo, células de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus* e *Escherichia*). Daqui por diante tais células são referidas como células de produção. Produtos produzidos através destas células de produção podem ser produtos orgânicos tal como 3-HP e/ou as

5 moléculas de ácido nucléico e polipeptídeos aqui descritos.

Um outro aspecto da invenção provê polipeptídeos tendo uma seqüência de aminoácidos que (1) é mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161, (2) é pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos de uma seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26,

10 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161, (3) tem pelo menos 65 por cento de identidade de seqüência com pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos de uma seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161, (4) é uma seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 41, 141, 160 ou 161 tendo substituições de aminoácidos conser-

15 vativas, ou (5) tem pelo menos 65 por cento de identidade de seqüência com uma seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Da mesma maneira, a invenção também provê seqüências de ácidos nucléicos que codificam quaisquer dos polipeptídeos aqui descritos assim como específicos agentes ligantes que se ligam a quaisquer dos poli-

20 peptídeos aqui descritos. Da mesma maneira, a invenção provê células transformadas que contêm quaisquer das seqüências de ácidos nucléicos que codificam quaisquer dos polipeptídeos aqui descritos. Estas células podem ser usadas para produção de moléculas de ácido nucléico, polipeptídeos, e compostos orgânicos. Os polipeptídeos podem ser usados para ca-

25 talisar a formação de compostos orgânicos ou podem ser usados como antígenos para criação de específicos agentes ligantes.

Ainda em uma outra modalidade, a invenção provê moléculas de ácido nucléico isoladas que contêm pelo menos uma das seguintes seqüências de ácidos nucléicos: (1) uma seqüência de ácidos nucléicos como mos-

30 trada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163; (2) uma seqüência de ácidos nucléicos tendo pelo menos 10 nucleotídeos consecutivos a partir de uma seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1,

9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163; (3) uma sequência de ácidos nucleicos que hibridiza sob condições de hibridização (por exemplo, condições de hibridização moderadamente a altamente rigorosas) a uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163; (4) uma sequência de ácidos nucleicos tendo 65 por cento de identidade de sequência com pelo menos 10 nucleotídeos consecutivos a partir de uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163; e (5) uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos 65 por cento de identidade de sequência com uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Da mesma maneira, a invenção também provê uma célula de produção que contém pelo menos um ácido nucleico exógeno tendo qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos providas acima. A célula de produção pode ser usada para expressar polipeptídeos que têm uma atividade enzimática tal como atividade CoA transferase, atividade lactil-CoA desidratase, atividade CoA sintase, atividade desidratase, atividade desidrogenase, atividade malonil CoA redutase, atividade beta alanina amônio liase, e/ou atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Da mesma maneira, a invenção também provê processos de produção de polipeptídeos codificados pelas sequências de ácidos nucleicos descritas acima.

A invenção também provê vários processos tais como processos para fabricação de 3-HP a partir de lactato, fosfo enol piruvato (PEP), ou piruvato. Em algumas modalidades, processos para fabricação de 3-HP a partir de lactato, PEP, ou piruvato envolvem cultura de uma célula contendo pelo menos um ácido nucleico exógeno sob condições que permitem a célula produzir 3-HP. Estes processos podem ser praticados usando-se os vários tipos de células de produção aqui descritos. Em algumas modalidades, as células de produção podem ter uma ou mais das seguintes atividades: atividade CoA transferase, atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase, atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase, atividade desidratase, e/ou atividade malonil CoA redutase.

Em outras modalidades, os processos envolvem fabricação de 3-HP onde lactato é contactado com um primeiro polipeptídeo tendo atividade de CoA transferase ou atividade CoA sintetase de modo que lactil-CoA é formado, então contactando lactil-CoA com um segundo polipeptídeo tendo
5 atividade lactil-CoA desidratase para formar acrilil-CoA, então contactando acrilil-CoA com um terceiro polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase para formar ácido 3-hidróxi propiônico-CoA, e então contactando ácido 3-hidróxi propiônico-CoA com o primeiro polipeptídeo para formar 3-HP ou com um quarto polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propi-
10 onil-CoA hidrolase ou atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase para formar 3-HP.

Um outro aspecto da invenção provê processos para fabricação de 3-HP polimerizado. Estes processos envolvem fabricação de ácido 3-hidróxi propiônico-CoA como descrito acima, e então contactam de ácido 3-
15 hidróxi propiônico-CoA com um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase para formar 3-HP polimerizado.

Ainda em uma outra modalidade da invenção, processos para fabricação de um éster de 3-HP são providos. Estes processos envolvem fabricação de 3-HP como descrito acima, e então adicionalmente contactan-
20 do 3-HP com um quinto polipeptídeo tendo atividade lipase para formar um éster.

A invenção também provê processos para fabricação de acrilato polimerizado. Estes processos envolvem cultura de uma célula que tem ambas, atividade CoA sintetase, atividade lactil-CoA desidratase, e atividade
25 poli hidróxi ácido sintase de modo que acrilato polimerizado seja fabricado. Da mesma maneira, a invenção também provê processos de fabricação de acrilato polimerizado onde lactato é contactado com um primeiro polipeptídeo tendo atividade CoA sintetase para formar lactil-CoA, então contactando lactil-CoA com um segundo polipeptídeo tendo atividade lactil-CoA desidra-
30 tase para formar acrilil-CoA, e então contactando acrilil-CoA com um terceiro polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase para formar acrilato polimerizado.

A invenção também provê processos de fabricação de um éster de acrilato. Estes processos envolvem cultura de uma célula que tem atividade CoA transferase, atividade lipase, e atividade lactil-CoA desidratase sob condições que permitem a célula produzir um éster.

5 Em uma outra modalidade, a invenção provê processos para fabricação de um éster de acrilato, onde acrilil-CoA é formada como descrito acima, e então acrilil-CoA é contactada com um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase para formar acrilato, e acrilato é contactado com um polipeptídeo tendo atividade lipase para formar o éster.

10 A invenção também provê processos para fabricação de 3-HP. Estes processos envolvem cultura de uma célula contendo pelo menos um ácido nucléico exógeno que codifica pelo menos um polipeptídeo de modo que 3-HP é produzido a partir de acetil-CoA ou malonil-CoA.

 Modalidades alternativas provêm processos de fabricação de 3-
15 HP, onde acetil-CoA é contactada com um primeiro polipeptídeo tendo atividade acetil-CoA carboxilase para formar malonil-CoA, e malonil-CoA é contactada com um segundo polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase para formar 3-HP.

 Em outras modalidades, malonil-CoA pode ser contactada com
20 um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase de modo que 3-HP possa ser produzido.

 Em uma outra modalidade, a invenção provê um processo para fabricação de 3-HP que usa um intermediário beta-alanina. Este processo pode ser realizado através de contato de beta alanina CoA com um primeiro
25 polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônio liase (tal como um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 160 ou 161) para formar acrilil-CoA, contactando acrilil-CoA com um segundo polipeptídeo tendo atividade 3-HP-CoA desidratase para formar 3-HP-CoA, e contactando 3-HP-CoA com um terceiro polipeptídeo tendo atividade gluta-
30 mato desidrogenase para fabricar 3-HP.

 A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendi-

do por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Embora processos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou testes da presente invenção, processos e materiais apropriados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, controlará. Em adição, os materiais, processos, e exemplos são somente ilustrativos e não-pretendidos serem limitantes.

10 Outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada, e das reivindicações.

Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é um diagrama em um caminho para fabricação de 3-HP.

15 A Figura 2 é um diagrama em um caminho para fabricação de 3-HP polimerizado.

A Figura 3 é um diagrama em um caminho para fabricação de ésteres de 3-HP.

20 A Figura 4 é um diagrama em um caminho para fabricação de ácido acrílico polimerizado.

A Figura 5 é um diagrama em um caminho para fabricação de ésteres de acrilato.

25 A Figura 6 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase (SEQ ID NO: 1).

A Figura 7 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase (SEQ ID NO: 2).

A Figura 8 é um alinhamento das seqüências de ácidos nucléicos mostradas em SEQ ID Nos: 1, 3, 4 e 5.

30 A Figura 9 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID Nos: 2, 6, 7, e 8.

A Figura 10 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléi-

cos que codifica um polipeptídeo tendo atividade ativador E1. (SEQ ID NO: 9).

A Figura 11 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade ativador E1 (SEQ ID NO: 10).

5 A Figura 12 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID Nos: 9, 11, 12 e 13.

A Figura 13 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID Nos: 10, 14, 15 e 16.

10 A Figura 14 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma subunidade alfa E2 de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase (SEQ ID NO: 17).

A Figura 15 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de uma subunidade alfa E2 de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase (SEQ ID NO: 18).

15 A Figura 16 é um alinhamento das seqüências de ácidos nucléicos mostradas em SEQ ID Nos: 17, 19, 20 e 21.

A Figura 17 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID Nos: 18, 22, 23, e 24.

20 A Figura 18 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma subunidade beta E2 de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase (SEQ ID NO: 25). A "G" na posição 443 pode ser uma "A"; e a "A" na posição 571 pode ser uma "G".

25 A Figura 19 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de uma subunidade beta E2 de uma enzima tendo atividade lactil-CoA desidratase (SEQ ID NO: 26).

A Figura 20 é um alinhamento das seqüências de ácidos nucléicos mostradas em SEQ ID Nos: 25, 27, 28, e 29.

A Figura 21 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID Nos: 26, 30, 31 e 32.

30 A Figura 22 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos de DNA genômico de *Megasphaera elsdenii* (SEQ ID NO: 33).

A Figura 23 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléi-

cos que codifica um polipeptídeo de *Megasphaera elsdenii* (SEQ ID NO: 34).

A Figura 24 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo de *Megasphaera elsdenii* (SEQ ID NO: 35).

5 A Figura 25 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática (SEQ ID NO: 36).

A Figura 26 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade enzimática (SEQ ID NO: 37).

10 A Figura 27 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que contém seqüência não-codificante assim como codificante de um polipeptídeo tendo atividade CoA sintase, desidratase, e desidrogenase (SEQ ID NO: 38). O sítio de partida para a seqüência codificante está na posição 480, um sítio de ligação de ribossoma está na posição 466-473, e o códon de interrupção está na posição 5946.

15 A Figura 28 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade CoA sintase, desidratase, e desidrogenase (SEQ ID NO: 39).

20 A Figura 29 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (SEQ ID NO: 40).

A Figura 30 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (SEQ ID NO: 41).

25 A Figura 31 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que contém seqüência não-codificante assim como codificante de um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA (SEQ ID NO: 42).

A Figura 32 é um alinhamento das seqüências de ácidos nucléicos mostradas em SEQ ID Nos: 40, 43, 44, e 45.

30 A Figura 33 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 41, 46, 47, e 48.

A Figura 34 é um diagrama da construção de um óperon sintético (pTDH) que codifica polipeptídeos tendo atividade CoA transferase, ativi-

dade lactil-CoA desidratase (E1, E2 alfa, e E2 beta), e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (3-HP-CoA desidratase).

A Figura 35A e B é um diagrama da construção de um óperon sintético (pHTD) que codifica polipeptídeos tendo atividade CoA transferase, lactil-CoA desidratase (E1, E2 alfa, e E2 beta) e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (3-HP-CoA desidratase).

A Figura 36A e B é um diagrama da construção de um óperon sintético (pEIITHrEI) que codifica polipeptídeos tendo atividade CoA transferase, atividade lactil-CoA desidratase (E1, E2 alfa, e E2 beta), e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (3-HP-CoA desidratase).

A Figura 37A e B é um diagrama da construção de um óperon sintético (pEIITHEI) que codifica polipeptídeos tendo atividade CoA transferase, atividade lactil-CoA desidratase (E1, E2 alfa, E2 beta), e atividade 3-hidróxi propionil-CoA (3-HP-CoA desidratase).

A Figura 38A e B é um diagrama da construção de dois plasmídeos, pEIITH e pPROEI. O plasmídeo pEIITH codifica polipeptídeos tendo atividade CoA transferase, atividade lactil-CoA desidratase (E2 alfa e E2 beta), e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (3-HP-CoA desidratase), e o plasmídeo pPROEI codifica um polipeptídeo tendo atividade ativador E1.

A Figura 39 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade CoA sintase, desidratase, e desidrogenase (SEQ ID NO: 129).

A Figura 40 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 39, 130, e 131. Os resíduos de aminoácidos em caixa alta representam posições onde aquele resíduo de aminoácido está presente em duas ou mais seqüências.

A Figura 41 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 39, 132, e 133. Os resíduos de aminoácidos em caixa alta representam posições onde aquele resíduo de aminoácido está presente em duas ou mais seqüências.

A Figura 42 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos

mostradas em SEQ ID NOs: 39, 134, e 135. Os resíduos de aminoácidos em caixa alta representam posições onde aquele resíduo de aminoácido está presente em duas ou mais seqüências.

5 A Figura 43 é um diagrama em vários caminhos para fabricação de compostos orgânicos usando-se a enzima OS17 multifuncional.

A Figura 44 é um diagrama em um caminho para fabricação de 3-HP via acetil-CoA e malonil-CoA.

A Figura 45 é um diagrama em construções pMSD8, pET30a/acc1, pFN476, e PET286.

10 A Figura 46 contém um cromatograma em íon total e cinco espectros de massa de Coenzima A tioésteres. Painel A é um cromatograma em íon total ilustrando a separação de Coenzima A e quatro CoA-tioésteres orgânicos: 1 = coenzima A, 2 = lactil-CoA, 3 = acetil-CoA, 4 = acrilil-CoA, 5 = propionil-CoA. Painel B é um espectro de massa de Coenzima A. Painel C é
15 um espectro de massa de lactil-CoA. Painel D é um espectro de massa de acetil-CoA. Painel E é um espectro de massa de acrilil-CoA. Painel F é um espectro de massa de propionil-CoA.

A Figura 47 contém cromatogramas de íons e espectros de massa. Painel A é um cromatograma em íons total de uma mistura de lactil-CoA e 3-HP-CoA. A inserção de painel A é o espectro de massa anotado
20 sob pico 1. Painel B é um cromatograma em íons total de lactil-CoA. A inserção de painel B é o espectro de massa anotado sob pico 2. Cada painel, pico 1 é 3-HP-CoA, e pico 2 é lactil-CoA. O pico rotulado com um asterisco foi confirmado não ser um CoA éster.

25 A Figura 48 contém cromatogramas de íons e espectros de massa. Painel A é um cromatograma em íons total de CoA ésteres derivados de um caldo produzido por *E. coli* transfectado com pEIITHrEI. A inserção de painel A é o espectro de massa anotado sob pico 1. Painel B é um cromatograma em íons total de CoA ésteres derivados de um caldo produzido por *E.*
30 *coli* não-transfectado com pEIITHrEI. A inserção de painel B é o espectro de massa anotado sob o pico 2. Em cada painel, pico 1 é 3-HP-CoA, e pico 2 é lactil-CoA. Os picos marcados com um asterisco foram confirmados não se-

rem um CoA éster.

A Figura 49 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase (SEQ ID NO: 140).

5 A Figura 50 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase (SEQ ID NO: 141).

A Figura 51 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma porção de um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase (SEQ ID NO: 142).

10 A Figura 52 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOs: 141, 143, 144, 145, 146, e 147.

A Figura 53 é um alinhamento das seqüências de ácidos nucléicos mostradas em SEQ ID NOs: 140, 148, 149, 150, 151, e 152.

15 A Figura 54 é um diagrama em um caminho para fabricação de 3-HP via um intermediário beta-alanina.

A Figura 55 é um diagrama em um caminho para fabricação de 3-HP via um intermediário beta – alanina.

A Figura 56 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônio liase (SEQ ID NO: 160).

A Figura 57 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônio liase (SEQ ID NO: 161).

25 A Figura 58 é uma listagem de uma seqüência de aminoácidos que codifica um polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônio liase (SEQ ID NO: 162).

A Figura 59 é uma listagem de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade beta – alanil-CoA amônio liase (SEQ ID NO: 163).

30 Descrição Detalhada

I. Termos

Ácido Nucléico: O termo "ácido nucléico" como aqui usado

encampa ambos RNA e DNA incluindo, sem limitação, cDNA, DNA genômico, e DNA sintético (por exemplo, quimicamente sintetizado). O ácido nucléico pode ser de fita dupla ou fita simples. Onde de fita simples, o ácido nucléico pode ser a fita sentido ou a fita anti – sentido. Em adição, ácido nucléico pode ser circular ou linear.

Isolado: O termo "isolado" como aqui usado com referência a ácido nucléico refere-se a ácido nucléico ocorrendo naturalmente que não é imediatamente contíguo com ambas as seqüências com as quais ele é imediatamente contíguo (uma na extremidade 5' e uma na extremidade 3') no genoma ocorrendo naturalmente do organismo a partir do qual ele é derivado. Por exemplo, um ácido nucléico isolado pode ser, sem limitação, uma molécula de DNA recombinante de qualquer comprimento, contanto que uma das seqüências de ácido nucléico normalmente encontradas flanqueando imediatamente aquela molécula de DNA recombinante em um genoma ocorrendo naturalmente seja removida ou ausente. Assim, um ácido nucléico isolado inclui, sem limitação, um DNA recombinante que existe como uma molécula separada (por exemplo, um cDNA ou um fragmento de DNA genômico produzido por PCR ou tratamento com endonuclease de restrição) independente de outras seqüências assim como DNA recombinante que é incorporado em um vetor, um plasmídeo replicando autonomamente, um vírus (por exemplo, um retrovírus, adenovírus, ou vírus de herpes), ou no DNA genômico de um procariota ou eucariota. Em adição, um ácido nucléico isolado pode incluir uma molécula de DNA recombinante que é parte de um híbrido ou seqüência de ácido nucléico de fusão.

O termo "isolado" como aqui usado com referência a ácido nucléico também inclui qualquer ácido nucléico ocorrendo não-naturalmente desde que seqüências de ácidos nucléicos ocorrendo não-naturalmente não sejam encontradas em natureza e não tenham seqüências contíguas imediatamente em um genoma ocorrendo naturalmente. Por exemplo, ácido nucléico ocorrendo não-naturalmente tal como um ácido nucléico engenheirado é considerado ser ácido nucléico isolado. Ácido nucléico engenheirado pode ser obtido usando-se técnicas de sínteses de ácido nucléico químicas ou

clonagem molecular comuns. Ácido nucléico ocorrendo não-naturalmente isolado pode ser independente de outras seqüências, ou incorporado em um vetor, um plasmídeo replicando autonomamente, um vírus (por exemplo, um retrovírus, adenovírus, ou vírus de herpes), ou o DNA de um procariota ou eucariota. Em adição, um ácido nucléico ocorrendo não-naturalmente pode incluir uma molécula de ácido nucléico que é parte de uma seqüência de ácido nucléico de fusão ou híbrida.

Será visível para aqueles versados na técnica que um ácido nucléico existindo entre centenas a milhões de outras moléculas de ácidos nucléicos dentro, por exemplo, bibliotecas de cDNA ou genômico, ou fatias de gel contendo uma digestão de restrição de DNA genômico não é considerado um ácido nucléico isolado.

Exógeno: O termo "exógeno" como aqui usado com referência a ácido nucléico e uma célula particular refere-se a qualquer ácido nucléico que não origina-se daquela particular célula como encontrada em natureza. Assim, ácido nucléico ocorrendo não-naturalmente é considerado ser exógeno para uma célula uma vez introduzido na célula. Ácido nucléico que está ocorrendo naturalmente também pode ser exógeno para uma particular célula. Por exemplo, um inteiro cromossomo isolado de uma célula de pessoa X é um ácido nucléico exógeno com relação a uma célula de pessoa Y uma vez este cromossomo seja introduzido em célula Y.

Hibridização: O termo "hibridização" como aqui usado refere-se a um processo de teste para complementaridade na seqüência de nucleotídeos de duas moléculas de ácidos nucléicos, baseado na habilidade de DNA de fita simples complementar e/ou RNA para formar uma molécula dúplex. Técnicas de hibridização de ácido nucléico podem ser usadas para obter-se um ácido nucléico isolado dentro do escopo da invenção. Resumidamente, qualquer ácido nucléico tendo alguma homologia a uma seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163 pode ser usada como uma sonda para identificar um ácido nucléico similar através de hibridização sob condições de rigorosidade moderada a alta. Uma vez identificado, o ácido nucléico então pode ser purificado, se-

qüenciado, e analisado para determinar se ele está dentro do escopo da invenção aqui descrita.

Hibridização pode ser feita por análise Southern ou Northern para identificar seqüência de DNA ou RNA, respectivamente, que hibridiza a
5 uma sonda. A sonda pode ser marcada com uma biotina, digoxigenina, uma enzima, ou um rádio isótopo tal como ^{32}P . O DNA ou RNA a ser analisado pode ser separado eletroforeticamente sobre um gel de agarose ou poliacrilamida, transferido para membrana de nitrocelulose, náilon ou outra apropriada, e hibridizado com a sonda usando-se técnicas padrão bem conhecidas
10 tais como aquelas descritas em seções 7.39-7.52 de Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainville, NY. Tipicamente, uma sonda é pelo menos cerca de 20 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, uma sonda correspondendo a uma seqüência de 20 nucleotídeos mostrada em SEQ ID NOs: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40,
15 42, 129, 140 ou 142 pode ser usada para identificar um ácido nucléico idêntico ou similar. Em adição, sondas maiores ou menores que 20 nucleotídeos podem ser usadas.

A invenção também provê seqüências de ácido nucléico isoladas que são de pelo menos cerca de 12 bases em comprimento (por exemplo,
20 cerca de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, ou 5000 bases em comprimento) e hibridizam, sob condições de hibridização, à fita sensi do ou anti – sentido de um ácido nucléico tendo a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. As condições de hibridização
25 ção podem ser condições de hibridização de moderadamente a altamente rigorosas.

Para os propósitos desta invenção, condições de hibridização moderadamente rigorosas significam que a hibridização é realizada em cerca de 42°C em uma solução de hibridização contendo KPO_4 25 mM (pH 7,4),
30 5X SSC, 5X solução de Denhart, 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmão sonificado, desnaturado, formamida 50%, sulfato de Dextran 10%, e 1-15 ng/ml sonda (cerca de 5×10^7 com/ μg), enquanto as lavagens são realizadas

em cerca de 50°C com uma solução de lavagem contendo 2X SSC e dodecil sulfato de sódio 0,1%.

Condições de hibridização altamente rigorosas significam que a hibridização é realizada a cerca de 42°C em uma solução de hibridização contendo KPO₄ 25mM (pH 7,4), 5X SSC, 5X solução de Denhart, 50 µg/ml de DNA de esperma de salmão sonificado, desnaturado, formamida 50%, Dextran sulfate 10%, e 1-15 ng/ml de sonda (cerca de 5x10⁷ com/µg), enquanto as lavagens são realizadas em cerca de 65°C com uma solução de lavagem contendo 0,2X SSC e sulfato de dodecil de sódio 0,1%.

10 Purificado: O termo "purificado" como aqui usado não requer pureza absoluta; antes, ele é pretendido como um termo relativo. Assim, por exemplo, uma preparação de ácido nucléico ou polipeptídeo purificada pode ser uma na qual o polipeptídeo sujeito ou ácido nucléico, respectivamente, está em uma concentração maior que o polipeptídeo ou ácido nucléico pode
15 estar em seu ambiente natural dentro de um organismo. Por exemplo, uma preparação de polipeptídeo pode ser considerada purificada se o teor de polipeptídeo na preparação representa pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98%, ou 99% do teor de proteína total da preparação.

Transformada: Uma célula "transformada" é uma célula na qual
20 uma molécula de ácido nucléico foi introduzida através de, por exemplo, técnicas de biologia molecular. Como aqui usado, o termo "transformação" encampa todas as técnicas através das quais uma molécula de ácido nucléico pode ser introduzida em uma tal célula incluindo, sem limitação, transfecção com um vetor viral, conjugação, transformação com um vetor plasmídeo, e
25 introdução de DNA nu através de eletroporação, lipofecção, e aceleração com pistola de partícula.

Recombinante: Um ácido nucléico "recombinante" é um tendo (1) uma seqüência que não está ocorrendo naturalmente no organismo no qual ela é expressa ou (2) uma seqüência obtida através de uma
30 combinação artificial de duas seqüências menores, de outro modo separadas. Esta combinação artificial é freqüentemente realizada por síntese química ou, mais comumente, através de manipulação artificial de segmentos

isolados de ácidos nucleicos, por exemplo, através de técnicas de engenharia genética. "Recombinante" é também usado para descrever moléculas de ácido nucleico que foram manipuladas artificialmente, mas contêm as mesmas seqüências reguladoras e regiões codificantes que são encontradas no organismo da qual o ácido nucleico foi isolado.

Agente ligante específico: Um "agente ligante específico" é um agente que é capaz de ligação específica a qualquer um dos polipeptídeos aqui descritos, e pode incluir anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais humanizados), e fragmentos de anticorpos monoclonais tais como fragmentos Fab, F(ab')₂ e Fv assim como qualquer outro agente capaz de ligação específica a um epítipo de tais polipeptídeos.

Anticorpos para os polipeptídeos aqui providos (ou seus fragmentos) podem ser usados para purificar ou identificar tais polipeptídeos. As seqüências de aminoácidos e ácidos nucleicos aqui providas permitem a produção de específicos agentes ligantes baseados em anticorpo específicos que reconhecem os polipeptídeos aqui descritos.

Anticorpos monoclonais ou policlonais podem ser produzidos para os polipeptídeos, porções dos polipeptídeos, ou suas variantes. Otimamente, anticorpos elevados contra um ou mais epítipos sobre um antígeno polipeptídeo detectarão especificamente aquele polipeptídeo. Ou seja, anticorpos elevados contra um particular polipeptídeo podem reconhecer e ligar este particular polipeptídeo, e podem substancialmente não reconhecer ou não se ligar a outros polipeptídeos. A determinação de que um anticorpo liga-se especificamente a um particular polipeptídeo é feita através de qualquer um de um número de processos padrões de ensaios imunes; por exemplo, Western blotting (Ver, por exemplo, Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, N.Y., 1989).

Para determinar que uma dada preparação de anticorpos (tal como uma preparação produzida em um camundongo contra um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2) especi-

ficamente detecta o apropriado polipeptídeo (por exemplo, um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2) através de Western blotting, proteína celular total pode ser extraída de células e separada por eletroforese de SDS – gel poli(acrilamida). A proteína celular total separada então pode ser transferida para uma membrana (por exemplo, nitrocelulose), e a preparação de anticorpos incubada com a membrana. Após lavagem de membrana para remoção de anticorpos ligados não-especificamente, a presença de anticorpos ligados especificamente pode ser detectada usando-se um apropriado anticorpo secundário (por exemplo, um anticorpo anti-camundongo) conjugado a uma enzima tal como fosfatase alcalina uma vez que aplicação de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul tetrazólio resulta na produção de um composto de cor azul densa através de fosfatase alcalina imuno – localizada.

Polipeptídeos substancialmente puros apropriados para uso como um imunogênio podem ser obtidos a partir de células transfectadas, células transformadas, ou células tipo selvagem. Concentrações de polipeptídeos na preparação final podem ser ajustadas, por exemplo, por concentração sobre um dispositivo de filtro Amicon, para o nível de uns poucos microgramas por mililitro. Em adição, polipeptídeos variando em tamanho de polipeptídeos de inteiro comprimento a polipeptídeos tendo tão poucos como nove resíduos de aminoácidos podem ser utilizados como imunógenos. Tais polipeptídeos podem ser produzidos em cultura de células, podem ser quimicamente sintetizados usando-se processos padrões, ou podem ser obtidos através de clivagem de polipeptídeos grandes em menores polipeptídeos que podem ser purificados. Polipeptídeos tendo tão poucos como nove resíduos de aminoácidos em comprimento podem ser imunogênicos quando apresentados a um sistema imuno no contexto de uma molécula de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) tal como uma molécula MHC classe I ou MHC classe II. Da mesma maneira, polipeptídeos tendo pelo menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, ou mais resíduos de

aminoácidos consecutivos de qualquer seqüência de aminoácidos aqui mostrada podem ser usados como imunógenos para produção de anticorpos.

Anticorpos monoclonais para qualquer um dos polipeptídeos aqui mostrados podem ser preparados a partir de hibridomas murino de acordo com o processo clássico de Kohler & Milstein (Nature 256:495 (1975)) ou um seu derivado.

Anti-soro policlonal contendo anticorpos para os epítomos heterogêneos de qualquer polipeptídeo aqui mostrado pode ser preparado através de imunização de animais apropriados com o polipeptídeo (ou seu fragmento), que pode estar não-modificado ou modificado para aperfeiçoar imunogenicidade. Um protocolo de imunização eficaz para coelhos pode ser encontrado em Vaitukaitis et al. (J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991 (1971)).

Fragmentos de anticorpos podem ser usados no lugar de anticorpos inteiros e podem ser facilmente expressos em células hospedeiras procarióticas. Processos de obtenção e uso de porções imunologicamente eficazes de anticorpos monoclonais, também referidos como "fragmentos de anticorpos", são bem conhecidos e incluem aqueles descritos em Better & Horowitz (Methods Enzymol. 178:476-496 (1989)), Glockshuber et al. (Biochemistry 29:1362-1367 (1990)), patente US nº 5 648 237 ("Expression of Functional Antibody Fragments"), patente US nº 4 946 778 ("Single Polypeptide Chain Binding Molecules"), patente US nº 5 455 030 ("Immunotherapy Using Single Chain Polypeptide Binding Molecules"), e referências ali citadas.

Ligado operavelmente: Uma primeira seqüência de ácidos nucleicos está "ligada operavelmente" com uma segunda seqüência de ácidos nucleicos onde quer que a primeira seqüência de ácidos nucleicos esteja colocada em uma relação funcional com a segunda seqüência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor está operavelmente ligado a uma seqüência codificante se o promotor afeta a transcrição da seqüência codificante. Geralmente, seqüências de DNA ligadas operavelmente são contí-

guas e, onde necessário para unir duas regiões codificantes – polipeptídeo, no mesmo quadro de leitura.

Sondas e iniciadores: sondas de ácidos nucleicos e iniciadores podem ser preparados facilmente baseado nas seqüências de aminoácidos e seqüências de ácidos nucleicos ali providas. Uma "sonda" inclui um ácido nucleico isolado contendo um marcador detectável ou molécula repórter. Marcadores típicos incluem isótopos radioativos, ligantes, agentes quimioluminescentes, e enzimas. Processos para marcação e orientação na escolha de marcadores apropriados para vários propósitos são discutidos em, por exemplo, Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, e Ausubel et al. (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (com periódicas atualizações), 1987.

"Iniciadores" são tipicamente moléculas de ácido nucleico tendo dez ou mais nucleotídeos (por exemplo, moléculas de ácidos nucleicos tendo entre cerca de 10 nucleotídeos e cerca de 100 nucleotídeos). Um iniciador pode ser anelado a uma fita de ácido nucleico alvo complementar através de hibridização de ácido nucleico para formar um híbrido entre o iniciador e a fita de ácido nucleico alvo, e então estendida ao longo da fita de ácido nucleico alvo através de, por exemplo, uma enzima DNA polimerase. Pares de iniciadores podem ser usados para amplificação de uma seqüência de ácido nucleico, por exemplo, através de reação de cadeia polimerase (PCR) ou outros processos de amplificação de ácido nucleico conhecidos na técnica.

Processos para preparação e uso de sondas e iniciadores são descritos, por exemplo, em referências tais como Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel et al. (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (com atualizações periódicas), 1987; e Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San

Diego, 1990. Pares de iniciadores de PCR podem ser derivados de uma sequência conhecida, por exemplo, através do uso de programas de computador pretendidos para este propósito tais como Iniciador (Version 0,5, COPYRGT. 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Aqueles versados na técnica apreciarão que a especificidade de uma particular sonda ou iniciador aumenta com o comprimento, mas que uma sonda ou iniciador pode variar em tamanho a partir de uma sequência de inteiro comprimento para seqüências tão curtas como cinco nucleotídeos consecutivos. Assim, por exemplo, um iniciador de 20 nucleotídeos consecutivos pode anelar para um alvo com uma maior especificidade que um correspondente iniciador de somente 15 nucleotídeos. Assim, de modo a obter-se maior especificidade, sondas e iniciadores podem ser selecionados que compreendem, por exemplo, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 980, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 2000, 2050, 2100 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2650, 2700, 2750, 2800, 2850, 2900, 3000, 3050, 3100, 3150, 3200, 3250, 3300, 3350, 3400, 3450, 3500, 3550, 3600, 3650, 3700, 3750, 3800, 3850, 3900, 4000, 5040, 4100, 4150, 4200, 4250, 4300, 4350, 4400, 4450, 4500, 4550, 4300, 4650, 4700, 4750, 4800, 4850 4900, 5000, 5050, 5100, 5150, 5200, 5250, 5300, 5350, 5400, 5450, ou mais nucleotídeos consecutivos.

Porcentagem de identidade de seqüência: A "porcentagem de identidade de seqüência" entre uma particular seqüência de ácidos nucleicos ou aminoácidos e uma seqüência referida por um particular número de identificação de seqüência é determinada como se segue. Primeiro, uma seqüência de ácidos nucleicos ou aminoácidos é comparada à seqüência mostrada em um particular número de identificação de seqüência usando BLAST o programa 2 Sequences (B12seq) a partir da versão stand-alone de BLASTZ contendo BLASTN versão 2.0.14 e BLASTP version 2.0.14. Esta versão stand-alone de BLASTZ pode ser obtida de Fish & Richardson's web site (www.fr.com) ou de United States government's National Center for Bi-

otechnology Information web site (www.ncbi.nlm.nih.gov). Instruções explicando como usar o programa B12seq podem ser encontradas no arquivo readme acompanhando BLASTZ. B12seq realiza uma comparação entre duas seqüências usando tanto o algoritmo BLASTN como BLASTP. BLASTN

5 é usado para comparar seqüências de ácidos nucléicos, enquanto BLASTP é usado para comparar seqüências de aminoácidos. Para comparar duas seqüências de ácidos nucléicos, as opções são como se segue: -i é fixado para um arquivo contendo primeira seqüência de ácido nucléico a ser comparada (por exemplo, C:\seq 1 txt); é fixado para um arquivo contendo a se-

10 gunda seqüência de ácido nucléico a ser comparado (por exemplo, C:\seq 2.txt); blastn; -o é fixado para qualquer desejado nome de arquivo (por exemplo, C:\output.txt); -q é fixado para -1; -r é fixado para 2; e todas as outras opções são deixadas em sua fixação default. Por exemplo, o seguinte comando pode ser usado para gerar um arquivo saída contendo uma com-

15 paração entre duas seqüências: C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j C:\seq2.txt blastn-o c:\output.txt-q-1-r2. Para comparar duas seqüências de aminoácidos, as opções de B12seq são fixadas como se segue: -i é fixado para um arquivo contendo a primeira seqüência de aminoácido a ser comparada (por exemplo, C:\seq1.txt); -j é fixado para um arquivo contendo a segunda seqüência

20 de aminoácidos a ser comparada (por exemplo, C:\seq2.txt); -p é fixado para blastp; -o é fixado para qualquer nome de arquivo desejado (por exemplo, C:\output.txt); e todas as outras opções são deixadas em sua fixação default. Por exemplo, o seguinte comando pode ser usado para gerar um arquivo saída contendo uma comparação entre duas seqüências de aminoácidos:

25 C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastp-o c:\output.txt. Se as duas seqüências comparadas compartilham homologia, então o arquivo de saída projetado apresentará aquelas regiões de homologia como seqüências alinhadas. Se as duas seqüências comparadas não compartilham homologia, então o arquivo de saída projetado não apresentará seqüências alinhadas.

30 Uma vez alinhadas, o número de emparelhamentos é determinado através de contagem de número de posições onde um idêntico resíduo de nucleotídeo ou aminoácido é apresentado em ambas seqüências. A por-

centagem de identidade de seqüência é determinada pela divisão de número de emparelhamentos tanto através do comprimento da seqüência mostrada na seqüência identificada (por exemplo, SEQ ID NO: 1), como através de um comprimento articulado (por exemplo, 100 resíduos de nucleotídeos ou aminoácidos consecutivos a partir de uma seqüência mostrada em uma seqüência identificada), seguido por multiplicação do resultante valor por 100. Por exemplo, uma seqüência de ácido nucléico que tem 1166 emparelhamentos quando alinhada com a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 é 75,0 por cento idêntica à seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 (isto é, $1166 \div 1554 \cdot 100 = 75,0$). É notado que o valor de porcentagem de identidade de seqüência é arredondado para o décimo mais próximo. Por exemplo, 75,11, 75,12, 75,13 e 75,14 são arredondados para baixo para 75,1, enquanto 75,15, 75,16, 75,17, 75,18, e 75,19 são arredondados para 75,2. É também notado que o valor de comprimento será sempre um inteiro. Em um outro exemplo, uma seqüência alvo contendo uma região de 20 nucleotídeos que alinha-se com 20 nucleotídeos consecutivos de uma seqüência identificada como se segue contém uma região de compartilha 75 por cento de identidade de seqüência àquela seqüência identificada (isto é, $15 \div 20 \cdot 100 = 75$).

Seqüência alvo	1	20
	AGGTCGTGTACTGTCAGTCA	
Seqüência identificada	ACGTGGTGAAGTCCAGTGA	

Substituição conservativa: O termo "substituição conservativa" como aqui usado refere-se a qualquer das substituições de aminoácidos mostradas na Tabela 1. Tipicamente, substituições conservativas têm pequeno a nenhum impacto sobre a atividade de um polipeptídeo. Um polipeptídeo pode ser produzido para conter uma ou mais substituições conservativas através de manipulação da seqüência de nucleotídeos que codifica aquele polipeptídeo usando, por exemplo, procedimentos padrões tais como mutagênese de sítio direcionado ou PCR.

Tabela 1

Resíduo original	Substituição (ões) consecutivas
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

II. Caminhos Metabólicos

A invenção provê processos e materiais relacionados à produção de 3-HP assim como outros compostos orgânicos (por exemplo, 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, e ésteres de 3-HP). Especificamente, a invenção provê ácidos nucleicos isolados, polipeptídeos, células hospedeiras, e processos e materiais para produção de 3-HP assim como outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, 3-HP polimerizado, e ésteres de 3-HP.

Da mesma maneira, a invenção provê vários caminhos metabólicos que podem ser usados para produção de compostos orgânicos a partir

de PEP (Figuras 1-5, 43-44, 54, e 55). Como mostrado na Figura 1, lactato pode ser convertido em lactil-CoA através de um polipeptídeo tendo atividade de CoA transferase (EC 2.8.3.1); o resultante lactil-CoA pode ser convertida em acrilil-CoA por um polipeptídeo (ou complexo polipeptídeo múltiplo tal como um complexo E2 α e E2 β ativado) tendo atividade lactil-CoA desidratase (EC 4.2.1.54); o resultante acrilil-CoA pode ser convertida em 3-hidróxi propionil-CoA (3-HP-CoA) por um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (EC 4.2.1.-); e o resultante 3-HP-CoA pode ser convertida em 3-HP por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase, um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase (EC 3.1.2.-), ou um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA (EC 3.1.2.4).

Polipeptídeos tendo atividade CoA transferase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos a partir de várias espécies incluindo, sem limitação, *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium kluyveri*, e *Escherichia coli*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase pode ser obtido de *Megasphaera elsdenii* como descrito no Exemplo 1 e pode ter uma seqüência como mostrado em SEQ ID NO: 1. Em adição, polipeptídeos tendo atividade CoA transferase assim como codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos como aqui descrito. Por exemplo, as variações para SEQ ID NO: 1 aqui providas podem ser usadas para codificar um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase.

Polipeptídeos (ou os polipeptídeos de um complexo polipeptídeo múltiplo tal como um complexo E2 alfa e E2 beta ativado) tendo atividade lactil-CoA desidratase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Megasphaera elsdenii* e *Clostridium propionicum*. Por exemplo, ácido nucléico codificando um ativador E1, uma subunidade E2 alfa, e uma subunidade E2 beta que pode formar um complexo polipeptídeo múltiplo tendo atividade lactil-CoA desidratase pode ser obtido de *Megasphaera elsdenii* como descrito no Exemplo 2. O ácido nucléico codificando o ativador E1 pode conter uma seqüência como mostrado em SEQ ID NO: 9; o ácido nucléico codifi-

cando a subunidade E2 alfa pode conter uma seqüência como mostrado em SEQ ID NO: 17; e o ácido nucléico codificando a subunidade E2 beta pode conter uma seqüência como mostrado em SEQ ID NO: 2. Em adição, polipeptídeos (ou os polipeptídeos de um complexo polipeptídeo múltiplo) tendo atividade lactil-CoA desidratase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos como aqui descrito. Por exemplo, as variações para SEQ ID NO: 9, 17, e 25 aqui providas podem ser usadas para codificação de polipeptídeos de um complexo polipeptídeo múltiplo tendo uma atividade CoA transferase.

10 Polipeptídeos tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Chloroflexus aurantiacus*, *Candida rugosa*, *Rhodospirillum rubrum*, e *Rhodobacter capsulatus*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase pode ser obtido de *Chloroflexus aurantiacus* como descrito no Exemplo 3e e pode ter uma seqüência como mostrado em SEQ ID NO: 40. Em adição, polipeptídeos tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos como aqui descrito. Por exemplo, as variações para
15 SEQ ID NO: 40 aqui providas podem ser usadas para codificar um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase.

 Polipeptídeos tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Candida rugosa*. Polipeptídeos tendo atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Pseudomonas fluorescens*, *rattus*, e *homo sapiens*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase pode ser obtido de *homo sapiens* e pode ter
25 uma seqüência como mostrado em GenBank® accession number U66669.
30 O termo "polipeptídeo tendo atividade enzimática" como aqui usado refere-se a qualquer polipeptídeo que catalisa uma reação química de

outras substâncias sem ele próprio ser destruído ou alterado com término da reação. Tipicamente, um polipeptídeo tendo atividade enzimática catalisa a formação de um ou mais produtos a partir de um ou mais substratos. Tais polipeptídeos podem ter qualquer tipo de atividade enzimática incluindo, sem
 5 limitação, a atividade enzimática ou atividades enzimáticas associadas com enzimas tais como desidratases/hidratases, 3-hidróxi propionil-CoA desidratases hidratases, CoA transferases, lactil-CoA desidratases, 3-hidróxi propionil-CoA hidrolases, 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolases, poli hidróxi ácido sintases, CoA sintetases, malonil-CoA redutases, beta – alanina amônio liases,
 10 e lípases.

Como mostrado na Figura 2, lactato pode ser convertido em lactil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade CoA sintetase (EC 6.2.1.-); o resultante lactil-CoA pode ser convertida em acrilil-CoA por um polipeptídeo (ou complexo polipeptídeo múltiplo) tendo atividade lactil-CoA desidratase; o
 15 resultante acrilil-CoA sendo convertida em 3-HP-CoA por um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase; e o resultante 3-HP-CoA pode ser convertida em 3-HP polimerizado por um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase (EC 2.3.1.-). Polipeptídeos tendo atividade CoA sintetase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos po-
 20 dem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Salmonella* entérica. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade CoA sintetase pode ser obtido de *Escherichia coli* e pode ter uma sequência como mostrada em GenBank® accesdion number U00006. Poli-
 25 peptídeos (ou complexos de polipeptídeos múltiplos) tendo atividade lactil-CoA desidratase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos como aqui provido. Polipeptídeos tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos também podem ser obtidos como aqui provido. Polipeptídeos
 30 tendo atividade poli hidróxi ácido sintase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Rhodobacter sphaeroides*, *Comamonas acidovorans*, *Ralsto-*

nia eutropha, e *Pseudomonas oleovorans*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase pode ser obtido de *Rhodobacter sphaeroides* e pode ter uma seqüência como mostrado em GenBank accession number X97200.

5 Como mostrado na Figura 3, lactato pode ser convertido em lactil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase; o resultante lactil-CoA pode ser convertida em acrilil-CoA por um polipeptídeo (ou complexo polipeptídeo múltiplo) tendo atividade lactil-CoA desidratase; o resultante acrilil-CoA pode ser convertida em 3-HP-CoA através de um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase; o resultante 3-HP-CoA pode ser convertida em 3-HP por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase, um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase, ou um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA; e o resultante 3-HP pode ser convertido em um éster de 3-HP por um polipeptídeo tendo
10 atividade lipase (EC 3.1.1.-). Polipeptídeos tendo atividade lipase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, e *Candida albicans*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade lipase pode ser obtido de *Candida rugosa* e pode ter
15 uma seqüência como mostrado em GenBank® accession number A81171.
20

 Como mostrado na Figura 4, lactato pode ser convertido em lactil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade CoA sintetase; o resultante lactil-CoA pode ser convertida em acrilil-CoA por um polipeptídeo (ou complexo polipeptídeo múltiplo) tendo atividade lactil-CoA desidratase; e o resultante
25 acrilil-CoA pode ser convertida em acrilato polimerizado através de um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase.

 Como mostrado na Figura 5, lactato pode ser convertido em lactil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase; o resultante lactil-CoA pode ser convertida em acrilil-CoA por um polipeptídeo (ou complexo polipeptídeo múltiplo) tendo atividade lactil-CoA desidratase; o resultante acrilil-CoA pode ser convertida em acrilato por um polipeptídeo tendo
30 atividade CoA transferase; e o resultante acrilato pode ser convertido em um

éster de acrilato por um polipeptídeo tendo atividade lipase.

Como mostrado na Figura 44, acetil-CoA pode ser convertido em malonil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade acetil-CoA carboxilase, e o resultante malonil-CoA pode ser convertido em 3-HP por um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase. Polipeptídeos tendo atividade acetil-CoA carboxilase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos de várias espécies incluindo, sem limitação, *Escherichia coli* e *Chloroflexus aurantiacus*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade acetil-CoA carboxilase pode ser obtido de *Escherichia coli* e pode ter uma sequência como mostrada em GenBank® accession number M96394 ou U18997. Polipeptídeos tendo atividade malonil-CoA redutase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos a partir de várias espécies incluindo, sem limitação, *Chloroflexus aurantiacus*, *Sulfolobus metacillus*, e *Acidianus brierleyi*. Por exemplo, ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase pode ser obtido como aqui descrito e pode ter uma sequência similar à sequência mostrada em SEQ ID NO: 140. Em adição, polipeptídeos tendo atividade malonil-CoA redutase assim como ácido nucléico codificando tais polipeptídeos podem ser obtidos como descrito aqui. Por exemplo, as variações para SEQ ID NO: 140 aqui providas podem ser usadas para codificação de um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase.

Polipeptídeos tendo atividade malonil-CoA redutase podem usar NADPH como um cofator. Por exemplo, o polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 141 é um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA que usa NADPH como um cofator quando convertendo malonil-CoA em 3-HP. Da mesma maneira, polipeptídeos tendo atividade malonil-CoA redutase podem usar NADH como um cofator. Tais polipeptídeos podem ser obtidos por conversão de um polipeptídeo que tem atividade malonil-CoA redutase e usa NADPH como um cofator em um polipeptídeo que tem atividade malonil-CoA redutase e usa NADH como um cofator. Qualquer processo pode ser usado para converter um polipeptídeo que usa NADPH como um cofator em um polipeptídeo que usa NADH como um cofator tais

como aqueles descritos por outros (Eppink et al., J. Mol. Biol., 292(1):87-96(1999), Hall and Tomsett, Microbiology, 146(Pt 6):1399-406 (2000), e Dohr et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 98(1):81-86 (2001)). Por exemplo, mutagênese pode ser usada para converter o polipeptídeo codificado pela seqüência de

5 ácido nucléico mostrada em SEQ ID NO: 140 em um polipeptídeo que, quando convertendo malonil-CoA em 3-HP, usa NADH como um cofator ao invés de NADPH.

Como mostrado na Figura 43, propionato pode ser convertido em propionil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade CoA sintetase tal

10 como o polipeptídeo tendo a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 39; o resultante propionil-CoA pode ser convertida em acrilil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade desidrogenase tal como o polipeptídeo tendo a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 39; e o resultante acrilil-CoA pode ser convertido em (1) acrilato por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase ou

15 atividade CoA hidrolase, (2) 3-HP-CoA por um polipeptídeo tendo uma atividade 3-HP desidratase (também referida como acrilil-CoA hidratase ou simplesmente hidratase) tal como o polipeptídeo tendo a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 39, ou (3) acrilato polimerizado por um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase. O resultante acrilato pode ser convertido

20 em um éster de acrilato por um polipeptídeo tendo atividade lipase. O resultante 3-HP-CoA pode ser convertido em (1) 3-HP por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase, um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA hidrolase (EC 3.1.2.-), ou um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutiril-CoA hidrolase (EC 3.1.2.4), ou (2) 3-HP polimerizado por um polipeptídeo tendo atividade poli hidróxi ácido sintase (EC 2.3.1.-).

25

Como mostrado na Figura 54, PEP pode ser convertida em beta – alanina. Beta – alanina pode ser convertida em beta-alanil-CoA através do uso de um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase. Beta-alanil-CoA então pode ser convertida em acrilil-CoA através do uso de um polipeptídeo

30 tendo atividade beta-alanil-CoA amônio liase. Acrilil-CoA então pode ser convertida em 3-HP-CoA através do uso de um polipeptídeo tendo atividade 3-HP-CoA desidratase, e um polipeptídeo tendo atividade glutamato desi-

drogenase pode ser usado para converter 3-HP-CoA em 3-HP.

Como mostrado na Figura 55, 3-HP pode ser obtido a partir de beta – alanina através de primeiro contato de beta – alanina com um polipeptídeo tendo atividade 4,4-amino butirato amino transferase para criar malonato semi – aldeído. O malonato semi – aldeído pode ser convertido em 3-HP com um polipeptídeo tendo atividade 3-HP desidrogenase ou um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutirato desidrogenase.

III. Moléculas de ácidos nucléicos e polipeptídeos

A invenção provê ácido nucléico isolado que contém a inteira seqüência de ácidos nucléicos mostrada em SEQ ID NOS: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Em adição, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma porção da seqüência de ácidos nucléicos em SEQ ID NOS: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Por exemplo, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de 15 nucleotídeos idêntica a qualquer seqüência de 15 nucleotídeos mostrada em SEQ ID NOS: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163 incluindo, sem limitação, a seqüência partindo no nucleotídeo número 1 e terminando em nucleotídeo número 15, a seqüência partindo de nucleotídeo número 2 e terminando em nucleotídeo número 16, a seqüência partindo em nucleotídeo número 3 e terminando em nucleotídeo número 17, e assim por diante. Será apreciado que a invenção também provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de nucleotídeos que é maior que 15 nucleotídeos (por exemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais nucleotídeos) em comprimento e idêntica a qualquer porção da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Por exemplo, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de 25 nucleotídeos idêntica a qualquer seqüência de 25 nucleotídeos mostrada em SEQ ID NOS: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163 incluindo, sem limitação, a seqüência partindo do nucleotídeo número 1 e terminando em nucleotídeo número 25, a seqüência iniciando em nucleotídeo número 2 e terminando em nucleotídeo número 26, a seqüência iniciando em nucleotí-

deo número 3 e terminando em nucleotídeo número 27, e assim por diante. Exemplos adicionais incluem, sem limitação, ácidos nucléicos isolados que contêm uma seqüência de nucleotídeos que é 50 ou mais nucleotídeos (por exemplo, 100, 150, 200, 250, 300, ou mais nucleotídeos) em comprimento e
 5 idêntica a qualquer porção da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Tais ácidos nucléicos isolados podem incluir, sem limitação, aqueles ácidos nucléicos isolados contendo uma seqüência de ácidos nucléicos representada em uma linha simples de seqüência mostrada na Figura 6, 10, 14, 18, 22, 23, 25, 27, 29,
 10 31, 39, 49 ou 51 desde que cada linha de seqüência mostrada nestas figuras, com a possível exceção da última linha, proporcione uma seqüência de nucleotídeos contendo pelo menos 50 bases.

Em adição, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma variação da seqüência de ácidos nucléicos mostrada em SEQ ID NOs:
 15 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Por exemplo, a invenção provê ácido nucléico isolado contendo uma seqüência de ácidos nucléicos mostrada em SEQ ID NOs: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163 que contém uma inserção simples, uma supressão simples, uma substituição simples, inserções múltiplas, supressões múltiplas,
 20 substituições múltiplas, ou qualquer combinação das mesmas (por exemplo, supressão simples com inserções múltiplas). Tais moléculas de ácido nucléico isoladas podem compartilhar pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, ou 99 por cento de identidade de seqüência com uma seqüência mostrada em SEQ ID NOs: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129,
 25 140, 142, 162 ou 163.

A invenção provê exemplos múltiplos de ácido nucléico isolado que contém uma variação de uma seqüência de ácido nucléico mostrada em SEQ ID NOs: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. Por exemplo, a Figura 8 provê a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 alinhada com três outras seqüências de ácidos nucléicos. Exemplos de variações da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 incluem, sem limitação, qualquer variação da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 provida na Fi-

gura 8. Tais variações são providas na Figura 8 em que uma comparação do nucleotídeo (ou sua falta) em uma particular posição da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 com o nucleotídeo (ou sua falta) na mesma posição alinhada de qualquer das outras três seqüências de ácidos nucléicos mostradas na Figura 8 (isto é, SEQ ID NOs: 3, 4, e 5) provê uma lista de específicas mudanças para a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1. Por exemplo, "a" na posição 49 de SEQ ID NO: 1 pode ser substituída com um "c" como indicado na Figura 8. Também indicado na Figura 8, "a" na posição 590 de SEQ ID NO: 1 pode ser substituído com um "atgg"; um "aaac" pode ser inserido antes de "g" na posição 393 de SEQ ID NO: 1; ou "gaa" na posição 736 de SDEQ ID NO: 1 pode ser suprimido. Será apreciado que a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 pode conter qualquer número de variações assim como qualquer combinação de tipos de variações. Por exemplo, a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 pode conter qualquer variação provida na Figura 8 ou mais de uma (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, ou mais) das variações providas na Figura 8. É notado que as seqüências de ácidos nucléicos providas pela Figura 8 podem codificar polipeptídeos tendo atividade CoA transferase. A invenção também provê ácido nucléico isolado que contém uma variante de uma porção da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1 como mostrada na Figura 8 e aqui descrita.

Da mesma maneira, a Figura 12 provê variações de SEQ ID NO: 9 e suas porções; a Figura 16 provê variações de SEQ ID NO: 17 e suas porções; a Figura 20 provê variações de SEQ ID NO: 25 e suas porções; a Figura 32 provê variações de SEQ ID NO: 40 e suas porções; e Figura 53 provê variações de SEQ ID NO: 140.

A invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de ácido nucléico que codifica a inteira seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Em adição, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de ácido nucléico que codifica uma porção da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma

seqüência de ácido nucléico que codifica uma seqüência de 15 aminoácidos idêntica a qualquer seqüência de 15 aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161 incluindo, sem limitação, a seqüência iniciando no resíduo de aminoácido número 1 e terminando em resíduo de aminoácido número 15, a seqüência iniciando no resíduo de aminoácido número 2 e terminando no resíduo de aminoácido número 16, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 3 e terminando em resíduo de aminoácido número 17, e assim por diante. Será apreciado que a invenção também provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de ácido nucléico que codifica uma seqüência de aminoácidos que é maior que 15 resíduos de aminoácidos (por exemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais resíduos de aminoácidos) em comprimento e idêntica a qualquer porção da seqüência mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de 25 aminoácidos idêntica a qualquer seqüência de 25 aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161 incluindo, sem limitação, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 1 e terminando em resíduo de aminoácido número 25, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 2 e terminando em resíduo de aminoácido número 26, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 3 e terminando em resíduo de aminoácido número 27, e assim por diante. Exemplos adicionais incluem, sem limitação, ácidos nucléicos isolados que contêm uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de aminoácidos que é 50 ou mais resíduos de aminoácidos (por exemplo, 100, 150, 200, 250, 300 ou mais resíduos de aminoácidos) em comprimento e idêntica a qualquer porção da seqüência mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Tais ácidos nucléicos isolados incluem, sem limitação, aqueles ácidos nucléicos isolados contendo uma seqüência de ácido nucléico que codifica uma seqüência de aminoácidos representada em uma linha simples de seqüência mostrada na Figura 7, 11, 15, 19, 24, 26, 28, 30 ou 50 desde que cada linha

de seqüência mostrada nestas figuras, com a possível exceção da última linha, provê uma seqüência de aminoácidos contendo pelo menos 50 resíduos.

Em adição, a invenção provê ácido nucléico isolado que contém
 5 uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de aminoácidos tendo uma variação da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a invenção provê ácido nucléico isolado contendo uma seqüência de ácidos nucléicos codificando uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID
 10 NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160, ou 161 que contém uma inserção simples, uma supressão simples, uma substituição simples, inserções múltiplas, supressões múltiplas, substituições múltiplas, ou qualquer combinação das mesmas (por exemplo, supressão simples junto com múltiplas inserções). Tais moléculas de ácido nucléico isoladas podem conter uma
 15 seqüência de ácidos nucléicos codificando uma seqüência de aminoácidos que compartilha pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, ou 99 por cento de identidade de seqüência com uma seqüência mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161.

A invenção provê múltiplos exemplos de ácido nucléico isolado
 20 contendo uma seqüência de ácidos nucléicos codificando uma seqüência de aminoácidos tendo uma variação de uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a Figura 9 provê a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 alinhada com as outras três seqüências de aminoácidos. Exemplos
 25 de variações da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 incluem, sem limitação, qualquer variação da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 provida na Figura 9. Tais variações são providas na Figura 9 em que uma comparação do resíduo de aminoácido (ou sua falta) em uma particular posição da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 com o resíduo de aminoácido (ou sua
 30 falta) na mesma posição alinhada de qualquer das outras três seqüências de aminoácidos de Figura 9 (isto é, SEQ ID NOs: 6, 7 e 8) provê uma lista de específicas mudanças para a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2. Por

exemplo, "k" na posição 17 de SEQ ID NO: 2 pode ser substituído com "p" ou "h" como indicado na Figura 9. Como também indicado na Figura 9, "v" na posição 125 de SEQ ID NO: 2 pode estar substituído com "i" ou "f". Será apreciado que a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 pode conter qual-
 5 quer número de variações assim como qualquer combinações de tipos de variações. Por exemplo, a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 pode conter uma variação provida na Figura 9 ou mais de uma (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, ou mais) das variações providas na Figura 9. É notado que as seqüências de aminoácidos providas na Figura 9
 10 podem ser polipeptídeos tendo atividade CoA transferase.

A invenção também provê ácido nucléico isolado contendo uma seqüência de ácidos nucléicos codificando uma seqüência de aminoácidos que contém uma variante de uma porção da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 como mostrado na Figura 9 e aqui descrito.

15 Da mesma maneira, a Figura 13 provê variações de SEQ ID NO: 10 e suas porções; a Figura 17 provê variações de SEQ ID NO: 18 e suas porções; a Figura 21 provê variações de SEQ ID NO: 26 e suas porções; a Figura 33 provê variações de SEQ ID NO: 41 e suas porções; as Figuras 40, 41 e 42 provêm variações de SEQ ID NO: 39; e Figura 52 provê variações
 20 de SEQ ID NO: 141 e suas porções.

É notado que preferências de códon e tabelas de utilização de códon para uma particular espécie podem ser usadas para engenheirar moléculas de ácido nucléico isolado que tomam vantagem das preferências de uso de códon daquelas particulares espécies. Por exemplo, o ácido nucléico
 25 isolado aqui provido pode ser projetado para ter códons que são preferencialmente usados por um particular organismo de interesse.

A invenção também provê ácido nucléico isolado que é pelo menos cerca de 12 bases em comprimento (por exemplo, pelo menos cerca de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 100, 250, 500, 750, 1000,
 30 1500, 2000, 3000, 4000 ou 5000 bases em comprimento) e hibridiza, sob condições de hibridização, à fita sentido ou anti – sentido de um ácido nucléico tendo a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 34, 36,

38, 40, 42, 129, 140, 142, 162 ou 163. As condições de hibridização podem ser condições de hibridização moderadamente ou altamente rigorosas.

A invenção provê polipeptídeos que contêm a inteira seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Em adição, a invenção provê polipeptídeos que contêm uma porção da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a invenção provê polipeptídeos que contêm uma seqüência de 15 aminoácidos idêntica a qualquer seqüência de 15 aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161 incluindo, sem limitação, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 1 e terminando em resíduo de aminoácido número 15, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 2 e terminando em resíduo de aminoácido número 16, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 3 e terminando em resíduo de aminoácido número 17, e assim por diante. Será apreciado que a invenção também provê polipeptídeos que contêm uma seqüência de aminoácidos que é maior que 15 resíduos de aminoácidos (por exemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais resíduos de aminoácidos) em comprimento e idêntica a qualquer porção da seqüência mostrada em SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a invenção provê polipeptídeos que contêm uma seqüência de 25 aminoácidos idêntica a qualquer seqüência de 25 aminoácidos mostrada em SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161 incluindo, sem limitação, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 1 e terminando em resíduo de aminoácido número 25, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 2 e terminando em resíduo de aminoácido número 26, a seqüência iniciando em resíduo de aminoácido número 3 e terminando em resíduo de aminoácido número 27, e assim por diante. Exemplos adicionais incluem, sem limitação, polipeptídeos que contêm uma seqüência de aminoácidos que é 50 ou mais resíduos de aminoácidos (por exemplo, 100, 150, 200, 250, 300, ou mais resíduos de aminoácidos) em comprimento e idêntica a qualquer porção da seqüência mostrada em SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26,

35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Tais polipeptídeos podem incluir, sem limitação, aqueles polipeptídeos contendo uma seqüência de aminoácidos representada em uma linha simples de seqüência mostrada na figura 7, 11, 15, 19, 24, 26, 28, 30, ou 50 desde que cada linha de seqüência mostrada nestas figuras, com a possível exceção da última linha, proporcione uma seqüência de aminoácidos contendo pelo menos 50 resíduos.

Em adição, a invenção provê polipeptídeos que apresenta uma variação da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a invenção provê polipeptídeos contendo uma seqüência de aminoácidos mostrada em SQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161 que contém uma inserção simples, uma supressão simples, uma substituição simples, inserções múltiplas, supressões múltiplas, substituições múltiplas, ou qualquer combinação das mesmas (por exemplo, supressão simples junto com inserções múltiplas). Tais polipeptídeos podem conter uma seqüência de aminoácidos que compartilha pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, ou 99 por cento de identidade de seqüência com a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161.

A invenção provê múltiplos exemplos de polipeptídeos contendo uma seqüência de aminoácidos tendo uma variação de uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161. Por exemplo, a Figura 9 provê a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 alinhada com três outras seqüências de aminoácidos. Exemplos de variações da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 incluem, sem limitação, qualquer variação da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 provida na Figura 9. Tais variações são providas na Figura 9 em que uma comparação do resíduo de aminoácido (ou sua falta) em uma particular posição da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 com o resíduo de aminoácido (ou sua falta) na mesma posição alinhada de qualquer das outras três seqüências de aminoácidos de Figura 9 (isto é, SEQ ID NOs: 6, 7 e 8) provê uma lista de específicas mudanças para a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2. Por exemplo, "k" na posição 17 de SEQ ID NO: 2 pode ser

substituído com "p" ou "h" como indicado na Figura 9. Como também indicado na Figura 9, "v" na posição 125 de SEQ ID NO: 2 pode estar substituído com um "i" ou "f". Será apreciado que a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 pode conter qualquer número de variações assim como qualquer combinação de tipos de variações. Por exemplo, a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 pode conter uma variação provida na Figura 9 ou mais de uma (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100 ou mais) das variações providas na Figura 9. É notado que as seqüências de aminoácidos providas na Figura 9 podem ser polipeptídeos tendo atividade CoA transferase.

10 A invenção também provê polipeptídeos contendo uma seqüência de aminoácidos que contém uma variante de uma porção da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 como mostrado na Figura 9 e aqui descrito.

Da mesma maneira, a Figura 13 provê variações de SEQ ID NO: 10 e suas porções; a Figura 17 provê variações de SEQ ID NO: 18 e suas porções; a Figura 21 provê variações de SEQ ID NO: 26 e suas porções; a 15 Figura 33 provê variações de SEQ ID NO: 41 e suas porções, as figuras 40, 41 e 42 provêm variações de SEQ ID NO: 39; e Figura 52 provê variações de SEQ ID NO: 141 e suas porções.

Polipeptídeos tendo uma seqüência de aminoácidos variante 20 podem reter atividade enzimática. Tais polipeptídeos podem ser produzidos através de manipulação de seqüência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo usando-se procedimentos padrão tais como mutagênese de sítio – direcionado ou PCR. Um tipo de modificação inclui a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos por resíduos de aminoácidos tendo uma similar propriedade bioquímica. Por exemplo, um polipeptídeo pode ter uma 25 seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 35, 37, 39, 41, 141, 160 ou 161 com uma ou mais substituições conservativas.

Mudanças mais substanciais podem ser obtidas através de seleção de substituições que são menos conservativas que aquelas na Tabela 1, 30 isto é, selecionando resíduos que diferem mais significativamente em seu efeito sobre manutenção: (a) a estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação de folha ou

helicoidal; (b) a carga ou hidrofobicidade do polipeptídeo no sítio alvo; ou (c) o volume da cadeia lateral. As substituições que, em geral, são esperadas produzirem as maiores mudanças em função de polipeptídeo são aquelas onde: (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, serina ou treonina é substituído por um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucina, isoleucina, fenil alanina, valina ou alanina; (b) uma cisteína ou prolina é substituída por qualquer outro resíduo; (c) um resíduo tendo uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo, lisina, arginina, ou histidina, é substituído por um resíduo eletronegativo, por exemplo, ácido glutâmico ou ácido aspártico; ou (d) um resíduo tendo uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenil alanina, é substituído por um não tendo uma cadeia lateral, por exemplo, glicina. Os efeitos destas substituições de aminoácidos (ou outras supressões ou adições) podem ser avaliados para polipeptídeos tendo atividade enzimática através de análise de habilidade do polipeptídeo catalisar a conversão do mesmo substrato como o polipeptídeo nativo relacionado para o mesmo produto como o polipeptídeo nativo relacionado. Da mesma maneira, polipeptídeos tendo 5, 10, 20, 30, 40, 50 ou menos substituições conservativas são providos pela invenção.

Polipeptídeos e ácido nucléico codificando polipeptídeo podem ser produzidos através de técnicas padrão de mutagênese de DNA, por exemplo, mutagênese de iniciador M13. Detalhes destas técnicas são providos em Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, Ch. 15. Moléculas de ácidos nucléicos podem conter alterações de uma região codificante para adaptar tendência de utilização de códon do particular organismo no qual a molécula é para ser introduzida.

Alternativamente, a região codificante pode ser alterada tomando-se vantagem da degenerescência do código genético para alterar a seqüência codificante em uma maneira tal que, enquanto a seqüência de ácido nucléico é substancialmente alterada, ela não obstante codifica um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos idêntica ou substancialmente similar à seqüência de aminoácidos nativa. Por exemplo, o nono resíduo de

aminoácido da seqüência mostrada em SEQ ID NO: 2 é alanina, que é codificada no quadro de leitura aberto pelo tripleto códon nucleotídeo GCT. Devido à degenerescência do código genético, três outros tripletos de códon de nucleotídeo – GCA, GCC, e GCG – também codificam alanina. Assim, a seqüência de ácidos nucleicos do quadro de leitura aberto pode ser alterada nesta posição para qualquer destes três códons sem afetar a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo codificado ou as características do polipeptídeo. Baseado na degenerescência do código genético, variantes de ácidos nucleicos podem ser derivadas de uma seqüência de ácidos nucleicos aqui mostrada usando-se uma técnica padrão de mutagênese de DNA como aqui descrita, ou através de síntese de seqüências de ácido nucleico. Assim, esta invenção também encampa moléculas de ácidos nucleicos que codificam o mesmo polipeptídeo mas variam em seqüência de ácidos nucleicos em virtude da degenerescência do código genético.

15 IV. Processos de fabricação de 3-HP e outros ácidos orgânicos

Cada etapa provida nos caminhos mostrados em Figuras 1-5, 43-44, 54, e 55 pode ser realizada dentro de uma célula (in vivo) ou fora de uma célula (in vitro, por exemplo, em um recipiente ou coluna). Adicionalmente, os produtos ácidos orgânicos podem ser gerados através de uma combinação de síntese in vivo e síntese in vitro. Além disso, a etapa de síntese in vitro, ou etapas, pode ser através reação química ou reação enzimática.

Por exemplo, um microorganismo aqui provido pode ser usado para desempenhar as etapas providas na Figura 1, ou um extrato contendo polipeptídeos tendo as indicadas atividades enzimáticas pode ser usado para desempenhar as etapas providas na Figura 1. Em adição, tratamentos químicos podem ser usados para desempenharem as conversões providas nas Figuras 1-5, 43-44, 54, e 55. Por exemplo, acrilil-CoA pode ser convertido em acrilato por hidrólise. Outros tratamentos químicos incluem, sem limitação, trans-esterificação para converter acrilato em um éster de acrilato.

Fontes de carbono apropriadas como pontos de partida para bioconversão incluem carboidratos e intermediários sintéticos. Exemplos de

carboidratos que células são capazes de metabolizar a piruvato incluem açúcares tais como dextrose, triglicerídeos e ácidos graxos.

Adicionalmente, produtos químicos intermediários podem ser pontos de partida. Por exemplo, ácido acético e dióxido de carbono podem ser introduzidos em um caldo de fermentação. Acetil-CoA, malonil-CoA, e 3-HP podem ser sequencialmente produzidos usando-se um polipeptídeo tendo atividade CoA sintase, um polipeptídeo tendo atividade acetil-CoA carboxilase, e um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase. Outros pontos de partida químicos intermediários úteis podem incluir ácido propiônico, ácido acrílico, ácido pirúvico, e beta alanina.

A. Expressão de Polipeptídeos

Os polipeptídeos aqui descritos podem ser produzidos individualmente em uma célula hospedeira ou em combinação em uma célula hospedeira. Além disso, os polipeptídeos tendo uma particular atividade enzimática podem ser um polipeptídeo que está tanto ocorrendo naturalmente como ocorrendo não-naturalmente. Um polipeptídeo ocorrendo naturalmente é qualquer polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos como encontrada na natureza, incluindo polipeptídeos tipo selvagem e polimórficos. Tais polipeptídeos ocorrendo naturalmente podem ser obtidos a partir de quaisquer espécies incluindo, sem limitação, espécies animal (por exemplo, mamífero), planta, fungo, e bacterial. Um polipeptídeo ocorrendo não-naturalmente é qualquer polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos que não é encontrada em natureza. Assim, um polipeptídeo ocorrendo não-naturalmente pode ser uma versão mutante de um polipeptídeo ocorrendo naturalmente, ou um polipeptídeo engenheirado. Por exemplo, um polipeptídeo ocorrendo não-naturalmente tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase pode ser uma versão mutante de um polipeptídeo ocorrendo naturalmente tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase que retém, pelo menos, alguma atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Um polipeptídeo pode sofrer mutação através de, por exemplo, adições, supressões, substituições de seqüências, ou combinações das mesmas.

A invenção provê células geneticamente modificadas que podem

ser usadas para desempenhar uma ou mais etapas das etapas nos caminhos metabólicos aqui descritos ou as células geneticamente modificadas podem ser usadas para produção de polipeptídeos mostrados para subsequente uso in vitro. Por exemplo, um microorganismo individual pode conter

5 ácido nucléico exógeno de modo que cada um dos polipeptídeos necessários para desempenhar as etapas mostradas nas Figuras 1, 2 3, 4, 5, 43, 44, 54 ou 55 seja expresso. É importante notar que tais células podem conter qualquer número de moléculas e ácido nucléico exógeno. Por exemplo, uma particular célula pode conter seis moléculas de ácido nucléico exógeno com

10 cada uma codificando um dos seis polipeptídeos necessários para conversão de lactato em 3-HP como mostrado na Figura 1, ou uma célula particular pode produzir endogenamente polipeptídeos necessários para conversão de lactato em acrilil-CoA enquanto contendo ácido nucléico exógeno que codifica polipeptídeos necessários para converter acrilil-CoA em 3-HP.

15 Em adição, uma molécula de ácido nucléico exógeno simples pode codificar um ou mais de um polipeptídeo. Por exemplo, uma molécula de ácido nucléico exógeno simples pode conter seqüências que codificam três diferentes polipeptídeos. Ainda, as células aqui descritas podem conter uma cópia simples, ou múltiplas cópias (por exemplo, cerca de 5,10, 20, 35,

20 50, 75, 100 ou 150 cópias), de uma particular molécula de ácido nucléico exógeno. Por exemplo, uma particular célula pode conter cerca de 50 cópias das construções mostradas nas Figuras 34, 35, 36, 37, 38 ou 45. Novamente, as células aqui descritas podem conter mais de uma particular molécula de ácido nucléico exógeno. Por exemplo, uma célula particular pode conter

25 cerca de 50 cópias de moléculas de ácido nucléico exógeno X assim como cerca de 75 cópias de moléculas de ácido nucléico exógeno Y.

Em uma outra modalidade, uma célula dentro do escopo da invenção pode conter uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil CoA desidratase. Tais

30 células podem ter qualquer nível de atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Por exemplo, uma célula contendo uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-

CoA desidratase pode ter atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase com uma atividade específica maior que cerca de 1mg de 3-HP-CoA formado por grama em peso de célula seca por hora (por exemplo, maior que cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, ou mais mg de 3-HP-CoA formados por grama em peso de célula seca por hora). Alternativamente, uma célula pode ter atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase de modo que um extrato de célula a partir de 1×10^6 células têm uma atividade específica maior que cerca de 1 μ g de 3-HP-CoA formado por mg de proteína total por 10 minutos (por exemplo, maior que cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, ou mais μ g de 3-HP-CoA formados por mg de proteína total per 10 minutos).

Uma molécula de ácido nucléico codificando um polipeptídeo tendo atividade enzimática pode ser identificada e obtida usando-se qualquer processo como aqueles aqui mostrados. Por exemplo, moléculas de ácidos nucléicos que codificam um polipeptídeo tendo atividade enzimática podem ser identificadas e obtidas usando-se procedimentos e técnicas comuns de clonagem molecular ou síntese química de ácido nucléico, incluindo PCR. Em adição, técnicas padrão de seqüenciamento de ácido nucléico e programas de software que traduzem seqüências de ácidos nucléicos em seqüências de aminoácidos baseadas em código genético podem ser usados para determinar se ou não um particular ácido nucléico tem qualquer homologia de seqüência com polipeptídeos enzimáticos conhecidos. Software de alinhamento de seqüência tal como MEGALIGN® (DNASTAR, Madison, WI, 1997) pode ser usado para comparar várias seqüências. Em adição, moléculas de ácido nucléico codificando polipeptídeos enzimáticos conhecidos podem ser mutantes usando-se técnicas comuns de clonagem molecular (por exemplo, mutagênese de sítio – direcionado). Mutações possíveis incluem, sem limitação, supressões, inserções e substituições de base, assim como combinações de supressões, inserções e substituições de base. Ainda, bases de dados de ácidos nucléicos e aminoácidos (por exemplo, GenBank®) podem ser usadas para identificação de uma seqüência de

ácidos nucleicos que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática. Resumidamente, qualquer seqüência de aminoácidos tendo alguma homologia a um polipeptídeo tendo atividade enzimática, ou qualquer seqüência de ácidos nucleicos tendo alguma homologia a uma seqüência codificando um polipeptídeo tendo atividade enzimática pode ser usada como uma dúvinda para busca em GenBank®. Os polipeptídeos identificados então podem ser analisados para determinar se ou não eles exibem atividade enzimática.

Em adição, técnicas de hibridização de ácido nucleico podem ser usadas para identificar e obter uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática. Resumidamente, qualquer molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo enzimático conhecido, ou seu fragmento, pode ser usada como uma sonda para identificar moléculas de ácido nucleico similares através de hibridização sob condições de rigorosidade moderada a alta. Tais moléculas de ácidos nucleicos similares então podem ser isoladas, seqüenciados e analisadas para determinar se o polipeptídeo codificado tem atividade enzimática.

Técnicas de clonagem de expressão também podem ser usadas para identificação e obtenção de uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática. Por exemplo, um substrato conhecido para interagir com um particular polipeptídeo enzimático pode ser usado para selecionar uma biblioteca de mostra de fago contendo aquele polipeptídeo enzimático. Bibliotecas de mostra de fago podem ser geradas como descrito em outro lugar (Burritt et al., Anal. Biochem. 238:1-13 (1990)), ou podem ser obtidas de fornecedores comerciais como Novagen (Madison, WI).

Ainda, técnicas de seqüenciamento de polipeptídeos podem ser usadas para identificar e obter uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática. Por exemplo, um polipeptídeo purificado pode ser separado por eletroforese de gel, e sua seqüência de aminoácidos determinada através de, por exemplo, técnicas de microseqüenciamento de aminoácido. Uma vez determinada, a seqüência de aminoácidos pode ser usada para designar iniciadores oligonucleotídeo degene-

rados. Iniciadores oligonucleotídeos degenerados podem ser usados para obter-se o ácido nucléico codificando o polipeptídeo por PCR. Uma vez obtido, o ácido nucléico pode ser seqüenciado, clonado em um apropriado vetor de expressão, e introduzido em um microorganismo.

5 Qualquer processo pode ser usado para introduzir uma molécula de ácido nucléico exógeno em uma célula. De fato, muitos processos para introdução de ácido nucléico em microorganismos, tais como bactérias e levedura são conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, choque térmico, lipofecção, eletroporação, conjugação, fusão de protoplastos e liberação biolística são processos comuns para introdução de ácido
10 nucléico em células de bactérias e leveduras. Ver, por exemplo, Ito et al., J. Bacteriol. 153:163-168 (1983); Durrens et al., Curr. Genet. 18:7-12 (1990); e Becker and Guarente, Methods in Enzymology 194:182-187 (1991).

 Uma molécula de ácido nucléico exógeno contida em uma particular célula da invenção pode ser mantida dentro desta célula em qualquer
15 forma. Por exemplo, moléculas de ácido nucléico exógeno podem ser integradas no genoma da célula ou mantidas em um estado episomal. Em outras palavras a célula da invenção pode ser um transformante estável ou transiente. Novamente, um microorganismo aqui descrito pode conter uma
20 cópia simples, ou cópias múltiplas (por exemplo, cerca de 5, 10, 20, 35, 50, 75, 100 ou 150 cópias), de uma particular molécula de ácido nucléico exógeno como aqui descrito.

 Processos para expressão de uma seqüência de aminoácidos a partir de uma molécula de ácido nucléico exógeno são bem conhecidos por
25 aqueles versados na técnica. Tais processos incluem, sem limitação, construção de um ácido nucléico de modo que um elemento regulador promova a expressão de uma seqüência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo. Tipicamente, elementos reguladores são seqüências de DNA que regulam a expressão de outras seqüências de DNA no nível de transcrição.
30 Assim, elementos reguladores incluem, sem limitação, promotores, aperfeiçoadores, e semelhantes. Qualquer tipo de promotor pode ser usado para expressar uma seqüência de aminoácidos a partir de uma molécula de ácido

nucléico exógeno. Exemplos de promotores incluem, sem limitação, promotores constitutivos, promotores específicos de tecido, e promotores responsivos ou não-responsivos a um estímulo particular (por exemplo, luz, oxigênio, concentração química e semelhantes). Além disso, processos para expressão de um polipeptídeo a partir de uma molécula de ácido nucléico exógeno em células tais como células bacteriais e células de levedura são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, construções de ácidos nucléicos que são capazes de expressar polipeptídeos exógenos dentro de *E. coli* são bem conhecidos. Ver, por exemplo, Sambrook et al.,
 5 Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, segunda edição (1989).
 10

B. Produção de ácidos orgânicos e produtos relacionados via células hospedeiras

As seqüências de ácidos nucléicos e aminoácidos aqui providas
 15 podem ser usadas com células para produção de 3-HP e/ou outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, ésteres de 3-HP, e 3-HP polimerizado. Tais células podem ser de quaisquer espécies incluindo aquelas listadas dentro das páginas de web de taxonomia no National Institute of Health patrocinadas pelo
 20 governo dos Estados Unidos (www.ncbi.nlm.nih.gov). As células podem ser eucarióticas ou procarióticas. Por exemplo, células geneticamente modificadas da invenção podem ser células mamíferas (por exemplo, células humanas, murino e bovinas), células de plantas (por exemplo, células de milho, trigo, arroz e soja), células de fungos (por exemplo, células de *Aspergillus* e
 25 *Rhizopus*) células de levedura ou células bacteriais (por exemplo, células de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Clostridium*). Uma célula da invenção também pode ser um microorganismo. O termo "microorganismo" como aqui usado refere-se a qualquer organismo microscópico incluindo, sem limitação, bactérias, algas, fungos e protozoários. Assim, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, e *Pichia postoris* são considerados microorganismos e podem ser usados como aqui
 30 descrito.

Tipicamente, uma célula da invenção é geneticamente modificada de modo que um particular composto orgânico é produzido. Em uma modalidade, a invenção provê células que fabricam 3-HP a partir de PEP. Exemplos de caminhos biossintéticos que podem ser usados por células para fabricação de 3-HP são mostrados em Figuras 1-5, 43-44, 54 e 55.

Genericamente, células que são geneticamente modificadas para sintetizar um particular composto orgânico contêm uma ou mais moléculas de ácido nucléico exógeno que codificam polipeptídeos tendo específicas atividades enzimáticas. Por exemplo, um microorganismo pode conter ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidroxi propionil-CoA desidratase. Neste caso, acrilil-CoA pode ser convertido em ácido 3-hidróxi propiônico-CoA que pode conduzir à produção de 3-HP. É notado que uma célula pode receber uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo uma atividade enzimática que catalisa a produção de um composto normalmente não produzido por aquela célula. Alternativamente, uma célula pode receber uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo uma atividade enzimática que catalisa a produção de um composto que é normalmente produzido por aquela célula. Neste caso, a célula geneticamente modificada pode produzir mais do composto, ou pode produzir o composto mais eficientemente, que uma célula similar não tendo a modificação genética.

Em uma modalidade, a invenção provê uma célula contendo uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática que conduz à formação de 3-HP. É notado que o 3-HP produzido pode ser secretado da célula, eliminado a necessidade de rompimento de membranas de células para recuperação de composto orgânico. Tipicamente, a célula da invenção produz 3-HP com a concentração sendo pelo menos cerca de 100 mg por L (por exemplo, pelo menos cerca de 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 25 g/l, 50 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l ou 120 g/l). Quando determinando o rendimento de um composto orgânico tal como 3-HP para uma célula particular, qualquer processo pode ser usado. Ver, por exemplo, Applied Environmental Microbiolgy 59(12):4261-4265 (1993). Tipicamente,

uma célula dentro do escopo da invenção tal como um microorganismo catabolisa uma fonte de carbono hexose tal como glicose. Uma célula, entretanto, pode catabolizar uma variedade de fontes de carbono tais como açúcares pentose (por exemplo, ribose, arabinose, xilose e lixose), ácidos graxos, acetato, ou gliceróis. Em outras palavras, uma célula dentro do escopo da invenção pode utilizar uma variedade de fontes de carbono.

Como aqui descrito, uma célula dentro do escopo da invenção pode conter uma molécula de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo atividade enzimática que conduz à formação de 3-HP ou outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, poli acrilato, acrilato – ésteres, 3-HP-ésteres, e poli 3-HP. Processos de identificação de células que contêm ácido nucléico exógeno são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Tais processos incluem, sem limitação, técnicas de hibridização de ácido nucléico e PCR tais como análises Northern e Southern(ver hibridização aqui descrita). Em alguns casos, técnicas bioquímicas e química imuno histo podem ser usadas para determinar se uma célula contém um particular ácido nucléico através de detecção de expressão do polipeptídeo codificado por aquela particular molécula de ácido nucléico. Por exemplo, um anticorpo tendo especificidade para um polipeptídeo pode ser usado para determinar se ou não uma particular célula contém ácido nucléico codificando aquele polipeptídeo. Ainda, técnicas bioquímicas podem ser usadas para determinar se uma célula contém uma particular molécula de ácido nucléico codificando um polipeptídeo tendo atividade enzimática através de detecção de um produto orgânico produzido como um resultado da expressão do polipeptídeo tendo atividade enzimática. Por exemplo, detecção de 3-HP após introdução de ácido nucléico exógeno que codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase em uma célula que normalmente não expressa um tal polipeptídeo pode indicar que esta célula não somente contém a molécula de ácido nucléico exógeno introduzida mas também expressa o polipeptídeo codificado a partir daquela molécula de ácido nucléico exógeno introduzida. Processos para detecção de específicas atividades enzimáticas ou a presença de particulares

produtos orgânicos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, a presença de um composto orgânico tal como 3-HP pode ser determinada como descrito em outro local. Ver, Sullivan and Clarke, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 38:514-518 (1955).

5 C. Células com Reduzida Atividade de Polipeptídeo

A invenção também provê células geneticamente modificadas tendo reduzida atividade de polipeptídeo. O termo "reduzida" como aqui usado com relação a uma célula e uma particular atividade de polipeptídeo refere-se a um menor nível de atividade que aquele medido em uma célula comparável da mesma espécie. Por exemplo, um particular microorganismo com falta de atividade enzimática X é considerado ter reduzida atividade enzimática X se um microorganismo comparável tem pelo menos alguma atividade enzimática X. É notado que uma célula pode ter a atividade de qualquer tipo de polipeptídeo reduzida incluindo, sem limitação, enzimas, fatores de transcrição, transportadores, receptores, moléculas sinais e semelhantes. Por exemplo, uma célula pode conter uma molécula de ácido nucléico exógeno que interrompe uma seqüência reguladora e/ou codificante de um polipeptídeo tendo atividade piruvato descarboxilase ou atividade álcool desidrogenase. Interrupção de expressão de piruvato descarboxilase e/ou álcool desidrogenase pode conduzir à acumulação de lactato assim como produtos produzidos de lactato tais como 3-HP, 1,3-propanodiol, ácido acrílico, poli acrilato, acrilato ésteres, ésteres de 3-HP e poli 3-HP. É também notado que reduzidas atividade de polipeptídeo podem ser o resultado de menor concentração de polipeptídeo, menor atividade específica de um polipeptídeo, ou suas combinações. Muitos processos diferentes podem ser usados para obter-se uma célula tendo reduzida atividade de polipeptídeo. Por exemplo, uma célula pode ser engenheirada para ter uma seqüência reguladora ou seqüência codificando polipeptídeo interrompida usando-se tecnologia de knock-out ou mutagênese comum. Ver, por exemplo, Methods in Yeast Genetics (1997 edition), Adams, Gottschling, Kaiser, and Sterns, Cold Spring Harbor Press (1998). Alternativamente, tecnologia anti-sentido pode ser usada para reduzir a atividade de um particular polipeptídeo. Por exemplo,

uma célula pode ser engenheirada para conter um cDNA que codifica uma molécula anti – sentido que evita que um polipeptídeo seja traduzido. O termo "molécula anti-sentido" como aqui usado encampa qualquer molécula de ácido nucléico ou análogo de ácido nucléico (por exemplo, ácidos peptídeo

5 nucléicos) que contém uma seqüência que corresponde à fita codificante de um polipeptídeo endógeno. Uma molécula anti-sentido pode ter seqüências flanqueantes (por exemplo, seqüências reguladoras). Assim, moléculas anti-sentido podem ser ribozimas ou oligonucleotídeos anti-sentido. Uma ribozima pode ter qualquer estrutura genérica incluindo, sem limitação, estruturas

10 de grampo de cabelo, cabeça de martelo, ou cabeça de machado, contanto que a molécula clive RNA. Ainda, silenciamento de gene pode ser usado para reduzir a atividade de um particular polipeptídeo.

Uma célula tendo reduzida atividade de um polipeptídeo pode ser identificada usando-se qualquer processo. Por exemplo, ensaios de atividade de enzima tais como aqueles aqui descritos podem ser usados para

15 identificar células tendo uma reduzida atividade de enzima.

Um polipeptídeo tendo (1) a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 39 (o polipeptídeo OS17) ou (2) uma seqüência de aminoácidos compartilhando pelo menos cerca de 60 por cento de identidade de

20 seqüência com a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 39 pode ter três domínios funcionais: um domínio tendo atividade CoA-sintatase, um domínio tendo atividade 3-HP-CoA desidratase e um domínio tendo atividade CoA-redutase. Tais polipeptídeos podem ser seletivamente modificados por mutação e/ou supressão de domínios de modo que uma ou

25 duas das atividades enzimáticas sejam reduzidas. Redução de atividade desidratase do polipeptídeo OS17 pode fazer com que acrilil-CoA seja criada a partir de propionil-CoA. A acrilil-CoA então pode ser contactada com um polipeptídeo tendo atividade CoA hidrolase para produzir acrilato a partir de propionato (Figura 43). Similarmente, acrilil-CoA pode ser criada a partir de

30 3-HP através de uso, por exemplo, de um polipeptídeo OS17 tendo reduzida atividade redutase.

D. Produção de Ácidos Orgânicos e Produtos Relacionados através

de Técnicas In Vitro

Em adição, polipeptídeos purificados tendo atividade enzimática podem ser usados sozinhos ou em combinação com células para produção de 3-HP ou outros compostos orgânicos tais como 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, ésteres de 3-HP e 3-HP polimerizado. Por exemplo, uma preparação contendo um polipeptídeo substancialmente puro tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase pode ser usado para catalisar a formação de 3-HP-CoA, um precursor para 3-HP. Ainda, extratos livres de célula contendo um polipeptídeo tendo atividade enzimática podem ser usados sozinhos ou em combinação com polipeptídeos e/ou células purificadas para produção de 3-HP. Por exemplo, um extrato livre de célula contendo um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase pode ser usado para formar lactil-CoA, enquanto um microorganismo contendo polipeptídeos tem as atividades enzimáticas necessárias para catalisar as reações necessárias para formar 3-HP a partir de lactil-CoA pode ser usado para produzir 3-HP. Qualquer processo pode ser usado para produção de um extrato livre de células. Por exemplo, choque osmótico, sonificação, e/ou repetidos ciclos de congelamento – descongelamento seguido por filtração e/ou centrifugação podem ser usados para produção de um extrato livre de células a partir de células intactas.

É notado que uma célula, polipeptídeo purificado, e/ou extrato livre de célula pode ser usado para produzir 3-HP que é, por sua vez, quimicamente tratado para produzir um outro composto. Por exemplo, um microorganismo pode ser usado para produzir 3-HP, enquanto um processo químico é usado para modificar 3-HP em um derivado tal como 3-HP polimerizado ou um éster de 3-HP. Da mesma maneira, um processo químico pode ser usado para produzir um particular composto que é, por sua vez, convertido em 3-HP ou outro composto orgânico (por exemplo, 1,3-propanodiol, ácido acrílico, acrilato polimerizado, ésteres de acrilato, ésteres de 3-HP, e 3-HP polimerizado) usando uma célula, polipeptídeo substancialmente puro, e/ou extrato livre de célula aqui descrita. Por exemplo, um processo químico pode ser usado para produzir acrilil-CoA, enquanto um microorganismo pode

ser usado para converter acrilil-CoA em 3-HP.

E. Fermentação de Células Para Produção de Ácidos Orgânicos

Tipicamente, 3-HP é produzido através de provimento de uma célula de produção, tal como um microorganismo, e cultivando o microorga-

5 nismo com meio de cultura de modo que 3-HP seja produzido. Em geral, os meios de cultura e/ou condições de cultura podem ser tais de modo que os microorganismos cresçam para uma densidade adequada e produzam 3-HP eficientemente. Para processos de produção de larga escala, qualquer processo pode ser usado tais como aqueles descritos em outro lugar (Manual of

10 Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition, Editors: A.L. Demain and J.E. Davies, ASM Press; and Principles of Fermentation Technology, P.F. Stanbury and A. Whitaker, Pergamon). Resumidamente, uma tanque grande (por exemplo, um tanque de 100 galões, 200 galões, 500 galões, ou mais) contendo apropriado meio de cultura com, por exemplo, uma fonte de

15 carbono glicose é inoculada com um particular microorganismo. Após inoculação, os microorganismos são incubados para permitir que biomassa seja produzida. Uma vez a desejada biomassa seja atingida, o caldo contendo os microorganismos pode ser transferido para um segundo tanque. Este segundo tanque pode ser de qualquer tamanho. Por exemplo, o segundo tan-

20 que pode ser maior, menor, ou do mesmo tamanho como o primeiro tanque. Tipicamente, o segundo tanque é maior que o primeiro de modo que o meio de cultura adicional pode ser adicionado ao caldo a partir do primeiro tanque. Em adição, o meio de cultura dentro deste segundo tanque pode ser o mesmo, ou diferente, daquele usado no primeiro tanque. Por exemplo, o primeiro

25 tanque pode conter meio com xilose, enquanto o segundo tanque contém meio com glicose.

Uma vez transferidos, os microorganismos podem ser incubados para permitir a produção de 3-HP. Uma vez produzido, qualquer processo pode ser usado para isolar o 3-HP. Por exemplo, técnicas de separação co-

30 muns podem ser usadas para remover a biomassa do caldo, e procedimentos de isolamento comuns (por exemplo, extração, destilação e procedimentos de troca de íons) podem ser usadas para obter-se o 3-HP a partir do

caldo livre de microorganismo. Em adição, 3-HP pode ser isolado enquanto ele está sendo produzido, ou ele pode ser isolado do caldo após a fase de produção de produto ter sido terminada.

5 F. Produtos Criados a Partir das Rotas Biossintéticas Mostradas

Os compostos orgânicos produzidos a partir de qualquer uma das etapas providas nas Figuras 1-5, 43-44, 54, e 55 podem ser quimicamente convertidos em outros compostos orgânicos. Por exemplo, 3-HP pode ser hidrogenado para formar 1,3-propanodiol, um monômero poliéster valioso. Hidrogenação de um ácido orgânico tal como 3-HP pode ser realizada usando-se qualquer processo tais como aqueles usados para hidrogenar ácido succínico e/ou ácido láctico. Por exemplo, 3-HP pode ser hidrogenado usando-se um catalisador metal. Em um outro exemplo, 3-HP pode ser desidratado para formar ácido acrílico. Qualquer processo pode ser usado para realizar uma reação de desidratação. Por exemplo, 3-HP pode ser aquecido na presença de um catalisador (por exemplo, um metal ou catalisador ácido mineral) para formar ácido acrílico. Propanodiol também pode ser criado usando-se polipeptídeos tendo atividade óxido redutase (por exemplo, enzimas classe 1.1.1) in vitro ou in vivo.

20 V. Resumo de Metodologia Usada Para Criar Caminhos Biossintéticos Para Fabricação de 3-HP a Partir de PEP

A invenção provê processos de fabricação de 3-HP e produtos relacionados a partir de PEP através do uso de caminhos biossintéticos. Exemplos ilustrativos incluem processos envolvendo a produção de 3-HP através de um intermediário lactato, um intermediário malonil-CoA, e um intermediário β -alanina.

A. Caminho Biossintético para fabricação de 3-HP através de um intermediário ácido láctico

Um caminho biossintético que permite a produção de 3-HP a partir de PEP foi construído (Figura 1). Este caminho envolveu uso de vários polipeptídeos que foram clonados e expressos como aqui descrito. Células de *M. elsdenii* (ATCC 17753) foram usadas como uma fonte de DNA genô-

mico. Iniciadores foram usados para identificar e clonar uma seqüência de ácido nucléico codificando um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase (SEQ ID NO: 1). O polipeptídeo foi subsequentemente testado para atividade enzimática e verificado ter atividade CoA transferase.

5 Similarmente, iniciadores PCR foram usados para identificar seqüências de ácidos nucléicos a partir de DNA genômico de *M. elsdenii* que codificou um ativador E1, E2 α , e polipeptídeos E2 β (SEQ ID NOs: 9, 17, e 25, respectivamente). Estes polipeptídeos foram subsequentemente mostrados terem atividade lactil-CoA desidratase.

10 Células de *Chloroflexus aurantiacus* (ATCC 29365) foram usadas como uma fonte de DNA genômico. Clonagem inicial conduziu à identificação de seqüências de ácidos nucléicos: OS17 (SEQ ID NO: 129) e OS19 (SEQ ID NO: 40). Ensaios subseqüentes revelaram que OS17 codifica um polipeptídeo tendo atividade CoA sintase, atividade desidratase, e atividade
15 desidrogenase (propionil-CoA sintase). Ensaios subseqüentes também revelaram que OS19 codifica um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (também referida como atividade acrilil-CoA hidratase).

Vários óperons foram construídos para uso em *E. coli*. Estes óperons permitem a produção de 3-HP em células bacteriais. Experimentos
20 adicionais permitiram a expressão destes polipeptídeos em levedura, que pode ser usada para produzir 3-HP.

B. Caminho biossintético para fabricação de 3-HP através de um intermediário malonil-CoA

Um outro caminho conduzindo à produção de 3-HP a partir de
25 PEP foi construído. Este caminho usou um polipeptídeo tendo atividade acetil CoA carboxilase que foi isolado de *E.coli* (exemplo 9), e um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase que foi isolado de *Chloroflexus aurantiacus* (Exemplo 10). A combinação destes dois polipeptídeos permite a produção de 3-HP a partir de acetil-CoA (Figura 44).

30 Ácido nucléico codificando um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase (SEQ ID NO: 140) foi clonado, seqüenciado e expresso. O polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase foi então usado para

fabricar 3-HP.

C. Caminhos biossintéticos para fabricação de 3-HP através de um intermediário beta-alanina

Em geral, procariotas e eucariotas metabolizam glicose através do caminho Embden-Meyerhof-Parnas a PEP, um metabolito central em metabolismo de carbono. PEP gerado de glicose é tanto carboxilado a oxaloacetato ou é convertido a piruvato. Carboxilação de PEP a oxaloacetato pode ser catalisada por um polipeptídeo tendo atividade PEP carboxilase, um polipeptídeo tendo atividade PEP carbóxi cinase, ou um polipeptídeo tendo atividade PEP transcarboxilase. Piruvato que é gerado a partir de PEP através de um polipeptídeo tendo atividade piruvato cinase também pode ser convertido a oxaloacetato através de um polipeptídeo tendo atividade piruvato carboxilase.

Oxaloacetato gerado tanto a partir de PEP ou piruvato pode atuar como um precursor para produção de ácido aspártico. Esta conversão pode ser realizada por um polipeptídeo tendo atividade aspartato amino transferase, que transfere um grupo amino de glutamato para oxaloacetato. Glutamato consumido nesta reação pode ser regenerado pela ação de um polipeptídeo tendo atividade glutamato desidrogenase ou através da ação de um polipeptídeo tendo atividade 4,4-amino butirato amino transferase. A descarboxilação de aspartato a beta-alanina é catalisada por um polipeptídeo tendo atividade aspartato descarboxilase. Beta alanina produzida através desta bioquímica pode ser convertida a 3-HP através de dois caminhos possíveis. Estes caminhos são providos nas Figuras 54 e 55.

As etapas envolvidas na produção de beta-alanina podem ser as mesmas para ambos os caminhos. Estas etapas podem ser realizadas por polipeptídeos endógenos nas células hospedeiras que convertem PEP a beta-alanina, ou estas etapas podem ser realizadas com tecnologia de DNA recombinante usando polipeptídeos conhecidos tais como polipeptídeos tendo atividade PEP-carbóxi cinase (4.1.1.32), atividade aspartato amino transferase (2.6.1.1), e atividade aspartato alfa-decarboxilase (4.1.1.11).

Como mostrado na Figura 54, um polipeptídeo tendo atividade

CoA transferase (por exemplo, um polipeptídeo tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 2) pode ser usado para converter beta –alanina a beta-alanil-CoA. Beta-alanil-CoA pode ser convertida a acrilil-CoA através de um polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônio liase (por exemplo, um polipeptídeo tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 160). Acrilil-CoA pode ser convertido a 3-HP-CoA usando um polipeptídeo tendo atividade 3-HP-CoA desidratase (por exemplo, um polipeptídeo tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 40). 3-HP-CoA pode ser convertido em 3-HP através de um polipeptídeo tendo uma atividade CoA transferase (por exemplo, um polipeptídeo tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 2).

Como mostrado na Figura 55, um polipeptídeo tendo atividade 4,4-amino butirato amino transferase (2.6.1.19) pode ser usado para converter beta – alanina em malonato semi-aldeído. O malonato semi-aldeído pode ser convertido em 3-HP usando-se tanto um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionato desidrogenase (1.1.1.59) como um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutirato desidrogenase.

Exemplos

Exemplo 1 – Clonagem de moléculas de ácido nucléico que codificam um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase

DNA genômico foi isolado de células de *Megasphaera elsdenii* (ATCC 17753) crescidas em meio 1053 reforçado com Clostridium sob condições anaeróbicas a 37°C em tubos de rolos por 12-14 horas. Uma vez crescidas, as células foram feitas pélete, lavadas com 5ml de uma solução Tris 10 mM, e novamente feitas péletes. O pélete foi ressuspenso em 1ml de Gentra Cell Suspension Solution onde foram adicionados 14,2 mg de lisozi-
ma e 4 µl de solução de proteinase K 20 mg/ml. A suspensão de células foi incubada a 37°C por 30 minutos. O DNA genômico foi então isolado usando-se um Gentra Genomic DNA Isolation Kit seguindo o protocolo provido. O DNA genômico precipitado foi reunido e seco ao ar por 10 minutos. O DNA genômico foi suspenso em 500 µl de uma solução Tris 10 mM e estocado a 4°C.

Dois iniciadores PCR para frente degenerados (CoAF1 e CoAF2) e três reversos degenerados (CoAR1, CoAR2 e CoAR3) foram projetados baseado em seqüências de propionato CoA transferase e aceto acetil CoA transferase conservadas (CoAF1 5'-GAAWSCGGYSCNATYGGYGG-3', SEQ ID NO: 49; CoAF2 5'-TTYTGYGGYRSBTTYACBGCWGG-3', SEQ ID NO: 50; CoAR1 5'-CCWGCVGTRA AVSYRCCRCARAA-3', SEQ ID NO: 51; CoAR2 5'-AARACDSMRCGTTTCVGTRATRATA-3', SEQ ID NO: 52; e CoAR3 5'-TCRAYRCCSGGWGCRA YTTC-3', SEQ ID NO: 53). Os iniciadores foram usados em todas as combinações lógicas em PCR usando Taq polimerase (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) e 1 ng de DNA genômico por µl de mistura de reação. PCR foi conduzida usando-se um programa PCR touchdown com 4 ciclos em uma temperatura de anelamento de 59°C, 4 ciclos a 57°C, 4 ciclos a 55°C, e 18 ciclos em 52°C. Cada ciclo usou uma etapa de desnaturação de 30 segundos a 94°C e uma extensão de 3 minutos a 72°C. O programa teve uma etapa de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C e uma etapa de extensão final de 4 minutos a 72°C. Tempo permitido para anelamento foi 45 segundos. As quantidades de iniciador de PCR usadas nas reações foram aumentadas 2-8 vezes acima de quantidades de PCR típicas dependendo da quantidade de degenerescência na extremidade 3' do iniciador. Em adição, reações PCR separadas contendo cada iniciador individual foram feitas para identificar produtos PCR resultantes de iniciadores degenerados simples. Cada produto de PCR (25 µl) foi separado por eletroforese usando gel agarose TAE (Tris-acetato-EDTA) 1%.

As combinações CoAF1-CoAR2, CoAF1-CoAR3, CoAF2-CoAR2, e CoAF2-CoAR3 produziram uma banda de 423, 474, 177, e 228 pb, respectivamente. Estas bandas emparelharam os tamanhos baseado em outras seqüências CoA transferase. Nenhuma banda foi visível a partir das reações de controle de iniciador individual. O fragmento CoAF1-CoAR3 (474 pb) foi isolado e purificado usando-se um kit Quiagem PCR (Quiagen Gel Extraction Kit (Quiagen Inc., Valencia, CA). Quatro µl da banda purificada foram ligados em vetor pCRII e transformados em células TOP10 de *E. coli* através de choque térmico usando-se um procedimento de clonagem TOPO (Invitro-

gen, Carlsbad, CA). Transformações foram revestidas sobre meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina (Amp) e 50 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galacto piranosídeo (X-gal). Colônias brancas, simples, foram revestidas sobre meios frescos e selecionadas em uma reação PCR usando os iniciadores CoAF1 e COAR3 para confirmar a presença da inserção.

DNA plasmídeo obtido usando um QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.) foi quantificado e usado para seqüenciamento de DNA com iniciadores M13R e M13F. Análise de seqüência revelou que o fragmento CoAF1-CoAR3 compartilhou similaridade de seqüência com seqüências de aceto acetil CoA transferase.

Caminhar no genoma foi realizado para obter-se a completa seqüência codificante. Os seguintes iniciadores para caminhar no genoma em ambas as direções, a montante e jusante foram projetados usando-se a porção da seqüência de fragmento CoAF1-CoAR3 de 474 pb que foi interna para os iniciadores degenerados (COAGSP1F 5'-GAATGTTTACTTCTGCGG-CACCTTCAC-3', SEQ ID NO:54; COAGSP2F 5'-GACCAGATCACTTTCAACG-GTTCCTATG-3', SEQ ID NO:55; COAGSP1R 5'-GCATAGGAACCGTTGAAA-GTGATCTGG-3', SEQ ID NO:56; and COAGSP2R 5'-GTTAGTACCGAAGTTG-CTGACGTTGATG-3', SEQ ID NO:57).

Os iniciadores COAGSP1F e COAGSP2F fazem face a jusante, enquanto os iniciadores COAGSP1R e COAGSP2R fazem face a montante. Em adição, os iniciadores COAGSP2F e COAGSP2R estão aninhados dentro de iniciadores COAGSP1F e COAGSP1R. Caminhar no genoma foi realizado usando-se o Universal Genome Walking kit (Clon Tech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) com a exceção de que adicionais bibliotecas foram geradas com enzimas NruI, Sca I, e Hinc II. Primeiro ciclo de PCR foi realizado em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler com 7 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 72°C, e 36 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 65°C com uma extensão final a 65°C por 4 minutos. Segundo ciclo de PCR usou 5 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 72°C, e 20 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 65°C com uma extensão final a 65°C por 4 minutos. O produto de primeiro e segundo ciclos (20 µl) foi separado por eletroforese

sobre um gel TAE agarose 1%. Produtos de amplificação foram obtidos com a biblioteca Stu I para a direção reversa. O produto de segundo ciclo de 1,5 Kb a partir desta biblioteca foi purificado sobre gel, clonado e seqüenciado. Análises de seqüência revelaram que a seqüência derivada de caminhar no

5 genoma sobrepôs-se com o fragmento CoAF1-CoAR3 e compartilhou similaridade de seqüência com outras seqüências tais como seqüências de aceto acetil CoA transferase (Figuras 8-9).

Ácido nucléico codificando a CoA transferase (propionil-CoA transferase ou pct) de *Megasphaera elsdenii* foi amplificada por PCR a partir

10 de DNA cromossômico usando o seguinte programa em PCR: 25 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturar, 50°C por 30 segundos anelar e 72°C por 3 minutos para extensão (mais 2 segundos por ciclo). Os iniciadores foram projetados PCT-1.114 (5'-ATGAGAAAAGTAGAAATCATTAC-3'; SEQ ID NO: 58) e PCT-2.2045 (5'-GGCGGAAGTTGACGATAATG-3'; SEQ ID NO:

15 59). O resultante produto de PCR (cerca de 2 kb como julgado por eletroforese de gel agarose) foi purificado usando-se um Qiagen Inc., Valencia, CA). O produto purificado foi ligado a pETBlue-1 usando-se o Perfectly Blunt Kit (Novagen, Madison, WI). A reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen, Madison, WI) que foram

20 espargidas sobre placas LB agar suplementado com 50 µg/ml de carbenicilina, 40 µg/ml de IPTG, e 40 µg/ml X-Gal. Colônias brancas foram isoladas e selecionadas para a presença de inserções através de mapeamento de restrição. Isolatos com o correto padrão de restrição foram seqüenciados a partir de cada extremidade usando-se os iniciadores pETBlueUP e pETBlue-

25 DOWN (Novagen) para confirmar a seqüência nos pontos de ligação.

O plasmídeo foi transformado em células quimicamente competentes Tuner (DE3) pLacI (Novagen, Madison, WI), e expressão a partir da construção testada. Resumidamente, uma cultura foi cultivada por toda a noite para saturação e diluída 1:20 na manhã seguinte em meio LB fresco

30 com os apropriados antibióticos. A cultura foi cultivada a 37°C com aeração para uma OD₆₀₀ de cerca de 0,6. A cultura foi induzida com IPTG em uma concentração final de 100µM. A cultura foi incubada por duas horas adicio-

nais a 37°C com aeração. Alíquotas foram tomadas pré-indução e 2 horas pós-indução para análises SDS-PAGE. Uma banda do peso molecular esperado (55 653 Daltons prevista a partir da seqüência) foi observada após tratamento IPTG. Esta banda não foi observada em células contendo um plasmídeo carecendo de ácido nucléico codificando a transferase.

Extratos livres de células foram preparados para avaliação de atividade enzimática. Resumidamente, as células foram colhidas por centrifugação e rompidas por sonificação. A suspensão de células sonificada foi centrifugada para remoção de fragmento de células, e o sobrenadante foi usado nos ensaios.

Atividade transferase foi medida no seguinte ensaio. A mistura de ensaio usada conteve tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), acetato de sódio 200 mM, ditio bis nitrobenzoato (DTNB) 1 mM, oxalo acetato 500 µM, substrato Co-A 25 µM, e citrato sintase 3 µg/ml. Se presente, a CoA transferase transfere a CoA a partir de éster CoA para acetato para formar acetil-CoA. A citrato sintase adicionada condensa oxalo acetato e acetil-CoA para formar citrato e CoASH livre. CoASH livre complexa com DTNB, e a formação deste complexo pode ser medida por uma mudança na densidade ótica em 412 nm. A atividade da CoA transferase foi medida usando-se os seguintes substratos: lactil-CoA, propionil-CoA, acrilil-CoA, e 3-hidróxi propionil-CoA. As unidades/mg de proteína foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$(\Delta E/\text{minuto} \cdot V_f \cdot \text{fator diluição}) / (V_s \cdot 14,2) = \text{unidades/ml}$$

onde $\Delta E/\text{minuto}$ é a mudança em absorbância por minuto em 412 nm, V_f é o volume final da reação, e V_s é o volume de amostra adicionado. A concentração de proteína total do extrato livre de células foi cerca de 1 mg/ml assim as unidade/ml igualam-se a unidades/mg.

Extratos livres de células a partir de células contendo ácido nucléico codificando a CoA transferase exibiram atividade CoA transferase (Tabela 2). A atividade CoA transferase observada foi detectada para os substratos lactil-CoA, propionil-CoA, acrilil-CoA, e 3-hidróxi propionil-CoA (Tabela 2). A mais alta atividade CoA transferase foi detectada para lactil-

CoA e propionil-CoA.

Tabela 2

Substrato	Unidades/mg
Lactil-CoA	211
Propionil-CoA	144
Acrilil-CoA	118
3-hidróxi propionil-CoA	110

O seguinte ensaio foi realizado para testar se a atividade CoA transferase pode usar os mesmos doadores substrato CoA como receptores.

- 5 Especificamente, atividade CoA transferase foi avaliada usando-se uma estação de trabalho Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF EM) Voyager RP (PerSeptive Biosystems). As seguintes cinco reações foram analisadas:

- 10 1) acetato + lactil CoA → lactato + acetil-CoA
 2) acetato + propionil-CoA → propionato + acetil-CoA
 3) lactato + acetil-CoA → acetato + lactil-CoA
 4) lactato + acrilil-CoA → acrilato + lactil-CoA
 5) 3-hidróxi propionato + lactil-CoA → lactato + 3-hidróxi propio-
 nil-CoA

- 15 MALDI-TOF EM foi usada para medir simultaneamente o apare-
 cimento do produto CoA éster e o desaparecimento do doador CoA éster. O
 tampão de ensaio conteve fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), CoA éster 1
 mM, e 100 mM respectivo sal ácido. Proteína de um extrato livre de células
 20 preparado como descrito acima foi adicionada para uma concentração final
 de 0,005 mg/ml. Uma reação controle foi preparada a partir de um extrato
 livre de células preparado de células carecendo da construção contendo o
 ácido nucléico codificando CoA transferase. Para cada reação, o extrato livre
 de células foi adicionado por último para iniciar a reação. Reações foram
 25 deixadas procederem em temperatura ambiente e foram interrompidas atra-
 vés de adição de 1 volume de ácido trifluor acético (TFA) 10%. As misturas
 de reação foram purificadas antes de análises MALDI-TOF EM usando-se
 colunas Sep Pak Vac C₁₈ de 50mg (Waters, Inc.). As colunas foram condici-

onadas com 1ml de metanol e equilibradas com duas lavagens de 1 ml de TFA 0,1%. Cada amostra foi aplicada à coluna, e o fluxo através foi descartado. A coluna foi lavada duas vezes com 1 ml de TFA 0,1%. A amostra foi eluída em 200 µl de acetonitrila 40%, TFA 0,1%. A acetonitrila foi removida por centrifugação in vacuo. Amostras foram preparadas para análise MALDI-TOF EM através de mistura 1:1 com ácido sinapínico 110 mM em TFA 0,1%, acetonitrila 67%. As amostras foram deixadas secar ao ar.

Em reação nº1, a amostra controle exibiu um pico principal em um peso molecular correspondendo a lactil-CoA (PM 841). Houve um pico menor no peso molecular correspondendo a acetil-CoA (PM 811). Este pico menor foi determinado ser sobra de acetil-CoA da síntese de lactil-CoA. A amostra de reação nº1 contendo o extrato de células das células transfectadas com o plasmídeo codificando CoA transferase exibiu completa conversão de lactil-CoA a acetil-CoA. Nenhum pico foi observado para lactil-CoA. Este resultado indica que a atividade CoA transferase pode transferir CoA de lactil-CoA para acetato para formar acetil-CoA.

Em reação nº2, a amostra controle exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a propionil-CoA (PM 825). A amostra nº2 de reação contendo o extrato de células de células transfectadas com o plasmídeo codificando CoA transferase exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a acetil-CoA (PM 811). Nenhum pico foi observado para propionil-CoA. Este resultado indica que a atividade CoA transferase pode transferir CoA de propionil-CoA para acetato para formar acetil-CoA.

Em reação nº3, a amostra controle exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a acetil-CoA (PM 811). A amostra nº3 de reação contendo o extrato de células a partir de células transfectadas com o plasmídeo codificando CoA transferase exibiu um pico correspondendo a lactil-CoA (PM 841). O pico correspondendo a acetil-CoA não desaparece. De fato, a razão do tamanho dos dois picos foi cerca de 1:1. O observado aparecimento do pico correspondendo a lactil-CoA demonstra que a atividade CoA transferase catalisa reação nº3.

Em reação nº4, a amostra controle exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a acrilil-CoA (PM 823). A amostra nº4 de reação contendo o extrato de células de células transfectadas com o plasmídeo codificando CoA transferase exibiu um pico dominante correspondendo a lactil-CoA (PM 841). Este resultado demonstra que a atividade
5 CoA transferase catalisa reação nº4.

Em reação nº5, lactil-CoA deuterada foi usada para detectar a transferência de CoA de lactato para 3-hidróxi propionato desde que ácido láctico e 3-HP têm o mesmo peso molecular como seus respectivos CoA ésteres. Uso de lactil-CoA deuterada permitiu a diferenciação entre lactil-CoA e
10 3-hidróxi propionato usando MALDI-TOF EM. A amostra controle exibiu um grupo difuso de picos em pesos moleculares variando de PM 841 a 845 devido as quantidades variáveis de átomos de hidrogênio que foram substituídos com átomos de deutério. Em adição, um pico significativo foi observado
15 em um peso molecular correspondendo a acetil-CoA (PM 811). Este pico foi determinado ser a sobra de acetil-CoA da síntese de lactil-CoA. A amostra de reação nº5 contendo o extrato de células de células transfectadas com o plasmídeo codificando CoA transferase exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a 3-hidróxi propionil-CoA (PM 841) como
20 oposto a um grupo de picos variando de PM 841 a 845. Este resultado demonstra que a CoA transferase catalisa a reação nº5.

Exemplo 2 – Clonagem de moléculas de ácido nucléico que codificam um complexo polipeptídico múltiplo tendo atividade lactil-CoA desidratase

Os seguintes procesos foram usados para clonar um polipeptídeo ativador E1. Resumidamente, quatro iniciadores para frente degenerados e cinco iniciadores reversos degenerados foram projetados baseados nas
25 seqüências conservadas de homólogos de proteína ativadora

E1 (E1F1 5'-GCWACBGGY-

TAYGGYCG-3', SEQ ID NO:60; E1F2 5'-GTYR̄TYGAYR̄TYGGYGGYCAGGA-3',
 SEQ ID NO:61; E1F3 5'-ATGAACGAYAARTGYGCWGCWGG-3', SEQ ID NO:62;
 E1F4 5'-TGYGCWGCWGGYACBGGYCGYTT-3', SEQ ID NO:63; E1R1 5'-TCCT-
 GRCCRCCRAYRTCRAIRAC-3', SEQ ID NO:64; E1R2 5'-CCWGCWGCRCAY-
 TTRTCGTTTCAT-3', SEQ ID NO:65; E1R3 5'-AARCGRCCVGTRCCWGCWG-CRCA-
 3', SEQ ID NO:66; E1R4 5'-GCTTCGSWTTCRACRATGSW-3', SEQ ID NO:67; e
 E1R5 5'-GSWRATRACCTTCGCWTTTCWGCRAA-3', SEQ ID NO:68).

Os iniciadores foram usados em todas as combinações lógicas em PCR usando Taq polimerase (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) e 1 ng de DNA genômico por µl de mistura de reação. PCR foi con-

5 duzida usando-se um programa PCR touchdown com 4 ciclos em uma temperatura de anelamento de 60°C, 4 ciclos a 58°C, 4 ciclos a 56°C, e 18 ciclos a 54°C. Cada ciclo usou uma etapa de desnaturação inicial de 30 segundos a 94°C e uma etapa de extensão de 3 minutos a 72°C. O programa teve uma

10 etapa de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C e uma etapa de extensão final de 4 minutos a 72°C. Tempo permitido para anelamento foi de 45 segundos. As quantidades de iniciador PCR usadas nas reações foram aumentadas 2-10 vezes acima de quantidades típicas de PCR dependendo da quantidade de degenerescência na extremidade 3' do iniciador. Em adição,

15 reações PCR separadas contendo cada iniciador individual foram feitas para identificar produto PCR resultante de iniciadores degenerados simples. Cada produto de PCR (25 µl) foi separado por eletroforese usando gel TAE (Tris-acetato-EDTA) agarose 1%.

As combinações E1F2-E1R4, E1F2-E1R5, E1F3-E1R4, E1F3-E1R5, e E1F4-E1R4R2 produziram uma banda de 195, 207, 144, 156, e 144

20 pb, respectivamente. Estas bandas ajustam-se ao esperado tamanho baseado em seqüências de ativador E1 de outras espécies. Nenhuma banda foi visível com reações controles de iniciador individual. O fragmento E1F2-E1R5 (207 pb) foi isolado e purificado usando Qiagen Gel Extraction procedure (Qiagen Inc., Valencia, CA). A banda purificada (4 µl) foi ligada em ve-

25 tor pCRII que então foi transformado em células TOP10 de E.coli usando um procedimento de clonagem TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Transforma-

ções foram revestidas sobre meios LB contendo 100 µg/ml de ampicilina (Amp) e 50 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galcto piranosídeo (X-gal). Colônias brancas, simples foram revestidas sobre meios frescos e selecionadas em uma reação PCR usando os iniciadores E1F2 e E1R5 para
 5 confirmar a presença da inserção. DNA plasmídeo foi obtido de colônias múltiplas usando QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc). Uma vez obtido, o DNA plasmídeo foi quantificado e usado para seqüenciamento de DNA com iniciadores M13R e M13F. Análises de seqüências revelaram uma seqüência de ácido nucléico codificando um polipeptídeo e revelaram que o fragmento
 10 E1F2-E1R5 compartilhou similaridade de seqüência com seqüências de ativador E1 (Figuras 12-13).

Caminhar no genoma foi realizado para obter-se a completa seqüência codificante de subunidades E2 α e β . Resumidamente, quatro iniciadores para modalidade de caminhar no genoma em ambas as direções, a
 15 montante e a jusante foram projetados usando-se a porção da seqüência de fragmento E1F2-E1R5 de 207 pb que foi interna aos iniciadores degenerados E1F2 e E1R5 E1GSP1F
 5'-ACGTCATGTCGAAGGTACTGGAAATCC-3', SEQ ID NO:69; E1GSP2F 5'-GGGACTGGTACTTCAAATCGAAGCATC-3', SEQ ID NO:70; E1GSP1R 5'-TGACGGCAGCGGGATGCTTCGATTTGA-3', SEQ ID NO:71; e E1GSP2R 5'-TCAGACATGGGGATTTCAGTACCTTC-3', SEQ ID NO:72).

Os iniciadores E1GSP1F e E1GSP2F fazem face a jusante, enquanto os
 20 iniciadores E1GSP1R e E1GSP2R fazem face a montante. Em adição, os iniciadores E1GSP2F e E1GSP2R estão aninhados dentro dos iniciadores E1GSP1F e E1GSP1R.

Caminhar no genoma foi realizado usando-se o Universal Genome Walking Kit (ClonTech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) com a exce-
 25 ção de que adicionais bibliotecas foram geradas com enzimas Nru I, Sca I, e Hinc II. Primeiro ciclo de PCR foi realizado em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler com 7 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 72°C, e 36 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 65°C com uma extensão final a 65°C por 4 minutos. Segundo ciclo de PCR usou 5 ciclos de 2 segundos a 94°C e

3 minutos a 72°C, e 20 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 65°C com uma extensão final a 65°C por 4 minutos. O produto de primeiro e segundo ciclo (20 µl) foi separado por eletroforese usando gel TAE agarose 1%. Produtos de amplificação foram obtidos com a biblioteca Stu I para ambas as

5 direções frente e reversa. O produto de segundo ciclo de cerca de 1,5 kb para direção para frente e fragmento de 3 kb para direção reversa da biblioteca Stu I foram purificados com gel, clonados e seqüenciados. Análises de seqüências revelaram que a seqüência derivada de caminhar no genoma sobrepôs-se com o fragmento E1F2-E1R5.

10 Para obter seqüência adicional, um segundo caminhar no genoma foi realizado usando um iniciador de primeiro ciclo (E1GSPF 5'-CCGTGTTACTTGGGAAGGTATCGCTGTCTG-3', SEQ ID NO: 73) e um iniciador de segundo ciclo (E1GSPF6 5'-GCCAATGAAGGAGG AAACCAC-TAATGAGTC-3', SEQ ID NO: 74). Caminhar no genoma foi realizado usando-se as bibliotecas NruI, Scal, e HincII. Em adição, ClonTech's Advantage-

15 Genomic Polymerase foi usada para a PCR. Iniciadorio ciclo de PCR foi realizado em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos. 7 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 72°C, e 36 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 65°C com uma

20 extensão final a 65°C por 4 minutos. Segundo ciclo de PCR usou 5 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 72°C, e 20 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 65°C com uma extensão final a 65°C por 4 minutos. O produto de primeiro e segundo ciclo (20 µl) foi separado por eletroforese sobre um gel agarose 1%. Um produto de amplificação de cerca de 1,5 kb foi obtido do

25 segundo ciclo de PCR para a biblioteca Hinc II. Esta banda foi purificada com gel, clonada e seqüenciada. Análises de seqüências revelaram que ela sobrepôs-se com o fragmento de caminhar no genoma previamente obtido. Em adição, análises de seqüências revelaram uma seqüência de ácidos nucleicos codificando uma subunidade E2 alfa que compartilha similaridades

30 de seqüência com outras seqüências (Figuras 16-17). Ainda, análises de seqüências revelaram uma seqüência de ácidos nucleicos codificando uma subunidade E2 beta que comaprtilha similaridades de seqüência com outras

seqüências (Figuras 20-21).

Adicionais análises de seqüências e PCR revelaram a ordem de seqüências codificando polipeptídeo dentro da região contendo as seqüências codificando lactil-CoA desidratase. Especificamente, o par de iniciadores E1GSP1F e COAGSP1R e o par de iniciadores COAGSP1F e E1GSP1R foram usados para amplificar fragmentos que codificam ambos CoA transferase e polipeptídeos ativador E1. Resumidamente, DNA de genoma de *M. elsdenii* (1 ng) foi usado como molde. A PCR foi conduzida em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler usando Long Template Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). O programa PCR foi usado como se segue: 94°C por 2 minutos; 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 45 segundos, e 72°C por 6 minutos; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Ambos produtos de PCR (20 µl) foram separados sobre um gel agarose 1%. Um produto de amplificação (cerca de 1,5 kb) foi obtido usando-se o par de iniciadores COAGSP1F e E1GSP1R. Este produto foi purificado com gel, clonado e seqüenciado (Figura 22).

A organização do óperon de *M. elsdenii* contendo as seqüências codificando lactil-CoA desidratase foi determinada conter as seguintes seqüências codificando polipeptídeo na seguinte ordem: CoA transferase (Figura 6), ORFX (Figura 23), proteína ativador E1 de lactil-CoA desidratase (Figura 10), subunidade E2 alfa de lactil-CoA desidratase (Figura 14), subunidade E2 beta de lactil-CoA desidratase (Figura 18), e CoA desidrogenase truncada (Figura 25).

A lactil-CoA desidratase (lactil-CoA desidratase ou lcd) de *M. elsdenii* foi amplificada por PCR a partir de DNA cromossômico usando-se o seguinte programa: 94°C por 2 minutos; 7 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47°C por 45 segundos, e 72°C por 3 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 3 minutos; e 72°C por 7 minutos. Um par de iniciadores foi usado (OSNBE1F 5'-GGGAATTCCATATGAAACTGTGTATACTCTC-3', SEQ ID NO: 75 e OSNBE1R 5'-CGACGGATCCTTAGAGGATTTCCGAGAAAGC-3', SEQ ID NO: 76). O produto amplificado (cerca de 3,2 kb) foi separado sobre gel agarose

1%, cortado do gel, e purificado com um Qiagen Gel Extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). O produto purificado foi digerido com enzimas de restrição Nde I e BamHI e ligado em um vetor pET11a (Novagen) digerido com as mesmas enzimas. A reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen) que então foram espalhadas sobre placas LB agar suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. Colônias individuais isoladas foram selecionadas para a presença de inserções por mapeamento de restrição. Isolatos com o correto padrão de restrição foram sequenciados a partir de cada extremidade usando-se iniciadores Novagen (iniciador promotor T7 nº69348-3 e iniciador terminador T7 nº69337-3) para confirmar a seqüência nos pontos de ligação.

Um plasmídeo tendo a correta inserção foi transformado em células quimicamente competentes Tuner (DE3) pLacI (Novagen, Madison, WI). Expressão a partir desta construção foi testada como se segue. Uma cultura foi cultivada por toda noite para saturação e diluída 1:20 na manhã seguinte em meio LB fresco com os apropriados antibióticos. A cultura foi cultivada 37°C com aeração para uma OD₆₀₀ de cerca de 0,6. A cultura foi induzida com IPTG em uma concentração final de 100 µM. A cultura foi incubada por duas horas adicionais a 37°C com aeração. Alíquotas foram tomadas pré-indução e 2 horas pós-indução para análises SDS-PAGE. Bandas do esperado peso molecular (27 024 Daltons para a subunidade E1, 48 088 Daltons para a subunidade E2 alfa, e 42 517 Daltons para a subunidade E2 beta - todas previstas a partir da seqüência) foram observadas. Estas bandas não foram observadas em células contendo um plasmídeo faltando o ácido nucléico codificando os três componentes da lactil-CoA desidrartase.

Extratos livres de células foram preparados por crescimento de células em uma garrafa de soro selada por toda noite a 37°C. Seguindo o crescimento por toda a noite, as culturas foram induzidas com IPTG 1 mM (adicionado usando-se técnica anaeróbica) e incubadas por 2 horas adicionais a 37°C. As células foram colhidas por centrifugação e rompidas por sonificação sob estritas condições anaeróbicas. A suspensão de células sonificada foi centrifugada para remoção de fragmento de células, e o sobrena-

dante foi usado nos ensaios. O tampão usado para ressuspensão/sonificação de células foi Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), ATP 200 μ M, Mg(SO₄) 7 mM, DTT 4 mM, ditionito 1 mM, e NADH 100 μ M.

Atividade desidratase foi detectada com MALDI-TOF EM. O ensaio foi conduzido no mesmo tampão como acima com lactil-CoA 1 mM ou acrilil-CoA 1 mM adicionada e cerca de 5 mg/ml de extrato livre de células. Antes de análise MALDI-TOF EM, amostras foram purificadas usando-se colunas Sep Pak Vac C₁₈ (Waters, Inc.) como descrito no Exemplo 1. As seguintes duas reações foram analisadas:

- 1) acrilil-CoA \rightarrow lactil-CoA
- 2) lactil-CoA \rightarrow acrilil-CoA

Em reação nº1, a amostra controle exibiu um pico em um peso molecular correspondendo a acrilil-CoA (PM 823). A amostra de reação nº1 contendo o extrato de células a partir de células transfectadas com o plasmídeo codificando desidratase exibiu um pico principal em um peso molecular correspondendo a lactil-CoA (PM 841). Este resultado indica que a atividade desidratase pode converter acrilil-CoA em lactil-CoA.

Para detectar atividade desidratase sobre lactil-CoA, reação nº2 foi realizada em D₂O 80%. A amostra controle exibiu um pico em um peso molecular correspondendo a lactil-CoA (PM 841). A amostra de reação nº2 contendo o extrato de células de células transfectadas com o plasmídeo codificando desidratase revelou um pico lactil-CoA deslocado para uma forma deuterada. Este resultado indica que a enzima desidratase é ativa sobre lactil-CoA. Em adição, os resultados de ambas reações indicam que a enzima desidratase pode catalisar a reação lactil-CoA \leftrightarrow acrilil-CoA em ambas as direções.

Exemplo 3 – Clonagem de moléculas de ácido nucléico que codificam um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil CoA desidratase

DNA genômico foi isolado de *Chloroflexus aurantiacus* (ATCC 29365). Resumidamente, células de *C. aurantiacus* em meio 920 *Chloroflexus* foram cultivadas em culturas de 50 ml (tubos de polipropileno Falcon 2070) usando uma Innova 4230 Incubator, Shaker (New Brunswick Scienti-

fic; Edison, NJ) a 50°C com luzes interiroes. Uma vez crescidas, as células foram feitas péletes, lavadas com 5ml de uma solução Tris 10 mM, e repeletizadas. DNA genômico foi isolado das células peletizadas usando-se um Gentra Genomic "Puregene" DNA isolation kit (Gentra Systems; Minneapolis, MN). Resumidamente, as células peletizadas foram ressuspensas em 1 ml de solução de suspensão de células Gentra a qual foram adicionados 14,2 mg de lisozima e 4 µl de solução de proteinase K 20 mg/ml. A suspensão de células foi incubada a 37°C por 30 minutos. O DNA genômico precipitado foi recuperado por centrifugação em 3500xg por 25 minutos e seco ao ar por 10 minutos. O DNA genômico foi suspenso em 300 µl de uma solução Tris 10 mM e estocado a 4°C.

O DNA genômico foi usado como um molde em reações de amplificação PCR com iniciadores projetados baseados em domínios conservados de homólogos crotonase e uma tabela de uso de códon *Chloroflexus aurantiacus*. Resumidamente, dois iniciadores de PCR para frente degenerados (CRF1 e CRF2) e três reversos degenerados (CRR1, CRR2, CRR3) foram projetados (CRF1

5'-AAYCGBCCVAARGCNCTSAAYGC-3', SEQ ID NO:77; CRF2: 5'-TTYGTBGCNGGYGCNGAYAT-3', SEQ ID NO:78; CRR1 5'-ATRTCNG-CRCCNGCVACRAA-3', SEQ ID NO:79; CRR2 5'-CCRCCRCCSAGNG-CRWARCCRTT-3', SEQ ID NO:80; e CRR3 5'-SSWNGCRATVCGRATRTCAC-3', SEQ ID NO:81).

Estes iniciadores foram usados em todas as combinações lógicas em PCR usando Taq polymerase (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) e 1 ng do DNA genômico por µl de mistura de reação. A PCR foi conduzida usando um programa PCR touchdown com 4 ciclos em uma temperatura de anelamento de 61°C, 4 ciclos a 59°C, 4 ciclos a 57°C, 4 ciclos a 55°C, e 16 ciclos a 52°C. Cada ciclo usou uma etapa de desnaturação inicial de 30 segundos a 94°C e uma etapa de extensão de 3 minutos a 72°C. O programa também teve uma etapa de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C e uma etapa de extensão final de 4 minutos a 72°C. O tempo permitido para anelamento foi 45 segundos. As quantidades de iniciador PCR usadas na reação foram aumentadas 4-12 vezes acima de típicas quantidades de

PCR dependendo da quantidade de degenerescência na extremidade 3' do iniciador. Em adição, reações PCR separadas contendo cada iniciador individual foram realizadas para identificar produtos de amplificação resultantes de iniciadores degenerados simples. Cada produto de PCR (25 µl) foi separado por eletroforese de gel usando um gel TAE (Tris-acetato-EDTA) agarose 1%.

As combinações CRF1-CRR1 e CRF2-CRR2 produziram uma única banda de cerca de 120 e cerca de 150 pb, respectivamente. Estas bandas ajustaram-se ao esperado tamanho baseado em genes crotonase de outras espécies. Nenhuma banda de 120 pb ou 150 pb foi observada das reações controles de iniciador individual. Ambos fragmentos (isto é, as bandas de 120 pb e 150 pb) foram isolados e purificados usando-se o Qiagen Gel Extraction kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Cada fragmento purificado (4 µl) foi ligado em vetor pCRII que então foi transformado em células TOP10 de *E. coli* através de um processo de choque térmico usando um procedimento de clonagem TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Transformações foram revestidas sobre meios LB contendo 100 µg/ml de ampicilina (Amp), e 50 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galacto piranosídeo (X-gal). Colônias brancas, simples foram revestidas sobre meios frescos e selecionadas em uma reação PCR usando os iniciadores CRF1 e CRR1 e os iniciadores CRF2 e CRR2 para confirmar a presença da desejada inserção. DNA plasmídeo foi obtido de colônias múltiplas com a desejada inserção usando um QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.). Uma vez obtido, o DNA foi quantificado e usado para seqüenciamento de DNA com iniciadores M13R e M13F. Análises de seqüências revelaram a presença de dois clones diferentes do produto PCR de cerca de 150 pb. Cada um compartilhou similaridade de seqüência com seqüências crotonase e hidratase. Os dois clones foram projetados OS17 (produto PCR 157 pb) e OS19 (produto PCR 151 pb).

Caminhar no genoma foi realizado para obter-se a completa seqüência codificante de OS17. Resumidamente, iniciadores para condução de caminhar no genoma em ambas as direções, a montante e a jusante foram projetados usando-se a porção da seqüência de fragmento CRF2-CRR2 de

157 pb que foi interna para os iniciadores degenerados CRF2 e CRR2 (S17F1 5'-CGCTG-ATATTCGCCAGTTGCTCGAAG-3', SEQ ID NO:82; OS17F2 5'-CCCATCTTG-CTTTCCGCAAGATTGAGC-3', SEQ ID NO:83; OS17F3 5'-CAATGGCCCTGCCGA-ATAACGCCCATCT-3', SEQ ID NO:84; OS17R1 5'-CTTCGAGCAACTGGCGAA-TATCAGCG-3', SEQ ID NO:85; OS17R2 5'-GCTCAATCTTGCGGAAAGCAAG-ATGGG-3', SEQ ID NO:86; e OS17R3 5'-AGATGGGCGTTATTCGGCAGGGCC-ATTG-3', SEQ ID NO:87).

Os iniciadores OS17F1, OS17F3, e OS17F2 fazem face a jusante, enquanto os iniciadores OS17R2, OS17R3 e OS17R1 fazem face a montante.

Caminhar no genoma foi conduzido usando-se o Universal Genome Walking kit (ClonTech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) com a exceção de que adicionais bibliotecas foram geradas com enzimas Nru I, Fsp I, e Hinc II. O primeiro ciclo de PCR foi conduzido em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler com 7 ciclos de 2 segundos a 94°C, e 3 minutos a 72°C, e 36 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 66°C com uma extensão final a 66°C por 4 minutos. Segundo ciclo de PCR usou 5 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 72°C, e 20 ciclos de 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 66°C com uma extensão final a 66°C por 4 minutos. O produto de amplificação de primeiro e segundo ciclo (5 µl) foi separado por eletroforese com gel sobre um gel TAE agarose 1%. Após o segundo ciclo de PCR, um produto de amplificação de cerca de 0,4 kb foi obtido com a biblioteca Fsp I usando o iniciador OS17R1 na direção reversa, e um produto de amplificação de cerca de 0,6 kb foi obtido com a biblioteca Hinc II usando o iniciador OS17F2 na direção para frente. Estes produtos de PCR foram clonados e seqüenciados.

Análises de seqüências revelaram que as seqüências derivadas de caminhar no genoma sobrepuseram-se com o fragmento CRF2-CRR2 e compartilharam similaridade de seqüência com seqüências crotonase e hidratase.

Um segundo caminhar no genoma foi realizado para obtenção de adicionais de seqüências. Seis iniciadores foram projetados para este

segundo caminhar no genoma (OS17F4 5'-AAGCTGGG-TCTGATCGATGCCATTGCTACC-3', SEQ ID NO:88; OS17F5 5'-CTCGATTATCG-CCCATCCACGTATCGAG-3', SEQ ID NO:89; OS17F6 5'-TGGATGCAATCCG-CTATGGCATTATCCACG-3', SEQ ID NO:90; OS17R4 5'-TCATTCAAGTGCG-TTCACCGGCGGATTTGTC-3', SEQ ID NO:91; OS17R5 5'-TCGATCCGGAAGT-AGCGATAGCGTTCGATG-3', SEQ ID NO:92 e OS17R6 5'-CTTGGCTGCAAT-CTCTTCGAGCACTTCAGG-3', SEQ ID NO:93)

Os iniciadores OS17F4, OS17F5, e OS17F6 fizeram face a jusante, enquanto os iniciadores OS17R4, OS17R5, e OS17R6 fizeram face a montante.

O segundo caminhar no genoma foi realizado usando-se os mesmos processos descritos para o primeiro caminhar no genoma. Após o segundo ciclo de walking, um produto de amplificação de cerca de 2,3 kb foi obtido com uma biblioteca Hinc II usando o iniciador OS17R5 na direção reversa, e um produto de amplificação de cerca de 0,6 kb foi obtido com uma biblioteca Pvu II usando o iniciador OS17F5 na direção em frente. Os produtos de PCR foram clonados e seqüenciados. Análises de seqüências revelaram que as seqüências derivadas do segundo caminhar no genoma se sobrepõem com a seqüência obtida durante o primeiro caminhar no genoma. Em adição, as análises de seqüências revelaram uma seqüência com 3572 pb.

Uma busca BLAST revelou que o polipeptídeo codificado por esta seqüência compartilha similaridade de seqüência com polipeptídeos tendo três diferentes atividades. Especificamente, o início do polipeptídeo codificado por OS17 compartilha similaridade de seqüência com CoA-sintetases, a região média do polipeptídeo codificado por OS17 compartilha similaridade de seqüência com enoil-CoA hidratases e a região de extremidade do polipeptídeo codificado por OS17 compartilha similaridade de seqüência com CoA-redutases.

Um terceiro caminhar no genoma foi realizado usando-se quatro

iniciadores (OS17UP-6 5'-

CATCAGAGGTAATCACCCTCGTGCA-3', SEQ ID NO:94; OS17UP-7 5'-

AAGTAGTAGGCCACCTCGTCGCCATA-3', SEQ ID NO:95; OS17DN-1 5'-

GCCAATCAGGCGCTGATCTATGTTCT-3', SEQ ID NO:96 e OS17DN-2 5'-

CTGATCTATGTTCTGGCCTCGGAGGT-3', SEQ ID NO:97).

Os iniciadores OS17UP-6 e OS17UP-7 fazem face a montante, enquanto os iniciadores OS17DN-1 e OS17DN-2 fazem face a jusante. O terceiro cami-

5 nhar no genoma rendeu um produto de amplificação de cerca de 1,2 kb com uma biblioteca Nru I usando iniciador OS17UP-7 na direção reversa. Em adição, produtos de amplificação de cerca de 4 kb e cerca de 1,1 kb foram obtidos com uma biblioteca Hinc II e FspI, respectivamente, usando o inicia-
10 dor OS17DN-2 na direção em frente. Análises de seqüências revelaram uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um polipeptídeo (Figuras 27-28). O completo gene OS17 teve 5466 nucleotídeos e codificou um polipeptídeo aminoácido 1822. O peso molecular calculado do polipeptídeo OS17 a partir da seqüência foi 201 346 (pl = 5,71).

Análises de busca BLAST revelaram que o produto do ácido nu-
15 cléico OS17 tem três diferentes atividades baseadas em similaridade de seqüência a (1) CoA-sintetases no início da seqüência OS17, (2) 3-HP desidratases no meio da seqüência OS17, e (3) CoA-redutase na extremidade da seqüência OS17. Assim, o clone OS17 pareceu codificar uma enzima simples capaz de catalisar três reações distintas conduzindo à direta conver-
20 são de 3-hidróxi propionato a propionil CoA: 3-HP→3-HP-CoA→acrilil-CoA→propionil-CoA.

O gene OS17 de *C.aurantiacus* foi amplificado por PCR a partir de DNA cromossômico usando-se as seguintes condições: 94°C por 3 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturar, 54°C por 30 se-
25 gundos para anelar, e 68°C por 6 minutos para extensão; seguido por 68°C por 10 minutos para extensão final. Dois iniciadores foram usados (OS17F 5'-GGGAATTCCATATGATCGACACTGCG-3', SEQ ID NO: 136; e OS17R 5'-CGAAGGATCCAACGATAATCGGCTCAGCAC-3', SEQ ID NO: 137). O resultante produto de PCR (~5,6 kb) foi purificado usando-se Qiagen PCR

purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). O produto purificado foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI, aquecido a 80°C por 20 minutos para inativar as enzimas, purificado usando Qiagen PCR purification kit, e ligado em um vetor pET11a (Novagen, Madison, WI) previamente digerido com enzimas NdeI e BamHI. A reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen, Madison, WI) que foram espalhadas sobre placas LB agar suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. Transformantes individuais foram selecionados por amplificação PCR do DNA OS17 com os iniciadores OS17F e OS17R e condições como descrito acima diretamente de células de colônias. Clones que renderam o produto de 5,6 Kb foram usados para purificação de plasmídeo com Qiagen QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.). Plasmídeos resultantes foram transformados em células E.coli BL21(DE3), e induzida a expressão de polipeptídeo OS17. O peso molecular aparente do polipeptídeo OS17 de acordo com eletroforese de gel SDS foi cerca de 190 000 Da.

Para ensaiar função de polipeptídeo OS17, uma cultura de 100 ml de células BL21-DE3/pET11a-OS17 foi iniciada usando 1 ml de cultura crescida por toda noite como um inoculum. A cultura foi cultivada para uma OD de 0,5-0,6 e foi induzida com IPTG 100 µM. Após duas horas e meia de indução, as células foram colhidas por rotação em 8000rpm na centrífuga de piso. As células foram lavadas com Tris-HCl 10 mM (pH 7,8) e passadas duas vezes através de uma prensa Francesa em uma pressão de 70,3 kgf/cm² (1000 psi). Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 15 000 rpm. A atividade do polipeptídeo OS17 foi medida espectrofotometricamente, e os produtos formados durante esta transformação enzimática foram detectados por LC/EM. A mistura de ensaio foi como se segue (J. Bacteriol., 181:1088-1098 (1999)):

Reagente	Volume	Conc. final
Tris-HCl (1000 mM, pH 7,8)	10µl	50 mM
MgCl ₂ (100 mM)	10 µl	5 mM
ATP (30 mM)	20 µl	3 mM
KCl (100 mM)	20 µl	10 mM
CoASH (5 mM)	20 µl	0,5 mM
NAD(P)H	20 µl	0,5 mM
3-hidróxi propionato	2 µl	1 mM
Extrato de proteína (7 mg/ml)	20(40) µl	140 µg
Água DI	78(58) µl	
Total	200 µl	

A taxa inicial de reação foi medida por monitoração de desaparecimento de NAD(P)H em 340 nm. A atividade do polipeptídeo OS17 foi medida usando-se 3-HP como o substrato. As unidades/ml de proteína total foram calculadas usando-se a fórmula mostrada no Exemplo 1. A atividade do polipeptídeo OS17 expresso foi calculada ser 0,061 U/ml de proteína total. Os produtos de reação foram purificados usando-se uma coluna Sep Pak Vac (Waters). A coluna foi condicionada com 1 ml de metanol e lavada duas vezes com 0,5ml de TFA 0,1%. A amostra foi então aplicada à coluna, e a

5 coluna foi lavada mais duas vezes com 0,5ml de TFA 0,1%. A amostra foi eluída com 200 µl de acetonitrila 40%, TFA 0,1%. A acetonitrila foi removida da amostra por centrifugação a vácuo. Os produtos de reação foram analisados por LC/EM.

Análises de tioésteres por exemplo propionil CoA, acrilil CoA, e

15 3-HP CoA da reação acima foram realizadas usando-se um instrumento Waters/Micromass ZQ LC/EM que teve um cromatógrafo líquido Waters 2690 com um arranjo de fotodiodo Waters 996 (PDA) colocado em séries entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massa quadropolo simples. Separações LC foram feitas usando-se uma coluna de cromatografia de fase reversa YMC ods-AQ (partículas de 3 µm, poros de 120Å) de 4,6x150mm

20 em temperatura ambiente. CoA ésteres foram eluídos em Tampão A (ace-

tato de amônio 25 mM, ácido acético 0,5%) com um gradiente linear de Tampão B (acetonitrila, ácido acético 0,5%). Uma taxa de fluxo de 0,25 ml/minuto foi usada, e absorbância UV de arranjo de fotodiodo foi monitorada de 200 a 400 nm. Todos os parâmetros do sistema EM de eletrospray
 5 foram otimizados e selecionados baseado na geração de íons moleculares protonados ($[M+H]^+$) dos analitos de interesse e produção de íons de fragmentos característicos. Os seguintes parâmetros instrumentais foram usados para detecção ESI-EM de CoA e ácido orgânico-CoA tioésteres no modo íon positivo; Extrator: 1 V; lentes RF: 0 V; temperatura de fonte: 100°C; tem-
 10 peratura de dessolvatação: 300°C; gás de dessolvatação: 500 l/hora; gás de cone: 40 l/hora; resolução de massa baixa: 13,0; resolução de massa alta: 14,5; energia de íon: 0,5; multiplicador: 650. Incertezas para as razões de carga de massa (m/z) e massas moleculares são $\pm 0,01\%$.

A mistura de ensaio de enzima de cepas expressando o polipeptídeo OS17 exibiu picos para propionil CoA, acrilil CoA, e 3-HP CoA com o pico de propionil CoA sendo o pico dominante. Estes picos foram perdidos na mistura de ensaio de enzima obtida da cepa controle, que carregou vetor pET11a sem uma inserção. Estes resultados indicam que o polipeptídeo OS17 tem atividade CoA sintetase, atividade CoA hidratase, e atividade de-
 20 sidrogenase.

Caminhar no genoma (genome walking) também foi realizado para obter-se a completa seqüência codificante de OS19. Resumidamente, iniciadores para condução do andamento no genoma em ambas direções, a montante e a jusante foram projetados usando-se a porção da seqüência de
 25 fragmento CRF2-CRR2 de 151 pb que foi interna para os iniciadores degenerados CRF2 e CRR2 (OS19F1

5'-GGCTGATATCAAAGCGATGGCCAATGC-3', SEQ ID NO:98; OS19F2 5'-CCAC-GCCTATTGATATGCTCACCAGTG-3', SEQ ID NO:99; OS19F3 5'-GCAAACCGG-TGATTGCTGCCGTGAATGG-3', SEQ ID NO:100; OS19R1 5'-GCATTGGCCAT-CGCTTTGATATCAGCC-3', SEQ ID NO:101; OS19R2 5'-CACTGGTGAGCATATC-AATAGGCGTGG-3', SEQ ID NO:102; e OS19R3 5'-CCATTACGGCAGCAA-TCACCGGTTTGC-3, SEQ ID NO: 103)

Os iniciadores OS19F1, OS19F2, e OS19F3 fazem face a ju-

sante, enquanto os iniciadores OS19R1, OS19R2, e OS19R3 fazem face a montante.

Um produto de amplificação de cerca de 0,25 kb foi obtido com a biblioteca Fsp I usando o iniciador OS19R1, enquanto um produto de amplificação de cerca de 0,65 kb foi obtido com a biblioteca Pvu II usando o iniciador OS19R1. Em adição, um produto de amplificação de cerca de 0,4 kb foi obtido com a biblioteca Pvu II usando o iniciador OS19F3. Os produtos de PCR foram clonados e seqüenciados. Análises de seqüências revelaram que as seqüências derivadas de caminhar no genoma foram sobrepostas com o fragmento CRF2-CRR2 e compartilharam similaridade de seqüência com seqüências crotonase e hidratase. As seqüências obtidas foram responsáveis pela maioria da seqüência codificante incluindo o códon de partida.

Um segundo "caminhar no genoma" foi realizado para obter seqüência adicional usando dois iniciadores (OS19F7 5'-TCATCATCGCCAGTGAAAACGCGCAGTTCG-3', SEQ ID NO:104 e OS198F8 5'-GGATCGCGCAAACCATTGCCACCAAATCAC-3', SEQ ID NO:105).

Os iniciadores OS19F7 e OS19F8 fazem face a jusante.

Um produto de amplificação (cerca de 0,7 kb) obtido da biblioteca Pvu II foi clonado e seqüenciado. Análises de seqüências revelaram que a seqüência derivada do segundo caminhar no genoma se sobrepôs com a seqüência obtida do primeiro caminhar no genoma e conteve o códon de parada. O clone OS19 de comprimento total foi verificado compartilhar similaridade de seqüência com outras seqüências tais como seqüências crotonase e enoil-CoA hidratase (Figuras 32-33).

O clone OS19 foi verificado codificar um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase também referida como atividade acrilil-CoA hidratase. O ácido nucléico codificando a OS19 desidratase de *C. aurantiacus* foi amplificado por PCR a partir de DNA cromossômico usando-se as seguintes condições: 94°C por 3 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturar, 56°C por 30 segundos para recozer, e 68°C por 1 minuto para extensão; e 68°C por 5 minutos para extensão final. Dois inicia-

dores foram usados

(OSACH3 5'-ATGAGTGAAGAGTCTCTGGTTCTCAGC-3', SEQ ID NO:106 e OSACH2 5'-AGATCGCAATCGCTCGTGTATGTC-3', SEQ ID NO:107).

O resultante produto de PCR (cerca de 1,2 kb) foi separado por eletroforese de gel de agarose e purificado usando-se Qiagen kit de purificação PCR (Qiagen Inc.; Valencia, CA). O produto purificado foi ligado em pETBlue-1 usando o kit de clonagem Perfectly Blunt (Novagen; Madison, WI). A reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen, Madison, WI) que então foram espalhadas sobre placas LB ágar suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina, 40 µg/ml de IPTG, e 40 µg/ml de X-Gal. Colônias brancas foram isoladas e selecionadas para a presença de inserções por mapeamento de restrição. Isolados com o correto padrão de restrição foram seqüenciados a partir de cada extremidade usando o iniciador pETBlueUP e pETBlueDOWN (Novagen) para confirmar a seqüência nos pontos de ligação.

O plasmídeo contendo a seqüência codificando OS19 desidratase foi transformado em células quimicamente competentes Tuner (DE3) pLacI (Novagen, Madison, WI), e expressão a partir do constructo testado. Resumidamente, uma cultura foi cultivada por toda a noite para saturação e diluída 1:20 na manhã seguinte em meio LB fresco com os apropriados antibióticos. A cultura foi cultivada a 37°C e 250 rpm para uma OD₆₀₀ de cerca de 0,6. Neste ponto, a cultura foi induzida com IPTG em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi incubada por duas horas adicionais a 37°C e 250 rpm. Alíquotas foram tomadas pré-indução e 2 horas pós-indução para análise SDS-PAGE. Uma banda do esperado peso molecular (27 336 Dáltons previsto a partir da seqüência) foi observada. Esta banda não foi observada em células contendo um plasmídeo faltando o ácido nucléico codificando a hidratase.

Extratos isentos de células foram preparados através de crescimento de células como descrito acima. As células foram colhidas por centrifugação e rompidas por sonificação. A suspensão de células sonificada foi centrifugada para remoção de fragmento de células, e o sobrenadante foi

usado nos ensaios. A habilidade da 3-hidróxi propionil-CoA desidratase realizar as seguintes três reações foi medida usando MALDI-TOF EM:

- 1) acrilil-CoA \rightarrow 3-hidróxi propionil-CoA
- 2) 3-hidróxi propionil-CoA \rightarrow acrilil-CoA
- 5 3) crotonil-CoA \rightarrow 3-hidróxi butiril-CoA

A mistura de ansaio conteve Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), CoA éster 1 mM, e cerca de 1 μ g de extrato isento de células. Reações foram deixadas proceder para temperatura ambiente e foram interrompidas por adição de 1 volume de ácido trifluor acético (TFA) 10%. As misturas de reação foram purificadas antes de análise MALDI-TOF EM usando colunas Sep Pak Vac C₁₈ 50mg (Waters, Inc.). As colunas foram condicionadas com 1ml de metanol e então equilibradas com duas lavagens de 1ml de TFA 0,1%. A amostra foi aplicada à coluna, e o fluxo através foi descartado. A coluna foi lavada duas vezes com 1 ml de TFA 0,1%. A amostra foi eluída em 200 μ l de acetonitrila 40%, TFA 0,1%. A acetonitrila foi removida por centrifugação em vácuo. Amostras foram preparadas para análise MALDI-TOF EM através de mistura 1:1 com ácido sinapínico 110 mM em TFA 0,1%, acetonitrila 67%. As amostras foram deixadas secar ao ar.

A conversão de acrilil-CoA em 3-hidróxi propionil-CoA catalisada por 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi detectada usando-se a técnica MALDI-TOF EM. Em reação nº 1, a amostra controle exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a acrilil-CoA (PM 823). A amostra de reação nº 1 contendo o extrato de células a partir de células transfectadas com o plasmídeo codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase exibiu um pico dominante correspondendo a 3-hidróxi propionil-CoA (PM 841). Este resultado demonstra que a atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase catalisa a reação nº1.

Para detectar a conversão de 3-hidróxi propionil-CoA em acrilil-CoA, reação nº2 foi realizada em D₂O 80%. A amostra de reação nº2 contendo o extrato de células a partir de células transfectadas com o plasmídeo codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase revelou incorporação de deutério na molécula de 3-hidróxi propionil-CoA. Este resultado indica que a

enzima 3-hidróxi propionil-CoA desidratase catalisa reação nº2. Em adição, os resultados de ambas reações nº1 e nº2 indicam que a enzima 3-hidróxi propionil-CoA desidratase pode catalisar a reação 3-hidróxi propionil-CoA \leftrightarrow acrilil-CoA em ambas direções. É notado que para ambas reações nº1 e nº2, um pico foi observado em PM 811, devido à sobra de acetil-CoA da síntese de 3-hidróxi propionil-CoA a partir de 3-hidróxi propionato e acetil-CoA.

Os ensaios avaliando conversão de crotonil-CoA em 3-hidróxi butiril-CoA também foram realizados em D₂O 80%. Em reação nº3, a amostra controle exibiu um pico dominante em um peso molecular correspondendo a crotonil-CoA (PM 837). Este resultado indicou que a crotonil-CoA não foi convertida em outros produtos. A amostra de reação nº3 contendo o extrato de células a partir de células transfectadas com o plasmídeo codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase exibiu um grupo difuso de picos correspondendo a 3-hidróxi butiril-CoA deuterada (PM 855 a PM 857). Este resultado demonstra que a atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase catalisa reação nº3.

Uma série de reações controle foi realizada para confirmar a especificidade da 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Lactil-CoA (1 mM) foi adicionada à mistura de reação contendo Tris 100 mM (pH 7,0) na presença e na ausência de 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Em ambos os casos, o pico dominante observado teve um peso molecular correspondendo a lactil-CoA (PM 841). Este resultado indica que lactil-CoA não é afetada pela presença de atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase mesmo na presença de D₂O significando que a enzima 3-hidróxi propionil-CoA desidratase não ataca um grupo hidroxila na posição carbono alfa. A presença de 3-hidróxi propionil-CoA em mistura de reação D₂O 80% resultou em um desvio com adição da atividade 3-hidroxipropionil-CoA desidratase. Na ausência de atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase, um pico correspondendo a 3-hidróxi propionil-CoA foi observado em adição a um pico de PM 811. O pico de PM 811 foi devido à sobra de acetil-CoA da síntese de 3-hidróxi propionil-CoA. Na presença de atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase, um pico correspondendo a 3-hidróxi propionil-CoA deuterada foi observado (PM 842)

devido à troca de um grupo hidroxila durante a conversão de 3-hidróxi propionil-CoA a acrilil-CoA e vice-versa. Estas reações controladas demonstram que a enzima 3-hidróxi propionil-CoA desidratase é ativa sobre 3-hidróxi propionil-CoA e não ativa sobre lactil-CoA. Em adição, estes resultados demonstram que o produto da reação acrilil-CoA é 3-hidróxi propionil-CoA não-lactil-CoA.

Exemplo 4 – Construção de óperon nº 1

O seguinte óperon foi construído e pode ser usado para produzir 3-HP em *E. coli* (Figura 34). Resumidamente, o óperon foi clonado em um vetor de expressão pET11a sob o controle de um promotor T7 (Novagen, Madison, WI). O vetor de expressão pET-11a é um plasmídeo de 5677 pb que usa a sequência ATG de um sítio de restrição NdeI como um códon de partida para sequências inseridas a jusante.

Moléculas de ácidos nucleicos codificando uma CoA transferase e uma lactil-CoA desidratase foram amplificadas de DNA genômico de *Megasphaera elsdenii* através de PCR. Dois iniciadores foram usados para amplificar a sequência codificando CoA transferase (OSNBpctF 5'-GGGAATTCC ATATGAGAAAAGTAGAAATCATTACAGCTG-3', SEQ ID NO:108 e OSCTE-2 5'-GAGAGTATACACAGTTTTACCTCCTTTACAGCAGAGAT-3', SEQ ID NO: 109 e dois iniciadores foram usados para amplificar a sequência codificando lactil-CoA desidratase (OSCTE-1 5'-ATCTCTGCTGTAAAGGAGGTGAAAAC TGTGTATACT-CT3'-, SEQ ID NO: 110 e OSEBH-2 5'-ACGTTGATCTCCTGTACATT-AGAGGATTTCCGAGAAAGC-3', SEQ ID NO: 111).

Uma molécula de ácido nucleico codificando uma 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi amplificada de DNA genômico de *Chloroflexus aurantiacus* através de PCR usando dois iniciadores (OSEBH-1 5'-GCTTTCTCGG-AAATCCTCTAATGTACAAGGAGATCAACGT-3', SEQ ID NO: 112 e OSHBR 5'-CGACGGATCCTCAACGACCACTGAAGTTGG-3', SEQ ID NO: 113).

PCR foi conduzida em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler usando 100ng de DNA genômico e uma mistura de rTth polimerase (Applied

Biosystems; Foster City, CA) e Pfu Turbo polymerase (Stratagene; La Jolla, CA) em razão 8:1. A mistura polimerase assegurou maior fidelidade da reação PCR. As seguintes condições de PCR foram usadas: etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 2 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados por gel usando-se um kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Inc.; Valencia, CA).

Os produtos de PCR CoA transferase, lactil-CoA desidratase (E1, subunidade E2 α , e subunidade E2 β), e 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foram montados usando-se PCR. Os iniciadores OSCTE-1 e OSCTE-2 assim como os iniciadores OSEBH-1 e OSEBH-2 foram complementares uns para os outros. Assim, as extremidades de DNA complementares podem anelar umas às outras durante a reação PCR estendendo o DNA em ambas direções. Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSNBpctF e OSHBR) foram adicionados para a mistura de PCR de montagem, que conteve 100 ng de cada produto PCR (isto é, os produtos PCR a partir de reações CoA-transferase, lactil-CoA desidratase e 3-hidróxi propionil-CoA desidratase) assim como a mistura rTth polimerase/Pfu Turbo polimerase descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montar os produtos: 94°C por 1 minuto; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 68°C por 6 minutos; e uma extensão final a 68°C por 7 minutos. O produto de PCR montado foi purificado com gel e digerido com enzimas de restrição (NdeI e BamHI). Os sítios para estas enzimas de restrição foram introduzidos no produto de PCR montado usando-se os iniciadores OSNBpctF (NdeI) e OSHBR (BamHI). O produto de PCR digerido foi aquecido a 80°C por 30 minutos para inativar as enzimas de restrição e usado diretamente para ligação em vetor pET-11a.

O vetor pET-11a foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI, purificado com gel usando-se um kit Qiagen Gel Extraction, tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN) e usado em uma reação de ligação com o produto PCR montado. A ligação foi realizada a 16°C por toda a noite usando-se T4 ligase (Roche

Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A resultante reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBLue (Novagen; Madison, WI) usando um processo de choque térmico. Uma vez submetidas a choque térmico, as células foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado de colônias individuais usando-se um Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) e analisado por digestão com enzimas de restrição NdeI e BamHI.

Exemplo 5 – Construção de óperon nº2

O seguinte óperon foi construído e pode ser usado para produção de 3-HP em *E. coli* (Figuras 35A e B). Moléculas de ácido nucléico codificando uma CoA transferase e uma lactil-CoA desidratase foram amplificadas a partir de DNA genômico de *Megasphaera elsdenii* por PCR. Dois iniciadores foram usados para amplificar a seqüência codificando CoA transferase (OSNBpctF e OSCTE-2), e dois iniciadores foram usados para amplificar a seqüência codificando lactil-CoA desidratase (OSCTE-1 e OSNBe1R 5'-CGACGGATCCTTAGAGGATTTCGAGAAAGC-3', SEQ ID NO: 114). Uma molécula de ácido nucléico codificando uma 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi amplificada de DNA genômico de *Chloroflexus aurantiacus* através de PCR usando-se dois iniciadores (OSXNhF 5'-GGTGTCT-AGAGACAGTCCTGTCGTTTATGTAGAAGGAG-3', SEQ ID NO:115 e OSXNhR 5'-GGGAATTCCATATGCGTAACTTCCTCCTGCTATCAACGACCACTGAA-GTTGG-3', SEQ ID NO:116).

PCR foi conduzida em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler usando-se 100 ng de DNA genômico e uma mistura de rTth polimerase (Applied Biosystems; Foster City, CA) e Pfu Turbo polymerase (Stratagene; La Jolla, CA) em razão 8:1. A mistura polimerase assegurou alta fidelidade da reação PCR. As seguintes condições de PCR foram usadas: etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 2 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos PCR obtidos foram purificados com gel usando-se um Kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Inc.; Valencia, CA).

Os produtos de PCR CoA transferase e lactil-CoA desidratase (E1, subunidade E2 α , e subunidade E2 β) foram montados usando-se PCR. Os iniciadores OSCTE-1 e OSCTE-2 foram complementares um ao outro. Assim, os 22 nucleotídeos na extremidade da seqüência de CoA transferase e os 22 nucleotídeos no início da lactil-CoA desidratase podem anelar-se uns aos outros durante a reação de PCR estendendo o DNA em ambas direções. Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSNBpctF e OSNBeIR) foram adicionados à mistura de PCR de montagem, que conteve 100 ng ddo produto de PCR CoA transferase, 100 ng de produto de PCR lactil-CoA desidratase e a mistura rTth polimerase/Pfu Turbo polimerase descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montar os produtos: 94°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 5 minutos; e uma extensão final a 68°C por 6 minutos.

O produto de PCR montado foi purificado com gel e digerido com enzimas de restrição (NdeI e BamHI). Os sítios para estas enzimas de restrição foram introduzidos no produto de PCR montado usando-se iniciadores OSNBpctF (NdeI) e OSNBeIR (BamHI). O produto de PCT digerido foi aquecido a 80°C por 30 minutos para inativar as enzimas de restrição e usado diretamente em um vetor pET-11a

O vetor pET-11a foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI, purificado sobre gel usando um Kit Qiagen Gel Extraction, tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN) e usado em uma reação de ligação com o produto PCR montado. A ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando-se T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A resultante reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen; Madison, WI) usando-se um processo de choque térmico. Uma vez tenham sofrido choque térmico, as células foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 μ g/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado de colônias individuais usando um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) e analisado com enzimas de restrição NdeI e BamHI. A digestão

revelou que o fragmento de DNA contendo seqüências codificando CoA transferase e codificando lactil-CoA desidratase foi clonado no vetor pET-11a.

O plasmídeo carreando as seqüências codificando CoA transferase e codificando lactil-CoA desidratase (pTD) foi digerido com enzimas de restrição XbaI e NdeI, purificado com gel, e usado para clonagem de produto codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase a montante da seqüência codificando CoA transferase. Uma vez que esta digestão XbaI e NdeI eliminou um sítio ligante – ribossoma (RBS) do vetor pET-11a, um novo homólogo RBS foi clonado no plasmídeo junto com o produto codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Resumidamente, o produto de PCR codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi digerido com enzimas de restrição XbaI e NdeI, aquecido a 65°C por 30 minutos para inativar as enzimas de restrição, e ligado em pTD. A mistura de ligação foi transformada em células NovaBlue quimicamente competentes (Novagen) que então foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina.

Colônias individuais foram selecionadas, e o DNA plasmídeo obtido usando-se um kit Qiagen Spin Miniprep. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com enzimas de restrição XbaI e NdeI e analisados por eletroforese de gel. Plasmídeos pTD contendo o produto de PCR codificado 3-hidroxipropil-CoA desidratase inserido foram nomeados pHDT. Embora expressão das seqüências lactil-CoA desidratase, CoA transferase, e 3-hidróxi propionil-CoA desidratase a partir de pHDT tenha sido direcionada por um promotor T7 simples, cada seqüência codificante teve um RBS individual a montante de seu códon de partida.

Para assegurar a correta montagem e clonagem das seqüências lactil-CoA desidratase, CoA transferase, e 3-hidróxi propionil-CoA desidratase em um óperon, ambas extremidades do óperon e todas as junções entre as seqüências codificantes foram seqüenciadas. Esta análise de DNA revelou que o óperon foi corretamente montado.

O plasmídeo pHDT foi transformado em células BL21(DE3) para estudo de expressão das seqüências codificadas.

Exemplo 6 – Construção de óperons nº 3 e nº 4

Óperon nº 3 (Figuras 36A e B) e óperon nº 4 (Figuras 37A e B) cada posição de ativador E1 na extremidade do óperon. Óperon nº 3 contém um RBS entre a sequência codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase e a sequência codificando ativador E1. Em óperon nº 4, entretanto, o códon de interrupção da sequência codificando 3-hidróxi propionil-CoA desidratase está fundido com o códon de partida da sequência codificando ativador E1 como se segue: TAGTG. A ausência do RBS em óperon nº 4 pode diminuir o nível de expressão de ativador E1.

Para construção de óperon nº 3, moléculas de ácido nucléico codificando uma CoA transferase e uma lactil-CoA desidratase foram amplificadas a partir de DNA genômico de *Megasphaera elsdenii* através de PCR. Dois iniciadores foram usados para amplificar a sequência codificando CoA transferase (OSNBpctF e OSHTR 5'-ACGTTGATCTCCTTCTACATTATTTTTCAGT-CCCATG-3', SEQ ID NO 117), dois iniciadores foram usados para amplificar as subunidades E2 alfa e beta da sequência codificando lactil-CoA desidratase (OSEIIXNF 5'-GGTGTCTAGAGTCAAAGGAGAGAACAAAATCATGAGTG-3', SEQ ID NO:118 e OSEIIXNR 5'-GGGAATTCCATATGCGTAACTTCCTCCTGCTATTAGAGGA-TTCCGAGAAAGC-3', SEQ ID NO:119), e dois iniciadores foram usados para amplificar o ativador E1 da sequência codificando lactil-CoA desidratase (OSHrEIF 5'-TCAGTG-GTCGTTGATCACGCTATAAAGAAAGGTGAAAAGTGTGTATACTCTC-3', SEQ ID NO:120 e OSEIBR 5'-CGACGGATCCCTTCCTTGGAGCTCATGCTTTC-3', SEQ ID NO:121).

A molécula de ácido nucléico codificando uma 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi amplificada a partir de DNA genômico de *Chloroflexus aurantiacus* ou através de PCR usando-se dois iniciadores (OSTHF 5'-CATGGGACTGAAAAATAATGTAGAAGGAGAT-CAACGT-3', SEQ ID NO:122 OSELHR 5'-GAGAGTATACACAGTTTTCA-CCTTTCTTTATAGCGTGATCAACGACCACTGA-3', SEQ ID NO:123).

PCR foi conduzida em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler usando-se 100 ng de DNA genômico e uma mistura de rTth polimerase

(Applied Biosystems; Foster City, CA) e Pfu Turbo Polymerase (Stratagene; La Jolla, CA) em razão 8:1. A mistura polimerase assegurou maior fidelidade da reação PCR. As seguintes condições de PCR foram usadas: etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 2 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com gel usando um Kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Inc; Valencia, CA).

Os produtos de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase e ativador E1 foram montados usando-se PCR. Os iniciadores OSHrE1F e OSEIrHR foram complementares um ao outro. Assim, os iniciadores podem anelar um ao outro durante a reação de PCR estendendo o DNA em ambas direções. Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSTHF e OSEIBR) foram adicionados à mistura de PCR de montagem, que conteve 100 ng do produto de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase, 100 ng de produto de PCR ativador E1, e a mistura rTth polimerase/Pfu Turbo polimerase descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montar os produtos: 94°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 1,5 minuto; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

O produto PCR montado foi purificado com gel e usado em uma segunda PCR de montagem com produto de PCR CoA transferase purificado com gel. Os iniciadores OSTHF e OSHTR foram complementares um ao outro. Assim, as extremidade de DNA complementar podem anelar umas às outras durante a reação de PCR estendendo o DNA em ambas direções. Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSNBpctF e OSEIBR) foram adicionados à segunda mistura de PCR de montagem, que conteve 100 ng da montagem de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase/EI purificada, 100 ng do produto de PCR CoA transferase purificado, e a mistura polimerase descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montar os produtos: 94°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, e 68°C por 3 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

O produto PCR montado foi purificado sobre gel e digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI. Os sítios para estas enzimas de restrição foram introduzidos nos produtos de PCR montados com os iniciadores OSNBpctF (NdeI) e OSEIBR (BamHI). O produto de PCR digerido foi aquecido a 80°C por 30 minutos para inativar as enzimas de restrição e usado diretamente para ligação em um vetor pET11a.

O vetor pET-11a foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI, purificado com gel usando um Kit Qiagen Gel Extraction, tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN) e usado em uma reação de ligação com o produto de PCR montado. A ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A reação de ligação resultante foi transformada em células quimicamente competentes NovaBLue (Novagen; Madison, WI) usando um processo de choque térmico. Uma vez terem sofrido choque térmico, as células foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado a partir de colônias individuais usando um QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc.; Valencia, CA). Os resultantes plasmídeos carreando as seqüências CoA transferase, 3-hidróxi propionil-CoA desidratase e ativador EI (pTHrEI) foram digeridas com XbaI e NdeI, purificados usando eletroforese de gel e um Kit Qiagen Gel Extratation, e usados como um vetor para clonagem do produto de PCR subunidade E2 α /subunidade E2 β .

O produto de PCR subunidade E2 α /subunidade E2 β foi digerido com as mesmas enzimas e ligado no vetor pTHrEI. A reação de ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A mistura de ligação foi transformada em células NovaBlue quimicamente competentes (Novagen) que então foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado de colônias individuais usando-se um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) e digerido com enzimas de restrição XbaI e NdeI para análise de eletroforese de gel. Os resultantes plasmídeos carreando o óperon cosntruído nº 3 (pEIITHrEI) foram transformados

em células BL21(DE3) para se estudar a expressão das seqüências clonadas. Ensaio de espectrometria de massa de eletrospray confirmaram que extratos destas células têm atividade CoA transferase e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Ensaio similares são usados para confirmar que

5 extratos destas células também têm atividade lactil-CoA desidratase.

Para construir óperon nº 4, moléculas de ácido nucléico codificando uma CoA transferase e uma lactil-CoA desidratase foram amplificadas de DNA genômico de *Megasphaera elsdenii* através de PCR. Dois iniciadores foram usados para amplificar a seqüência codificando CoA transferase (OSNBpctF e OSHTR), dois iniciadores foram usados para amplificar as subunidades E2 α e β da seqüência codificando lactil-CoA desidratase (OSEIIXNF e OSEIIXNR), e dois iniciadores foram usados para amplificar o

10 ativador E1 da seqüência codificando lactil-CoA desidratase (OSHEIF 5'-CCAACTTCAGTGGTCGTTAGTGAAAAGTGTGTATACTCTC-3', SEQ ID Nº 124 e OSEIBR). Uma molécula de ácido nucléico codificando uma 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi amplificada a partir de DNA genômico de *Chloroflexus aurantiacus* ou através de PCR usando-se dois iniciadores (OSTHF e OSEIHR 5'-GAGAGTATACACAGTTTTCTACTAACGACCACTGAAGTTGG-3', SEQ ID NO: 125).

PCR foi conduzida em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler usando 100 ng de DNA genômico e uma mistura de rTth polimerase (Applied Biosystems; Foster City, CA) e Pfu Turbo polimerase (Stratagene; La Jolla, CA) em razão 8:1. A mistura polimerase assegurou maior fidelidade da reação PCR. As seguintes condições de PCR foram usadas: etapa de desnatura

20 ração inicial de 94°C por 2 minutos; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 2 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados sobre gel usando-se um Kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Inc.; Valencia, CA).

Os produtos de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase e ativador E1 foram montados usando-se PCR. Os iniciadores OSHEIF e OSEIHR foram complementares um ao outro. Assim, os iniciadores podem anelar um

30 ao outro durante a reação de PCR estendendo o DNA em ambas direções.

Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSTHF e OSE1BR) foram adicionados à mistura de PCR de montagem, que conteve 100 ng do produto de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase, 100 ng de produto de PCR ativador E1, e a mistura de rTth polimerase/Pfu Turbo polimerase descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montar os produtos: 94°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 1,5 minuto; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

O produto de PCR montado foi purificado sobre gel e usado em uma segunda PCR de montagem com produto de PCR CoA transferase purificado com gel. Os iniciadores OSTHF e OSHTR foram complementares um ao outro. Assim, as extremidades de DNA complementar podem anelar uma à outra durante a reação de PCR estendendo o DNA em ambas direções. Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSNBpctF e OSEIBR) foram adicionados à segunda mistura PCR de montagem, que conteve 100 ng da montagem de PCR de 3-hidróxi propionil-CoA desidratase/E1, 100 ng do produto de PCR CoA transferase purificado, e a mistura polimerase descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montar os produtos: 94°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 3 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

O produto PCR montado foi purificado com gel e digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI. Os sítios para estas enzimas de restrição foram introduzidos nos produtos de PCR montados com os iniciadores OSNBpctF (NdeI) e OSEIBR (BamHI). O produto de PCR digerido foi aquecido a 80°C por 30 minutos para inativar as enzimas de restrição e usado diretamente para ligação em um vetor pET11a.

O vetor pET-11a foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI, purificado sobre gel usando um Kit Qiagen Gel Extraction, tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) e usado em uma reação de ligação com o produto de PCR montado. A ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando T4 ligase (Roche

Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A resultante reação de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen; Madison, WI) usando um processo de choque térmico. Uma vez tenhamsofrido choque térmico, as células foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado de colônias individuais usando um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA). Os resultantes plasmídeos carreando as seqüências CoA transferase, 3-hidróxi propionil-CoA desidratase e ativador E1 (pTHE1) foram digeridas com XbaI e NdeI, purificadas usando eletroforese de gel e um Kit Qiagen Gel Extraction, e usados como um vetor para clonagem do produto de PCR subunidade E2 α /subunidade E2 β .

O produto de PCR subunidade E2 alfa/subunidade E2 beta foi digerido com as mesmas enzimas e ligado no vetor pTHE1. A reação de ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). A mistura de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBLue (Novagen) que então foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado a partir de colônias individuais usando um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) e digerido com enzimas de restrição XbaI e NdeI para análise de eletroforese de gel. Os resultantes plasmídeos carreando o óperon nº 4 construído (pEIITHEI) foram transformados em células BL21(DE3) para estudar-se a expressão das seqüências clonadas. Ensaios de espectrometria de massa de eletrospray confirmaram que extratos destas células têm atividade CoA transferase e atividade 3-hidróxi propionil-CoA desidratase. Ensaios similares são usados para confirmar que extratos destas células também têm atividade lactil-CoA desidratase.

pEIITHrEI plasmídeo *E. coli* carreando um óperon 3-HP sintético foi digerido com enzimas de restrição NruI, XbaI e BamHI, fragmento de DNA XbaI-BamHI foi purificado sobre gel com Kit QiaGen Gel Extraction (Qiagen, Inc., Valencia, CA) e usado para ainda clonagem em vetor Bacillu pWH1520 (MoBiTec BmBH, Gottingen, Alemanha). Vetor pWH1520 foi dige-

rido com enzimas de restrição SpeI e BamHI e purificado sobre gel com Kit QiaGen Gel Extraction. O fragmento XbaI-BamHI carreando óperon 3-HP foi ligado em vetor WH1520 a 16°C por toda noite usando-se T4 ligase. A mistura de ligação foi transformada em células TOP 10 quimicamente competentes e revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. Um clone nomeado B. megaterium (pBpO26) foi usado para ensaios de atividades de CoA-transferase e CoA-hidratase. Os ensaios foram realizados como descrito acima para *E. coli*. A atividade enzimática foi 5 U/mg e 13 U/mg, respectivamente.

10 Exemplo 7 – Construção de um sistema de dois plasmídeos

Os seguintes constructos foram construídas e podem ser usadas para produção de 3-HP em *E. coli* (Figuras 38A e B). Moléculas de ácidos nucléicos codificando uma CoA transferase e uma lactil-CoA desidratase foram amplificadas de DNA genômico de *Megasphaera elsdenii* por PCR. 15 Dois iniciadores foram usados para amplificar a sequência codificando CoA transferase (OSNBpctF e OSHTR), dois iniciadores foram usados para amplificar as subunidades E2 alfa e beta da sequência codificando lactil-CoA desidratase (OSEIIXNF e OSEIIXNR), e dois iniciadores foram usados para amplificar o ativador E1 da sequência codificando lactil-CoA desidratase (E1PROF 5'-GTCGCAGAATTCCCATCAATCGCAGCAATCCCAAC-3', SEQ ID NO:126 e 1PROR 5'-TAACATGGTACCGACAGAAGCGGACCAGCA-AACGA- 20 3', SEQ ID NO:127).

Uma molécula de ácido nucléico codificando uma 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foi amplificada a partir de DNA genômico de *Chloroflexus aurantiacus* por PCR usando-se dois iniciadores (OSTHF e OSHBR 5'-CGACGGATCCTCAACGACCACTGAAGTTGG-3', SEQ ID NO: 128).

25 PCR foi conduzida em um Perkin Elmer 2400 Thermocycler usando 100 ng de DNA genômico e uma mistura de rTth polimerase (Applied Biosystems; Foster City, CA) e Pfu Turbo Polimerase (Stratagene; LaJolla, CA) em razão 8:1. A mistura polimerase assegurou maior fidelidade da reação PCR. As seguintes condições de PCR foram usadas: etapa de desnatura- 30 ção inicial de 94°C por 2 minutos; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos,

54°C por 30 segundos, e 68°C por 2 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos PCR obtidos foram purificados sobre gel usando-se um Kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Inc.; Valencia, CA).

O produto de PCR CoA transferase e o produto de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase foram montados usando-se PCR. Os iniciadores OSTHF e OSHTR foram complementares um ao outro. Assim, as extremidades de DNA complementares podem anelar umas às outras durante a reação de PCR estendendo o DNA em ambas direções. Para assegurar a eficiência da montagem, dois iniciadores de extremidade (OSNBpctF e OSHBR) foram adicionados à mistura de PCR de montagem, que conteve 100 ng do produto de PCR CoA transferase purificado, 100 ng do produto de PCR 3-hidróxi propionil-CoA desidratase, e a mistura de polimerases descrita acima. As seguintes condições de PCR foram usadas para montagem de produtos: 94°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 68°C por 2,5 minutos; e uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

O produto PCR montado foi purificado sobre gel e digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI. Os sítios para estas enzimas de restrição foram introduzidos nos produtos de PCR montados com os iniciadores OSNBpctF (NdeI) e OSHBR (BamHI). O produto de PCR digerido foi aquecido a 80°C por 30 minutos para inativar as enzimas de restrição e usado diretamente para ligação em um vetor pET11a.

O vetor pET-11a foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI, purificado sobre gel usando-se um kit Qiagen Gel Extraction, tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) e usado em uma reação de ligação com o produto PCR montado. A ligação foi realizada a 16°C por toda a noite usando T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN). A reação de ligação resultante foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen; Madison, WI) usando um processo de choque térmico. Uma vez tenham sofrido choque térmico, as células foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 µg/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado de

colônias individuais usando-se um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc.; Valencia, CA) e digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI para análises de eletroforese sobre gel. Os plasmídeos resultantes carreando a CoA transferase e 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (pTH) foram digeridos com XbaI e NdeI, purificados usando-se eletroforese sobre gel e um Kit Qiagen Gel Extraction, e usados como um vetor para clonagem do produto de PCR subunidade E2 α /subunidade E2 β .

O produto de PCR de subunidade E2 α /subunidade E2 β digerido com as mesmas enzimas foi ligado no vetor pTH. A reação de ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando-se T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A mistura de ligação foi transformada em células quimicamente competentes NovaBlue (Novagen) que então foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 50 μ g/ml de carbenicilina. O DNA plasmídeo foi purificado a partir de colônias individuais usando-se um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc.; Valencia, CA) e digerido com enzimas de restrição XbaI e NdeI para análise de eletroforese de gel. Os plasmídeos resultantes carreando as subunidades E2 α e β da lactil-CoA desidratase, a CoA transferase, e a 3-hidróxi propionil-CoA desidratase (pEITH) foram transformados em células BL21(DE3) para estudo de expressão das seqüências clonadas.

O produto de PCR ativador E1 purificado sobre gel foi digerido com enzimas de restrição EcoRI e KpnI, aquecido a 65°C por 30 minutos, e ligado em um vetor (pPROLar.A) que foi digerido com enzimas de restrição EcoRI e KpnI, purificado sobre gel usando kit Qiagen Gel Extraction, e tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A ligação foi realizada a 16°C por toda noite usando-se T4 ligase (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN). A resultante reação de ligação foi transformada em células eletrocompetentes DH10B (Gibco Life Technologies; Gaithersburg, MD) usando-se eletroporação. Uma vez eletroporadas, as células foram revestidas sobre placas LB suplementadas com 25 μ g/ml de canamicina. O DNA plasmídeo foi purificado de colônias individuais usando-se um Kit QiaPrep Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) e

digerido com enzimas de restrição EcoRI e KpnI para análise de eletroforese de gel. Os plasmídeos resultantes carreando o ativador E1 (pPROEI) são transformados em células BL21(DE3) para estudar a expressão da sequência clonada.

- 5 Os plasmídeos pPROEI e pEIITH são plasmídeos compatíveis que podem ser usados na mesma célula hospedeira bacteriana. Em adição, a expressão a partir dos plasmídeos pPROEI e pEIITH pode ser induzida em diferentes níveis usando-se IPTG e arabinose, permitindo-se a sintonia fina da expressão das seqüências clonadas.

10 Exemplo 8 – Produção de 3-HP

- 3-HP foi produzido usando-se *E. coli* recombinante em uma reação de fermentação em batelada em pequena escala. A construção de cepa ALS848 (também designada como TA 3476 (J. Bacteriol., 143:1081-1085 (1980))) que carregou T7 RNA polimerase induzível foi realizada usando-se
- 15 λ DE3 lysogenization kit de lisogenização (Novagen, Madison, WI) de acordo com instruções do fabricante. A cepa construída foi designada ALS484(DE3). Cepa ALS484(DE3) foi transformada com plasmídeo pEIITHrEI usando-se técnicas de eletroporação padrões. Os transformantes foram selecionados sobre placas de LB/carbenicilina (50 μ g/ml). Uma colônia
- 20 simples foi usada para inocular 4 ml de cultura em um tubo de cultura de 15ml. Cepa ALS484(DE3) carreando vetor pET11a foi usada como um controle. As células foram crescidas a 37°C e 250rpm em um Innova 4230 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) por oito a nove horas. Esta cultura (3ml) foi usada para iniciar uma fermentação anaeróbica. Duas
- 25 culturas anaeróbicas de 100ml de ALS(DE3)/pET11a e ALS(DE3)pEIITHrEI foram cultivadas em garrafas de soro usando-se meios LB suplementados com glicose 0,4%, 50 μ g/ml de carbenicilina, e 100 mM MOPS. As culturas foram cultivadas por toda a noite a 37°C sem agitação. Culturas crescidas por toda a noite foram subcultivadas em garrafas de soro usando-se meios
- 30 LB frescos suplementados com glicose 0,4%, carbenicilina 50 μ g/ml e MOPS 10 mM. A OD(600) de partida destas culturas foi ajustada para 0,3. Estas garrafas de soro foram incubadas a 37°C sem agitação. Após uma hora de

incubação, as culturas foram induzidas com IPTG 100 μ M. Uma amostra de 3ml foi tomada de cada uma das garrafas de soro em 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, e 24 horas. As amostras foram transferidas em dois tubos de microcentrífuga de 2ml propriamente marcados, cada um contendo 1,5ml de amostra. As amostras foram giradas em uma centrífuga em 14000g por 3 minutos. O sobrenadante foi passado através de um filtro seringa de 0,45 μ , e o resultante filtrado foi estocado a -20°C até ainda análise. A formação de produtos de fermentação, principalmente lactato e 3-hidróxi propionato, foi medida através de detecção de CoA ésteres derivatizados de lactato e 3-HP usando LC/EM.

Os seguintes processos foram realizados para conversão de lactato e 3-HP em seus respectivos CoA ésteres. Resumidamente, os filtrados foram misturados com tampão de reação CoA (tampão fosfato de potássio 200 mM, acetil-CoA 2 mM, e transferase purificada 0,1 mg/ml) em razão 1:1. A reação foi deixada proceder por 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida por adição de 1 volume de TFA 10%. A amostra foi purificada usando-se colunas Sep Pak Vac (Waters). A coluna foi condicionada com metanol e lavada duas vezes com TFA 0,1%. A amostra foi então aplicada à coluna, e a coluna foi lavada mais duas vezes com TFA 0,1%. A amostra foi eluída com acetonitrila 40%, TFA 0,1%. A acetonitrila foi removida da amostra por centrifugação à vácuo. As amostras então foram analisadas por LC/EM.

Análises das misturas CoA/CoA tioéster padrão e as misturas CoA tioéster derivadas de caldos de fermentação foram realizadas usando-se um instrumento Waters/Micromass ZQ LC/EM que teve um cromatógrafo líquido Waters 2690 com um Water 996 Photo-Diode Array (PDA) absorbança monitor colocado em série entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massa quadrupolo simples. Separações LC foram feitas usando-se uma coluna de cromatografia de fase reversa YMC ODS-AQ(partículas de 3 μ m, poros de 120 Å de 4,6x150mm em temperatura ambiente. Dois sistemas de eluição de gradiente foram desenvolvidos usando-se diferentes fases móveis para a separação dos CoA ésteres. Estes dois sistemas são resumidos na

Tabela 3. Sistema de eluição 1 foi desenvolvido para prover a separação mais rápida e eficiente da mistura de CoA/CoA tioéster de cinco componentes (CoA, acetil-CoA, lactil-CoA, acrilil-CoA, e propionil-CoA), enquanto sistema de eluição 2 foi desenvolvido para prover separação de linha base dos ésteres estruturalmente isoméricos de lactil-CoA e 3-HP-CoA em adição à separação dos ésteres restantes listados acima. Em todos os casos, a taxa de fluxo foi 0,250 ml/minuto, e absorbância de UV de arranjo de fotodiodo foi monitorada de 200 nm a 400 nm. Todos os parâmetros do sistema de EM de eletrospray foram otimizados e selecionados baseados em geração de íons moleculares protonados ($[M+H]^+$) dos analitos de interesse e produção de característicos íons de fragmentos. Os seguintes parâmetros instrumentais foram usados para detecção ESI-EM de CoA e ácido orgânico-CoA tioésteres no modo íon positivo: Capilaridade: 4,0 V; Cone: 56 V; Extrator: 1 V; lente RF: 0 V; temperatura de fonte: 100°C; temperatura de dessolvatação: 300°C; gás de dessolvatação: 500 l/hora; gás de cone: 40 l/hora; resolução de massa baixa: 13,0; resolução de massa alta: 14,5; energia de íon: 0,5; multiplicador: 650. Incertezas para razões de massa/carga reportadas (m/z) e massas moleculares são $\pm 0,01\%$. A tabela 3 provê um resumo de sistemas de gradiente de eluição para a separação de ácido orgânico-Coenzima A tioésteres.

Sistema	Tampão A	Tampão B	Gradiente	
			Tempo	Porcentagem B
1	25 mM acetato de amônio 0,5% ácido acético	ACN 0,5% ácido acético	0	10
			40	40
			42	100
			47	100
			50	10
2	23 mM acetato de amônio 10 mM TEA 0,5% ácido acético	ACN 0,5% ácido acético	0	10
			10	10
			45	60
			50	100
			53	100
			54	10

Os seguintes processos foram usados para separar a 3-hidróxi propionil-CoA derivatizada, que foi formada a partir de 3-HP, de 2-hidróxi propionil-CoA (isto é, lactil-CoA), que foi formada a partir de lactato. Devido a estes isômeros estruturais terem massas idênticas e comportamento de fragmentação espectral de massa, a separação e identificação destes analitos em uma mistura depende de sua separação cromatográfica. Embora sistema de eluição 1 tenha provido excelente separação dos CoA tioésteres testados (Figura 46), ele foi incapaz de resolver 3-HP-CoA e lactil-CoA. Um sistema de eluição LC alternativo foi desenvolvido usando acetato de amônio e trietilamina (sistema 2; Tabela 3).

A habilidade de sistema 2 em separar 3-HP-CoA e lactil-CoA foi testada em uma mistura destes dois compostos. Comparando os resultados de uma mistura de 3-HP-CoA e lactil-CoA (Figura 47, Painel A) aos resultados de lactil-CoA somente (Figura 47, Painel B) revelou-se que sistema 2 pode separar 3-HP-CoA e lactil-CoA. O espectro de massa anotado sob pico 1 (Figura 47, Painel A inserção) foi usado para identificar pico 1 como sendo um hidróxi propionil-CoA tioéster quando comparado a Figura 46, Painel C. Em adição, comparação de painéis A e B de Figura 47 assim como os re-

sultados de espectros de massa para cada pico revelou que pico 1 corresponde a 3-HP-CoA e pico 2 corresponde a lactil-CoA.

Sistema 2 foi usado para confirmar que *E. coli* transfectado com pEIITHrEI produziu 3-HP em que 3-HP-COA foi detectada. Especificamente, um cromatograma de íon para $m/z = 840$ na análise de uma alíquota de caldo de fermentação tratado com CoA transferase coletada de uma cultura de *E. coli* contendo pEIITHrEI revelou a presença de 3-HP-CoA (Figura 48, Painel A). A alíquota de caldo de fermentação tratado com CoA transferase coletada de uma cultura de *E. coli* faltando pEIITHrEI não exibe o pico correspondendo a 3-HP-CoA (Figura 48, Painel B). Assim, estes resultados indicam que o plasmídeo pEIITHrEI direciona a expressão de polipeptídeos tendo atividade propionil-CoA transferase, atividade lactil-CoA desidratase e atividade acrilil-CoA hidratase. Estes resultados também indicam que expressão destes polipeptídeos conduz à formação de 3-HP.

Exemplo 9 – clonagem de moléculas de ácido nucléico que codificam um polipeptídeo tendo atividade acetil CoA carboxilase

Polipeptídeos tendo atividade acetil-CoA carboxilase catalisam a primeira etapa da síntese de ácido graxo por carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA. Polipeptídeos tendo atividade acetil-CoA também são responsáveis pelo provimento de malonil-CoA para a biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa requeridos para própria função de célula. Polipeptídeos tendo atividade acetil-CoA carboxilase põem ser enzimas dependentes de biotina nas quais o co-fator biotina está pós-traducionalmente ligado a um específico resíduo lisina. A reação catalisada por tais polipeptídeos consiste em duas meias reações discretas. Na primeira meia-reação, biotina é carboxilada por biocarbonato em uma reação dependente-ATP para formar carbóxi biotina. Na segunda meia-reação, o grupo carboxila é transferido para acetil-CoA para formar malonil-CoA.

Polipeptídeos procarióticos e eucarióticos tendo atividade acetil-CoA carboxilase existem. O polipeptídeo procariótico é uma enzima multi-subunidade (quatro subunidades), onde cada uma das subunidades é codificada por uma diferente seqüência de ácido nucléico. Por exemplo, em *E.*

coli, os seguintes genes codificam as quatro subunidades de acetil-CoA carboxilase:

accA: acetil coenzima a carboxilase carboxil transferase subunidade alfa (GenBank® número de acesso M96394)

5 accB: proteína carreadora de biotina carboxila (GenBank® número de acesso U18997)

accC: biotina carboxilase (GenBank® número de acesso U18997)

10 accD: acetil-coenzima uma carboxilase carboxil transferase subunidade beta (GenBank® número de acesso M68934)

O polipeptídeo eucariótico é uma enzima multifuncional de alto peso molecular codificado por um gene simples. Por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*, a acetil-CoA carboxilase pode ter a seqüência mostrada em GenBank® número de acesso M92156.

15 O tipo procariótico de acetil-CoA carboxilase de *E. coli* foi super-expresso usando vetor promotor T7 pFN476 como descrito em outro lugar (Davis et al. J. Biol. Chem., 275:28593-28598 (2000)). O gene acetilCoA carboxilase tipo eucariótico foi amplificado de DNA genômico de *Saccharomyces cerevisiae*. Dois iniciadores foram projetados para amplificar o gene

20 acc1 de *S. cerevisiae* (acc1F 5'-atag**GCGGCCGCAGGAATGCTGTATG** AGCGAAGAAAGCTTATT C-3', SEQ ID NO: 138 onde o negrito é seqüência homóloga, os itálicos é um sítio Not I, o sublinhado é uma RBS, e a caixa baixa é extra; e acc1R

5'-ATGCTCGCATCTCGAGTAGCTAAATTAAATTACATCAATAGTA-3', SEQ

25 ID NO: 139 onde o negrito é seqüência homóloga, os itálicos um sítio Xho I, e a caixa baixa é extra). A seguinte mistura de PCR é usada para amplificar gene acc1 tampão 10X pfu (10 µl), dNTP (10mM; 2 µl), cDNA (2 µl), acc1F (100 uM; 1 µl), acc1R (100 uM, 1 µl), enzima pfu (2,5 unidades/µl; 2 µl), e água DI (82 µl). O seguinte protocolo foi usado para amplificar o gene acc1.

30 Após modalidade de PCR, o produto de PCR foi separado sobre um gel, e a banda correspondendo a ácido nucléico acc1 (cerca de 6,7 Kb) foi isolada em gel usando Kit de isolamento de gel Qiagen. O fragmento de PCR é di-

gerido com enzimas de restrição Not I e Xho I (New England BioLab). O fragmento de PCR digerido é então ligado a pET30a que foi restrito com Not I e Xho I e desfosforilado com enzima SAP. A cepa *E. coli* DH10B foi transformada com 1 µl da mistura de ligação, e as células foram recuperadas em 1 ml de meio SOC. As células transformadas foram selecionadas sobre placas de LB/canamicina (50 µg/µl). Oito colônias simples são selecionadas, e PCR foi usada para selecionar a correta inserção. O plasmídeo tendo correta inserção foi isolado usando Qiagen Spin Mini prep kit.

Para obter um polipeptídeo tendo atividade acetil-CoA carboxilase, o plasmídeo pMSD8 ou pET30a/acc1 superexpressando *E.coli* ou *S.cerevisiae* acetil-CoA carboxilase foi transformado em células quimicamente competentes Tuner pLacI (Novagen, Madison, WI). As células transformadas foram selecionadas sobre LB/cloranfenicol (25 µg /ml) mais carbenicilina (50 µg /ml) ou canamicina (50 µg /ml).

Um extrato bruto desta cepa pode ser preparado da seguinte maneira. Uma cultura de toda noite de Tuner pLacI com pMSD8 é subcultivada em 200ml (em um frasco de cultura de defletor de um litro) de meios M9 frescos suplementados com glicose 0,4%, tiamina 1 µg /ml, ácidos casamino 0,1%, e 50 µg /ml de carbencilina ou 50 µg /ml canamicina e 25 µg /ml cloranfenicol. A cultura é crescida a 37°C em um agitador com 250 rpm de agitação até atingir uma densidade ótica em 600 nm de cerca de 0,6. IPTG é então adicionada para uma concentração final de 100 µM. A cultura é então incubada por 3 horas adicionais com velocidade de agitação de 250 rpm a 37°C. Células são colhidas por centrifugação a 8000 x g e são lavadas uma vez com NaCl 0,85%. A pélete de células foi re-suspensa em um volume mínimo de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, DTT 2 mM, e glicerol 5%. As células são lisadas através de passagem das mesmas duas vezes através de uma célula de Pressão Francesa em pressão de 70,3 kgf/cm². Os fragmento de células foram removidos por centrifugação por 20 minutos em 30 000 x g.

A enzima pode ser ensaiada usando-se um processo de Davis et al. (J. Biol. Chem., 275:28593-28598 (2000)).

Exemplo 10 – Clonagem de uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase a partir de *Chloroflexus aurantiacus*

Um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase foi parcialmente purificado de *Chloroflexus aurantiacus* e usado para resultados obtidos de microseqüenciamento de aminoácido. Os resultados de seqüenciamento de aminoácido foram usados para identificar e clonar o ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase.

Biomassa requerida para purificação de proteína foi cultivada em fermentadores B. Braun BIOSTAT B (B Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany). Um vaso de vidro adaptado com uma camisa de água para aquecimento foi usado para crescer a biomassa requerida. O vaso de vidro foi conectado a sua própria unidade de controle. O volume de trabalho líquido foi 4 litros, e o fermentador foi operado a 55°C com 75 rpm de agitação. Dióxido de carbono foi ocasionalmente borbulhado através do espaço superior do fermentador para manter condições anaeróbicas. O pH das culturas foi monitorado usando-se uma sonda de pH padrão e foi mantido entre 8,0 e 8,3. O inoculum para os fermentadores foi crescido em duas garrafas de 250 ml em um Innova 4230 Incubator, Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 55°C com luzes interiores. Os fermentadores foram iluminados por três lâmpadas refletoras de luz de planta de 65 W (General Electric, Cleveland, OH). Cada lâmpada foi colocada aproximadamente 50cm afastada do vaso de vidro. Os meios usados para o inoculum e a cultura de fermentador foram como se segue por litro: 0,07 g EDTA, 1 ml de solução micronutriente, 1 ml de FeCl₃, 0,06 g CaSO₄.2 H₂O, 0,1g MgSO₄.7H₂O, 0,008 g NaCl, 0,075 g KCl, 0,103 g KNO₃, 0,68 g NaNO₃, 0,111 g Na₂HPO₄, 0,2 g NH₄Cl, 1 g extrato de levedura, 2,5 g ácido casamino, 0,5 g glicil – glicina e 900 ml água DI. A solução micronutriente conteve o seguinte por litro: 0,5ml H₂SO₄ (conc.), 2,28g MnSO₄.7H₂O, 0,5g ZnSO₄.7H₂O, 0,5g H₃BO₃, 0,025g CuSO₄.2H₂O, 0,025g Na₂MoO₄.2H₂O, e 0,045g CoCl₂.6H₂O. A solução de FeCl₃ conteve 0,2905g FeCl₃ por litro. Após ajuste de pH dos meios para 8,2 a 8,4, 0,75 g/l de Na₂S.9H₂O foram adicionados, o pH ajustado para

8,2 a 8,4, e os meios foram esterilizados em filtro através de um filtro de 0,22 μ m.

O fermentador foi inoculado com 500ml de cultura de crescimento. A fermentação foi interrompida, e a biomassa foi colhida após a densidade de célula ser cerca de 0,5 a 0,6 unidades em 600 nm.

As células foram colhidas por centrifugação em 5000xg (Beckman JLA 8.1000 rotor) a 4°C, lavadas com 1 volume de NaCl 0,85% resfriado com gelo, e novamente centrifugadas. O pélete de células foi ressuspenso em tampão de 30 ml de Tris-HCl 100 mM resfriado com gelo (pH 7,8) que foi suplementado com DTT 2 mM, $MgCl_2$ 5 mM, PEFABLOC 0,4 mM (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN), sulfato de streptomicina 1%, e 2 tabletes de coquetel inibidor protease livre-EDTA completo (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). A suspensão de células foi lisada através de passagem da suspensão, três vezes, através de uma célula de pressão francesa de 50ml operada em 11,03 MPa (1600 psi) (leitura de medidor). Fragmentos de células foram removidos por centrifugação em 30 000 xg (Beckman JA 25.50 rotor). O extrato bruto foi filtrado antes de cromatografia usando-se um filtro de seringa de membrana Tuffrin HT 0,2 μ m (Pall Corp., Ann Arbor, MI). A concentração de proteína do extrato bruto foi 29 mg/ml, que foi determinada usando-se o Ensaio de Proteína da BioRad de acordo com o protocolo de micro-ensaio do fabricante. Gama globulina bovina foi usada para a determinação de curva padrão. Este ensaio foi baseado no procedimento de ligação-corante de Bradford (Bradford, Anal. Biochem., 72:248 (1976)).

Antes de iniciar a purificação de proteína, o seguinte ensaio foi usado para determinar a atividade de malonil-CoA redutase no extrato bruto. Uma alíquota de 50 μ l do extrato de células (29 mg/ml) foi adicionada a 10 μ l de Tris-HCl 1M (concentração final em ensaio de 100 mM), 10 μ l de malonil CoA 10 mM (concentração final em ensaio de 1 mM), 5,5 μ l de NADPH 5,5 mM (concentração final em ensaio de 0,3 mM), e 24,5 μ l de água DI em uma placa transparente de UV de 96 cavidades (Corning, NY). A atividade de enzima foi medida a 45°C usando-se leitor de placa de 96 cavidades Spectra-

MAX Mais (Molecular devices Sunnyvale, CA). A atividade de malonil-CoA redutase foi monitorada através de medição de desaparecimento de NADPH em comprimento de onda de 340 nm. O extrato bruto exibiu atividade malonil-CoA redutase.

5 O extrato de célula de proteína de 5 ml (total 145mg) foi diluído com 20ml de tampão A (etanolamina 20 mM (pH 9,0), $MgCl_2$ 5 mM, DTT 2 mM). A purificação cromatográfica de proteína foi conduzida usando-se um sistema de purificação de proteína BioLogic (BioRad Hercules, CA). Os 25ml de suspensão de células foram carregados em uma coluna UNO Q-6 ion-exchange que foi equilibrada com tampão A em uma taxa de 1 ml/minuto. 10 Após carga de amostra, a coluna foi lavada com 2,5 vezes volume de coluna de tampão A em uma taxa de 2 ml/minuto. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl em tampão A de 0-0,33M em 25 volumes de coluna. Durante a inteira separação cromatográfica, frações de três ml foram coletadas. Os tubos de coleta contiveram 50 μ l de Tris-HCl (pH 6,5) de modo 15 que o pH da amostra eluída caiu para cerca de pH 7. Principais picos cromatográficos foram detectados na região que correspondeu a frações 18 a 21 e 23 a 30. Uma amostra de 200 μ l foi tomada destas frações e concentrada em uma microcentrífuga a 4°C usando colunas Microcon YM-10 (Millipore Corp., Bedford, MA) com instruções do fabricante. A cada fração concentrada, tampão A-Tris (Tris-HCl 100 mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 5 mM, DTT 2 mM) foi adicionado para levar o volume total para 100 μ l. Cada uma destas 20 frações foi testada para a atividade malonil-CoA redutase usando o ensaio espectrofotométrico descrito acima. A maioria de atividade específica malonil CoA foi encontrada em frações 18 a 21. Estas frações foram reunidas, e a 25 amostra reunida foi dessalinizada usando coluna PD-10 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) com instruções do fabricante.

 10,5ml de extrato de proteína dessalinizado foram diluídos com tampão A-Tris para um volume de 25ml. Esta amostra dessalinizada diluída 30 foi aplicada a uma coluna HiTrap Blue 1ml (Amersham Pharmacia Piscataway, NJ) que foi equilibrada com tampão A-Tris. A amostra foi carregada em uma taxa de 0,1 ml/minuto. Proteínas não-ligadas foram lavadas com 2,5

CV tampão A-Tris. A proteína foi eluída com Tris 100 mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 5 mM, DTT 2mM, NADPH 2 mM, e NaCl 1 M. Durante este processo de separação, frações de um ml foram coletadas. Uma amostra de 200 μ l foi retirada de frações 49 a 54 e concentrada. Tampão A-Tris foi adicionado a cada uma das frações concentradas para levar o volume total para 100 μ l. Frações foram ensaiadas para atividade de enzima como descrito acima. A mais alta atividade específica foi observada em fração 51. A inteira fração 51 foi concentrada como descrito acima, e a amostra concentrada foi separada sobre um gel SDS-PAGE.

10 Eletroforese foi realizada usando-se um sistema Bio-Rad Protean II minigel e géis pré-cast SDS-PAGE (4-15%), ou um sistema Protean II XI e géis SDS-PAGE 16cm x 20 cm x 1 mm (10%) cast como para o protocolo do fabricante. Os géis foram corridos de acordo com as instruções do fabricante com um tampão de corrida de Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 15 192 mM, e SDS 0,1%.

Uma espessura de gel de 1mm foi usada para correr amostras de fração 51. Proteína de fração 51 foi carregada sobre SDS-PAGE 10% (3 faixas, cada uma contendo 75 μ g de proteína total). Os géis foram brevemente manchados com azul Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA) e então 20 mancha retirada para um fundo claro com uma solução de ácido acético 10% e metanol 20%. O manchamento revelou uma banda de cerca de 130 a 140 Kda.

A banda de proteína de cerca de 130-140 Kda foi cortada sem excesso de gel não-manchado presente. Uma área igual de gel sem proteína 25 foi cortada como um controle negativo. As fatias de gel foram colocadas em tubos de microcentrífuga não-coloridos, pré-lavados com acetonitrila 50% em água grau HPLC, lavadas duas vezes com acetonitrila 50%, e transportadas sobre gelo seco para Harvard Microchemistry Sequencing Facility, Cambridge, MA.

30 Após digestão enzimática in-situ da amostra de polipeptídeo com tripsina, os resultantes polipeptídeos foram separados por HPLC de fase reversa microcapilar. A HPLC foi diretamente acoplada à fonte de ionização

de nano – eletrospray de um espectrômetro de massa Finnigan LCQ quadrupole ion trap (uLC/EM/EM). Espectros de seqüências individuais (EM/EM) foram adquiridos em linha em alta sensibilidade para os múltiplos polipeptídeos separados durante a corrida cromatográfica. Os espectros EM/EM dos polipeptídeos foram correlacionados com seqüências conhecidas usando-se o algoritmo Sequest desenvolvido na Universidade de Washington (Eng et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5:976 (1994)) e programas desenvolvidos em Harvard (Chittum et al., Biochemistry, 37:10866 (1998)). Os resultados foram revistos para consenso com proteínas conhecidas e para confirmação manual de fidelidade.

Um similar procedimento de purificação foi usado para obter uma outra amostra (amostra de proteína 1) que foi submetida à mesma análise que foi usada para avaliar a amostra de fração 51.

Os resultados de seqüência de polipeptídeo indicaram que os polipeptídeos obtidos de ambas, amostra de fração 51 e amostra de proteína 1 tiveram similaridade para os seis contigs (764, 799, 859, 923, 1090, 1024) seqüenciados a partir do genoma de *C. aurantiacus* e apresentados no Joint Genome Institute's web site (<http://www.jgi.doe.gov/>). O contig 764 foi o mais proeminente dos seis com cerca de 40 seqüências de peptídeo mostrando similaridade. Análise BLASTX de cada um destes contigs sobre o GenBank web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) indicaram que a seqüência de DNA do contig 764 (4201 bases) codificou polipeptídeos que tiveram uma atividade tipo desidrogenase/redutase. Inspeção de perto do contig 764, entretanto, revelou que este contig não tem um ORF apropriado que possa codificar um polipeptídeo de 130-140 Kda.

Análises BLASTX também foram conduzidas usando-se os outros cinco contigs. Os resultados desta análise foram como se segue. O contig 799 (3173 bases) pareceu codificar polipeptídeos tendo atividades tipo fosfato e desidrogenase. O contig 859 (5865 bases) pareceu codificar polipeptídeos tendo atividades tipo sintetase. O contig 923 (5660 bases) pareceu codificar polipeptídeos tendo atividades de fator de alongação e tipo sintetase. O contig 1090 (15201 bases) pareceu codificar polipeptídeos ten-

do atividades desidrogenase/redutase e citocroma e fator sigma. O contig 1024 (12276 bases) pareceu codificar polipeptídeos tendo atividades tipo desidrogenase e descarboxilase e sintetase. Assim, os contigs 859 e 923 foram eliminados de quaisquer ainda análises.

5 Os resultados das análises BLASTX também revelaram que a desidrogenase encontrada no contig 1024 foi mais provavelmente uma inositol monofosfato desidrogenase. Assim, o contig 1024 foi eliminado como um possível candidato que pode codificar um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase. O contig 799 também foi eliminado uma vez que este
10 contig é parte do polipeptídeo OS17 descrito acima.

Isto estreitou a busca para 2 contigs, os contigs 764 e 1090. Uma vez que os contigs foram identificados usando-se a mesma amostra de proteína e as atividades desidrogenase encontradas nestes contigs renderam resultados BLASTX muito similares, foi feita a hipótese de que eles são parte
15 do mesmo polipeptídeo. Adicional evidência suportando esta hipótese foi obtida da descoberta de que os contigs 764 e 1090 são adjacentes um ao outro no genoma de *C. aurantiacus* como revelado por uma análise de dados de "scaffold" providos pelo Joint Genome Institute. Similaridade de sequência e análise de montagem, entretanto, não revelaram sobreposição de
20 sequência entre estes dois contigs, possivelmente devido à presença de folgas no seqüenciamento de genoma.

As seqüências de polipeptídeos que pertenceram aos contigs 764 e 1090 foram mapeadas. Baseado nestas análises, uma apropriada armadilha codificante e potenciais códons de partida e interrupção foram identifi-
25 cados. Os seguintes iniciadores PCR foram projetados para amplificar por PCR um fragmento que codificou um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase:

PRO140F 5'-ATGGCGACGGGCGAGTCCATGAG-3', SEQ ID NO:153; PRO140R 5'-GGACACGAAGAACAGGGCGACAC-3', SEQ ID NO:154; and PRO140UP 5'-GAACTGTCTGGAGTAAGGCTGTC-3', SEQ ID NO:155.

O iniciador PRO140F foi projetado baseado na seqüência do
30 contig 1090 e corresponde ao início do potencial códon de partida. A vigési-

ma base foi alterada de G para C para evitar formação iniciador – iniciador. Esta mudança não altera o aminoácido que foi codificado pelo códon. O iniciador PRO140R foi projetado baseado na seqüência do contig 764 e corresponde a uma região localizada cerca de 1 kB a jusante do potencial códon de interrupção. O iniciador PRO140F foi projetado baseado na seqüência do contig 1090 e corresponde a uma região localizada cerca de 300 bases a montante de potencial códon de partida.

DNA genômico de *C. aurantiacus* foi obtido. Sumariamente, *C. aurantiacus* foi crescido em culturas de 50ml por 3 a 4 dias. Células foram peletizadas e lavadas com 5 ml de uma solução Tris 10 mM. O DNA genômico foi então isolado usando-se o protocolo de bactérias gram positivas provido com Gentra Genomic "Puragene" DNA isolation kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN). O pélete de células foi ressuspensão em 1ml de solução de suspensão de célula Gentra à qual 14,2mg de lisozima e 4 µl de solução de proteinase K 20mg/ml foram adicionados. A suspensão de células foi incubada a 37°C por 30 minutos. O DNA genômico precipitado foi recuperado por centrifugação a 3500g por 25 minutos e secado ao ar por 10 minutos. O DNA genômico foi suspenso em uma quantidade apropriada de uma solução Tris 10 mM e estocado a 4°C.

Duas reações PCR foram fixadas usando-se DNA genômico de *C. aurantiacus* como molde como se segue:

Reação PCR nº 1		Programa PCR	
3,3 X r TH Tampão polimerase	30 µL	94°C	2 minutos
Mg(OAC) (25 mM)	4 µL	29 ciclos de:	
dNTP Mix (10 mM)	3 µL	94°C	30 segundos
PRO140F (100 µM)	2 µL	63°C	45 segundos
PRO140R (100 µM)	2 µL	68°C	4,5 minutos
DNA genômico (100 ng/mL)	1 µL	68°C	7 minutos
rTH polimerase (2 U/µL)	2 µL	4°C	Até ainda uso
pfu polimerase (2,5 U/µL)	0,25 µL		
Água DI	55,75 µL		
Total	100 µL		

Reação PCR nº 2		Programa PCR	
3,3 X r TH Tampão polimerase	30 µL	94°C	2 minutos
Mg(OAC) (25 mM)	4 µL	29 ciclos de:	
dNTP Mix (10 mM)	3 µL	94°C	30 segundos
PRO140F (100 µM)	2 µL	60°C	45 segundos
PRO140R (100 µM)	2 µL	68°C	4,5 minutos
DNA genômico (100 ng/mL)	1 µL	68°C	7 minutos
rTH polimerase (2 U/µL)	2 µL	4°C	Até ainda uso
pfu polimerase (2,5 U/µL)	0,25 µL		
Água DI	55,75 µL		
Total	100 µL		

Os produtos de ambas reações de PCR foram separados sobre um gel TAE 0,8%. Ambas reações de PCR produziram um produto de 4,7 a 5 Kb em tamanho. Isto aproximadamente ajustou-se ao tamanho esperado de uma molécula de ácido nucléico que pode codificar um polipeptídeo tendo

5 atividade malonil-CoA redutase.

Ambos produtos de PCR foram sequenciados usando-se iniciadores de seqüenciamento (1090Fseq 5'-GATTCCGTATGTCACCCCTA-3', SEQ ID NO: 156; e 764Rseq 5'-CAGGCGACTGGCAATCACAA-3', SEQ ID NO: 157) As análises de seqüências revelaram uma folga entre os contigs

10 764 e 1090. A seqüência de ácidos nucléicos entre as seqüências dos contigs 764 e 1090 foi maior que 300 pares de bases em comprimento (Figura 51). Em adição, as análises de seqüências revelaram uma ORF de 3678 bases que mostrou similaridades a enzimas tipo desidrogenase/redutase (Figura 52). A seqüência de aminoácidos codificada por esta ORF é de 1225

15 aminoácidos em comprimento (Figura 50). Também, análises BLASTP da seqüência de aminoácidos codificada por esta ORF revelou dois domínios desidrogenase de cadeia curta (tipo adh). Estes resultados são consistentes com um polipeptídeo tendo atividade malonil-CoA redutase uma vez que uma tal enzima envolve duas etapas de redução para a conversão de malonil CoA a 3-HP. Ainda, o PM computado do polipeptídeo foi determinado ser

20

cerca de 134 KDa.

PCR foi conduzida usando-se o par de iniciadores PRO140F/PRO140R, DNA genômico de *C. aurantiacus*, e o protocolo descrito acima como reação PCR nº1. Após a PCR ser completada, 0,25 U de Taq polimerase (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) foram adicionadas à mistura de PCR, que foi então incubada a 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi purificado em coluna usando kit de purificação Qiagen PCR (Qiagen Inc., Valencia, CA). O produto de PCR purificado foi então clonado TOPO em vetor de expressão pCRT7/CT de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen, carlsbad, CA). Células quimicamente competentes TOP10 F' foram transformadas com a mistura de ligação TOPO de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). As células foram recuperadas por meia-hora e os transformantes foram selecionados sobre placas de LB/ampicilina (100 µg /ml). Vinte colônias simples foram selecionadas, e o DNA plasmídeo foi isolado usando Qiagen spin Mini prep kit (Qiagen Inc., Valencia, CA).

Cada um destes vinte clones foi testado para correta orientação e tamanho de inserção certo por PCR. Sumariamente, DNA plasmídeo foi usado como um molde, e os seguintes dois iniciadores foram usados na amplificação PR: PCRT7 5'-GAGACCACAACGGTTTCCCTCTA-3', SEQ ID NO: 158; e PRO140R 5'-GGACACGAAGAACAGGGCGACAC-3', SEQ ID NO:159. A seguinte mistura de reação PCR e programa foram usados:

Reação PCR		Programa PCR	
3,3 X r TH Tampão polimerase	7,5 µL	94°C	2 minutos
Mg(OAC) (25 mM)	1 µL	25 ciclos de:	
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µL	94°C	30 segundos
PCRT7 (100 µM)	0,125 µL	55°C	45 segundos
PRO140R (100 µM)	0,125 µL	68°C	4 minutos
DNA plasmídeo (100 ng/mL)	0,5 µL	68°C	7 minutos
rTH polimerase (2 U/µL)	0,5 µL	4°C	Até ainda uso
Água DI	14,75 µL		
Total	25 µL		

De vinte clones testados, somente um clone exibiu a correta inserção (Clone nº P-10). Células quimicamente competentes de BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram transformadas com 2 µl do DNA plasmídeo P-10 de acordo com instruções do fabricante. As células
5 foram recuperadas a 37°C por 30 minutos e foram revestidas sobre LB ampicilina (100 µg /ml) e cloranfenicol (25 µg /ml).

Uma cultura de 20ml de BL21(DE3)pLysS/P-10 e uma cultura controle de 20ml de BL21(DE3)pLysS foi incubada por toda noite. Usando as culturas de toda noite como um inoculum, duas culturas clones de 100ml de
10 BL21(DE3)pLysS/P-10 e duas culturas de cepa controle (BL21(DE3)pLysS) foram iniciadas. Todas as culturas foram induzidas com IPTG quando elas atingiram uma OD de cerca de 0,5 a 600nm. A cultura de cepa controle foi induzida com IPTG 10 uM ou IPTG 100uM, enquanto uma das culturas clones de BL21(DE3)pLysS/P-10 foi induzida com IPTG 10 uM e a outra com
15 IPTG 100 uM. As culturas foram cultivadas por 2,5 horas após indução. Alíquotas foram tomadas de cada um dos frascos de cultura antes e após 2,5 horas de indução e separadas usando-se SDS-PAGE 4-15% para analisar expressão de polipeptídeo. Nas amostras de BL21(DE3)pLysS/P-10 induzidas, uma banda correspondendo a um polipeptídeo tendo um peso molecu-
20 lar de cerca de 135 KDa foi observada. Esta banda estava ausente nas amostras de cepa controle e em amostras tomadas antes de indução com IPTG.

Para avaliar atividade malonil-CoA redutase, células BL21(DE3)pLysS/P-10 e BL21(DE3)pLys S foram cultivadas e então colhi-
25 das por centrifugação em 8000xg (Rotor JÁ 16.250, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Uma vez colhidas, as células foram lavadas uma vez com um igual volume de uma solução 0,85% de NaCl. Os péletes de células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 100 mM que foi suplementado com Mg₂Cl 5 mM e DTT 2 mM. As células foram rompidas através de passagem
30 por duas vezes através de um célula de prensa francesa em pressão de 70,3 kgf/cm² (valor de medidor). Os fragmento de células foram removidos por centrifugação em 30 000xg (Rotor JÁ 25.50, Beckman Coulter, Fullerton,

CA). O extrato de células foi mantido a 4°C ou sobre gelo até ainda uso.

Atividade de malonil CoA redutase foi medida a 37°C para ambas, as células controles e as células induzidas com IPTG. A atividade de malonil CoA redutase foi monitorada através de observação de desaparecimento de NADPH adicionada como descrito acima. Nenhuma atividade foi encontrada no extrato de célula da cepa controle, enquanto o extrato de células das células BL21(DE3)pLysS/P-10 induzidas com IPTG mostrou atividade malonil-CoA redutase com uma atividade específica calculada ser cerca de 0,0942 umoles/minuto/mg de proteína total.

Atividade malonil-CoA redutase também foi medida por análise de formação de 3-HP a partir de malonil-CoA usando-se a seguinte reação conduzida a 37°C:

	Volume	Conc. Final
Tris HCl (1M)	10 µL	100 mM
Malonil CoA (10 mM)	40 µL	4 mM
NADPH (10 Mm)	30 µL	3 mM
Extrato de Células	20 µL	
Total	100 µL	

A reação foi realizada a 37°C por 30 minutos. Na reação controle, um extrato de células de BL21(DE3)pLysS foi adicionado para uma concentração final de 322 mg de proteína total. Na mistura de reação experimental, um extrato de células de BL21(DE3)pLysS/P-10 foi adicionado para uma concentração final de 226mg de proteína total. As misturas de reação foram congeladas a -20°C até ainda análises.

Separação cromatográfica dos componentes nas misturas de reação foi realizada usando-se uma coluna de HPLC de ácido orgânico HPX-87H (7,8x300mm) (BioRad Laboratories, Hercules, CA). A coluna foi mantida a 60°C. Composição de fase móvel foi água grau HPLC pH para 2,5 usando ácido trifluor acético (TFA) e foi liberada em uma taxa de fluxo de 0,6 ml/minuto.

Detecção de 3-HP nas amostras de reação foi realizada usando-se um instrumento Waters/Micromass ZQ LC/EM consistindo em um cro-

matógrafo líquido Waters 2690 (Waters Corp., Milford, MA) com um monitor de absorvância Waters 996 Photo-diode Array (PDA) colocado em série entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massa quadrupole simples. A fonte de ionização foi uma fonte de ionização Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI). Todos os parâmetros do sistema APCI-EM foram otimizados e selecionados baseado na geração do íon molecular protonado $([M+H])^+$ de 3-HP. Os seguintes parâmetros foram usados para detectar 3-HP no modo íon positivo: Corona: 10 μ A; Cone: 20V; Extrator: 2V; lente RF: 0,2V; temperatura de fonte: 100°C; temperatura de sonda APCI: 300°C; gás de dessolvatação: 500 l/hora; gás cone: 50 l/hora; resolução de massa baixa: 15; resolução de massa alta: 15; energia de íon: 1,0; multiplicador: 650. Dados foram coletados em modo Selected Ion Reporting (SIR) fixado em $m/z = 90,9$.

Ambas, a amostra de reação controle e a amostra de reação experimental foram sondadas para a presença de 3-HP usando-se a técnica de espectroscopia de massa-HPLC. Nas amostras controles, nenhum pico 3-HP foi observado, enquanto a amostra experimental exibiu um pico que ajustou-se à retenção e massa de 3-HP.

Exemplo 11 – construção de células recombinantes que produzem 3-HP

Um caminho para fabricar 3-hidróxi propionato diretamente de glicose via acetila CoA é apresentado na Figura 44. Maior parte de organismos como E.coli, Bacillus, e levedura produz acetila CoA a partir de glicose via glicólise e a ação de piruvato desidrogenase. De modo a separar a acetila CoA gerada de glicose, é desejável superexpressar dois genes, um codificando acetil CoA carboxilase e o outro codificando malonil-CoA redutase. Como um exemplo, estes genes são expressos em E.coli através de um promotor T7 usando-se vetores pET30a e pFN476. O vetor pET30a tem resistência pBRori e canamicina, enquanto pFN476 tem pSC101 ori e usa resistência a carbencilina para seleção. Devido estes dois vetores serem compatíveis ori e marcadores diferentes eles podem ser mantidos em E.coli ao mesmo tempo. Portanto, as construções usadas para engenheirar E.coli para produção direta de 3-hidróxi propionato a partir de glicose são pMSD8

(pFN476/accABCD) (Davis et al., J. Biol. Chem., 275:28593-28598, 2000) e pET30a/malonil-CoA redutase ou pET30a/acc1 e pFN76/malonil-CoA redutase. Os constructos são mostrados na Figura 45.

Para testar a produção de 3-hidróxi propionato a partir de glicose, E.coli cepa Tuner pLacI carreando plasmídeo pMSD8 (pFN476/accABCD) e pET30a/malonil-CoA redutase ou pET30a/acc1 e pFN476/malonil-CoA redutase são crescidas em um fermentador B. Braun BIOSTAT B. Um vaso de vidro adaptado com uma camisa de água para aquecimento é usado para conduzir este experimento. O volume de trabalho de fermentador é 1,5 litro e é operado a 37°C. O fermentador é suprido continuamente com oxigênio através de borbulhamento de ar estéril através do mesmo em uma taxa de 1 vvm. A agitação é feita cascata para dissolver a concentração de oxigênio que é mantida em 40% DO. O pH dos meios líquidos é mantido em 7 usando-se NaOH 2N. A cepa de E.coli é crescida em meios M9 suplementados com glicose 1%, 1 µg /ml tiamina, ácidos casamino 0,1%, 10 µg /ml biotina, 50 µg /ml carbencilina, 50 µg /ml canamicina, e 25 µg /ml cloranfenicol. A expressão dos genes é induzida quando a densidade de célula atingiu 0,5 OD (600nm) através de adição de IPTG 100 µM. Após indução, amostras de 2ml de volume são tomadas em 1, 2, 3, 4, e 8 horas. Em adição, em 3 horas após indução, uma amostra de 200 ml é tomada para obter-se um extrato de células. As amostras de 2ml são giradas, e o sobrenadante é usado para analisar produtos usando-se a técnica LC/EM. O sobrenadante é estocado a -20°C até ainda análise.

O extrato é preparado girando-se 200ml de suspensão de células em 8000g e lavando o pélete de células com 50ml de Tris-HCl 50mM (pH 8,0), MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, DTT 2 mM, e glicerol 5%. A suspensão de células é novamente girada a 8000g, e o pélete é ressuspensão em 5ml de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, DTT 2 mM, e glicerol 5%. As células são rompidas por passagem duas vezes através de uma prensa francesa a 70,3 kgf/cm². Os fragmento de células são removidos por centrifugação por 20 minutos a 30 000g. Todas as operações são conduzidas a 4°C. Para demonstrar formação in vitro de 3-hidróxi propionato usando

este extrato de células recombinantes, a seguinte reação de 200 µl é conduzida a 37°C. A mistura de reação é como se segue: Tris HCl (pH 8,0; 100 mM), ATP (1 mM), MgCl₂ (5 mM), KCl (100 mM), DTT (5 mM), NaHCO₃ (40 mM), NADPH (0,5 mM, acetil CoA (90,5 mM), e extrato de células (0,2 mg).

- 5 A reação é interrompida após 15 minutos pela adição de 1 volume de ácido trifluor acético 10% (RTFA). Os produtos desta reação são detectados usando-se a técnica LC/EM.

- 10 A detecção e análise para a presença de 3-hidróxi propionato no sobrenadante e a mistura de reação in vitro são realizadas usando-se um instrumento Waters/Micromass ZQ LC/EM. Este instrumento consiste em um cromatógrafo líquido Waters 2690 com um detetor de índice de refração Waters 2410 colocado em série entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massa quadropolo simples. Separações LC são feitas usando-se uma coluna de troca de íons Bio-Rad Aminex 87-H a 45°C. Açúcares, álcool e produtos ácido orgânico são eluídos com tampão TFA 0,015%. Para eluição, o
- 15 tampão é passado em uma taxa de fluxo de 0,6 ml/minuto. Para detecção e quantificação de 3-hidróxi propionato, uma amostra obtida de TCI, América (Portland, OR) é usada como um padrão.

- 20 Exemplo 12 – Clonagem de propionil-CoA transferase, lactil-CoA desidratase (LDH), e uma hidratase (OS19) para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*

- 25 O pESC Yeast Epitope Tagging Vector System (Stratagene, La Jolla, CA) foi usado em clonagem de genes envolvidos em produção de ácido 3-hidróxi propiônico via ácido láctico. Os vetores pESC cada contêm promotores GAL1 e GAL10 em direções opostas, permitindo a expressão de dois genes de cada vetor. Os promotores GAL1 e GAL10 são reprimidos por glicose e induzidos por galactose. Cada um de quatro vetores pESC disponíveis tem um diferente marcador selecionável – levedura (HIS3, TRP1, LEU2, URA3) de modo que múltiplos plasmídeos podem ser mantidos em
- 30 uma cepa simples. Cada região de clonagem tem um sítio poli ligador para inserção de gene, um terminador de transcrição e um epítipo codificando seqüência para epítipo C-terminal ou N-terminal de rotulação de proteínas

expressas. Os vetores pESC também têm uma origem ColE1 de replicação e um gene de resistência a ampicilina para permitir replicação e seleção em *E.coli*. As seguintes combinações de vetor/promotor/ácido nucléico foram construídas:

Vetor	Promotor	Polipeptídeo	Fonte de Ácido Nucléico
pESC-Trp	GAL1	OS19 hidratase	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	GAL10	E1	<i>Megasphaera elsdenii</i>
pESC-Leu	GAL1	E2 α	<i>Megasphaera elsdenii</i>
	GAL10	E2 β	<i>Megasphaera elsdenii</i>
pESC-His	GAL1	D-LDH	<i>Escherishia Coli</i>
	GAL10	PCT	<i>Megasphaera elsdenii</i>

5 Os iniciadores usados como se segue:

OS19APAF: 5'-ATAGGGCCCAGGAGATCAAACCATGGGTGAAGAGTCT-CTGGTTC-3' (SEQ ID NO:164)

OS19SALR: 5'-CCTCTGCTACAGTCGACACAACGACCACTGAAGTTGGAG-3'(SEQ ID NO:165)

OS19KPNR: 5'-AGTCTGCTATCGGTACCTCAACGACCACTGAAGTTGGAG-3'(SEQ ID NO:166)

EINOTF: 5'-ATAGCGGCCGCATAATGGATACTCTCGGAATCGACGTTGG-3'(SEQ ID NO:167)

EICLAR: 5'-CCCCATCGATACATATTTCTTGATTTTATCATAAGCAATC-3'(SEQ ID NO:168)

EII α APAF: 5'-CCAGGGCCCATAATGGGTGAAGAAAAACAGTAGATATTG-3'(SEQ ID NO:169)

EII α SALR: 5'-GGTAGACTTGTCGACGTAGTGGTTTCCTCCTTCATTGG-3'(SEQ ID NO:170)

EII β NOTF: 5'-ATAGCGGCCGCATAATGGGTCAGATCGACGAACTTA-

TCAG-3'(SEQ ID NO:171)

ENBSPER: 5'-AGGTTCAACTAGTTCGTAGAGGATTTCCGAGAAAGC-
CTG-3'(SEQ ID NO:172)

LDHAPAF: 5'-CTAGGGCCCATAATGGAACTCGCCGTTTATAG-
CAC-3'(SEQ ID NO:173)

LDHXHOR: 5'-ACTTCTCGAGTTAAACCAGTTCGTTCTGGGCA-
GGT-3'(SEQ ID NO:174)

PCTSPEF: 5'-GGGACTAGTATAATGGGAAAAGTAGAAATCAT-
TACAG-3'(SEQ ID NO:175)

PCTPACR: 5'-CGGCTTAATTAACAGCAGAGATTTATTTTTTCA-
GTCC-3'(SEQ ID NO:176)

Todas as enzimas de restrição foram obtidas de New England Biolabs, Beverly, MA. Todas as preparações de DNA plasmídeo foram feitas usando QIAprep Spin Miniprep Kits, e todas as purificações de gel foram feitas usando QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Valencia, CA).

5 A. Construção do vetor pESC-Trp/OS19 hidratase

Dois constructos em pESC-Trp foram feitos para o ácido nucléico OS19 de *C. aurantiacus*. Um destes constructos utilizou os sítios de restrição Apal e Sal I do sítio de clonagem múltipla GAL1 e foi projetada para incluir o epítipo c-myc. O segundo constructo utilizou os sítios Apa I e Kpn I e assim não inclui a seqüência epítipo c-myc.

Seis µg de DNA vetor pESC-Trp foram digeridos com a enzima de restrição Apa I e o digerido foi purificado usando uma coluna de purificação QIAquick PCR. Três µg do DNA vetor digerido-Apal foram então digeridos com a enzima de digestão Kpn I, e 3 µg foram digeridos com Sall. Os DNAs de vetor digeridos – duplos foram separados sobre um gel TAE-agarose 1%, purificados, desfosforilados com fosfatase alcalina de camarão (Roche Biochemical Products, Indianápolis, IN), e purificados com uma coluna de purificação QIAquick PCR.

O ácido nucléico codificando o polipeptídeo Chloroflexus aurantiacus tendo atividade hidratase (OS19) foi amplificado de DNA genômico usando par de iniciadores PCR OS19APAF e OS19SALR e o par de iniciadores OS19APAF e OS19KPNR. OS19APAF foi projetado para introduzir um

sítio de restrição Apa I e um sítio de iniciação de translação (ACCATGG) no início do fragmento amplificado. O iniciador OS19KPNR foi projetado para introduzir um sítio de restrição Kpn I na extremidade do fragmento amplificado e para conter o códon de interrupção de translação para o gene hidrata-

5 se. OS19SALR introduz um sítio Sal I na extremidade do fragmento amplificado e tem um códon de interrupção alterado de modo que translação continua em-quadro através de vetor epítipo c-myc. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Expand PCR, 100 ng DNA genômico de *C. aurantiacus*, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 5,25 unidades de

10 Expand DNA Polymerase (Roche) em um volume final de 100 μ l. A reação PCR foi realizada em um MJ Reseaerch PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto, e 72°C por 2,25 minutos; 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto, e 72°C por 2,25 minutos; e uma exten-

15 são final por 7 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi então separado por eletroforese de gel usando um gel TAE-Agarose 1%. Um fragmento de 0,8 Kb foi cortado do gel e purificado para cada par de iniciadores. Os fragmentos purificados foram digeridos com enzimas de restrição Kpn I ou Sal I, purificados com uma coluna de purificação QIAquic PCR, digeridos com en-

20 zima de restrição Apa I, novamente purificados com uma coluna de purificação QIAquick PCR, e quantificados sobre um minigel.

50-60 ng do produto de PCR digerido contendo o ácido nucléico codificando o polipeptídeo *C. aurantiacus* tendo atividade hidratase (OS19) e 50 ng do vetor pESC-Trp preparado foram ligados usando T4 DNA ligase a

25 16°C por 16 horas. Um μ l da reação de ligação foi usado para eletroporar 40 μ l de células *E. coli* Electromax DH10B. As células eletroporadas foram revestidas sobre placas LB contendo 100 μ g /ml de carbenicilina (LBC). Colônias individuais foram selecionadas usando-se PCR colônia com os apropriados iniciadores PCR. Colônias individuais foram suspensas em cerca de 25

30 μ l de Tris 10 mM, e 2 μ l da suspensão foram revestidos sobre meios LBC. A suspensão restante foi aquecida por 10 minutos a 95°C para abrir quebrando as células bacteriais, e 2 μ l das células aquecidas foram usados em uma

reação PCR de 25 µl. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Taq, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 unidade de Taq DNA polimerase por reação. O programa de PCR usado foi o mesmo como descrito acima para amplificação do ácido nucléico a partir de DNA genômico.

5 DNA plasmídeo foi isolado de culturas de colônias tendo a desejada inserção e foi seqüenciado para confirmar a falta de erros de nucleotídeos a partir de PCR. Um constructo com uma seqüência confirmada foi transformada em *S. cerevisiae* cepa YPH500 usando uma Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research, Orange, CA). Reações de transformação foram revestidas sobre meios SC-Trp (ver Stratagene pESC Vector Instruction Manual para receitas de meios). Colônias de leveduras individuais foram selecionadas para a presença do ácido nucléico OS19 por PCR de colônia. Colônias foram suspensas em 20 µl de tampão Y-Lysis (Zymo Research) contendo 5 unidades de zimolase e aquecidas a 37°C por 10 minutos. Três µl desta suspensão foram então usados em uma reação PCR de 25 µl usando a mistura de reação de PCR e programa descritos para a seleção de colônia dos transformantes *E.coli*. O vetor pESC-Trp também foi transformado em YPH500 para uso como um controle de ensaio de hidratase e transformantes foram selecionados por PCR usando iniciadores GAL1 e
10
15
20 GAL10.

B. Construção do vetor pESC-Trp/OS19/EI hidratase

DNA plasmídeo de um constructo pESC-Trp/OS19 (sítios Apa I – Sal I) com seqüência confirmada e resultados de ensaio positivos foi usado para inserção do ácido nucléico para o polipeptídeo ativador E1 de *M. elsdenii* a jusante do promotor GAL10. Três µg de DNA plasmídeo foram digeridos com a enzima de restrição Clã I, e o digerido foi purificado usando uma coluna de purificação QIAquick PCR. O DNA vetor foi então digerido com a enzima de restrição Not I, e o digerido foi inativado por aquecimento a 65°C por 20 minutos. O DNA vetor digerido – duplo foi desfosforilado com fosfatase alcalina camarão (Roche), separado sobre um gel TAE-agarose 1%, e purificado com gel.
25
30

O ácido nucléico codificando o polipeptídeo ativador E1 *M.*

elsdenii foi amplificado de DNA genômico usando o par de iniciadores PCR EINOTF e EICLAR. EINOTF foi projetado para introduzir um sítio de restrição Not I e um sítio de iniciação de translação no início do fragmento amplificado. O iniciador EICLAR foi projetado para introduzir um sítio de restrição Cla I na extremidade do fragmento amplificado e para conter um códon de interrupção de translação alterado para permitir translação em-quadro do epítipo FLAG. A mistura de PCR conteve: tampão 1X Expand PCR, 100 ng de DNA genômico de *M. elsdenii*, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 5,25 unidades de Expand DNA polymerase em um volume final de 100 μ l. A reação de PCR foi realizada em um MJ Research PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, e 72°C por 3 minutos; 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 45 segundos, e 72°C por 3 minutos; e uma extensão final por 7 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi então separado por eletroforese de gel usando um gel TAE-agarose 1%, e um fragmento de 0,8 Kb foi cortado e purificado. O fragmento purificado foi digerido com enzima de restrição cla I, purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, digerido com enzima de restrição Not I, novamente purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, e quantificado sobre um minigel.

60ng do produto de PCR digerido contendo o ácido nucléico para o polipeptídeo ativador E1 de *M. elsdenii* e 70ng do vetor pESC-Trp/OS19 hidratase foram ligados usando T4 DNA ligase a 16°C por 16 horas. Um μ l da reação de ligação foi usado para eletroporar 40 μ l de células *E. coli* Electromax DH10B. As células eletroporadas foram revestidas sobre meios LBC. Colônias individuais foram selecionadas usando PCR colônia com os iniciadores EINOTF e EICLAR. Colônias individuais foram suspensas em cerca de 25 μ l de Tris 10 mM, e 2 μ l da suspensão foram revestidos sobre meios LBC. A suspensão restante foi aquecida por 10 minutos a 95°C para abrir partindo as células bacteriais, e 2 μ l das células aquecidas usados em uma reação PCR de 25 μ l. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Taq, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 unidade

de Taq DNA Polymerase por reação. O programa de PCR usado foi o mesmo como descrito acima para amplificação do gene a partir de DNA genômico. DNA plasmídeo foi isolado de culturas de colônias tendo a desejada inserção e foi seqüenciado para confirmar a falta de erros de nucleotídeos a partir de PCR.

C. Construção do vetor pESC-Leu/EII α /EII β

Três μ g de DNA do vetor pESC-Leu foram digeridos com a enzima de restrição Apa I, e o digerido foi purificado usando uma coluna de purificação QIAquick PCR. O DNA vetor foi então digerido com a enzima de restrição Sal I, e o digerido foi inativado por aquecimento a 65°C por 20 minutos. O DNA vetor digerido – duplo foi desfosforilado com fosfatase alcalina camarão (Roche), separado sobre um gel TAE-agarose 1%, e purificado com gel.

O ácido nucléico codificando o polipeptídeo E2alfa de *M. elsdenii* foi amplificado a partir de DNA genômico usando o par de iniciadores PCR EII α APAF e EII α SALR. EII α APAF foi projetado para introduzir um sítio de restrição Apa I e um sítio de início de translação no início do fragmento amplificado. O iniciador EII α SALR foi projetado para introduzir um sítio de restrição Sal I na extremidade do fragmento amplificado e para conter um códon de interrupção translacional alterado para permitir translação em frame do epítipo c-myc. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Expand PCR, 100ng de DNA genômico de *M. elsdenii*, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 5,25 unidades de Expand DNA Polymerase em um volume final de 100 μ l. A reação de PCR foi realizada em um MJ Research PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 3 minutos; 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos; e uma extensão final por 7 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi então separado por eletroforese sobre gel usando um gel TAE-agarose 1%, e um fragmento de 1,3 Kb foi cortado e purificado. O fragmento purificado foi digerido com enzima de restrição Apa I, purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, digerido com enzima de restrição Sal I,

novamente purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, e quantificado sobre um minigel.

80ng do produto de PCR digerido contendo o ácido nucléico codificando o polipeptídeo E2alfa de *M. elsdenii* e 80ng do vetor pESC-Leu preparado foram ligados usando-se T4 DNA ligase a 16°C por 16 horas. Um 5 µl da reação de ligação foi usado para eletroporar 40 µl de células *E. coli* Electromax® DH10B®. As células eletroporadas foram revestidas sobre meios LBC. Colônias individuais foram selecionadas usando-se PCR de colônia com os iniciadores EIIαAPAF e EIIαSALR. Colônias individuais foram sus- 10 pensas em cerca de 25 µl de Tris 10 mM, e 2 µl da suspensão foram revestidos sobre meios LBC. A suspensão restante foi aquecida por 10 minutos a 95°C para abrir rompendo as células bacteriais, e 2 µl das células aquecidas usados em uma reação PCR de 25 µl. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Taq, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 unida- 15 de de Taq DNA polimerase por reação. O programa de PCR usado foi o mesmo como descrito acima para amplificação do gene a partir de DNA genômico. DNA plasmídeo foi isolado de culturas de colônias tendo a desejada inserção e foi seqüenciado para confirmar a falta de erros de nucleotídeos a partir de PCR.

20 DNA plasmídeo de um vetor pESC-Leu/EIIα com seqüência confirmada foi usado para inserção do ácido nucléico codificando o polipeptídeo E2beta de *M. elsdenii*. Três microgramas de DNA plasmídeo foram digeridos com a enzima de restrição Spe I, e o digerido foi purificado usando-se uma coluna de purificação QIAquick PCR. O DNA vetor foi então digerido com a 25 enzima de restrição Not I e purificado com gel a partir de um gel de TAE-agarose 1%. O DNA vetor digerido – duplo foi então desfosforilado com fosfatase alcalina de camarão (Roche) e purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR.

O ácido nucléico codificando o polipeptídeo E2beta *M. elsdenii* 30 foi amplificado a partir de DNA genômico usando-se o par de iniciadores EIIβNOTF e EIIβSPER. O iniciador EIIβNOTF foi projetado para introduzir um sítio de restrição Not I e um sítio de início de translação no início do

fragmento amplificado. O iniciador EII β SPER foi projetado para introduzir um sítio de restrição Spe I na extremidade do fragmento amplificado e para conter um códon de interrupção translacional alterado para permitir translação em-quadro do epítipo FLAG. A mistura de PCR conteve o seguinte:

5 tampão 1X Expand PCR, 100ng de DNA genômico de *M. elsdenii*, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 5,25 unidades de Expand DNA Polymerase em um volume final de 100 μ l. A reação de PCR foi realizada em um MJ Research PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45

10 segundos, e 72°C por 3 minutos; 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 45 segundos, e 72°C por 3 minutos; e uma extensão final por 7 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi separado por eletroforese de gel usando-se um gel TAE-agarose 1%, e um fragmento de 1,1 Kb foi cortado e purificado. O fragmento purificado foi digerido com enzima de restrição Spe

15 I, purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, digerido com enzima de restrição Not I, novamente purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, e quantificado sobre um minigel.

38ng do produto de PCR digerido contendo o ácido nucléico codificando o polipeptídeo E2beta de *M. elsdenii* e 50ng do vetor pESC-Leu/EII α foram ligados usando T4 DNA ligase a 16°C por 16 horas. Um μ l da

20 reação de ligação foi usado para eletroporar 40 μ l de células E.coli Electro-max[®] DH10B[®]. As células eletroporadas foram revestidas sobre placas LBC.Colônias individuais foram selecionadas usando PCR colônia com os iniciadores EII β NOTF e EII β SPER. Colônias individuais foram suspensas em

25 cerca de 25 μ l de Tris 10 mM, e 2 μ l da suspensão foram revestidos sobre meios LBC. A suspensão restante foi aquecida por 10 minutos a 95°C para abrir rompendo as células bacteriais, e 2 μ l das células aquecidas foram usados em uma reação PCR de 25 μ l. A mistura de PCR conteve o seguinte:

30 tampão 1X Taq, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 unidade de Taq DNA Polimerase por reação. O programa de PCR usado foi o mesmocomo descrito acima para amplificação do gene a partir de DNA genômico.

DNA plasmídeo foi isolado de culturas de colônias tendo a desejada inserção e foi seqüenciado para confirmar falta de erros de nucleotídeos de PCR. Um constructo pESC-Leu/EII α /EII β com uma seqüência confirmada foi co-transformada junto com o vetor pESC-Trp/OS19EI cepa em *S.cerevisiae* YPH500 usando um Frozen-EZ Yeast Transformation II[®] Kit (Zymo Research, Orange, CA). Reações de transformação foram revestidas sobre meios SC-Trp-Leu. Colônias de leveduras individuais foram selecionadas para a presença de ácido nucléico OS19, E1, E2 α , e E2 β através de PCR colônia. Colônias foram suspensas em 20 μ l de tampão Y-Lysis (Zymo Research) contendo 5 unidades de zimolase e aquecidas a 37°C por 10 minutos. Três μ l desta suspensão foram então usados em uma reação de PCR de 25 μ l usando as misturas de reação de PCR e programas descritos para as seleções de colônias dos transformantes *E.coli*. Os vetores pESC-Trp/OS19 e pESC-Leu também foram co-transformados em YPH500 para uso como um controle de ensaio de lactil-CoA desidratase. Estes transformantes foram selecionados de colônia usando os iniciadores GAL1 e GAL10 (manual de instruções, pESC Yeast Epitope Tagging Vectors, Stratagene).

D. Construção do vetor pESC-His/D-LDH/PCT

Três μ g de DNA do vetor pESC-His foram digeridos com a enzima de restrição Xho I, e o digerido foi purificado usando uma coluna de purificação QIAquick PCR. O DNA vetor foi então digerido com a enzima de restrição Apa I e purificado sobre gel a partir de um gel de TAE-agarose 1%. O DNA vetor digerido – duplo foi desfosforilado com fosfatase alcalina de camarão (Roche) e purificado usando uma coluna de purificação QIAquick PCR.

O gene de *E.coli* D-LDH foi amplificado a partir de DNA genômico de cepa DH10B usando o par de iniciadores de PCR LDHAPAF e LDHXHR. LDHAPAF foi projetado para introduzir um sítio de restrição Apa I e um sítio de início de translação no começo do fragmento amplificado. O iniciador LDHXHR foi projetado para introduzir um sítio de restrição Xho I na extremidade do fragmento amplificado e para conter o códon de interrupção translacional para o gene D-LDH. A mistura de PCR conteve o seguinte:

tampão 1X Expand PCR, 100ng de DNA genômico de *E.coli*, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 5,25 unidades de Expand DNA Polymerase em um volume final de 100 µl. A reação de PCR foi realizada em um MJ Research PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos, e 72°C por 2 minutos; 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 45 segundos, e 72°C por 2 minutos; e uma extensão final por 7 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi separado por eletroforese de gel usando um gel Tae-agarose 1%, e um fragmento de 1,0 Kb foi cortado e purificado. O fragmento purificado foi digerido com enzima de restrição Apa I, purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, digerido com enzima de restrição Xho I, novamente purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR, e quantificado sobre um minigel.

80ng do produto de PCR digerido contendo o gene *E.coli* D-LDH e 80ng do vetor pESC-His preparado foram ligados usando T4 DNA ligase a 16°C por 16 horas. Um µl da reação de ligação foi usado para eletroporar 40 µl de células *E.coli* electromax® DH10B®. As células eletroporadas foram revestidas sobre meios LBC. Colônias individuais foram selecionadas usando PCR de colônia com os iniciadores LDHAPAF e LDHXHR. Colônias individuais foram suspensas em cerca de 25 µl de Tris 10mM, e 2 µl da suspensão foram revestidos sobre meios LBC. A suspensão restante foi aquecida por 10 minutos a 95°C para abrir rompendo as células bacteriais, e 2 µl das células aquecidas foram usados em uma reação PCR de 25 µl. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Taq, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 unidade de Taq DNA polymerase por reação. O programa de PCR usado foi o mesmo como descrito acima para amplificação do gene a partir de DNA genômico. DNA plasmídeo foi isolado de culturas de colônias tendo a deseja inserção e foi seqüenciado para confirmar falta de erros de nucleotídeos a partir de PCR.

DNA plasmídeo de um constructo pESC-His/D-LDH com uma seqüência confirmada foi usado para inserção do ácido nucléico codificando o polipeptídeo PCT de *M. elsdenii*. Três µg de DNA plasmídeo foram digeri-

dos com a enzima de restrição Pac I, e o digerido foi purificado usando coluna de purificação QIAquick PCR. O DNA vetor foi então digerido com a enzima de restrição Spe I e purificado com gel a partir de um gel de TAE-agarose 1%. O DNA vetor digerido – duplo foi desfosforilado com fosfatase

5 alcalina de camarão (Roche) e purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR.

O ácido nucléico codificando o polipeptídeo PCT *M. elsdenii* foi amplificado a partir de DNA genômico usando o par de iniciadores de PCR PCTSPEF e PCTPACR. PCTSPEF foi projetado para introduzir um sítio de

10 restrição Spe I e um sítio de iniciação de translação no começo do fragmento amplificado. O iniciador PCTPACR foi projetado para introduzir um sítio de restrição Pac I na extremidade do fragmento amplificado e para conter o códon de interrupção translacional para o gene PCT. A mistura de PCR contém o seguinte: tampão 1X Expand PCR, 100ng de DNA genômico de *M.*

15 *elsdenii*, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 5,25 unidades de Expand DNA Polymerase em um volume final de 100 µl. A reação de PCR foi realizada em um MJ Research PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, e 72°C por 2,5 minutos; 24 ciclos de 94°C

20 por 30 segundos, 64°C por 45 segundos, e 72°C por 2,5 minutos; e uma extensão final por 7 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi separado por eletroforese de gel usando um gel TAE-agarose 1%, e um fragmento de 1,55 Kb foi cortado e purificado. O fragmento purificado foi digerido com enzima de restrição Pac I, purificado com uma coluna de purificação QIAquick

25 PCR, digerido com enzima de restrição Spe I, novamente purificado com uma coluna de purificação QIAquick PCR e quantificado sobre um minigel.

95ng do produto de PCR digerido contendo o ácido nucléico codificando o polipeptídeo PCT de *M. elsdenii* e 75 ng do vetor pESC-His/D-LDH foram ligados usando-se T4 DNA ligase a 16°C por 16 horas. Um µl da

30 reação de ligação foi usado para eletroporar 40 µl de células *E. coli* Electro-max® DH10B®. As células eletroporadas foram revestidas sobre placas LBC. Colônias individuais foram selecionadas usando PCR de colônia com os ini-

ciadores PCTSPEF e PCTPACR. Colônias individuais foram suspensas em cerca de 25 µl de Tris 10 mM, e 2 µl da suspensão foram revestidos sobre meios LBC. A suspensão restante foi aquecida por 10 minutos a 95°C para abrir rompendo as células bacteriais, e 2 µl das células aquecidas foram usados em uma reação PCR de 25 µl. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Taq, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 unidade de Taq DNA polymerase por reação. O programa de PCR usado foi o mesmo como descrito acima para amplificação do gene a partir de DNA genômico.

DNA plasmídeo foi isolado de culturas de colônias tendo a desejada inserção e foi seqüenciado para confirmar a falta de erros de nucleotídeos a partir de PCR. Um constructo com uma seqüência confirmada foi transformada em *S.cerevisiae* linhagem YPH500 usando um Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research, Orange, CA). Reações de transformação foram revestidas sobre meios SC-His. Colônias de levedura individuais foram selecionadas para a presença dos genes D-LDH e PCT através de PCR de colônia. Colônias foram suspensas em 20 µl de tampão Y-Lysis (Zymo Research) contendo 5 unidades de zimolase e aquecidas a 37°C por 10 minutos. Três µl desta suspensão foram então usados em uma reação PCR de 25 µl usando a mistura de reação PCR e programa descritos para a seleção de colônia dos transformantes *E. coli*. O vetor pESC-His também foi transformado em YPH500 para uso como um controle de ensaio, e transformantes foram selecionados por PCR usando iniciadores GAL1 e GAL10.

Exemplo 13 – Expressão de enzimas em *S.cerevisiae*

A. Atividade hidratase em levedura transformada

Colônias individuais carreando o constructo pESC-Trp/OS19 ou o vetor pESC-Trp (controle negativo) foram usados para inocular culturas de 5ml de meios SC-Trp contendo glicose 2%. Estas culturas foram cultivadas por 16 horas a 30°C e usadas para inocular 35ml dos mesmos meios. As subculturas foram cultivadas por 7 horas a 30°C, e suas OD's₆₀₀ foram determinadas. Um volume de células rendendo uma Od x volume igual a 40 foi pelotizado, lavado com meios SC-Trp sem fonte de carbono, e re-pelotizado.

As células foram suspensas em 5ml de meios SC-Trp contendo galactose 2% e usadas para inocular um volume total de 100ml destes meios. Culturas foram cultivadas por 17,5 horas a 30°C e 250 rpm. Células foram então peletizadas, rinsadas em NaCl 0,85%, e re-peletizadas. Péletes de células
 5 (70mg) foram suspensas em 140 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e um igual volume (pélete mais tampão) de pérolas de vidro pré-rinsadas (Sigma, 150-212 mícrons) foi adicionado. Esta mistura foi feita vórtice por 30 segundos e colocada sobre gelo por 1 minuto, e o ciclo de vórtice/resfriamento foi repetido 8 vezes adicionais. As células foram então centrifugadas por 6 minutos
 10 em 5000g, e o sobrenadante foi removido para um tubo novo. As contas/pélete foram lavadas duas vezes com 250 µl de tampão, centrifugadas, e o sobrenadante é ligado com o primeiro sobrenadante.

Uma cepa *E. coli* carreando o constructo pETBlue-1/OS19, descrita anteriormente, foi usada como um controle positivo para ensaios de
 15 hidratase. Uma cultura desta cepa foi cultivada para saturação por toda noite e diluída 1:20 na manhã seguinte em meios LBC novos. A cultura foi cultivada a 37°C e 250rpm para uma OD₆₀₀ de 0,6, em cujo ponto ela foi induzida com IPTG em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi incubada por duas horas adicionais a 37°C e 250rpm. Células foram peletizadas, lavadas
 20 com NaCl 0,85%, e re-peletizadas. Células foram rompidas usando-se BugBuster Protein Extraction Reagente Benzonase® (Novagen) de acordo com instruções do fabricante com uma incubação de 20 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação e 16000g e 4°C, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e usado no ensaio de atividade.

25 Teor de proteína total de extratos de células de *S.cerevisiae* descritos acima foram quantificados usando uma microplaca de ensaio de proteção Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Os cosntructos OS19 (ambos sítios Apa I-Sall e Apa I-Kpn I) em YPH500, o controle negativo pESC-Trp em YPH500, e o constructo pETBlue-1/OS19 em *E.coli* foram testados para
 30 sua habilidade em converter acrilil-CoA a 3-hidróxi propionil-CoA. O ensaio foi conduzido como descrito anteriormente para os constructos pETBlue-1/OS19 em *E.coli* cepa Tuner. Quando extrato de células da cepa controle

negativo foi adicionado à mistura de reação contendo acrilil-CoA, um pico dominante de PM 823 foi exibido. Este pico corresponde a acrilil-CoA e indica que acrilil-CoA não foi convertida a qualquer outro produto. Quando extrato de células da cepa carreando um constructo pESC-Trp/OS19 (tanto

5 sítios Apa I-Sal I como Apa I-KpnI) foi adicionado à mistura de reação, o pico dominante deslocou-se para PM 841, que corresponde a 3-hidróxi propionil-CoA. A mistura de reação a partir do controle E.coli também mostrou o pico de PM 841. Um estudo de curso de tempo foi conduzido para o constructo pESC-Trp/OS19(Apa I-Sal I), que mediu o aparecimento dos picos de PM

10 841 e PM 823 após 0, 1, 3, 7, 15, 30, e 60 minutos de tempo de reação. Um aumento no pico de 3-hidróxi propionil-CoA foi visto sobre tempo com os extratos de células de ambas, este constructo e o controle E.coli, enquanto extrato de células da cepa YPH500 com vetor somente mostrou um pico acrilil-CoA dominante.

15 **B. Atividade propionil CoA-transferase em levedura transformada**

Colônias individuais de *S. cerevisiae* cepa YPH500 carreando o constructo pESC-His/D-LDH ou pESC-His/D-LDH/PCT ou o vetor pESC-His sem inserção (controle negativo) foram usadas para inocular culturas de 5ml de meios SC-His contendo glicose 2%. Estas culturas foram cultivadas por

20 16 horas a 30°C e 250rpm e foram então usadas para inocular 35ml dos mesmos meios. As subculturas foram cultivadas por 7 horas a 30°C, e suas OD_{600s} foram determinadas. Para cada cepa, um volume de células rendendo uma OD x volume igual a 40 foi pelotizado, lavado com meios SC-His sem fonte de carbono, e repeletizado. As células foram suspensas em 5ml

25 de meios SC-His contendo galactose 2% e usadas para inocular um volume total de 100 ml destes meios. Culturas foram cultivadas por 16,75 horas a 30°C e 250 rpm. Células foram então peletizadas, rinsadas em NaCl 0,85%, e repeletizadas. Péletes de células (70mg) foram suspensos em 140 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e um igual volume (pélete mais

30 tampão) de contas de vidro pré-rinsadas (Sigma, 150-212 microns) foi adicionado. Esta mistura foi feita vórtice por 30 segundos e colocada sobre gelo por 1 minuto, e o ciclo de vórtice/resfriamento foi repetido 8 vezes adicionais.

As células foram então centrifugadas por 6 minutos em 5000g, e o sobrenadante foi removido para um tubo novo. As contas/pélete foram lavados duas vezes com 250 µl de tampão e centrifugados, e os sobrenadantes ligados com o primeiro sobrenadante.

5 Uma cepa *E.coli* carreando o constructo pETBlue-1/PCT, descrita anteriormente, foi usada como um controle positivo para ensaios de propionil CoA transferase. Uma cultura desta cepa foi crescida para saturação por toda noite e diluída 1:20 na manhã seguinte em meios LB frescos contendo 100 µg /ml de carbenicilina. A cultura foi cultivada a 37°C e 250
10 rpm para uma OD₆₀₀ de 0,6, em cujo ponto ela foi induzida com IPTG em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi incubada por duas horas adicionais a 37°C e 250 rpm. Células foram peletizadas, lavadas com NaCl 0,85%, e re-peletizadas. Células foram rompidas usando BugBuster® Protein Extracton Reagent e Benzonase® (Novagen) de acordo com instruções do
15 fabricante com uma incubação de 20 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 16000g e 4°C, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e usado no ensaio de atividade.

Teor de proteína total de extratos de células foi quantificado usando-se uma microplaca de Ensaio de Proteína da Bio-Rad (Bio-Rad,
20 Hercules, CA). As construções D-LDH e D-LDH/PCT em *S. cerevisiae* cepa YPH500, o controle negativo pESC-His em YPH500, e o constructo pETBlue-1/PCT em *E.coli* foram testados para sua habilidade em catalisar a conversão de propionil-CoA e acetato a acetil-CoA e propionato. A mistura de ansaio usada foi aquela previamente descrita para os construções pE-
25 TBlue-1/PCT em *E.coli* cepa Tuner.

Quando 1 µg de proteína de extrato de célula total da cepa de controle negativo ou a cepa YPH500/pESC-His/D-LDH foi adicionado à mistura de reação, nenhum aumento em absorbância (0,00 a 0,00) foi visto em
30 11 minutos. Aumentos em absorbância de 0,00 para 0,04 e de 0,00 para 0,06 foram vistos, respectivamente, com 1 µg de proteína de extrato de célula da cepa YPH500/pESC-His/D-LDH/PCT e a cepa *E.coli*/PCT. Com 2mg de proteína de extrato de célula total, a cepa controle negativo e a cepa

YPH500/pESC-His/D-LDH mostraram um aumento em absorbância de 0,00 para 0,01 em 11 minutos, enquanto aumentos de 0,00 para 0,10 e 0,00 para 0,08 foram vistos, respectivamente, com a cepa YPH500/pESC-His/D-LDH/PCT e a cepa E.coli/PCT.

5 C. Atividade lactil-CoA desidratase em levedura transformada

Colônias individuais de *S.cerevisiae* cepa YPH500 carreando a constructo pESC-His/D-LDH ou pESC-His/D-LDH/PCT ou o vetor pESC-His sem inserção (controle negativo) foram usadas para inocular culturas de 5ml de meios SC-His contendo glicose 4%. Estas culturas foram cultivadas por 10 23 horas a 30°C e usadas para inocular 35ml de meios SC-His contendo rafinose 2%. As subculturas foram cultivadas por 8 horas a 30°C, e suas OD_{600s} foram determinadas. Para cada cepa, um volume de células rendendo uma OD x volume igual a 40 foi pelotizado, ressuspenso em 10ml de meio SC-His contendo galactose 2%, e usado para inocular um volume total de 15 100ml deste meio. Culturas foram cultivadas por 17 horas a 30°C e 250rpm. Células foram então peletizadas, rinsadas em NaCl 0,85%, e repeletizadas. Péletes de células (190mg) foram suspensas em 380ul de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, e um volume igual (pélete mais tampão) de contas de vidro pré-rinsadas (Sigma, 150-212 microns) foi adicionado. Esta mistura foi feita vórtice por 30 segundos e colocada sobre gelo por 1 minuto, e o ciclo de vórtice/resfriamento foi repetido 7 vezes adicionais. As células foram então centrifugadas por 6 minutos a 5000g e o sobrenadante foi removido para um tubo novo. As contas/pélete foram lavados duas vezes com 300 µl de tampão e centrifugadas, e os sobrenadantes ligados 25 com o primeiro sobrenadante.

Uma cultura cultivada anaerobicamente de *E.coli* cepa DH10B foi usada como um controle positivo para ensaios D-LDH. Uma cultura desta cepa foi cultivada para saturação por toda noite e diluída 1:20 na manhã seguinte em meios LB frescos. A cultura foi cultivada anaerobicamente a 37°C por 7,5 horas. Células foram peletizadas, lavadas com NaCl 0,85%, e repeletizadas. Células foram rompidas usando BugBuster® Protein Extraction Reagent e Benzonase® (Novagen) de acordo com instruções do fabricante 30

com uma incubação de 20 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 16000g e 4°C, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e usado no ensaio de atividade.

O teor de proteína total de extratos de célula foi quantificado usando uma microplaca de Ensaio de Proteína da Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Os constructos D-LDH e D-LDH/PCT em YPH500, o controle negativo pESC-His em YPH500, e a cepa *E.coli* cultivada anaerobicamente foram testadas para sua habilidade de catalisar a conversão de piruvato a lactato através de ensaio de simultânea oxidação de NADH a NAD. A mistura de ensaio conteve tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, NADH 0,2 mM, e 0,5-1,0 µg de extrato de células. A reação foi iniciada pela adição de piruvato de sódio para uma concentração final de 5 mM, e a diminuição em absorbância em 340 nm foi medida por 10 minutos. Quando 0,5 µg de proteína de extrato de célula total da cepa controle negativo foi adicionado à mistura de reação, uma diminuição em absorbância de -0,01 a -0,02 foi vista em 200 segundos. Uma diminuição em absorbância de -0,21 para -0,47 e -0,20 para -0,47 em 200 segundos foi vista, respectivamente, para extrato de célula das cepas YPH500/pESC-His/D-LDH ou YPH500/pESC-His/D-LDH/PCT. 0,5 µl (7,85 µg) de extrato de célula da cepa *E.coli* cultivada anaerobicamente mostrou uma diminuição em absorbância muito similar àquela para 1 µg de extrato de célula da cepa YPH500/pESC-His/D-LDH/PCT. Quando 4 µg de extrato de células foram usados, a cepa YPH500/pESC-His/D-LDH/PCT mostrou uma diminuição em absorbância de -0,18 para -0,60 em 10 minutos, enquanto a cepa controle negativo não mostrou diminuição em absorbância (-0,08 a -0,08).

D. Demonstração de produção de 3-HP em *S.cerevisiae*

Os constructos pESC-Trp/OS19/EI, pESC-Leu/EIla/EIIB, e pESC-His/D-LDH/PCT foram transformados em uma cepa simples de *S.cerevisiae* YPH500 usando um Frozen-EZ Yeast Transformation II® Kit (Zymo Research, Orange, CA). Uma cepa controle negativo também foi desenvolvida através de transformação dos vetores pESC-Trp, pESC-Leu, e pESC-His em uma cepa YPH500 simples. Reações de transformação foram

revestidas sobre meios SC-Trp-Leu-His. Colônias de levedura individuais foram selecionadas por PCR de colônia para a presença ou ausência de ácido nucléico correspondendo a cado constructo.

A cepa carreando todos os seis genes e a cepa controle negativo foram cultivadas em 5ml de meios SC-Trp-Leu-His contendo glicose 2%. Estas culturas foram cultivadas por 31 horas a 30°C, e 2 ml foram usados para inocular 50 ml dos mesmos meios. As subculturas foram cultivadas por 19 horas a 30°C, e suas OD600s foram determinadas. Para cada cepa, um volume de células rendendo uma OD x volume igual a 100 foi peletizadas, lavadas com meios SC-Trp-Leu-His sem fonte de carbono, e re-peletizadas. As células foram suspensas em 10ml de meios SC-Trp-Leu-His contendo galactose 2% e rafinose 2% e usadas para inocular um volume total de 250ml destes meios. As culturas foram cultivadas em garrafas a 30°C sem agitação, e amostras foram tomadas em 0, 4,5, 20, 28,5, 45, e 70 horas. Amostras foram giradas para remoção de células e o sobrenadante foi filtrado usando-se filtros Acrodisc Syringe de 0,45 micron (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI).

100 microlitros do caldo filtrado foram usados para derivar CoA ésteres de qualquer lactato ou 3-HP no caldo usando 6 microgramas de propionil-CoA transferase purificada, tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), e acetil-CoA 1 mM. A reação foi deixada proceder em temperatura ambiente por 15 minutos e foi interrompida pela adição de 1 volume de ácido trifluor acético 10%. As misturas de reação foram purificadas usando-se colunas Sep Pak C18 como descrito anteriormente e analisadas por LC/EM.

Exemplo 14 – Construção de um caminho biossintético que produz ácidos orgânicos a partir de beta-alanina

Um possível caminho para 3-HP a partir de beta-alanina envolve o uso de um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase (por exemplo, uma enzima da classe de enzimas que transfere um grupo CoA de um metabolito para outro). Como mostrado na Figura 54, beta-alanina pode ser convertida a beta-alanil-CoA usando um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase e doadores CoA tais como acetil-CoA ou propionil-CoA. Alternativa-

tivamente, beta-alanil-CoA pode ser gerada através da ação de um polipeptídeo tendo uma atividade CoA sintetase. A beta-alanil-CoA pode ser desaminada para formar acrilil-CoA por um polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônia liase. A hidratação de acrilil-CoA na posição beta para
 5 render 3-HP-CoA pode ser realizada por um polipeptídeo tendo atividade 3-HP-CoA desidratase. A 3-HP-CoA pode atuar como um doador CoA para beta-alanina, uma reação que pode ser catalisada por um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase, assim rendendo 3-HP como um produto. Alternativamente, 3-HP-CoA pode ser hidrolisada para render 3-HP por um poli-
 10 peptídeo tendo específica atividade CoA hidrolase.

Processos para isolamento, seqüenciamento, expressão, e teste de atividade de um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase são aqui descritos.

15 A. Isolamento de um polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônia liase

Polipeptídeos tendo atividade beta-alanil-CoA amônia liase podem catalisar a conversão de beta-alanil-CoA em acrilil-CoA. A atividade de tais polipeptídeos foi descrita por Vagelos et al. (J. Biol. Chem., 234:490-497 (1959)) em *Clostridium propionicum*. Este polipeptídeo pode ser usado como
 20 parte do caminho acrilato em *Clostridium propionicum* para produzir ácido propiônico.

C. propionicum foi crescido a 37°C em um meio anóxico contendo extrato de levedura 0,2%, tripticase peptone 0,2%, cisteína 0,05%, b-alanina 0,5%, VRB-sais 0,4%, fosfato de potássio 5mM, pH 7,0. As células
 25 foram colhidas após 12 horas e lavadas duas vezes com fosfato de potássio 50 mM (Kpi), pH 7,0. Cerca de 2g de células empacotadas úmidas foram ressuspensos em 40ml de Kpi, pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1 mM, e DTT 1 mM (Tampão A), e homogeneizados por sonificação em cerca de 85-100 W de energia usando uma ponta de 3mm (Branson sonifer 250). Fragmento de
 30 células foram removidos por centrifugação em 100 000g por 45 minutos em uma centrífuga Centricon T-1080 Ultra, e o extrato isento de células (~110 U/mg de atividade) foi submetido à cromatografia de troca de ânions sobre

material Source-15Q. A coluna Source-15Q foi carregada com 32ml de extrato isento de células. A coluna foi desenvolvida através de um gradiente linear de 0M a 0,5M NaCl dentro de 10 volumes de coluna. O polipeptídeo eluiu entre 70-110 mM NaCl.

- 5 A solução foi ajustada para uma concentração final de 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e aplicada sobre uma coluna Resource-Phe equilibrada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M em tampão A. O polipeptídeo não se liga a esta coluna.

- 10 A preparação final foi obtida após concentração em uma câmara Amicon (corte de filtro de 30 kDa). O polipeptídeo funcional é composto por quatro subunidades de polipeptídeo, cada uma tendo uma massa molecular de 16 kDa. O polipeptídeo teve uma atividade específica final de 1033 U/mg no ensaio padrão (ver abaixo).

- 15 A amostra de polipeptídeo após cada etapa de purificação foi separada sobre um gel SDS-PAGE 15%. O gel foi manchado com Coomassie R250 0,1% e a retirada de mancha foi obtida através do uso de solução de ácido acético 7,1%/etanol 5%.

- 20 Retirou-se o sal do polipeptídeo por RP-HPLC e o mesmo foi submetido à seqüenciamento N-terminal através de degradação Edman de fase gasosa. Os resultados destas análises renderam uma seqüência N-terminal de 35 aminoácidos do polipeptídeo. A seqüência foi como se segue: MV-GKKVVHHLMMMSAKDAHYTGNLVNGARIVNQWGD (SEQ ID NO:177).

B. Amplificação de um fragmento de gene

- 25 A seqüência de 35 aminoácidos do polipeptídeo tendo atividade beta-alanina-CoA amônia liase foi usada para designar iniciadores com os quais amplificar o correspondente DNA de genoma de C. propionicum. DNA genômico de *C. propionicum* foi isolado usando o kit de isolamento Gentra Genomic DNA (Gentra Systems, Minneapolis) seguindo o protocolo de DNA genômico para bactérias gram – positivas. Uma tabela de uso de códon para *Clostridium propionicum* foi usada para contra traduzir os sete aminoácidos sobre qualquer extremidade da seqüência de aminoácido para obter iniciadores degenerados de 20 nucleotídeos:

ACLF: 5'-ATGGTWGGYAARAARGTWGT-3' (SEQ ID NO:178)

ACLR: 5'-TCRCCCCAYTGRTTWACRAT-3'(SEQ ID NO:179)

Os iniciadores foram usados em uma reação PCR de 50 µl contendo tampão 1X Taq PCR, 0,6 uM cada iniciador, 0,2 mM cada dNTP, 2 unidades de Taq DNA polimerase (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 2,5% (v/v) DMSO, e 100 ng de DNA genômico. PCR foi conduzida usando-se um programa PCR touchdown com 4 ciclos em uma temperatura de anelamento de 58°C, 4 ciclos a 56°C, 4 ciclos em 54°C, e 24 ciclos em 52°C. Cada ciclo usou uma etapa de desnaturação inicial de 30 segundos a 94°C e uma extensão de 1,25 minuto a 72°C, e o programa teve uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. As quantidades de iniciador PCR usadas na reação foram aumentadas três vezes acima de quantidades típicas de PCR devido à quantidade de degenerescência na extremidade 3' do iniciador. Em adição, reações PCR separadas contendo cada iniciador individual foram feitas para identificar produto PCR resultante de iniciadores degenerados simples. Vinte µl de cada produto de PCR foram separados sobre gel TAE(Tris-acetato-EDTA)-agarose 2,0%.

Uma banda de cerca de 100 pb foi produzida pela reação contendo ambos iniciadores para frente e reverso, mas não estava presente nas reações de controle iniciador frente e reverso individuais. Este fragmento foi cortado e purificado usando um kit de extração QIAquick Gel (Qiagen, Valencia, CA). Quatro microlitros da banda purificada foram ligados em vetor pCRII-TOPO e transformados por um processo de choque térmico em células E.coli TOP10 usando um procedimento de clonagem TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Transformações foram revestidas sobre meios LB contendo 50 µg /ml de canamicina e 50 µg /ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranosídeo (X-gal). Colônias brancas individuais foram ressuspensas em 25 µl de Tris 10 mM e aquecidas por 10 minutos a 95°C para romper as células bacteriais. Dois microlitros das células aquecidas foram usados em uma reação PCR de 25 µl usando iniciadores universais M13R e M13F homólogos ao vetor pCRII-TOPO. A mistura de PCR conteve o seguinte: tampão 1X Taq PCR, 0,2 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, e 1 uni-

dade de Taq DNA Polymerase por reação. A reação PCR foi realizada em um MJ Pesquisa PTC100 sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto, e 72°C por 1,25 minutos; e uma extensão final por 7 minutos a 72°C.

- 5 Dna de plasmídeo foi obtido (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen) de culturas de colônias mostrando a desejada inserção e foi usado para seqüenciamento de DNA com iniciador universal M13R. A seguinte seqüência de ácidos nucleicos foi interna aos iniciadores degenerados e corresponde a uma porção da seqüência de resíduo de 35 aminoácidos: 5'-
10 ACATCATTTAATGAT GAGCGCAAAAGATGCTCACTATACTGGAAACTA-GTAAACGGCGCTAGA-3'(SEQ ID NO:180).

C. “Caminhar no genoma” para obter a completa seqüência codificante

- Iniciadores para conduzir caminhar no genoma em ambas dire-
15 ções, a montante e a jusante foram projetados usando a porção da seqüência de ácidos nucleicos que foi interna aos iniciadores degenerados. As seqüências de iniciadores foram como se segue:

ACLGSP1F: 5'-GTACATCATTTAATGATGAGCGCAAAAGATG-3' (SEQ ID NO:181)

- 20 ACLGSP2F: 5'-GATGCTCACTATACTGGAACTTAGTAAAC-3' (SEQ ID NO:182)

ACLGSP1R: 5'-ATTCTAGCGCCGTTTACTAAGTTTCCAG-3' (SEQ ID NO:182)

- 25 ACLGSP2R: 5'-CCAGTATAGTGAGCATCTTTTGCGGCTCATC-3' (SEQ ID NO:184)

- GSP1F e GSP2F são iniciadores de face a jusante, GSP1R e GSP2R são iniciadores de face a montante, e GSP2F e GSP2R são iniciadores aninhados dentro de GSP1F e GSP1R, respectivamente. Bibliotecas de caminhar no genoma foram construídas de acordo com o manual para
30 CLONTECH's Universal Genome Walking Kit (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA), com a exceção de que as enzimas de restrição Ssp I e Hinc II foram usadas em adição a Dra I, Eco R V, e Pvu II. PCR foi conduzida em

um termociclizador Perkin Elmer 9700 usando seguinte mistura de reação: tampão II 1X XL, 0,2 mM cada dNTP, 1,25 mM Mg(Oac)₂, 0,2 uM cada iniciador, 2 unidades de rTth DNA polimerase XL (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 1 µl de biblioteca por 50 µl de reação. Iniciador ciclo de PCR usou

5 uma desnaturação inicial em 94°C por 5 segundos; 7 ciclos consistindo em 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 70°C; 32 ciclos consistindo em 2 segundos a 94°C e 3 minutos a 64°C; e uma extensão final a 64°C por 4 minutos. Segundo ciclo de PCR usou uma desnaturação inicial a 94°C por 15 segundos; 5 ciclos consistindo em 5 segundos a 94°C e 3 minutos a 70°C; 26 ciclos

10 consistindo em 5 segundos a 94°C e 3 minutos a 64°C; e uma extensão final a 66°C por 7 minutos. Vinte µl de cada produto de primeiro e segundo ciclo foram corridos sobre um gel TAE-agarose 1,0%. No segundo ciclo de PCR para as reações para diante, uma banda de 1,4 Kb foi obtida para Dra I, uma banda de 1,5 Kb para Hinc II, uma banda de 4,0 Kb para Pvu II, e bandas de

15 2,0 e 2,6 Kb foram obtidas para Ssp I. No segundo ciclo de PCR para as reações reversas, uma banda de 1,5 Kb foi obtida para Dra I, uma banda de 0,8 Kb para EcoR V, uma banda de 2,0 Kb para Hinc II, uma banda de 2,9 Kb para Pvu II, e uma banda de 1,5 Kb foi obtida para Sspl. Vários destes fragmentos foram purificados sobre gel, clonados e seqüenciados.

20 A seqüência codificante do polipeptídeo tendo atividade beta-alanil-CoA amônia liase é mostrada em SEQ ID NO: 162. Esta seqüência codificante codifica a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 160. A seqüência codificante foi clonada e expressa em células bacteriais. Um polipeptídeo com o esperado tamanho foi isolado e testado para atividade

25 de enzimática.

O isolamento de uma molécula de ácido nucléico codificando um polipeptídeo tendo atividade 3-HP-CoA desidratase (por exemplo, a sétima atividade enzimática na Figura 54, que pode ser realizada com um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 41) é aqui

30 descrito. Este polipeptídeo em combinação com um polipeptídeo tendo atividade CoA transferase (por exemplo, um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 e um polipeptídeo tendo atividade

beta-alanil-CoA amônia liase (por exemplo) um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 160) provê um processo de fabricação de 3-HP a partir de beta-alanina.

Exemplo 15 – Construção de um caminho biossintético que produz ácidos

5 orgânicos a partir de beta-alanina

Em um outro caminho, beta-alanina gerada de aspartato pode ser desaminada por um polipeptídeo tendo atividade 4,4-amino butirato amino transferase (Figura 55). Esta reação também pode regenerar glutamato que é consumido na formação de aspartato. A desaminação de beta-alanina
10 pode render malonato semi-aldeído, que pode ser ainda reduzido a 3-HP por um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi propionato desidrogenase ou um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi isobutirato desidrogenase. Tais polipeptídeos podem ser obtidos como se segue.

15 A. Clonagem de gabT(4-amino butirato amino transferase) a partir de C.acetobutylicum

Os seguintes iniciadores PCR foram projetados baseado em uma sequência publicada para um gene gabT de Clostridium acetobutylicum (GenBanknº AE007654):

20 Cac aba nco sen: 5'-GAGCCATGGAAGAAATAAATGCTAAAG-3' (SEQ ID NO:185)

Cac aba bam anti: 5'-AGAGGATGGCTTTTAAATCGCTATTC-3' (SEQ ID NO:186)

Os iniciadores introduziram um sítio NcoI na extremidade 5' e um sítio BamH I na extremidade 3'. Uma reação PCR foi iniciada usando
25 DNA cromossômico de C. acetobutylicum como o molde.

H2O	80,75 µL	Programa PCR	
Tampão taq plus long 10x	10 µL	94°C	5 minutos
dNTP mistura (10 mM)	3 µL	25 ciclos de:	
Cac aba nco anti (20 mM).	2 µL	94°C	30 segundos
Cac aba bam sen (20 mM)	2 µL	50°C	30 segundos
C. acetobutylicum DNA (~100 ng)	1 µL	72°C	80 minutos + 2
Tampão taq plus (5 U/mL)	1 µL	segundos/ciclo	

5 1 µl da mistura de ligação pCRII TOPO foi usado para transformar células E.coli TOP10 quimicamente competentes. As células foram por 1 hora em meios SOC, e os transformantes foram selecionados sobre placas de LB/canamicina (50 µg /ml). Colônias simples do transformante cresceram durante a noite em meios LB/canamicina, e o DNA plasmídeo foi extraído

10 usando-se um kit Mini prep (Qiagen, Valencia, CA). O DNA plasmídeo super-respirado foi separado sobre um gel agarose 1%, digerido, e as colônias com inserção foram selecionadas. A inserção foi seqüenciada para confirmar a seqüência e sua qualidade.

O plasmídeo tendo a correta inserção foi digerido com enzima de restrição Nco I e BamH I. A inserção digerida foi isolada com gel e ligada a vetor de expressão pET28b que também foi restrito com enzimas Nco I e BamH I. 1 µl de mistura de ligação foi usado para transformar células E.coli TOP10 quimicamente competentes. As células foram recuperadas por 1 hora em meios SOC, e os transformantes foram selecionados sobre placas LB/canamicina (50 µg /ml). O DNA plasmídeo superespiralado foi separado sobre gel agarose 1% digerido, e as colônias com inserção foram selecionadas. O plasmídeo com a inserção foi isolado usando-se um kit Mini prep (Qiagen, Valencia, CA), e 1 µl deste DNA plasmídeo foi usado para transformar células BL21(DE3) eletro-competentes (Novagen, Madison,. WI). Estas células foram usadas para verificar expressão de um polipeptídeo tendo atividade 4-amino butirato amino transferase.

B. Clonagem de mmsB(3-hidróxi isobutirato desidrogenase) de P.aeruginosa

Os seguintes iniciadores PCR foram projetados baseados em

uma seqüência publicada para um gene *mmsB* de *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank nº M84911):

Ppu hid nde sem: 5'-ATACATATGACCGACCGACATCGCATT-3' (SEQ ID NO:186)

- 5 Ppu hid sal anti: 5'-ATAGTCGACGGGTCAGTCCTTGCCGCG-3' (SEQ ID NO:187)

Os iniciadores introduziram um sítio Nde II na extremidade 5' e um sítio BamH I na extremidade 3'.

H2O	80,75 µL	Programa PCR
Tampão taq plus long 10x	10 µL	94°C 5 minutos
dNTP mistura (10 mM)	3 µL	25 ciclos de: 94°C 30 segundos 55°C 30 segundos 72°C 90 minutos + 2 segundos/ciclo
Ppu hid.nde sen (20 µM)	2 µL	68°C 7 minutos
Ppu hid sal anti (20 µM)	2 µL	4°C até uso
<i>C. acetobutylicum</i> DNA (~100 ng)	1 µL	
Tampão taq plus (Stratagene, La Jolla, CA)	1 µL	
Pfu (Stratagene, La Jolla, CA)	0,25 µL	

- Uma reação PCR foi iniciada usando-se DNA cromossômico de
- 10 *P.aeruginosa* como o molde. DNA cromossômico foi obtido de ATCC (Manassas, VA) *P. aeruginosa* 17933D.

- Com análise de gel agarose, uma banda simples foi observada de ~1,6 Kb em tamanho. Este fragmento foi purificado usando kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA) e clonado em pCRII TOPO usando o kit de clonagem TOPO Zero Blunt PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA).
- 15 da mistura de ligação pCRII TOPO foi usado para transformar células *E.coli* TOP10 quimicamente competentes. As células foram recuperadas por 1 hora em meios SOC, e os transformantes foram selecionados sobre placas LB/canamicina (50 µg /ml). Colônias simples do transformante cresceram

por toda noite em meios LB/canamicina, e o DNA plasmídeo foi extraído usando um kit Mini prep (Qiagen, Valencia, CA). O DNA plasmídeo superespiralado foi separado sobre um gel agarose 1% e digerido, e as colônias com inserção foram selecionadas. A inserção foi seqüenciada para confirmar a seqüência e sua qualidade.

O plasmídeo tendo a correta inserção foi digerido com enzima de restrição Nde I e BamHI. A inserção digerida foi isolada com gel e ligada a vetor de expressão pET30a que também foi restrito com enzimas Nde I e BamHI. 1 µl de mistura de ligação foi usado para transformar células E.coli TOP10 quimicamente competentes. As células foram recuperadas por 1 hora em meios SOC, e os transformantes foram selecionados sobre placas de LB/canamicina (50 µg/ml). O DNA plasmídeo superespiralado foi separado sobre um gel agarose 1% e digerido, e as colônias com inserção foram selecionadas. O plasmídeo com a inserção foi isolado usando um kit Mini prep (Qiagen, Valencia, CA) e 1 µl deste DNA plasmídeo foi usado para transformar células BL21(DE3) eletro-competentes (Novagen, Madison, WI). Estas células foram usadas para verificar a expressão de um polipeptídeo tendo atividade 3-hidróxi butirato desidrogenase.

Outras Modalidades

É para ser entendido que embora a invenção tenha sido descrita em conjunção com sua descrição detalhada, a descrição anterior é pretendida ilustrar e não limitar o escopo da invenção, que é definida pelo escopo das reivindicações apostas. Outros aspectos, vantagens, e modificações estão dentro do escopo das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. *Escherichia coli* (*E. coli*) transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína consistindo em uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 141.

5 2. *E. coli* transgênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucléico exógeno consistindo na sequência mostrada em SEQ ID NOs: 140 ou 142 operacionalmente ligada a um promotor heterólogo.

10 3. *E. coli* transgênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que produz ácido 3-hidroxipropiônico.

4. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fato de que consiste em uma sequência de ácido nucleico mostrada em SEQ ID NO:140 ou 142 operacionalmente ligada a um promotor heterólogo.

15 5. *E. coli* transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico exógeno, em que a referida molécula consiste em uma sequência de ácidos nucléicos mostrada em SEQ ID NO:140 ou 142 operacionalmente ligada a um promotor heterólogo.

6. *E. coli* transgênica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que produz 3-HP.

20 7. *E. coli* transgênica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de ácido nucléico exógeno codifica um polipeptídeo consistindo em uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 141.

25 8. *E. coli* transgênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda atividade acetil-CoA carboxilase.

9. *E. coli* transgênica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende ainda atividade acetil-CoA carboxilase.

30 10. *E. coli* transgênica de produção, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada como definida na reivindicação 4 que é exógena para a referida *E. coli* de produção.

11. Processo para fabricação de 3-HP, caracterizado pelo fato de que compreende:

contatar acetil-CoA com um primeiro polipeptídeo tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 189 ou 190 para formar malonil-CoA, e

contatar a referida malonil-CoA com um segundo polipeptídeo consistindo em uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 141 para formar o

5 dito 3-HP.