

BRUNA FONSECA MAZZEU

Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan
Coorientadora: Profa. Dra. Lidiane Gaspareto Felipe

**Araraquara
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

M477a Mazzeu, Bruna Fonseca
Avanços no processo de purificação da friedelina sintase
e estudos de sua atividade e especificidade / Bruna Fonseca
Mazzeu. – Araraquara : [s.n.], 2019
107 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan
Coorientador: Lidiane Gaspareto Felippe

1. Espinheira Santa. 2. Mutagenese. 3. Saccharomyces
cerevisiae. 4. Terpenos. 5. Reconhecimento molecular.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade"

AUTORA: BRUNA FONSECA MAZZEU

ORIENTADORA: MAYSIA FURLAN

COORDINADORA: LIDIANE GASPARETO FELIPPE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Lidiane Gaspareto Felippe

Prof.ª. Dr.ª. LIDIANE GASPARETO FELIPPE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Cintia Duarte de Freitas Milagre

Prof.ª. Dr.ª. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Isabele R. Nascimento

Prof.ª. Dr.ª. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Taícia Pacheco Fill

Prof.ª. Dr.ª. TAÍCIA PACHÊCO FILL

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Andre Luiz Meleiro Porto

Prof. Dr. ANDRE LUIZ MELEIRO PORTO

Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 18 de outubro de 2019

INFORMAÇÕES CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome: Bruna Fonseca Mazzeu
Filiação: Benedito Antonio Mazzeu e Roseli Aparecida Fonseca Mazzeu
Nascimento: 08/08/1987 - Araraquara/SP - Brasil
Estado Civil: Solteira
Endereço residencial: Avenida Laudomiro Scotton, 52
Jardim Califórnia – Araraquara, 14801-024, SP - Brasil
Telefone: (16) 3332-1883
Endereço profissional Instituto de Química de Araraquara – UNESP
Departamento de Química Orgânica
Rua Prof. Francisco Degni, 55
Quitandinha – Araraquara, 14800-970, SP - Brasil
Telefone: (16) 3301-9510
e-mail: bruna.mazzeu@gmail.com

2. Formação Profissional

2.1. Graduação

Curso: Licenciatura em Química
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Período: março de 2007 a dezembro de 2011.

2.2. Iniciação Científica

Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Modalidade: Produtos Naturais
Projeto: “Estudo químico e biológico de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”
Orientadora: Maysa Furlan
Período: janeiro de 2010 a dezembro de 2011

2.3. Pós-Graduação

2.3.1. Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Modalidade: Produtos Naturais
Projeto: “Estudo de aspectos estruturais e biossintéticos em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”
Orientadora: Maysa Furlan
Período: março de 2012 a maio de 2014

2.3.2. Doutorado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Modalidade: Produtos Naturais
Projeto: “Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade”
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maysa Furlan
Co orientadora: Prof^a. Dr^a. Lidiane Gaspareto Felipe
Período: março de 2015 a outubro de 2019

3. Trabalhos publicados.

MAZZEU, B. F.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; OLIVEIRA, A. A.; REMLINGER, M.; FELIPPE, L. G.; VALENTINI, S. R.; GUIDO, R. V. C. ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. The methionine 549 and leucine 552 residues of friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia* are important for the substrate binding specificity, **Scientific Reports**. (SUBMETIDO)

MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; COTINGUIBA, F.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Kavalactones and benzoic acid derivatives from leaves of *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1286-1290, 2018.

FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, A. U. C.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; PINTO, R. A.; GOLIM, M. A.; ARRUDA, M. S. P.; FURLAN, M.; VENTURINI, J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PLoS One**, v. 13, n. 6, 2018.

JARDIM, A.; SANTOS, V. A.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; IGLOI, Z; AMAKO, Y; FURLAN, M.; HARRIS, M.; RAHAL, P. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Journal: Antiviral Research**, v. 115, p. 39-47, 2014.

Dedicatória

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me deu forças para vencer todas as dificuldades. À minha família por estar presente neste momento tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por estar sempre me guiando.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Maysa Furlan, pelo seu incansável e permanente encorajamento, pela disponibilidade dispensada em todas as situações, por todo o incentivo e principalmente a confiança depositada em mim; os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo.

A minha coorientadora, grande amiga e incentivadora Lidiane Gaspareto Felipe, pela dedicação, disponibilidade, pela ajuda sempre tao importante e principalmente pela amizade.

A meu pai, Mazzeu, meu irmão Murilo e a meu namorado Ederson, a toda minha família e amigos pelo apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Química, por todas as conquistas e realizações, desde a graduação.

Ao professor Cleslei Zanelli da Faculdade de Ciências Farmaceuticas (Unesp) por disponibilizar o laboratório de biologia molecular e possibilitar a realização deste trabalho.

À Dra Tatiana Maria de Souza Moreira, por todo ensinamento prático de biologia molecular.

A todo pessoal do laboratório de biologia molecular: Angélica, Suélen, Fernanda, Ana, Marco, Bianca, Maria Olivia, Anderson.

Aos amigos do grupo de Biossíntese de Produtos Naturais: Aline, João Bronzel, João Paulo, Karina, Keylla, Naira, Vania, Wellington e Weslei pelas discussões, conversas, risadas e acima de tudo, pela amizade.

Ao professor Dr Richard Garratt e à Dra Tatiana Watanabe, do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física da USP de São Carlos, pela oportunidade e aprendizado.

Ao professor Dr Rafael Guido e ao Dr Andrew Oliveira do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos, Instituto de Física de São Carlos, USP de São Carlos, pelas análises de modelagem molecular.

Aos amigos e professores do Departamento de Química Orgânica e do NuBBE, pela amizade, pelo convívio e pela ajuda.

À Juliana e João pela obtenção dos cromatogramas e por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e funcionárias do Departamento de Química Orgânica, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários e funcionárias da Seção de Pós-Graduação e da biblioteca pela atenção e dedicação

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A engenharia metabólica tem ajudado a melhorar ou redirecionar as vias metabólicas, fazendo modificações genéticas, como, a deleção ou superexpressão de genes e desta forma alterando a atividade de reações enzimáticas específicas. Friedelina é um triterpeno pentacíclico encontrado nas folhas das espécies de Celastraceae, que demonstrou inúmeras atividades biológicas e é precursor dos triterpenos quinonemetideos, promissor antitumoral. É biossintetizada a partir da ciclização do 2,3-oxidosqualeno e envolve o número máximo de rearranjos para a formação de uma cetona por desprotonação do intermediário hidroxilado sem o auxílio de uma enzima oxidoreductase. O estudo das enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários é importante na busca de novas alternativas sustentáveis para a produção dos mesmos. Nessas condições, friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* foi clonada e expressa em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, levando a sua obtenção em um sistema heterólogo. A obtenção da fração enriquecida com friedelina sintase, foi realizada em duas etapas cromatográficas: cromatografia por afinidade, utilizando uma coluna com resina Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) e cromatografia de troca iônica com resina de troca aniônica. A presença e pureza de *MFRS* foi avaliada por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelado com Coomassie e comparado com o perfil em *Western Blot*. As etapas de purificação removeram uma grande parte das proteínas contaminantes. Os estudos de mutação sitio dirigida *in vivo* foram realizados com quatro mutações: a troca de um resíduo de cisteína, na posição 369 por um resíduo de prolina (C369P), a troca de uma fenilalanina, na posição 473 por um triptofano (F473W), a troca de um resíduo de metionina, na posição 549 por um resíduo de serina (M549S) e a troca de uma leucina por uma fenilalanina, na posição 552 (L552F). As mutações C369P e F473W levaram a perda de função, além de não produzir qualquer outro triterpeno. Os mutantes M549S e L552F conservaram a atividade da enzima, produzindo friedelina e foram capazes de produzir α -amirina e β -amirina.

Palavras-chave: Friedelina sintase, sistema heterólogo, modelagem molecular, mutação sitio dirigida.

ABSTRACT

Metabolic engineering has helped to improve or redirect metabolic pathways, making genetic modifications such as deletion or overexpression of genes and thus altering the activity of specific enzyme reactions. Friedelin is a pentacyclic triterpene found in the leaves of Celastraceae species, which has demonstrated numerous biological activities and is a precursor of quinonemethide, promising antitumoral. It is biosynthesized from 2,3-oxidosqualene cyclization and involves the maximum number of rearrangements for ketone formation by deprotonation of the hydroxylated intermediate without the aid of an oxidoreductase enzyme. The study of the enzymes responsible for the production of secondary metabolites is important in the search for new sustainable alternatives for their production. Under these conditions, friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia* was cloned and expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, leading to its obtention in a heterologous system. Enriched fraction with friedelin synthase was obtained in two chromatographic steps: affinity chromatography using a column with Ni-NTA resin (nitrilotriacetic acid) and ion exchange chromatography with anion exchange resin. The presence and purity of MFERS was evaluated by polyacrylamide denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE) developed with Coomassie and compared to the Western Blot profile. The purification steps removed a large portion of the contaminating proteins. Site-directed mutation studies were performed with four mutations: exchanging a cysteine residue at position 369 for a proline residue (C369P), exchanging a phenylalanine residue at position 473 for a tryptophan residue (F473W), exchanging a methionine residue at position 549 for a serine residue (M549S) and exchanging a leucine residue for a phenylalanine residue at position 552 (L552F). Mutations C369P and F473W led to loss of function and produced no other triterpene. Mutants M549S and L552F retained enzyme activity, producing friedelin and were capable of producing α -amyrin and β -amyrin.

Keywords: Friedelin synthase, heterologous system, molecular modeling, site directed mutation.

Lista de figuras

Figura 1: Estruturas químicas de algumas substâncias produzidas por engenharia metabólica.	23
Figura 2: Vias biossintéticas que levam a produção dos esqueletos terpênicos.	25
Figura 3: Cátions intermediários e produtos da ciclização de 2,3-oxidosqualeno por oxidosqualeno ciclases.	29
Figura 4: Vias biossintéticas dos diferentes esqueletos triterpênicos (HAN, et al., 2019).	30
Figura 5: Via biossintética que leva a produção dos triterpenos quinonametídeos pela oxidação da friedelina.	33
Figura 6: Mapa do plasmídeo pET28a(+)-6xHis- <i>MiFRS</i>	38
Figura 7: Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni ²⁺ da resina Ni-NTA.	41
Figura 8: Esquema da purificação de <i>MiFRS</i> por cromatografia de afinidade.	42
Figura 9: Modelo <i>in silico</i> da enzima friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i> (<i>MiFRS</i>). A representação da estrutura secundária mostra os domínios α/α conhecidos como proteína $\beta\gamma$. A hélice α_9 se aproxima da bicamada lipídica que origina o substrato. Por outro lado, o domínio γ processa e libera o produto friedelina. Horizontalmente ao N-terminal está organizado o sítio ativo, criado na interface entre os domínios γ e β . Especificamente, alças flexíveis e três pinos β dão movimento e polaridade para a produção do substrato.	54
Figura 10: Alinhamento entre as sequências primárias das oxidosqualeno ciclases. Em destaque o motivo conservado DCTAE.	55
Figura 11: Curva analítica da substância padrão, friedelina, obtida com as seguintes concentrações: 5,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$	56
Figura 12: SDS-PAGE (10% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 37° C para o vetor pET28a(+)-6xHis- <i>MiFRS</i> , variando o tempo de indução: 1; 3; 6 e 24 h; e a concentração de IPTG: 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mM. Os retângulos destacam as bandas de expressão.	58
Figura 13: SDS-PAGE (10% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 37° C e 18 °C para o vetor pET28a(+)-6xHis- <i>MiFRS</i> , com 6 h de indução e a 0,25 mM de IPTG. Os retângulos destacam as bandas de expressão.	59
Figura 14: SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação por cromatografia de afinidade. Lav ₁₋₂ são as lavagens feitas com 50 mM de imidazol e E ₁₋₄ são as eluições feitas com 500 mM de imidazol. Os retângulos destacam as bandas referentes a <i>MiFRS</i>	60
Figura 15: Comparação entre eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blotting</i> . (a) SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação de <i>MiFRS</i> (<i>F_{MiFRS}</i>) por cromatografia de afinidade. (b) Perfil em <i>Western blotting</i> da purificação de <i>MiFRS</i> por cromatografia de afinidade.	61
Figura 16: (a) SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação por cromatografia de troca iônica. L ₁₋₂ são as lavagens feitas com 50 mM de KCl, E ₁ a eluição feita com KCl 1 M e E ₁ conc é a eluição após ser concentrada. As bandas referentes a <i>MiFRS</i> estão destacadas com flechas. (b) Perfil em <i>Western blotting</i> da purificação de <i>MiFRS</i> por cromatografia por troca iônica.	63
Figura 17: Cascata de reações envolvida na produção de friedelina e outros triterpenos (HAN, et al., 2019).	64

Figura 18 - Alinhamento global múltiplo entre a sequência selvagem de <i>MiFRS</i> e as sequências mutadas obtidas.	65
Figura 19 - Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Comparação entre os resíduos na posição 369. A identificação e número de acesso estão apresentados na Tabela 1 do Anexo I.	67
Figura 20 : Estruturas químicas dos aminoácidos cisteína e prolina.	67
Figura 21 : Interação entre os resíduos F473 e W612.	68
Figura 22 : Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina e triptofano.	69
Figura 23 : Alinhamento secundário da proteína nativa (<i>MiFRS</i>) (carbonos em cinza) com o mutante F473W (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Interação favorável entre o resíduo F473 da enzima nativa e substrato. (b) Impedimento estérico do resíduo W473 no sítio ativo de <i>MiFRS</i> mutante. (c) Interação entre os resíduos W417 e W473, favorecendo o impedimento estérico. (d) Interação entre os resíduos W417 e F473.	71
Figura 24 : Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Comparação entre os resíduos na posição M549S.	72
Figura 25 : Estruturas químicas dos aminoácidos metionina e serina.	72
Figura 26 : Alinhamento secundário (ou representação lado a lado) da proteína nativa (<i>MiFRS</i>) (carbonos em cinza) com o mutante M549S (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Interação dos resíduos Y259 e L482. (b) estabilização dos resíduos aromáticos Y264 e W219; interação ânion- π entre a hidroxila do resíduo S549 e o resíduo F551. (c) A estrutura nativa mostra um ângulo desfavorável de 98 ° a partir da interação do M549 com o F551. (d) Sanduíche entre os resíduos Y264 e W219 e o ânion no resíduo mutado S549 próximo ao anel C. Estabilização do complexo S549/F551/W219/Y264.	73
Figura 27 : Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Comparação entre os resíduos na posição L552F.	74
Figura 28 : Estruturas químicas dos aminoácidos leucina e fenilalanina.	75
Figura 29 : Alinhamento secundário da proteína nativa (<i>MiFRS</i>) (carbonos em cinza) com o mutante L552F (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Sanduíche entre os resíduos de fenilalanina nas posições 551/552/728 (b) A mutação aproximou o resíduo F728 do sítio catalítico, com uma interação do tipo elétron π que estabiliza o anel C, diminuindo a especificidade da enzima. (c) A estrutura nativa mostra a interação dos resíduos L552 e F728. (d) Outra possibilidade de rotâmero é prejudicada devido ao colapso de outros resíduos da cadeia principal ou lateral.	76
Figura 30 : Cromatograma das substâncias usadas como padrão: (a) friedelina, (b) β -amirina e α - amirina. Cromatograma das frações hexânicas de <i>MiFRS</i> (c), C369P (d), F473W (e), L552F (f) e M549S (g).	76
Figura 31 : Cromatograma da friedelina purificada por CC ($t_r=21,100$ minutos).	80
Figura 32 : Curva analítica da substância padrão, friedelina, obtida com as seguintes concentrações: 15,62; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0, 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g/mL}$	81

Figura 33: Teores de friedelina, β -amirina e α - amirina produzidas nos mutantes de MiFRS.....83

Figura 34: Concentração de friedelina em frações extraídas de *Saccharomyces cerevisiae*, expressando mutantes *MiFRS*. A concentração de friedelina é expressa em mg/L de meio de cultura.84

Lista de tabelas

Tabela 1: Estruturas químicas e atividades biológicas de alguns terpenos.	26
Tabela 2: Massa seca das células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressando friedelina sintase selvagem (pYES-MiFRS) e expressando com uma sequência de seis histidinas, na região N-terminal (pYES-6xHis-MiFRS) e C-terminal (pYES-MiFRS-6xHis).....	36
Tabela 3 - Lista com os <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> para cada reação de mutação sítio-dirigida.....	45
Tabela 4 - Lista com os <i>primers forward</i> usados no sequenciamento para cada reação de mutação sítio-dirigida.....	47
Tabela 5: Massa seca das células e extratos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressando friedelina sintase selvagem (<i>MiFRS</i>) e expressando as sequências dos mutantes. Análise feita em triplicata.	51
Tabela 6: Concentração de friedelina presente nos extratos brutos da levedura <i>S. cerevisiae</i>	57
Tabela 7 - Resíduos de aminoácidos do sítio ativo da friedelina sintase selecionados para mutagênese sítio dirigida.....	65
Tabela 8: Concentração de friedelina presente nas frações extraídas dos mutantes da levedura <i>S. cerevisiae</i>	78
Tabela 9: Dados referentes às concentrações da substância padrão friedelina e do padrão interno colesterol usados na construção da curva analítica.	81
Tabela 10: Concentração de friedelina presente nas frações extraídas da levedura <i>S. cerevisiae</i> , expressando os mutantes de <i>MiFRS</i>	82

Lista de fluxogramas

Fluxograma 1: Procedimento geral de extração da friedelina do sistema heterólogo (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	36
Fluxograma 2: Procedimento geral para extração dos triterpenos produzidos heterologamente nas linhagens modificadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
Fluxograma 3: Procedimento experimental para purificação de friedelina.	52

Lista de cromatogramas

Cromatograma 1: Cromatograma da fração hexânica do vetor vazio expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	93
Cromatograma 2: Cromatograma da fração clorofórmica do vetor vazio expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	93
Cromatograma 3: Cromatograma da fração hexânica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	93
Cromatograma 4: Comparação entre os cromatograma da fração hexânica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa).	93
Cromatograma 5: Cromatograma da fração clorofórmica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	94
Cromatograma 6: Comparação entre os cromatograma da fração clorofórmica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa).	95
Cromatograma 7: Cromatograma da fração hexânica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	95
Cromatograma 8: Comparação entre os cromatograma da fração hexânica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa) (Ampliação).	96
Cromatograma 9: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	96
Cromatograma 10: Comparação entre os cromatograma da fração clorofórmica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> (rosa) e os padrões friedelina e colesterol (preto).	97
Cromatograma 11: Cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	97
Cromatograma 12: Cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> (Ampliação).	98
Cromatograma 13: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> (rosa) com o padrão friedelina (preto) (Ampliação).	98
Cromatograma 14: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	99
Cromatograma 15: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com os padrões friedelina e colesterol (rosa).	99
Cromatograma 16: Cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	100
Cromatograma 17: Cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> (Ampliação).	100
Cromatograma 18: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).	101
Cromatograma 19: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	101

Cromatograma 20: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão friedelina (rosa) (Ampliação).	102
Cromatograma 21: Cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i>	102
Cromatograma 22: Cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (Ampliação).	103
Cromatograma 23: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).	103
Cromatograma 24: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão friedelina (rosa) (Ampliação).	104
Cromatograma 25: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).	104

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2YT	-	meio de cultura a base de triptona, extrato de levedura e NaCl
6xHis	-	sequência de 6 histidinas
CC	-	cromatografia em coluna
CG-EM	-	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DMAPP	-	difosfato de dimetilalila
D.O.	-	densidade optica
DTT	-	1,4-ditiotreitol
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
Hex	-	hexano
His-tag	-	cauda de histidina
IPP	-	difosfato de isopentenila
IPTG	-	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo
LB	-	meio de cultura Luria-Bertani
<i>MFRS</i>	-	friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i>
<i>m/z</i>	-	relação massa-carga
Ni-NTA	-	matriz de íons níquel ligados a agarose
OSCs	-	oxidoesqualeno ciclases
p.	-	página
PBS	-	tampão fosfato salino
PBS-T	-	tampão fosfato salino com Tween [®] 20 0,5%
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
PEG	-	polietilenoglicol
PLAC	-	inibidor de protease
rpm	-	rotações por minuto
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	-	eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida
SC-URA	-	meio de cultura a base de extrato de levedura, vitaminas e bases nitrogenadas exceto uracila
TE	-	tampão tris/HCl com EDTA
UV	-	ultravioleta

VC - volumes de coluna

YNB - base nitrogenada de levedura sem adição de aminoácidos

SUMÁRIO

1.1. Engenharia metabólica aplicada a produtos naturais	21
1.2. Terpenóides	25
1.3. Biossíntese da friedelina	27
1.4. Mutações em enzimas oxidoesqualeno ciclases	31
2. OBJETIVOS	33
3. PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1. Análise quantitativa da friedelina em levedura	34
3.1.1. Extração de friedelina biossintetizada no sistema heterólogo (<i>S. cerevisiae</i>).....	35
3.1.2. Curva analítica.....	37
3.1.3. Análise dos produtos gerados.....	37
3.2. Produção de friedelina sintase	38
3.2.1. Teste de indução.....	38
3.2.2. Crescimento das células.....	39
3.2.3. Lise das células	40
3.3. Purificação da proteína	40
3.3.1. Cromatografia por afinidade	40
3.3.2. Diálise	42
3.3.3. Cromatografia por troca iônica	42
3.3.4. Determinação de pureza e confirmação da obtenção de <i>MiFRS</i>	43
3.4. Estudo mutagênico de <i>MiFRS</i>	44
3.4.1. Reações de mutagênese sítio-dirigida	44
3.4.2. Transformação dos mutantes em levedura.....	47
3.4.3. Expressão heteróloga dos mutantes de <i>MiFRS</i> em <i>S. cerevisiae</i>	48
3.4.4. Extração das substâncias biossintetizadas no sistema heterólogo (<i>S. cerevisiae</i>).....	49
3.4.5. Curva analítica.....	51
3.4.5.1. Purificação da friedelina.....	52
3.4.6. Análise dos produtos gerados.....	52
3.4.7. Estudos de modelagem molecular.....	53

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Friedelina sintase.....	54
4.2. Análise quantitativa da friedelina em levedura	55
4.3. Produção de friedelina sintase	57
4.3.1. Teste de indução.	57
4.4. Purificação parcial da friedelina sintase	59
4.4.1. Cromatografia por afinidade.....	59
4.4.2. Determinação da pureza e confirmação da obtenção de <i>MIFRS</i>	60
4.4.3. Cromatografia por troca iônica.....	62
4.5. Estudo mutagênico de <i>MIFRS</i>	63
4.5.1. Obtenção dos mutantes do sítio ativo de <i>MIFRS</i>	65
4.5.1.1. Confirmação das mutações realizadas	65
4.5.2. Análise dos produtos triterpênicos produzidos pelos mutantes de <i>MIFRS</i>	66
4.5.2.1. Mutante C369P	66
4.5.2.2. Mutante F473W	68
4.5.2.3. Mutante M549S.....	71
4.5.2.4. Mutante L552F	74
4.5.3. Quantificação da friedelina nos mutantes	80
5. CONCLUSÃO	84
6. Referências	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Engenharia metabólica aplicada a produtos naturais

A engenharia metabólica surgiu no final da década de 1980, quando cientistas introduziram o gene da diidroquercetina 4-redutase do milho em petúnia (*Petunia hybrida*). Essa nova alternativa de manipulação genética levou a uma mudança na coloração das flores devido ao aumento da produção da antocianina pelargonidina (Figura 1, p. 23) nas plantas transgênicas (MEYER, et al., 1987). A partir de então, uma grande variedade de petúnia com diferentes cores, padrões e formas foram produzidas, por expressão ou silenciamento de genes críticos que levavam à produção das plantas modificadas (NAKATSUKA, et al., 2007; SHIMADA, et al., 2001; TSUDA, et al., 2004).

Em suas primeiras aparições, a engenharia metabólica era vista apenas como uma maneira de melhorar as propriedades das células por modificações genéticas no seu metabolismo. No entanto, isso exigia uma compreensão do funcionamento metabólico. Desta forma, as análises metabólicas e fisiológicas da célula desempenharam um importante papel no início dos estudos de engenharia metabólica. Com o passar dos anos, a engenharia metabólica evoluiu e passou a abranger muito mais do que esses conceitos tradicionais (NIELSEN e LEE, 2018). Atualmente a engenharia metabólica permite melhorar ou redirecionar as vias metabólicas, por modificações genéticas, incluindo, a deleção ou superexpressão de genes o que altera a atividade de reações enzimáticas específicas (SOUZA-MOREIRA et al., 2016; IKRAM E SIMONSEN, 2017; IBDAH, et al., 2018; KAYANI, et al., 2018, ABDALLAH, et al., 2019, ZHANG, et al., 2019).

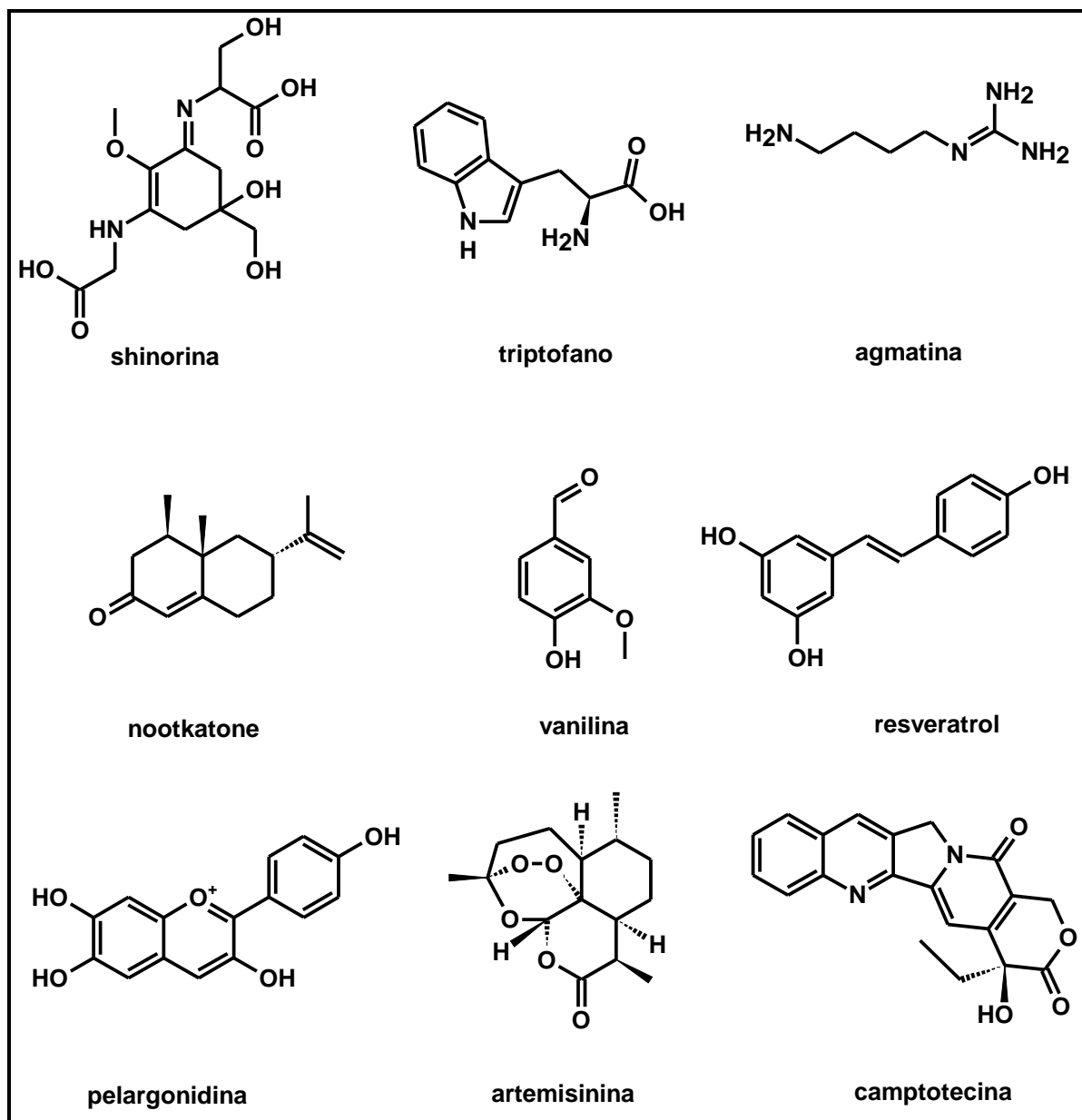
Plantas, fungos e microorganismos possuem uma maquinaria biossintética capaz de produzir uma variedade de metabólitos secundários, cuja função na natureza é atuar na defesa contra predadores ou competidores, além de outros significados ecológicos. Por isso, essas substâncias apresentam baixo acúmulo nas espécies e sua produção em larga escala é limitada. Desta forma, a prática do extrativismo vegetal torna-se desvantajosa devido à necessidade de grande quantidade da planta para obtenção razoável do produto. Nessas condições, estudos das vias metabólicas e das enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários em uma fonte natural são de extrema importância na busca de novas alternativas sustentáveis para a produção dos mesmos. Uma vez que conhecida a via metabólica e as enzimas envolvidas na produção de substâncias de interesse é

possível propor modificações genéticas, com o intuito de aumentar o rendimento de importantes metabólitos (NABAVI, et al., 2018). Para isso, é necessário expressar os genes que codificam enzimas da via biossintética da planta ou fungo que produz a substância de interesse, em hospedeiros microbianos, chamados de sistema heterólogo. A produção desses metabólitos utilizando hospedeiros microbianos é ecologicamente amigável e pode produzir produtos com alto grau de pureza quando comparados aos obtidos a partir de plantas, permitindo assim, quando necessário, a utilização de estratégias de purificação mais simples e mais afeitas a processos “verdes” (IBDAH, et al., 2018).

Os sistemas heterólogos podem ser plantas (DESAI, et al., 2010), células de mamíferos (REED e NOPO-OLAZABAL, 2005), de eucarióticos e procarióticos, como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*. A produção microbiana oferece vantagem em comparação com outros sistemas heterólogos, devido ao seu rápido crescimento, a conveniência da manipulação genética e também as ferramentas de engenharia metabólica estar bem estabelecidas e desenvolvidas para serem usadas em microrganismos (IBDAH, et al., 2018). *S. cerevisiae* e *E. coli*, são amplamente utilizados como fábricas celulares para sintetizar substâncias desejadas pela utilização de uma abordagem biossintética dirigida por precursores (KENNEDY, 2008).

O aumento de doenças como Alzheimer, obesidade, câncer e diabetes nas últimas décadas, acompanhada da grande demanda pública por medicamentos fitoterápicos levou ao interesse crescente pela engenharia metabólica como uma abordagem para produzir tais produtos naturais em escala industrial, que tem o potencial de reduzir os custos de produção (IBDAH, et al., 2018). Dessa forma, estão sendo produzidas em microrganismos algumas substâncias de interesse para as indústrias, como os fármacos artemisinina (ABDIN, et al., 2015) e camptotecina (LISCOMBE e O’CONNOR, 2011), fragrâncias como o nootkatone, produtos químicos alimentares, como a vanilina e o resveratrol (Figura 1, p. 23), e até mesmo, biocombustíveis como o etanol e isobutanol (JULLESSON, et al., 2018).

Figura 1: Estruturas químicas de algumas substâncias produzidas por engenharia metabólica.



Um exemplo dessa abordagem biotecnológica para o acesso a substâncias bioativas de interesse é a produção da agmatina (Figura 1, p. 23) em *Escherichia coli*. A agmatina é uma substância natural produzida pela descarboxilação enzimática do aminoácido arginina. Tem sido usada como suplemento alimentar e apresenta grande potencial para aplicações no tratamento de muitas doenças complexas, incluindo distúrbios do sistema nervoso central, doenças cardiovasculares e cânceres (KEYNAN, et al., 2010; PILETZ, et al., 2013). Atualmente, a síntese química da agmatina depende de um processo que envolve várias etapas (YE, et al., 2010). Além disso, as condições de reação são severas e envolvem altas questões de segurança

de produção, além de gerar resíduos que poluem o ambiente. Estudos apontaram que *Escherichia coli* modificada geneticamente foi capaz de excretar agmatina para o meio de cultura, demonstrando seu potencial para produzi-la em larga escala (XU e ZHANG, 2019). Outro aditivo alimentar que foi produzido em *E. coli* é o aminoácido *L*-triptofano, que é largamente utilizado na indústria alimentar, farmacêutica e química. A produção heteróloga do *L*-triptofano foi mais eficiente, quando comparada com os métodos tradicionais de síntese, além de ser ambientalmente melhor e ter baixos custos de produção (HAO, et al., 2019).

Recentemente, Seong-Hee e colaboradores (2019) relataram a produção heteróloga de shinorina em *Saccharomyces cerevisiae*. A shinorina pode ser usada como protetor solar, uma vez que, seus comprimentos de onda de absorbância máxima (310–365 nm) cobrem UV-A, que é mais abundante na luz do sol e mais penetrante do que UV-B (CARRETO, et al., 2011; GAO e GARCIA-PICHEL, 2011; SINGH, et al., 2008). A shinorina é isolada da alga vermelha *Porphyra umbilicalis* e produzida em algumas cianobactérias como *Nostoc punctiform* e *Anabaena variabilis*, entretanto tem um rendimento muito baixo na sua produção. Nesse trabalho, os genes da shinorina da cianobactéria *N. punctiform* foram introduzidos em *Saccharomyces cerevisiae* resultando em uma elevada produção de shinorina, fazendo com que sua produção heteróloga seja uma alternativa promissora (SEONG-HEE, et al., 2019).

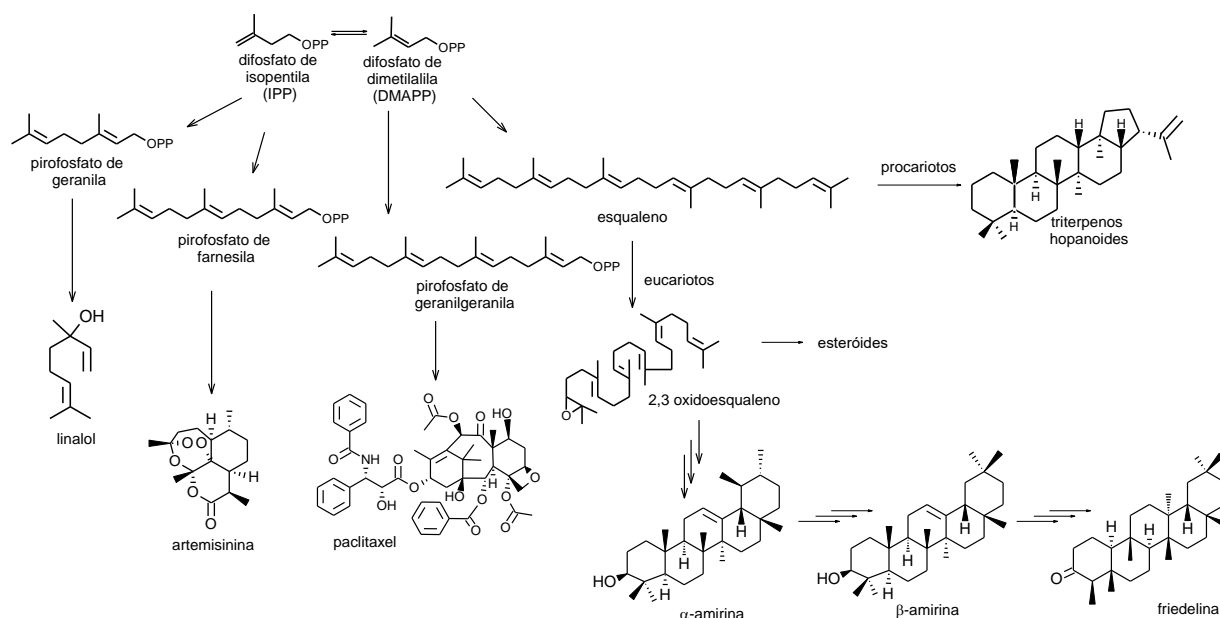
A artemisinina, é um fármaco antimalárico que fornece o tratamento contra as formas parasitárias resistentes a cloroquina e outras formas parasitárias multirresistentes do *Plasmodium sp.* O baixo teor de artemisinina em *Artemisia annua* torna o fármaco, relativamente caro para as pessoas de baixa renda. Além disso, sua complexidade estrutural faz com que sua síntese química seja cara e inviável (ABDIN e ALAM, 2015). Desta forma, foram feitos vários estudos para produzir artemisinina utilizando sistemas heterólogos, como leveduras (PADDON, et al., 2013), bactérias (ANTHONY, et al., 2009) e outras plantas, como por exemplo *Cichorium intybus L.* (chicória) (KRAKER, et al., 2003).

Diante do exposto, fica claro que a engenharia metabólica vem se tornando uma importante ferramenta para a produção de uma gama de substâncias de interesse comercial e biológico, especialmente por apresentar uma alternativa a uma produção sustentável de substâncias úteis a sociedade.

1.2. Terpenóides

Terpenos são substâncias que fazem parte de uma diversificada classe de metabolitos secundários derivados dos isoprenóides (C_5H_8). Podem ser classificados em diferentes grupos, de acordo com o número de unidades de isopreno, incluindo os monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos) e os triterpenos (30 carbonos) (PAPADA et al., 2017). Representam um grupo diversificado de metabólitos secundários presentes em plantas, organismos marinhos, microrganismos etc. São utilizados como aditivos alimentares, fragrâncias, aromas e são considerados promissores agentes farmacológicos, o que têm atraído à atenção da indústria farmacêutica (PAPADA et al., 2017) (Figura 2, p.25).

Figura 2: Vias biossintéticas que levam a produção dos esqueletos terpênicos.

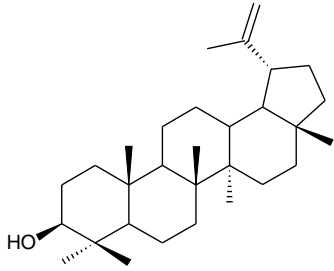
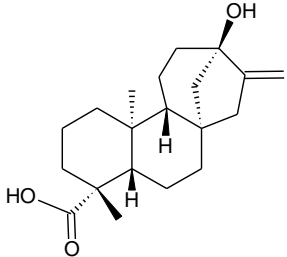
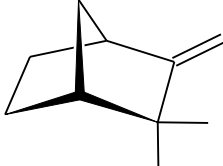
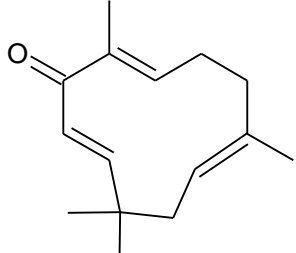


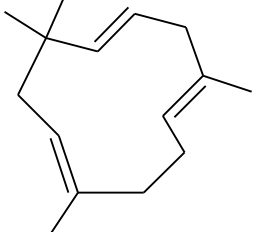
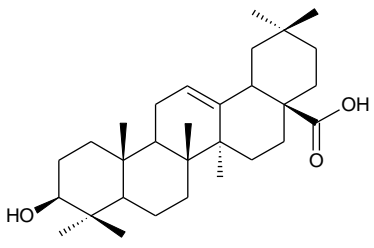
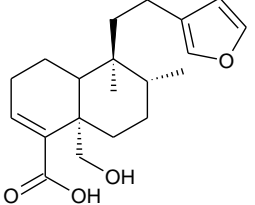
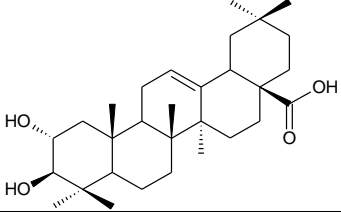
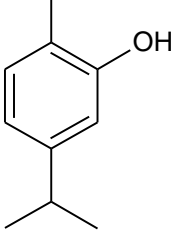
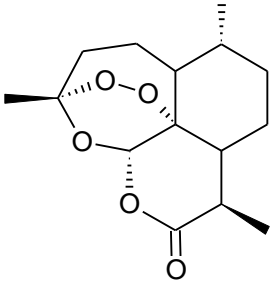
Recentemente, foi mostrado que o esteviol presente nas folhas de *Stevia rebaudiana*, e usado como adoçante natural, mostrou potente inibição de células cancerígenas gastrointestinais (CHEN et al., 2018). O óleo essencial de *Cheilocostus speciosus* com destaque para o canfeno, zerumbona e α -humuleno têm um potencial promissor como inseticidas com toxicidade reduzida em vertebrados não alvos. (BENELLI et al., 2018). Há também relatos dos monoterpenos carvacrol, timol, mentol, geraniol, e triterpenos ácido maslínico, ácido ursólico e ácido oleanólico que em ação conjunta a antibióticos potencializam seus efeitos (ZACCHINO et al., 2017), além de se mostrarem eficientes contra os sintomas de artrite (CARVALHO et al., 2019) (Tabela 1, p. 26). Além disso, estudos mostraram que o triterpeno lupeol

apresentou ação contra artrite, anti-inflamatória, antimutagênica e antimalárica *in vitro* e *in vivo*, além de efeito quimiopreventivo e quimioterápico contra uma variedade de cânceres como o melanoma, próstata e colorretal (TARAPORE et al., 2013).

Diante dos dados apresentados, fica claro que os estudos dos terpenóides têm contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas, entretanto é interessante desenvolver novas estratégias que permitam a produção destes metabolitos em quantidades apreciáveis, de uma forma mais eficiente e limpa. O desenvolvimento da engenharia genética favorece essas estratégias.

Tabela 1: Estruturas químicas e atividades biológicas de alguns terpenos.

Substância	Estrutura química	Atividade biológica	Referência
lupeol (<i>Aloe vera</i>)		anti-inflamatória, anti-artrítica, atividade antimutagênica e antimalárica e antitumoral	TARAPORE, et al., 2013
esteviol (<i>Stevia rebaudiana</i>)		antitumoral	CHEN, et al., 2018
canfeno (<i>Cheilocostus speciosus</i>)		inseticida	BENELLI, et al., 2018
zerumbona (<i>Cheilocostus speciosus</i>)		inseticida	BENELLI, et al., 2018

<p>α-humuleno (<i>Cheilocostus speciosus</i>)</p>		<p>inseticida</p>	<p>BENELLI, et al., 2018</p>
<p>ácido oleanólico (<i>Eugenia caryophyllata</i>)</p>		<p>antibacteriana, em sinergismo com gentamicina e kanamicina</p>	<p>SHIN E PARK, 2015</p>
<p>ácido hautriwaic (<i>Dodonaea viscosa</i>)</p>		<p>sintomas de artrite</p>	<p>SALINAS- SÁNCHEZ et al., 2015</p>
<p>ácido maslínico (<i>Olea europaea</i> L.)</p>		<p>sintomas de artrite</p>	<p>FUKUMITSU et al., 2016</p>
<p>carvacrol (<i>Origanum vulgare</i>)</p>		<p>doenças cardiovasculares</p>	<p>SILVA et al., 2019</p>
<p>artemisinina (<i>artemisia annua</i>)</p>		<p>malária</p>	<p>KNAEPPER, et al., 2012</p>

1.3. Biossíntese da friedelina

Friedelina é um triterpeno pentacíclico encontrado nas folhas de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida como “Espinheira Santa”, tradicionalmente usada em distúrbios estomacais (TABACH et al., 2017). Apresenta um grande potencial

medicinal e atua também como antiinflamatório, analgésico, antipirético, gastroprotetor e antibiótico, contra as bactérias não patogênicas *Mycobacterium madagascariense* e *Mycobacterium indicus pranii*, e contra a bactéria responsável pela tuberculose em bovinos, *Mycobacterium bovis* e em humanos, *Mycobacterium tuberculosis* (ABDULLAHI, et al., 2011; ANTONISAMY, et al., 2016; ANTONISAMY, et al., 2015; CHRISTOPHER, et al., 2014). Também se mostrou eficiente na redução dos níveis lipídicos em ratos hiperlipidêmicos (DURAI PANDIYAN et al., 2016). Além disso, em espécies de Celastraceae, friedelina é considerada o precursor dos triterpenos quinonametídeos, substâncias consideradas promissoras antitumorais (CORSINO et al., 2000; SUNG et al., 2010; YELANI et al., 2010; BUFFA-FILHO, et al., 2014; LIU, et al., 2015; SHARMA, et al., 2017; BARKER, et al., 2018; CEVATEMRE, et al., 2018; TANG, et al., 2018; YOUSEF, et al., 2018; YANG, et al., 2018; BICALHO et al., 2019).

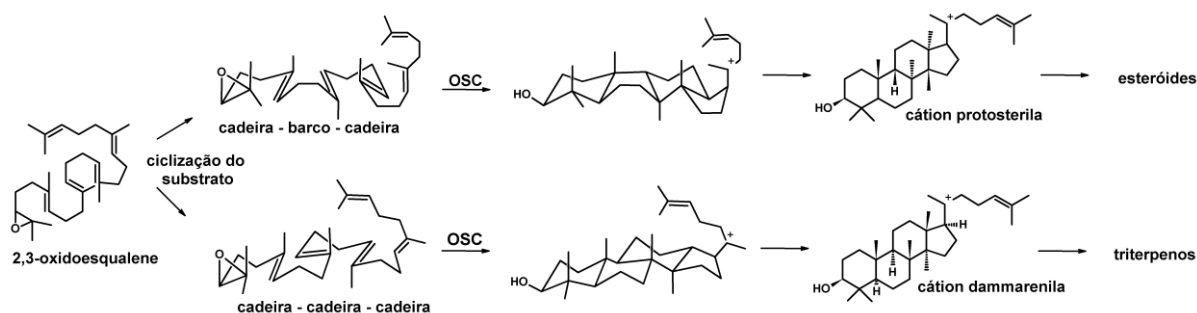
Como já descrito, a friedelina é biossintetizada a partir de blocos construtores com cinco átomos de carbono, os isoprenóides. Esses blocos, pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), são combinados para formar isoprenóides de cadeia mais longas: pirofosfato de geranila (GPP), pirofosfato de farnesila (FPP), pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) e esqualeno, precursores dos mono-, sesqui-, di-, tri-terpenos e esteroides, respectivamente (THIMMAPPA, et al., 2014) (Figura 2, p.25).

Em procariotos, o esqualeno é diretamente ciclizado a triterpenos hopanóides, enquanto que em eucariotos, é primeiramente convertido a 2,3-oxidoesqualeno e, em seguida, ciclizado produzindo cicloartenol (precursor de fitoesteróis) (WANG et al., 2010) ou triterpenos pentacíclicos em plantas, lanosterol em fungos e mamíferos, resultando em ergosterol e colesterol, respectivamente (OHYAMA et al., 2009; WANG, et al., 2010).

A ciclização do precursor 2,3-oxidoesqualeno é catalisada por enzimas denominadas oxidoesqualeno ciclases (OSCs), as quais são geralmente produto-específicas, mas competem pelo mesmo substrato para formar esteróides e triterpenos pentacíclicos, o que as torna um importante ponto de separação entre o metabolismo primário e secundário (LODEIRO et al., 2007). A conformação do substrato é uma etapa chave para a formação dos diferentes produtos. A reação de ciclização das OSCs se inicia com a protonação do substrato 2,3-oxidoesqualeno. Em seguida, ocorre seu dobramento podendo assumir a conformação cadeira-barco-

cadeira que leva a formação do cátion protosterila, o qual dá origem a esteróides (GASPASCUAL et al., 2014) ou a conformação cadeira-cadeira-cadeira levando a formação do cátion damarenila, dando origem aos diferentes esqueletos triterpênicos (XUE et al., 2012) (Figura 3, p. 29).

Figura 3: Cátions intermediários e produtos da ciclização de 2,3-oxidosqualeno por oxidoesqualeno ciclases.

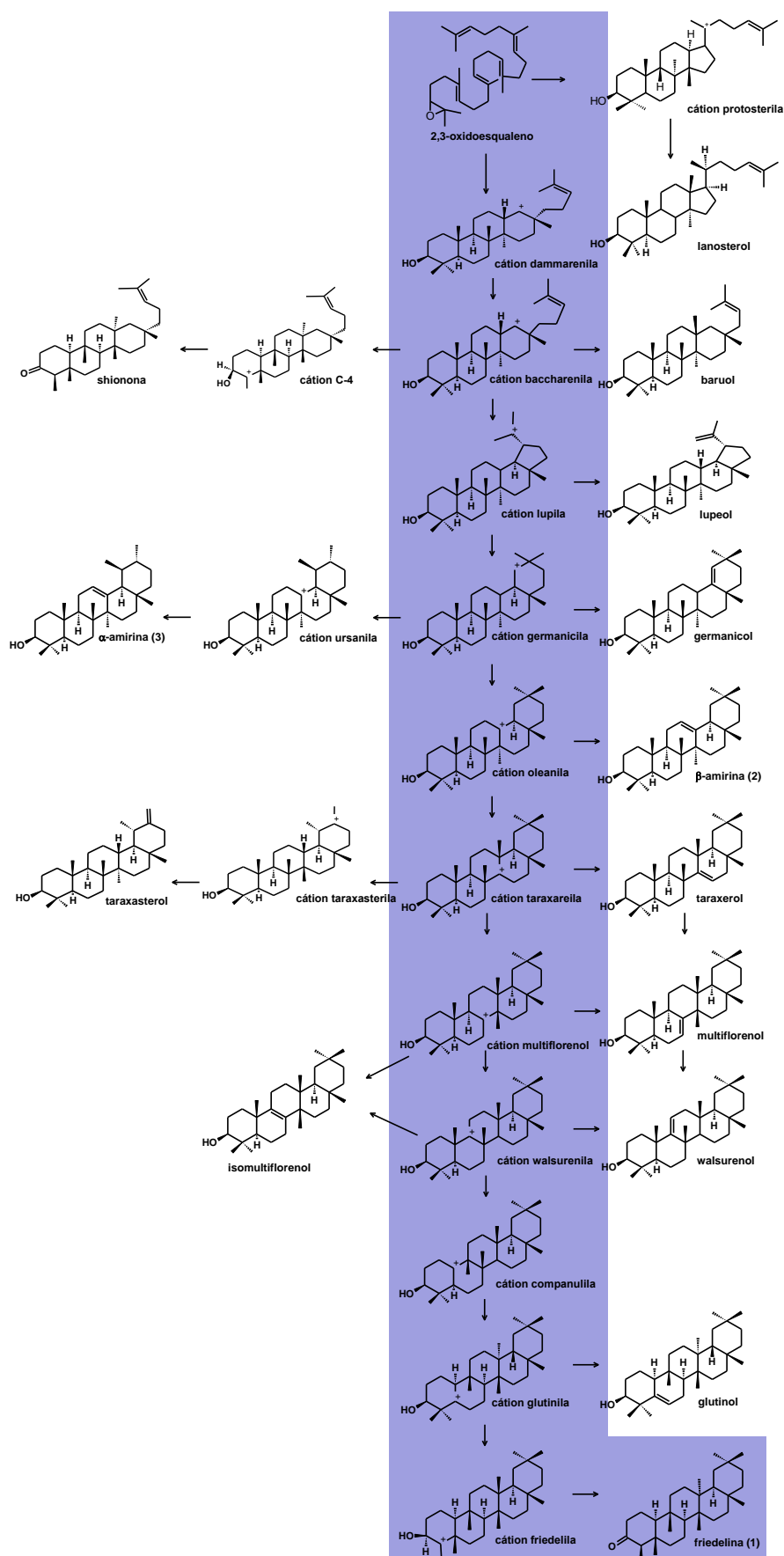


Após a formação dos cátions, ocorrem as ciclizações específicas, resultando numa cascata de reações para a formação dos esqueletos triterpênicos e esteróidicos (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016) (Figura 4, p. 30).

As enzimas oxidoesqualeno ciclases que atuam na ciclização do cátion damarenila produzem os diferentes triterpenos pentacíclicos. Importante notar que nesta via ocorre também a produção da shionona, único triterpeno tetracíclico com uma carbonila no anel A, produzido pela shionona sintase (Figura 4, p. 30).

A friedelina sintase tem capacidade de produzir a friedelina e envolve o número máximo de rearranjos na cascata de reações, com formação de uma carbonila em C-3 pela desprotonação do intermediário hidroxilado, utilizando o resíduo de aspartato que iniciou o ciclização, sem auxílio de uma enzima oxidorreductase (ABE e PRESTWICH, 1995; WANG et al., 2010) (Figura 4, p. 30).

Figura 4: Vias biossintéticas dos diferentes esqueletos triterpênicos (HAN, et al., 2019).



Com o intuito de estudar as vias metabólicas de derivados terpênicos, assim como controlar a sua produção, diversas espécies vegetais tiveram suas triterpeno sintases clonadas e expressas em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, levando à obtenção desses produtos em sistemas heterólogos (WANG, et al., 2010; ITO, et al., 2013a; KÜRTEEN, et al., 2015, SOUZA-MOREIRA, et al., 2016). Como já mencionado, a utilização desses microrganismos como sistemas heterólogos evita o extrativismo predatório, emprega menos solventes e se aproxima de práticas relacionadas a “química verde”. Portanto, a engenharia metabólica é uma ferramenta de manipulação genética que utiliza produtos renováveis e fontes de carbono baratas, permitindo assim o aumento do rendimento e produção de substâncias de interesse comercial e biológico em larga escala.

1.4. Mutações em enzimas oxidoesqualeno ciclases

Vários estudos mutagênicos foram realizados entre diferentes OSCs para avaliar a importância dos resíduos de aminoácidos envolvidos em suas atividades e especificidades catalíticas. Pequenas alterações na estrutura do sítio ativo podem alterar o rendimento do produto dessas enzimas. Dentre os exemplos, pode-se incluir os mutantes F728H da β -amirina sintase de *Euphorbia tirucalli* (EtAS), que passou a produzir germanicol como principal produto (ITO, et al., 2013b) e I481V da cicloartenol sintase, que perde sua especificidade, e passou a produzir uma mistura de cicloartenol, lanosterol e parkeol (LODEIRO et al., 2005).

Os estudos das mutações sítio dirigidas também podem melhorar a compreensão sobre resíduos de aminoácidos que são essenciais para a atividade catalítica da enzima. Como mostrado em um estudo sobre mutantes de β -amirina sintase e lupeol sintase. A mutação W259L da β -amirina sintase de *Panax ginseng*, levou à produção de lupeol e β -amirina, tendo o lupeol como principal produto (TETSUO e KAZUO, 2000). Quando a mutação foi feita na lupeol sintase (L256W) produziu predominantemente β -amirina, mostrando que o resíduo de triptofano é crucial para a produção de β -amirina, enquanto o resíduo de leucina pode desempenhar um papel importante na biossíntese do lupeol (TETSUO e KAZUO, 2000). Isso também foi mostrado no mutante S728F da β -amirina sintase de *Avena strigosa* (SAD1). A alteração da serina pela fenilalanina levou à estabilização do cátion dammarenila (Figura 3, p.29), gerando o triterpeno tetracíclico dammarano, ao

invés dos triterpenos pentacíclicos, indicando a importância do resíduo de aminoácido serina para a atividade catalítica da β -amirina sintase de *Avena strigosa* (SALMON, et al., 2016).

Em relação a todas as friedelina sintases conhecidas, foi observado um único resíduo de leucina a duas posições do sítio ativo. Estudos de mutagênese com friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (MIFRS) e *Tripterygium wilfordii* (TwOSC1) comprovaram a influência da leucina na especificidade da atividade das enzimas que produzem friedelina e β -amirina ou apenas β -amirina, dependendo do resíduo trocado (SOUZA-MOREIRA et al., 2016; ZHOU, et al., 2019). Entretanto, outro mutante da friedelina sintase (TwOSC1), que alterou treonina 502 para ácido glutâmico, foi capaz de aumentar a produção heteróloga de friedelina e não alterar sua especificidade, mostrando o potencial desses estudos para melhorar a produção de friedelina (ZHOU, et al., 2019).

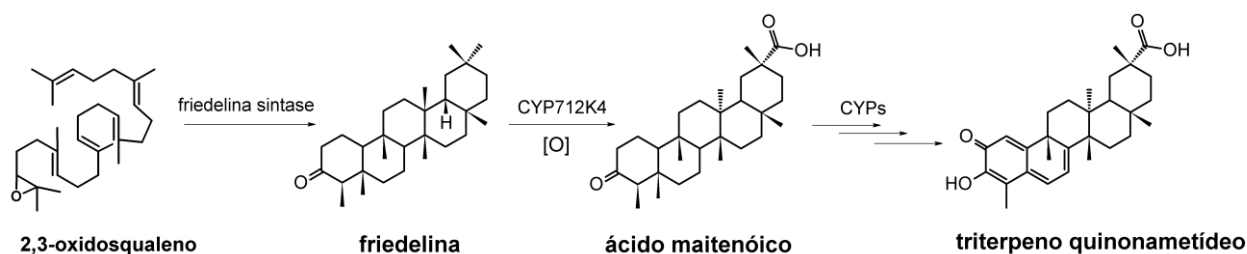
Como mencionado, a friedelina é um triterpeno pentacíclico que possui uma variedade de atividade biológica, além de ser precursora dos triterpenos quinonametideos, importantes substâncias anticancerígenas produzidas em pequena quantidade nas cascas das raízes de *M. ilicifolia* (CORSINO et al., 2000). Estudos apontam que a friedelina é biossintetizada nas folhas, translocada para as raízes e posteriormente transformada nos triterpenos quinonametideos por enzimas oxidoredutases do tipo citocromo P450 (CYPs) (CORSINO et al., 2000; BICALHO, et al., 2019).

Nosso grupo vem utilizando ferramentas de engenharia metabólica, a fim de produzir uma enzima que apresente melhores rendimentos de friedelina em *Saccharomyces cerevisiae* (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016, ALVES, et al., 2018) para que se possa dar continuidade e estudar as P450 responsáveis pelas etapas de oxidação até a produção dos triterpenos quinonametideos (BICALHO, et al., 2019).

Em trabalho anterior a sequência de MIFRS foi clonada em um plasmídeo de expressão de levedura e transformada em *S. cerevisiae* com expressão reduzida de ERG7 (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016). A lanosterol sintase compete com friedelina sintase pelo mesmo substrato, o 2,3-oxidosqualeno. Dessa forma, para melhorar a produção de friedelina, foi necessário diminuir a expressão de ERG7, o qual produz lanosterol. Isso ocorre, pois lanosterol é essencial para o metabolismo da levedura e o gene que codifica a lanosterol sintase não pode ser excluído (ALVES, et al., 2018).

A reconstituição de uma via metabólica visando à produção heteróloga de uma substância de interesse depende da identificação das enzimas responsáveis pela produção desses metabolitos. Nesse sentido, a produção de friedelina em sistema heterólogo tem sido otimizada e ferramentas de engenharia metabólica estão sendo usadas para a obtenção dos triterpenos quinonametideos em sistema heterólogo (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016; BICALHO, et al., 2019). A oxidação da friedelina a ácido maitenóico pelo CYP712K4 pode ser considerada como o segundo passo dessa via. Recentemente, Bicalho et al., (2019) caracterizou a CYP712K4, uma enzima do tipo citocromo P450 de *Maytenus ilicifolia* que catalisa a oxidação da friedelina na posição C-29, levando ao ácido maitenóico (Figura 5, p.33). Entretanto, ainda é necessária a identificação de outros genes que possam permitir a reconstituição gradual da via biossintética dos triterpenos quinonametideos e finalmente, fornecer uma fonte heteróloga de produção desses metabolitos e promover seu uso terapêutico futuro.

Figura 5: Via biossintética que leva a produção dos triterpenos quinonametideos pela oxidação da friedelina.



2. OBJETIVOS

- Otimizar a produção da enzima friedelina sintase em sistema heterólogo de *Escherichia coli* com vistas a concentrá-la;
- Realizar mutações sítio-dirigidas específicas para viabilizar o aumento da produção da friedelina e estudar os mecanismos de interação com o sítio ativo por modelagem molecular;

- Avaliar os resíduos de aminoácidos da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* envolvidos sua na especificidade, atividade e eficiência de biotransformação.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Análise quantitativa da friedelina em levedura

A produção de friedelina em *Saccharomyces cerevisiae* se torna possível, pois, a levedura converte o esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno, desta forma, a levedura produz naturalmente o substrato para a friedelina sintase, tornando possível a produção desse metabolito em sistema heterólogo (Figura 2, p.25).

Primeiramente foi realizado um estudo quantitativo da produção de friedelina nas linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* VZL 1303 (*MATa*, Δ *ura3*, Δ *his3*, Δ *leu2*, *ERG7-kan*) expressando friedelina sintase selvagem (pYES-*MIFRS*). Esses dados foram comparados com a produção de friedelina, quando *MIFRS* foi expressa com uma sequência de seis histidinas, na região N-terminal (pYES-6xHis-*MIFRS*) e na região C-terminal (pYES-*MIFRS*-6xHis). Esses estudos foram realizados no laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara.

O início dos estudos se deu com a incubação de 5 mL de um pré-inóculo em meio SC-URA (base nitrogenada de levedura sem adição de aminoácidos - YNB, 6,7 g/L; pó composto de aminoácidos com ausência de uracila, 2 g/L; glicose 20%) e deixados *overnight*, sob agitação constante, a 30 °C. Em seguida foi incubado um segundo pré-inóculo, adicionando 5 mL do primeiro a 25 mL do meio SC-URA, *overnight*, sob agitação, a 30 °C. Após o tempo de crescimento foi medida a densidade óptica (D.O.) em 600 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU-800). Para a leitura dilui-se 100 µL da cultura em 900 µL de água Milli-Q na cubeta. Em seguida realizou-se o seguinte cálculo:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 : leitura do espectro x10 (devido a diluição na hora da leitura)

V_1 : volume a ser calculado

C_2 : D.O._{600 nm} inicial = 0,1

V_2 : volume de incubação: 50 mL

O valor da D.O. foi de 0,69. Desta forma, após realizados os cálculos, obtivemos um valor de V_1 igual a 700 μL , relativo ao volume de pré-inóculo para preparo de um inóculo de 50 mL a 0,1 para indução da expressão de friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (MFRS). As células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm, 5 min) e lavadas com tampão fosfato salino (PBS) para ressuspensão em 50 mL de meio SC-URA contendo apenas rafinose 2% como fonte de açúcar. O inóculo foi incubado a 30 °C, 220 rpm até atingir D.O. de 0,6, quando, então, foram adicionados 5 mL de galactose 20% para indução da expressão da sequência heteróloga por 10 h nas mesmas condições. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min e ressuspensas em solução de KH_2PO_4 0,1 M, pH 7,2 contendo 3% de glicose, sendo novamente incubadas a 30 °C por 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, lavadas com PBS e congeladas a -80 °C por 24 horas e liofilizadas.

3.1.1. Extração de friedelina biossintetizada no sistema heterólogo (*S. cerevisiae*).

Inicialmente as células congeladas foram liofilizadas. Após a liofilização, a massa de células secas (Tabela 2, p. 36) foi transferida para tubos de vidro de borossilicato (Pyrex, 16x100 mm), e então adicionados 7 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1, v/v) para extração dos triterpenos utilizando ultrassom (Elmasonic S30H, ELMA) por 10 minutos. Seguiu-se pela adição de NaCl 0,73%, e separação das fases. A fase orgânica foi coletada e ressuspensa em acetonitrila para posterior análise cromatográfica por CG-EM (Fluxograma 1, p. 36), como descrito no item 2.1.3.

Fluxograma 1: Procedimento geral de extração da friedelina do sistema heterólogo (*Saccharomyces cerevisiae*).

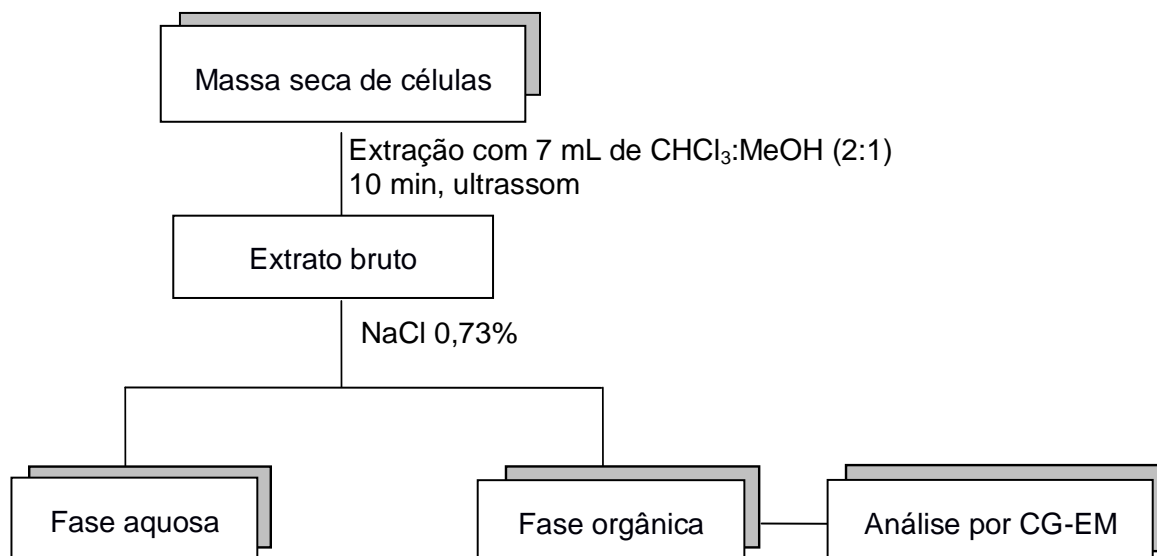


Tabela 2: Massa seca das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* expressando friedelina sintase selvagem (pYES-MiFRS) e expressando com uma sequência de seis histidinas, na região N-terminal (pYES-6xHis-MiFRS) e C-terminal (pYES-MiFRS-6xHis).

Amostra	Massa seca de células (g)	Massa extrato bruto (g)	Rendimento (%)
pYES-MiFRS -1	$3,2 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-3}$	0,50
pYES-MiFRS -2	$3,5 \times 10^{-1}$	$2,0 \times 10^{-3}$	0,57
pYES-MiFRS -3	$3,7 \times 10^{-1}$	$2,2 \times 10^{-3}$	0,59
pYES-6xHis-MiFRS -1	$4,1 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-3}$	0,78
pYES-6xHis-MiFRS -2	$3,9 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^{-3}$	0,54
pYES-6xHis-MiFRS -3	$3,6 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-3}$	0,78
pYES-MiFRS-6xHis -1	$3,5 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^{-3}$	0,83
pYES-MiFRS-6xHis -2	$3,3 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-3}$	0,91
pYES-MiFRS-6xHis -3	$5,6 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-3}$	0,57

3.1.2. Curva analítica.

A curva de calibração foi realizada utilizando o padrão comercial da friedelina (SIGMA-ALDRICH®) com grau de pureza de 97%. A identificação da friedelina nas amostras analisadas foi determinada com base no tempo de retenção nas mesmas condições cromatográficas em que padrão foi analisado (aproximadamente 21,100 minutos).

Para a análise quantitativa foi preparada uma solução estoque da substância padrão, a friedelina, na concentração de 1 mg/mL. A partir dessa solução, diluições sucessivas foram feitas para preparar as soluções nas concentrações necessárias para a construção da curva analítica pelo método do padrão externo. As concentrações para as quais foi obtida esta curva foram: 5,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL; volume de injeção de 1 µL cada, e com tempo de aquisição de dados de 30 min. Posteriormente, as amostras também foram analisadas em uma concentração de 1 mg/mL, empregando-se a mesma metodologia. O tratamento estatístico dos dados para a obtenção da curva analítica envolveu a determinação da equação da reta de regressão linear e do coeficiente de correlação utilizando o software EXCEL®, 2016. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.1.3. Análise dos produtos gerados.

As frações extraídas das células de *S. cerevisiae* que expressam heterologicamente a sequência de 6 histidinas (6xHis), na região N-terminal de *MFRS* (pYES-6xHis-*MFRS*), na região C-terminal (pYES-*MFRS*-6xHis) e a sequência selvagem de *MFRS* (pYES-*MFRS*) foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As amostras secas foram ressuspendidas em 200 µL de acetonitrila. A análise cromatográfica foi realizada por CG-EM (SHIMADZU, QP2020C W/O RP230V) com coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent Technologies). Temperatura do injetor: 270° C; rampa de aquecimento de 200 a 290° C (10° C/min); temperatura do trap: 200° C por 3 min; temperatura da interface: 290 °C por 18 min; volume de injeção: 1 µL, com modo de injeção do tipo Split: 1:10; fluxo do gás de arraste 1,0 mL/min; tempo total de análise de 30 min, relação massa/carga m/z de 35 a 600.

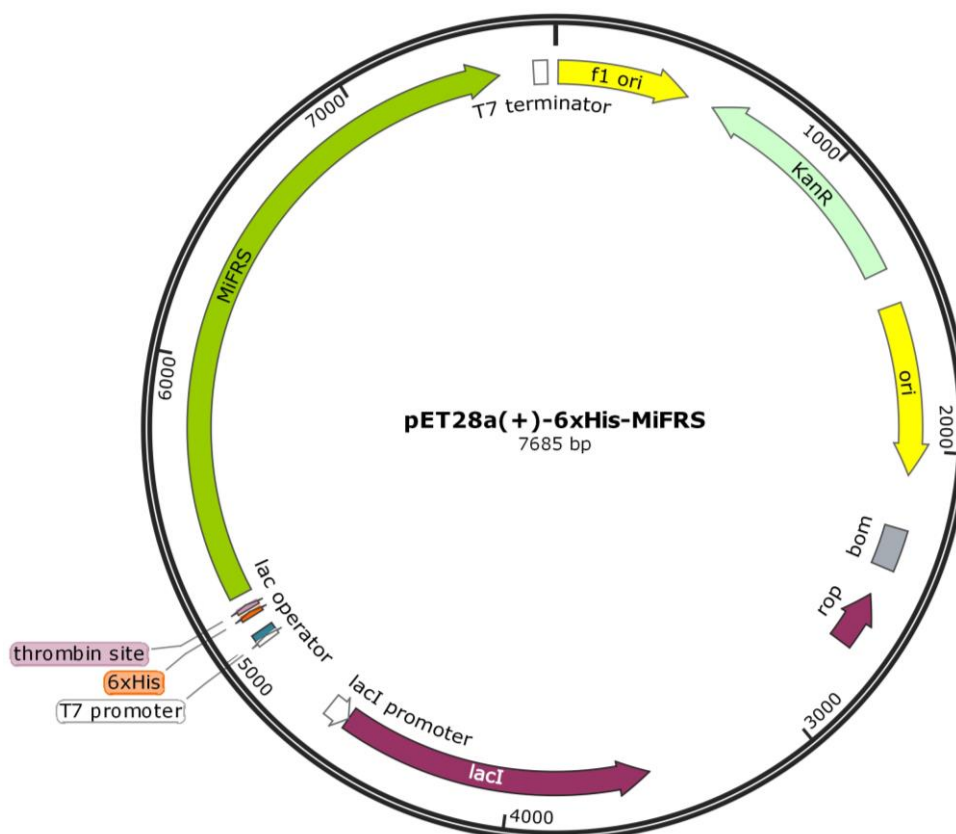
3.2. Produção de friedelina sintase

3.2.1. Teste de indução.

Esses estudos foram realizados no laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara. A sequência de friedelina sintase clonada de *Maytenus ilicifolia* (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016) foi subclonada para o vetor plasmidial pET28a(+) (Figura 6, p. 38). O plasmídeo foi então transformado na linhagem de *Escherichia coli* Rosetta por meio de eletroporação e os clones positivos foram selecionados em meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL).

A produção de friedelina sintase em *Escherichia coli* se torna possível, pois, a bactéria passa a expressar o gene da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*, levando a sua obtenção em sistema heterólogo. Entretanto, esse sistema não é capaz de produzir friedelina, já que *E. coli* não produz o substrato 2,3-oxidoesqualeno, usado para a produção de friedelina (Figura 2, p.25).

Figura 6. Mapa do plasmídeo pET28a(+)-6xHis-MiFRS.



A fim de otimizar as condições de indução na produção de *MFRS* na linhagem de *E. coli* Rosetta foram avaliados o tempo de indução e a concentração de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), necessários para melhorar a produção de friedelina sintase.

Os estudos se iniciaram com a preparação de um pré-inóculo da linhagem bacteriana, contendo o plasmídeo com o gene heterólogo, o qual foi preparado em 5 mL do meio de cultura 2YT (triptona, 16 g/L; extrato de levedura, 10 g/L; NaCl 5 g/L), com adição dos mesmos antibióticos descritos acima e incubado *overnight* a 37 °C, 180 rpm. Em seguida, foi medida a densidade óptica (D.O.) a 600 nm no espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU-800) para diluição do pré-inóculo a uma densidade final de 0,07 em seis frascos contendo 10 mL de meio 2YT com canamicina e cloranfenicol. O inóculo foi mantido a 37 °C, 180 rpm por 3 horas, até D.O._{600 nm} de 0,6, e então, foi adicionado as seguintes concentrações de IPTG: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mM para a indução da expressão. O frasco sem adição de IPTG foi usado como controle negativo. Os meios foram novamente incubados a 37 °C, 180 rpm. A cada 1, 3, 6 e 24 horas eram coletados 1 mL de cada frasco. As células foram centrifugadas (18000 rpm, 50 min, centrífuga Eppendorf 5417 R), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de PBS gelado. Em seguida foi lisado por meio de sonicação como descrito no item 2.2.3 e analisado por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (ALEMDAR, et al, 2015).

3.2.2. Crescimento das células

A purificação de *MFRS* teve início com a preparação de 20 mL do meio de cultura 2YT com adição dos antibióticos canamicina e cloranfenicol e incubado *overnight* a 37 °C, 180 rpm. Em seguida, foi medida a densidade óptica (D.O.) a 600 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU-800) para diluição do pré-inóculo a uma densidade final de 0,07 em 1 L de meio 2YT com os mesmos antibióticos. O inóculo foi mantido 37 °C, 180 rpm por 3 horas, até D.O._{600 nm} de 0,6, e então, adicionado IPTG 0,25 mM. Em seguida, as células foram incubadas novamente a 37 °C, 180 rpm por 6 horas. Após o tempo de incubação, as células foram coletadas por centrifugação (10000 rpm, 10 min, Centrífuga Beckman-Coulter Avanti J25), e transferidas para tubos de 50 mL tarados. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 10 mL de PBS gelado, pesado e guardado no freezer a - 80 °C.

3.2.3. Lise das células

O *pellet* congelado foi ressuspenso em 22,32 mL (3 mL/g em relação à massa úmida do *pellet*) de tampão de lise (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5; inibidor de protease PLAC (pepstatina $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL; leupeptina $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL; aprotinina $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL; antipaina $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL e chimostatina $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL)). O *pellet* foi então lisado duas vezes por meio de sonicação (sonicador SONICS Vibra-Cell) por 2 min, amplitude: 60%, pulso: 4,4 s ligado, 9,9 s desligado. O lisado foi centrifugado a 18000 xg, 4 °C, por 45 minutos (Centrífuga Beckman-Coulter Avanti J25) e o sobrenadante contendo a fração solúvel foi descartado. O *pellet* foi solubilizado com tampão de solubilização (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5; 0,2% TritonX-100 e 20 mM de imidazol) e incubado por 1 hora a 4 °C sob agitação. Em seguida a solução foi novamente centrifugada por 50 minutos, a 18000 xg, 4 °C e o sobrenadante foi transferido para a coluna de afinidade (KÜRTEEN, et al., 2015).

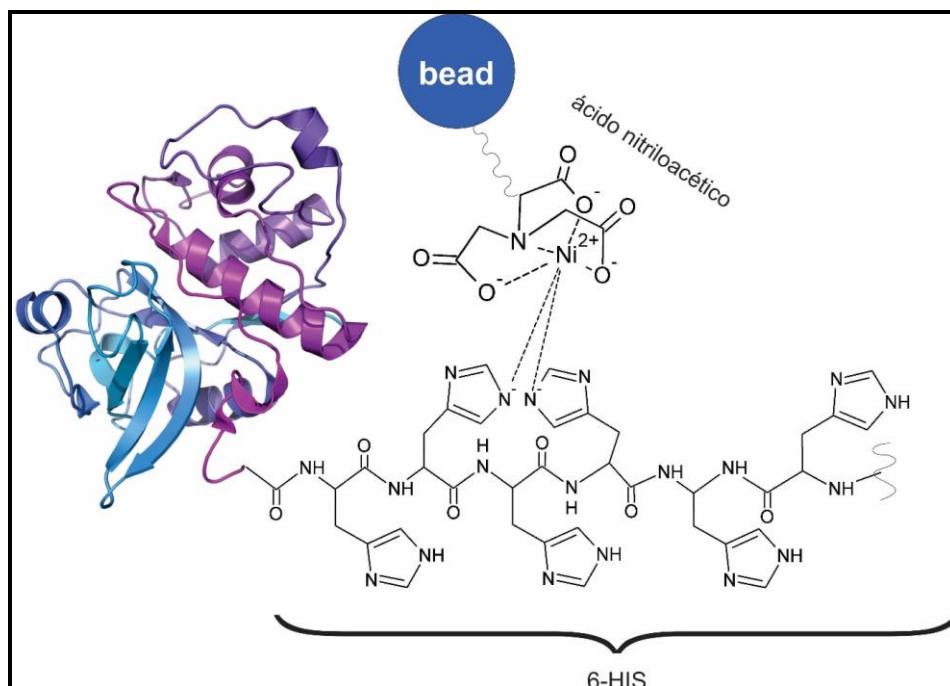
3.3. Purificação da proteína

Para a purificação de friedelina sintase (*MiFRS*) foram necessários dois procedimentos cromatográficos: afinidade e troca iônica, já que a purificação apenas por afinidade apresentou impurezas. A purificação foi monitorada por gel de eletroforese SDS-PAGE 10% em cada etapa. Para minimizar os efeitos de degradação da proteína, todas as etapas foram realizadas a baixa temperatura (3 °C), utilizando banho de gelo e aparelhos refrigerados.

3.3.1. Cromatografia por afinidade

A primeira etapa de purificação escolhida foi a cromatografia por afinidade, a qual separa as proteínas de acordo com sua afinidade por um ligante específico (FUJI, et al., 2016). A friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (*MiFRS*) foi expressa com uma fusão de seis histidinas, denominado cauda de histidina, a qual confere a enzima afinidade por íons bivalentes carregados positivamente. A resina utilizada neste processo possui uma matriz de íons níquel ligados a agarose, Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) (Qiagen) (Figura 7, p. 41).

Figura 7: Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA.

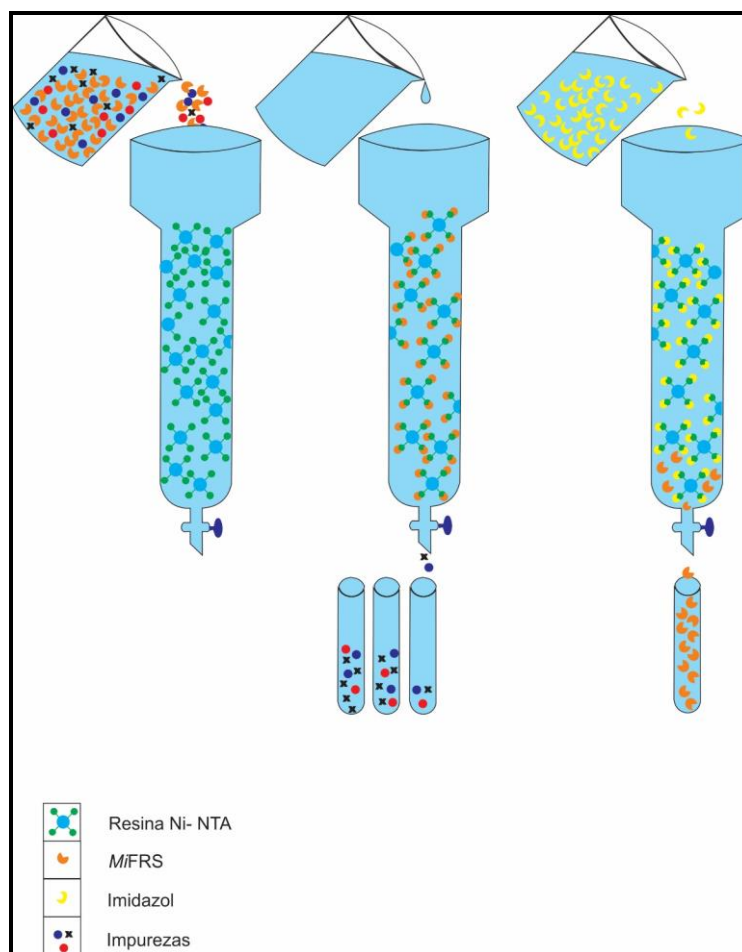


Fonte: Bruna F. Mazzeu

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 5 VC (volumes de coluna) com o tampão de lavagem (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5; 20 mM imidazol, 0,2% TritonX-100 e qsp de H_2O). Em seguida, a solução com o extrato proteico foi adicionada à coluna (1 mL de resina/g *pellet*) e condicionada a 4 °C por 1 hora. Após o tempo de incubação, a coluna foi lavada com 5 VC de tampão de lavagem para eliminar as proteínas não ligadas à resina. A lavagem foi monitorada com a leitura da absorbância a 280 nm até a leitura ser igual a zero, para garantir que todas as proteínas não específicas fossem removidas.

A proteína *MFRS* foi eluída da coluna com tampão de eluição (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5; 500 mM imidazol, 0,2% TritonX-100 e qsp de H_2O) e coletada, conforme mostrado na Figura 8 (p.42). Posteriormente, o excesso de imidazol foi retirado por diálise e a solução foi concentrada em um concentrador com membrana de corte para proteínas menores de 30 KDa (Amicon Ultra Centrifugal Filters com Ultracel 30K- EMD Millipore) por meio de centrifugação a 5000 rpm por 10 min (ITO, et al., 2013a).

Figura 8: Esquema da purificação de *MFRS* por cromatografia de afinidade.



Fonte: Bruna F. Mazzeu

3.3.2. Diálise

A diálise é um procedimento que separa proteínas de solventes com alta concentração de sal, utilizando o maior tamanho das proteínas como fator determinante. A proteína foi colocada em uma membrana semipermeável (Spectra/Por®, MWCO: 12-14.000), suspensa em 2 L de solução tamponada (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5; 20 mM KCl; 1 mM DTT, 10% glicerol e qsp de H_2O) e deixada *overnight*.

3.3.3. Cromatografia por troca iônica

A segunda etapa de purificação de *MFRS* foi realizada por cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna HiTrap DEAE FF Sepharose (GE Healthcare) de 1 mL. A matriz da coluna é um polímero sintético que contém grupos carregados ligados a ela, que podem ser grupos aniônicos (trocadores catiônicos) ou catiônicos

(trocadores aniônicos). Escolheu-se uma coluna com trocadores aniônicos, já que a proteína estudada tem pI teórico 6,9 (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016) e está em pH 7,5, desta forma apresenta carga negativa.

Inicialmente, a coluna foi eluída com 20 mL de H₂O Milli-Q para retirar o etanol 20% armazenado. Em seguida a coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão de lavagem (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7,5; 50 mM KCl e qsp de H₂O) e a solução contendo a fração enriquecida com *MFRS*, obtida na primeira etapa de purificação foi adicionada à coluna. A coluna foi lavada com 10 mL de tampão de lavagem para eliminar as proteínas que não interagem com os grupos catiônicos e em seguida adicionou-se mais 10 mL de tampão de eluição (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5; 1 M KCl e qsp de H₂O). Posteriormente, a solução foi submetida a diálise *overnight*, como descrito no item 2.3.2 e novamente concentrada. A quantificação de *MFRS* foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

3.3.4. Determinação de pureza e confirmação da obtenção de *MFRS*

Primeiramente, a pureza da amostra de proteína concentrada foi avaliada por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). A análise por *Western Blotting* da mesma amostra foi realizada para confirmar a presença de *MFRS* contendo uma cauda de 6xhistidinas. Foi utilizado um anticorpo que detecta a cauda de histidina que está fusionada na proteína estudada.

Foram aplicados 30 µL da amostra em tampão de carregamento 6x concentrado (glicerol 60%, azul de bromofenol 0,15%, xileno cianol 0,15% e TE pH 8,0 q.s.p.) em SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970). Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese a 100 V. O gel de empilhamento foi constituído de 5,0 mL de tampão Tris 1 M, pH 6,8; 0,67 mL de acrilamida 30%, 0,04 mL de SDS 10%, 4 µL de Temed, 0,04 mL de persulfato de amônio 10% dissolvidos em 0,5 mL de 2,7 mL de H₂O. O gel de separação foi caracterizado por uma solução de tampão Tris 1,5 M, pH 8,8; 6,7 mL de acrilamida 30%, 0,2 mL de SDS 10%, 8 µL de temed, 0,2 mL de persulfato de amônio 10% e 7,9 mL de H₂O.

Utilizou-se como tampão de corrida uma solução composta por Tris 250 Mm; glicina 2,5 M, pH= 8,3 e SDS 1%. Um gel foi então submetido a revelação das proteínas com o corante Coomassie Blue, por 30 min e posterior descoramento com solução de ácido acético 10% e etanol 45% (v/v).

A eletrotransferência semi-seca das proteínas para a membrana de nitrocelulose 45 µm foi realizada durante 30 minutos a 20 V, com tampão de transferência (Tris 25 mM - Glicina 192 mM (pH 8,3), contendo 20% (v/v) de metanol) em transfer-blot modelo SD Semi-Dry Transfer Cell marca Bio-Rad.

Concluída essa etapa, a membrana foi corada com Poceau (Poceau 50 mg, ácido acético glacial 5% e 50 mL de água Milli-Q) para avaliação da eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 30 minutos com uma solução 10% de leite em PBS-T (NaCl 1,4M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 0,1M, KH₂PO₄ 18mM e Tween[®]20 0,5%). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-histidina (1:20000; camundongo, Sigma-Aldrich [®]) a 4 °C, *overnight*. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 10 min e então realizou-se a incubação por 45 minutos com o anticorpo secundário anti-camundongo (1:5000; produzido em coelho, Sigma-Aldrich [®]), seguido de lavagens como descrito anteriormente. Procedeu-se, então, a revelação por quimioluminescência com luminol e peróxido de hidrogênio utilizando o reagente Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, UK), seguindo o protocolo do fabricante.

3.4. Estudo mutagênico de *MiFRS*

Os estudos mutagênicos foram realizados em colaboração com o professor doutor Cleslei Fernando Zanelli, do laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara. A troca dos aminoácidos foi orientada tanto pela comparação com outras OSCs, quanto pela similaridade entre os aminoácidos de acordo com a matriz de substituição *BLOSUM62* (Blocks Substitution Matrix). Essa matriz busca regiões muito conservadas de famílias de proteínas e exibe a frequência relativa de aminoácidos e as suas probabilidades de substituição a partir do banco de dados BLOCKS.

3.4.1. Reações de mutagênese sítio-dirigida

As reações de mutagênese foram realizadas pela mestra Melissa Remlinger. A PCR para troca dos resíduos de interesse foi realizada usando o plasmídeo [pSP_P_{TEF1}-MiFRS-6xHis, P_{PGK1}-tHMG1_URA3, 2µ] como DNA modelo e a enzima Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase, sendo conduzida, separadamente, uma

reação de polimerização com o *primer forward* e outra com o *reverse* (Tabela 3, p. 45), contendo os seguintes reagentes: 1,0 µL de DNA plasmidial (500 ng/µL); 5,0 µL de tampão (5X); 0,25 µL MgCl₂ (25 mM); 0,75 µL dNTPs (10 mM); 0,8 µM de *primer*; 0,3 µL da enzima polimerase (2 U/µL); e água q.s.p. volume final de 25 µL. A reação foi conduzida nas seguintes condições: *hotstart* de 98 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento a temperatura com subtração de 15 °C da temperatura de anelamento de cada *primer* por 30 s e polimerização a 72 °C por 5 min e um ciclo final de polimerização a 72 °C por 5 min. Após a PCR, os 20 µL do produto de cada reação sintetizados separadamente foram reunidos em um mesmo microtubo, elevando a temperatura da solução a 98 °C. Após o anelamento entre as fitas foi realizado pela redução gradativa de 1 °C/ min até 90 °C e depois, redução de 10 °C/min até 37 °C (EDELHEIT et al., 2009).

Tabela 3 - Lista com os *primers forward* e *reverse* para cada reação de mutação sítio-dirigida.

Primer	Sequência 5'-3'	T_m (° C)
C369Pf (VZO2349)	GATACATCACAATCGGT <u>CCAGTT</u> GAAAAAGCTTTATG	60,5
C369Pr (VZO2350)	CATAAAGCTTTTTCAACT <u>GGACCG</u> ATTGTGATGTATC	60,5
F473Wf (VZO2355)	CAAGGGTAGTTGGACAT <u>GGTCCG</u> ATCAAGACCACGG	67,1
F473Wr (VZO2356)	CCGTGGTCTTGATCGGAC <u>CCATGT</u> CCAACCTACCCTTG	67,1
M549Sf (VZO2361)	GATGGAAATGTTGAACCCAT <u>CTIGA</u> ATTCTTGGAAAACATCG	62,8
M549Sr (VZO2362)	CGATGTTTTCCAAGAATTC <u>AGATGG</u> GTTCAACATTTCCATC	62,8
L552Fr (VZO2364)	GATGACGATGTTTTCA <u>AGAATT</u> CCATTGGG	58,5

A região sublinhada indica as bases do respectivo resíduo de aminoácido a sofrer mutação.

As letras f e r nos *primers* correspondem a *forward* e *reverse*, respectivamente.

O DNA plasmidial molde de cada mutação foi digerido com 1 μ L da enzima *DpnI* (20 U/ μ L), em uma reação contendo o produto de anelamento das PCRs e 5 μ L de tampão CutSmart (New England Biolabs) e a digestão foi incubada *overnight* a 37^o C. O DNA plasmidial resultante foi transformado em *E. coli* competente, pelo método de choque térmico. Desta forma, preparou-se uma solução de 10 mL de Transfobuffer, ou seja, 1,0 mL de KCM 10X (1 M KCl; 0,3 M CaCl₂; 0,5 M MgCl₂), 1,5 mL de polietilenoglicol 3350 (PEG) 10% e 7,5 mL de água esterilizada. Desta solução, foram utilizados 80 μ L e adicionados 20 μ L do produto plasmidial em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e adicionados 100 μ L de *E. coli* competente. A mistura foi incubada por 30 min em um banho de gelo. Em seguida, o tubo foi colocado em banho-maria a 42 °C por 2 min. Em uma etapa posterior, foi adicionado 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) ao tubo, o qual foi incubado por 1 h a 37 °C com agitação de 200 rpm. Ao final da incubação, o produto da transformação foi centrifugado a velocidade máxima por 1 min, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido em 200 μ L de água esterilizada e foi plaqueado em meio de cultura sólido LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), o qual foi e incubado a 37 °C por 12-16 h. Após crescimento das colônias, cinco foram utilizadas para confirmação dos mutantes obtidos de friedelina sintase.

As colônias foram incubadas em meio LB com ampicilina, o plasmídeo foi obtido utilizando o kit Five-Minute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), homogeneizando 40 μ L do reagente de lise às culturas. A mistura foi deixada em descanso por 2 min enquanto a coluna de purificação foi preparada por lavagem com 500 μ L da solução de preparo da mesma. À mistura contendo o inóculo foram adicionados 400 μ L da solução de ligação e inverteu-se o tubo por 15 vezes. Todo o volume foi então colocado na coluna e centrifugado por 30 s, a velocidade máxima. O líquido que passou pela coluna foi descartado e foram adicionados 700 μ L de solução de lavagem, centrifugando-se por 20 s, a velocidade máxima. Novamente, descartou-se o líquido que passou pela coluna e foram adicionados, 200 μ L da solução de lavagem centrifugando-se a coluna por 30 s, a velocidade máxima. A coluna foi colocada em um tubo novo e foram adicionados e centrifugados 40 μ L da solução de eluição. A quantificação do DNA plasmidial eluído foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), observando-se a razão de qualidade entre os comprimentos de onda 260/280 entre 1,8 a 2,0.

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para a reação de sequenciamento das diferentes mutações estão apresentados na Tabela 4 (p.47). As condições de amplificação foram: *hot start* de 96° C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96° C por 10 s, 43° C por 5 s, 60° C por 4 min e extensão final de 60° C por 5 min. Em seguida à amplificação, as amostras foram purificadas com o kit Big Dye[®] X Terminator[™] Purification Kit (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento automático foi realizado com 20 µL de cada amostra no sequenciador GeneticAnalyzer 3130 (Applied Biosystems). A confirmação de cada mutação foi feita por alinhamento com a sequência selvagem de friedelina sintase utilizando a ferramenta de alinhamento global Clustal Omega.

Tabela 4 - Lista com os *primers forward* usados no sequenciamento para cada reação de mutação sítio-dirigida.

Primer	Sequência 5'-3'	Mutações verificadas
369/484seq (VZO2372)	GGGACTCTTTGTATGTTGCATC	C369P, F473W,
534/612seq (VZO2373)	GTTGCTTGTTAGCTGCAACC	M549S, L552F,
MiseqR (VZO2377)	AATGTCCAACCTACCTTGG	C369P

3.4.2. Transformação dos mutantes em levedura

Após a confirmação das mutações, os plasmídeos foram transformados nas linhagens *S. cerevisiae* CEN.PK113-5D VZL1434 (*MATa MAL2-8c SUC2 ura3-52 P_{ERG7}::P_{KEX2}*) pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (SHEN, et al., 2006). A transformação foi realizada a partir de um inóculo *overnight* da linhagem de *S. cerevisiae* em 3 mL de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% glicose). As células crescidas *overnight* foram recuperadas por centrifugação na velocidade máxima por 1 min, ressuspendidas em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e incubados por 15 min a 30 °C. As células foram novamente centrifugadas por 10 s na velocidade máxima e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* formado foram misturados os seguintes reagentes: 240 µL de PEG a 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 50 µL de solução de fita simples de DNA de esperma de salmão (2,0 mg/mL), 5 µL

do plasmídeo com a mutação (em torno de 2 µg) e, 20 µL de água esterilizada. As suspensões foram incubadas por 30 min, sob agitação, a 30 °C. Posteriormente, foi realizado o choque térmico por 10 min a 42° C. Ao término da incubação, as células transformadas foram centrifugadas, o sobrenadante removido e o *pellet* ressuspenso em 200 µL de água esterilizada. Este volume foi então plaqueado em meio sintético completo (0,67% de base para levedura nitrogenada sem adição de aminoácidos - YNB, e 2% de glicose) suplementado com aminoácidos, bases e ácido *p*-aminobenzoico, sem adição de uracila (SC-URA) e colocado em estufa de crescimento a 30 °C por 2 a 4 dias.

3.4.3. Expressão heteróloga dos mutantes de *MFRS* em *S. cerevisiae*

Inicialmente, foram realizados pré-inóculos, separadamente, de uma colônia de cada levedura contendo o vetor vazio como controle negativo, a sequência selvagem de *MFRS* e as sequências mutadas em 5 mL de SC-URA, sob agitação constante a 30°C, *overnight*. Posteriormente, os inóculos foram diluídos para uma densidade óptica a 600 nm inicial de 0,05 em 50 mL de meio mínimo de Delft (0,75% de sulfato de amônio, 1,44% de fosfato monobásico de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio heptaidratado, 2% de glicose, 0,2% de solução contendo traços de metais: 1,5% de EDTA, 0,045% sulfato de zinco heptaidratado, 0,1% de cloreto de manganês II, 0,03% de cloreto de cobalto II hexaidratado, 0,03% de sulfato de cobre II pentaidratado, 0,05% de molibdato de sódio diidratado, 0,045% de cloreto de cálcio diidratado, 0,03% de sulfato de ferro II heptaidratado, 0,01% de ácido bórico, 0,01 % de iodeto de potássio; e, 0,1% de solução de vitaminas: 0,005% de biotina, 0,02% de ácido paminobenzoico, 0,1% de ácido nicotínico, 0,1% de ácido pantotênico, 0,1% de piridoxina-HCl, 0,1% de tiamina-HCl e 2,5% mio-inositol) (VERDUYN et al., 1992).

A incubação foi realizada a 30 °C, por 72 h, a 200 rpm. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 min em tubos tarados de 50 mL e lavadas com 10 mL de tampão fosfato salino (PBS). As células foram congeladas em ultrafreezer a -80 °C por 24 h e depois submetidas a liofilização. Os produtos gerados foram extraídos com hexano e clorofórmio e analisados por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas. A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (SHIMADZU, QP2020C W/O RP230V) com coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm;

Agilent Technologies). Temperatura do injetor: 270° C; rampa de aquecimento de 200 a 290° C (10° C/min); temperatura do trap: 200° C por 3 min; temperatura da interface: 290 °C por 18 min; volume de injeção: 1 µL, com modo de injeção do tipo Split: 1:10; fluxo do gás de arraste 1,0 mL/min; tempo total de análise de 30 min, relação massa/carga (m/z) de 35 a 600.

3.4.4. Extração das substâncias biossintetizadas no sistema heterólogo (*S. cerevisiae*).

As células congeladas foram liofilizadas. A massa seca (Tabela 5, p. 51) foi transferida para tubos de vidro de borossilicato (Pyrex, 16x100 mm) para posterior extração com solventes orgânicos. Para tanto, o material seco foi submetido à extração por ultrassom (Elmasonic S30H, ELMA) por 15 minutos (três extrações com 5mL), utilizando os solventes hexano e clorofórmio. Todas as extrações foram feitas em triplicata. As frações hexânica e clorofórmica de cada amostra foram analisadas por CG-EM, como descrito no item anterior. (Fluxograma 2, p. 50).

Fluxograma 2: Procedimento geral para extração dos triterpenos produzidos heterologamente nas linhagens modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

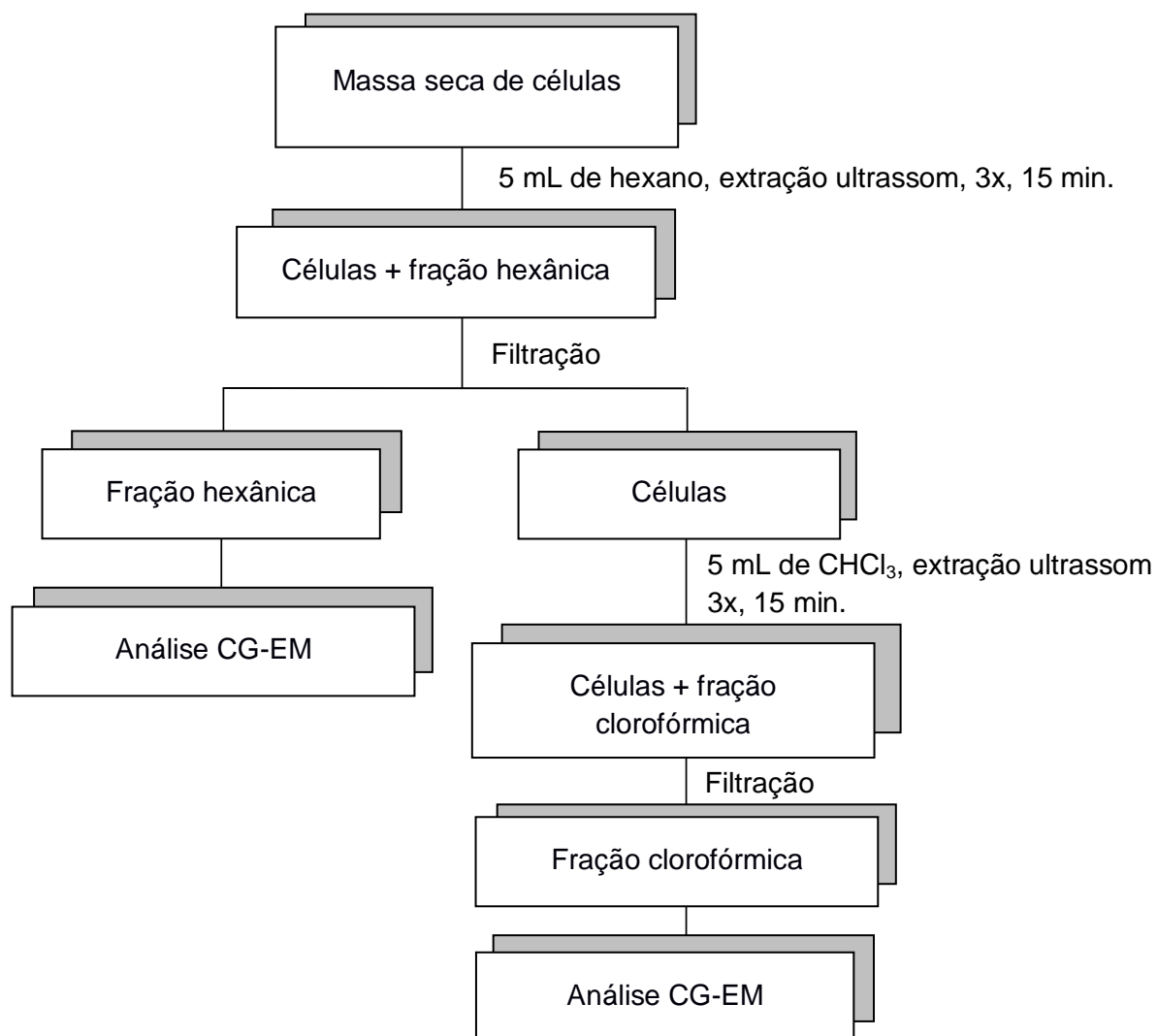


Tabela 5: Massa seca das células e extratos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* expressando friedelina sintase selvagem (MIFRS) e expressando as sequencias dos mutantes. Análise feita em triplicata.

Amostra	Massa seca de células (g)	Massa extrato hexânico (g)	Rendimento (%)	Massa extrato clorofórmico (g)	Rendimento (%)
MIFRS -1	$3,5 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-3}$	0,43	$1,2 \times 10^{-3}$	0,34
MIFRS-2	$3,8 \times 10^{-1}$	$8,0 \times 10^{-4}$	0,21	$6,0 \times 10^{-4}$	0,16
MIFRS-3	$4,4 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-3}$	0,52	$1,6 \times 10^{-3}$	0,36
C369P-1	$3,6 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-3}$	0,42	$1,6 \times 10^{-3}$	0,44
C369P-2	$2,9 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-3}$	0,55	$1,3 \times 10^{-3}$	0,45
C369P-3	$3,3 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-3}$	0,45	$1,3 \times 10^{-3}$	0,39
F473W-1	$6,5 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-3}$	0,78	$8,0 \times 10^{-4}$	0,12
F473W-2	$6,3 \times 10^{-1}$	$4,9 \times 10^{-3}$	0,78	$1,9 \times 10^{-3}$	0,30
F473W-3	$5,6 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-3}$	0,66	$1,9 \times 10^{-3}$	0,34
L552F-1	$5,1 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-3}$	0,58	$1,7 \times 10^{-3}$	0,33
L552F-2	$4,8 \times 10^{-1}$	$4,0 \times 10^{-3}$	0,83	$2,0 \times 10^{-3}$	0,42
L552F-3	$5,5 \times 10^{-1}$	$4,5 \times 10^{-3}$	0,82	$1,9 \times 10^{-3}$	0,34
M459S-1	$5,2 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-3}$	0,92	$1,8 \times 10^{-3}$	0,35
M459S-2	$6,5 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-3}$	0,35	$1,0 \times 10^{-3}$	0,15
M459S-3	$6,9 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-3}$	0,40	$2,1 \times 10^{-3}$	0,30

3.4.5. Curva analítica.

A curva de calibração foi realizada com friedelina comercial SIGMA-ALDRICH® purificada por cromatografia em coluna, como descrito no item 3.4.5.1. A identificação da friedelina nas amostras analisadas foi determinada com base no tempo de retenção e no espectro de massas.

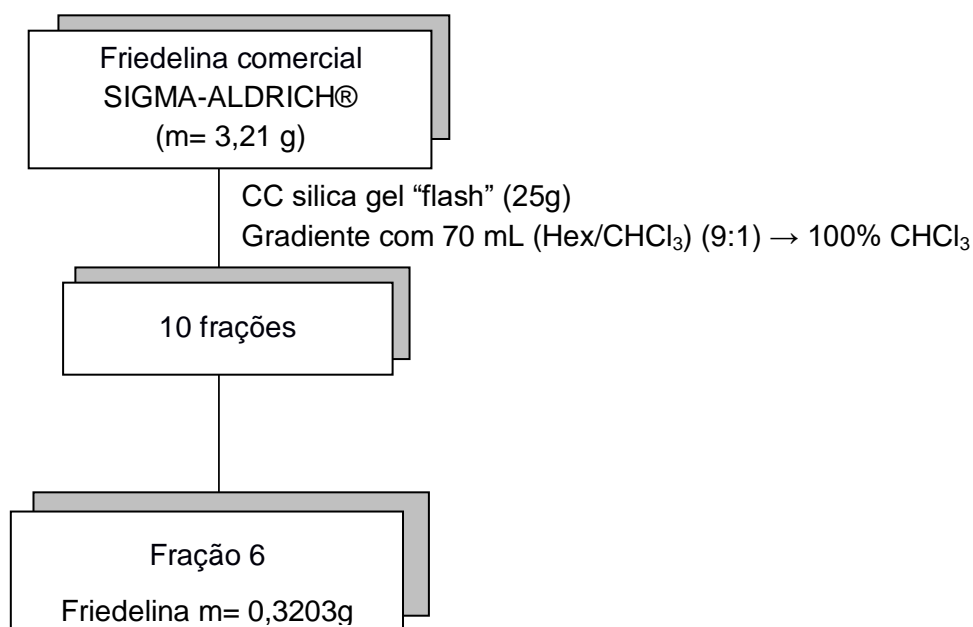
A análise quantitativa se iniciou com a preparação de uma solução estoque da substância padrão, a friedelina, na concentração de 1 mg/mL. A partir dessa solução, diluições sucessivas foram feitas para preparar as soluções nas concentrações necessárias para a construção da curva analítica. O colesterol foi utilizado como padrão interno na concentração de 50 µg/mL. As concentrações para as quais foi obtida a curva foram: 15,62; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 µg/mL; as soluções foram preparadas em quintuplicata, com volume de injeção de 1 µL cada, e com tempo de aquisição de dados de 30 min. Posteriormente, as amostras também foram analisadas em uma concentração de 1 mg/mL, empregando-se a mesma metodologia. O tratamento estatístico dos dados para a obtenção da curva analítica

envolveu a determinação da equação da reta de regressão linear e do coeficiente de correlação utilizando o software EXCEL[®], 2016.

3.4.5.1. Purificação da friedelina

A fração enriquecida com friedelina comercial SIGMA-ALDRICH[®] (3,21 g) foi submetida à purificação por cromatografia em coluna, utilizando sílica flash (25 g) e um sistema gradiente da fase móvel Hex:CHCl₃, em ordem crescente de polaridade. A friedelina foi obtida pura na fração 6 (0,3203 g) (Fluxograma 3, p. 52).

Fluxograma 3: Procedimento experimental para purificação de friedelina.



3.4.6. Análise dos produtos gerados.

As amostras da curva analítica e as substâncias extraídas das células de *S. cerevisiae* foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As amostras secas foram ressuspensas em 200 µL de CHCl₃. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (SHIMADZU, QP2020C W/O RP230V), com uma coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent Technologies). Temperatura do injetor: 270° C; rampa de aquecimento de 200 a 290° C (10° C/min); temperatura do trap: 200° C por 3 min; temperatura da interface: 290 °C por 18 min; volume de injeção: 1 µL, com

modo de injeção do tipo Split: 1:10; fluxo do gás de arraste 1,0 mL/min; tempo total de análise de 30 min, relação massa/carga m/z de 35 a 600.

3.4.7. Estudos de modelagem molecular.

Os estudos de modelagem molecular foram realizados em colaboração com o Dr. Andrew A. Oliveira, sob a supervisão do Profº Drº Rafael V. C. Guido (Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP).

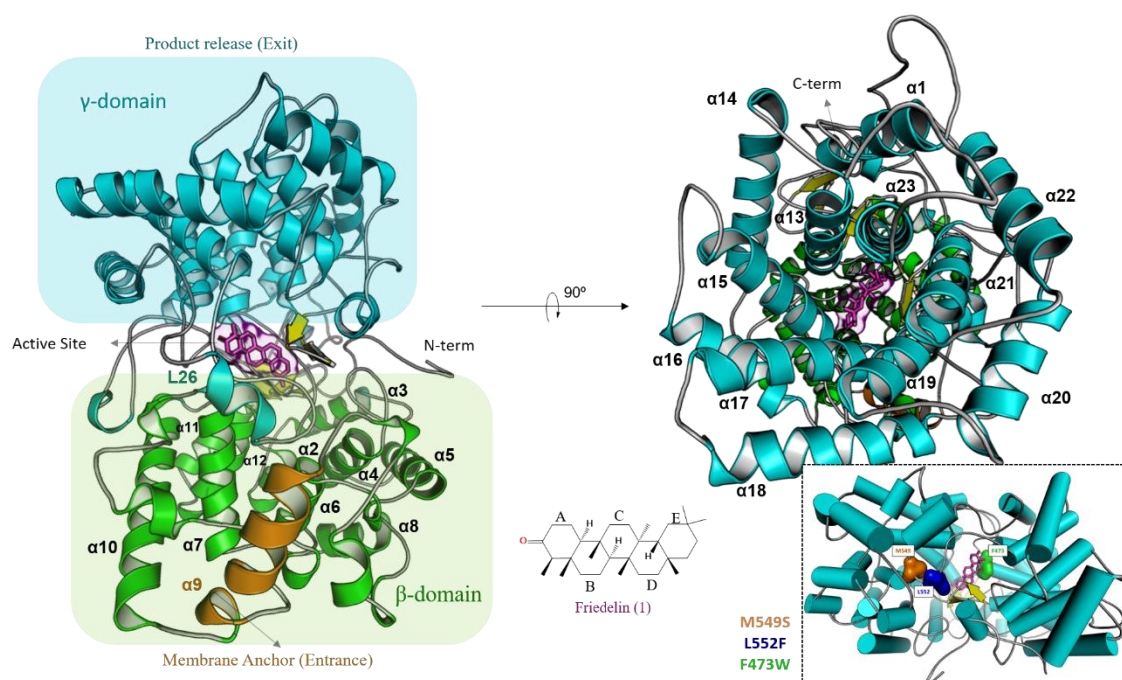
Os modelos foram construídos seguindo a metodologia de modelagem por homologia do programa Modeller (SALI e BLUNDELL, 1993; JOHNSON, et al., 1994; SHEN e SALI, 2006;). A interface ViTAMIn foi empregada como auxílio no desenvolvimento dos modelos e mutações. A sequência primária da proteína friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (MFERS) foi extraída do banco GenBank sob o código KX147270. A busca por homólogos resultou na identidade sequencial de 41 % com a enzima oxidosqualeno ciclase de *Homo sapiens*. As mutações foram geradas manualmente. Após a modelagem molecular, os melhores modelos foram selecionados com base nos diagrama de Ramachandran e DOPE de energia. Os alinhamentos das estruturas secundárias indicaram elevada similaridade estrutural (r.m.s.d < 0.2 Å).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Friedelina sintase

A friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* é formada por 23 alfa hélices, originando a topologia apresentada na Figura 9 (p.54), subdividida em dois domínios α/α conhecidos como $\beta\gamma$, similarmente encontrados no complexo de proteínas G beta-gama. Essa proteína de membrana monotópica se conecta a estrutura de bicamada por uma alfa-hélice ($\alpha 9$), onde ocorre a entrada do substrato. Após reorganizar o barril interno α/α no domínio β , o canal de solvente formado ao longo da estrutura de 65 Å de diâmetro conduz o substrato ao sítio ativo localizado entre os domínios. Cada domínio α/α é conectado por um segmento do tipo I β , pequenas curvas e voltas estendidas, considerando a região N-/C-terminal das estruturas secundárias que circundam o centro da interface das subunidades e fecham o sítio da reação.

Figura 9: Modelo *in silico* da enzima friedelina sintase de *M. ilicifolia* (MFRS). A representação da estrutura secundária mostra os domínios α/α conhecidos como proteína $\beta\gamma$. A hélice $\alpha 9$ se aproxima da bicamada lipídica que origina o substrato. Por outro lado, o domínio γ processa e libera o produto friedelina. Horizontalmente ao N-terminal está organizado o sítio ativo, criado na interface entre os domínios γ e β . Especificamente, alças flexíveis e três pinos β dão movimento e polaridade para a produção do substrato.



O domínio β compreende um barril alfa-alfa responsável pelo início da reação de ciclização após a protonação do cátion friedelila previamente dobrado pelo resíduo de aspartato, na posição 484, no motivo conservado DCTAE (Figura 10, p. 55). Observando o sítio catalítico, a região compreende uma tríade de segmentos β e a flexibilidade dada por essas alças permite o rearranjo do substrato dentro do sítio catalítico.

Na figura 9 (p. 54), a alça L26 é a entrada do sítio catalítico, enquanto as alças L18 e L23 pertencem à mesma cavidade, na extremidade oposta. A liberdade conformacional é assegurada exclusivamente ao L26, que é orientada na direção do solvente.

Figura 10: Alinhamento entre as sequências primárias das oxidoesqualeno ciclases. Em destaque o motivo conservado DCTAE.

PSY	469	KGSWTFSDQDHGWQVSDCTAELKCCLLIS-LIPPEIVGEKMEPERLFDSVNLILLSIQ--
GgbAS1	469	KGSWTFSDQDHGWQVSDCTAELKCCLLIS-MIPPEIVGEKMEPERLYDSVNVLLSIQ--
PNY1	470	KGSWTFSDQDHGWQVSDCTAELKCCLLIFS-TMPEEIVGKIKKPERLYDSVNVLLSIQ--
KdFRS	469	KGAWTFSDQDHGWQVSDCTAELKCCLLIFS-LMQPEVVGEMPPERLYDSVNVLLYLIQ--
LUP1	467	KGAWTFSDRDHGWQVSDCTAELKCCLLIS-MMSADIVGQKIDDEQLYDSVNLILLSIQ--
MiFRS	468	KGSWTFSDQDHGWQVSDCTAELKCCLLAA-TMPEELVGEKLDPOWIFESVNIILLSIQE-
OEW	467	KGAWTFSMQDHGWQVSDCTAELKAAALLIFS-QMPEELVGAETETGHLVDVNVILILIQ--
TRW	469	KGAWTFSIQDHGWQVSDCTAELKVSLLYS-QMNPKEVGEKVEIETGHLVDVNVILSIQ--
Erg7pS288c	440	KGAWGFSTKTQGYTVADCTAEAIKAIIMVKNSPVFSEVHHMISSEERLFEGLDVLNLIQNI

4.2. Análise quantitativa da friedelina em levedura

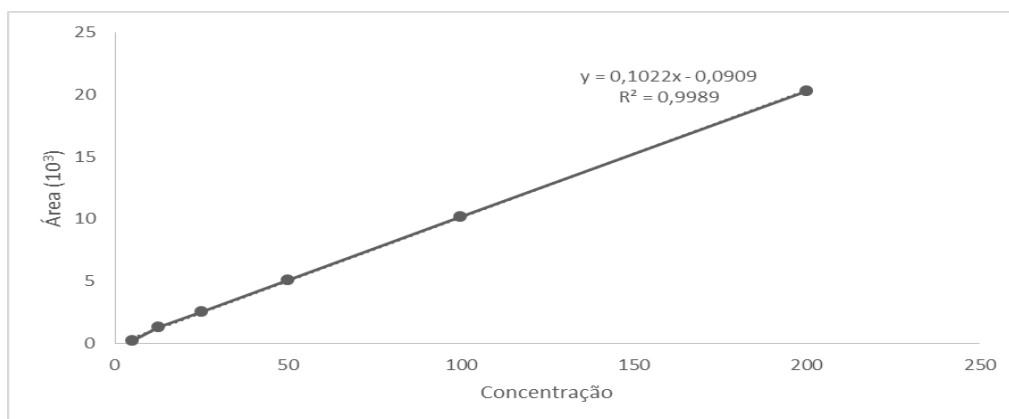
A purificação de uma enzima produzida em um sistema heterólogo se torna possível quando uma sequência de histidina (His-tag) é expressa junto com os genes que codificam essa enzima. Estes sistemas de *tags* conferem a enzima elevada afinidade por cátions bivalentes, pois permite a interação entre as histidinas da enzima com os cátions Ni^{2+} presentes na resina Ni-NTA usada na cromatografia por afinidade, possibilitando assim sua purificação (FUJI, et al., 2016) (Figura 7, p. 41).

Sabendo disso, friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* foi expressa com uma sequência de seis histidinas (cauda de histidina) fusionada a região N-terminal (pYES-6xHis-MFRS) e na região C-terminal (pYES-MFRS-6xHis) separadamente. Entretanto, a influência dessa modificação na funcionalidade da enzima era desconhecida. Desta forma, para avaliar a interferência da cauda de histidina na

atividade da friedelina sintase, foram analisadas as concentrações de friedelina produzidas pela levedura expressando *MfRS* fusionada a seis histidinas, na região N-terminal (pYES-6xHis-*MfRS*) e na região C-terminal (pYES-*MfRS*-6xHis). Tais análises foram comparadas com a produção de friedelina em levedura expressando *MfRS* selvagem (pYES-*MfRS*).

A curva analítica construída a partir das injeções das soluções em diferentes concentrações da substância padrão apresentou bons resultados com relação ao coeficiente de regressão linear da reta, $R^2=0,9989$, indicando que é linear entre as concentrações analisadas (Figura 11, p. 56).

Figura 11: Curva analítica da substância padrão, friedelina, obtida com as seguintes concentrações: 5,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$



Com base nos valores obtidos pela equação de regressão linear da reta ($y = 0,1022x - 0,0909$) foi possível realizar o cálculo para as respectivas concentrações de friedelina nas amostras analisadas. O cálculo foi feito pela média das áreas dos picos referentes a friedelina, produzidos pela injeção das amostras analisadas.

A partir destes resultados pode-se inferir que a cauda de histidina fusionada a proteína não interfere significativamente na atividade enzimática de *MfRS* (Tabela 6, p. 57). Desta forma, foi dado prosseguimento ao processo de purificação.

Tabela 6: Concentração de friedelina presente nos extratos brutos da levedura *S. cerevisiae*.

Amostra	Média da Área do pico	Desvio padrão	Concentração de friedelina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de friedelina (mg/L)*
pYES- <i>Mi</i> FRS-6xHis	12,11	0,038	39,83	0,239
pYES-6xHis- <i>Mi</i> FRS	17,94	0,052	58,83	0,353
pYES- <i>Mi</i> FRS	18,23	0,058	59,73	0,358

* Quantidade de friedelina em miligrama por litro de meio de cultura.

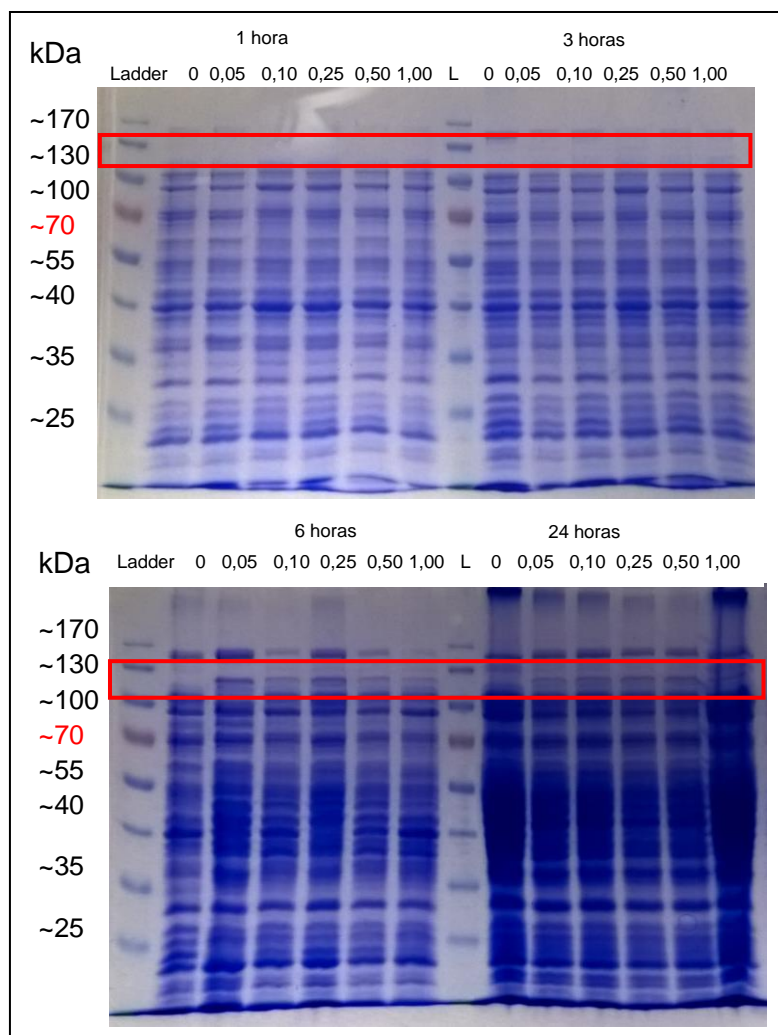
4.3. Produção de friedelina sintase

4.3.1. Teste de indução.

O gene da friedelina sintase no plasmídeo pET28a(+)-6xHis-*Mi*FRS (Figura 6, p. 38), está sob o controle do promotor lac. Desta forma o isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi utilizado para induzir o promotor lac para a síntese da friedelina sintase. A fim de se otimizar o tempo de indução e a concentração de IPTG foi avaliado a produção de friedelina sintase recombinante em *Escherichia coli* Rosetta contendo o plasmídeo pET28a(+)-6xHis-*Mi*FRS.

Foram avaliadas cinco concentrações diferentes de IPTG: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mM, além do controle, o qual não houve adição do agente indutor em quatro diferentes tempos de indução: 1, 3, 6 e 24 horas. Os géis de proteína mostram que em 1 e 3 horas de indução não houve produção significativa de proteína, enquanto que, com 6 e 24 horas, pode-se observar a presença de friedelina sintase (*Mi*FRS). Desta forma, escolheu-se trabalhar com um tempo de indução de 6 horas e a concentração de 0,25 mM de IPTG, já que com 24 horas aumenta apenas a concentração de outras proteínas (Figura 12, p. 58).

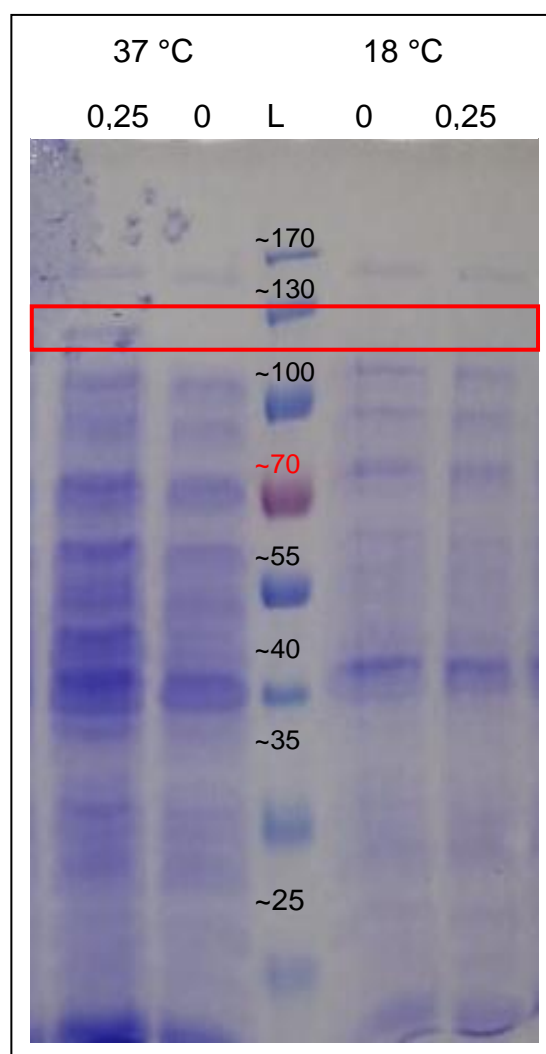
Figura 12: SDS-PAGE (10% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 37° C para o vetor pET28a(+)-6xHis-MiFRS, variando o tempo de indução: 1; 3; 6 e 24 h; e a concentração de IPTG: 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mM. Os retângulos destacam as bandas de expressão.



Em muitos casos, a expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* pode resultar em processos de dobramento incompletos, culminando no seu acúmulo nas células como agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (HUNKE e BETTON, 2003). Uma estratégia para reduzir a agregação de proteínas recombinantes consiste no seu cultivo a temperaturas reduzidas. Essa abordagem tem se mostrado eficiente em aumentar a solubilidade de um grande número de proteínas que tendem a formar corpos de inclusão, aumentando assim o seu rendimento final (GROOTA e VENTURA, 2006). Sabendo disso, para tentar aumentar o rendimento de MiFRS foi realizado a indução com IPTG a 18 °C e comparado com a indução a 37 °C. Essas análises foram realizadas após a

otimização do tempo e da concentração do agente indutor. Como pode-se observar na Figura 13 (p. 59) não houve produção da proteína a 18 °C. Dessa forma todos os experimentos de produção de *MFRS* foram realizados a 37 °C.

Figura 13: SDS-PAGE (10% poliacrilamida). Ensaios de expressão a 37° C e 18 °C para o vetor pET28a(+)-6xHis-*MFRS*, com 6 h de indução e a 0,25 mM de IPTG. Os retângulos destacam as bandas de expressão.



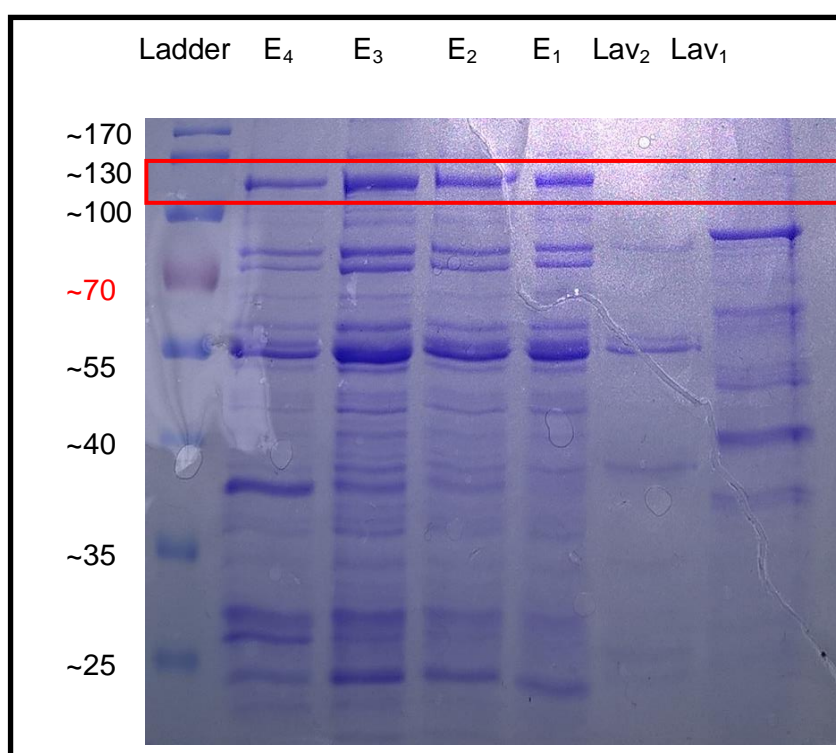
4.4. Purificação parcial da friedelina sintase

4.4.1. Cromatografia por afinidade

Os primeiros ensaios de purificação da enzima friedelina sintase foram realizados por cromatografia de afinidade, utilizando resina de Ni-NTA. A Figura 14 (p.60) mostra o gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, com as lavagens e eluições da

proteína. As lavagens foram feitas com uma concentração de imidazol de 50 mM. Como podemos observar no gel de eletroforese (Figura 14, p. 60), as lavagens retiraram alguns contaminantes, entretanto as eluições ainda apresentaram bandas intensas de outras proteínas. Friedelina sintase tem peso molecular teórico 89 KDa.

Figura 14: SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação por cromatografia de afinidade. Lav₁₋₂ são as lavagens feitas com 50 mM de imidazol e E₁₋₄ são as eluições feitas com 500 mM de imidazol. Os retângulos destacam as bandas referentes a *MFRS*.



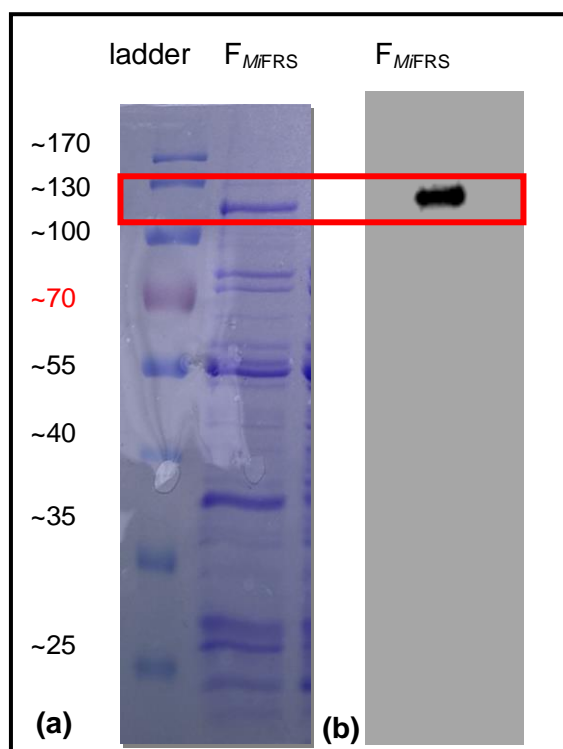
Para tentar remover os contaminantes presentes na eluição de *MFRS*, foi realizado uma segunda etapa de purificação: a cromatografia por troca iônica, a qual se baseia no *pI* e carga da proteína para separá-la dos contaminantes que apresentam *pI* e cargas diferentes.

4.4.2. Determinação da pureza e confirmação da obtenção de *MFRS*

A pureza e a presença de *MFRS* foi avaliada por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e por *Western blotting*, respectivamente. *Western blotting* é uma técnica bioquímica altamente valorizada para a identificação de proteínas e quantificação relativa em amostras complexas. Combina a separação

por eletroforese com imunoensaio para identificar proteínas específicas. Esse método é muito usado devido a alta seletividade relativa tanto à separação, quanto ao imunoensaio. Em uma transferência de *Western*, as proteínas são separadas por tamanho utilizando eletroforese em dodecil sulfato de sódio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e em seguida transferidas para uma membrana por eletro transferência, a qual é tratada com solução de bloqueio com o anticorpo primário e secundário para detectar a proteína alvo (JIN E KENNEDY, 2015).

Figura 15: Comparação entre eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blotting. **(a)** SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação de *MFRS* (F_{MFRS}) por cromatografia de afinidade. **(b)** Perfil em *Western blotting* da purificação de *MFRS* por cromatografia de afinidade.



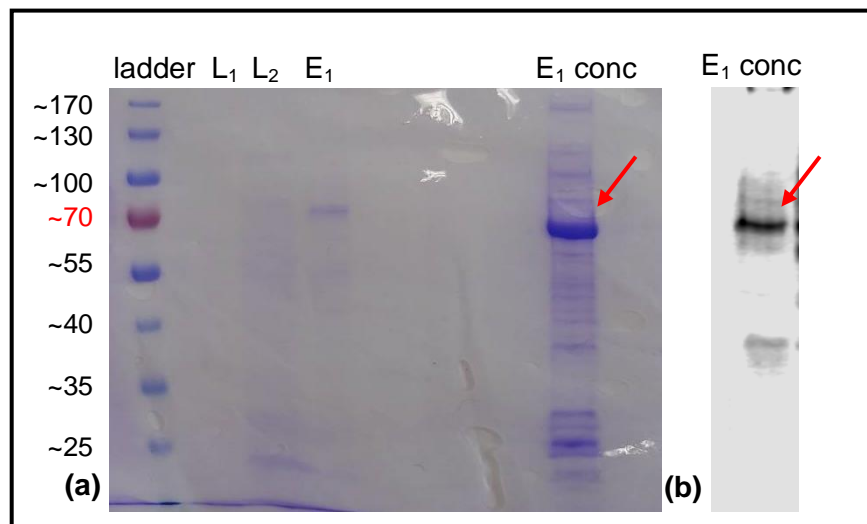
De acordo com a Figura 15 (p. 61), foi possível observar que a banda de peso molecular em torno de 110 KDa está presente na revelação com Coomassie e foi também observada pela revelação com o anticorpo anti-histidina, específico para a cauda de 6 histidinas adicionada à porção N-terminal de *MFRS* no vetor pET28a(+)-6xHis-*MFRS*. Desta forma, foi possível confirmar que a fração obtida contém a proteína de interesse.

4.4.3. Cromatografia por troca iônica

A segunda etapa de purificação de *MFRS* foi realizada por cromatografia de troca iônica. A Figura 16 (p. 63) mostra o gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, com as lavagens e eluições da proteína, que foram feitas com soluções de KCl a 50 mM e 1M, respectivamente. As lavagens L1, L2 e a eluição E1 se mostraram muito diluídas, entretanto ainda foi possível observar a banda referente a *MFRS* na eluição E₁. A amostra E₁ foi concentrada utilizando membrana de corte para 30 KDa e a proteína foi obtida com uma concentração de 1,095 mg/mL. Entretanto, como podemos observar na Figura 16 (p. 63), a amostra ainda apresenta bandas de outras proteínas. Esses contaminantes podem ser resultado da ineficácia no processo de purificação ou podem ser produtos de degradação da própria enzima.

De acordo com os resultados obtidos com a purificação por afinidade e *Western blot* esperava-se observar, na análise por SDS-PAGE, banda próxima a 110 KDa da *MFRS*. Entretanto, a banda que mais se destaca apresenta peso molecular em torno de 70 KDa. Essa banda foi confirmada com os resultados obtidos na análise por *Western blot*, que indica a presença de 6xhistidinas em *MFRS*. Isso pode indicar que friedelina sintase está sofrendo degradação entre as etapas de purificação. Essa degradação possivelmente ocorra devido a presença de proteases, já que durante esta etapa, apesar de matido temperaturas baixas, não foi usado inibidor de protases.

Figura 16: (a) SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação por cromatografia de troca iônica. L₁₋₂ são as lavagens feitas com 50 mM de KCl, E₁ a eluição feita com KCl 1 M e E₁ conc é a eluição após ser concentrada. As bandas referentes a *MFRS* estão destacadas com flechas. **(b)** Perfil em Western blotting da purificação de *MFRS* por cromatografia por troca iônica.

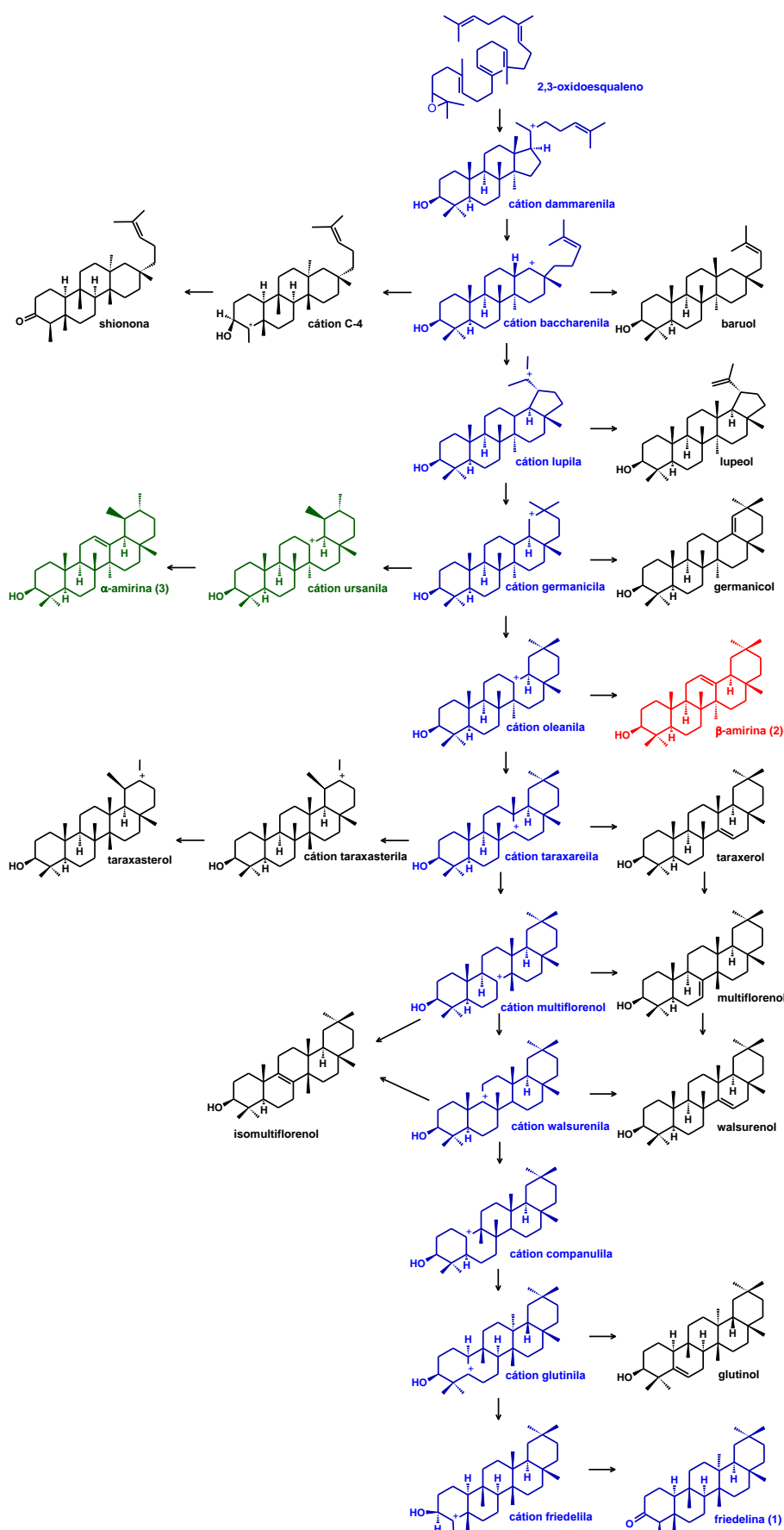


Com base nesses resultados, foram propostos novos estudos, os quais permitiriam avaliar a atividade da *MFRS* por mutações expressas em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e, assim, avançar no entendimento de sua especificidade.

4.5. Estudo mutagênico de *MFRS*

A friedelina sintase tem capacidade de produzir friedelina utilizando o número máximo de rearranjos na cascata de reações (Figura 17. p. 64). Os resíduos de aminoácidos do sitio ativo da enzima auxiliam na formação dos rearranjos até a produção do último triterpeno da cascata: friedelina. Dessa forma, a troca de aminoácidos do sitio ativo, pode levar a estabilização dos cátions intermediários antes da formação do cátion friedelila, levando a produção de outros triterpenos (Figura 17, p. 64). Além disso, a mutação também pode levar o substrato 2,3-oxidoesqualeno a formar o cátion protosterila, dando origem aos triterpenos esteroidais e impedindo a formação dos triterpenos não derivados do metabolismo celular, levando a perda de atividade enzimática (Figura 17, p.64). Assim foram avaliadas as possíveis modificações na produção de friedelina e de outro(s) triterpeno(s), causada pela mutação de quatro resíduos de aminoácidos.

Figura 17: Cascata de reações envolvida na produção de friedelina e outros triterpenos (HAN, et al., 2019).



4.5.1. Obtenção dos mutantes do sítio ativo de *MiFRS*

De forma a complementar o estudo funcional de friedelina sintase, foram realizados experimentos de mutação sitio dirigida *in vivo*. As mutações foram selecionadas (Tabela 7, p. 65) a partir da interação/acomodação dos resíduos no sítio ativo da enzima com a molécula de friedelina. Para auxiliar o estudo da especificidade da friedelina sintase, também foi realizado um alinhamento múltiplo da sequência primária de várias oxidoesqualeno ciclases depositadas no Genbank *versus* a sequência de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.

Tabela 7 - Resíduos de aminoácidos do sítio ativo da friedelina sintase selecionados para mutagênese sitio dirigida.

Resíduo	Troca	Posição	Justificativa
Cisteína (C)	Prolina (P)	369	Na lanosterol sintase, ao invés de C é P
Fenilalanina (F)	Triptofano (W)	473	Interação entre os resíduos F473 e W612
Metionina (M)	Serina (S)	549	Na lanosterol sintase ao invés de M é S
Leucina (L)	Fenilalanina (F)	552	Encaixe/acomodação do ligante no sítio ativo

4.5.1.1. Confirmação das mutações realizadas

Todas as mutações propostas foram obtidas e confirmadas por análise do alinhamento global múltiplo utilizando-se a ferramenta Clustal Omega das sequências obtidas pela reação de sequenciamento e o gene selvagem, como mostrados na Figura 18 (p.65).

Figura 18 - Alinhamento global múltiplo entre a sequência selvagem de *MiFRS* e as sequências mutadas obtidas.

A	MiFRS	121	AACACAACATGCATAAAAGCTTTTTCAACACAACCGATTGTGATGTATCTACTGTTTTCAI
	C369P	109	AACACAACATGCATAAAAGCTTTTTCAAC GG ACCGATTGTGATGTATCTACTGTTTTCAI
B	MiFRS	352	AAAGATGTTCAGACATATATCCAAGGGTAGTTGGACA TT CTCCGATCAAGACCACGGTTG
	F473W	272	AAAGATGTTCAGACATATATCCAAGGGTAGTTGGACA GG CTCCGATCAAGACCACGGTTG
C	MiFRS	299	CCGGTTGGGAACCTGTTAGAGCTGGTCAATGGATGGAAATGTTGAACCCA AT GGAATTCT
	M549S	361	CCGGTTGGGAACCTGTTAGAGCTGGTCAATGGATGGAAATGTTGAACCCA CT GGAATTCT
D	MiFRS	1	TGGAATTC TT GGAAAACATCGTCATCGAACATACATACATCGAATGTACCGGTTCCAGTA
	L552F	1	TGGAATTC TTT GAAAACATCGTCATCGAACATACATACATCGAATGTACCGGTTCCAGTA

O códon do resíduo de *MFRS* selvagem está evidenciado em cinza e a sua troca está evidenciada em vermelho. A) mutação C369P, troca de nucleotídeos ACA por TGG; B) mutação F473W, troca de nucleotídeos TTC por TGG; C) mutação M549S, troca de nucleotídeos ATG por TCT; D) mutação L552F, troca de nucleotídeos TTG por TTT;

4.5.2. Análise dos produtos triterpênicos produzidos pelos mutantes de *MFRS*

Com a confirmação das mutações dos aminoácidos selecionados, as sequências selvagens e mutantes de friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (*MFRS*, número de acesso GenBank MK526901) foram, separadamente, expressas em *Saccharomyces cerevisiae* com expressão reduzida de *ERG7*, que codifica a lanosterol sintase, a qual compete pelo precursor 2,3- oxidoesqualeno. Avaliou-se a presença de friedelina, bem como, de outros compostos não derivados do metabolismo celular.

4.5.2.1. Mutante C369P

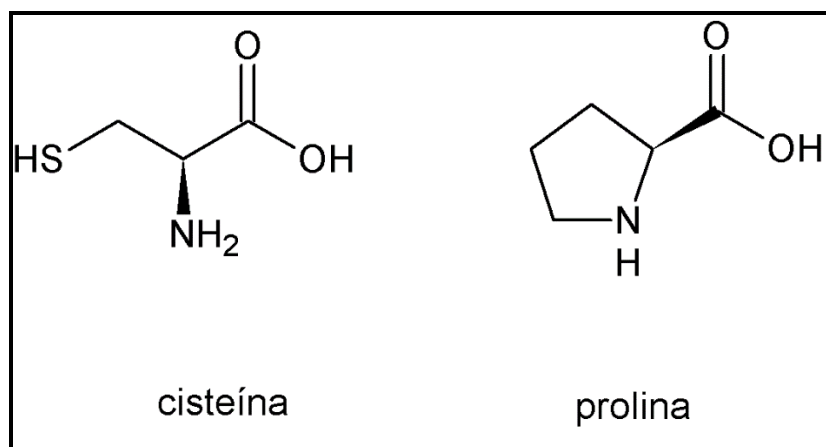
A substituição de cisteína por prolina (C369P) não produziu friedelina ou qualquer outro triterpeno (Figura 30 (d), p. 77; Tabela 8, p. 78). O resíduo de aminoácido cisteína na posição 369 é conservado em grande parte das famílias de triterpenos sintase que fornecem o cátion dammarenila como intermediário, enquanto que nas famílias de triterpenos sintase que possuem cátion protosterila como intermediário, há uma prolina nessa posição (Figura 19, p. 67).

Figura 19 - Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*. Comparação entre os resíduos na posição 369. A identificação e número de acesso estão apresentados na Tabela 1 do Anexo I.

1W6K	296	VYALNLYEHH-----HSAHQRRAVQKLYEHIVADDRFTKSSISIGPISKTTINMLVRWY
KdCAS	322	LWATLHKVVEPVLNWPQKGL-REKALCSATEHIHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWV
CAS1	321	LWASLHKIVEPVLNWPQANL-REKARTATEHIHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWV
GgCAS1	321	LWASLHKFLEPILMHWPQKGL-REMAIKTATEHIHYEDDNTRYLCIGPVNKVLNMLCCWV
OSC5	321	LWASLHKVVEPVLNWPQKGL-REKALNSVMEHIHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWV
LcIMS1	320	LWDTLYLLSEPLLTRWPFNKLIRKALNETMRHIHYEDENSRYITIGCVEKPLCMLACWV
MiFRS	323	LWDSLYVASEPLLTRWPFNKLIRKALEKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWV
LUP2	324	LWDTLHNFVEPLLTRWPLKGLVREKALRVAMEHIHYEDENSHYITIGCVEKVLCLACWV
LUP1	321	LSDTLQNFVEPLLTRWPLNKLVREKALQVTMKHIHYEDENSHYITIGCVEKVLCLACWV
KdFRS	323	IWDTLYLTTEPLLTRWPLNKLIRERALKKTMKHIHYEDENSRYIVIGAVEKVLCLACWV
KdLUS	323	LWDTLYLTTEPLLTRWPLNKLIRKRALQVTMKHIHYEDENSRYITIGCVEKVLCLACWV
EtAS	323	MWDSLYLFTTEPLLTRWPFNKLIRKALEVTMKHIHYEDENSRYITIGCVEKVLCLACWA
KdTAS	342	LWDTLYLTTEPLLTRWPFNKLIRERALKKTMKHIHYEDENSRYITIGCVEKVLCLACWV
BPY	323	LWDSLYLFTTEPLLTRWPFNKLIRKALEVTMKHIHYEDENSRYITIGCVEKVLCLACWV
AMY1	323	IWDSLYLFTTEPLLTRWPFNKLIRKALEVTMKHIHYEDENSRYLTIGCVEKVLCLACWV
OSC1	323	MWDSLYLFTTEPLLTRWPFNKLIRKALEVTMKHIHYEDENSRYITIGCVEKVLCLACWV
GgbAS1	323	IWDSLYLFTTEPLLTRWPFNKLIRKALEVTMKHIHYEDENTSRITIGCVEKVLCLACWV
TwOSC3	322	FLWDGLYVASEPLLTRWPFNKLIRKALEKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWV
TwOSC1	325	FIWDSLYVASEPLLTRWPLNKLIRKALAKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWV
PdFRS	320	LWDSLYLMSPELLTRWPFNQLVRRKALEVTMKHIHYEDENSRYITIGCVEKVLCLSCWV

A prolina é um aminoácido de baixo peso molecular, não carregado, de pouco volume, contendo em sua estrutura química uma amina secundária. O grupo α -amino está ligado diretamente à cadeia lateral, tornando o carbono α um substituinte direto da cadeia lateral (Figura 20, p. 67). Essa estrutura diferenciada dá à prolina uma característica de rigidez, podendo desestruturar a conformação α -hélice, impedindo o dobramento correto da proteína e ocultar o sítio ativo.

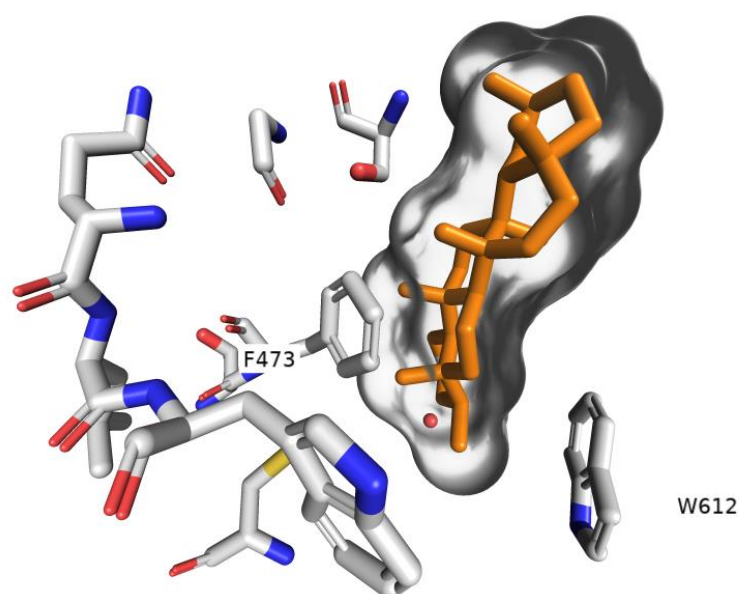
Figura 20: Estruturas químicas dos aminoácidos cisteína e prolina.



4.5.2.2. Mutante F473W

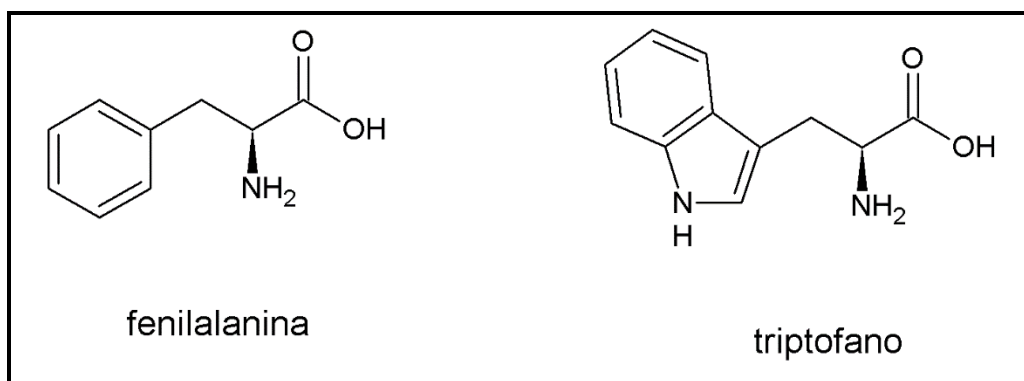
A mutação no resíduo na posição 473 foi baseada em sua conservação, posição na cavidade catalítica e possível interação com um resíduo W612 (Figura 21, p. 68). Observamos que a presença adequada de resíduos era importante para toda a atividade enzimática, uma vez que não foi observado a produção de friedelina ou outras classes de triterpeno. O mutante F473W levou a perda de atividade enzimática sem produção de triterpeno (Figura 30 (e), p. 78; Tabela 8, p. 78).

Figura 21: Interação entre os resíduos F473 e W612.



Fenilalanina e triptofano são os únicos aminoácidos aromáticos apolares (Figura 22, p. 69). A diferença entre eles é que o triptofano possui um grupo pirrol a mais em comparação à fenilalanina. Esse aumento na cadeia carbônica pode ter influenciado na acomodação do substrato 2,3-oxidosqualeno no sítio ativo da friedelina sintase, interrompendo a reação de ciclização e as produções de friedelina ou de outros triterpenos.

Figura 22: Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina e triptofano.

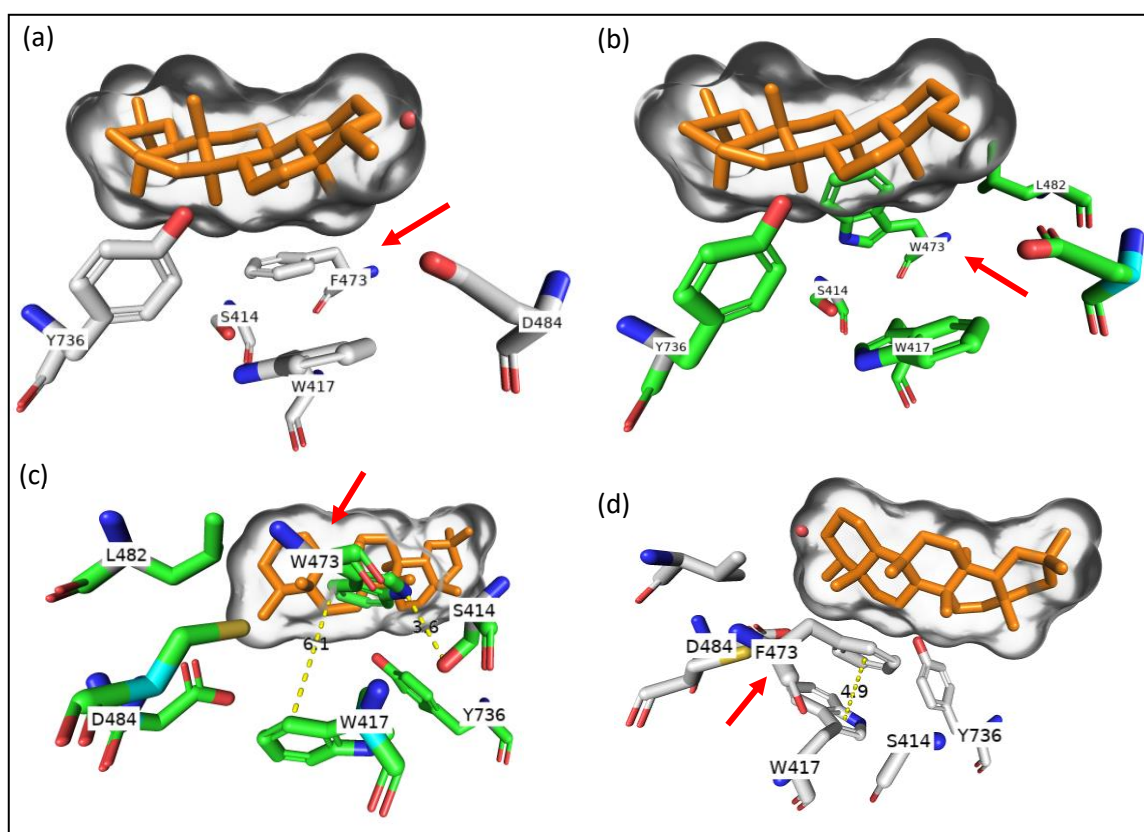


Alguns estudos sugerem que pequenas alterações no volume dos resíduos de aminoácidos podem interferir na atividade enzimática. Como pode ser observado em mutações na cicloartenol sintase de *Arabidopsis thaliana* (CAS). A substituição de um resíduo de isoleucina na posição 481, por uma leucina, alanina ou valina, (I481L, I481A, I481V) não alteram significativamente o volume dos resíduos, já que são aminoácidos com volumes semelhantes, entretanto essas mutações levaram a produção de cicloartenol e uma mistura de outros triterpenos (MATSUDA, et al., 2000). Por outro lado, com a substituição de um resíduo de histidina por um resíduo de tirosina (H477Y), cicloartenol sintase passou a produzir lanosterol como produto principal (WU e GRIFFIN, 2002). Essa alteração mostrou-se mais significativa em relação ao volume do aminoácido, pois enquanto a histidina tem apenas um imidazol na cadeia lateral, a tirosina tem um grupo fenol, ligado a um metileno.

Os estudos de modelagem corroboram com essa ideia, pois indicam que a substituição da fenilalanina pelo triptofano aumenta o volume ocupado dentro do sítio ativo, quando comparado à forma da apoenzima. Quando o substrato se aproxima do sítio catalítico, há um bloqueio estérico devido ao grupo indol da cadeia lateral W473 (Figura 23 (b), p.71). A conformação no modelo (Figura 23 (c), p.71) é a única possível entre todos os testados. Isso ocorre porque nos vários rotâmeros possíveis, há o bloqueio da cadeia lateral dos resíduos W417, S411 ou L482. Além disso, quando o substrato está ausente, o anel indol mutante (W473) interage pela possibilidade de conjugação dos elétrons π com o W417, preenchendo o espaço catalítico e não atingindo a conformação ideal para interagir favoravelmente com o substrato (Figura 23 (c), p.71). Como o resíduo F473 é menos volumoso, aumenta a mobilidade e acomoda o substrato (Figura 23 (d), p.71).

O mutante F474W da β -amirina sintase (EtAS), apresentou uma alteração conformacional devido ao aumento do volume atribuído ao resíduo de triptofano dentro da cavidade catalítica, alterando a formação do anel B. Dessa forma, o mutante teve a produção de β -amirina diminuída além de produzir outros triterpenos (ITO, et al., 2014). Também foi observado que outras mutações de aminoácidos levaram a produção de diferentes triterpenos ou alteraram a concentração de β -amina produzida, mas não interrompeu a sua formação. No entanto, o F473W de friedelina sintase interrompeu a formação de qualquer triterpeno por causa do bloqueio da mobilidade dos resíduos e pela interação com o resíduo W417, obstruindo a interação do substrato (Figura 23 (b), p.71). No mutante F474W de β -amirina sintase ainda há flexibilidade porque os resíduos de aminoácidos são diferentes. De qualquer forma, concordamos que o resíduo F473 é importante para a atividade enzimática devido ao volume estérico na cavidade de catálise e interação do tipo elétrons π que estabilizam o substrato.

Figura 23: Alinhamento secundário da proteína nativa (*MFRS*) (carbonos em cinza) com o mutante F473W (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Interação favorável entre o resíduo F473 da enzima nativa e substrato. (b) Impedimento estérico do resíduo W473 no sítio ativo de *MFRS* mutante. (c) Interação entre os resíduos W417 e W473, favorecendo o impedimento estérico. (d) Interação entre os resíduos W417 e F473.



4.5.2.3. Mutante M549S

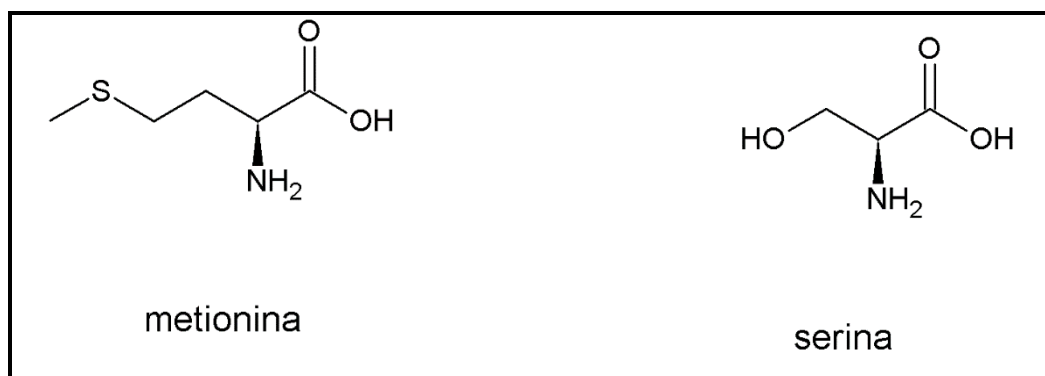
Quando compara-se a sequência primária da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* com outras OSCs, observamos que o resíduo de metionina nessa posição é conservado entre as friedelina sintases, exceto o *KdFRS* (Figura 24, p. 72). Na lanosterol sintase, escolhida como modelo para estudos de modelagem molecular (Protein Data Bank ID 1W6K), existe uma serina nessa posição, enquanto as demais OSCs (Figura 24, p. 72) mantêm um resíduo polar menor como treonina ou apolar como alanina, valina, leucina e isoleucina.

Figura 24: Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*. Comparação entre os resíduos na posição M549S.

1W6K	467	LQEKCPH--VTEHPRERLCDAVAVLLNMRN----PDGGFATYETKRCGHLLELLLNPS	EV
MiFRS	496	AATMPEE-IVGEKLDPOWIFESVNIILSLQEP---KTGGLAGWEPVVRAGQWMEMLNPM	EF
KdFRS	497	FSLMQPE-VVGEAMPPEPERLYDSVNVLLYLQS----KNGGMPCWEPAGESEWLELLNP	TEF
KdTAS	516	FSLMPPE-IVGEKMEPERLYDSVNIILSLQS----KNGGLAAWEPAGAPEWLELLNP	TEF
LUP2	498	LSMMPAE-VVGOKIDPEQLYDSVNIILSLQG----EKGGITAWEPVRAQEWLELLNP	TDF
EtAS	497	FSMMPPE-IVGEKMDAQHLYNAVNIILSLQS----KNGGLAAWEPAGAQQWLEMLNP	TEF
CAS1	495	LSKVPKA-IVGEPIDAKRLYFAVNVIIISLQN----ADGGIATYVELTRSYPWLEL	INPAET
LUP2	498	LSMMPAE-VVGOKIDPEQLYDSVNIILSLQG----EKGGITAWEPVRAQEWLELLNP	TDF
BgLUS	496	FSMMPPE-IVGEKMGPRMYDAVNVIIISLQS----KNGGCSAWEPAGAGSWMEWLN	PVEF
PSM	497	LSMMPPE-IVGEKMEPEMLYDSVNIILSLQG----KKGGLPAWEPSEAVEWLEL	FNPIEF
RsM2	499	FSMMPPE-IVGEKLEPERLYLAVDFIISLQS----KNGGLTCWEPARGCKWLE	VLNPIEF
PdFRS	493	KGLSWTFSDQDHPERLYDSVNVLLYLQS----KNGGMPCWEPAGESEWLELLNP	PPTMFD
TwOSC1	498	FSLMQPE-VVGEAMPPEPERLYDSVNVLLYLQS----KNGGMPCWEPAGESEWLELL	NPM
TwOSC3	496	FSLMQPE-VVGKAMPQERLYDSVNVLLYLQS----KNGGMPCWEPAGESEWLELL	NPM

A troca da metionina por uma serina em friedelina sintase foi baseada somente pela análise do alinhamento múltiplo. A metionina é um aminoácido básico com um átomo de enxofre e cadeia lateral apolar. A serina, por sua vez é classificada como um aminoácido polar e neutro (Figura 25, p.72).

Figura 25: Estruturas químicas dos aminoácidos metionina e serina.

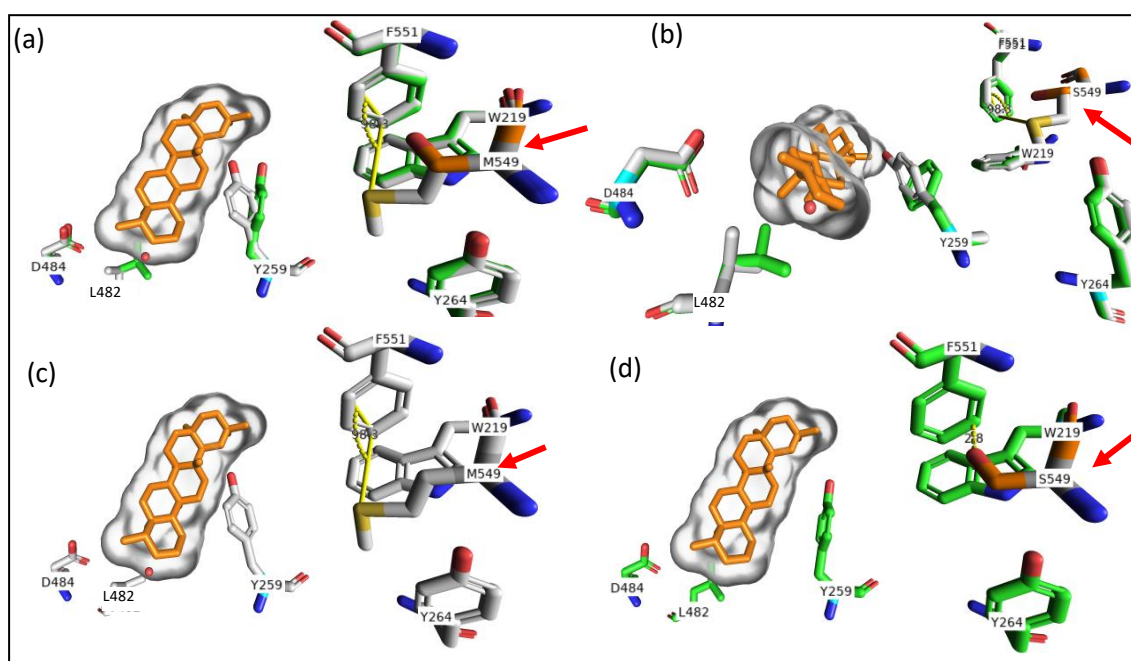


A troca de um resíduo de metionina por um de serina na posição 549 não impediu a enzima de produzir friedelina (Figura 30 (g), p. 78; Tabela 8, p. 78), e ainda contribuiu com a produção de β -amirina e α -amirina.

Estudos de modelagem molecular indicaram que o aumento na produção de friedelina observado na mutação M549S, quando comparado com o *MiFRS* selvagem, ocorre devido a estabilização dos aminoácidos aromáticos Y264 e W219 (Figura 26 (b), p.73). A substituição de uma metionina por uma serina permite a ligação ânion- π da hidroxila com F551, fechando o complexo (ANJANA, et al., 2012). A estrutura nativa mostra um ângulo desfavorável de 98° a partir da interação de M549 com F551

(Figura 26 (c), p.73). Quando se tem serina na posição 549, ocorre a estabilização do complexo S549/F551/W219/Y264, que mantém a entrada do sítio ativo aberta para a ligação do substrato e a saída do produto (Figura 26 (d), p.73). Consequentemente, há a liberdade para interação da Y259 e L482 na catálise enzimática, o que explica o aumento na produção dos triterpenos (Figura 34, p.84). Em nosso estudo, os grupos aromáticos em Y264 e W219 criaram um sanduíche com o ânion no resíduo mutado S549 próximo ao anel C, possibilitando a estabilização do cátion oleanila e produzindo β -amirina e α -amirina mesmo que em menor concentração em comparação com produção de friedelina (Figura 26 (d), p.73).

Figura 26: Alinhamento secundário (ou representação lado a lado) da proteína nativa (*MFRS*) (carbonos em cinza) com o mutante M549S (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Interação dos resíduos Y259 e L482. (b) estabilização dos resíduos aromáticos Y264 e W219; interação ânion- π entre a hidroxila do resíduo S549 e o resíduo F551. (c) A estrutura nativa mostra um ângulo desfavorável de 98° a partir da interação do M549 com o F551. (d) Sanduíche entre os resíduos Y264 e W219 e o ânion no resíduo mutado S549 próximo ao anel C. Estabilização do complexo S549/F551/W219/Y264.



4.5.2.4. Mutante L552F

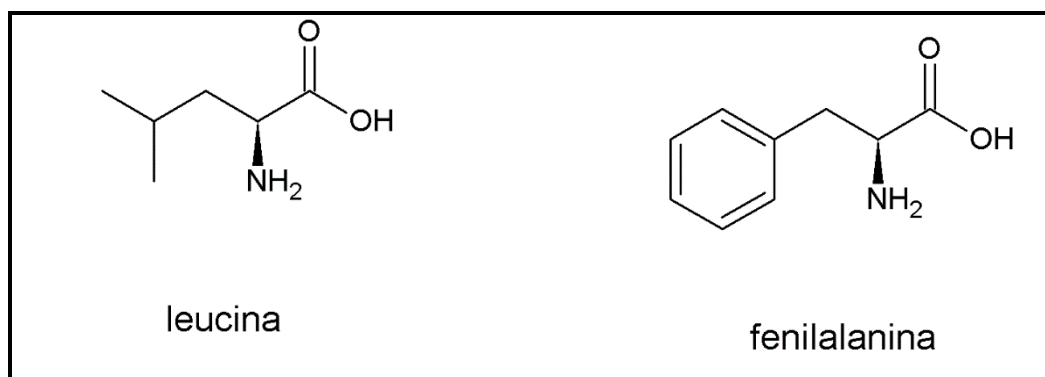
A outra mutação analisada, L552F, foi selecionada porque a maioria das enzimas OSC possui uma fenilalanina na posição 552, incluindo *KdFRS*, enquanto a friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (*MiFRS*), *Populus davidiana* (*PdFRS*) e *Tripterygium wilfordii* (*TwOSC1* e *TwOSC3*) tem uma leucina nessa posição (Figura 27, p. 74).

Figura 27: Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*. Comparação entre os resíduos na posição L552F.

1W6K	521	FGD	I	M	I	D	Y	T	Y	V	E	C	T	S	A	V	M	O	A	L	K	Y	E	H	K	R	E	P	E	H	R	A	E	T	R	E	T	T	O	G	L	E	F	C	R	R	O	R	A	D	G	S	W	E	G	S					
MiFRS	552	L	E	N	I	V	I	E	H	T	Y	I	E	C	T	G	S	S	I	I	A	F	I	T	L	K	K	L	P	G	H	R	T	K	D	I	N	F	I	V	N	A	I	R	Y	L	E	D	E	O	Y	P	D	G	S	W	Y	G	N		
KdCAS	551	F	G	D	I	V	I	D	Y	P	Y	V	E	C	T	S	A	A	I	Q	A	L	T	S	F	K	L	Y	P	G	H	R	K	E	V	D	E	C	T	E	K	A	V	K	F	I	E	S	I	Q	A	A	D	G	S	W	Y	G	S		
CAS1	550	F	G	D	I	V	I	D	Y	P	Y	V	E	C	T	S	A	A	I	Q	A	L	T	S	F	K	L	Y	P	G	H	R	K	E	V	D	E	C	T	E	K	A	V	K	F	I	E	S	I	Q	A	A	D	G	S	W	Y	G	S		
RsM2	554	F	E	N	I	V	E	H	E	Y	V	E	V	T	A	S	A	I	N	A	L	V	M	F	K	K	R	Y	P	G	Y	R	E	K	E	I	E	H	F	I	S	K	A	V	H	Y	L	I	Q	T	O	F	P	N	G	P	W	Y	G	V	
GgLUS1	549	F	E	D	T	M	I	E	R	E	Y	V	E	C	T	G	S	A	M	O	G	L	A	L	F	K	O	P	O	H	R	S	K	E	I	D	R	C	I	A	K	A	I	R	Y	I	E	N	M	O	N	P	D	G	S	W	Y	G	C		
GgCAS1	550	F	G	D	I	V	I	D	Y	P	Y	V	E	C	T	S	A	A	I	Q	A	L	T	S	F	K	L	Y	P	G	H	R	K	E	V	D	E	C	T	E	K	A	S	F	I	E	K	T	Q	A	S	D	G	S	W	Y	G	S			
KdFRS	552	F	E	N	I	V	I	E	H	E	Y	V	E	C	T	S	S	A	V	Q	A	L	V	L	F	K	K	L	Y	P	L	H	R	R	K	E	V	E	R	F	I	T	N	G	A	K	Y	L	E	D	I	Q	M	P	D	G	S	W	Y	G	N
KdLUS	552	F	E	N	I	V	I	E	H	E	Y	V	E	C	T	S	S	A	V	Q	A	L	V	L	F	K	K	L	Y	P	L	H	R	R	K	E	V	E	R	F	I	T	N	G	A	K	Y	L	E	D	I	Q	M	P	D	G	S	W	Y	G	N
EtAS	552	F	A	D	I	V	I	E	H	E	Y	V	E	C	T	A	S	A	I	H	A	L	T	M	F	K	K	L	Y	P	G	H	R	K	E	I	E	N	F	I	T	N	A	V	K	Y	L	E	D	V	Q	T	A	D	G	G	W	Y	G	N	
KdGLS	552	F	E	N	I	V	I	E	H	E	Y	V	E	C	T	S	S	A	V	Q	A	L	V	L	F	K	K	L	Y	P	L	H	R	R	K	E	V	E	R	F	I	T	N	G	A	K	Y	L	E	D	I	Q	M	P	D	G	A	W	Y	G	N
PNY2	551	F	E	D	I	V	I	E	H	E	Y	V	E	C	T	S	S	A	I	Q	A	M	V	M	F	K	K	L	Y	P	G	H	R	K	E	I	E	V	S	I	T	N	A	V	Q	Y	L	E	D	I	Q	M	P	D	G	S	W	Y	G	N	
AMY1	552	F	A	D	I	V	E	H	E	Y	V	E	C	T	G	S	A	I	Q	A	L	V	L	F	K	K	L	Y	P	G	H	R	K	E	I	E	N	F	I	S	E	A	V	R	F	I	E	D	I	Q	T	A	D	G	S	W	Y	G	N		
LUP2	553	F	T	C	V	M	A	E	R	E	Y	V	E	C	T	S	A	V	I	Q	A	L	V	L	F	K	O	L	Y	P	D	H	R	T	K	E	I	I	K	S	I	E	K	G	V	O	F	I	E	S	K	O	T	P	D	G	S	W	H	G	N
PdFRS	549	L	E	N	I	V	I	E	H	D	Y	D	V	F	P	P	E	R	L	Y	D	S	V	N	V	L	L	Y	L	O	S	---	K	N	G	G	P	C	W	E	P	A	G	E	S	E	W	L	L	N	P	P	T	M	F	D					
TwOSC1	554	L	E	N	I	V	I	E	H	T	Y	I	E	C	T	G	S	S	I	I	A	F	I	T	L	K	K	L	P	G	H	R	T	K	D	I	N	F	I	V	N	A	I	R	Y	L	E	D	E	O	Y	P	D	G	S	W	Y	G	N		
TwOSC3	552	L	E	N	I	V	I	E	H	T	Y	I	E	C	T	G	S	S	I	I	A	F	I	T	L	K	K	L	P	G	H	R	T	K	D	I	N	F	I	V	N	A	I	R	Y	L	E	D	E	O	Y	E	D	G	S	W	Y	G	N		

Tanto a leucina como a fenilalanina (Figura 28, p. 75) são aminoácidos apolares, entretanto a fenilalanina é um aminoácido de maior volume, que pode ter influenciado na estabilização dos cátions intermediários, resultando na produção de outros triterpenos pela enzima friedelina sintase (Figura 17, p. 64). A densidade eletrônica da fenilalanina centrada no anel aromático pode ter ajudado na estabilização do cátion oleanila levando a formação de β -amirina e α -amirina, além da friedelina.

Figura 28: Estruturas químicas dos aminoácidos leucina e fenilalanina.



A troca de um resíduo de leucina por um resíduo de fenilalanina na posição 552 produziu friedelina, β -amirina e α -amirina (Figura 30 (f), p. 78; Tabela 8, p. 78). A produção de friedelina no mutante L552F foi similar a produção de friedelina pela enzima do tipo selvagem. O resíduo F552 forma uma estrutura em sanduíche com outros dois resíduos de fenilalanina (551 e 728) (Figura 29 (a), p.76). A substituição da leucina pela fenilalanina (L552F) faz com que o resíduo F728 se aproxime do sítio catalítico estabilizando o cátion oleanila, levando a produção de α -amirina e β -amirina, diminuindo a especificidade da enzima. (Figura 29 (b), p.76). Na enzima selvagem, quando F728 está fora do ambiente catalítico, a estabilidade dos cátions intermediários diminui, levando a produção apenas de friedelina (Figura 29 (c), p.76). Outras possibilidades de rotâmeros são prejudicadas devido ao colapso de outros resíduos da cadeia principal ou lateral, mas existe uma chance de 6,6% de F552 estar voltada para o sítio ativo e alterar a conformação do resíduo F728 em relação ao substrato, prejudicando sua interação com o sítio ativo (Figura 29 (d), p.76). A estabilização dos resíduos ou intermediários que estão em sanduíche pode levar a alterações no produto enzimático. O tipo selvagem SAD1 de *Avena strigosa* produz β -amirina, mas o mutante S728F propiciou a criação de uma estrutura sanduíche com o resíduo F725 e o carbocátion damarenila deu origem a um triterpeno tetracíclico devido à estabilização do cátion intermediário (ITO, et al., 2013b). Na mutação L552F de friedelina sintase, o carbocátion oleanila sofreu estabilização, pois está formando um sanduíche com os resíduos F551 e F728. Como esses resíduos estão um pouco distantes do sítio ativo, permitiu a produção de β -amirina e α -amirina e ainda a expansão do carbocátion para a formação de cátion friedelila e depois produção de friedelina.

Figura 29: Alinhamento secundário da proteína nativa (*MFRS*) (carbonos em cinza) com o mutante L552F (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Sanduíche entre os resíduos de fenilalanina nas posições 551/552/728. (b) A mutação aproximou o resíduo F728 do sítio catalítico, com uma interação do tipo elétron π que estabiliza o anel C, diminuindo a especificidade da enzima. (c) A estrutura nativa mostra a interação dos resíduos L552 e F728. (d) Outra possibilidade de rotâmero é prejudicada devido ao colapso de outros resíduos da cadeia principal ou lateral.

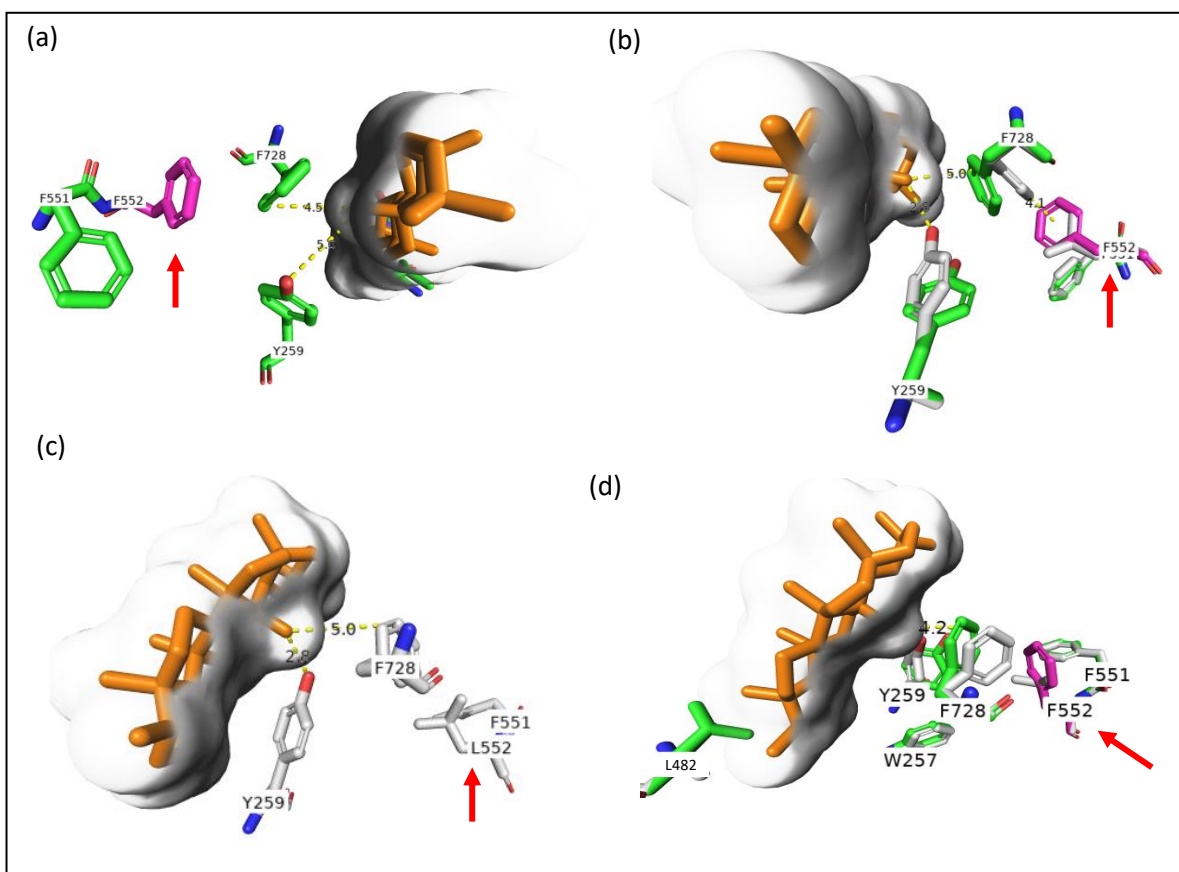
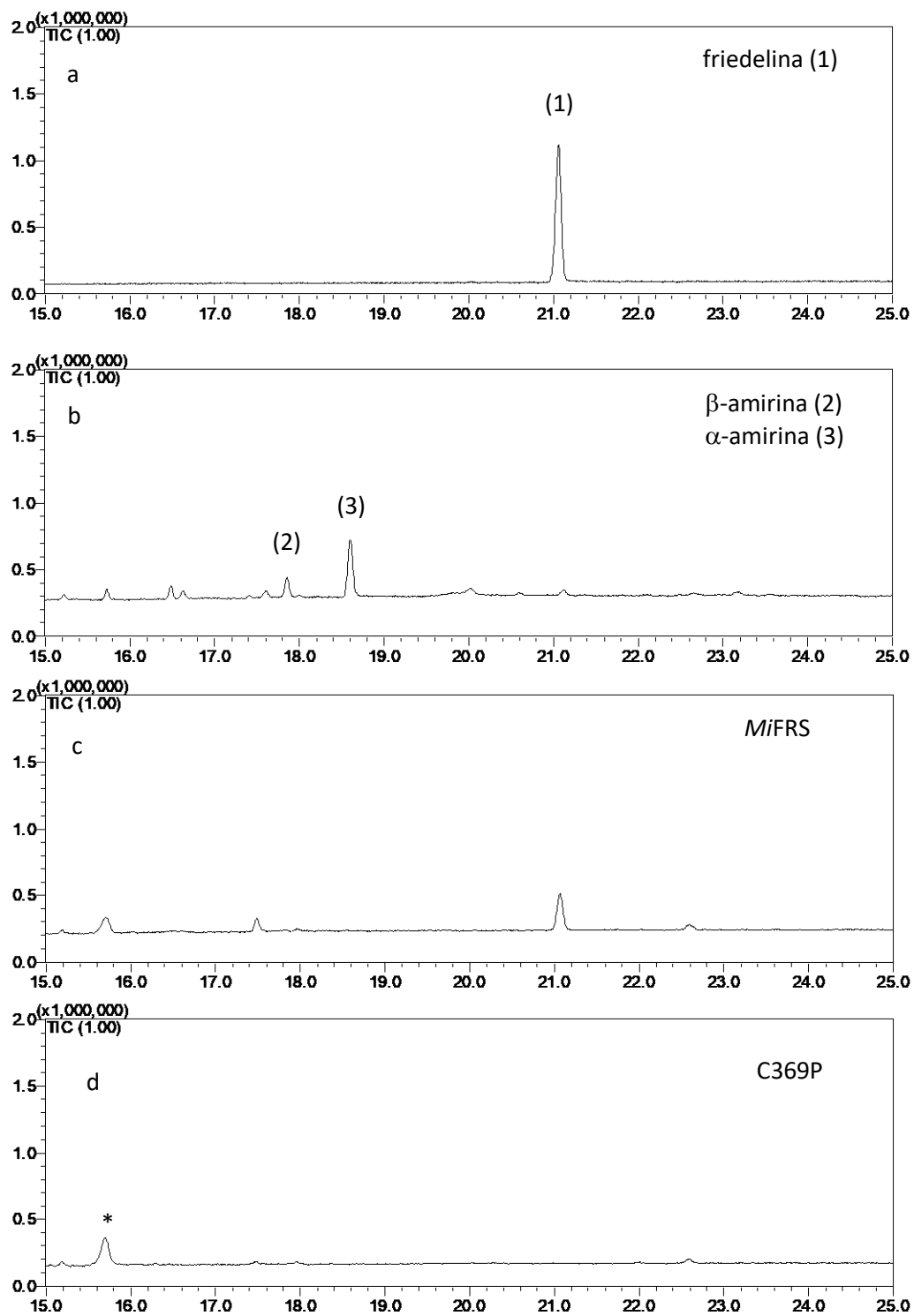
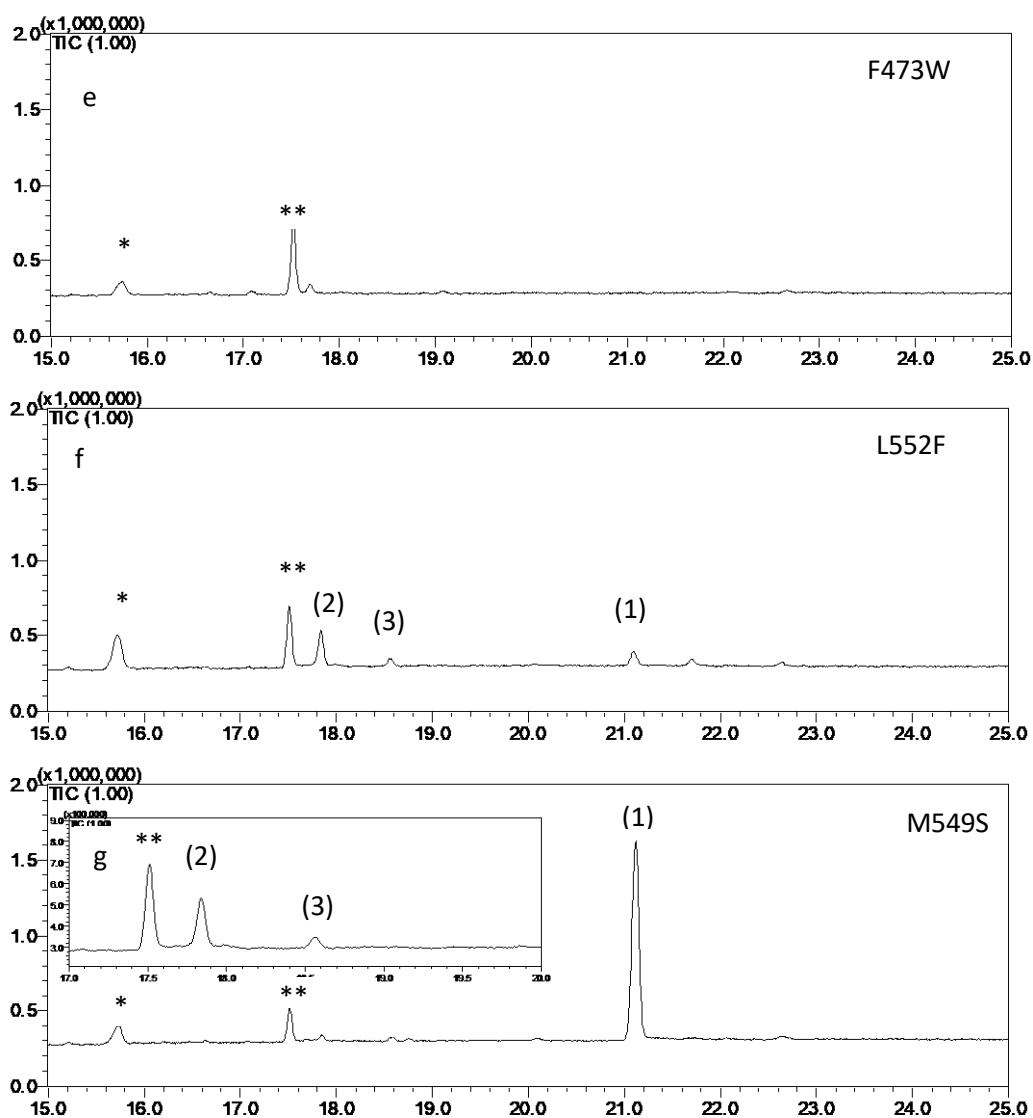


Figura 30: Cromatograma das substâncias usadas como padrão: (a) friedelina, (b) β -amirina e α -amirina. Cromatograma das frações hexânicas de *MiFRS* (c), C369P (d), F473W (e), L552F (f) e M549S (g).





(*)ergosterol e (**) lanosterol identificados por CG-EM

Tabela 8: Concentração de friedelina presente nas frações extraídas dos mutantes da levedura *S. cerevisiae*.

Amostra	ergosterol tr = 15,706	lanosterol tr = 17,509	β -amirina tr = 17,851	α -amirina tr = 18,654	friedelina tr = 21,100
\emptyset	✓	-	-	-	-
MFRS	✓	✓	-	-	✓
C369P	✓	✓	-	-	-
F473W	✓	✓	-	-	-
M549S	✓	✓	✓	✓	✓
L552F	✓	✓	✓	✓	✓

É interessante destacar que diferentes resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da friedelina sintase exercem funções importantes para a atividade e especificidade catalítica da enzima. Alguns aminoácidos são geralmente altamente conservados entre as OSCs e sua troca leva à perda de atividade catalítica e inibe a biossíntese de triterpenos, como é o caso dos mutantes C369P e F473W. Como se pode observar pelo alinhamento múltiplo, a maior parte das oxidoesqualeno ciclases têm os resíduos cisteína (C369) e fenilalanina (F473) conservados, como por exemplo, o resíduo C369 na enzima lupeol sintase de *Arabidopsis thaliana* (LUP2), β -amirina sintase de *Lotus japonicus* (OSC1) e taraxerol sintase de *Kalanchoe daigremontiana* (KdTAS). O resíduo F473, também é mantido em muitas OSCs, como a lupeol sintase de *Bruguiera gymnorhiza* (BgLUS), β -amirina sintase de *Medicago tirucalli* (EtAS) e friedelina sintase de *Kalanchoe daigremontiana* (KdFRS). Um estudo envolvendo mutações de β -amirina sintase de *Avena strigosa* identificou que a mutação C563Y (troca do resíduo de aminoácido cisteína por tirosina) bloqueia o início da ciclização impedindo a formação de β -amirina (SALMON, et al., 2016). Entretanto, outros resíduos estão presentes em pequenos grupos de enzimas OSCs, como o resíduo de metionina na posição 549, e leucina 552, conservados apenas nas friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (MFRS), *Populus davidiana* (PdFRS) e *Tripterygium wilfordii* (TwOSC1 e TwOSC3). Assim, esses resíduos devem ser importantes para a estabilização dos cátions intermediários até a formação do cátion friedelina. A troca desses resíduos conservados pode levar a formação de outros triterpenos. Em estudo anterior, foi avaliada a influência do resíduo de leucina na posição 482 sobre o sítio ativo de friedelina sintase. O resíduo L482 é conservado em friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (MFRS), *Kalanchoe daigremontiana* (KdFRS) e *Tripterygium wilfordii* TwOSC3). A sua troca por valina (L482V) levou a produção de friedelina e β -amirina, enquanto que com a troca por treonina (L482T), a levedura passou a produzir apenas β -amirina (SOUZA-MOREIRA et al., 2016).

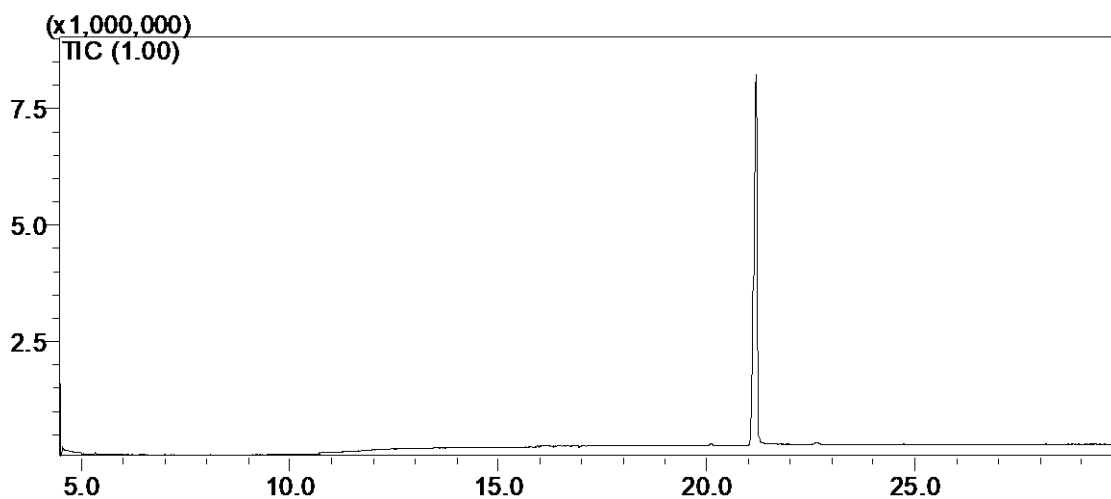
Portanto, foi possível concluir que os resíduos de cisteína (C369) e fenilalanina (F473) são cruciais na manutenção da atividade catalítica da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*, enquanto os resíduos de metionina (M549) e leucina (L552) são importantes para a estabilização, controle de rearranjo e especificidade da friedelina sintase.

4.5.3. Quantificação da friedelina nos mutantes

A análise quantitativa de friedelina foi realizada para determinar a concentração de friedelina produzida heterologicamente nos quatro mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Inicialmente foi necessário realizar a purificação da friedelina à ser utilizada como padrão, já que a amostra continha impurezas. As frações obtidas durante a cromatografia em coluna (CC) foram analisadas por CG-EM e a fração 6 apresentou maior grau de pureza, como mostrado na Figura 31 (p. 80).

Figura 31: Cromatograma da friedelina purificada por CC ($t_r=21,100$ minutos).

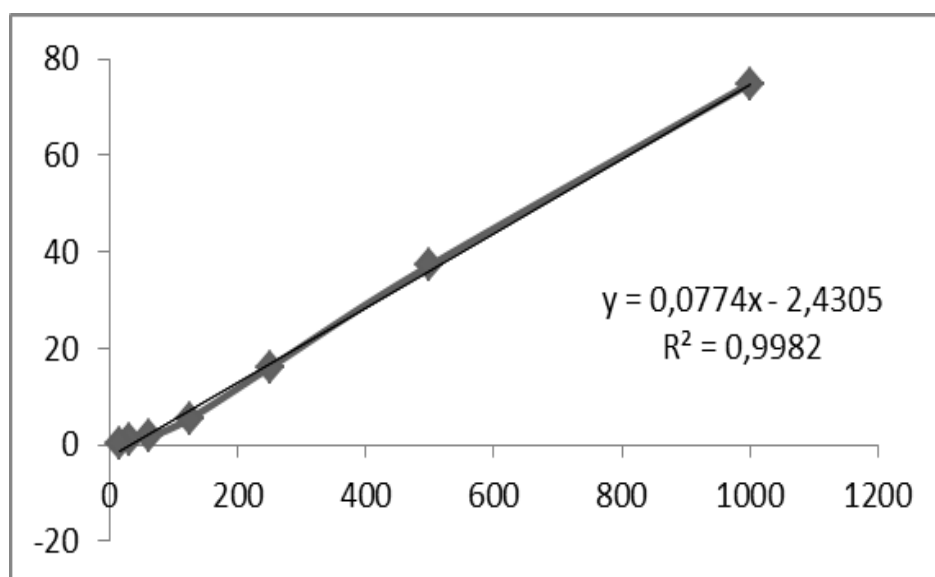


A construção da curva analítica foi feita utilizando o colesterol como padrão interno. Dessa forma, utilizou-se a média entre a razão dos valores das áreas do pico referente à friedelina e colesterol, versus a concentração de friedelina (Figura 32, p. 81; Tabela 9, p. 81).

Tabela 9: Dados referentes às concentrações da substância padrão friedelina e do padrão interno colesterol usados na construção da curva analítica.

[friedelina] ($\mu\text{g/mL}$)	Média (área friedelina/ área colesterol)	Desvio padrão
1000	74,89	3,831
500,0	37,17	2,510
250,0	16,04	0,981
125,0	5,421	3,150
62,50	1,766	0,947
31,25	0,955	1,010
15,62	0,236	0,123

Figura 32: Curva analítica da substância padrão, friedelina, obtida com as seguintes concentrações: 15,62; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0, 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g/mL}$.



O cálculo para as concentrações de friedelina nas amostras analisadas foi feito com base nos valores obtidos pela média das razões entre as áreas dos picos referentes a friedelina e do padrão interno colesterol, produzidas por cada injeção das amostras. A concentração de friedelina em cada amostra foi obtida a partir da equação de regressão linear da reta ($y = 0,0774x - 2,4305$), apresentou excelentes

resultados de linearidade entre as concentrações analisadas ($R^2=0,9982$). Após o cálculo das concentrações de friedelina em cada amostra analisada, foi possível calcular a quantidade dessa substância produzida pelos mutantes na levedura *S. cerevisiae*, e comparados com a levedura e com o gene selvagem. Os dados obtidos com a curva analítica para as amostras analisadas e a concentração de friedelina estão resumidos na Tabela 10 (P. 82).

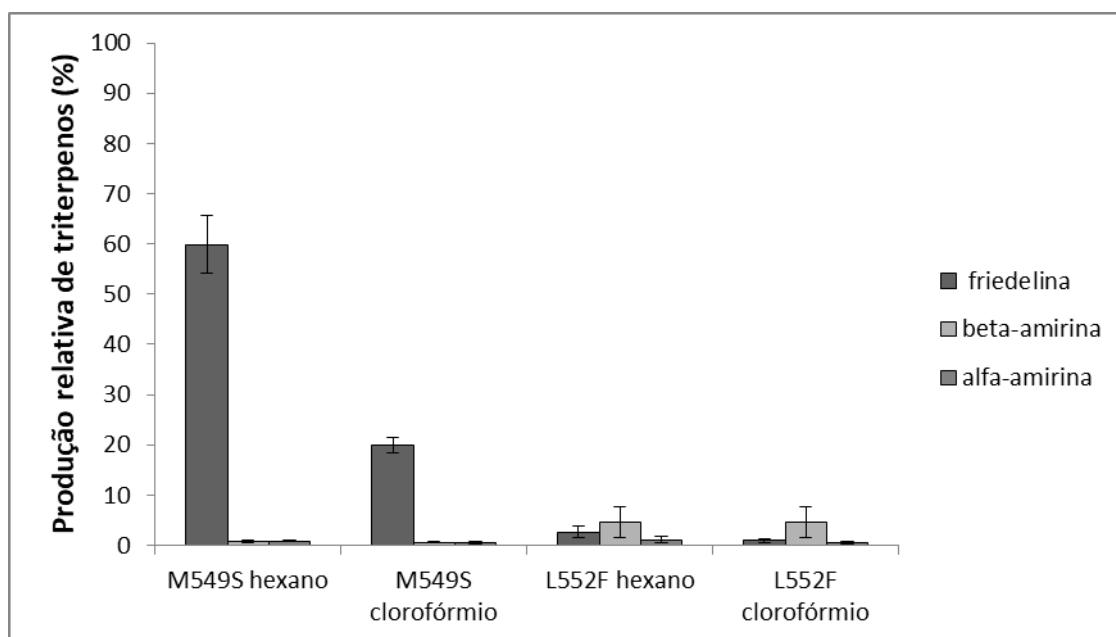
Tabela 10: Concentração de friedelina presente nas frações extraídas da levedura *S. cerevisiae*, expressando os mutantes de *MiFRS*.

Amostra	Média área friedelina/área colesterol	Desvio padrão	Concentração friedelina (mg/L)*
<i>MiFRS</i> – Hex	0,221	0,024	0,206
<i>MiFRS</i> - CHCl ₃	0,050	0,020	0,193
M549S - Hex	2,157	0,023	0,403
M549S - CHCl ₃	0,880	0,031	0,248
L552F - Hex	0,054	0,014	0,193
L552F - CHCl ₃	0,018	0,007	0,190

* Quantidade de friedelina em miligrama por litro de meio de cultura.

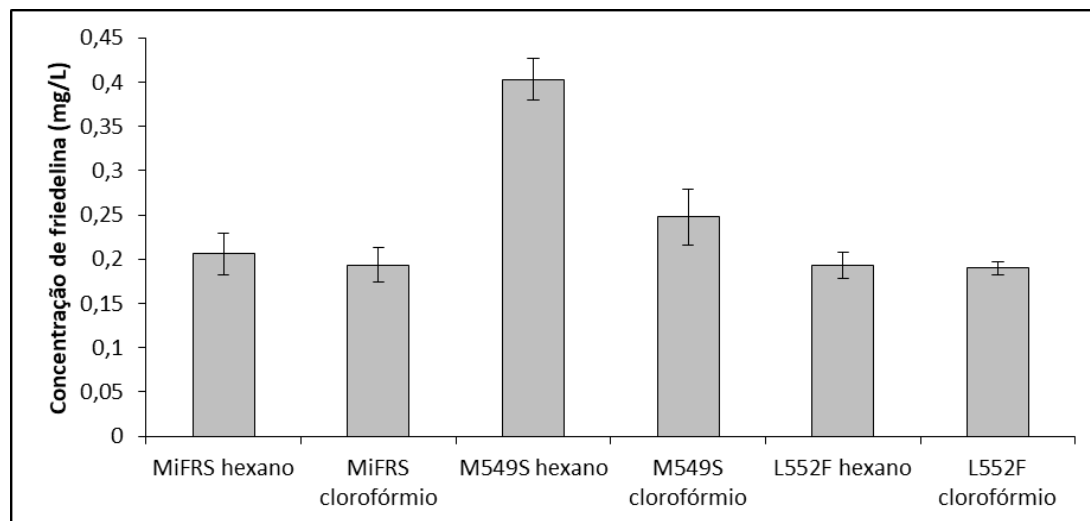
Ambos os mutantes, M549S e L552F, produziram friedelina, α -amirina e β -amirina. As proporções entre os triterpenos produzidos no sistema heterólogo são descritas na figura 33 (p.83). O mutante M549S produziu 0,40 mg de friedelina por litro de meio de cultura (Figura 34, p. 83), um aumento de duas vezes na produção de friedelina quando comparada com *MiFRS* selvagem, enquanto o mutante L552F manteve a mesma produção em relação a enzima selvagem. O aumento da produção de friedelina pelo mutante M549S da friedelina sintase também foi observado no mutante T502E de friedelina sintase de *Tripterygium wilfordii*, o qual produziu friedelina, β -amina e α -amina. O mutante T502E manteve a produção de quantidades semelhantes de β -amirina e α -amirina, mas aumentou quase em 45% a produção de friedelina (SALMON, et al., 2016). O mutante M549S aumentou 96% a produção de friedelina, mas também produziu β -amirina e α -amirina, que não eram vistas no *MiFRS* do tipo selvagem.

Figura 33: Teores de friedelina, β -amirina e α - amirina produzidas nos mutantes de *MFRS*.



A troca de resíduos de aminoácidos visa aumentar a produção da substância de interesse, no entanto, é importante enfatizar que é necessário não apenas melhorar a eficiência catalítica, mas também melhorar a especificidade da enzima. O mutante L552F perdeu sua especificidade e passou a produzir concentrações maiores de β -amirina do que friedelina. O mutante M549S se mostrou mais interessante do ponto de vista quantitativo, mas também perdeu sua especificidade e produziu outros triterpenos mesmo que em proporções menores. Assim, ainda é necessário entender o sítio ativo da friedelina sintase e aumentar a produção de friedelina, mantendo sua especificidade.

Figura 34: Concentração de friedelina em frações extraídas de *Saccharomyces cerevisiae*, expressando mutantes *MiFRS*. A concentração de friedelina é expressa em mg/L de meio de cultura.



5. CONCLUSÃO

A friedelina é uma substância medicinalmente importante devido à diversidade de atividades biológicas atribuídas a ela, além de ser o principal precursor dos promissores antitumorais, triterpenos quinonametídeos. Com isso, a transferência do gene da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* para um sistema heterólogo (*Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*) permitiu avançar nos estudos sobre sua produção em *E. coli*, e obter uma fração concentrada da enzima estudada. Além disso, foi possível avaliar a sua capacidade biossintética por estudos de mutação sitio dirigida, expressas em levedura *Saccharomyces cerevisiae* e, assim, avançar no entendimento da sua atividade e especificidade na produção de metabólitos secundários de interesse, de forma sustentável e mais eficiente, como uma pequena fábrica biológica.

6. Referências

- ABE, I.; PRESTWICH, G. Identification of the active site of vertebrate oxidosqualene cyclase. **Lipids**, v. 30, n. 3, p. 231-234, 1995.
- ABDALLAH, I. I.; PRAMASTYA, H.; VAN, M. R.; QUAX, W. J.; PRAMASTYA, H. Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* Toward Taxadiene Biosynthesis as the First Committed Step for Taxol Production. **Frontiers in microbiology**, n. 10, v. 218, 2019.
- ABDIN, M. Z., ALAM, P. Genetic engineering of artemisinin biosynthesis: prospects to improve its production. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 33, 2015.
- ABDULLAHI, M. KOLO, I. ADEBAYO, O. OYEWALE, J. O. AMUPITAN, M. O. FATOPE, J. I. OKOGUN. Antimycobacterial Friedelane-terpenoid from the Root Bark of *Terminalia Avicennioides*. **American Journal of Chemistry**, n. 2, p. 52-55, 2011.
- ALVES T.B., SOUZA-MOREIRA T.M., VALENTINI S.R., ZANELLI C.F., FURLAN M. (2018) Friedelin in *Maytenus ilicifolia* is produced by friedelin synthase isoforms. **Molecules**, n. 3,v. 23, 2018.
- ANJANA, R. VAISHNAVI, M. K. SHERLIN, D. KUMAR, S. P. NAVEEN, K. KANTH, P. S. SEKAR, K. Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. **Bioinformation**, n. 8, p. 1220-1224, 2012.
- ANTHONY, J.; ANTHONY, L. C.; NOWROOZI, F.; KWON, G.; NEWMAN, J. D.; KEASLING, J. D. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 1, p. 13-19, 2009.
- ANTONISAMY, P. DURAI PANDIYAN, V. IGNACIMUTHU, S. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 63, p. 1070-1077, 2016.
- ANTONISAMY, P. DURAI PANDIYAN, V. ARAVINTHAN, A. AL-DHABI, N. A. IGNACIMUTHU, S; CHOI, K. C. KIM, J. H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, n. 750, p. 167-175, 2015.
- BARKER, E. C.; KIM, B.; YOON, J. H.; TOCHTROP, G. P.; LETTERIO, J. J.; CHOI, S. H. Potent suppression of both spontaneous and carcinogen-induced colitis-associated colorectal cancer in mice by dietary celastrol supplementation. **Carcinogenesis**, v. 39, n.1, p. 36-46, 2018.
- BENELLI, G.; GOVINDARAJAN, F.; RAJESWARY, M.; VASEEHARAN, B.; ALYAHYA, S. A.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; MAGGI, F. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.148, p. 781-786, 2018.

BICALHO, K. U. SANTONI, M. M. ARENDT, P., ZANELLI, C. F., FURLAN, M., GOOSSENS, A., POLLIER, J. CYP712K4 Catalyzes the C-29 Oxidation of Friedelin in the *Maytenus ilicifolia* Quinone Methide Triterpenoid Biosynthesis Pathway. **Plant and Cell Physiology**, 2019. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz144>.

BUFFA-FILHO, W., BOLZANI, V. S., FURLAN, M., PEREIRA, S. I. V., PEREIRA, A. M. S., FRANÇA, S. C. In vitro propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinonemethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, v. 6, p. 137–146, 2014.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. *Chemical and ecological aspects*, v. 9, p. 387-446, 2011.

CARVALHO, A. M. S.; HEIMFARTH, L.; SANTOS, K. A.; GUIMARAES, A. G.; PICOT, L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms - A systematic review. **Phytomedicine**, n. 57, p. 137-147, 2019.

FUJII, Y., KANEKO, M. K.; YUKINARI, K. MAP Tag: A Novel Tagging System for Protein Purification and Detection. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**. v. 35, n. 6, p. 293-299, 2016

FUKUMITSU, S.; VILLAREAL, M.O.; FUJITSUKA, T.; AIDA, K.; ISODA, H. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF- κ B inactivation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, pp. 399-409, 2016.

GAO, Q.; GARCIA-PICHEL, F. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 791-802, 2011.

GASPASCUAL, E.; BERNA, A.; BACH, T. J.; SCHALLER, H. Plant oxidosqualene metabolism: cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS One**, v. 10, 2014.

GROOTA, N. S.; VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Letters**, v. 580, n. 27, p. 6471-6476, 2006.

HAN, J. Y. AHN, C. ADHIKARI, P. B. KONDETI, S. CHOI, Y. E. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (*PdFRS*) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana*. **Planta**, n. 249, v. 1, p. 95-111, 2019.

HAO, N.; RUIRUI, L.; QIANG, L.; PENGFEI, G.; QUANFENG, L.; QINGSHENG, Q. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 46, p. 1, p. 55-65, 2019.

HUNKE, S.; BETTON, J. M. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, n. 5, v. 50, p. 1579-1589, 2003.

IBDAH, M.; MARTENS, S.; GANG, D. R. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of plant dihydrochalcones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 10, p. 2273-2280, 2018.

IKRAM, N. K. B. K.; SIMONSEN, H. T. A Review of Biotechnological Artemisinin Production in Plants, **Frontiers in plant science**, n. 8, p. 1966, 2017.

ITO, R.; MASUKAWA, Y.; HOSHINO, T. Purification, kinetics, inhibitors and CD for recombinant β -amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L and functional analysis of the DCTA motif, which is highly conserved among oxidosqualene cyclases. **FEBS Journal**, v. 280, n. 5, p. 1267-80, 2013a.

ITO, R. MASUKAWA, Y. NAKADA, C. AMARI, K. NAKANO, C. HOSHINO, T. β -Amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli*. Steric bulk, not the π -electrons of Phe, at position 474 has a key role in affording the correct folding of the substrate to complete the normal polycyclization cascade. **Organic & Biomolecular Chemistry**, n. 12, p. 3836-3846, 2014.

ITO, R. HASHIMOTO, I. MASUKAWA, Y. HOSHINO, T. Effect of Cation- π Interactions and Steric Bulk on the Catalytic Action of Oxidosqualene Cyclase: A Case Study of Phe728 of β -Amyrin Synthase from *Euphorbia tirucalli* L. **Chemistry a European Journal**, n. 50, p. 17150-17158, 2013b.

JIN, S; KENNEDY, R. T. New developments in Western blot technology. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 4, p. 416-418, 2015.

JOHNSON, M. S., SRINIVASAN, N. SOWDHAMINI, R. BLUNDELL, T. L. Knowledge-based protein modeling. **Crit. Biochemistry & Molecular Biology Journal**, n. 29, p. 1-68, 1994.

JULLESSON, D.; DAVID, F.; PFLEGER, B.; NIELSEN, J. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1395-1402, 2015.

KAYANI, W. K.; KIANI, B. H.; DILSHAD, E.; MIRZA, B. Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 4, p.54, 2018.

KNAEPPER, S.; PENA, Y.; SULLEIRO, E.; FERNANDEZ-POLO, A.; ESPIAU, M.; MARTIN-NALDA A. Use of intravenous artemisinin derivatives in severe malária. **Anales de pediatria**, v. 77, n. 1, p. 67-68, 2012.

KRAKER, J.; SCHURINK, M.; FRANSSSEN, M. C. R.; KONIG, W. A.; DE GROOT, A.; BOUWMEESTER, H. J. Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. **Tetrahedron**, v. 59, n. 3, p. 409-418, 2003.

KENNEDY, J. Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: Combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 25– 34, 2008.

KEYNAN, O.; MIROVSKY, Y.; DEKEL, S.; GILAD, V. H.; GILAD, G. M. Safety and efficacy of dietary agmatine sulfate in lumbar disc-associated radiculopathy. An open-label, dose-escalating study followed by a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain Medicine**, v. 11, p. 356-368, 2010.

KÜRTEEN, C.; UHLÉN, M.; SYRÉN, P. O. Overexpression of functional human oxidosqualene cyclase in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 115, p. 46–53, 2015.

LISCOMBE, D. K., O'CONNOR, S. E. A virus-induced gene silencing approach to understanding alkaloid metabolism in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 72, p.1969-1977, 2011.

LIU, Y. B.; GAO, X.; DEEB, D.; PINDOLIA, K.; GAUTAM, S. C. Role of telomerase in anticancer activity of pristimerin in prostate cancer cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, n. 1, v. 11, p. 41-44, 2015.

LODEIRO, S.; GASCHSEIICHI, T.; MATSUDA, S. P. T. Enzyme Redesign: Two Mutations Cooperate to Convert Cycloartenol Synthase into an Accurate Lanosterol Synthase. **American Chemical Society**, v.127, n.41, p.14132-14133, 2005.

LODEIRO, S.; XIONG, Q.; WILSON, W.K.; KOLESNIKOVA, M.D.; ONAK, C.S.; MATSUDA, S.P.T. An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: A challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v.129, n.36, p.11213-11222, 2007.

MATSUDA, S. P. T., DARR, L. B., HART, E. A., HERRERA, J. B. R., MCCANN, K. E., MEYER, M. M., PANG, J., SCHEPMANN, H. G. AND WILSON, W. K. STERIC Bulk at Cycloartenol Synthase Position 481 Influences Cyclization and Deprotonation. **Organic Letters**, n. 2, p. 2261-2263, 2000.

MEYER, P. I. HEIDMANN, G. FORKMANN, H. SAEDLER. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 677, 1987.

NABAVI, S. MOHAMMAD; SAMEC, D.; TOMCZYK, M.; MILELLA, L.; RUSSO, D.; HABTEMARIAM, S.; SUNTAR, I.; RASTRELLI, L.; DAGLIA, M.; XIAO, J.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; YOUSEFI, B.; JEANDET, P.; XU, S.; SHIROOIE, S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, 2018.

NAKATSUKA, T.; ABE, Y.; KAKIZAKI, Y.; YAMAMURA, S.; NISHIHARA, M. Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 11, p. 1951-1959, 2007.

NIELSEN, J.; YUPLEE, S. Evolution of the Metabolic Engineering Community. **Metabolic Engineering**, v. 48, p. A1-A2, 2018.

OHYAMA, K.; SUZUKI, M.; KIKUCHI, J.; SAITO, K.; MURANAKA, T. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. **PNAS**, v.106, n.3, p.725-730, 2009.

PADDON, C. J.; WESTFALL, P. J.; PITERA, D. J.; BENJAMIN, K.; FISHER, K.; MCPHEE, D.; M.; LEAVELL, M. D.; TAI, A.; MAIN, A.; ENG, D.; POLICHUK, D. R.; TEOH, K. H.; REED, D. W.; TREYNOR, T.; LENIHAN, J.; JIANG, H.; FLECK, M.; BAJAD, S.; DANG, G.; DENGROVE, D.; DIOLA, D.; DORIN, G.; ELLENS, K. W.; FICKES, S.; GALAZZO, J.; GAUCHER, S. P.; GEISTLINGER, T.; HENRY, R.; HEPP, M.; HORNING, T.; IQBAL, T.; KIZER, L.; LIEU, B.; MELIS, D.; MOSS, N.; REGENTIN, R.; SECREST, S.; TSURUTA, H.; VAZQUEZ, R.; WESTBLADE, L. F.; XU, L.; YU, M.; ZHANG, Y.; ZHAO, L.; LIEVENSE J.; COVELLO, P. S.; KEASLING, J. D.; REILING, K. K.; RENNINGER, N. S.; NEWMAN, J. D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 528-532, 2013.

PAPADA, E., GIOXARI, A., BRIEUDES, V., AMERIKANOU, C., HALABALAKI, M., SKALTSOUNIS, A. L., SMYRNIODIS, I., KALIORA, A. C. Bioavailability of terpenes and postprandial effect on human antioxidant potential. **An Open-Label Study in Healthy Subjects Molecular Nutrition Food Research**, 1700751, 2017.

PILETZ, J. E.; ARICIOGLU, F.; CHENG, J. T.; FAIRBANKS, C. A.; GILAD, V. H.; HAENISCH, B.; HALARIS, A.; HONG, S.; LEE, J. E.; LI, J.; LIU, P.; MOLDERINGS, G. J.; RODRIGUES, A. L.; SATRIANO, J.; SEONG, G. J.; WILCOX, G.; WU, N.; GILAD, G. M. Agmatine: Clinical applications after 100 years in translation. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 18, p. 880-893, 2013.

REED, D. G.; NOPO-OLAZABAL, L. H.; FUNK, V.; WOFFENDEN, B. J.; REIDY, M. J.; DOLAN, M. C.; CRAMER, C. L.; MEDINA-BOLIVAR, F. Expression of functional hexahistidine-tagged ricin B in tobacco. **Plant Cell Reports**, v. 24, n.1, p. 15-24, 2005.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, n. 234, p. 779–815, 1993.

SALINAS-SÁNCHEZ, D.O.; ZAMILPA, A.; PÉREZ, S.; HERRERA-RUIZ, M.; TORTORIELLO, J.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; JIMÉNEZ-FERRER, E. Effect of hautriwaic acid isolated from *dodonaea viscosa* in a model of kaolin/carrageenan-induced monoarthritis. **Planta Medicinal**, v. 81, p. 1240-1247, 2015.

SALMON, M. THIMMAPPA, R. B. MINTO, R. E. MELTON, R. E. HUGHES, R. K. O'MAILLE, P. E. HEMMING, A. M. OSBOURN, A. A conserved amino acid residue for product and substrate specificity in plant triterpene synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 113, p. 4407-4414, 2016.

SEONG-HEE, P.; KYUSUNG, L.; JAE, W. J.; JI-SOOK, H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of shinorine, a sunscreen material, from xylose. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 2, p. 346-357, 2019.

SHARMA, S. H., THULASINGAM, S., NAGARAJAN, S. Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives, **European Journal of Pharmacology**, v. 795, p. 169–178, 2017.

SHEN, M. Y. SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, n. 15, p. 2507-2524, 2006.

SHIMADA, Y.; OHBAYASHI, M.; NAKANO-SHIMADA, M.; OKINAKA, Y.; KIYOKAWA, Y.; KIKUCHI, Y. Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3', 5'-hydroxylase: specific switching of the pathway in petunia. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 456-462, 2001.

SHIN, B e PARK, W. Synergistic effect of oleanolic acid on aminoglycoside antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **PLOS One**, v. 10, 2015.

SILVA, E. A. P.; CARVALHO, J. S.; GUIMARAES, A. G.; BARRETO, R. S. S.; SANTOS, M. R. V.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment: a patent review (2008-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 1, p. 43-53, 2019.

SINGH, S. P.; KUMARI, S.; RASTOGI, R. P.; SINGH, K. L.; SINHA, R. P. Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 7-17, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; ALVES, T. B.; PINHEIRO, K. A.; FELIPPE, L. G.; LIMA, G. M. A. de; WATANABE, T. F.; BARBOSA, C. C.; SANTOS, V. A. F. F. M.; LOPES, N. P.; VALENTINI, S. R.; GUIDO, R. V. C.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia*: leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene. **Scientific Reports**, n. 6, p. 36858, 2016.

SUNG, B.; PARK, B.; YADAV, V. R.; AGGARWAL, B. B. Celastrol, a Triterpene, Enhances TRAIL-induced Apoptosis through the Down-regulation of Cell Survival Proteins and Up-regulation of Death Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, n. 5, v. 285, p. 11498-11507, 2010.

TABACH, R. DUARTE-ALMEIDA, J. M. CARLINI, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract. Part I - Preclinical Studies. **Phytotherapy Research**, n. 31, p. 915-920, 2017.

TANG, B.; XU, D.; ZHAO, Y.; LIANG, G.; CHEN, X.; WANG, L. Celastrol inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration through suppression of MMP3 and MMP7 by the PI3K/AKT signaling pathway. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 6, p. 530-538, 2018.

TARAPORE, R. S.; SIDDIQUI, I. A.; ADHAMI, V. M.; SPIEGELMAN, V. S.; MUKHTAR, H. The dietary terpene lupeol targets colorectal cancer cells with constitutively active Wnt/ β -catenin signaling. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 11, p. 1950-1958, 2013.

TETSUO, K. M. S. KAZUO, M. Y. E. Mutational Studies on Triterpene Synthases: Engineering Lupeol Synthase into β -Amyrin Synthase. **Journal of the American Chemical Society**, n. 122, p. 6816-6824, 2000.

THIMMAPPA R. GEISLER K. LOUVEAU T. O'MAILLE P. OSBOURN A. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, n. 65, p. 225-257, 2014.

TSUDA, S.; FUKUI, Y.; NAKAMURA, N.; KATSUMOTO, Y.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; OHIRA, K.; UEYAMA, Y.; OHKAWA, H.; HOLTON, T. A. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. **Plant Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 377-386, 2004.

WANG, Z.; YEATS, T.; HAN, H.; JETTER, R. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703-29712, 2010.

XU, D., ZHANG, L. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for agmatine production, *Engineering in Life Sciences*, v. 19, p. 13–20, 2019.

XUE, Z.; DUAN, L.; LIU, D.; GUO, J.; GE, S.; ÓMÁILLE, P.; DICKS, J.; OSBOURN, A.; QI, X. Divergent evolution of oxidosqualene cyclases in plants. **New Phytologist**, v. 193, p. 1022-1038, 2012.

YANG, Y.; CHENG, S.; LIANG, G.; HONGGANG, L.; WU, H. Celastrol inhibits cancer metastasis by suppressing M2-like polarization of macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 2, n. 503, p. 414-419, 2018.

YE, S.; WANG, J.; SHAN, W.; YE, L.; ZOU, J. Green process for the preparation of agmatine sulfate. **Zhejiang Chemystri**, v. 41, p. 5-7, 2010.

YELANI, T., HUSSEIN, A. A., MEYER, J. J. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*, **Natural Product Research**, n 15, v. 24, p. 1418-1425, 2010.

YOUSEF, B. A.; HASSAN, H. M; ZHANG, L.; JIANG, Z. Pristimerin exhibits in vitro and in vivo anticancer activities through inhibition of nuclear factor-kB signaling pathway in colorectal cancer cells. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 40, p. 140-147, 2018.

WU, T.; GRIFFIN, J. H. Conversion of a Plant Oxidosqualene-Cycloartenol Synthase to an Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase by Random Mutagenesis. **Biochemistry**, n. 26, p. 8238-8244, 2002.

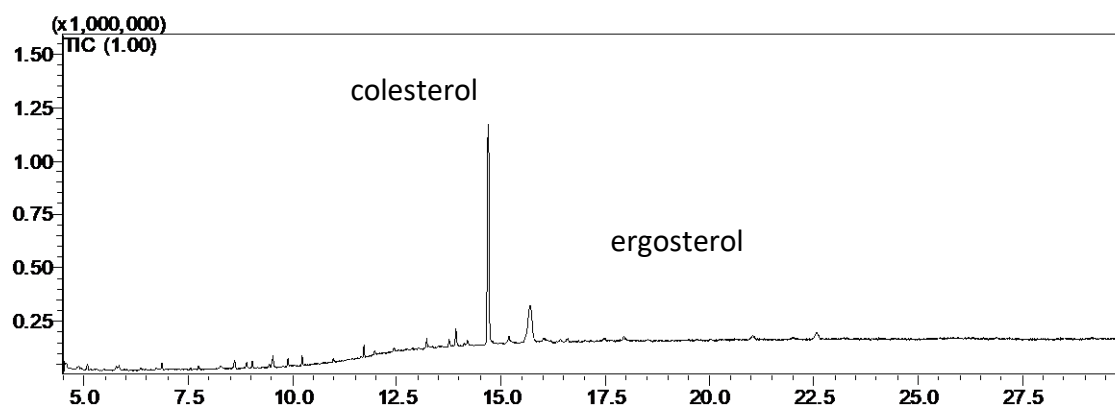
ZACCHINO, S. A., BUTASSI, E., DILIBERTO, M., RAIMONDI, M., POSTIGO, A., SORTINO, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, n. 15, p. 27-48, 2017.

ZHANG, Q. Z.; WU, N.; JIAN, D.; JIANG, R.I; YANG, C.; LAN, X. Z.; CHEN, M.; ZHANG, F. Y.; LIAO, Z. Overexpression of AaPIF3 promotes artemisinin production in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, n. 138, p. 111476, 2019.

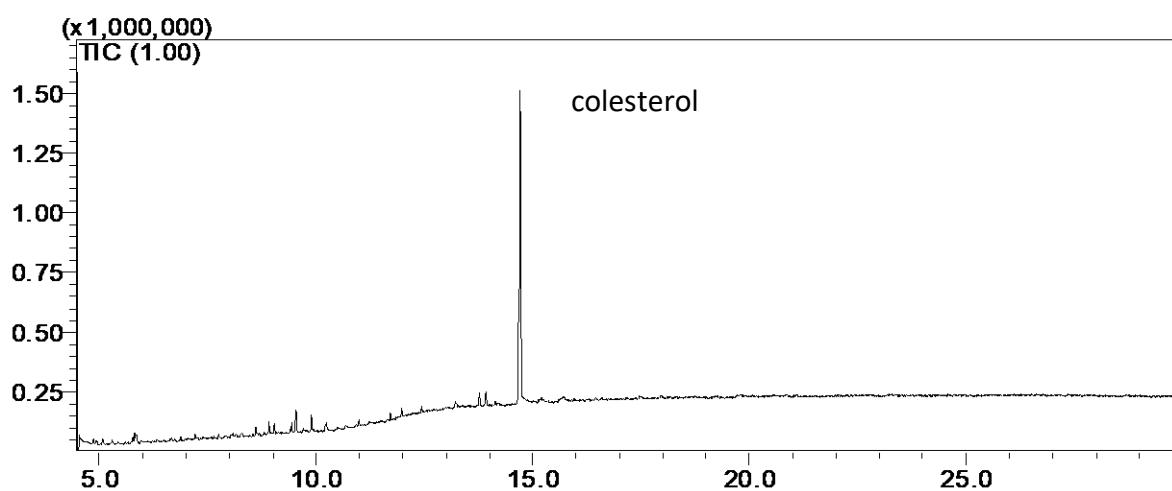
ZHOU, J. HU, T. GAO, L. SU, P. ZHANG, Y. ZHAO, Y. CHEN, S. TU, L. SONG, Y. WANG, X. HUANG, L. GAO, W. Friedelane-type triterpene cyclase in celastrol biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* and its application for triterpenes biosynthesis in yeast. **New Phytologist**, n. 2, p. 722-73, 2019.

APÊNDICE I – CROMATOGRAMAS

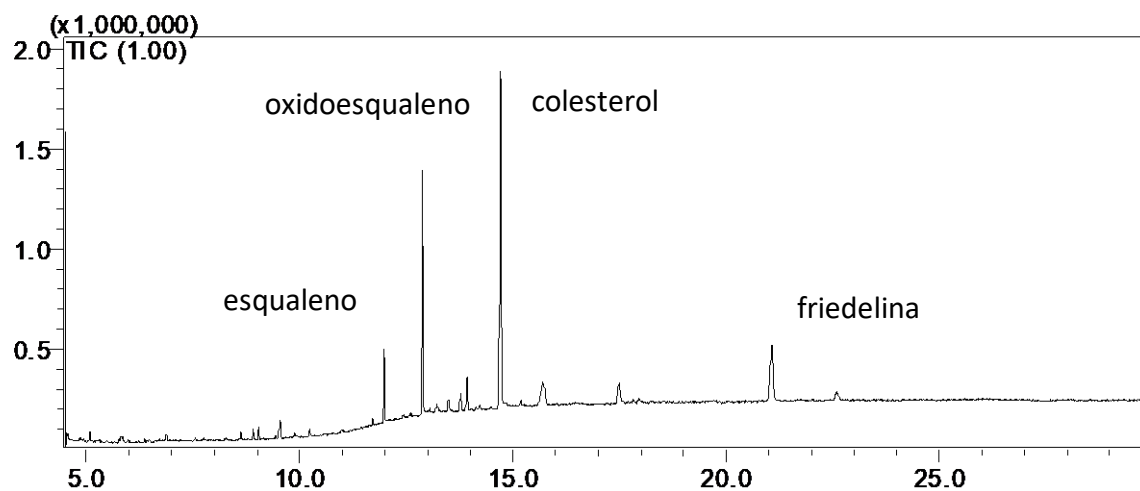
Cromatograma 1: Cromatograma da fração hexânica do vetor vazio expresso em *S. cerevisiae*.



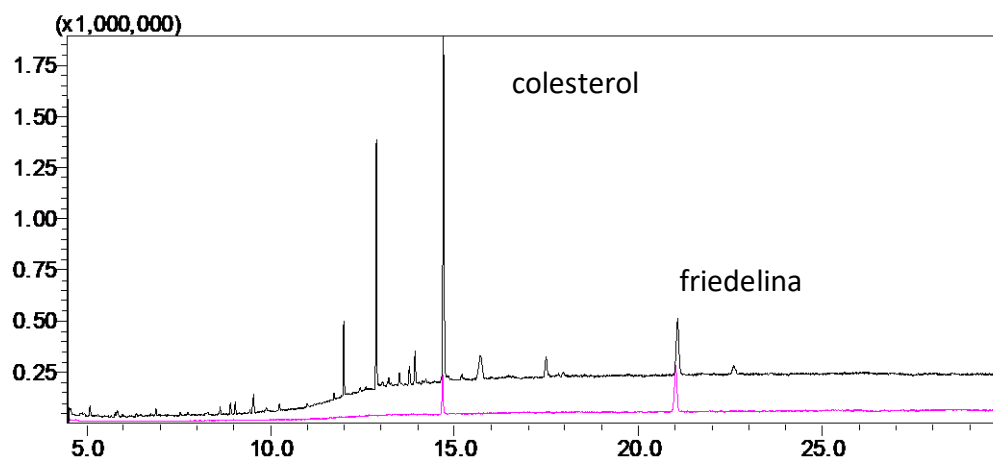
Cromatograma 2: Cromatograma da fração clorofórmica do vetor vazio expresso em *S. cerevisiae*.



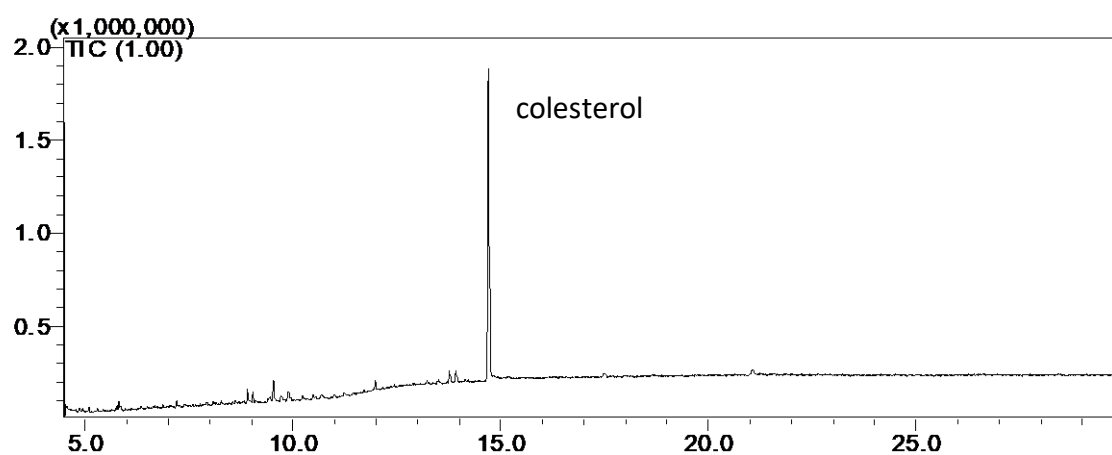
Cromatograma 3: Cromatograma da fração hexânica do gene selvagem expresso em *S. cerevisiae*.



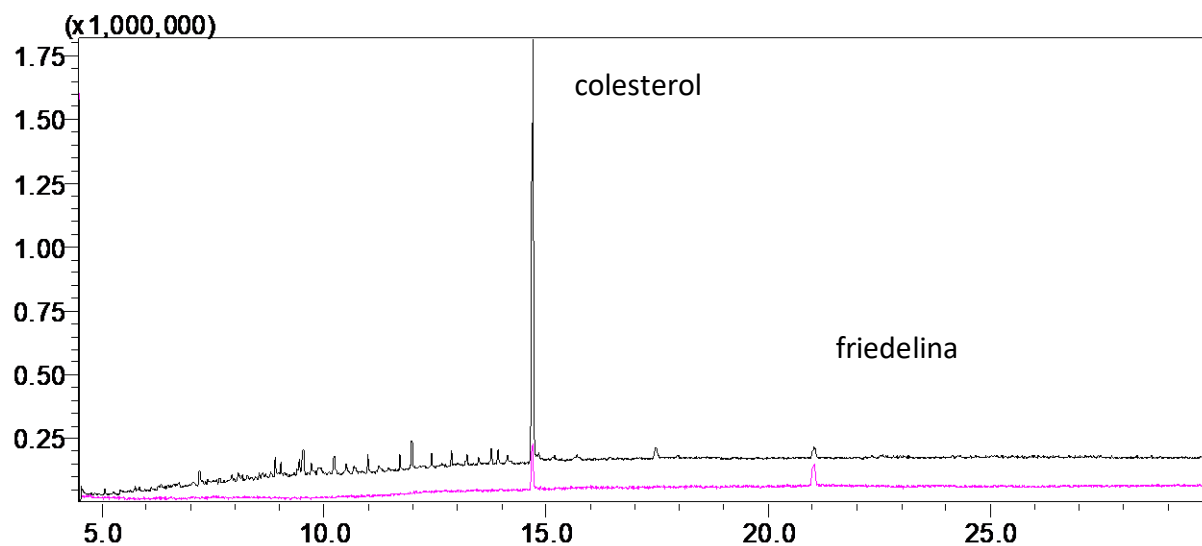
Cromatograma 4: Comparação entre os cromatograma da fração hexânica do gene selvagem expresso em *S. cerevisiae* (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa).



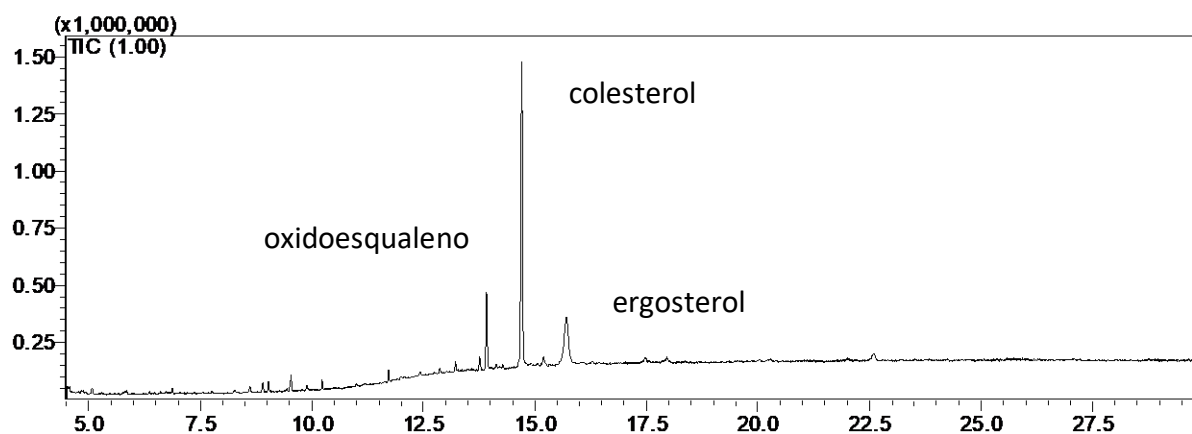
Cromatograma 5: Cromatograma da fração clorofórmica do gene selvagem expresso em *S. cerevisiae*.



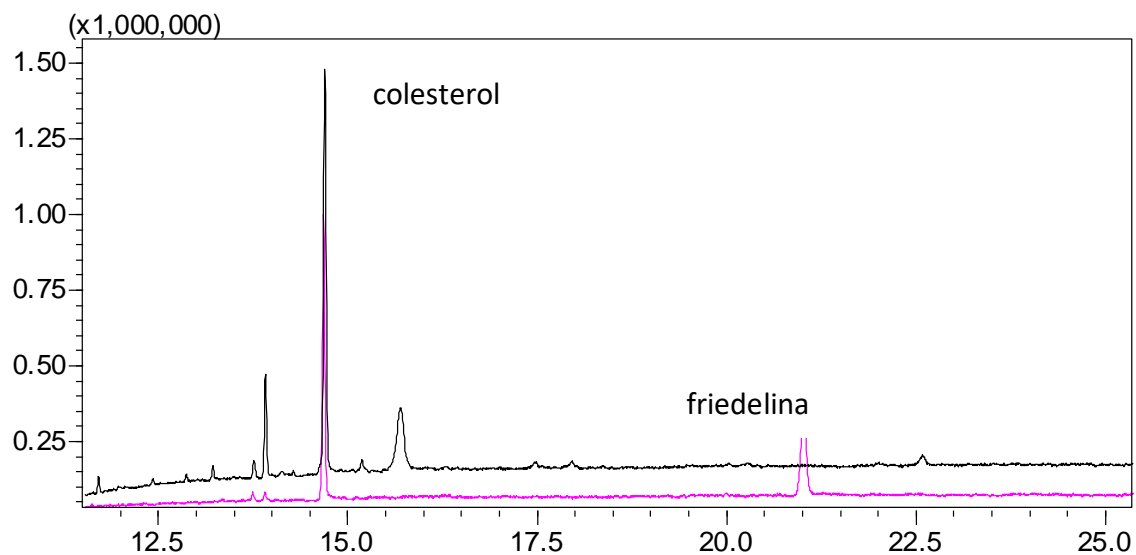
Cromatograma 6: Comparação entre os cromatograma da fração clorofórmica do gene selvagem expresso em *S. cerevisiae* (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa).



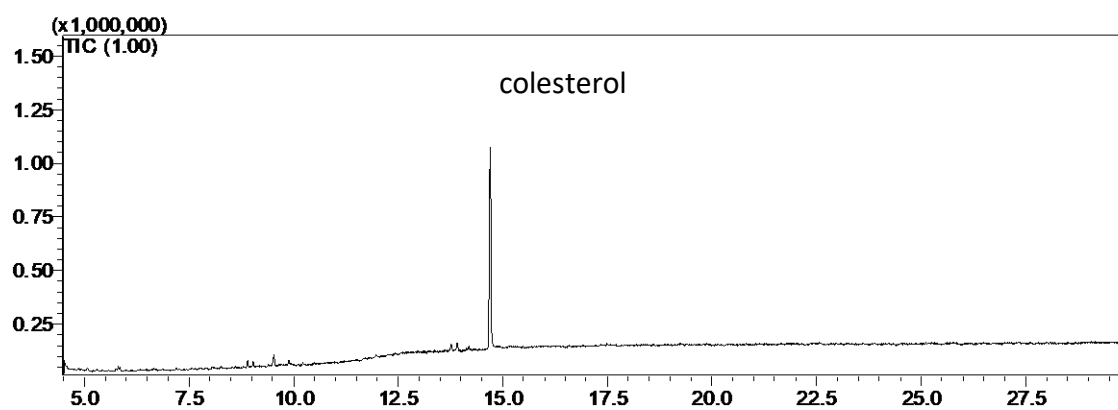
Cromatograma 7: Cromatograma da fração hexânica do mutante C369P expresso em *S. cerevisiae*.



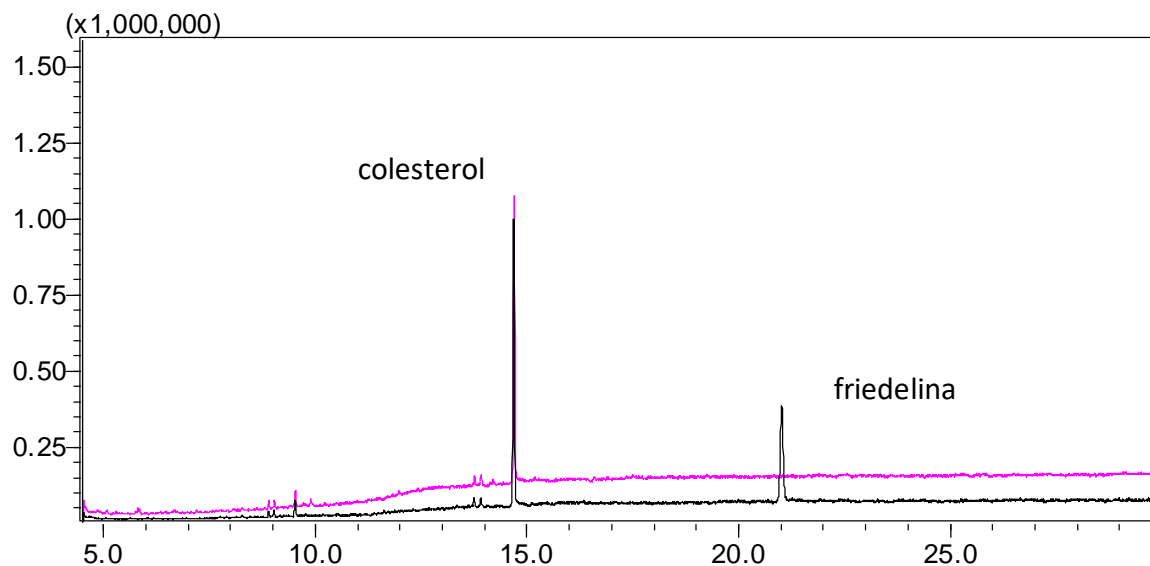
Cromatograma 8: Comparação entre os cromatograma da fração hexânica do mutante C369P expresso em *S. cerevisiae* (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa) (Ampliação).



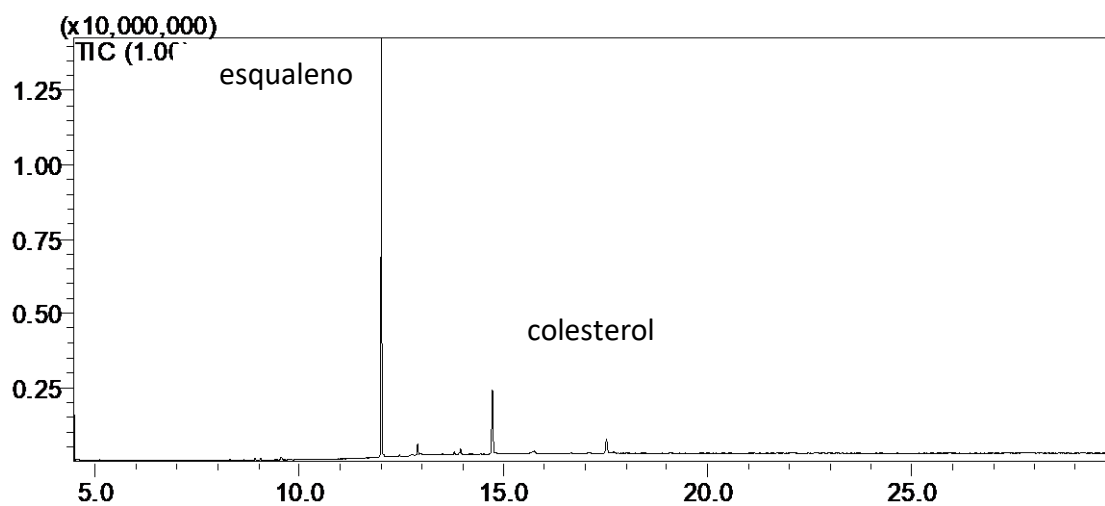
Cromatograma 9: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante C369P expresso em *S. cerevisiae*.



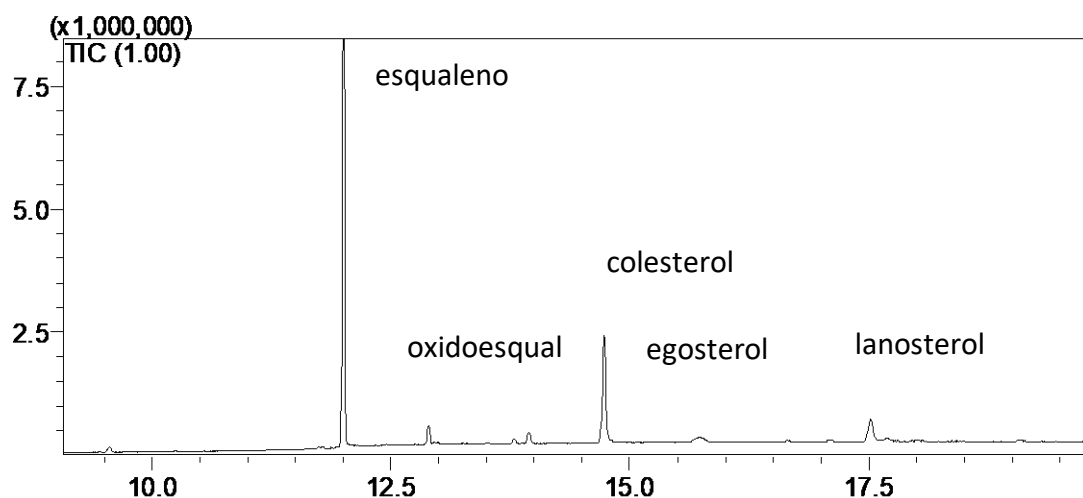
Cromatograma 10: Comparação entre os cromatogramas da fração clorofórmica do mutante C369P expresso em *S. cerevisiae* (rosa) e os padrões friedelina e colesterol (preto).



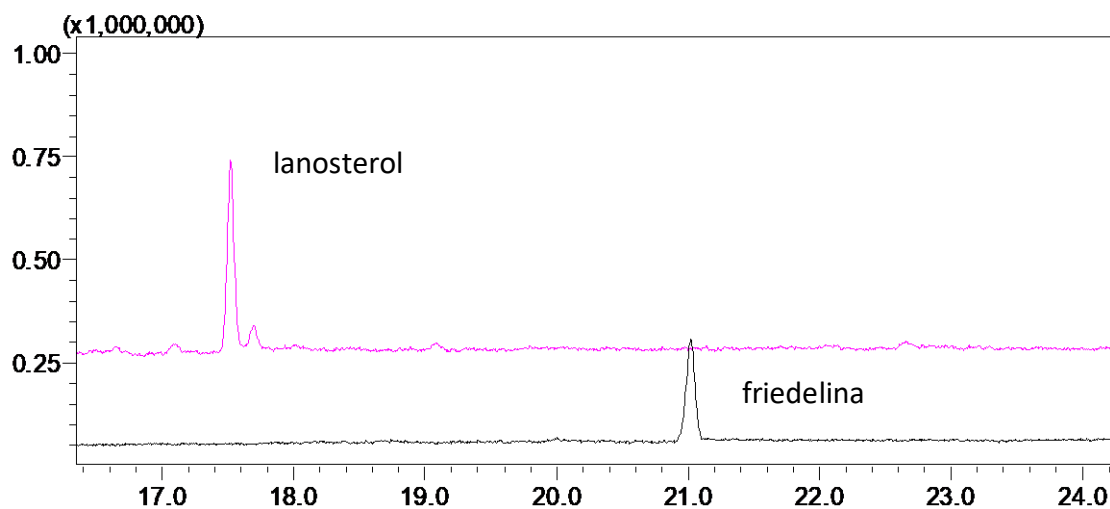
Cromatograma 11: Cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em *S. cerevisiae*.



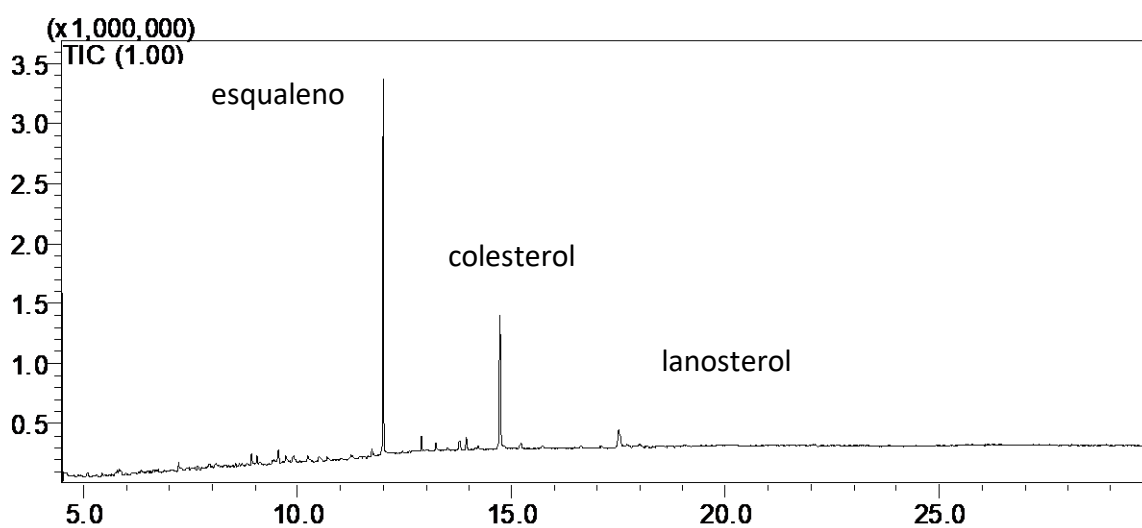
Cromatograma 12: Cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em *S. cerevisiae* (Ampliação).



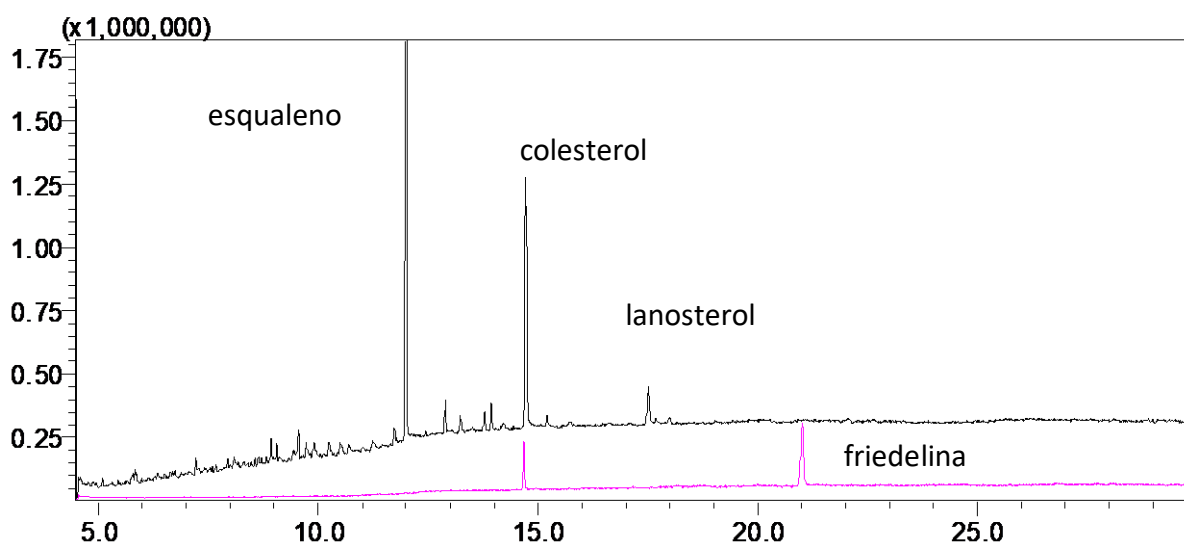
Cromatograma 13: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em *S. cerevisiae* (rosa) com o padrão friedelina (preto) (Ampliação).



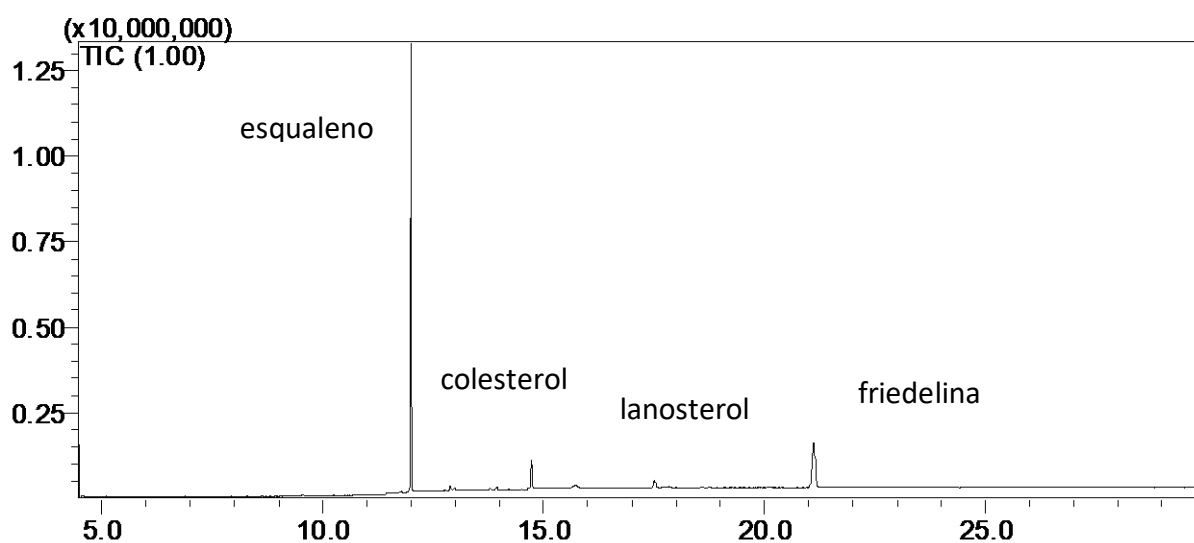
Cromatograma 14: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante F473W expresso em *S. cerevisiae*.



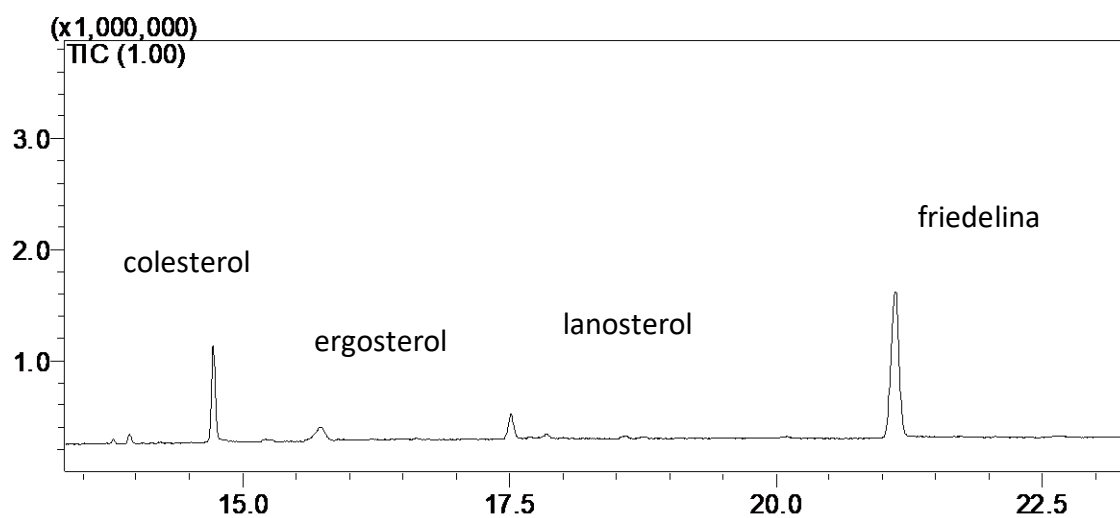
Cromatograma 15: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante F473W expresso em *S. cerevisiae* (preto) com os padrões friedelina e colesterol (rosa).



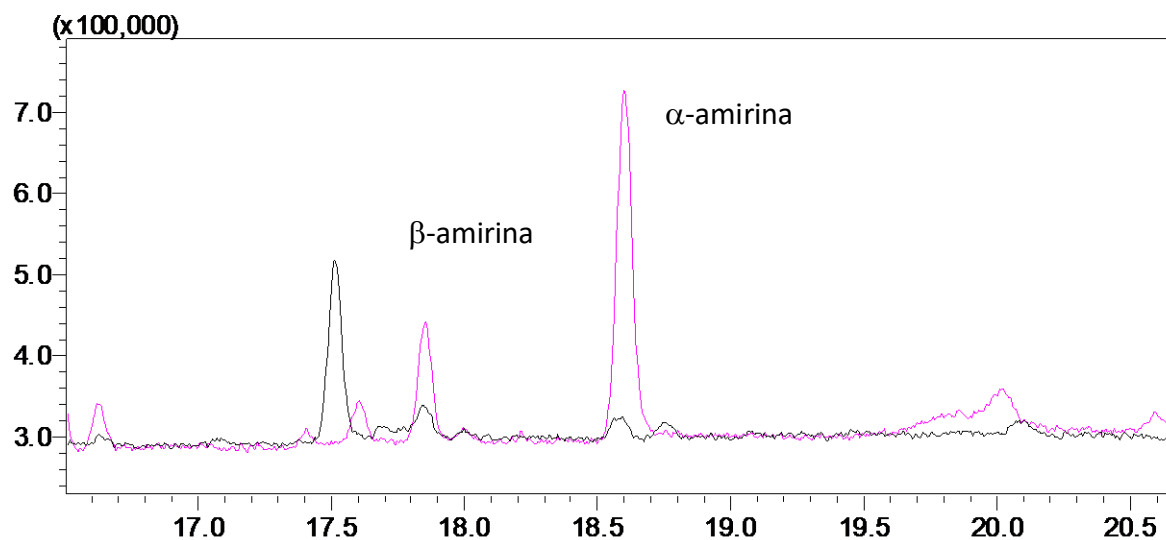
Cromatograma 16: Cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em *S. cerevisiae*.



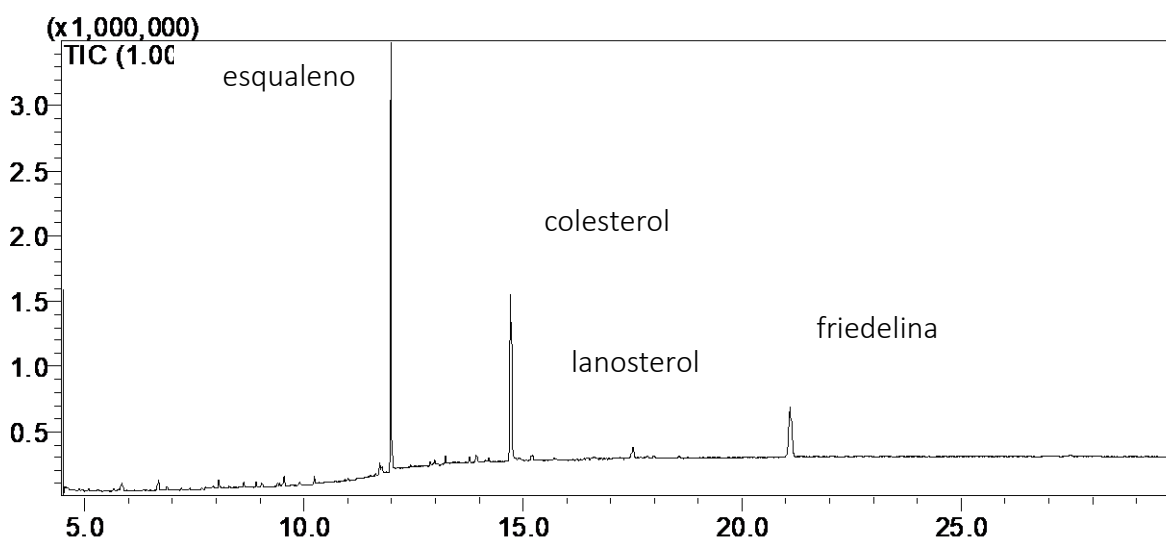
Cromatograma 17: Cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em *S. cerevisiae* (Ampliação).



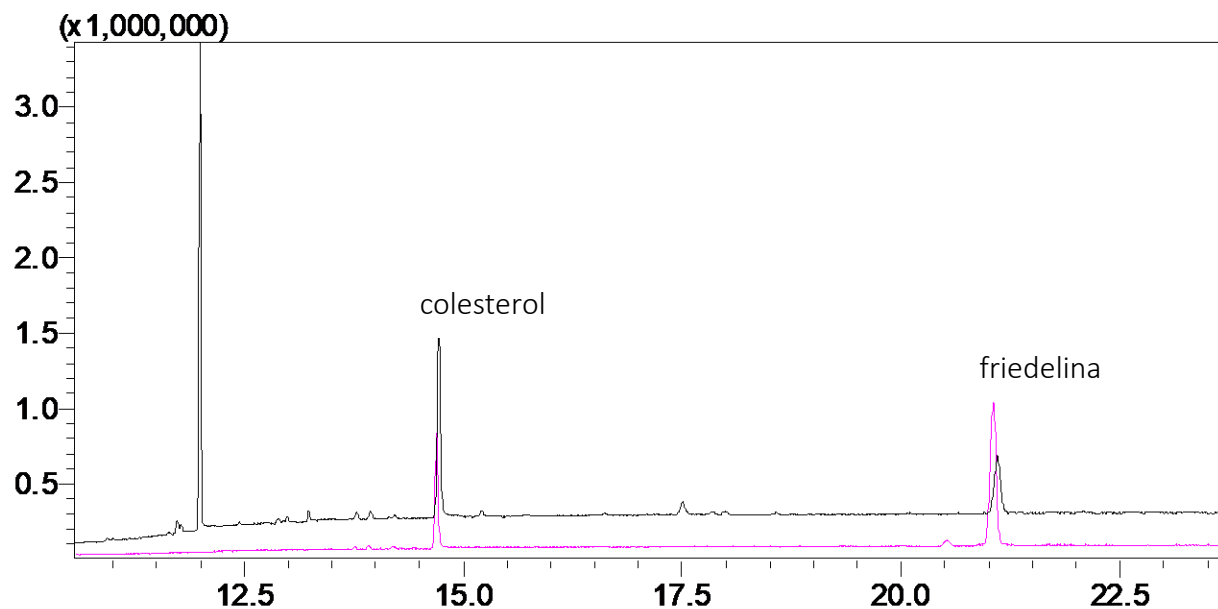
Cromatograma 18: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em *S. cerevisiae* (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).



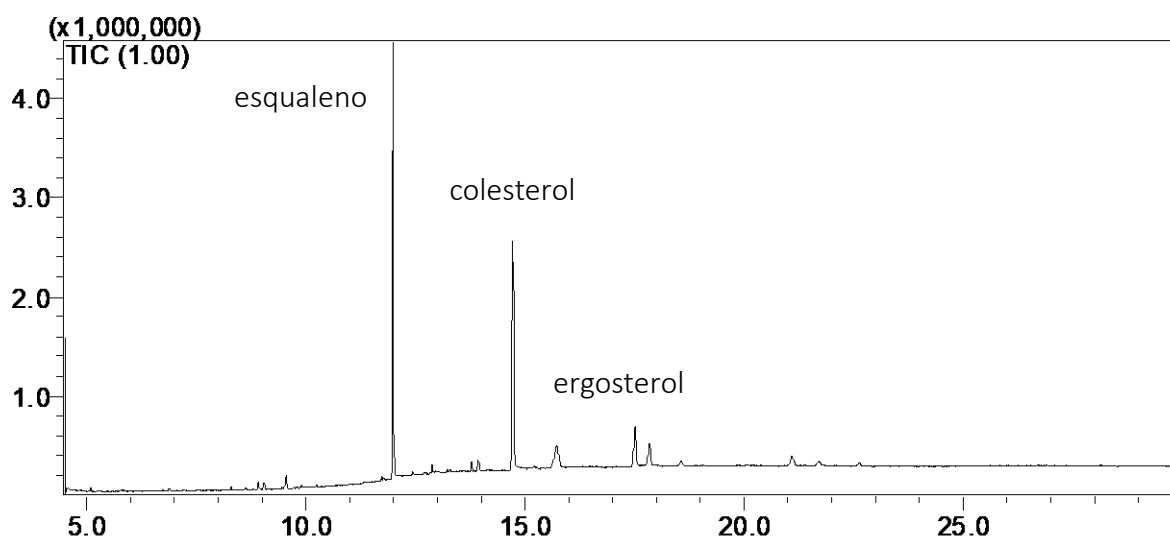
Cromatograma 19: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante M549S expresso em *S. cerevisiae*.



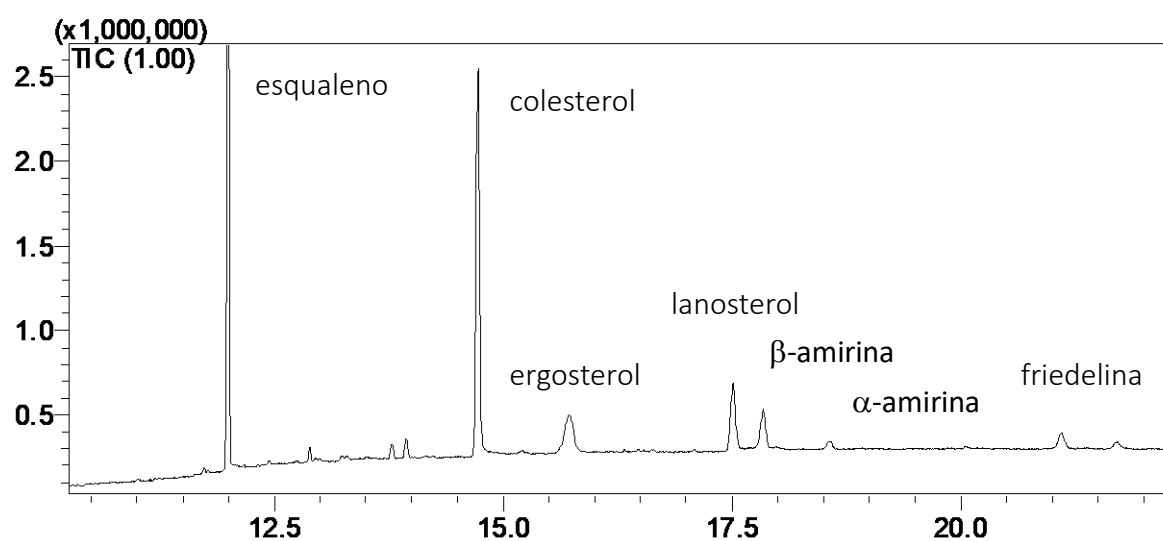
Cromatograma 20: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante M549S expresso em *S. cerevisiae* (preto) com o padrão friedelina (rosa) (Ampliação).



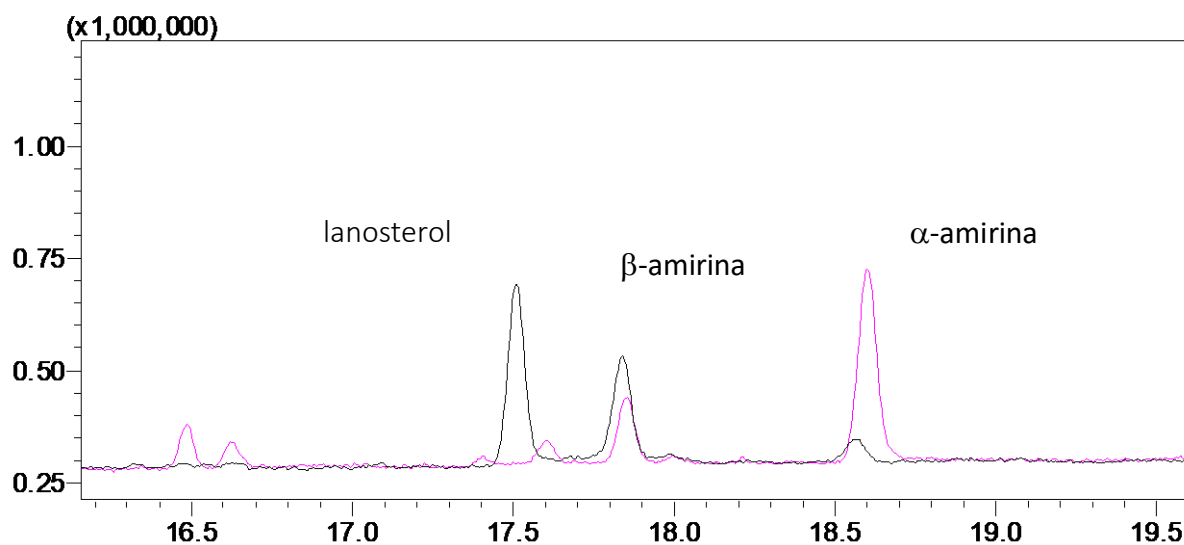
Cromatograma 21: Cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em *S. cerevisiae*.



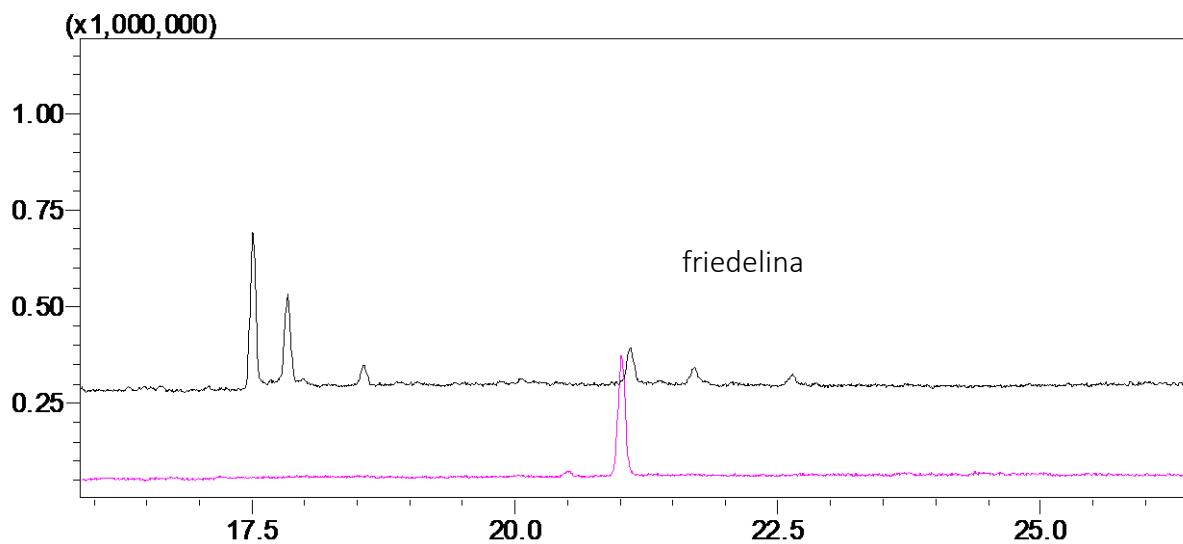
Cromatograma 22: Cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em *S. cerevisiae* (Ampliação).



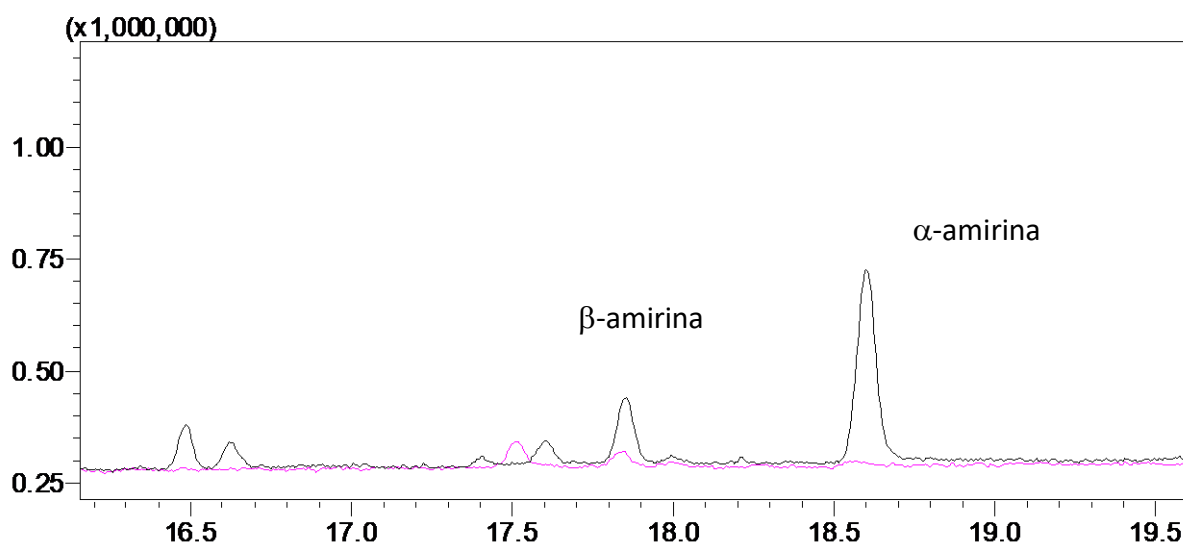
Cromatograma 23: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em *S. cerevisiae* (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).



Cromatograma 24: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em *S. cerevisiae* (preto) com o padrão friedelina (rosa) (Ampliação).



Cromatograma 25: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante L552F expresso em *S. cerevisiae* (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).



ANEXO I – Tabela com as sequências das OSCs

Tabela 1: Sequências das enzimas oxidoesqualeno ciclases usadas no alinhamento múltiplo com seu número de acesso no GenBank, espécie e função.

Número de acesso	Espécie	Função
AB257562.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidiol synthase (PEN1)
AY327541.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Talianol synthase (PEN4)
BT020456.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Marneral synthase (PEN5)
AB274959.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Triterpene synthase multifuncional (PEN6)
NM_179572.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lupeol synthase 1 (LUP1)
NM_106545.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lupeol synthase 2 (LUP2)
NM_126681.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cycloartenol synthase (CAS1)
AB263204.1	<i>Rhizophora stylosa</i>	Triterpene synthase multifuncional (RsM2)
AB289586.1	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	Lupeol synthase (BgLUS)
AB257507.1	<i>Kandelia candel</i>	Triterpene synthase multifuncional (KcMS)
DQ268869.1	<i>Ricinus communis</i>	Lupeol synthase (RcLUS)
AB058643.1	<i>Luffa cylindrica</i>	Isomultiflorenol synthase (LcIMS1)
AB037203.1	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	β -amyrin synthase (GgbAS1)
AB181244.1	<i>Lotus japonicus</i>	β - amyrin synthase (OSC1)
AB034802.1	<i>Pisum sativum</i>	β - amyrin synthase (PSY)
AF478453.1	<i>Medicago truncatula</i>	β -amyrin synthase (AMY1)
AF478455.1	<i>Lotus japonicus</i>	β -amyrin synthase multifuncional (AMY2)
AB034803.2	<i>Pisum sativum</i>	amyrin synthase mista (PSM)
AB009030.1	<i>Panax ginseng</i>	β -amyrin synthase (PNY1)
AB014057.1	<i>Panax ginseng</i>	β -amyrin synthase (PNY2)
AB055512.1	<i>Betula platyphylla</i>	β -amyrin synthase (BPY)
HM623868.1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Taraxerol synthase (KdTAS)
AB263203.1	<i>Rhizophora stylosa</i>	Triterpene synthase multifuncional (RsM1)
AB206469.1	<i>Medicago tirucalli</i>	β -amyrin synthase (EtAS)
HM623870.1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Friedelin synthase (KdFRS)
HM623869.1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Glutinol synthase (KdGLS)
HM623871.1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Lupeol synthase (KdLUS)
AB025343.1	<i>Olea europaea</i>	Lupeol synthase (OEW)
AB025345.1	<i>Taraxacum officinale</i>	Lupeol synthase (TRW)
AB181245.1	<i>Lotus japonicus</i>	Lupeol synthase (OSC3)
AB116228.1	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Lupeol synthase (GgLUS1)
AB055511.1	<i>Betula platyphylla</i>	Lupeol synthase (BPW)
AB181246.1	<i>Lotus japonicus</i>	Cycloartenol synthase (OSC5)
AB025968.1	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Cycloartenol synthase (GgCAS1)
AB009029.1	<i>Panax ginseng</i>	Cycloartenol synthase (PNX)
HM623872.1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Cycloartenol synthase (KdCAS)
AB055509.1	<i>Betula platyphylla</i>	Cycloartenol synthase (BPX1)
APG38073.1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Friedelin synthase (MiFRS)
AAA16975.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lanosterol synthase (SCLAS)
P48449.1	<i>Homo sapiens</i>	Lanosterol synthase (1W6K)
BAK52535.1	<i>Aster tataricus</i>	Shionone synthase (SHS1)
AJ311789.1	<i>Avena strigosa</i>	β -amyrin sintase (SAD1)
ART66198.1	<i>Populus davidiana</i>	Friedelin synthase (PdFRS)
AWK97810.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Friedelin synthase (TwOSC1)

AWK97811.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	β -amyrin synthase (TwOSC2)
AWK97812.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Friedelin synthase (TwOSC3)
