



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética evolutiva e Biologia Molecular

Heloisa Tavoni Longhim Peccin

**INIBIDORES DE POLIGALACTURONASE (PGIPs) ORIUNDOS DO FEIJÃO:  
PRODUÇÃO RECOMBINANTE E ESTUDOS FUNCIONAIS**

**São Carlos-SP, 2019**

**INIBIDORES DE POLIGALACTURONASE (PGIPs) ORIUNDOS DO FEIJÃO:  
PRODUÇÃO RECOMBINANTE E ESTUDOS FUNCIONAIS**

Heloisa Tavoni Longhim Peccin

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para a obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – Área de concentração em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

**São Carlos, 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Heloisa Tavoni Longhin Peccin, realizada em 01/03/2019:



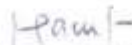
---

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva  
UFSCar



---

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira  
UFSCar



---

Prof. Dr. Mauricio Bacci Júnior  
UNESP

## **Dedicatória**

Dedico aos meus pais Marco e Marcia que nunca mediram esforços para minha criação e educação e ao meu marido Douglas que sempre esteve ao meu lado durante minha jornada profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho nessa trajetória que chamamos de vida.

Agradeço aos meus pais e minha família que sempre me incentivaram e me apoiaram em meus estudos e em minhas decisões.

Agradeço ao Douglas, meu marido, por estar sempre ao meu lado me ajudando a tornar meus sonhos realidade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, por ter acreditado em meu trabalho, ter aberto as portas de seu laboratório pra mim e ter me ensinado tantas coisas. Ao seu lado cresci profissionalmente e pessoalmente, serei eternamente grata.

Agradeço duas pessoas em especial, a Priscila Shibao, minha companheira Farmacêutica, de café e cerveja, veterana e amiga, que me apresentou para o Flávio, sendo uma das responsáveis pelo meu mestrado e que desde Ribeirão vem me aconselhando. E a Danyelle Toyama que me ajudou muito no laboratório, acredito que não exista alguém com mais paciência e que conheça mais o LBM que ela, sou muito grata às duas.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Chakra, Navenna, Célio, Valentina, Anderson, Isabela, Paty, Camilo, Adelita, que além de ajudarem no meu crescimento profissional, deixaram meus dias de trabalho mais divertidos.

Agradeço à Profa. Dra. Maria de Lourdes de Moraes Polizeli e sua aluna Vanessa Elisa Pinheiro, do departamento de biologia da FFCLRP pela colaboração.

Agradeço ao Prof. Dr Paulo Teixeira Lacava do Departamento de Morfologia e Patologia - DMP – UFSCar pela colaboração.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado durante o período de dois anos.

## RESUMO

As substâncias pécticas são componentes da lamela média da parede celular vegetal e são compostas de resíduos de ácido galacturônico, parcialmente metil-esterificados e ligados por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas. Estas substâncias são naturalmente degradadas por pectinases, como a endopoligalacturonase (PG), que é responsável pela reação de hidrólise de ligações  $\alpha$ -(1,4) da pectina. As pectinases e outras enzimas responsáveis pela degradação da parede celular das plantas (PCWDEs) têm sido extensivamente estudadas em plantas, bactérias, fungos e insetos. Como estratégia de defesa, as plantas tentam inibir a atividade enzimática dessas enzimas, produzindo inibidores de PG, os PGIPs (Polygalacturonase Inhibitor Proteins). Os PGIPs possuem uma estrutura formada por repetições ricas em leucina (LRRs), que são organizadas para formar duas folhas  $\beta$ , sendo que a folha  $\beta$ 1 contém resíduos cruciais para interação com as PGs. O alto nível de expressão dos PGIPs não previne a infecção, porém, limita significativamente a colonização do tecido pelo organismo invasor. Dentre os PGIPs mais estudados encontram-se os inibidores de poligalacturonase oriundos do feijão (*Phaseolus vulgaris*), os quais consistem em uma família de 4 genes agrupados (pvpqip1, pvpqip2, pvpqip3 e pvpqip4). Devido a aplicação de pectinases em diversos campos industriais e à importância desses inibidores, foram produzidos, neste trabalho, de forma recombinante em *Pichia pastoris*, os inibidores PvPGIP2 e PvPGIP3 do feijão, os quais foram submetidos a ensaios funcionais. Foi observada a inibição parcial da atividade da pectinase de *Aspergillus niger* pelas proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3. Além disso a PvPGIP2 inibiu parcialmente a atividade da pectinase do fungo *Neosartorya glaba*, pela primeira vez relatado na literatura. As proteínas recombinantes também foram testadas frente à pectinase do inseto *Sphenophorus levis* (SI-EndoPG), porém a atividade da mesma não foi reduzida.

**Palavras chaves:** Inibidores de poligalacturonase, Pectinase e Pectina

## ABSTRACT

Pectic substances are components of the middle lamella of the plant cell wall and are composed of partially methyl-esterified galacturonic acid residues linked by  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds. These substances are naturally degraded by pectinases, such as the endopolygalacturonase (PG), which is responsible for the reaction of hydrolysis of  $\alpha$ - (1,4) bonds of pectin. Pectinases and other enzymes responsible for cell wall degradation (PCWDEs) have been extensively studied in plants, bacteria, fungi and insects. As a defense strategy, the plants try to inhibit their enzymatic activity by producing inhibitors of PG, the PGIPs (Polygalacturonase Inhibitor Protein). PGIPs have a structure formed by leucine-rich repeats (LRRs), which are arranged to form two  $\beta$ -sheets, being that  $\beta$ 1-sheet contains residues crucial for interaction with PGs. The high level of PGIP expression does not prevent infection, however, it significantly limits colonization of the tissue by the invading organism. Among the most studied PGIPs are polygalacturonase inhibitors from the bean (*Phaseolus vulgaris*), which consist of a family of 4 clustered genes (pvpgip1, pvpgi2, pvpgi3 and pvpgi4). Due to the application of pectinases in several industrial fields and to the importance of these inhibitors, the PvPGIP2 and PvPGIP3, inhibitors of the beans were recombinantly produced in *Pichia pastoris*, which were subjected to functional assays. Partial inhibition of *Aspergillus niger* pectinase activity against recombinant proteins PvPGIP2 and PvPGIP3 were observed. In addition, PvPGIP2 partially inhibited the activity of the *Neosartorya glabra*'s fungus pectinase for the first time reported in the literature. The recombinant proteins were also tested against pectinase of the insect *Sphenophorus levis* (SI-EndoPG), but the activity of the same was not reduced.

**Keywords:** Polygalacturonase Inhibitors, Pectinase and Pectin

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição da parede celular vegetal	15
Figura 2: Estrutura péctica	16
Figura 3: Ação das pectinases na pectina	17
Figura 4: Ciclo de vida do <i>Sphenophorus levis</i>	19
Figura 5: Representação da estrutura tridimensional da PvPGIP2 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).	21
Figura 6: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZ $\alpha$ -A	25
Figura 7: Modelo de montagem do sanduíche para reação enzimática no zimograma	29
Figura 8: Alinhamento das sequências de nucleotídeos das PvPGIPs oriundas do feijão	32
Figura 9: Alinhamento das sequências das PvPGIP1 e PvPGIP2	33
Figura 10: Extração do material genético das folhas de Feijão	34
Figura 11: Amplificação dos fragmentos codificantes para PvPGIP1, PvPGIP2, PvPGIP3 e PvPGIP4	35
Figura 12: Análise das colônias DH5 $\alpha$ recombinantes	36
Figura 13: Sequências deduzidas das PGIPs expressas em <i>Pichia pastoris</i>	37
Figura 14: Análise da expressão da PvPGIP2 recombinante ao longo do tempo de 144 horas	38
Figura 15: Análise da expressão da PvPGIP3 recombinante ao longo do tempo de 144 horas	39
Figura 16: Ensaio de gel difusão em ágar - SI-EndoPG	41
Figura 17: Ensaio de gel difusão em ágar – Pectinase de <i>N. glabra</i>	44
Figura 18: Ensaio de gel difusão em ágar – Pectinase de <i>A. niger</i>	46
Figura 19: Zimograma com as pectinases dos fungos <i>A. niger</i> e <i>N. glabra</i> e com a SI-EndoPG	49
Figura 20: Ensaio de inibição enzimática da SI-EndoPG pelos inibidores PvPGIP2 e PvPGIP3 pelo método do DNS	50
Figura 21: Ensaio de atividade inibitória de PvPGIP2 frente às pectinases de <i>N. glabra</i> e <i>A. niger</i>	51



Figura Ap.1: Alinhamento das sequências primárias das proteínas AmPGIP, PvPGIP2 e PvPGIP3	<b>55</b>
Figura Ap.2: DNA extraído das folhas da Amora	<b>56</b>
Figura Ap.3: Amplificação da AmPGIP	<b>57</b>
Figura Ap.4: Análise das colônias DH5 $\alpha$ transformadas com o vetor	<b>58</b>
Figura Ap.5: Sequência completa da ScPGIP	<b>59</b>
Figuras A1.1-6: Clones Recombinantes	<b>68</b>
Figura A2: Quantificação das proteínas PvPGIP2 e PvPGIP3 recombinantes	<b>72</b>
Figura A3: Curva padrão	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ensaio de gel difusão em ágar - SI-EndoPG – PvPGIP2	42
Tabela 2: Ensaio de gel difusão em ágar - SI-EndoPG – PvPGIP3	42
Tabela 3: Análise estatística do ensaio de gel difusão em ágar - SI-EndoPG	43
Tabela 4: Ensaio de gel difusão em ágar - Pectinase <i>N. glabra</i> – PvPGIP2	44
Tabela 5: Ensaio de gel difusão em ágar - Pectinase <i>N. glabra</i> – PvPGIP3	45
Tabela 6: Análise estatística do ensaio de gel difusão em ágar- Pectinase <i>N. glabra</i>	45
Tabela 7: Ensaio de gel difusão em ágar- Pectinase <i>A. niger</i> - PvPGIP2	47
Tabela 8: Ensaio de gel difusão em ágar- Pectinase <i>A. niger</i> – PvPGIP3	47
Tabela 9: Análise estatística do ensaio de gel difusão em ágar- Pectinase <i>A. niger</i>	48
Tabela A1: Sequências utilizadas no alinhamento múltiplo das PGIPs	67
Tabela A2: Primers utilizados para a clonagem das PGIPs	67
Tabela A3: Atividade inibitória dos PGIPs de feijão genótipos BAT93 e Pinto contra PGs fúngicas e de insetos	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: absorvância

BMGY: *Buffered Glycerol-complex Medium*: Meio Complexo-Glicerol  
Tamponado

BMMY: *Buffered Methanol-complex Medium*: Meio Complexo-Metanol  
Tamponado

cm: centímetros

CTAB: *cetyltrimethylammonium bromide*

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNS: ácido 3,5 – dinitrosalicílico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfato

D.O.: densidade óptica

DTT: ditioneitol

EDPCV: enzimas de degradação de parede celular vegetal

EDTA: ácido etileno-diamino-tetra-acético

Endo-PG: Endo-poligalacturonase

g: grama

GalA: ácido galacturônico

GRAS: *Generally recognized as safe* – Geralmente reconhecido como seguro

HCl: ácido clorídrico

HG: homogalacturano

kDa: quilodalton

M: molar

mA: miliampéres

mg: miligrama

MgCl: Cloreto de Magnésio

Min: minuto

mL: mililitro

ng: nanograma

nm: nanômetros

nmol: nanômols

ORF: *open reading frame* – fase aberta de leitura

pb: pares de base

PCR: *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PCWDE: Plant cell wall-degrading enzymes - Enzimas responsáveis pela degradação da parede celular

PG: Poligalacturonase

PGIP: *Polygalacturonase-inhibiting protein* – Proteína inibidora de poligalacturonase

pH: potencial de hidrogênio

pI: ponto isoelétrico

PME: Pectina metilesterase

rpm: rotações por minuto

s: segundos

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato

SI-EndoPG: SI-Endo-poligalacturonase

SI-PME: SI-Pectina metilesterase

TAE: Tris Acetato EDTA

U: unidade enzimática

V: volts

YEPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*

YEPDS: *Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Agar*

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>14</b>
1.1. Parede celular vegetal	14
1.2. Pectina	15
1.3. Pectinases	16
1.3.1. Pectinases de <i>Sphenophorus levis</i>	17
1.3.2. Pectinases fúngicas	19
1.4. PGIPs	19
<b>2. Objetivos</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>22</b>
3.1. Produção da enzima SI-EndoPG	22
3.2. Pectinase do fungo <i>Neosartorya glaba</i>	22
3.3. Pectinase do fungo <i>Aspergillus niger</i>	22
3.4. PGIPs	22
3.4.1. Análise <i>in silico</i>	22
3.4.2. Extração de DNAs	23
3.4.3. Construção dos vetores de expressão	23
3.5. Transformação de <i>Pichia pastoris</i> e obtenção de recombinantes	25
3.6. Expressão dos inibidores em <i>Pichia pastoris</i>	26
3.7. Purificação dos inibidores	26
3.8. Ensaio funcionais	27
3.8.1. Ensaio de difusão em ágar	27
3.8.2. Zimograma	28
3.8.3. Ensaio de Atividade / Inibição Enzimática: Dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS	29

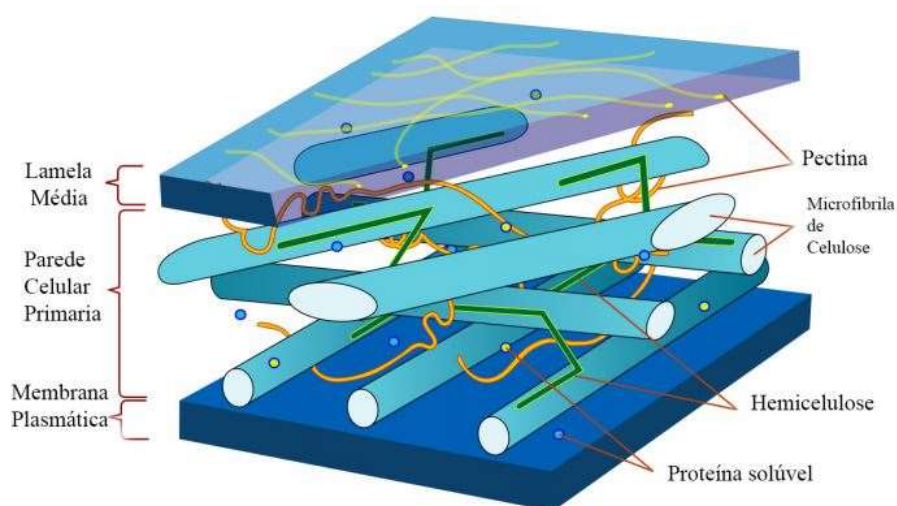
<b>4. Resultados e discussão</b>	<b>30</b>
4.1. Análises <i>in silico</i> dos PvPGIPs	30
4.2. Obtenção do material genético do feijão ( <i>P. vulgaris</i> )	32
4.3. Amplificação das regiões codificantes para PvPGIP1, PvPGIP2, PvPGIP3 e PvPGIP4	33
4.4. Construção dos vetores para expressão em <i>P. pastoris</i>	34
4.5. Transformação em <i>Pichia pastoris</i> – Obtenção de clones hiperprodutores	36
4.6. Purificação das proteínas recombinantes	38
4.7. Ensaio funcionais	39
4.7.1. Ensaio de difusão em ágar	39
4.7.2. Zimograma	47
4.7.3. Ensaio de Atividade/Inibição via determinação de açúcares redutores (DNS)	49
<b>5. Conclusões</b>	<b>52</b>
<b>6. Considerações finais e Perspectivas</b>	<b>53</b>
<b>7. Apêndice</b>	<b>54</b>
7.1. Inibidor de poligalacturonase proveniente da Amora ( <i>Morus notabilis</i> ) - AmPGIP	54
7.1.1. Análise <i>in silico</i>	54
7.1.2. Extração do DNA da Amora	55
7.1.3. Amplificação da região codificadora da AmPGIP	55
7.1.4. Obtenção do vetor para expressão da AmPGIP	56
7.1.5. Tranformação em <i>Pichia pastoris</i>	57
7.2. Inibidor de poligalacturonase proveniente da Cana-de-açúcar - ScPGIP	57
<b>8. Referências</b>	<b>59</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>66</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Parede celular vegetal

A parede celular vegetal possui funções estruturais, definindo o tamanho e formato das células e tecidos (York, 1986), além de atuar na proteção contra invasores, sendo considerada a primeira barreira física contra insetos fitófagos e micro-organismos fitopatogênicos (Preston, 1974).

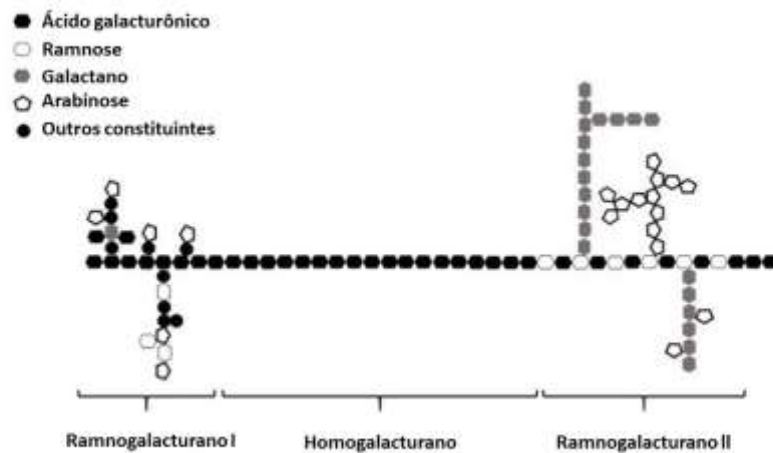
A parede celular vegetal pode ser classificada em primária ou secundária e essa classificação está relacionada à sua distância da membrana plasmática e à sua composição química (York; 1986). Dentre os componentes em maior abundância nessa estrutura celular estão a celulose, hemicelulose, lignina e pectina (Figura 1) (Preston, 1974).



**Figura 1: Composição da parede celular vegetal.** Organização dos principais componentes da parede celular vegetal em sua estrutura. Fonte modificado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3APlant\\_cell\\_wall\\_diagram-en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3APlant_cell_wall_diagram-en.svg)

## 1.2. Pectina

A pectina é um hetero-polissacarídeo que contém predominantemente resíduos de ácido galacturônico (GalA) ligados por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas, no qual proporções variáveis dos grupos ácidos estão presentes como ésteres metílicos, enquanto uma certa quantidade de açúcares neutros pode estar presente como cadeias laterais (Voragen, 2009). Ela é composta por quatro diferentes polissacarídeos: homogalacturano (HG), ramnogalacturano I (RG-I) e II (RG-II), e xilogalacturano (XGA) (Mohnen, 2008). O principal polissacarídeo da pectina é o homogalacturano (HG), o qual representa 65% da pectina em paredes celulares primárias e é um homopolímero de GalA (Figura 2) (Mohnen, 2008).



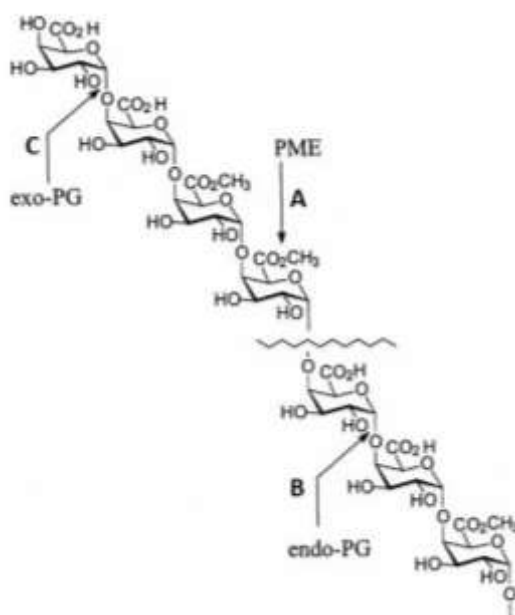
**Figura 2: Estrutura pectica.** Representação esquemática dos principais polissacarídeos da estrutura pectica: homogalacturano (HG), ramnogalacturano I (RG-I) e II (RG-II) (Fonte Ulrike, 2016 modificado)

As substâncias pecticas são componentes da parede celular vegetal e estão diretamente relacionadas com a manutenção da estrutura vegetal e com a proteção celular, ou seja, quando estas substâncias pecticas são degradadas, e isso ocorre naturalmente por ação enzimática de pectinases, grandes alterações ocorrem na célula vegetal.



### 1.3. Pectinases

As pectinases são enzimas capazes de atuar sobre substâncias pécicas. Dentre a família de pectinases encontram-se a pectilmetilesterase (PME), a qual é responsável pela remoção de grupos éster metílico, a endo-poligalacturonase (Endo-PG), que é responsável pela reação de hidrólise aleatória de ligações  $\alpha$ -(1,4) e a Exo-poligalacturonase (Exo-PG) que hidrolisa as penúltimas ligações glicosídicas e liberam unidades de ácido digalacturônico (Figura 3) (Reignault, et al., 1994; Crelier, et al., 2001 e Evangelista, et al., 2015).



**Figura 3: Ação das pectinases na pectina. A-** PME catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da cadeia principal; **B-** endo-PG rompe as ligações glicosídicas internas da cadeia de modo randômico, **C-** exo-PG age sobre os monômeros terminais da cadeia (Fonte Limberg, 2000 modificado).

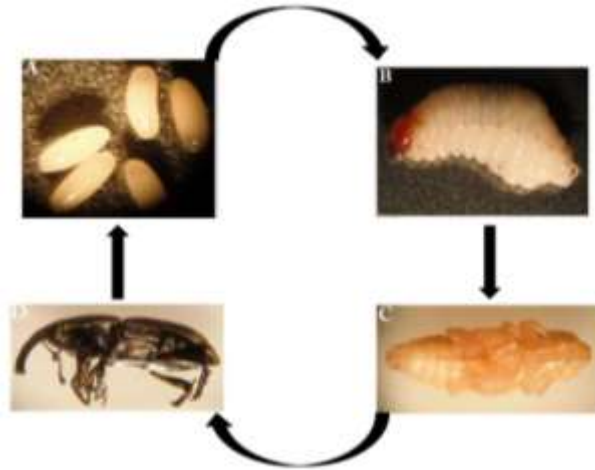
As pectinases e outras enzimas responsáveis pela degradação da parede celular das plantas (PCWDEs) têm sido extensivamente estudadas em plantas, bactérias e fungos. As pectinases vegetais estão relacionadas principalmente com o crescimento vegetal e amadurecimento de frutos (Gonzalez; et al., 2010). Já os fitopatógenos utilizam a pectina vegetal como fonte de energia por meio da degradação mediada por estas enzimas (Kirsch, 2016).

Há alguns anos, acreditava-se que a presença de pectinases em insetos tinha origem endossimbiótica. Entretanto, estudos mostraram que alguns invertebrados, incluindo insetos, também podem sintetizar essas enzimas (Watanabe et al. 1998; Girard and Jouanin, 1999; Watanabe and Tokuda, 2001, 2010; Allen and Mertens, 2008; Celorio-Mancera Mde, et al. 2009; Willis et al., 2011; Evangelista, et al., 2015). Já foi relatada a presença de pectinases em insetos da família *Miridae*, bicho-pau e besouros, este último nos dois grupos: *Chrysomelidae* (besouro de folha, besouro de longos-chifres) e *Curculionidae* (weevils) (Allen, 2007; Hull et al., 2013; Pauchet et al., 2014, 2010, 2009; Shen et al., 1996; Evangelista, et al., 2015; Kirsch, 2016).

### **1.3.1. Pectinases de *Sphenophorus levis***

O besouro *Sphenophorus levis* (Coleptera, Curculionidae), popularmente conhecido como “bicudo da cana”, foi identificado em 1978 (Vaurie, 1978) e tornou-se uma das principais pragas desta planta no Brasil, principalmente nos canaviais do estado de São Paulo e de regiões de Minas Gerais (Gallo et al., 2002).

*S. levis* é um inseto de hábitos noturnos, com tamanho adulto variado entre 8 a 14 mm (Figura 4D), e tamanho larval de cerca de 15 mm (Figura 4B) (Vaurie, 1978). A fêmea adulta utiliza a mandíbula para abrir pequenos orifícios na base do colmo onde deposita os ovos (Figura 4A), os quais após eclodirem liberam as larvas (Figura 4B). É durante a fase larval que este inseto causa maiores danos a cultura. As larvas atacam o interior do rizoma, abrindo galerias na base da brotação, gerando graves danos à planta e em alguns casos, até a sua morte.



**Figura 4: Ciclo de vida do *Sphenophorus levis*.** A: Ovos; B: Larva de aproximadamente 30 dias de idade; C: Pupa; D: Inseto adulto. (Fonte Fonseca, 2012; Laboratório de Biologia Molecular Dep. Genética e Evolução).

A ação da larva causa prejuízos econômicos em razão da redução da produtividade e longevidade do canavial (Izzepi, et al., 2014). Apesar de várias estratégias serem aplicadas para controlar a incidência e proliferação de *S. levis*, como o manejo integrado, utilização de controles biológicos e inseticidas químicos, nenhuma obteve sucesso, uma vez que as larvas permanecem dentro da planta e os insetos adultos em baixo da terra, tornando mais difícil o seu controle (Rinke, et al., 2011).

Nosso grupo construiu e sequenciou uma biblioteca de cDNA de larvas *S. levis* (Fonseca, 2012) afim de estabelecer estratégias moleculares para o controle deste inseto. As análises das sequências revelaram a presença, no inseto, de duas pectinases: Uma pectilmetilesterase (PME) (GenBank: KF697077) e uma endopoligalacturonase, endo-PG (GenBank: KF697078) denominadas SI-PME e SI-endoPG, respectivamente. A SI-endoPG é uma glicoproteína provavelmente secretada de aproximadamente 36 kDa, que possui quatro sítios de N-glicosilação e apresenta similaridade com as sequências de pectinases de outros insetos pragas como *S. oryzae*, *D. ponderosae*, *Chysomela tremula*, *Gastrophysa viridula*, *Leptinotarsa decemlineata* e *Phaedon cochleariae* (todos com máxima identidade maior que 49%) (Fonseca, 2012 e Evangelista, et al., 2015).

### 1.3.2. Pectinases fúngicas

O uso de pectinases tem aumentado consideravelmente com grande enfoque nas indústrias de alimentos, têxtil e de papel de celulose (Bhat, 2000). Atualmente, pectinases são as enzimas mais importantes nas indústrias de processamento de alimentos, principalmente para extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos (Akhter,2011).

Geralmente, as preparações enzimáticas usadas na indústria alimentícia são de origem fúngica, por estes microorganismos serem potentes produtores destas enzimas (Akhter,2011; Marie K. W. Sin, et al., 2002; Abe, J. et al., 1988; Aguilar and Huitron, 1987).

As preparações enzimáticas comerciais são geralmente produzidas com fungos filamentosos, especialmente *Aspergillus niger*, uma vez que o mesmo é considerado como não patogênico e na produção de alguns compostos tem o estatuto de GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Este fungo secreta sete endopoligalacturonases, as quais são altamente homólogas (endopoligalacturonases I, II e A - E) (van Pouderoyen, 2003) e possuem massa molecular entre 30 e 60 kDa (Singh, S. A. e Appu Rao, 2002).

Ainda dentro dos fungos filamentosos, encontra-se o gênero *Neosartorya*. A espécie *Neosartorya glabra* foi recentemente descrita e por isso apresenta poucos estudos acerca dela, entretanto é sabido que *N. glabra* é um bom produtor de enzimas pectinolíticas, e apresenta uma endopoligalacturonase de aproximadamente 72,44 KDa (Pinheiro, et. al, 2017).

### 1.4. PGIPs

As PGIPs são proteínas inibidoras de poligalacturonases. Elas são naturalmente produzidas pelas plantas como forma de defesa a fatores exógenos. Sua estrutura é composta por motivos formados por repetições ricas em leucina (LRRs) que são organizadas para formar duas folhas  $\beta$  (figura 5). Uma das folhas (folha B1) ocupa o lado interior côncavo do inibidor e contém resíduos cruciais para interagir com PGs (Di Matteo et al., 2003 e Kalunke et al., 2015). Além de reduzir o potencial agressivo das PGs, os PGIPs favorecem a formação de oligogalacturonídeos de

cadeia longa (OGs), capazes de induzir respostas de defesa da planta (De Lorenzo et al., 2001). O importante papel do PGIP na defesa das plantas tem sido demonstrado pela superexpressão de seus genes em várias espécies de plantas, sendo que o gene de escolha pode ser endógeno ou proveniente de outra espécie (Kalunke, et al., 2015).



**Figura 5: Representação da estrutura tridimensional do PvPGIP2 (PGIP2 de *Phaseolus vulgaris*).** Os domínios N-terminal e C-terminal ricos em cisteína são apresentados em verde. A folha  $\beta$ , B1 ocupa a face côncava (azul), uma matriz regular caracteriza a face convexa (vermelha), e uma segunda folha  $\beta$  não regular (B2; ciano) é encontrada entre as duas faces (Maulik, et al, 2009).

A primeira planta transgênica obtida utilizando um gene codificante para um PGIP, e testada contra microrganismos patogênicos, foi o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) expressando PvPGIP1 de *P. Vulgaris* (Kalunke, 2015). O tabaco, no entanto, foi a planta mais utilizada para testar o efeito da expressão de PGIP sobre patógenos. A expressão constitutiva e em alta quantidade de Pvpqip2 (*P. vulgaris*), Vvpqip1 (de *V. vinifera*), Capqip1 [de pimenta (*Capsicum annum*)] e Brpqip2 (Rapa) foram obtidas em tabaco transgênico, e as plantas que expressam PvPGIP2 mostraram redução de 35% dos sintomas causados pelo fungo *Botrytis cinerea* (Manfredini et al., 2005, Kalunke, 2015). Os resultados relatados por Kalunke 2015 indicam claramente que PGIP é útil para melhorar a resistência em diferentes espécies de culturas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral do projeto**

O presente projeto teve como objetivo principal a produção recombinante de inibidores de endopoligalacturonases provenientes do feijão (*Phaseolus vulgaris*), para avaliar a atividade inibitória destes sobre uma PG (SI-EndoPG) do inseto *Sphenophorus levis*, e sobre PGs fúngicas.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Extração do material genético de *Phaseolus vulgaris*;
- Amplificação das regiões codificadoras para as PGIPs e clonagem em vetor de expressão em *Pichia Pastoris*;
- Transformação em *P.pastoris* das construções realizadas e isolamento de transformantes hiperprodutores;
- Produção e purificação dos inibidores;
- Ensaio de atividade inibitória dos PGIPs produzidos frente à SI-EndoPG;
- Ensaio de atividade inibitória dos PGIPs frente a pectinases fúngicas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Produção da enzima SI-EndoPG**

A enzima SI-EndoPG foi produzida em *Pichia pastoris*, como descrito por Evangelista, 2012. Desse modo, cresceu-se as células do clone desta enzima em 25 mL de meio BMGY por 24h a 250 rpm, em seguida utilizou-se dos 25 mL para inocular 500 mL de meio BMGY, o qual incubou-se por 24h a 250 rpm. Posteriormente realizou-se a precipitação das células e troca do meio por 100 mL de meio BMMY. Incubou-se por 144h a 250 rpm adicionando-se metanol absoluto ao meio em uma concentração final de 0,75%. Após término das 144h o meio foi separado das células por centrifugação, filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Milipore) e purificado.

A purificação por cromatografia por afinidade foi conduzida a partir de coluna de resina sílica carregada com 5 mL de níquel (His-Link, Promega), na qual as proteínas ficam aderidas pela cauda de histidina. Para a coleta das proteínas, lavou-se a coluna com soluções tampão de concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). Após coleta, as amostras foram analisadas em SDS PAGE 12%, por onde se selecionou para diálise as frações que apresentaram maiores concentrações da proteína desejada.

A diálise foi realizada via membrana de diálise (PIERCE 3,500 MWCO) em tampão 10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl pH 7,5 em uma proporção proteína/tampão de 1:1000 (V/V). O processo foi realizado sob leve agitação a 4 °C. As proteínas dialisadas foram armazenadas em tubos falcon a 4 °C, após filtradas em membrana 0,45 µm (Milipore) sob condições assépticas. Foi realizada a quantificação proteica das frações dialisadas por kit BCA (Thermo Scientific), segundo instruções do fabricante.

#### **3.2. Pectinase do fungo *Neosartorya glabra***

A enzima foi produzida no laboratório da Profa Dra Maria de Lourdes de Mores Polizeli, do departamento de biologia da FFCLRP – USP, e o extrato contendo a enzima foi gentilmente cedido para a realização dos ensaios.

### **3.3. Pectinase de *Aspergillus niger***

A pectina de *A. niger* utilizada nos ensaios foi adquirida comercialmente. A enzima é da marca Sigma-Aldrich® (número de catálogo 17389).

### **3.4. PGIPs**

#### **3.4.1. Análise *in silico***

As sequências codificantes para PvPGIP1, PvPGIP2, PvPGIP3 e PvPGIP4 foram traduzidas em sequências de aminoácidos, as quais foram avaliadas quanto à massa molecular, pI, presença de peptídeo sinal e sítios de glicosilação pelos softwares disponíveis on-line SIGNALP 4.0 (Petersen, 2011), NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 1.0 (Gupta, 1999). Realizou-se também o alinhamento múltiplo dessas sequências, pelo software on-line Multialin (Corpet, 1988).

#### **3.4.2. Extração de DNAs**

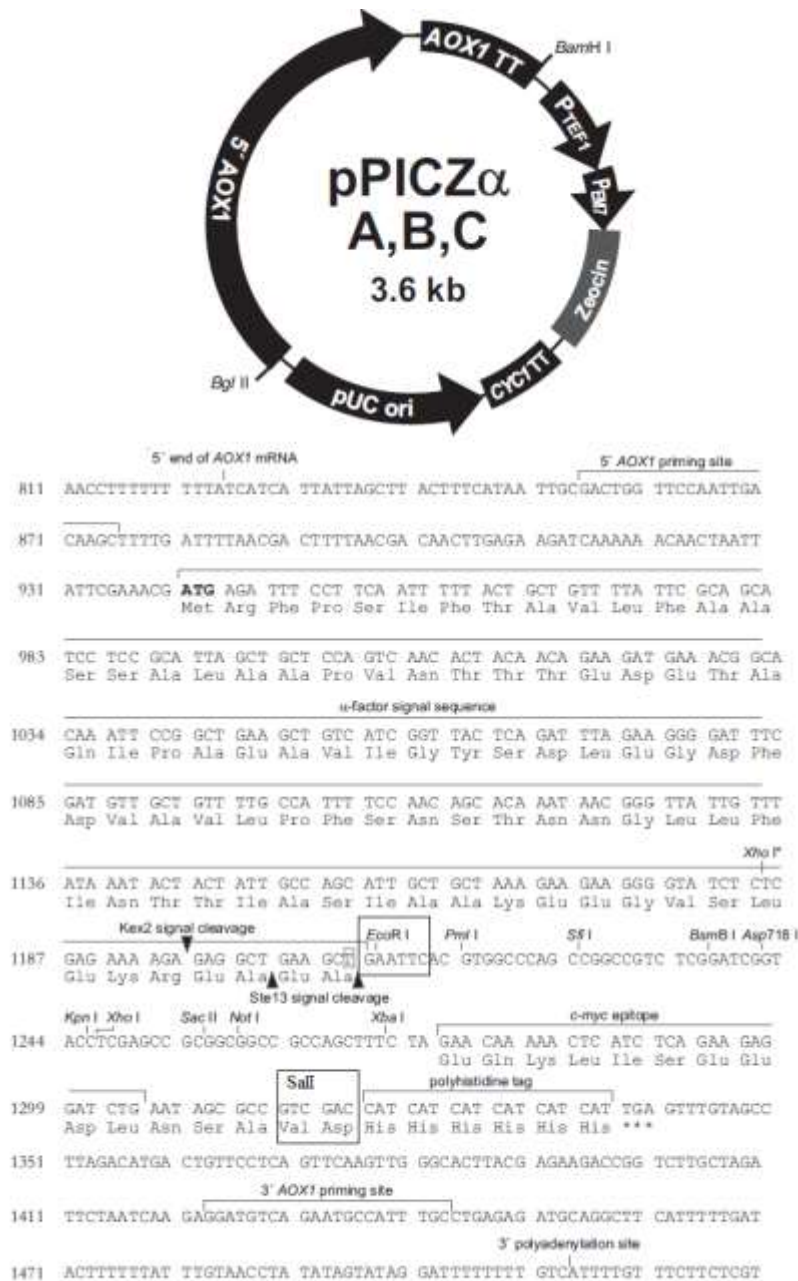
As sementes de *Phaseolus vulgaris* subtipo Pinto foram tratadas como descrito por D'Ovidio et al. (2004). Basicamente, as sementes foram cultivadas e após a germinação as folhas foram utilizadas para extração de DNA, a qual foi realizada utilizando reagente TRIzol® segundo protocolo do fabricante. A concentração de DNA foi determinada por análise densitométrica das bandas de DNA após eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C e posteriormente utilizado para a amplificação dos genes que codificam as PGIPs.

#### **3.4.3. Construção dos vetores de expressão**

As ORFs (Open Reading frames) foram amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), excluindo as regiões do peptídeo sinal. Foram desenhados primers específicos contendo sítios para as enzimas de restrição EcoRI e Sall (Tabela A1). Os sítios de restrição correspondem aos mesmos do vetor de expressão pPicZ $\alpha$ -A (Figura 6), e direcionam a inserção das ORFs de modo a mantê-las em fase com a



sequência do fator-alfa e da cauda de histidina.



**Figura 6: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZ $\alpha$ -A.** Os retângulos pretos indicam os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *Sall*, utilizadas na clonagem. (Modificado de: Easysselect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen)).

A PCR foi realizada com aproximadamente 50 ng de DNA; 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1x PCR buffer (20 mM Tris HCl, pH 8.4; 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 50 mM de KCl); 0,4 mM de cada primer e 1 U de DNA polimerase em uma reação de 25 µL. A ciclagem utilizada foi de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, e 2 min a 72°C; com uma etapa final de 4 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e TAE 1X, as bandas correspondentes à massa molecular esperada foram recortadas e purificadas em kit PCR Clean-up Kit (Promega).

Os *amplicons* purificados e os plasmídeos de expressão foram tratados com as enzimas de restrição EcoRI e Sal I seguindo as instruções do fabricante (Fermentas). Os produtos digeridos foram avaliados em gel de agarose 1% e TAE 1X, purificados por Kit e quantificados em Nanodrop spectrophotometer (NS-1000). Posteriormente, realizou-se a ligação dos *amplicons* com o plasmídeo em uma proporção 3:1 (inserto:plasmídeo), 1X tampão de ligação e 1U de T4 DNA Ligase (Invitrogen), por 14 horas a 16 °C. As misturas de ligação foram utilizadas para transformar células de *E.coli* DH5 alfa competentes, as quais foram plaqueadas em placas contendo o antibiótico Zeocina. Os clones recombinantes foram selecionados por meio de PCR de colônia, utilizando os mesmos primers utilizados para amplificação dos fragmentos gênicos.

As colônias recombinantes foram multiplicadas em meio LB *broth low salt* com 25 µg/ml de Zeocina e foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o método de lise alcalina. Para confirmar a correta inserção em fase do gene no plasmídeo, os vetores recombinantes foram sequenciados em sequenciador MegaBACE 1000 Flexyble.

### **3.5. Transformação de *Pichia pastoris* e obtenção de recombinantes**

Foram produzidas células competentes da cepa X-33 segundo o manual EasySelect™ *Pichia*Expression kit (Invitrogen). A transformação das células competentes foi realizada a partir do vetor recombinante purificado e previamente linearizado com a enzima de restrição *Pme* I (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1 µg de vetor linearizado foi

adicionado em 40 µl de células competentes, após a homogeneização, as células foram incubadas em gelo por 5 min. Em seguida, as células foram eletroporadas em cubetas de 0,2 cm a 1,5 Kv, 25 mFe 200 Ω. Foi adicionado 1 ml de sorbitol 1M, e foi incubado a 30 °C por 2 h sem agitação. Posteriormente as células crescidas foram inoculadas em placa de Petri contendo meio YEPDS acrescidos de 100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml de Zeocina.

As colônias isoladas foram homogeneizadas em solução SDS 0,2% e aquecidas por 3 min a 90 °C. Foi realizada uma PCR de colônia com 2 µl da solução fervida com DNA molde e 0,1% de Triton x-100 acrescidos na reação final. O resultado da PCR foi analisado em gel de agarose 1% e as colônias recombinantes para o gene de interesse foram selecionadas para screening de expressão em pequena escala.

### **3.6. Expressão dos inibidores em *Pichia pastoris***

O screening de expressão foi realizado em placa 24-deep-well, como descrito por Boettner *et al.* (2002), com modificações. Para a indução, uma pequena quantidade de massa celular foi crescida em 3 mL de meio complexo com glicerol tamponado (BMGY), por 48 horas, a 30 °C e 250 RPM. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação na centrífuga (Eppendorf 5810r), por 5min a 1500 g e o sobrenadante foi substituído por 2 mL de meio complexo com metanol tamponado (BMMY). Isso foi repetido em intervalos de 24 horas até o tempo de 144 horas. Metanol absoluto foi adicionado a uma concentração final de 0,75% a cada intervalo. Após o término das 144 h o meio foi centrifugado por 5 min a 4450 rpm, 4°C e filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Millipore) e a proteína submetida à purificação.

### **3.7. Purificação dos inibidores**

Considerando que as proteínas possuíam um his-tag em sua extremidade C-terminal, a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em uma coluna de 5mL contendo resina carregada com níquel Ni-NTA agarose (Qiagen). Anteriormente à purificação da enzima, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão de equilíbrio (10 mM de Tris, 50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> monohidratado, 100 mM de NaCl pH

8), em seguida, o sobrenadante foi passado pela coluna, e posteriormente, esta foi lavada com 3 volumes do mesmo tampão de equilíbrio, para retirar qualquer impureza que houvesse na coluna. Para a coleta das proteínas, a coluna foi lavada com soluções tampão de concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 75, 100 e 250 mM). Após a coleta, alíquotas de 10 µL das amostras foram analisadas em SDS PAGE 12%.

A diálise foi realizada utilizando membranas de diálise (VISKASE, 14000 MWCO) em tampão 20 mM acetato de sódio pH 5 em uma proporção amostra com proteína/tampão de 1:1000 (V/V). O processo foi realizado sob leve agitação a 4°C. Depois disso, o produto dialisado foi filtrado em membranas 0,45 µm (Millipore) sob condições assépticas.

As proteínas foram quantificadas comparando-as com quantidades conhecidas da proteína BSA. Foram aplicados em um SDS-PAGE 10% cinco quantidades conhecidas da proteína BSA (0,039 – 0,625 µg) e volumes conhecidos do sobrenadante da indução dos inibidores e da enzima SI-EndoPG. Após o processo de eletroforese, o gel foi corado e descorado e posteriormente a imagem do gel foi utilizada para o cálculo da quantidade de proteínas através do software ImageJ 1.51k (RASBAND, 2012) (Figura A2). Não foi possível realizar a quantificação proteica dos inibidores por kit BCA (Thermo Scientific), uma vez que as proteínas foram quantificadas a partir do sobrenadante da indução.

### **3.8. Ensaios funcionais**

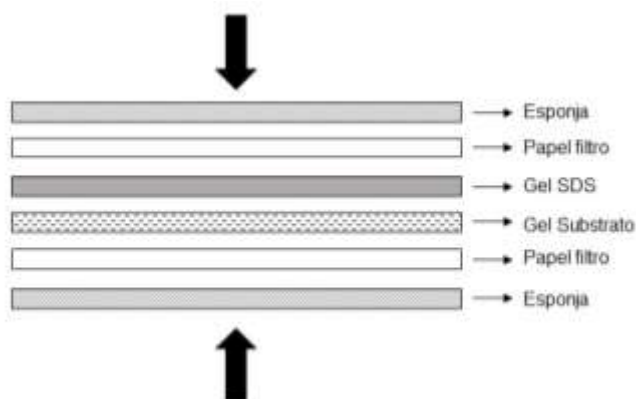
#### **3.8.1. Ensaio de difusão em ágar**

O ensaio foi realizado segundo Frati, 2006 com modificações. Placas de *Petri* de 15 cm foram preenchidas com meio tamponado (100 mM de acetato de sódio pH 4,7) contendo 0,8% de ágar e 0,5% de ácido poligalacturônico (Sigma). Após a solidificação do meio, poços de 5 mm foram feitos com um molde para posterior aplicação das amostras. As amostras contendo as enzimas foram previamente incubadas por 10 min a temperatura ambiente com diferentes quantidades dos inibidores e posteriormente foram aplicadas nos poços de forma que todas as amostras estivessem em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C *por 16 h*, em

seguida reveladas por 5 min com solução HCl 6 M. A atividade enzimática foi avaliada pela presença ou ausência de halos, os quais foram medidos usando o software ImageJ 1.51k (Rasband, 2012). Para as análises estatísticas, usou-se os dados dos diâmetros em mm, com ajuda do software GraphPad Prism 6.0 (Miller, 2003).

### 3.8.2. Zimograma

O Zimograma foi baseado na técnica descrita por Cruickshank e Wade, 1980, com modificações. Primeiramente foi feito um gel de poliacrilamida em condições desnaturantes a 10 % (v/v). As amostras foram aplicadas duplamente no mesmo gel, para que uma metade do gel fosse tratada com os inibidores, e a outra não. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de *comassie blue* e descorado com solução descorante (8% ácido acético, 7% etanol). Para reativação das enzimas o gel foi incubado duas vezes em solução Triton® X-100 2,5% (v/v) por 30 min. Em seguida o mesmo foi cortado ao meio e uma metade ficou incubada por 30 min em uma solução contendo o inibidor e a outra metade no tampão (20mM acetato de sódio pH 5). Para ocorrer a reação enzimática foi preparado um gel contendo o substrato (0,5% ácido poligalacturônico e 0,8% agarose em tampão 100 mM de acetato de sódio pH 5) e montado um sanduíche para cada metade do gel separadamente como demonstrado a seguir:



**Figura 7:** Modelo de montagem do sanduíche para reação enzimática no zimograma.

Após serem incubados por 2 horas a 37 °C os sanduíches foram deixados por 16 horas em solução de 1% CTAB. A atividade enzimática foi avaliada pela presença ou ausência de bandas translúcidas.

### **3.8.3. Ensaio de Atividade / Inibição Enzimática: Dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS**

O ensaio enzimático foi realizado segundo Miller, 1959 com modificações. Para o ensaio de atividade / Inibição enzimática foram usadas diferentes concentrações de inibidores e todas as reações foram feitas em triplicata. Primeiramente a enzima foi adicionada em tubos de eppendorf de 1,5 mL para interagir com diferentes quantidades dos inibidores por 10 min à temperatura ambiente, após este tempo foi adicionado a cada reação 50 µL de substrato (0,5 % Ácido poligalacturônico (Sigma) em 100 mM de Tampão Acetato de sódio pH 5). A reação ocorreu por 10 min a 50 °C. A reação foi interrompida com 100 uL de uma solução de DNS e fervida por 5 min e, em seguida, resfriada em banho de gelo e diluída 10 x em água. O mesmo procedimento foi realizado com os controles, exceto que neste caso o DNS foi adicionado juntamente com a enzima à solução contendo os inibidores mais o substrato, antes da incubação da reação. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro 5100 Hitachi, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorvância foram utilizados para o cálculo da atividade enzimática (U/mL) utilizando uma curva padrão (Figura A3), sendo que uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares reduzidos por minuto. Assim, após as determinações analíticas anteriores, as atividades enzimáticas foram calculadas segundo a equação:

$$\frac{((Abs - Abs\ b) / Fator) / T. reação}{V. enzima}$$

onde:

Abs: Absorbância da reação

Abs b: Absorbância do branco da reação

Fator: Fator da curva padrão = a (y = ax + b)

T. reação: Tempo de reação

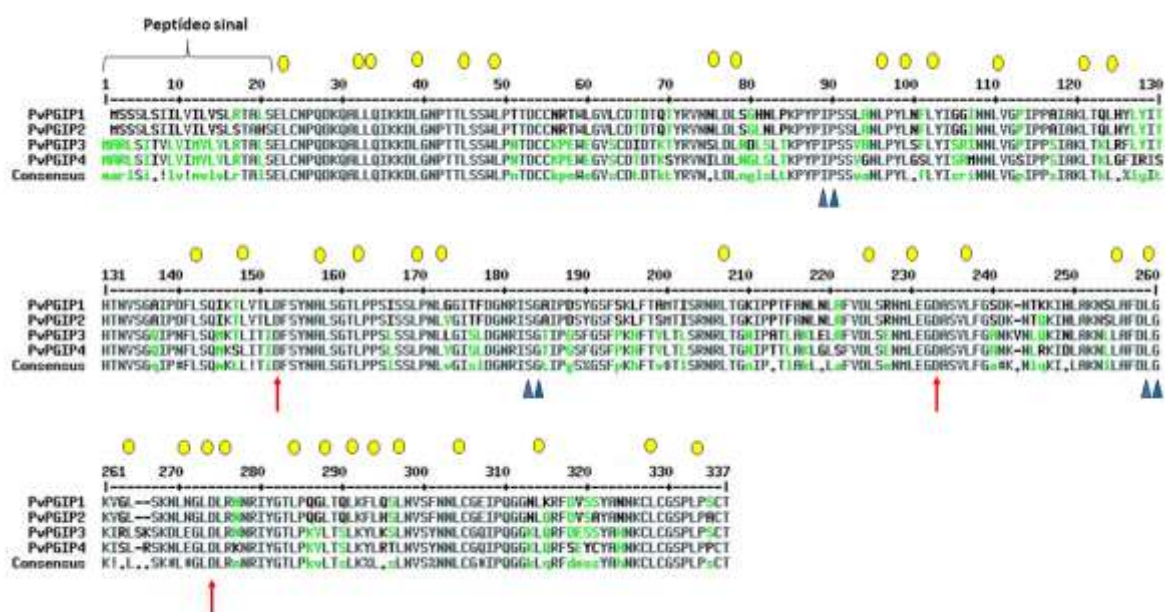
V. enzima: Volume de enzima em mL

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análises *in silico* dos PvPGIPs

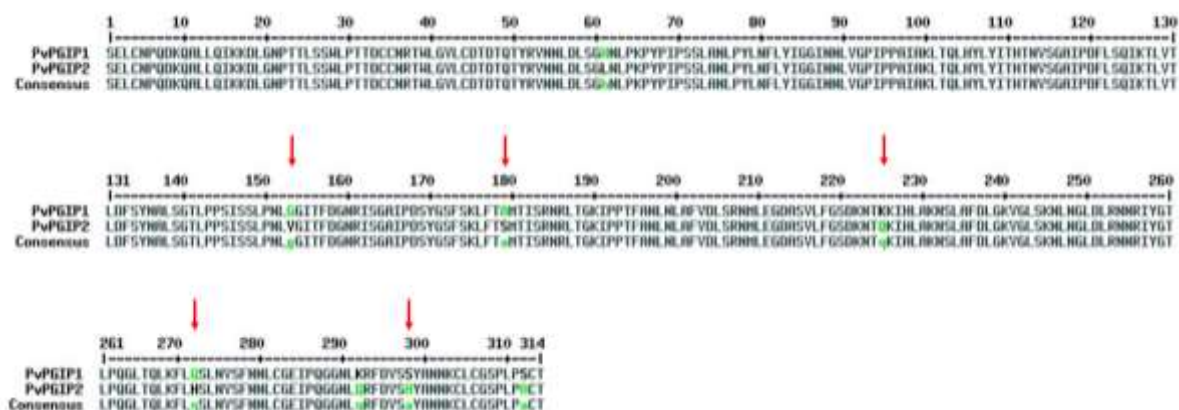
PvPGIPs são os inibidores de poligalacturonase de *Phaseolus vulgaris* (Feijão). A família consiste em quatro genes Pvpqip1, Pvpqip2, Pvpqip3 e Pvpqip4 (Tabela A1), os quais possuem estruturas muito semelhantes. As semelhanças entre eles sugerem que os mesmos derivam de um ancestral comum por uma sequência de eventos de duplicação-divergência-duplicação (D`Ovideo, 2004). Suas sequências ricas em leucinas (LRRs) possuem sequências consensus características de PGIPs de plantas (LxxLxLxxNxLT/SGxIPxxLxxLxx) (D`Ovideo, 2004), além de possuírem três resíduos ácidos D131, D157 e D203, que são altamente conservados em todos os PGIPs e possuem um importante papel na interação com as PGs (Spinelli, 2009) (Figura 8).

As sequências dos inibidores PvPGIP1 e PvPGIP2 diferenciam-se apenas por 8 aminoácidos dos quais 5 encontram-se nas folhas  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 (Figura 9). A região de folha  $\beta$  é hipervariável e responsável pela especificidade de ligação nessa classe de proteínas (Leckie, 1999). D`Ovidio e colaboradores em 2004 demonstraram que os PvPGIP3 e PvPGIP4 possuem atividade inibitória em relação às PGs de insetos (*Lygus rugulipennis* e *Adelphocoris lineolatus*), mas que são inibidores fracos de PGs fúngicas quando comparados com PvPGIP1 e PvPGIP2 (Tabela A2). Em vista disso, neste presente trabalho decidimos testar as atividades desses inibidores frente à endopoligacturonase do inseto *Sphenophorus levis* e algumas pectinases fúngicas.



**Figura 8: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das PvPGIPs oriundas do feijão.** As seqüências das quatro PGIPs foram coletadas em banco de dados do NCBI para alinhamento no software online Multalin, com os parâmetros da matriz original. As seqüências com identidade estão representadas em cinza (90%) e as de baixa identidade em verde (50%). Os círculos amarelos sobre as seqüências representam as regiões ricas em leucina, as setas vermelhas indicam os aminoácidos ácidos envolvidos na ligação da proteína com a enzima e os triângulos abaixo das seqüências indicam seqüências consenso conservadas em PGIPs de plantas.

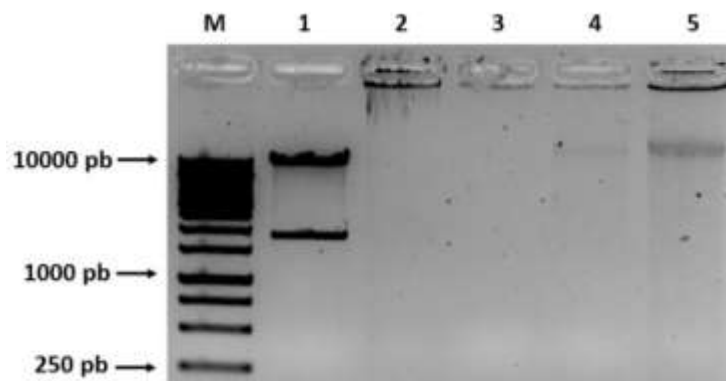




**Figura 9: Alinhamento das PvPGIP1 e PvPGIP2.** As sequências das duas PGIPs foram coletadas em banco de dados do NCBI para alinhamento no software online Multalin, com os parâmetros da matriz original. As sequências com identidade estão representadas em cinza (90%) e as de baixa identidade em verde (50%). As setas vermelhas indicam os 5 aminoácidos que estão presentes nas folhas betas e se diferenciam entre sequências.

#### 4.2. Obtenção do material genético do feijão (*P. vulgaris*)

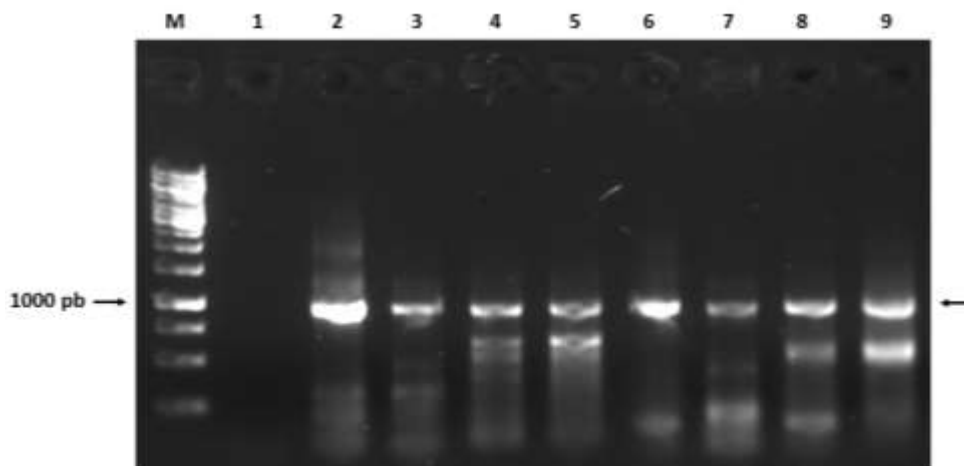
A extração do material genômico foi realizada segundo o método do Trizol® a partir das folhas do feijão e foi possível obter o DNA em uma concentração aproximada de 15 ng/μL (Figura 10). Neste caso foi possível utilizar o DNA como material genético para a amplificação das regiões codificantes das PvPGIPs, uma vez que as sequências desses inibidores não possuem introns (Maulik, 2011).



**Figura 10: Extração do material genético das folhas de Feijão.** Extração de DNA genômico do feijão; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: RNA do feijão; 2 e 3 extrações negativas para o DNA do feijão e 4 e 5: extrações positivas para o DNA genômico do feijão.

#### 4.3. Amplificação das regiões codificantes para PvPGIP1, PvPGIP2, PvPGIP3 e PvPGIP4

As quatro regiões codificadoras para PGIPs de *P. vulgaris* foram amplificadas com sucesso. Como é possível observar na figura 11, além dos fragmentos com aproximadamente 1000 pb, que eram esperados para as PvPGIPs, o gel apresentou bandas espúrias, menores, que não foram investigadas, mas também não apresentaram complicações para os passos seguintes uma vez que os fragmentos específicos foram purificados de gel e confirmados por sequenciamento.

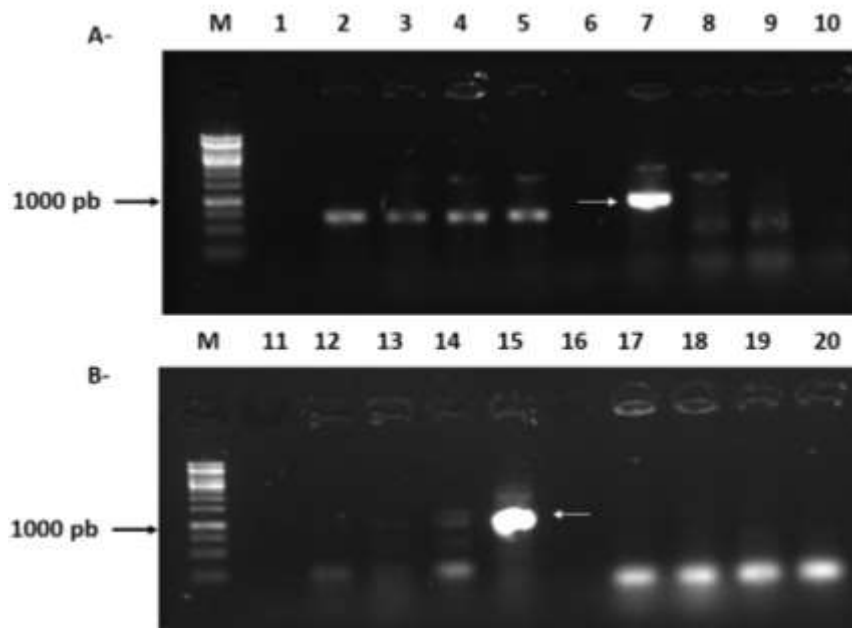


**Figura 11: Amplificação dos fragmentos codificantes para PvPGIP1, PvPGIP2, PvPGIP3 e PvPGIP4.** Gel de agarose 1% mostrando em M: Marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific); 1: controle sem DNA; 2 e 3 amplificado da PvPGIP1 (939 pb); 4 e 5: amplificado da PvPGIP2 (939 pb); 6 e 7: amplificado da PvPGIP3 (948 pb) e 8 e 9: amplificação do fragmento da PvPGIP4 (942 pb). Os fragmentos de aproximadamente 1000 pb estão indicados pela seta.

#### 4.4. Construção dos vetores para expressão em *P.pastoris*

Como a análise da estrutura primária das PvPGIPs mostrou possíveis sítios de glicosilação e cisteínas que poderiam estar envolvidas em formação de ligações de dissulfeto, optou-se pela produção das proteínas recombinantes em sistema eucarioto. Além disso, Spinelli e colaboradores em 2009 já haviam expressado o inibidor PvPGIP2 em *Pichia pastoris* e comprovado que a proteína produzida por este sistema heterólogo era funcional e não apresentava diferenças em termo de especificidade e cinética em sua atividade. Para isso, foram construídos vetores para expressão em levedura *Pichia pastoris* utilizando o plasmídeo de expressão pPicZαA, o qual possibilita alta expressão protéica, indução por metanol, secreção da proteína e fusão da mesma com his-tag para posterior purificação por cromatografia de afinidade.

Afigura 12 mostra o resultado da PCR de colônia para as DH5α transformadas com os vetores recombinantes, na qual é possível observar um possível clone recombinante para o inibidor PvPGIP2 e um para o inibidor PvPGIP3.



**Figura 12: Análise das colônias DH5 $\alpha$  recombinantes.** A figura mostra os géis onde os produtos da PCR de colônia foram separados por eletroforese. M: Marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1, 6, 11 e 16: Brancos das reações. **A-** 2-5 reações negativas para amplificação da PvPGIP1; 7: Reação positiva para amplificação da PvPGIP2 indicada pela seta branca; 8-10: Reações negativas para amplificação da PvPGIP2. **B-** 12-14: Reações negativas para amplificação da PvPGIP3; 15: Reação positiva para amplificação da PvPGIP3 indicada pela seta branca e 17-20: Reações negativas para amplificação da PvPGIP4.

Após analisar as seqüências obtidas no sequenciamento dos vetores recombinantes e confirmada a correta inserção das ORFs no plasmídeo (Figuras A1.2 e A1.3), os vetores foram denominados pPicZ $\alpha$ A\_PvPGIP2 e pPicZ $\alpha$ A\_PvPGIP3.

As seqüências codificantes para as PGIPs foram traduzidas em seqüências de aminoácidos destas proteínas. Estas seqüências primárias estão representadas na figura 13, onde a proteína madura nativa é acrescida de um peptídeo sinal e cauda de histidina, os quais são provenientes do plasmídeo pPicZ $\alpha$ A. Estão representados também os sítios de clivagem do peptídeo sinal e os possíveis sítios de glicosilação destas proteínas. Nota-se que em ambas há presença de sítios de glicosilação, incluindo três sítios de N-glicosilação provenientes do plasmídeo de expressão, porém

como estes se encontram antes do sítio de clivagem do peptídeo sinal não é esperado que estas glicosilações extras permaneçam nas proteínas. A PvPGIP2 recombinante, incluindo as sequências provenientes do plasmídeo e a his-tag, é uma proteína de aproximadamente 35 KDa com pI igual a 8,40 e a PvPGIP3 também apresenta três sítios de N-glicosilação, possui aproximadamente 36 KDa e pI igual a 8,9.

### **PvPGIP2 recombinante**

```

1  MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
61  NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKR*EA*EA*EFELCNPQDKQALLQIKKDLGNPTTLSS
118 WLPTTDCCNRTWLGVLCDTDTQTYRVNNDLSGLNLPKPYPIPSSLANLPYLNFLYIGGI
178 NNLVGPIPPAIAKLTQLHYLYITHTNVSGAIPDFLSQIKTLVTLDFSYNALSGTLPPSIS
238 SLPNLVGITFDGNRISGAIPDSYGSFSLFTSMTISRNLTKGIPPTFANLNLAFVDLSR
298 NMLEGDASVLFSGDKNTQKIHLAKNSLAFDLGKVGLSKNLNGLDLRNNRIYGTLPQGLTQ
358 LKFLHSLNVSFNNLCGEIPQGGNLQRFDVSAYANNKCLCGSPLPACTVDHHHHHH

```

### **PvPGIP3 recombinante**

```

1  MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
61  NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKR*EA*EA*EFELCNPQDKQALLQIKKDLGNPTTLSS
118 WLPNTDCCKPEWEGVSCDIDTKTYRVNSLDLNDLSLTKPYPIPSSVANLPYLSFLYISRI
178 NNLVGPIPPSIKLTCLRFLYITHTNVSGQIPNFLSQMKTLITIDFSYNALSGTLPPSL
238 SLPNLLGISLDGNRISGTIPGSFGSFPKHFTVLTLSRNLTKGNIPATLAKLELAFVDLSE
298 NMLEGDASVLFGANKVNLQKINLAKNLLAFDLGKIRLSKSKDLEGLDLRNNRIYGTLPKV
358 LTSLKYLKSLNVSYNNLCGQIPQGGKLQRFDESSYAHNKCLCGSPLPCTVDHHHHHH

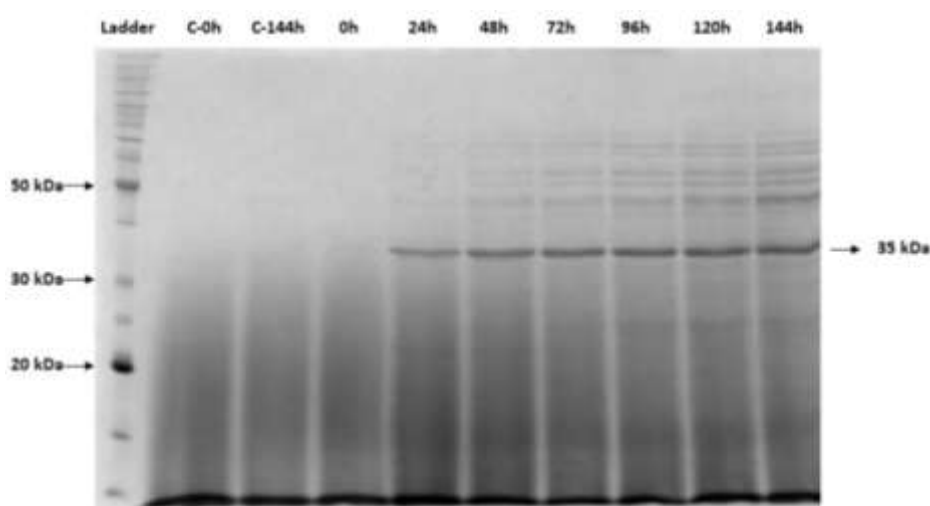
```

**Figura 13: Sequências deduzidas das PGIPs expressas em *Pichia pastoris*.** Os aminoácidos destacados em preto são referentes à proteína madura nativa, enquanto os aminoácidos em cinza são de origem do plasmídeo de expressão. O peptídeo sinal se encontra na extremidade N-terminal da proteína e é clivado pelas peptidases da levedura nos pontos indicados pelos asteriscos. Os sítios de glicosilação estão destacados pelos aminoácidos sublinhados.

#### 4.5. Transformação em *Pichia pastoris* – Obtenção de clones hiperprodutores.

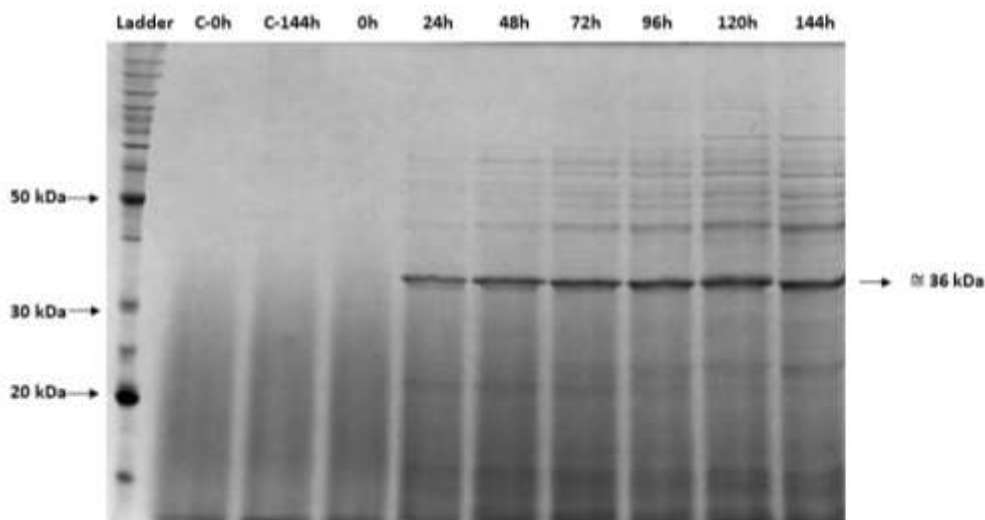
Após transformação das leveduras *P. pastoris* cepa X-33 com os vetores linearizados foram obtidas várias colônias, das quais 22 foram escolhidas de cada clone para realizar o *screening* em placa. Identificou-se ao final do *screening*, para as duas PGIPs, um clone com potencial para produção da proteína recombinante. Como já mencionado no item anterior o inibidor PvPGIP2 já havia sido produzido de forma recombinante (Spinelli, 2009), porém está foi a primeira vez que o inibidor PvPGIP3 foi produzido em sistema heterólogo em *Pichia pastoris*.

As figuras 14 e 15 mostram o processo de indução ao longo de 144 h para a PvPGIP2 e PvPGIP3 recombinantes, respectivamente. As proteínas apresentaram perfil de expressão semelhantes, ambas já são bem expressas em apenas 24 h, sendo, portanto, esse tempo escolhido para a indução em uma escala maior. Como esperado, no tempo 0h e nos tempos 0h e 144h do controle (X-33 não transformada) não foi observado a presença das proteínas desejadas. As duas proteínas apresentaram bandas com tamanhos próximos ao preditos na análise *in silico* PvPGIP2 (35 KDa) e PvPGIP3 (35,9 KDa).



**Figura 14: Análise da expressão da PvPGIP2 recombinante ao longo do tempo de 144 horas.** Foram coletadas alíquotas do sobrenadante de cultura, que foram analisadas em SDS PAGE 12%. A figura mostra, o *Ladder* (marcador de massa molecular- Invitrogen); C-0h, sobrenadante da X-33 em 0 h; C-144h, sobrenadante da

X-33 em 144 h e 0 a 144 h, alíquotas de sobrenadantes da cultura induzida por metanol nos diferentes tempos. A seta indica a posição da proteína **PvPGIP2** recombinante.



**Figura 15: Análise da expressão da PvPGIP3 recombinante.** Foram coletadas alíquotas do sobrenadante de cultura, que foram analisadas em SDS PAGE 12%. A figura mostra, o *Ladder* (marcador de massa molecular- Invitrogen); C-0h, sobrenadante da X-33 em 0 h; C-144h, sobrenadante da X-33 em 144 h e 0 a 144 h, alíquotas de sobrenadantes da cultura induzida por metanol nos diferentes tempos. A seta indica a posição da proteína **PvPGIP3** recombinante.

#### 4.6. Purificação das proteínas recombinantes

Após indução das proteínas recombinantes em uma escala maior (100 mL de meio de indução) foi realizada a purificação das mesmas em coluna de afinidade com  $\text{Ni}^{+2}$ . Porém, ao analisar as frações após a purificação, observou-se uma grande quantidade de proteínas no eluato (coleta do meio induzido contendo a proteína após passagem na coluna) e na lavagem (passagem de tampão de lise sem imidazol após coleta do eluato), concluindo, portanto, que as proteínas não se ligaram na coluna.

Na construção do clone da proteína recombinante PvPGIP2 que foi expressa em *P. pastoris* por Spinelli e colaboradores em 2009, havia a cauda de histidina, porém os autores utilizaram como meio de purificação a cromatografia por troca catiônica, sugerindo que provavelmente eles tiveram o mesmo problema com a purificação da

proteína por cromatografia de afinidade.

Ao analisar a estrutura dessas proteínas recombinantes tridimensionalmente foi observado que a cauda de histidina poderia estar escondida dentro de sua própria estrutura, não sendo possível, portanto, a interação com o  $\text{Ni}^{+2}$  e por consequência a purificação por este método. Uma alternativa para tal problema seria fazer uma nova construção com o his-tag na região N-terminal das proteínas, porém a cauda poderia estar escondida novamente.

Alguns ensaios de inibição relatados com os PvPGIPs provenientes de sistemas heterólogos de PVX/*Nicotiana benthamiana*, renderam resultados positivos utilizando as proteínas no extrato bruto (D'ovidio, et al.;2006 e Frati, et al., 2006). Portanto, considerando os resultados relatados na literatura utilizando o extrato bruto, e que *Pichia pastoris* não secreta proteínas com atividades similares, os ensaios funcionais foram iniciados utilizando as proteínas recombinantes presentes no sobrenadante do meio cultura de indução, após dialise em tampão adequado para os ensaios. Além disso foi utilizado nos ensaios, como controle, o sobrenadante da *Pichia pastoris* não transformada, nos quais o mesmo não apresentou atividade sobre as pectinases (dados não mostrados).

Para o cálculo de rendimento de proteína obtida por litro de cultura de indução e para ter uma ideia aproximada da quantidade de inibidor utilizada nos ensaios foi realizada uma quantificação por comparação com proteínas de concentração conhecida em SDS-PAGE (Figura A2). O rendimento obtido foi de 50 e 140 mg por litro de cultura, para PvPGIP2 e PvPGIP3, respectivamente.

## **4.7. Ensaios funcionais**

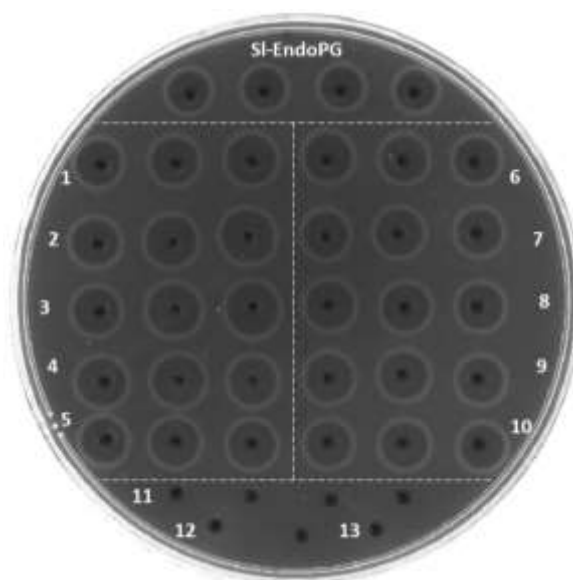
### **4.7.1. Ensaio de gel difusão em ágar**

As proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 foram primeiramente testadas frente a diferentes poligalacturonases tanto de inseto quanto fúngicas em um ensaio de gel difusão em ágar.

A figura 16 mostra os resultados do ensaio realizado com a enzima SI-EndoPG do coleóptero *Sphenophorus levis*, a qual mostrou-se ativa na presença de diferentes concentrações dos inibidores, visto que foi possível observar a presença de halos de



alteração do substrato na placa. Nas tabelas 1 e 2 é possível observar o diâmetro médio dos halos obtidos em triplicata referente a cada concentração de inibidor e na tabela 3, a análise estatística do ensaio, que demonstra que a diferença entre os halos na presença e na ausência dos inibidores não foi significativa.



**Figura 16: Ensaio de gel difusão em ágar- SI-EndoPG.** Ensaio de inibição da SI-EndoPG (0,1  $\mu\text{g}$ ). De 1 a 5 foram testados diferentes quantidades da proteína recombinante PvPGIP2 (0,25 – 1,25  $\mu\text{g}$ ) frente a SI-EndoPG; de 6 a 10 foram testadas diferentes quantidades da proteína recombinante PvPGIP3 (0,70 – 3,50  $\mu\text{g}$ ) frente a SI-EndoPG; 11, 12 e 13 foram os controles do tampão ( 100 mM acetato de sódio pH 5), PvPGIP2 e PvPGIP3 respectivamente. Os ensaios de inibição foram realizados em triplicata.

**Tabela 1: Ensaio de gel difusão em ágar- SI-EndoPG – PvPGIP2.** A tabela apresenta a média das triplicatas dos halos referentes a enzima (SI-EndoPG – 0,11 µg) e a Enzima na presença de diferentes quantidades do inibidor PvPGIP2.

\*Valores finais descontado o tamanho do halo inicial (5 mm).

Amostra	PvPGIP2 (µg)	Média halo (mm) *
SI-EndoPG (0,1 µg)	0	9,114 +/- 0,366
1	0,25	9,961 +/- 0,458
2	0,50	10,543 +/- 0,904
3	0,75	10,649 +/- 0,826
4	1,00	10,384 +/- 0,558
5	1,25	09,855 +/- 0,692

**Tabela 2: Ensaio de gel difusão em ágar- SI-EndoPG – PvPGIP3.** A tabela apresenta a média das triplicatas dos halos referentes a enzima (SI-EndoPG – 0,11 µg) e a Enzima na presença de diferentes quantidades do inibidor PvPGIP3.

\*Valores finais descontado o tamanho do halo inicial (5 mm).

Amostra	PvPGIP3 (µg)	Média halo (mm) *
SI-EndoPG (0,1 µg)	0	9,114 +/- 0,366
6	0,70	9,220 +/- 0,550
7	1,40	9,431 +/- 0,184
8	2,10	9,325 +/- 0,367
9	2,80	9,643 +/- 0,367
10	3,50	9,325 +/- 0,367

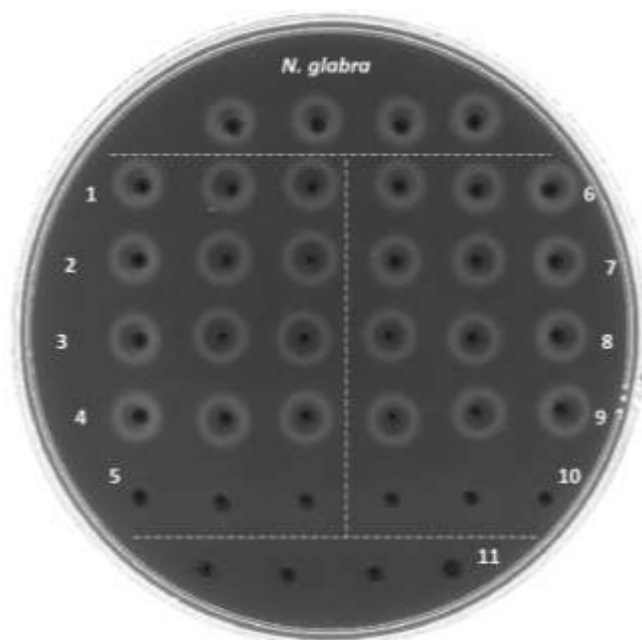
**Tabela 3: Análise estatística do ensaio de gel difusão em ágar- SI-EndoPG.**

	<b>Diferença</b>	<b>95% CI de diferença</b>	<b>Significante</b>	<b>Resumo</b>
Controle SI-EndoPG vs 1	-0,8463	-2,415 a 0,7227	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 2	-1,429	-2,998 a 0,1400	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 3	-1,535	-3,104 a 0,03404	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 4	-1,270	-2,839 a 0,2990	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 5	-0,7403	-2,309 a 0,8287	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 6	-0,1060	-0,9629 a 0,7509	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 7	-0,3143	-1,171 a 0,5426	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 8	-0,2107	-1,068 a 0,6463	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 9	-0,5287	-1,386 a 0,3283	Não	ns
Controle SI-EndoPG vs 10	-0,5440	-1,401 a 0,3129	Não	ns

ns: não significativo

Não foi detectada diferença significativa de acordo com a análise Anova combinada com o teste Dunnett de comparações múltiplas ( $p < 0,05$ ).

As proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 foram testadas também frente ao extrato contendo a pectinase do fungo *Neosartoya glabra*. A pectinase desse fungo se mostrou ativa na presença de diferentes concentrações dos inibidores, uma vez que foi possível observar a presença de halos de alteração do substrato na placa (Figura 17). Nas tabelas 4 e 5 é possível observar o diâmetro médio dos halos obtidos em triplicata referente a cada concentração de inibidor e na tabela 6 a análise estatística do ensaio, que demonstra que a diferença entre os halos na presença e na ausência dos inibidores não foi significativa.



**Figura 17: Ensaio de gel difusão em ágar - Pectinase de *N. glabra*.** Ensaio de inibição da *N. glabra*. De 1 a 4 foram testadas diferentes quantidades da proteína recombinante PvPGIP2 (0,25 – 1,00 µg) frente a pectinase de *N. glabra*; de 6 a 9 foram testadas diferentes quantidades da proteína recombinante PvPGIP3 (0,70 – 2,80 µg) frente a pectinase de *N. glabra*; 5, 10 e 11 foram os controles dos inibidores, PvPGIP2, PvPGIP3 e do tampão ( 100 mM acetato de sódio pH 5) respectivamente. Os ensaios de inibição foram realizados em triplicata.

**Tabela 4: Ensaio de gel difusão em ágar – Pectinase de *N. glabra* – PvPGIP2.** A tabela apresenta a média das triplicatas dos halos referentes ao extrato (*N. glabra* – 0,01 U) e o extrato na presença de diferentes quantidades do inibidor PvPGIP2.

\*Valores finais descontado o tamanho do halo inicial (5 mm).

Amostra	PvPGIP2 (µg)	Média halo (mm) *
<i>N. glabra</i> (0,01 U)	0	6,735 +/- 0,171
1	0,25	6,982 +/- 0,678
2	0,50	7,130 +/- 0,257
3	0,75	7,130 +/- 0,678
4	1,00	6,933 +/- 0,085

**Tabela 5: Ensaio de gel difusão em ágar- Pectinase de *N. glabra* – PvPGIP3.** A tabela apresenta a média das triplicatas dos halos referentes ao extrato (*N. glabra* – 0,01 U) e ao extrato na presença de diferentes quantidades do inibidor PvPGIP3.

\*Valores finais (descontado o tamanho do halo inicial (5 mm)).

Amostra	PvPGIP3 (µg)	Média halo (mm) *
<i>N. glabra</i> (0,01 U)	0	6,735 +/- 0,171
6	0,70	6,884 +/- 0,341
7	1,40	6,785 +/- 0,226
8	2,10	6,883 +/- 0,085
9	2,80	7,031 +/- 0,085

**Tabela 6: Análise estatística do ensaio gel difusão ágar- Pectinase *N. glabra*.**

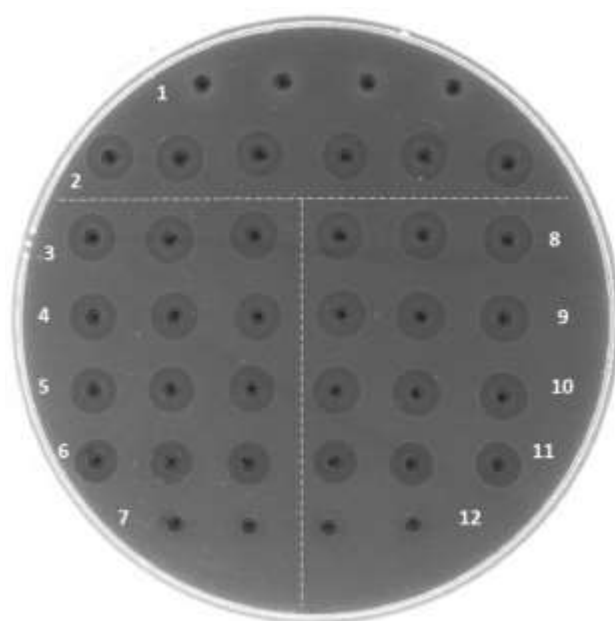
	Diferença	95% CI de diferença	Significante	Resumo
Controle <i>N. glabra</i> vs 1	-0,2470	-1,123 a 0,6293	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 2	-0,3950	-1,271 a 0,4813	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 3	-0,3950	-1,271 a 0,4813	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 4	-0,1973	-1,074 a 0,6790	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 6	-0,1487	-1,025 a 0,7276	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 7	-0,04933	-0,9256 a 0,8270	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 8	-0,1480	-1,024 a 0,7283	Não	ns
Controle <i>N. glabra</i> vs 9	-0,2960	-1,172 a 0,5803	Não	ns

ns: não significativo

Não foi detectada diferença significativa de acordo com a análise Anova combinada com o teste Dunnett de comparações múltiplas ( $p < 0,05$ ).

Para confirmar se as proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 estavam ativas, e capazes de inibir pectinases, foram realizados ensaios com uma pectinase comercial do fungo *Aspergillus niger*, uma vez que a inibição dessas enzimas pelo inibidor PvPGIP2 já havia sido reportada (Spinelli, et al., 2009). Na figura 18 é possível observar que as enzimas tiveram sua atividade reduzida pelos inibidores PvPGIP2 e

PvPGIP3, uma vez que os halos formados por estas enzimas no meio contendo o substrato apresentaram-se menores na presença destes inibidores (6, 10 e 11). Nas tabelas 7 e 8 é possível observar o diâmetro médio dos halos obtidos em triplicata referente a cada concentração de inibidor e na tabela 9 a análise estatística do ensaio, que demonstra que a diferença entre os halos na presença e na ausência dos inibidores foi significativa tanto para o PvPGIP2 (1,25 µg) quanto para o PvPGIP3 (2,80 e 3,50 µg). É importante ressaltar que a inibição das endopoligalacturonases de *A. niger* pelo inibidor PvPGIP3 não havia ainda sido relatada.



**Figura 18: Ensaio de gel difusão em ágar - Pectinase de *A. niger*.** Ensaio de inibição da pectinase de *A. niger* (Sigma). De 3 a 6 foram testados diferentes quantidades da proteína recombinante PvPGIP2 (0,50 – 1,25 µg) frente 0,025 U de pectinase de *A. niger*; de 8 a 11 foram testadas diferentes quantidades da proteína recombinante PvPGIP3 (1,4 – 3,50 µg) frente 0,025 U de pectinase de *A. niger*; 1(quadruplicata), 7(duplicata) e 12 (duplicata) foram os controles do tampão ( 100 mM acetato de sódio pH 5), PvPGIP2 e PvPGIP3 respectivamente. Os ensaios de inibição foram realizados em triplicata.

**Tabela 7: Ensaio de gel difusão em ágar - Pectinase de *A. niger* - PvPGIP2.** A tabela apresenta a média das triplicatas dos halos referentes a enzima (*A. niger* 0,025 U) e a enzima na presença de diferentes quantidades do inibidor PvPGIP2.

\*Valores finais (descontado o tamanho do halo inicial (5 mm)).

Amostra	PvPGIP2 (µg)	Média halo (mm) *
2	0	6,717 +/- 0,152
3	0,50	6,799 +/- 0,075
4	0,75	6,651 +/- 0,206
5	1,00	6,518 +/- 0,057
6	1,25	5,595 +/- 0,171

**Tabela 8: Ensaio de gel difusão em ágar - Pectinase de *A. niger* - PvPGIP3.** A tabela apresenta a média das triplicatas dos halos referentes a enzima (*A. niger* 0,025 U) e a enzima na presença de diferentes quantidades do inibidor PvPGIP3.

\*Valores finais (descontado o tamanho do halo inicial (5 mm)).

Amostra	PvPGIP3 (µg)	Média halo (mm) *
2	0	6,717 +/- 0,152
8	1,40	6,815 +/- 0,057
9	2,10	6,749 +/- 0,151
10	2,80	6,386 +/- 0,099
11	3,50	5,760 +/- 0,057

**Tabela 9: Análise estatística do ensaio de gel difusão ágar - Pectinase de *A. niger*.**

	<i>Diferença</i>	<i>95% CI de diferença</i>	<i>Significante</i>	<i>Resumo</i>
<i>Controle 2 vs 3</i>	-0,08233	-0,3842 a 0,2195	Não	ns
<i>Controle 2 vs 4</i>	0,06600	-0,2358 a 0,3678	Não	ns
<i>Controle 2 vs 5</i>	0,1983	-0,1035 a 0,5002	Não	ns
<i>Controle 2 vs 6</i>	1,122	0,8202 a 1,424	Sim	***
<i>Controle 2 vs 8</i>	-0,09867	-0,4005 a 0,2032	Não	ns
<i>Controle 2 vs 9</i>	-0,03267	-0,3345 a 0,2692	Não	ns
<i>Controle 2 vs 10</i>	0,3307	0,02882 a 0,6325	Sim	*
<i>Controle 2 vs 11</i>	0,9567	0,6548 a 1,259	Sim	***

ns: não significativo

Foi detectada diferença significativa de acordo com a análise Anova combinada com o teste Dunnett de comparações múltiplas ( $p < 0,05$ )

\* P value  $< 0,01$

\*\*\* P value  $< 0,0001$

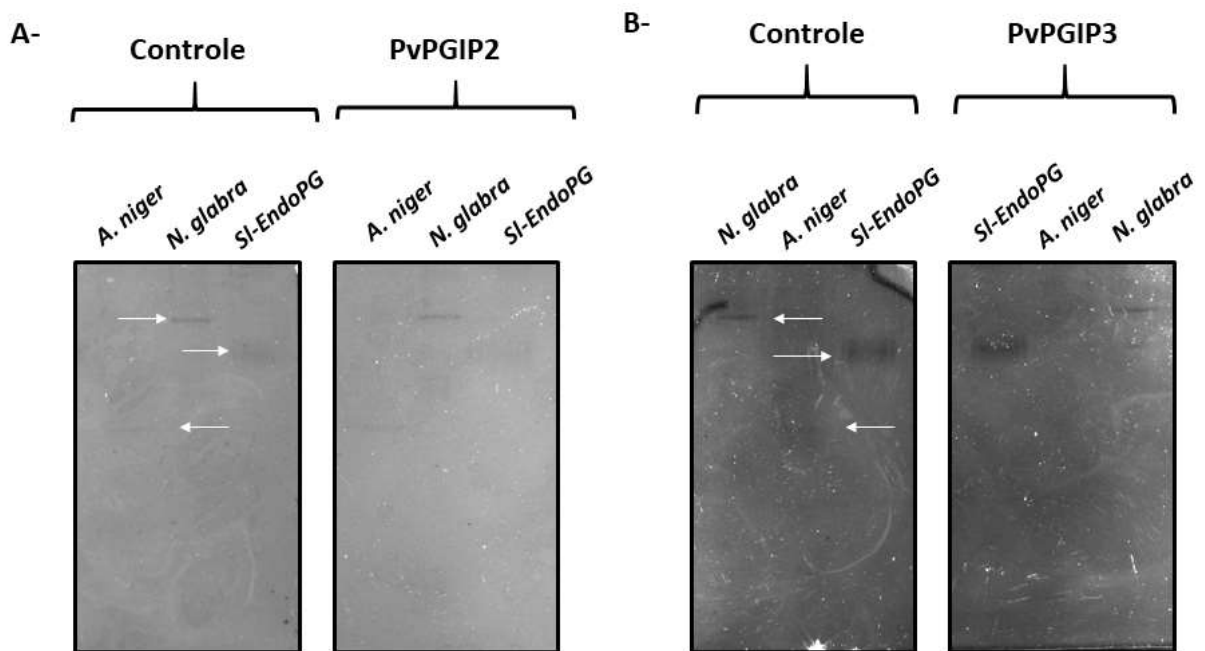
#### 4.7.2. Zimograma

As pectinases dos fungos *A. niger* e *N. glabra* e a SI-EndoPG foram submetidas ao ensaio enzimático zimograma. Segundo Cruickshank e Wade, 1980, as técnicas descritas anteriormente utilizadas em estudos de enzimas pectinolíticas, como análise da viscosidade ou química dos produtos da atividade enzimática bruta, tendem a consumir tempo ou ser de baixa sensibilidade, sendo, portanto o zimograma uma técnica importante nos ensaios enzimáticos com pectinases.

Para tal ensaio foi preparado um SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e cada enzima foi aplicada duas vezes no gel de forma que metade do gel pudesse ser usada como controle e a outra metade para o teste de inibição. Após todo procedimento e revelação dos géis com CTAB foi possível observar no gel controle uma banda translúcida responsável pela atividade pectinolítica de aproximadamente 40 kDa em *A. niger* uma banda de aproximadamente 70 kDa em *N. glabra* e uma banda de aproximadamente 50 Kda na SI-EndoPG, o que era esperado



(Figura 19). Ao comparar o gel controle com o gel tratado com a proteína recombinante PvPGIP2 (Figuras 19-A) observou-se uma diminuição na intensidade das bandas, demonstrando assim uma possível inibição parcial dessas enzimas frente a esse inibidor. Porém, ao se comparar o gel controle com o gel tratado com a proteína recombinante PvPGIP3 (Figura 19-B) não foi possível observar diferenças nas intensidades das bandas.

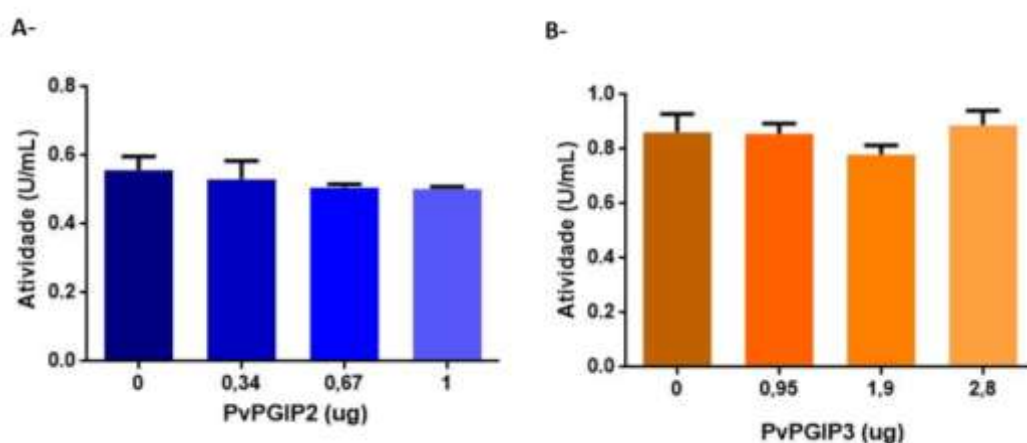


**Figura 19: Zimograma com as pectinases dos fungos *A. niger* e *N. glabra* e com a SI-EndoPG. A-** Zimograma com e sem tratamento com o inibidor PvPGIP2 recombinante. **B-** Zimograma com e sem tratamento com o inibidor PvPGIP3 recombinante. As setas brancas indicam as bandas translúcidas referentes à atividade das pectinases sobre o substrato.

### 4.7.3. Ensaio de Atividade / Inibição Enzimática via determinação de Açúcares redutores (DNS)

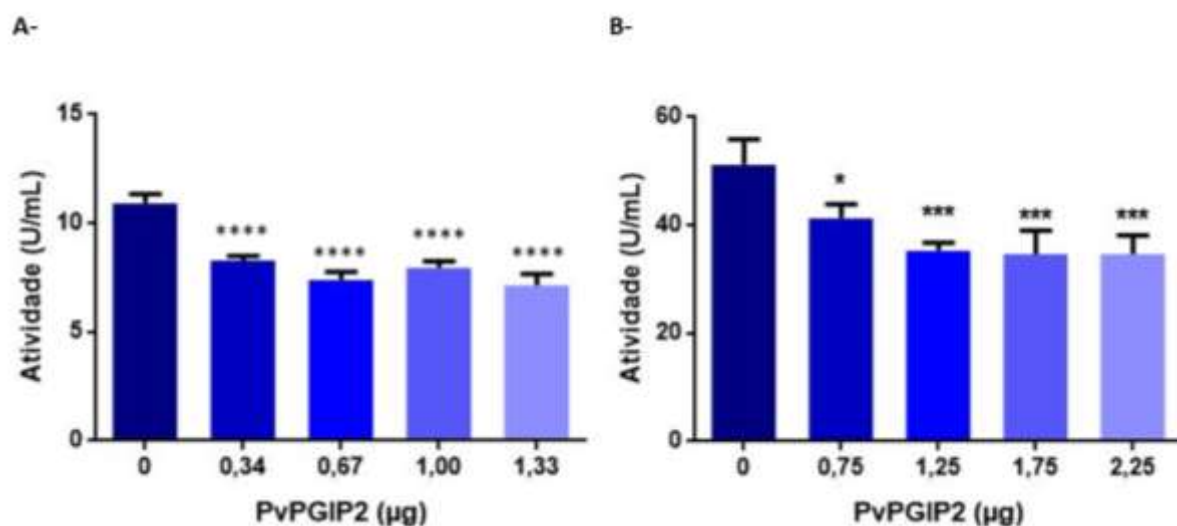
Na tentativa de se obter resultados mais conclusivos, as pectinases dos fungos *A. niger*, e *N. glabra* e a SI-EndoPG foram submetidas ao ensaio de Atividade/Inibição enzimática com detecção de açúcares redutores liberados pelo método do DNS.

A SI-EndoPG não apresentou diminuição significativa em sua atividade na presença de diferentes concentrações dos inibidores PvPGIP2 e PvPGIP3 recombinantes quando comparado com o controle da enzima sem inibidor (Figura 20).



**Figura 20: Ensaio de Inibição Enzimática da SI-EndoPG pelos inibidores PvPGIP2 e PvPGIP3 pelo método do DNS.** Gráfico em barras da atividade enzimática (U/mL) pela quantidade de inibidor ( $\mu\text{g}$ ). **A-** Ensaio Atividade/Inibição SI-EndoPG frente a quantidades crescente do inibidor PvPGIP2 (0,34 - 1  $\mu\text{g}$ ). **B-** Ensaio de Atividade/Inibição SI-EndoPG frente a quantidades crescente do inibidor PvPGIP3 (0,95 - 2,8  $\mu\text{g}$ ).

Já as pectinases de *N. glabra* e *A. niger* apresentaram redução em suas atividades na presença do inibidor PvPGIP2 (Figura 21). Foi detectada diferença significativa de acordo com a análise Anova combinada com o teste Dunnett de comparações múltiplas.



**Figura 21: Ensaio de atividade inibitória de PvPGIP2 frente às pectinases de *N.glabra* e *A.niger*.** Gráfico em barras da atividade enzimática (U/mL) pela quantidade de inibidor (µg). **A-** Ensaio Atividade/Inibição pectinase *N. glabra* frente a quantidades crescente do inibidor PvPGIP2 (0,34 – 1,33 µg). Foi detectada diferença significativa de acordo com a análise Anova combinada com o teste Dunnett de comparações múltiplas ( $p < 0,05$ ). **B-** Ensaio Atividade/Inibição pectinase *A.niger* frente a quantidades crescente do inibidor PvPGIP2 (0,75 – 2,25 µg). Foi detectada diferença significativa de acordo com a análise Anova combinada com o teste Dunnett de comparações múltiplas ( $p < 0,05$ ).

\* P value  $< 0,01$

\*\*\* P value  $< 0,0001$

\*\*\*\* P value  $< 0,00001$

Ao analisar os resultados obtidos após todos os ensaios funcionais com as proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 concluiu-se que elas não foram capazes de inibir a SI-EndoPG. Apesar de o inibidor PvPGIP3 apresentar atividade inibitória frente à endopectinases de outros insetos como *Lygus rugulipennis* (Hemiptera, Miridae) e *Adelphocoris lineolatus* (Hemiptera, Miridae) (D’Ovidio, et al., 2004 e Frati, et al., 2006), provavelmente as PGs desses insetos apresentam diferenças em relação a estrutura da pectinase de *S. levis* (Coleoptera, Curculionidae). Necessita-se, portanto, de uma análise estrutural mais profunda entre as PGs destes insetos para uma explicação plausível da não inibição da SI-EndoPG.

Além disso a não inibição da SI-EndoPG pode estar relacionada ao grande sucesso de invasão deste inseto praga nas culturas de cana-de-açúcar, uma vez que a cana de açúcar possui seus próprios inibidores de endopoligalacturonases, e que provavelmente não são efetivos e estão mais relacionados ao remodelamento e crescimento vegetal junto as PGs do próprio vegetal (Gonzalez; et al., 2010).

Em uma avaliação quantitativa foi indicado que a atividade inibitória dos PGIPs contra PGs provenientes de insetos da família *miridae* é geralmente mais fraca do que a de PGs fúngicas, mas que isso pode estar relacionado também com as condições experimentais (D'Ovidio, et al., 2004 e Frati, et al., 2006). No presente trabalho foi possível observar atividade inibitória da proteína recombinante PvPGIP2 frente as pectinases fúngicas de *A. niger* e *N.glabra*, e da proteína recombinante PvPGIP3 frente a pectinase de *A. niger*, a qual nunca havia sido relatada anteriormente.

O PvPGIP2 é um inibidor forte, que exibe inibição competitiva em relação a PG de *Fusarium phyllophilum* e não competitiva contra PG de *A. niger*, sugerindo que a orientação do PvPGIP2 no complexo enzima/inibidor depende da PG ligante (Spinelli, et al., 2009). Após o mesmo ser testado frente à PG de *N. glabra* foi possível observar uma possível inibição não competitiva, uma vez que em diferentes concentrações do inibidor a atividade enzimática reduziu da mesma forma indicando que provavelmente este inibidor se liga à enzima, mas não em seu sítio catalítico.

Além de possuir atividade inibitória, já foi comprovado também, que as PGIPs podem funcionar como ativadores de poligalacturonase, dependendo da faixa de pH na qual está sendo trabalhado o complexo PG/Inibidor. (Kemp, et al., 2004). Devido à grande importância das atividades das pectinases fúngicas nas indústrias, principalmente na indústria alimentícia, na clarificação de sucos (Akhter,2011; Marie K. W. Sin, et al., 2002; Abe, J. et al., 1988; Aguilar and Huitron, 1987) e em coquetéis enzimáticos utilizados em processos para a extração de bioetanol de segunda geração (Latarullo, et al., 2016 e Wang, et al., 2019), a produção recombinante em larga-escala e mais estudos funcionais e estruturais sobre esses inibidores tornam-se necessários.

## 5. CONCLUSÕES

- A expressão heteróloga dos dois PGIPs de feijão em *P. pastoris* foi eficiente, gerando proteína em quantidade suficiente para desenvolver os estudos de atividade;
- As proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 não foram capazes de inibir a SI-EndoPG do inseto *Sphenophorus levis*;
- As proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 foram capazes de inibir as pectinases do fungo *A. niger*, sendo que a inibição pelo inibidor PvPGIP3 foi pela primeira vez relatada neste trabalho;
- A proteína recombinante PvPGIP2 foi capaz de inibir as pectinases de *N. glabra*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Até presente momento, este trabalho representa o primeiro relato de inibição parcial da pectinase do fungo *Neosartorya glabra*.
- Considerando que as proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 não apresentaram uma atividade inibitória sobre a SI-EndoPG, estudos estruturais dessa enzima e dos inibidores poderiam esclarecer o real motivo da não inibição.
- Considerando a importância das Pectinases na indústria alimentícia e na infestação de pragas em culturas vegetais, torna-se importante também mais estudos em relação a esses inibidores de poligalacturonase como os PGIPs da cana e o PGIP da amora.

## 7. APÊNDICE

Um dos objetivos iniciais do mestrado era a identificação e a caracterização de possíveis inibidores da endopoligalacturonase com atividade inibitória sobre a SI-EndoPG do inseto *Sphenophorus levis*. A intenção era utilizar estes inibidores em estratégias de controle do inseto. Para cumprir tal objetivo, além da produção das proteínas recombinantes PvPGIP2 e PvPGIP3 foram produzidos os vetores para expressar os inibidores de poligalacturonase de Amora e de Cana-de-açúcar, que infelizmente, não puderam ser expressos em tempo hábil. No entanto, o inibidor de amora foi isolado e clonado, assim como o de cana-de-açúcar, que poderão ser utilizados em projetos futuros.

### 7.1. Inibidor de poligalacturonase proveniente da Amora (*Morus notabilis*) – AmPGIP

#### 7.1.1. Análise in sílico

Alinhamento das seqüências primárias das proteínas AmPGIP, PvPGIP2 e PvPGIP3

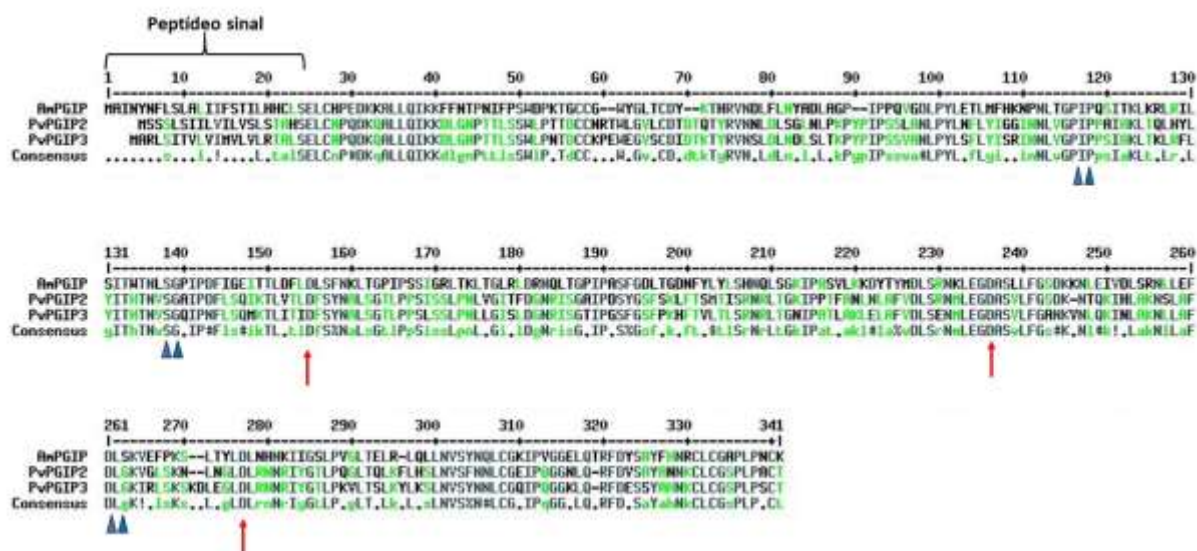
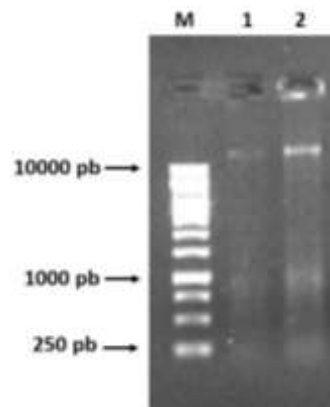


Figura Ap1: Alinhamento das seqüências primárias das Proteínas AmPGIP, PvPGIP2 e PvPGIP3. As seqüências das três PGIPs foram coletadas em banco de dados do NCBI para alinhamento no software online Multalin, com os parâmetros da matriz original. As seqüências com identidade estão representadas em cinza (90%) e

as de baixa identidade em verde (50%). As setas vermelhas indicam os aminoácidos ácidos envolvidos na ligação da proteína com a enzima e os triângulos abaixo das sequências indicam sequências consenso conservadas em PGIPs de plantas.

### 7.1.2. Extração do DNA de Amora

A extração de DNA genômico a partir das folhas da amora foi eficiente obtendo amostra em uma concentração aproximada de 50 ng/mL.

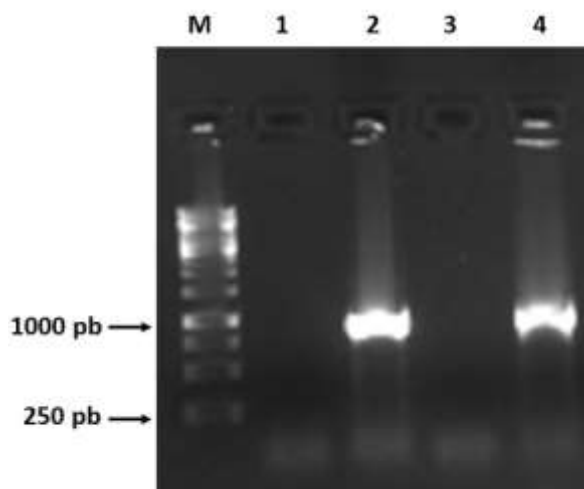


**Figura Ap2: DNA extraído das folhas da Amora.** Gel de agarose 1% mostrando em M: marcador de massa molar GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific); 1 e 2: amostras de DNA genômico da Amora.



### 7.1.3. Amplificação da região codificadora da AmPGIP

A região codificadora para AmPGIP foi amplificada com sucesso utilizando os primers específicos para a mesma (Tabela A2).

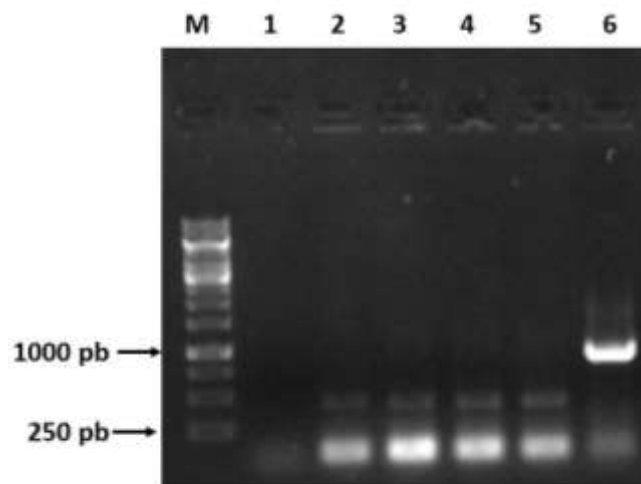


**Figura Ap3: Amplificação da AmPGIP.** A figura mostra o gel de agarose 1%, em que os produtos da PCR foram separados por eletroforese. Na PCR foi utilizado os primer Forward e Reverse específicos para AmPGIP. Em M: Marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific); 1: reação sem DNA; 2 e 4 reações positivas para amplificação do fragmento codificador do AmPGIP (924 pb).

### 7.1.4. Obtenção do vetor para expressão da AmPGIP

Como a análise prévia da estrutura primária do AmPGIP também apresentou possíveis sítios de glicosilação e cisteínas passíveis de formação de ligações de dissulfeto, assim como para os inibidores provenientes de feijão, optou-se pela produção da proteína recombinante em sistema eucarioto levando-se em conta as possíveis modificações pós-traducionais. Para isso construiu-se vetores recombinantes para expressão em levedura *Pichia pastoris* utilizando o plasmídeo de expressão pPicZ $\alpha$ A.

O vetor foi construído e o plasmídeo obtido foi denominado pPicZ $\alpha$ A\_AmPGIP (Figura A1.5).



**Figura Ap.4: Análise das colônias de E.coli DH5 $\alpha$  transformadas com o vetor pPicZ $\alpha$ A\_AmPGIP.** A figura mostra o gel 1% agarose onde os produtos da PCR de colônia foram separados por eletroforese. Na PCR foi utilizado o primer Forward do vetor ( $\alpha$ Factor) e o primer Reverse específico para o fragmento AmPGIP. M: Marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific); 1: Branco da reação; 2-5 clones não recombinantes; 6: clone recombinante.

### 7.1.5. Transformação em *Pichia pastoris*

Foram realizadas várias tentativas de transformação do clone pPicZ $\alpha$ A\_AmPGIP em *Pichia pastoris*, porém ainda não foi possível encontrar uma colônia que superexpressasse a proteína recombinante.

## 7.2. Inibidor de poligalacturonase proveniente da Cana-de-açúcar – ScPGIP

Possuíamos em nosso laboratório o clone SCVPRZ2035E03.g no vetor pSPORT, o qual continha a sequência codificante para um possível inibidor de poligalacturonase da cana-de-açúcar. Entretanto ainda não era sabida a sequência completa do mesmo. Utilizando a sequência 3' de cDNA (GenBank:CA153732.1.) e o fragmento 5' obtido após sequenciamento do clone em nosso laboratório, foi possível obter a sequência completa do mesmo (Figura Ap5).

A partir da sequência completa foram desenhados os primers específicos (Tabela A2) para posterior amplificação da ORF de interesse e clonagem no vetor de expressão pPICz $\alpha$ A (Figura A1.6). Infelizmente, ainda não foram obtidos clones recombinantes.

1 atggcgtccaccaccaccaccttcctcgctgtcttctctgctcgtggcgctggcgctccgcg  
·M·A·S·T·T·T·T·F·L·A·V·F·L·L·V·A·S·A·S·A·  
61 gcgcccggcgcggtcctgctcaccgagcgacctgcacgcgctgctgagcgtgaagcaggcg  
·A·P·A·R·S·C·S·P·S·D·L·H·A·L·L·S·V·K·Q·A·  
121 ctgggcaaccggcgacgctgtcgacgtggaccgctcgtcgcccaactgctgcgctgg  
·L·G·N·P·A·T·L·S·T·W·T·A·S·S·P·N·C·C·A·W·  
181 gaccacctccggtgcaacgacgccgggcgctgaacaacgtcttcatcgacgccgaggac  
·D·H·L·R·C·N·D·A·G·R·V·N·N·V·F·I·D·A·A·D·  
241 gacgtgcacggccagatcccgtccgcggtgggcgggctgacggagctcatgtcgcttacc  
·D·V·H·G·Q·I·P·S·A·V·G·G·L·T·E·L·M·S·L·T·  
301 ctgttcaagctgcccggggtcacgggctccatcccgaacctgcctcaccgcgctgtccaag  
·L·F·K·L·P·G·L·T·G·S·I·P·T·C·L·T·A·L·S·K·  
361 ctggagttcctcaccatctcccacaccagcgtgtccggcgccatcccggagtccttggcg  
·L·E·F·L·T·I·S·H·T·S·V·S·G·A·I·P·E·S·L·A·  
421 cggctgvcgacgctcactccgtggacctctccagcaaccaactgacggggcgcatcccg  
·R·L·R·S·L·D·S·V·D·L·S·S·N·Q·L·T·G·G·I·P·  
481 gcgtcgttcgccgacctgcccacacctccggctcgtggacctccggcgcaaccagctgacg  
·A·S·F·A·D·L·P·N·L·R·S·L·D·L·R·R·N·Q·L·T·  
541 ggcaccatcccggcggggctggtgcaggggagttccggctcgtgatcctgtcctacaac  
·G·T·I·P·A·G·L·V·Q·G·Q·F·R·S·L·I·L·S·Y·N·  
601 cagctgacgggcccgatcccgcgacgacgcgcacgacgagatcaacaccgtggacctc  
·Q·L·T·G·P·I·P·R·D·D·A·H·D·E·I·N·T·V·D·L·  
661 tcccacaacaagctcaccggcgacctcccacctgttcgctcgcggccggcccatcggc  
·S·H·N·K·L·T·G·D·P·S·H·L·F·V·A·G·R·P·I·G·  
721 aaggtggacctgtcgtggaactacctcgacttcgacctcagcaagctggtgttcccgccg  
·K·V·D·L·S·W·N·Y·L·D·F·D·L·S·K·L·V·F·P·P·  
781 gagctgacgtacctggacctgtcccacaaccaaaccggggcaccgtgccgctgtcgtg  
·E·L·T·Y·L·D·L·S·H·N·Q·I·R·G·T·V·P·L·S·L·  
841 gageggctgtccacgctgcagaagctggacctcagctacaaccgctgtgcccggccgctc  
·E·R·L·S·T·L·Q·K·L·D·L·S·Y·N·R·L·C·G·P·L·  
901 cccaaggccacggcgctgatcaagcacgggtgcaagccgtacgcgcacaaccagtgccgc  
·P·K·G·H·G·V·I·K·H·G·C·K·P·Y·A·H·N·Q·C·R·  
961 aaggggaccccgctcgcggggtgccaggacctggagtg  
·K·G·T·P·L·A·G·C·Q·D·L·E·\*·

**Figura Ap.5: Sequência completa da ScPGIP.** Sequência codificante para a ScPGIP. O pepetideo sinal previsto para esta proteína está sublinhado.

## 8. REFERÊNCIAS

Abe J, Bergman FW, Obata K, Hikuri S. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus* K-27. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.27, p.447-450, 1988.

Allen, M.L. Expressed sequenced tags from *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), the tarnished plant bug. **Gent. Mol. Res.** v.6, p. 206-213, 2007.

Allen, M. L., and J. A. Mertens. Molecular cloning and expression of three polygalacturonase cDNAs from the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. **J. Insect Sci.** v. 8 p. 1–14, 2008.

Aguilar G, Huitron C. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galactouronic acid and glucose addition. **Enzyme Microb. Technol** v.9, p.690-696, 1987.

Akhter, N.; Morshed, A. M.; Uddin, A.; et al. Production of Pectinase by *Aspergillus niger* Cultures in Solid State Media. **International Journal of Biosciences**, v.1, No.1, p. 33-42, 2011.

Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol Adv.** v.18, n.5, p.355-83, 2000.

Boettner, M. *et al.* Hight throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 51-62, 2002.

Celorio-Mancera Mde, L., L. Carl Greve, L. R. Teuber., and J. M. Labavitch. Identification of endo- and exo-polygalacturonase activity in *Lygus hesperus* (Knight) salivary glands. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** v. 70, p. 122–135, 2009.

Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881–90, 1988.

Crelier, S., M. C. Robert., J. Claude, and M. A. Juillerat. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. **J. Agric. Food Chem.** v.49, p.5566–5575, 2001.

Cruickshank, H. R. e Wade, C. G. Detection of Pectic Enzymes in Pectin-Acrylamide Gels. **Analytical biochemistry**, v.107, p.177- 18, 1980.

De Lorenzo, G., and Ferrari, S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 5, p. 295–299, 2002.

De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., and Cervone, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 39, p. 313–335, 2001.

Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K. A., Savino, C., et al. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 100, p. 10124–10128, 2003.

D' Ovidio, R.; Raiola, A.; Capodicasa, C.; et al. Characterization of the Complex Locus of Bean Encoding Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Reveals Subfunctionalization for Defense against Fungi and Insects. **Plant Physiol.** v.135(4), p.2424-35, 2004.

Evangelista, D. E. Produção recombinante, caracterização enzimática e estudos sobre a ocorrência de pectinases no “ Bicudo da Cana-de-açúcar” (*Sphenophorus levis*, *Curculionidae*), 111, Tese mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Pós- Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, 2012.

Evangelista, D. E.; de Paula, F. F.; Rodrigues, A. e Silva, F. E. Pectinases From *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): Putative Accessory Digestive Enzymes. **J. Insect Sci.** v.15(5), 2015.

Fonseca, F.P.P.; Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*; 206, Tese doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Pós- Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, fevereiro de 2012.

Frati, F.; Galletti, R.; De Lorenzo, G.; et al. Activity of endo-polygalacturonases in mirid bugs (Heteroptera: Miridae) and their inhibition by plant cell wall proteins (PGIPs). **Eur. J. Entomol.** v.103, p.515–522, 2006.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto S.; Carvalho, et al.; **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ed Agrícola Ceres Ltda. 649 P. 2002.

Girard, C., and L. Jouanin. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v. 29, p.1129–1142, 1999.

Gonzalez, Lemke, S. Determinação da atividade da pectina metilesterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco da manga. Disponível em: <<http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=41425802>>.

Gupta, R.; JUNG, E.; et al. Scanning the available *Dictyostelium discoideum* proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using networks. **Glycobiology**, V9, n.10, p.1009-22, 1999.

Hull, J.J., Geib, S.M., Fabrick, J.A., Brent, C.S. Sequencing and de novo assembly of the western tarnished plant bug (*Lygus hesperus*) transcriptome. **PLoS One** 8, 2013.

Izeppi, S. T.; Barbosa C. J.; Dinardo-Miranda L. L.; Fracasso V. j. Sphenophorus levis: como combater esta praga na cana de açúcar. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, edição 182, julho de 2014.

Kalunk, R.M.; Tundo, S.; Benedetti, M.; et al. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. **Front. Plant Sci.**, 2015.

Kemp, G.; Stanton, L.; Bergmann, W. C.; et al. Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Can Function as Activators of Polygalacturonase. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 17(8), p. 888-94, 2004.

Kirsch R, Heckel D.G., Pauchet Y. How the rice weevil breaks down the pectin network: Enzymatic synergism and sub-functionalization. **Insect Biochem Mol Biol**. v.71, p.72-82, 2016.

Latarullo, M. B. G. et al. Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1401, 2016.

Leckie, F.; Mattei, B.; Capodicasa, C. et al. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed  $\beta$ -strand/ $\beta$ -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. **The EMBO Journal**, v.18, n.9, p. 2352–2363, 1999.

Limberg, G.; Korner, R.; Christian, H.; et al. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v.327, p.321-332, 2000.

Marie, K.W.S.; Kevin, D.H.; Stephen, B.P. Comparative Enzyme Production by Fungi from Diverse Lignocellulosic Substrates. **The Journal of Microbiology** v.40(3), p.241-244, 2002.

Manfredini, C., Sicilia, F., Ferrari, S., Pontiggia, D., Salvi, G., Caprari, C., et al. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 67, 108–115, 2005.

Maulik, A.; Ghosh, H. e Basu, S. Comparative study of protein-protein interaction observed in PolyGalacturonase-Inhibiting Proteins from *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* and PolyGalacturonase from *Fusarium moniliforme*. **BMC Genomics**, 2009

Miller, L. G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical biochemistry**, 1959.

Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008a.

Pauchet, Y., Kirsch, R., Giraud, S., Vogel, H., Heckel, D.G. Identification and characterization of plant cell wall degrading enzymes from three glycoside hydrolase families in the cerambycid beetle *Apriona japonica*. **Insect Biochem. Mol.** v.49, p1-13, 2014.

Pauchet, Y., Wilkinson, P., Chauhan, R., EFrench-Constant, R.H. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS One** v.5, 2010.

Pauchet, Y., Wilkinson, P. van Munster, M., Augustin, S., Pauron, D., Ffrench-Constant, R.H. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. **Insect Biochem. Mol.** v.39, p. 403-413, 2009.

Preston, R. D. The Physical Biology of Plant Cell Walls, **Chapman & Hall**, London p. 457-479, 1947.



Petersen, T. N.; Brunak, S.; et al. SignalP 4.0 discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, n.10, p.785-786, 2011.

Pinheiro, V.; Desagiacomo, V. C. C.; Michelin, M.; et al. Neosartorya glabra polygalacturonase produced from fruit peels as inducers has the potential for application in passion fruit and apple juices. **Struct Chem**, v.20, p.263–275, 2009.

Rasband, W. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, p. //imagej.nih.gov/ij/, 2012.

Reignault, P., M. Mercier, G. Bompeix, and M. Boccara. Pectin methylesterase from botrytis-cinerea—physiological, biochemical and immunochemical studies. **Microbiology**. v. 140, p. 3249–3255, 1994.

Rinke, R.; Costa, A.S.; Fonseca, F.P.P.; et al. Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). **Genet. Mol. Res.**, v.10 (4), p. 2679-2691, 2011.

Singh, S. A. e Appu Rao, A. G. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Appl. Biochem**, 35, 115–123, 2002.

Shen, Z.C., Reese, J.C., Reeck, G.R. Purification and caracaterization of polygalacturonase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochem. Mol.** v.26, p.427-433, 1996.

Spinelli, F.; Mariotti, L.; Mattei, B.; et al. Three aspartic acid residues of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from *Phaseolus vulgaris* are critical for inhibition of *Fusarium phyllophilum* PG. **Plant Biology** ISSN 1435-8603, 2008.

Ulrike, S. V. Citrus pectin as a hydrocolloid emulsifier: Emulsifying and emulsion stabilizing properties, 2016.

Vaurie, P. Revision of the Genus Sphenophorus in South America. **American museum of natural history Central Park west**. n. 2656, p. 1-30, 1978.

Van Pouderoyen, G.; Snijder, J. H.; Benen, A. E. J. e Dijkstra W. B. Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v.554, p.462-466, 2003.

Voragen, J. G. A.; Coenen J. G.; Verhoef, P. R.; et al., Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, 20:263, 2009.

Wang, J.; Chio, C.; Chen, X.; et al. Efficient Saccharification of Agave Biomass Using *Aspergillus niger* Produced Low-cost Enzyme Cocktail with Hyperactive Pectinase Activity. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 26-33, 2019.

Watanabe,H., Noda, H., Tokuda, G., and Lo, N. A cellulase gene of termite origin. **Nature** v. 394, p. 330–341, 1998.

Watanabe, H., and G. Tokuda. Animal cellulases. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 58 p. 1167–1178, 2001.

Willis, J. D., B. Oppert, C. Oppert, W. E. Klingeman, and J. L. JuratFuentes. Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Insect Physiol.** v. 57, p. 300–306, 2011.

York, W. S.; Darvill, A. G. et al. Isolation na Characterization of Plant-Cell-Walls and Cell-Wall Components. **Methods in Enzymology**, v.118, p.3-40, 1986.

## 9. ANEXOS

**Tabela A1: Sequências utilizadas no alinhamento múltiplo das PGIPs.** Número de acesso no GenBank do NCBI.

Sequências	Número de acesso
PvPGIP1	AJ864506.1
PvPGIP2	AJ864507.1
PvPGIP3	AJ864508.1
PvPGIP4	AJ864509.1
AmPGIP	XM_010113102.1
Endopolygalacturonase C	XP_001397067.1
ScPGIP (parcial)	CA153732.1

**Tabela A2: Primers utilizados para a clonagem das PGIPs.** Os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI*, *Sall* e *NotI* encontram-se sublinhados.

Nome	Sequência
PvPGIP1_ <i>EcoRI</i> _FW	5`-AAAGA <u>ATT</u> CGAGCTATGCAACCCACAAGATA-3`
PvPGIP1_ <i>Sall</i> _RV	5`-AAAG <u>T</u> CGA <u>C</u> AGTGCAGGAAGGAAGAGGAGAA-3`
PvPGIP2_ <i>EcoRI</i> _FW	5`-AAAGA <u>ATT</u> CGAGCTATGCAACCCACAAGACA-3`
PvPGIP2_ <i>Sall</i> _RV	5`-AAAG <u>T</u> CGA <u>C</u> AGTGCAGGCAGGAAGAGGAGAA -3`
PvPGIP3_ <i>EcoRI</i> _FW	5`-AAAGA <u>ATT</u> CGAACTATGCAACCCACAAGACA-3`
PvPGIP3_ <i>Sall</i> _RV	5`-AAAG <u>T</u> CGA <u>C</u> AGTGCAGAAGGAAGTGGAGAA-3`
PvPGIP4_ <i>EcoRI</i> _FW	5`-AAAGA <u>ATT</u> CGAACTATGCAACCCACAAGACA-3`
PvPGIP4_ <i>Sall</i> _RV	5`-AAAG <u>T</u> CGA <u>C</u> AGTGCAGGAGGAAGTGGAGAA-3`
AmPGIP_ <i>EcoRI</i> _FW	5`-AAAGA <u>ATT</u> CGAGCTCTGCCATCCTGAAGACA -3`
AmPGIP_ <i>Sall</i> _RV	5`-AAAG <u>T</u> CGA <u>C</u> ACTCATTTCAGTTCGGTAGCGG -3`
ScPGIP_ <i>EcoRI</i> _FW	5`-AAAGA <u>ATT</u> CGCGCGGTCTGCTCACCGAGCG -3`
ScPGIP_ <i>NotI</i> _RV	5`-AAAG <u>C</u> GG <u>C</u> CGCCTCCAGGTCCTGGCACCCCGCG-3`

**Tabela A3: Atividade inibitória dos PGIPs de feijão genótipos BAT93 e Pinto contra PGs fúngicas e de insetos.**

Poligalacturonases	pH	Ativ. R	PvBPGIP1 PvPPGIP1	PvBPPGIP2	PvPPGIP2	PvBPGIP3 PvPPGIP3	PvBPGIP4 PvPPGIP4
<i>Aspergillus niger</i>	4.7	1	140	10	1	∞	250
	7	0	-	-	-	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	4.7	1	∞	∞	9	∞	∞
	7	0	-	-	-	-	-
<i>Stenocarpella maydis</i>	4.7	1	7.5	4.5	5	260	65
	7	0	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum acutatum</i>	4.7	1	16	12	12	230	1200
	7	0.8	16	15	13	690	1400
<i>Botrytis cinera</i>	4.7	1	200	16	2.5	100	70
	7	1.1	∞	17	4	∞	120
<b><i>Lygus rugulipennis</i></b>	<b>4.7</b>	<b>0</b>	-	-	-	-	-
<b><i>Adelphocoris lineolatus</i></b>	<b>7</b>	<b>1</b>	∞	∞	∞	<b>490</b>	<b>1950</b>
<b><i>Adelphocoris lineolatus</i></b>	<b>4.7</b>	<b>0</b>	-	-	-	-	-
<b><i>Adelphocoris lineolatus</i></b>	<b>7</b>	<b>1</b>	∞	∞	∞	<b>2100</b>	<b>1954</b>

Fonte D' Ovidio, 2004 modificado.

## Figura A1.1

### pPicZαA\_PvPGIP1

ATGAGATTTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA  
 CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAG  
 GGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACT  
 ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATT  
 CGAGCTATGCAACCCACAAGATAAGCAAGCCCTTCTCCAAATCAAGAAAGACCTTGGCAACCCAACCA  
 CTCTCTCTTCATGGCTTCCAACCACCGACTGTTGTAACAGAACCTGGCTAGGTGTTTTATGCGACACC  
 GACACCCAAACATATCGCGTCAACAACCTCGACCTCTCCGGCCATAACCTCCCAAACCTACCCTAT  
 CCCTTCTCCCTCGCCAACCTCCCCTACCTCAATTTTCTATACATTGGCGGCATCAATAACCTCGTCG  
 GTCCAATCCCCCCGCCATCGCTAAACTCACCCAACCTCCACTATCTCTATATCACTCACACCAATGTC  
 TCCGGCGCAATACCCGATTTCTTGTACAGATCAAAACCTCGTCACCCTCGACTTCTCCTACAACGC  
 CCTCTCCGGCACCTCCCTCCCTCCATCTCTTCTCTCCCAACCTCGGAGGAATCACATTCGACGGCA  
 ACCGAATCTCCGGCGCCATCCCCGACTCCTACGGCTCGTTTTCGAAGCTGTTTACGGCGATGACCATC  
 TCCCGCAACCGCCTCACCGGAAGATTCCACCGACGTTTGCGAATCTGAACCTGGCGTTTCGTTGACTT  
 GTCTCGGAACATGCTGGAGGGTGACGCGTGGTGTGTTTCGGGTCAGATAAGAACACGAAGAAGATAC  
 ATCTGGCGAAGAACTCTCTTGCTTTTGATTTGGGGAAAGTGGGGTTGTCAAAGAACTTGAACGGGTTG  
 GATCTGAGGAACAACCGTATCTATGGGACGCTACCTCAGGGACTAACGCAGCTAAAGTTTCTGCAAAG  
 TTAAATGTGAGCTTCAACAATCTGTGCGGTGAGATTCCCTCAAGGTGGGAACCTTGAAGAAGTTTGACG  
 TTTCTTCTTATGCCAACACAAGTGCTTGTGTGGTTCTCCTTCTCCTTCTCCTGCACTGTCGACCATCAT  
 CATCATCATCATTGA

## A1.2

### pPicZαA\_PvPGIP2

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA  
CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTACTCAGATTTAGAAG  
GGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACT  
ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATT  
CGAGCTATGCAACCCACAAGACAAGCAAGCCCTTCTCCAAATCAAGAAAGACCTTGGCAACCCAACCA  
CTCTCTCCTCATGGCTTCCAACCACCGACTGTTGTAACAGAACCTGGCTAGGTGTTTTATGCGACACC  
GACACCCAAACATATCGCGTCAACAACCTCGACCTCTCCGGCCTTAACCTCCCAAACCCCTACCCTAT  
CCCTTCTCCTCGCCAACCTCCCCTACCTCAATTTTCTATACATTGGAGGCATCAATAACCTCGTGC  
GTCCAATCCCCCCCCGCCATCGCTAAACTCACCCAACCTCCACTATCTCTATATCACCCACACCAATGTC  
TCCGGCGCAATACCCGATTTCTTGTACAGATCAAAACCCCTCGTACCCTCGACTTCTCCTACAACGC  
CCTCTCCGGCACCTACCTCCCTCCATCTCTTCTCTCCCCAACCTCGTCCGAATCACATTGACGGCA  
ACCGAATCTCCGGCGCCATCCCCGACTCCTACGGCTCATTTTTCGAAGCTGTTTACGTCGATGACCATC  
TCCCGCAACCGCCTCACCGGGAAGATTCCGCGGACGTTTGCGAATCTGAACCTGGCGTTTCGTTGACTT  
GTCTCGAAACATGCTGGAGGGTGACGCGTGGTGTGTTCGGGTGAGATAAGAACACGCAGAAGATAC  
ATCTGGCGAAGAAGCTCTCTTGCCTTTGATTTGGGGAAAGTGGGGTTGTCAAAGAAGTTGAACGGGTG  
GATCTGAGGAACAACCGTATCTATGGGACGCTACCGCAGGGACTGACGCAGCTAAAGTTTCTGCACAG  
TTTAAATGTGAGCTTCAACAATCTGTGCGGTGAGATTCCCTCAAGGTGGGAAGTTGCAAAGATTTGACG  
TTTCTGCTTATGCCAACAACAAGTGCTTGTGTGGTTCTCCTTCTCCTGCCTGCCTGACTGTCGACCATCAT  
CATCATCATCATTGA

## A1.3

### pPicZαA\_PvPGIP3

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA  
CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTACTCAGATTTAGAAG  
GGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACT  
ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATT  
CGAAGCTATGCAACCCACAAGACAAGCAAGCCCTTCTCCAGATCAAGAAAGACCTCGGCAACCCAACCA  
CCCTCTCCTCCTGGCTCCCAAACACCGACTGCTGCAAACCGGAATGGGAAGGTGTCTCATGCGACATC  
GACACCAAACATACCGCGTCAACAGCCTCGACCTCAACGACCTTAGCCTCACCAAACCCCTACCCTAT  
CCCTTCTCCTCCGTCCGCAACCTCCCCTACCTCAGTTTTTCTCTACATTTCTCGCATCAACAACCTCGTGC  
GTCTATCCCCCCTCCATCGCCAAACTCACCAAACCTCCGTTTTCTCTACATCACCCACACCAACGTC  
TCTGGCCAGATACCAAATTTCTTGTCCCAAATGAAAACCCCTTATAACCATGATTTCTCCTACAACGC  
CCTCTCCGGCACACTCCCTCCCTCCCTCTCTTCTCTCCCCAACCTCCTCGGAATCTCCCTCGACGGCA  
ACCGAATCTCCGGCACCATCCCGGGTCTTTCGGCTCCTTCCCAGCATTTTCACGGTGTGACTGACACTC  
TCCCGCAACCGTCTCACCGGCAATATACCGGCGACGCTGGCTAAGCTGGAAGTGGCGTTTCGTTGACTT  
GTCTGAGAACATGCTGGAAGGAGATGCATCGGTGCTGTTTGGGGCAAATAAGGTAAATTTGCAGAAGA  
TAAACCTGGCGAAGAAGTTACTGGCTTTTGTGATTTGGGGAAAATAAGGTGTGCAAGTCAAGGACTTA  
GAGGGTTGGATCTTAGGAACAACCGTATCTATGGGACGCTTCCCAAGTTCTTACGTCTCTTAAGTA  
TCTGAAGAGTTTGAATGTGAGCTACAATAATCTGTGTGGTCAAGTTCCCTCAAGGTGGAAAGTTGCAGA  
GATTTGATGAATCTTCTATGCTCATAACAAGTGCTGTGCGGTTCTCCACTTCTTCTTGCCTGACTGTC  
GACCATCATCATCATCATCATTGA

## A1.4

### pPicZαA\_PvPGIP4

ATGAGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA  
CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAG  
GGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACT  
ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATT  
CGAACTATGCAACCCACAAGACAAGCAAGCCCTTCTCCAGATCAAGAAAGACCTCGGCAACCCAACCA  
CCCTCTCCTCCTGGCTCCCAAACACCGACTGCTGCAAACCGAATGGGAAGGTGTCTCATGCGACACC  
GACACCAAATCATAACCGCGTCAACATCCTCGACCTCAACGGCCTTAGCCTCACCAAACCTACCCTAT  
CCCTTCCCTCCGTCGGCAACCTCCCCTACCTCGGTTCACTCTACATCTCTCGCATGAACAACCTCGTGC  
GTTCTATCCCCCCTCCATCGCCAAACTCACCAAACCTCGGTTTTATCCGAATCTCCACACCAACGTC  
TCTGGCCAGATACCCAATTTCTTGTCCCAAATGAAAAGCCTTATAACCATTGATTTCTCCTACAACGC  
CCTCTCCGGCACACTCCCTCCCTCCTCTCTTCTCTCCCAACCTCGTCGGAATCTCCCTCGACGGAA  
ACCGCATCTCCGGCACCATTCGGGGTCTTTCGGCTCCTTCCCGAAGCATTTCACGGTGTGACACTC  
TCCCGCAACCGCCTCACCGGCAATATTCCGACGACGCTGGCTAAGTTGGGACTGTGCTTCGTGGACTT  
GTCTGAGAACATGCTGGAAGGAGATGCATCGGTGCTTTTTGGGGCAAATAAAAATTTGCGGAAGATAG  
ACCTGGCGAAGAACTTACTTGTCTTTGATTTGGGAAAATAAGTTTGAGGTCAAGAACTTAGAGGGG  
TTGGATCTTAGGAAGAACCGTATCTATGGGACGCTTCCCAAGGTTCTTACGTCTCTTAAGTATCTGAG  
GACTTTGAATGTGAGCTACAATAATCTGTGTGGTTCAGATTCCGCAAGGAGGGAAGTTGCAGAGATTTA  
GTGAATATTGTTATGCTCATAACAAGTGTCTGTGCGGTTCTCCACTTCCTCCTTGCACTGTCGACCAT  
CATCATCATCATCATTGA

## A1.5

### pPicZαA\_AmPGIP

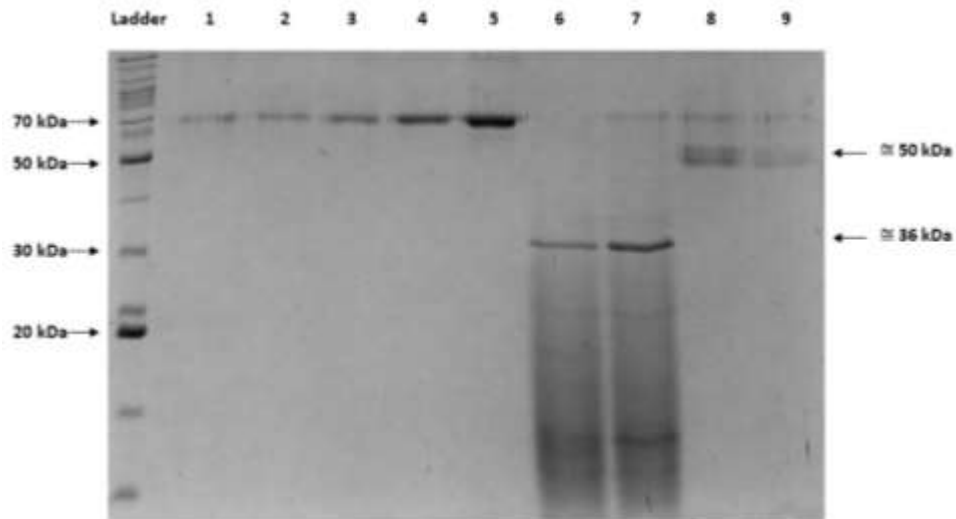
ATGAGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA  
CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAG  
GGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACT  
ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATT  
CGAGCTCTGCCATCCTGAAGACAAGAAAGCCCTCCTCCAAATCAAGAAATTTCTTCAACACCCCTAATA  
TCTTCCCCTCGTGGGACCCGAAAACCGGTGTTGCGGTTGGTACGGCCTCACTTGCAGCTACAAAACC  
CACCGAGTAAATGACCTCTTCCCTCAACTACGCCGACCTCGCGGGACCGATCCCGCCCCAAGTCGGCGA  
CCTTCCCTATCTCGAAACCCCTCATGTTCCACAAAAACCCAAACCTGACGGGACCGATTCCACAGTCCA  
TCACCAAGCTAAAGAGGCTCCGGATCCTCAGTATAACCTGGACCAACCTCTCGGGTCCCATCCCGGAC  
TTCATTGGCGAAATCACCAACCTCGATTTCTTGATCTCTCTTTCAACAACTAACGGGACCGATCCC  
GAGCTCCATCGGTCCGCTGACGAAACTCACAGGCCTCCGGTTAGACCGTAACCAACTCACGGGACCGA  
TCCCGGCCTCATTCGGGGATCTCACTGGAGATAATTTTTATCTCTACTTATCGCACAAACCAACTTTCT  
GGGAAAATACCGGCCTCAGTGTGAAAAAGGACTACACCTACATGGACCTGTGCGGGAACAAGCTCGA  
GGGCGATGCGTGCCTGCTGTTCCGATCGGACAAGAAGAATTTGGAGATCGTGGACCTGTGAGGAACCT  
TGTTGGAGTTCGATCTGTGCAAGGTCGAGTTTCCGAAGAGCTTGACCTATTTAGATCTAAACCACAAC  
AAGATAATTGGGAGTCTTCCGGTGGGGCTGACCGAGCTGAGACTACAGCTGCTCAATGTGAGTTACAA  
CCAGCTGTGCGGGAAGATCCCGGTCCGGCGGGAATTGCAGACGAGGTTGACTACTCAGCCTACTTCC  
ATAACCGCTGCTTGTGCGGAGCGCCGCTACCGAACTGCAAAGTGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA

## A1.6

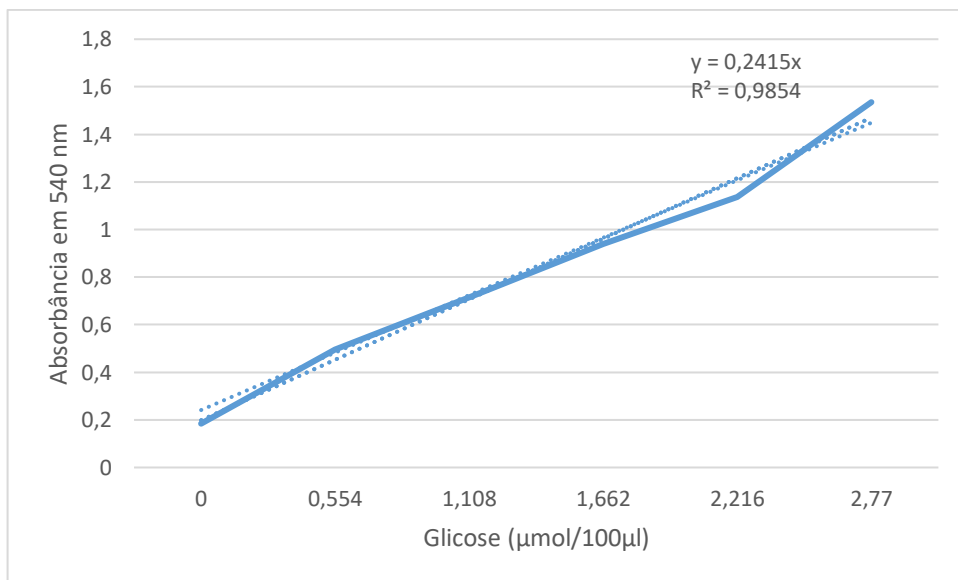
### pPicZαA\_ScPGIP

ATGAGATTTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAA  
CACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAG  
GGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACT  
ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATT  
CGCGCGGTCTGCTCACCGAGCGACCTGCACGCGCTGCTGAGCGTGAAGCAGGCGCTGGGCAACCCGG  
CGACGCTGTCGACGTGGACCGCGTCGTCGCCAACTGCTGCGCGTGGGACCACCTCCGGTGCAACGAC  
GCCGGGCGCGTGAACAACGTCTTCATCGACGCCCGGACGACGTGCACGGCCAGATCCCGTCCGCGGT  
GGGCGGGCTGACGGAGCTCATGTCGCTTACCCTGTTCAAGCTGCCGGGGCTCACGGGCTCCATCCCGA  
CCTGCCTCACCGCGCTGTCCAAGCTGGAGTTCCTCACCATCTCCCACACCAGCGTGTCCGGCGCCATC  
CCGGAGTCCCTGGCGCGGGCTGCGCAGCCTCGACTCCCGTGGACCTCTCCAGCAACCAACTGACGGGCGG  
CATCCCGGCGTGTTCGCCGACCTGCCCAACCTCCGGTCGCTGGACCTCCGGCGCAACCAGCTGACGG  
GCACCATCCCGGCGGGGCTGGTGCAGGGGCAGTTCGGTCGCTGATCCTGTCTTACAACCAGCTGACG  
GGCCCATCCCGCGCGACGACGCGCAGCAGAGATCAACACCGTGGACCTCTCCCACAACAAGCTCAC  
CGGCGACCCCTCCCACCTGTTTCGTCGCCGGCCGGCCATCGGCAAGGTGGACCTGTGCTGGAACCTACC  
TCGACTTCGACCTCAGCAAGCTGGTGTTCGCCCGGAGCTGACGTACCTGGACCTGTCCACAACCAA  
ATCCGGGGCACCGTGCCGCTGTGCTGGAGCGGCTGTCCACGCTGCAGAAGCTGGACCTCAGCTACAA  
CCGCCTGTGCGGGCCGCTCCCCAAGGGCCACGGCGTGATCAAGCACGGGTGCAAGCCGTACGCGCACA  
ACCAGTGCCGCAAGGGGACCCCGCTCGCGGGGTGCCAGGACCTGGAGCGCGCCAGCTTTCTAGAA  
CAAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCTGA

**Figuras A1.1-6: Clones Recombinantes:** A figura ilustra a região dos vetores recombinantes pPicZαA\_PvPGIP1, pPicZαA\_PvPGIP2, pPicZαA\_PvPGIP3, pPicZαA\_PvPGIP4, pPicZαA\_AmPGIP e pPicZαA\_ScPGIP, respectivamente. As trincas de nucleotídeos destacadas em vermelho indicam os códons de início e terminação na síntese das proteínas recombinantes. A ORF, isenta das sequências codificantes para o peptídeo sinal e códon de terminação nativos, está ressaltada em preto. Os nucleotídeos sublinhados são referentes aos sítios de restrição utilizados na clonagem dos plasmídeos.



**Figura A2: Quantificação das proteínas PvPGIP2 e PvPGIP3 recombinantes.** Gel SDS PAGE. Ladder o marcador de massa molecular (Invitrogen); 1-5: Curva padrão com quantidade conhecidas para proteína BSA (0,039 - 0,625 µg); 6: PvPGIP2 (0,05 µg/µL); 7: PvPGIP3 (0,14 µg/µL) e 8 e 9: Enzima SI-endoPG (0,15 µg/µL e 0,04 µg/µL respectivamente).



**Figura A3: Curva padrão.** Gráfico de absorbância em 540 nm pela quantidade de glicose em µmol/µL.