

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS DE POLIGALACTURONASES DO FUNGO
MUTUALISTA *LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS*”**

Camilla Calemi Golfeto*

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista FAPESP.**

**São Carlos - SP
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS DE POLIGALACTURONASES DO FUNGO
MUTUALISTA *LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS*”**

Camilla Calemi Golfeto*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

* bolsista FAPESP.

**São Carlos - SP
2013**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

G625ep Golfeto, Camilla Calemi.
Estudos de poligalacturonases do fungo mutualista
Leucoagaricus gongylophorus / Camilla Calemi Golfeto. --
São Carlos : UFSCar, 2014.
87 f.

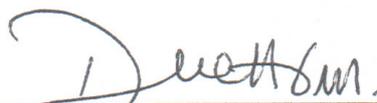
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2013.

1. Química. 2. Poligalacturonase. 3. *Leucoagaricus
gongylophorus*. 4. Proteínas recombinantes. 5.
Macromoléculas. 6. Biologia molecular. I. Título.

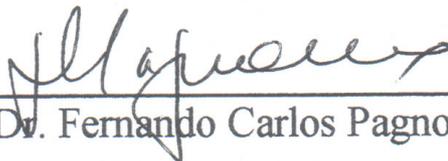
CDD: 540 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Camilla Calemi Golfeto**, realizada em 12 de julho de 2013:*



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza



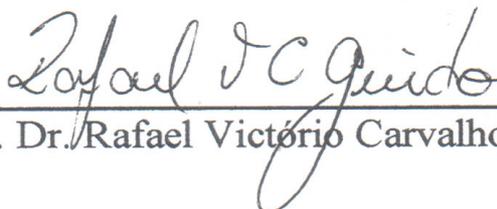
Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Profa. Dra. Maria Celia Bertolini



Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido

*Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei
Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs
É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir
Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou...
...Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora...
...Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

Dedico este trabalho ao meu querido pai Luiz (in memoriam), por seu amor, confiança e ensinamentos. À minha mãe Helena por todo apoio para que eu chegasse até aqui. Ao meu marido Fábio por todo seu companheirismo, paciência, compreensão, amizade, amor incondicional, auxílio e esforço para conquistarmos uma vida juntos.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza pelos anos de convivência, pelo apoio e pela orientação no trabalho de doutorado. Novamente obrigada, pois com certeza muito foi aprendido nesse período.

A Profa. Dra. Quézia Bezerra Cass e ao Dr. Paulo Roberto Adalberto pela parceria e convivência.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pelo laboratório e parceria e ao amigo Dr. Wilson Malagó Júnior pela parceria, atenção e pela paciência nas infinitas extrações de RNA e biblioteca de cDNA que fizemos juntos, além dos seus grandes ensinamentos.

Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani, por serem sempre atenciosas e prestativas a nos atender.

Aos amigos e colegas do Laboratório: Adriana, Ariele, Caio, Carol, Evandro, Guilherme, Júlio, Kátia, Mônica, Paulo, Priscila e Tatiane pela amizade e pelo agradável ambiente de trabalho estando sempre dispostos em colaborar. Agradeço em especial às amigas Ariele, Priscila e Mônica por todo apoio e dedicação nas discussões científicas. E aos colegas que já não estão mais no laboratório, mas trabalhamos juntos algum tempo: Aninha, Barbie, Patrícia, Bianca e Nabor.

Aos amigos e companheiros que são como irmãos Paula, Paulo, Marília, Ariele, Priscila, Mônica, Giba, Laynes, Alexandre e Fabinho, pela amizade verdadeira, e pelos muitos momentos de discussão científica (entre outras!) regada à cerveja e churrasco.

À minha mãe pela confiança e à minha grande e querida família, meus irmãos, cunhadas, sobrinhos, tias e tios, minha sogra, pela confiança que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as decisões. E mesmo que elas não tenham noção nenhuma disso, mas que fique registrado meu agradecimento às minhas cachorras, que me dão infinitos momentos de alegria, descontração, companheirismo e amor incondicional. Minhas filhas!

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela oportunidade de aprendizado e à FAPESP, pela bolsa concedida.

Lista de abreviaturas

λ	Comprimento de onda
Abs	Absorbância
ADNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
BLAST	Programa computacional para busca de homologies locais entre DNAs ou proteínas (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Soro albumina bovina (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
cDNA	DNA complementar a um mRNA
cfu	<i>Colony-forming unit</i>
CMC	Carboximetilcelulose
DEPC	<i>Diethyl Pyrocarbonate</i> (Dietilpirocarbonato)
DNA	<i>Deoxiribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	<i>Ethylenedinitrilo Tetraacetic Acid</i>
FDu	Unidade <i>Fast Digest</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatograph</i>
g	Unidade de força rotocentrífuga (gravidades) ou unidade de massa (grama)
GST	Glutathione-S-transferase
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton(s), unidade de massa molecular
L	Litro
LB	Meio de cultura de bactérias (L uria B ertani)
mA	Miliamper
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOPS	3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico mensageiro)
MWCO	<i>Molecular-Weight Cutoff</i>
mM	Milimolar
NCBI	Centro de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos da América (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
ng	Nanograma
Ni-NTA	Ácido Nitriliacético carregado com íons níquel

nm	Nanômetro (unidade de medida correspondente a 10^{-9} metros)
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PG ou PGase	Poligalacturonase
PGL	Poligalacturonato liase (pectato liase)
PMG	Polimetilgalacturonase
PMGE	Polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase)
PMGL	Polimetilgalacturonato liase
poli-dA	Oligonucleotídeo composto de poli-desoxiadeninas
poli-dT	Oligonucleotídeo composto de poli-desoxitimidinas
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
RNAse	Ribonuclease que degrada RNA
rpm	Rotações por minuto
rRNA	<i>ribossomal RNA</i> (RNA ribossomal)
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> (Transcriptase reversa)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
T_m	<i>Temperature melting</i>
Tris	<i>Tris[hydroxymethyl]aminomethane</i>
u	Unidade (enzimática)
UV-vis	Ultravioleta visível
V	Volts
v/v	volume/volume (proporção)
X-GAL	Análogo da lactose (5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Classificação das enzimas pécticas (UENOJO & PASTORE, 2007)..	13
Tabela 3.1: Reagentes.....	19
Tabela 3.2: Kits.....	19
Tabela 3.3: Tampões e Soluções.....	20
Tabela 3.4: Cepas de bactérias e levedura.....	20
Tabela 3.5: Vetores.....	20
Tabela 3.6: Meios de cultura.....	21
Tabela 3.7: Enzimas de restrição.....	22
Tabela 3.8: Equipamentos.....	22
Tabela 3.9. Outros Materiais.....	23
Tabela 5.1. Valores de A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} e concentração da amostra de mRNA.....	48

Lista de Figuras

Figura 1.1. Formiga saúva carregando folha recém cortada (SCHIOTT <i>et al.</i> , 2010) e área de pastagem prejudicada por formigueiros (Disponível em < http://www.homeorganica.com.br/?p=420 >)	01
Figura 1.2. Formigas cortadeiras cultivando fungo (MIKHEYEV <i>et al.</i> , 2006)	03
Figura 1.3. Ciclo das proteínas da gota fecal dentro do formigueiro (Modificado de SCHIOTT <i>et al.</i> 2010)	05
Figura 1.4. Estrutura da parede celular vegetal (Modificada de: < http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal15.php >)	08
Figura 1.5. Estrutura primária de uma molécula de pectina. Não estão incluídos resíduos de ramnose, galactose, arabinose e xilose (Modificado de UENOJO & PASTORE, 2007)	09
Figura 1.6. Representação da cadeia péctica (Modificada de CANTERI <i>et al.</i> , 2012)	11
Figura 1.7. Modo de ação enzimática das pectinases. PMGL: polimetilgalacturonato liase; PMG: polimetilgalacturonase; PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase); PGL: poligalacturonato liase (pectato liase); PG: poligalacturonase (UENOJO & PASTORE, 2007)	12
Figura 1.8. Modo de ação da pectina esterase (desesterificação) (CANTERI <i>et al.</i> , 2012)	13
Figura 1.9. Modo de ação das hidrolases (hidrólise ácida) (CANTERI <i>et al.</i> , 2012)	14
Figura 1.10. Modo de ação das liases (β -eliminação) (CANTERI <i>et al.</i> , 2012)	14
Figura 4.1. Representação simplificada da reação de hidrólise da cadeia principal de ácido poligalacturônico e seus produtos de degradação na reação com ADNS	26
Figura 4.2. Resumo do processo de síntese de cDNA do Kit <i>CloneMiner™ cDNA Library Construction</i> (Invitrogen)	30
Figura 4.3: Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados para o gene da PGase de <i>L. gongylophorus</i> com sítios de clivagem para as enzimas <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> e <i>HindIII</i>	32
Figura 4.4. Interação entre resíduos vizinhos na cauda de histidina e a matriz Ni-NTA (Fonte: The QIAexpressionist 06/2003)	41
Figura 5.1. Ninhos artificiais de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (formiga saúva) da UNESP – Rio Claro/SP	43
Figura 5.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	43
Figura 5.3. Cromatograma resultante da coluna Superdex 75. Círculo vermelho indica as frações contendo atividade	44

Figura 5.4: Análise em gel de tricina das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular em Superdex75. 1 : marcador de baixo peso molecular (GE - RNP755E). (A) 2-8 : frações 66-72; (B) 2-5 : frações 73-76.....	45
Figura 5.5. Atividade da enzima PGase-Lg em função da temperatura (A) e do pH (B) (ADALBERTO, P.R <i>et al</i> , 2012).....	45
Figura 5.6. Gráfico de Lineweaver-Burk para os parâmetros cinéticos da PGase-Lg para a hidrólise de ácido poligalacturônico a 60°C e pH 5,0.....	46
Figura 5.7. Análise da qualidade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando a presença das bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S, 18S e 5S. 1 : 1kb <i>DNA Ladder</i> (SM1163 - Thermo Scientific); 2-6 : amostras de RNA de 1 a 6, respectivamente.....	48
Figura 5.8. Análise da qualidade da amostra de mRNA por eletroforese em gel de agarose 1%. 1 : 1kb <i>DNA Ladder</i> (SM1163 - Thermo Scientific); 2 : mRNA.....	49
Figura 5.9: Análise de frações de cDNA em placa de agarose 1%. Linha superior: diluições de 50 a 1 ng do plasmídeo pEXP7- <i>tet</i> ; Linha inferior: fracionamento de cDNA, coletas de 1 a 20.....	50
Figura 5.10: Quantificação de fragmentos maiores de cDNA em placa de agarose 1%. Linha superior: diluições de 50 a 1 ng do plasmídeo pEXP7- <i>tet</i> ; Linha inferior: diluições de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 do cDNA.....	50
Figura 5.11: Análise de clones da biblioteca por restrição com a enzima <i>BsrGI</i> em gel de agarose 1%. Pad : 1kb <i>DNA Ladder</i> (SM1163 - Thermo Scientific); 1 a 18 : clones digeridos com a enzima <i>BsrGI</i>	52
Figura 5.12. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação por PCR do cDNA. 1 : marcador de peso molecular (SM1153 – Thermo Scientific); 2 : controle negativo; 3 : produto de PCR (1058pb).....	55
Figura 5.13. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação do cDNA purificado. 1 : marcador de peso molecular (SM1153 – Thermo Scientific); 2 : produto purificado de 1058 pb da amplificação por PCR.....	55
Figura 5.14. Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação da digestão com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> . 1 : marcador de peso molecular 1kb (SM1163 - Thermo Scientific); 2 : pETSUMO digerido (5624pb); 3 : ORF da PGase-Lg digerida (1033pb).....	57
Figura 5.15. Eletroforese em gel de agarose 1% da confirmação por PCR da ligação pETSUMO-PGase-Lg. 1 : marcador de peso molecular (SM1153 - Thermo Scientific); 2 : controle negativo da PCR; 3 e 4 : produtos de 1041 pb da amplificação da ORF da PGase-Lg.....	57
FIGURA 5.16: Representação esquemática para a construção do clone com o gene PGase-Lg no vetor pETSUMO (pETSUMO-PGase-Lg (6657pb)).....	57
Figura 5.17. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% do meio intracelular da expressão de His. <i>tag</i> -SUMO. <i>tag</i> -PGase-Lg-BL21(DE3) induzida com 0,6mM de IPTG à 37°C por 4 horas. 1 : marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); 2 : t_0 – antes da indução; 3 : t_4 – após 4 horas de indução; 4 : pellet t_4 após lise; 5 : sobrenadante lise. A seta indica a expressão da proteína em fusão His. <i>tag</i> -SUMO. <i>tag</i> -PGase-Lg (48,2kDa).....	59

- Figura 5.18. Análise por *Western Blot* com anticorpo anti-His. **1:** *pellet* t_4 após lise; **2:** sobrenadante lise. A seta indica a expressão da proteína em fusão His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg (48,2kDa), marcada pelo anticorpo anti-His. *Os valores de marcador de peso molecular (preparado com padrões da Sigma®) haviam sido marcados na membrana, não sendo possível a visualização das marcações através da foto..... 60
- Figura 5.19. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da expressão de His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg-BL21(DE3)pT-GroE induzida com 0,6mM de IPTG à 37°C por 4 horas. **1:** marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2:** t_0 – antes da indução; **3:** t_4 – após 4 horas de indução; **4:** *pellet* t_4 após lise; **5:** sobrenadante lise; **6:** *void*; **7:** *wash*; **8:** eluído 1; **9:** eluído 2..... 62
- Figura 5.20. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da expressão e purificação em resina de níquel do *refolding* da proteína em fusão His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg. **1:** marcador de peso molecular (preparado com padrões da Sigma®); **2:** pré-coluna; **3:** *void*; **4:** *wash*; **5:** amostra eluída com 250mM de imidazole em citrato-fosfato 60mM pH 8,0 com 6M de uréia; **6 a 9:** amostras com 4, 3, 2 e 1M de uréia, respectivamente..... 64
- Figura 5.21. Sequência de resíduos de aminoácidos da PGase-Lg (SCHIØTT *et al.*, 2010). Os resíduos de aminoácidos destacados em verde indicam possíveis sítios de N-glicosilação e o destacado em vermelho possível sítio de O-glicosilação..... 64
- Figura 5.22. Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação da digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI*. **1:** marcador de peso molecular (SM1563 - Thermo Scientific); **2 e 3:** ORF da PGase-Lg digerida (1049 pb); **4:** pPICZ α A digerido (3543 pb)..... 65
- Figura 5.23. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do pPICZ α A-PGase. **1:** marcador de peso molecular (SM1143 - Thermo Scientific); **2:** controle negativo; **3 e 4:** produtos de 1058 pb da amplificação da ORF da PGase-Lg..... 66
- FIGURA 5.24: Representação esquemática para a construção do clone com o gene PGase no vetor pPICz α A (pPICz α A-PGase (4592 pb))..... 67
- Figura 5.25. Eletroforese em gel de agarose 1% do pPICZ α A-PGase-Lg linearizado com *SacI*. **1:** marcador de peso molecular (SM1563 - Thermo Scientific); **2:** pPICZ α A-PGase-Lg digerido (4592pb)..... 68
- Figura 5.26. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico extraído de 6 colônias transformantes em KM71H..... 69
- Figura 5.27. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do DNA genômico de pPICZ α A-PGase-Lg. **1:** marcador de peso molecular (SM1153 - Thermo Scientific); **2:** controle negativo; **3 a 8:** produtos de 1058 pb da amplificação por PCR..... 69
- Figura 5.28. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% dos sobrenadantes da expressão em KM71H induzida por metanol à 30°C. **1:** marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2:** t_{144} controle (após 144 horas de indução do controle pPICZ α A-KM71H); **3 a 9:** expressão da proteína de fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg (t_0 - t_{144} horas respectivamente)..... 70

Figura 5.29. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% de 20 μ L dos sobrenadantes da expressão em KM71H induzida por metanol à 30°C por 144 horas. 1 : marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); 2 a 8 : expressão extracelular da proteína em fusão <i>c-myc</i> epitopo. <i>tag</i> -His. <i>tag</i> -PGase-Lg (t_0 a t_{144} horas respectivamente). As setas vermelhas indicam as proteínas em fusão expressas.....	71
Figura 5.30. Gráfico de atividade relativa <i>versus</i> tempo de indução da expressão extracelular da proteína em fusão <i>c-myc</i> epitopo. <i>tag</i> -His. <i>tag</i> -PGase-Lg (t_0 a t_{144} horas).....	72
Figura 5.31. Análise por <i>Western Blot</i> com anticorpo anti-His. 1 : marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); 2 a 8 : expressão extracelular da proteína em fusão <i>c-myc</i> epitopo. <i>tag</i> -His. <i>tag</i> -PGase-Lg (t_0 a t_{144} horas respectivamente). A seta vermelha indica a expressão da proteína em fusão His. <i>tag</i> -SUMO. <i>tag</i> -PGase-Lg (48,2kDa), marcada pelo anticorpo anti-His.....	72
Figura 5.32. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação na coluna de níquel da proteína de fusão <i>c-myc</i> epitopo. <i>tag</i> -His. <i>tag</i> -PGase-Lg. 1 : marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); 2 : pré-coluna; 3 : <i>void</i> ; 4 : <i>wash</i> ; 5-7 : amostras eluídas com imidazol.....	73
Figura 9.1. Mapa resumindo as características do vetor pPICZ α A.....	84
Figura 9.2. Múltiplos sítios de clonagem do vetor pPICZ α A.....	85
Figura 9.3. Mapa resumindo as características do vetor pETSUMO.....	86
Figura 9.4. Múltiplos sítios de clonagem do vetor pETSUMO.....	87

RESUMO

“ESTUDOS DE POLIGALACTURONASES DO FUNGO MUTUALISTA *LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS*”

Poligalacturonases (PGases) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 entre resíduos de ácido pécico, e são produzidas por plantas, fungos, bactérias e leveduras. O fungo *L. gongylophorus* mutualista da formiga *Atta sexdens*, secreta enzimas com atividade PGase. O projeto foi desenvolvido sob duas abordagens: estudo com a PGase nativa e recombinante. A atividade sobre ácido poligalacturônico da PGase nativa foi determinada no extrato bruto do fungo, e sua purificação foi feita por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de exclusão molecular. Temperatura e pH ótimos e parâmetros cinéticos V_{max} e K_M foram determinados, e a PGase foi imobilizada em partículas magnéticas, mostrando ser um bom método na busca de inibidores. Construiu-se uma biblioteca de cDNA a partir de RNA total obtido de cultura de *L. gongylophorus* em meio indutor. Foram sequenciados 816 clones da biblioteca, permitindo identificar sequências de enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, algumas em fase de clonagem e expressão em nosso laboratório. Utilizando uma sequência de PGase de *L. gongylophorus* (PGase-Lg) depositada (*GenBank*: ADV30326.1), foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação do gene da PGase-Lg, com sítios de clivagens das enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *NotI*, respeitando a fase de leitura dos vetores pETSUMO (para expressão em *E.coli*) e pPICZ α A (para expressão em *P.pastoris*). A partir do cDNA, a ORF codificante da PGase-Lg foi amplificada por PCR e clonada nos dois vetores. Os clones foram confirmados por extração de DNA plasmidial e PCR. Experimentos de expressão em *E. coli* da construção pETSUMO-PGase-Lg apresentaram grande expressão da proteína em fusão His.tag-SUMO.tag-PGase-Lg na forma insolúvel, e vários ensaios de expressão e solubilidade se mostraram ineficientes na solubilidade da proteína em fusão expressa. Realizou-se o *refolding* da proteína e esta foi obtida na forma solúvel, porém sem atividade, mostrando que o enovelamento pode não ter ocorrido corretamente ou que a proteína em fusão expressa pela *E. coli* não sofre as modificações pós-traducionais necessárias. A rPGase-Lg expressa em *P. pastoris* apresentou atividade PGase em ácido poligalacturônico, e análise em eletroforese sugere a expressão de mais de uma proteína, com conteúdos diferentes de glicosilação.

ABSTRACT

"STUDIES OF POLYGALACTURONASES FROM FUNGUS MUTUALISTIC *LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS*"

Polygalacturonases (PGases) are enzymes which hydrolyze glycosidic linkages α -1,4 between pectic acid residues, and are produced by plants, fungi, bacteria and yeasts. The fungus *L. gongylophorus*, *Atta sexdens* ant mutualist, secretes enzymes with PGase activity. The project was developed in two approaches: study with recombinant and native PGase. The activity on polygalacturonic acid of native PGase in fungus culture medium was determined, and its purification from crude extract was performed by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and molecular exclusion chromatography. PGase kinetic parameters (V_{max} and K_M), optimal pH and temperature were determined, and the enzyme was immobilized on magnetic particles, proved to be a good method to future work inhibitors search. A cDNA library was constructed from total RNA obtained from *L. gongylophorus* culture in induction medium. 816 clones from the library were sequenced, allowing the identification of enzymes sequences involved in the plant cell wall degradation, some already in cloning and expression in our laboratory. Using a deposited *L. gongylophorus* PGase (PGase-Lg) sequence (*GenBank*: ADV30326.1), primers were designed to amplify the PGase-Lg gene, with cleavage sites for *EcoRI*, *HindIII* and *NotI* enzymes, respecting the pETSUMO (for *E. coli* expression) and pPICZ α A (for *P. pastoris* expression) reading phase vectors. From the cDNA, the PGase-Lg ORF encoding was amplified by PCR and cloned in both vectors. The clones were confirmed by plasmid DNA extraction and PCR. *E. coli* expression experiments of pETSUMO-PGase-Lg construction showed a great expression of His.*tag*-SUMO.*tag*-Lg-PGase fusion protein in the insoluble form and many expression and solubility assays were inefficient in solubility of expressed fusion protein. The protein refolding was performed and this was obtained in soluble form but lacks PGase activity, showing that folding may not have been correctly or *E. coli* fusion protein expressed does not undergo post-translational modifications to have enzymatic activity. The rPGase-Lg expressed in *P. pastoris* showed PGase activity on polygalacturonic acid and electrophoresis analysis suggest more than one enzyme expression, with different glycosylation content.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Associação Simbiótica	02
1.2 A simbiose e as enzimas fúngicas	04
1.3 Pectina e Pectinases	08
1.4 Expressão de proteínas recombinantes em <i>Pichia pastoris</i>	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS	19
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
4.1 Condições de Cultivo e Indução de PGase	24
4.2 Isolamento, purificação e caracterização da PGase nativa (PGase-Lg)	24
4.2.1 Isolamento e purificação da PGase-Lg	24
4.2.2 Caracterização da PGase-Lg nativa	25
4.3 Estudos da PGase recombinante de <i>L. gongylophorus</i> (rPGase-Lg)	27
4.3.1 Extração de RNA total do fungo <i>L. gongylophorus</i>	27
4.3.2 Purificação de RNAs mensageiros (mRNAs)	28
4.3.3 Construção da biblioteca de cDNA de <i>L. gongylophorus</i>	29
4.3.4 Estudos com a PGase recombinante de <i>L. gongylophorus</i> (rPGase-Lg)	31
4.3.4.1 Obtenção de cDNA do gene que codifica a síntese de uma PGase	32
4.3.4.2 Amplificação do gene PGase-Lg através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32
4.3.4.3 Clonagem do gene PGase-Lg no vetor pETSUMO e Expressão da proteína em <i>E.coli</i>	33
4.3.4.4 Clonagem do gene PGase-Lg no vetor pICZαA e Expressão da proteína em <i>P. pastoris</i>	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Cultivo do <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	43

5.2	Isolamento e Caracterização de PGase Nativa do <i>L. gongylophorus</i>	44
5.3	Construção da biblioteca de cDNA de <i>L. gongylophorus</i>	47
5.4	Obtenção da ORF (<i>Open Reading Frame</i>) da PGase-Lg.....	54
5.5	Clonagem do gene PGase-Lg e Expressão da enzima rPGase-Lg em <i>Escherichia coli</i>	56
5.5.1	Construção do clone pETSUMO-PGase-Lg.....	56
5.5.2	Expressão da PGase-Lg em <i>E. coli</i>	58
5.6	Clonagem do gene PGase-Lg e Expressão da enzima rPGase-Lg em <i>Pichia pastoris</i>	65
5.6.1	Construção do clone pICZ α A-PGase-Lg.....	65
5.6.2	Linearização e precipitação do pPICZ α A-PGase-Lg.....	68
5.6.3	Análise e seleção de recombinantes.....	68
5.6.4	Expressão em <i>Pichia pastoris</i>	70
6.	CONCLUSÕES.....	75
7.	Sugestões para trabalhos futuros.....	77
8.	REFERÊNCIAS.....	78
9.	ANEXOS.....	84
9.1	Mapas dos plasmídeos.....	84

1. INTRODUÇÃO

A formiga saúva é classificada como pertencente ao gênero ATTA, da ordem Himenoptera. Diversas espécies de saúvas têm sido classificadas sendo a *Atta sexdens rubropilosa* (“Saúva Limão”) uma das espécies mais comuns no Brasil. As formigas saúvas têm origem nos ecossistemas naturais, onde estão em equilíbrio com outras espécies de insetos e não atacam todas as espécies vegetais disponíveis com igual frequência (BATISTA-PEREIRA *et al*, 2006).

Porém, com a substituição de matas naturais por grandes áreas de monoculturas, favoreceu-se a proliferação desses insetos devido a vários fatores como abundância de recursos alimentares, escassez de predadores, de competição, entre outros. São grandes as perdas de produção na agricultura e silvicultura causadas pelas formigas cortadeiras devido à grande quantidade de material de planta que coletam (BATISTA-PEREIRA *et al*, 2006). Aparte do dano direto causado às plantas, os formigueiros podem reduzir o acesso às plantações e danificar campos e a infraestrutura de estradas (SANTOS *et al*, 2007) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Formiga saúva carregando folha recém cortada (SCHIOTT *et al.*, 2010) e área de pastagem prejudicada por formigueiros (Disponível em <<http://www.homeorganica.com.br/?p=420>>).

Quase todas as culturas são atacadas e danificadas pelas formigas que cortam as folhas e ramos tenros, podendo destruir completamente as plantas. Em sistemas tropicais, chegam a consumir até 17% da produção florestal e constituem-se também importantes pragas nas áreas de reflorestamento. *Eucalyptus* e *Pinus* são culturas importantes atacadas por saúvas, causando perdas severas em produção de madeira. Estima-se que o prejuízo com formigas saúvas no Brasil seja em torno de U\$110 milhões por ano (CHERRETT, 1986; BOARETTO & FORTI, 1997).

O uso de iscas granuladas com inseticidas, como sulfluramida (Mirex-S[®]) e diflubenzuron (Formilin[®]), é o método amplamente adotado para o controle de formigas cortadeiras. Porém, o uso de iscas de inseticida tem certas restrições, por exemplo, toxicidade inespecífica ampla, rejeição e possibilidade de restabelecimento da colônia após a aplicação (SANTOS *et al*, 2007).

O controle biológico de pestes usando microrganismos pode ser altamente específico, de custo relativamente baixo e baixo risco ao ecossistema. O controle biológico usando fungos entomopatogênicos é especialmente promissor já que estes microrganismos apresentam mecanismos únicos de ação durante a infecção e colonização do hospedeiro que difere daqueles de bactérias e vírus, que devem ser ingeridas para iniciar uma infecção. Contudo, inimigos naturais como fungos entomopatogênicos ou outros candidatos para o controle de formigas cortadeiras, precisam possuir capacidade para superar a estrutura e organização social que são características destes insetos (SANTOS *et al*, 2007).

Na realidade até o momento não houve nenhum progresso em desenvolver uma estratégia eficiente para o controle biológico de formigas em geral. Porém, a pressão para que se desenvolvam tais estratégias está aumentando com a consciência do dano ambiental causado pelo controle químico e a baixa eficiência desses produtos químicos disponíveis.

Contudo, a eliminação completa desses insetos não se caracteriza uma alternativa adequada, uma vez que estas formigas contribuem significativamente à estabilidade do ecossistema tropical natural, apresentando aspectos positivos ao meio ambiente, provendo aeração do solo, reciclando matéria orgânica, podando a vegetação, estimulando assim o crescimento de algumas plantas ou mesmo na decomposição rápida do material vegetal (RICHARD *et al*, 2005). No entanto, o controle de populações desses insetos até níveis que não apresentem prejuízos para a lavoura se faz necessário.

1.1 Associação Simbiótica

Quase todas as plantas dependem de simbiose com fungos (micorriza), os quais ajudam as plantas a absorver minerais e água do solo. Importante também a simbiose das formigas *Attini* com fungos na ausência de enzimas que possibilite a degradação da matéria vegetal, pois as formigas obtêm os nutrientes e enzimas que necessitam através dos fungos. Em contrapartida, eles ganham um local no solo

onde podem se desenvolver protegidos pelas formigas de predadores e parasitas, além de ser um mecanismo de dispersão (SILVA-PINHATI *et al*, 2004).

A fungicultura no mundo dos insetos é praticada por formigas, cupins, besouros e mosquitos de galhas. O exemplo mais bem caracterizado são formigas *Attine*, que são endêmicas do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O ancestral dessas formigas desenvolveu a capacidade de cultivar fungos como fonte de alimento há aproximadamente 50 milhões de anos, levando à tribo *Attini* monofilética, que numera 15 gêneros com mais de 290 espécies (SILVA *et al*, 2013).

As muitas espécies de formigas da tribo *Attini* vivem em simbiose com grupos distintos de microrganismos, o que tem sido conhecido como uma das associações simbióticas mais complexas descoberta na natureza. Para entender os processos envolvidos na associação entre formigas cortadeiras e fungos simbióticos, a diversidade dentro de cada simbiote precisa ser caracterizada, mas embora a taxonomia de formigas esteja bem avançada, a taxonomia e, conseqüentemente, a diversidade de seus fungos simbióticos não estão ainda completamente elucidados.

A presença do fungo dentro dos formigueiros (“jardim de fungo”) e sua função simbiótica foram primeiramente descritas por Belt em 1874 e desde então tem sido fortemente relacionada com o sucesso ecológico das formigas (SILVA-PINHATI *et al*, 2004). A Figura 1.2 ilustra o cultivo do fungo por formigas cortadeiras.



Figura 1.2. Formigas cortadeiras cultivando fungo (MIKHEYEV *et al.*, 2006).

Fungos coletados de ninhos do gênero *Atta* foram nomeados *Leucocoprinus gongylophorus*, *Leucoagaricus gongylophorus* e *Leucoagaricus weberi*, mas testes emparelhados com micélio sugerem que algumas formigas do gênero *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) cultivam uma única espécie de fungo (SILVA-PINHATI *et al*, 2004).

Leucoagaricus gongylophorus é um fungo que vive em simbiose com a formiga saúva *Atta sexdens rubrobrillosa*. As formigas proporcionam para o fungo simbiótico uma variedade de substratos que estimulam o seu crescimento (SILVA *et al*, 2003), sendo também um meio de dispersão desse microrganismo, além de terem também um papel essencial na proteção do fungo contra parasitas microbianos e potenciais competidores. Por outro lado, o fungo é uma fonte essencial de alimento para as formigas e a única fonte de nutrientes para as larvas de todas as espécies de formigas (RICHARD *et al*, 2005).

O fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* está na família basidiomicete Lepiotaceae, e estruturas sexuais (frutificações) são raras nos jardins de fungos (PAGNOCCA *et al.*, 2001), pois as formigas operárias estão continuamente podando o micélio, fazendo com que a formação de um estado perfeito em ninhos saudáveis seja muito difícil de ser encontrada. Esse fungo simbionte pode ter sido propagado assexuadamente pelas formigas cortadeiras por milhões de anos (RONHEDE *et al.*, 2004).

1.2 A simbiose e as enzimas fúngicas

Um dos fatores envolvidos na simbiose entre formigas cortadeiras e o fungo é o suprimento de enzimas fúngicas às formigas, incluindo enzimas digestivas (SILVA *et al*, 2006). Colônias de formigas cortadeiras foram comparadas a um superorganismo e foi sugerido que esta interdependência evoluísse a um nível tal que os insetos deixam de produzir suas próprias enzimas digestivas já que o fungo proporciona às formigas não só enzimas hidrolíticas, mas também nutrientes de fácil assimilação (ERTHAL *et al*, 2004).

Martin e Weber, os primeiros pesquisadores a investigar a contribuição do fungo no fornecimento destas enzimas na manutenção da simbiose, sugeriram que a celulase era a principal enzima fúngica na interação, derivada da habilidade do fungo para metabolizar a celulose das plantas colhidas pelas formigas, fornecendo assim açúcares absorvíveis para as formigas (MARTIN & WEBER, 1969).

Porém, resultados mais recentes relativos ao potencial metabólico do *L. gongylophorus* mostraram que a atividade celulásica não é expressiva quando comparada com outros polissacarídeos. Além de amilase e xilanase, que são produzidas em quantidades maiores que celulase, a pectinase tem sido descrita como a principal enzima produzida pelo fungo (SILVA *et al*, 2006). Assume-se que

as formigas cortadeiras no gênero *Atta* e *Acromyrmex* não se alimentam de material sólido de planta, mas utilizam os nutrientes líquidos oriundos das folhas que elas cortaram e do fungo *L. gongylophorus*, que elas cultivam em seus ninhos (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

As formigas cortadeiras operárias coletam fragmentos de folhas frescas e os transportam para seus jardins de fungos subterrâneos onde são preparados para servir de substrato ao fungo. As formigas mastigam os novos fragmentos de material vegetal trazido, cortando-os em pedaços menores, e aplicam gotas de fluído fecal na polpa de folhas antes de depositar essa mistura de substrato no jardim de fungo (SCHIOTT *et al.* 2010). Durante o processo de corte do material vegetal as formigas ingerem seiva de planta e depositam gotículas de material fecal na polpa preparada antes de inoculá-la com o fungo simbiótico e incorporá-la no jardim de fungo (RONHEDE *et al.*, 2004; SCHIOTT *et al.* 2010). A Figura 1.3 representa o ciclo das proteínas da gota fecal dentro do formigueiro.

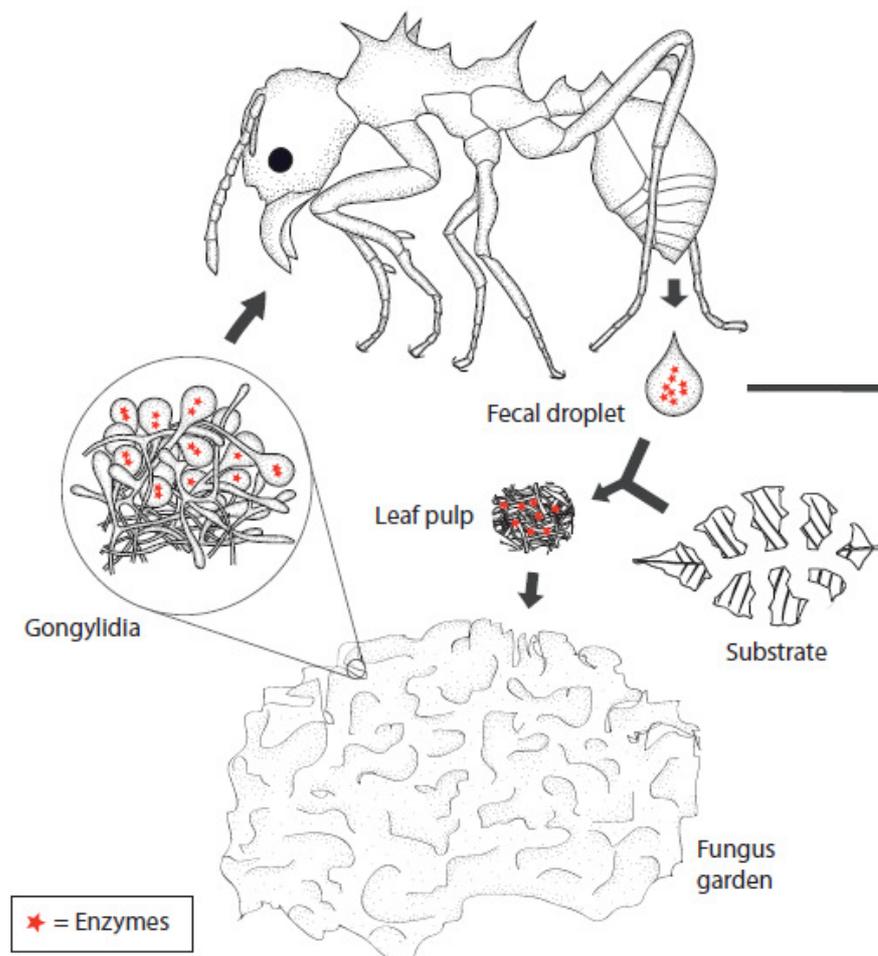


Figura 1.3. Ciclo das proteínas da gota fecal dentro do formigueiro (Modificado de SCHIOTT *et al.* 2010).

Estudos relataram que o líquido fecal de formigas da tribo *Attini* é rico em enzimas ativas contra quitina, amido, pectina, polipectato de sódio, xilano e carboximetilcelulose (RICHARD *et al*, 2005). Também foram encontradas proteases idênticas às proteases de micélio cultivado do fungo simbiótico. A presença de proteases fúngicas em fluido fecal sugere que parte da preparação das folhas pelas formigas para colonização pelo fungo seja distribuir as enzimas fúngicas no novo substrato (SILVA *et al*, 2006).

Um estudo com formigas operárias *A. cephalotes* mostrou que essas podem ingerir seiva de planta quando preparam as folhas antes da incorporação delas no jardim de fungo e assim, podem obter carboidrato suficiente para suas necessidades diárias. Bass and Cherrett (1995) mostraram que as hifas no topo do jardim de fungo são ingeridas preferivelmente pelas operárias e armazenadas em sua cavidade infra-bucal. O alimento armazenado nesta cavidade pode prover até 9% da necessidade de energia das operárias, sugerindo que elas produzam as próprias enzimas quitinolíticas em suas glândulas labiais (RICHARD *et al*, 2005).

Foi calculado que formigas operárias obtêm somente 5 - 9% de suas necessidades nutricionais do micélio de fungo, sendo o restante obtido da seiva vegetal. Mesmo assim, a idéia de que seiva de folhas representa acima de 90% da dieta de formigas cortadeiras não se adequa bem com o estilo de vida de algumas cortadeiras, como *Atta mexicana* ou *Acromyrmex versicolor*, que vivem em regiões desertas e não têm acesso a vegetação fresca durante vários meses do ano (SILVA *et al*, 2003).

O fungo metaboliza celulose, que é o polissacarídeo de planta mais comum. Porém, além de celulose, o material vegetal contém xilano, pectina, e amido, em quantidades de até 60% do peso da folha seca. Esta fonte abundante de nutrientes poderia ser assimilada pelo fungo e assim, após conversão em biomassa fúngica, poderia ser utilizada pelas formigas (SIQUEIRA *et al*, 1998).

A principal fonte de alimento das formigas cortadeiras consiste nas pontas inchadas das hifas, chamadas gongilídios, que seus jardins de fungos produzem em aglomerados (*clusters*). Estas estruturas não são conhecidas de quaisquer outros fungos e acredita-se serem produzidas exclusivamente para o benefício das formigas. Se as proteínas das gotas fecais são de fato derivadas diretamente do fungo ingerido pelas formigas, então os gongilídeos são a principal fonte destas proteínas. Contudo, proteínas fúngicas são excretadas nas gotas fecais das

formigas para serem recicladas para a decomposição de novos fragmentos de folhas (SCHIOTT *et al.* 2010).

Foi determinado experimentalmente que um grande número de proteínas distintas sobrevive à passagem intestinal das formigas (SCHIOTT *et al.* 2010). No trabalho foram sequenciadas 33 proteínas do fluido fecal da formiga cortadeira *Acromyrmex echinator*, e 7 proteínas identificadas foram enzimas pectinolíticas de origem fúngica, as quais ainda estavam ativas na gota fecal da formiga. Essas enzimas foram encontradas no material fecal somente quando as formigas tiveram acesso ao jardim de fungo como alimento, e através de análise de PCR quantitativo comprovou-se que a expressão de 6 genes dessas enzimas são superexpressos nos gongilídeos (SCHIOTT *et al.* 2010).

Essa interação mutualística obrigatória é ameaçada por vários patógenos microbianos como os fungos *Escovopsis*, *Fusarium*, *Syncephalastrum* e *Trichoderma* (SCHOENIAN, *et al.*, 2011). Além disso, os microrganismos do solo circundante ou patógenos de plantas introduzidos acidentalmente a partir do material vegetal colhido podem competir com o jardim de fungo por nutrientes e espaço de vida. Portanto, as formigas cortadeiras tratam seus jardins de fungos com grande cuidado, removendo qualquer material suspeito em câmaras de resíduos. Além deste comportamento de limpeza mecânica, as formigas cortadeiras fazem uso de agentes químicos antimicrobianos, que incluem ácido 3-hidroxidecanóico, secretado pelas glândulas metapleurais das formigas (SCHOENIAN, *et al.*, 2011).

Ao longo dos últimos anos, pesquisadores perceberam que o ecossistema de formigas cortadeiras é muito mais complexo do que o inicialmente descrito. Tem sido evidenciado que a relação formiga-fungo envolve outros microrganismos, que podem incluir tanto patógenos potenciais quanto colaboradores da simbiose (SCHOENIAN, *et al.*, 2011).

Em um trabalho utilizando ferramentas genômicas e metaproteômicas, foi demonstrado que o fungo *L. gongylophorus* codifica uma diversidade de enzimas de degradação de biomassa vegetal, sendo provavelmente o principal condutor da degradação de lignocelulose em jardins de fungo (AYLWARD *et al.*, 2013). A maioria das enzimas mais abundantes de *L. gongylophorus* identificadas nos dados de metaproteômica são preditas para a degradação de pectina, xilano, amido e proteínas. Esse dado é consistente com estudos anteriores que mostram que hemicelulases e proteases são produzidas por este organismo e que a atividade contra estes

substratos pode ser consistentemente detectada em todo o jardim de fungo (AYLWARD *et al*, 2013; SCHIOTT *et al*, 2008; SCHIOTT *et al*, 2010).

A descoberta de que as hemiceluloses estão entre as mais abundantes nos conjuntos de dados de metaproteômica indica que estes polímeros são provavelmente os polissacarídeos primários degradados por *L. gongylophorus* no jardim de fungo. A abundância de proteases ao longo de todas as camadas das amostras também sugere que as proteínas da planta podem ser uma importante fonte de nutrientes para *L. gongylophorus* ao longo de todo o processo de degradação (AYLWARD *et al*, 2013).

1.3 Pectina e Pectinases

Pectina é um termo genérico para um grupo de polissacarídeos de alto peso molecular presentes nas paredes celulares de plantas e o principal componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores. Esses polissacarídeos ramificados, constituídos principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose funcionam em combinação com celulose e hemicelulose como material de cimentação intercelular (Figura 1.4).

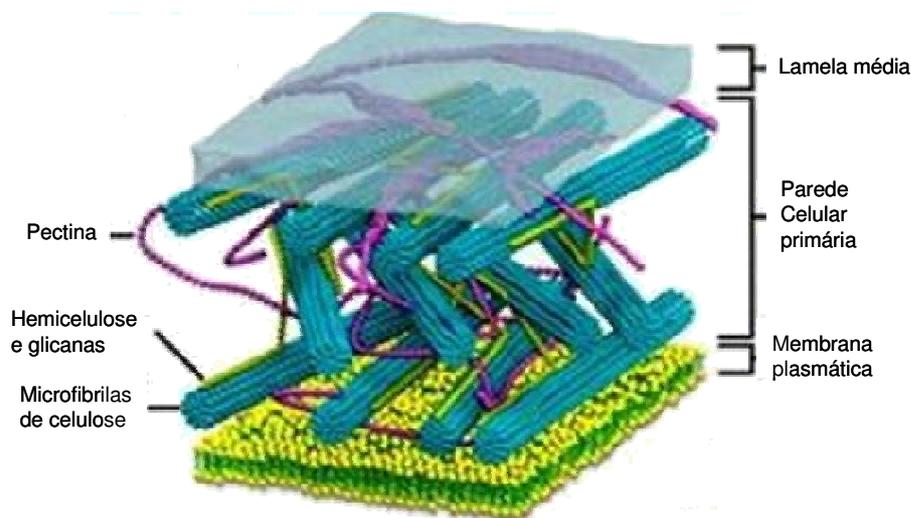


Figura 1.4. Estrutura da parede celular vegetal (Modificada de: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal15.php>).

O termo geral pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas. As ramificações servem para

aprisionar moléculas de água fato que dá à pectina a característica de gel. Consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α -1,4-D-galacturônico parcialmente esterificada por grupos metil éster e/ou moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (Figura 1.5). Pode estar parcial ou completamente neutralizada por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio). Substâncias pécticas com alto teor de metoxilas (acima de 50%) podem geleificar na presença de açúcares e ácidos, enquanto que a geleificação de pectinas com baixo teor de metoxilação é possível na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos (UENOJO & PASTORE, 2007).

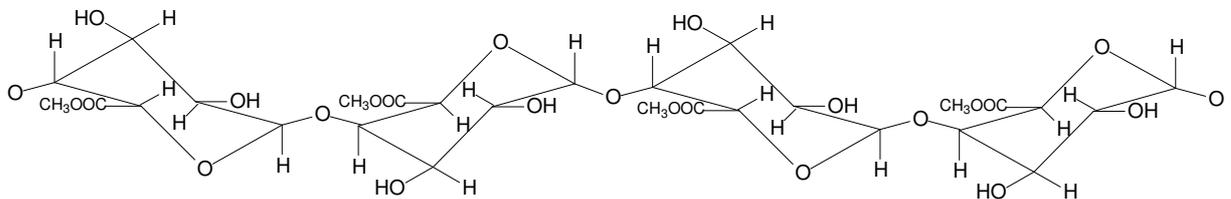


Figura 1.5. Estrutura primária de uma molécula de pectina. Não estão incluídos resíduos de ramnose, galactose, arabinose e xilose (Modificado de UENOJO & PASTORE, 2007).

Em 1934, as pectinas cítricas foram reconhecidas como cadeias lineares de ácido galacturônico e desde então, evidenciou-se que a pectina é uma molécula altamente complexa (CANTERI *et al*, 2012). As pectinas são formadas por dezessete diferentes monossacarídeos, organizados em polissacarídeos distintos, a partir de mais de vinte diferentes ligações para formação de uma rede quando unidos, agrupados em diferentes tipos de cadeia, constituídas por ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses.

A matriz péctica está envolvida no controle da porosidade da parede celular e é o material adesivo majoritário entre as células. O ácido galacturônico ocorre em duas características estruturais principais que formam a estrutura de três domínios de polissacarídeos, que se pensa serem encontrados em todas as espécies de pectina: homogalaturonana (HGA), ramnogalacturonana-I (RG-I) e ramnogalacturonana-II (RG-II). Pensa-se que estes três domínios de polissacarídeos podem ser ligados de forma covalente para formar uma rede péctica por toda a matriz da parede celular primária e lamela média. Esta rede tem um potencial considerável para a modulação da sua estrutura pela ação de enzimas baseadas em parede celular (WILLATS *et al.*, 2001).

A homogalacturonana (HGA) é o mais abundante polissacarídeo péctico na parede celular, correspondente a cerca de 60-65% do total da pectina. Apresenta unidades de ácido α -D-galactopiranosilurônico em ligações 1→4 em um padrão linear, onde os grupos carboxilas estão parcialmente metil-esterificados (CANTERI *et al*, 2012).

A ramnogalacturonana I (RG-I) apresenta uma cadeia representada por uma variedade de diferentes cadeias de glucanas (principalmente arabinana e galactana) ligadas às unidades de ramnose e representa 20-35% da pectina. A ramnogalacturonana II (RG-II) é o segmento estruturalmente mais complexo e compõe 10% da pectina. Essa estrutura, altamente conservada na maior parte das espécies vegetais, consiste de um esqueleto de homogalacturonana de no mínimo oito unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares (CANTERI *et al*, 2012).

A xilogalacturonana (XGA) é uma homogalacturonana substituída com xilose, sendo esta prevalente em tecidos reprodutivos como frutas e sementes. Existem ainda a arabinogalactana I (ARA-I), arabinogalactana II (ARA-II), que está principalmente associada com proteínas (3-8%), arabinana (ARA) e apiogalacturonana (API), sendo estas cadeias laterais mais complexas e menos abundantes. Um esquema estrutural hipotético da pectina está representado na Figura 1.6 (CANTERI *et al*, 2012).

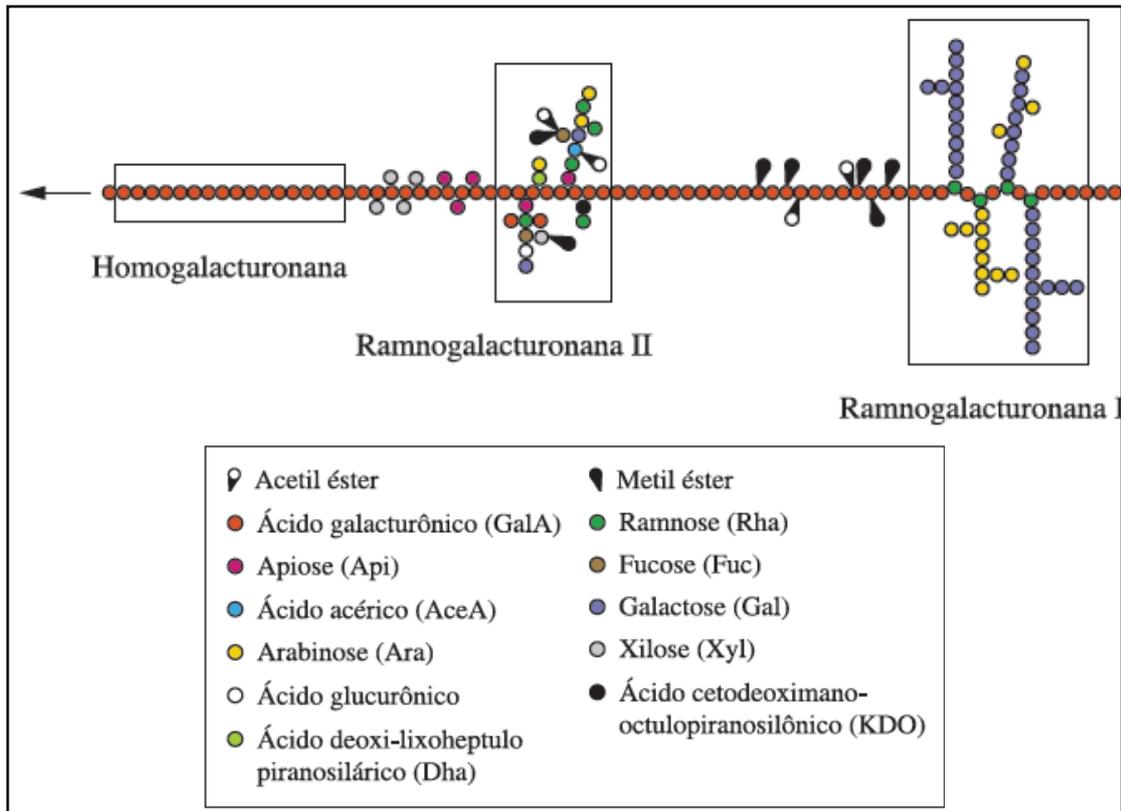


Figura 1.6. Representação da cadeia pectínica (Modificada de CANTERI *et al*, 2012).

Pectinases - As pectinases ou enzimas pectinolíticas formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pectícas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (UENOJO & PASTORE, 2007; DA SILVA *et al*, 2005; GAINVORS *et al*, 1994; TSUYUMU *et al*, 1989). Estas enzimas possuem muitas funções e aplicações em vários setores da indústria, como na indústria de alimentos, têxtil e de papel (UENOJO & PASTORE, 2007).

Existem basicamente três tipos de pectinases (Figura 1.7): pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pectícas e, as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (UENOJO & PASTORE, 2007). Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a *Enzyme Commission* (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (Tabela 1.1).

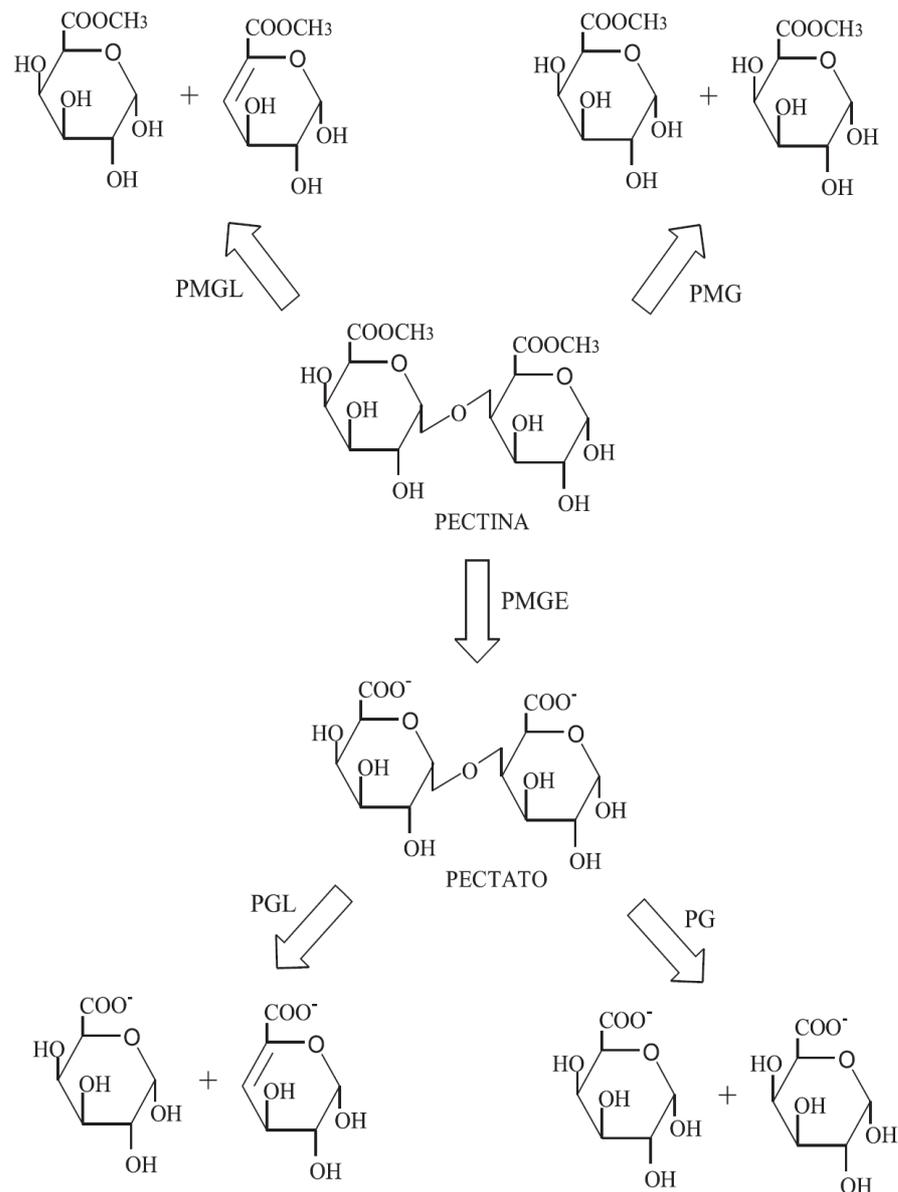


Figura 1.7. Modo de ação enzimática das pectinases. PMGL: polimetilgalacturonato liase; PMG: polimetilgalacturonase; PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase); PGL: poligalacturonato liase (pectato liase); PG: poligalacturonase (UENOJO & PASTORE, 2007).

Tabela 1.1. Classificação das enzimas pécticas (UENOJO & PASTORE, 2007).

Tipos de pectinase	Nome sugerido pela EC	Sigla	Nome comum	Número EC
Desesterificante	Polimetilgalacturonase esterase	PMGE	Pectina esterase	3.1.1.11
Hidrolase	Endo poligalacturonase	Endo-PG	Poligalacturonase	3.2.1.15
	Exo poligalacturonase 1	Exo-PG 1	Poligalacturonase	3.2.1.67
	Exo poligalacturonase 2	Exo PG 2	Poligalacturonase	3.2.1.82
	Endo polimetilgalacturonase	Endo-PMG	Pectina hidrolase	
	Exo polimetilgalacturonase	Exo PMG	Pectina hidrolase	
Liasse	Endo poligalacturonase liasse	Endo-PGL	Pectato liasse	4.2.2.2
	Exo poligalacturonase liasse	Exo-PGL	Pectato liasse	4.2.2.9
	Endo polimetilgalacturonase liasse	Endo-PMGL	Pectina liasse	4.2.2.10
	Exo polimetilgalacturonase liasse	Exo-PMGL	Pectina liasse	

A pectina esterase, que pode ser desmetoxilante ou desesterificante (PMGE), catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado) (Figura 1.8). Esta classe de enzima age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (UENOJO & PASTORE, 2007; CANTERI *et al*, 2012).

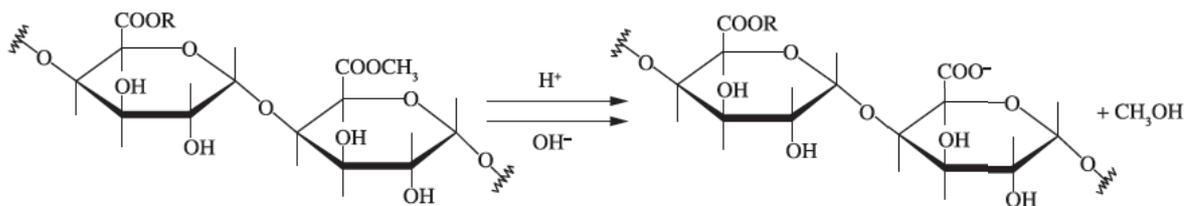


Figura 1.8. Modo de ação da pectina esterase (desesterificação) (CANTERI *et al*, 2012).

As enzimas despóimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem das ligações glicosídicas (hidrolítica ou transeliminativa) e mecanismos de ação e preferência pelo substrato (endo ou exo agindo em ácido péctico ou pectina). Esta classe de enzimas envolve as hidrolases e as liases.

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases (PMG) e as poligalacturonases (PG). A PMG hidrolisa polimetilgalacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de ligações α -1,4, podendo ser endo- ou exo-

PMG. A PG hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 entre resíduos de ácido galacturônico. É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar também ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial) do ácido pécico (UENOJO & PASTORE, 2007; CANTERI *et al*, 2012) (Figura 1.9).

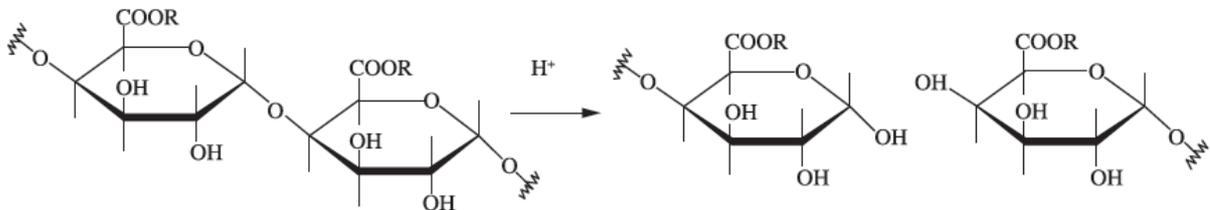


Figura 1.9. Modo de ação das hidrolases (hidrólise ácida) (CANTERI *et al*, 2012).

As liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado e incluem as pectina liases e as pectato liases. Pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) catalisa a β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo- ou exo-. Pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pécico de modo endo- ou exo- por transeliminação (UENOJO & PASTORE, 2007; CANTERI *et al*, 2012) (Figura 1.10).

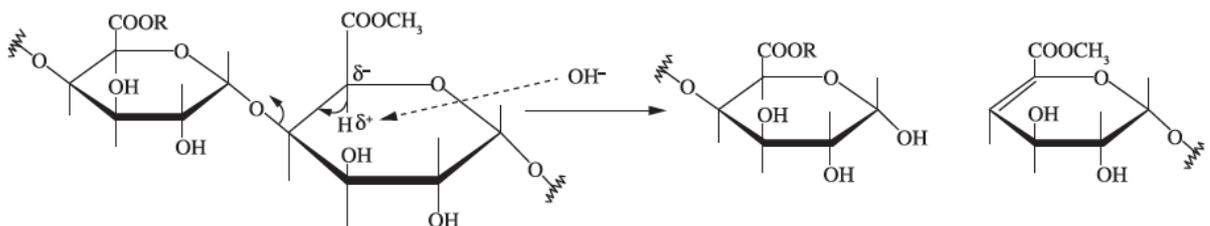


Figura 1.10. Modo de ação das liases (β -eliminação) (CANTERI *et al*, 2012).

As protopectinases não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina. Esta classe de enzimas solubilizam protopectina formando pectina solúvel altamente polimerizada. Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido

poligalacturônico, constituintes das paredes celulares. (UENOJO & PASTORE, 2007).

Estudos visando um melhor conhecimento dessas enzimas (pectinases) são necessários para o melhor entendimento de suas funções. Estudos da relação estrutura-função são particularmente bem avançados para pectinases isoladas a partir de fungos e bactérias patogênicas. Estas, ao lado de pectinases de plantas, são ferramentas extremamente poderosas para a elucidação da estrutura fina de domínios de pectina (WILLATS *et al.*, 2001).

Uma série de estudos de superexpressão ou de inibição da expressão de enzimas modificadoras de pectina tem sido realizada (SMITH *et al.*, 1990; CARRINGTON *et al.*, 1993; TIEMAN *et al.*, 1994). Abordagens genéticas tendem a elucidar as redes complexas e interação de fatores que influenciam a estrutura e propriedades de domínios pécticos. Por exemplo, é necessária a ação de uma PME antes de uma PG, ou uma pectina liase pode atuar em cadeias de HGA metilesterificadas, enquanto que a redução do teor de galactano em tubérculos de batata tem consequências em outros aspectos da estrutura de pectina. A redução dos níveis de celulose por produtos químicos e abordagens de silenciamento induzido por vírus resulta em níveis elevados de pectina, sugerindo a existência de reações-resposta que interligam a maquinaria celular controlando a biossíntese de celulose e pectina (WILLATS *et al.*, 2001).

Proteínas inibidoras de PG (PGIPs) são conhecidas numa grande variedade de espécies e existem em famílias multigênicas (WILLATS *et al.*, 2001). As PGIPs podem interagir com endoPGs de fungos fitopatogênicos e inibir suas atividades *in vitro* com especificidades distintas (WILLATS *et al.*, 2001).

1.4 Expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*

Até o momento, a maioria das preparações de pectinases consiste de misturas enzimáticas de origem fúngica com diferentes enzimas pectinolíticas em proporções variáveis. Tendo isto em mente, juntamente com o fato de que muitas aplicações industriais de pectinases podem exigir uma ação conjunta de várias enzimas nas proporções corretas, seria útil se as diferentes enzimas pectinolíticas pudessem ser produzidas separadamente e misturadas conforme necessário (SIEIRO *et al.*, 2009).

Algumas das aplicações industriais destas enzimas incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO & PASTORE, 2007).

O isolamento e caracterização de pectinases são particularmente bem documentados. Os primeiros relatos moleculares focaram em genes de pectinases de bactérias e fungos, sendo que atualmente, a maioria das pectinases utilizadas na indústria de alimentos e outros processos industriais são obtidas de fungos. Entretanto, estudos e análises de genes de pectinases de levedura são mais recentes, e desde 2009, a caracterização desses genes tem sido acelerada devido à possibilidade de usos biotecnológicos. Desde os anos 1990, leveduras têm sido usadas no estudo de genes de pectinases de diversos microrganismos, e para a expressão heteróloga de PGases específicas (ALIMARDANI-THEUIL *et al*, 2011).

Uma PGase de *A. niger* foi expressa e secretada em *S. cerevisiae*, e o tamanho aparente da PGase recombinante é ligeiramente maior do que a enzima nativa sintetizada pelo *Aspergillus* (38,4 kDa *versus* 37,3 kDa, respectivamente). Esta variação da massa molecular vem de uma diferença de N-glicosilação entre as duas proteínas. Uma análise funcional da enzima recombinante mostrou que ela tinha o mesmo pH e temperatura ótimos que a enzima nativa. No entanto, a estabilidade térmica foi maior para a enzima de origem recombinante (ALIMARDANI-THEUIL *et al*, 2011).

A principal espécie de levedura hospedeira tem sido *S.cerevisiae*, mas cepas de *Pichia pastoris* e *Schizosaccharomyces pombe* também têm sido utilizadas para superexpressão de genes que codificam PGase. A superexpressão do gene que codifica endoPGase de *K. marxianus* (EPG1-2) em *P. pastoris* parece ser a estratégia mais interessante quando apenas a atividade enzimática máxima é considerada. *P. pastoris* também parece ser o hospedeiro mais eficiente para a superexpressão do gene que codifica endo-PGase de *S. cerevisiae* (PGU1). Os autores sugerem que o sistema da *Pichia* poderia ser desenvolvido para a produção em escala industrial de endo-PGase de levedura, um componente promissor de preparações enzimáticas utilizadas na indústria de processamento de alimentos (ALIMARDANI-THEUIL *et al*, 2011).

Pichia pastoris é um sistema útil para superexpressão heteróloga de proteínas eucarióticas glicosiladas. Além disso, o sistema da *Pichia* é bem desenvolvido para fermentação em escala industrial e pode ser facilmente cultivada a alta densidade celular em meios relativamente baratos. Leveduras como *S. cerevisiae* que secretam poucas enzimas e produzem principalmente endo-PGase podem fornecer uma fonte alternativa para pectinases comerciais. No entanto, sua produtividade é baixa comparada com aquelas relatadas para fungos (BLANCO *et al*, 2002).

O sistema da *Pichia* possui como vantagens principais rendimentos extremamente elevados de proteínas intracelulares, níveis muito altos de secreção em meio com baixa concentração de outras proteínas, facilidade de fermentação em alta densidade celular, estabilidade genética e aumento da escala de crescimento sem perda de rendimento. O sistema está comprovando seu valor na produção de proteína em larga escala para estudos analíticos (ROMANOS, M., 1995).

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto foram a identificação e o isolamento de pectinases do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, além da caracterização bioquímica e desenvolvimento de sistema de expressão de pectinase recombinante.

Os objetivos específicos foram:

- Construção de uma biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* e análise da mesma;
- Isolamento de poligalacturonase (PGase) do cultivo de *L. gongylophorus*;
- Determinação da influência da temperatura e pH na atividade da PGase isolada;
- Caracterização cinética da enzima nativa;
- Clonagem do gene que codifica a síntese de uma PGase em vetor apropriado para expressão em *E.coli* e *P. pastoris*;
- Expressão da PGase-Lg recombinante;
- Caracterização bioquímica e cinética da PGase recombinante.

3. MATERIAIS

Os principais materiais utilizados no presente trabalho são descritos nas tabelas a seguir:

Tabela 3.1: Reagentes.

Nome	Marca
Acetato de potássio	Sigma [®]
Acetato de sódio	J.T.Baker [®]
Ácido acético glacial	Tedia Brazil
Ácido galacturônico	Sigma [®]
Ácido poligalacturônico	Sigma [®]
ADNS	Sigma [®]
Agarose	Sigma [®]
Álcool Isopropílico	Quemis
Brometo de Etídio	Promega
Clorofórmio	Sigma [®]
Comassie (Brilliant Blue R)	Sigma [®]
DEPC	Sigma [®]
EDTA	Sigma [®]
Etanol P.A.	Quemis
DTT	Promega [®]
Metanol P.A.	Quemis
Ponceau	Sigma [®]
Sacarose (açúcar comum)	Caravelas ou União
SDS	Sigma [®]
Sorbitol	Sigma [®]
Sulfato de Amônio	J.T.Baker [®]
Triton X-100	Sigma [®]
Tween [®] 20	Sigma [®]
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen [™]

Tabela 3.2: Kits.

Nome	Marca
<i>Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega [®]
<i>Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-UP System</i>	Promega [®]
<i>CloneMiner[™] cDNA Library Construction</i>	Invitrogen [™]

Tabela 3.3: Tampões e Soluções.

Nome	Descrição	Marca
Citrato-fosfato (75 e 60mM)	Citrato de Sódio tribásico Fosfato de Sódio monobásico Água Ultrapura	Quemis J.T.Baker® —
PBS	Cloreto de Potássio Fosfato de Potássio monobásico Cloreto de Sódio Fosfato de Potássio dibásico	J.T.Baker® J.T.Baker® J.T.Baker® J.T.Baker®
TBS	0,05M NaCl 0,15M Tris	J.T.Baker® Sigma®
TAE	Tris Ácido acético EDTA	Sigma® Tedia Brazil Sigma®
Tampão da amostra [3X]	0,188M de Tris-HCl, pH 6,8 30% de glicerol 15% de β-mercaptoetanol 6% de SDS 0,01% de Azul de bromofenol	Sigma® Sigma® Sigma® Sigma® J.T.Baker®
Tampão de extração	Tris 30mM pH 8,0 EDTA 1mM Sacarose 20%	Sigma® Sigma® Sigma®
Tampão de lise	Tris 10mM pH 8,0 EDTA 1mM SDS 1% Proteinase K 120µg.mL ⁻¹	Sigma® Sigma® Sigma® Promega®
Tampão TE	Tris-HCl 10mM pH 8,0 EDTA	USB® Mallinckrodt
Tampão de Transferência	0,021M Tris 0,056M Glicina 17% Metanol	Sigma® Sigma® Synth
Solução de bloqueio	5% (m/v) leite desnatado TBS.	Molico —

Tabela 3.4: Cepas de bactérias e levedura.

Nome	Marca
DH5α	Invitrogen
BL21(DE3)	Novagen
BL21(DE3)pTGroE	Promega
Rosetta(DE3)pLysS	Promega
KM71H	Invitrogen

Tabela 3.5: Vetores.

Nome	Marca
pETSUMO (para <i>E. coli</i>)	Invitrogen
pPICZαA (para <i>P. pastoris</i>)	Invitrogen

Tabela 3.6: Meios de cultura.

Nome	Descrição	Marca
Meio de crescimento <i>L. gongylophorus</i>	20 g.L ⁻¹ Extrato de Malte	Acumedia
	5 g.L ⁻¹ Peptona Bacteriológica	Acumedia
	2 g.L ⁻¹ Extrato de Levedura	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Ágar Bacteriológico	Acumedia
Indutor de PGase (com glicose)	6,7 g.L ⁻¹ YNB	Difco™
	5 g.L ⁻¹ Ácido Poligalacturônico	Sigma®
	5 g.L ⁻¹ Glicose	Sigma®
	Tampão citrato-fosfato 75mM pH 5,0.	—
Indutor de PGase (sem glicose)	6,7 g.L ⁻¹ YNB	Difco™
	5 g.L ⁻¹ Ácido Poligalacturônico	Sigma®
	Tampão citrato-fosfato 75mM pH 5,0.	—
LB (pH 7,5)	10 g.L ⁻¹ Triptona	Acumedia
	5 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	10 g.L ⁻¹ NaCl	J.T.Baker®
LB <i>low salt</i> (pH 7,5)	10 g.L ⁻¹ Triptona	Acumedia
	5 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	5 g.L ⁻¹ NaCl	J.T.Baker®
YPD	10 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Peptona Bacteriológica	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Dextrose	Acumedia
YPD ágar	10 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Peptona Bacteriológica	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Dextrose	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Ágar Bacteriológico	Acumedia
YPDS	10 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Peptona Bacteriológica	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Dextrose	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Ágar Bacteriológico	Acumedia
	1M Sorbitol	Sigma®
BMGY	10 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Peptona Bacteriológica	Acumedia
	100mM fosfato de potássio pH 6,0	J.T.Baker®
	13,4 g.L ⁻¹ YNB	Difco™
	4x10 ⁻⁴ g.L ⁻¹ Biotina	Sigma®
	1% Glicerol	Sigma®
BMMY	10 g.L ⁻¹ Extrato de levedura	Acumedia
	20 g.L ⁻¹ Peptona Bacteriológica	Acumedia
	100mM fosfato de potássio pH 6,0	J.T.Baker®
	13,4 g.L ⁻¹ YNB	Difco™
	4x10 ⁻⁴ g.L ⁻¹ Biotina	Sigma®
	0,5% Metanol	Quemis

Tabela 3.7: Enzimas de restrição.

Nome	Marca
<i>HindIII Fast Digest</i> (1FDu/ μ l)	Thermo Scientific
<i>EcoRI Fast Digest</i> (1FDu/ μ l)	Thermo Scientific
<i>NotI Fast Digest</i> (1FDu/ μ l)	Thermo Scientific
<i>SacI Fast Digest</i> (1FDu/ μ l)	Thermo Scientific

Tabela 3.8: Equipamentos.

Nome	Marca
Autoclave vertical	Phoenix AV 75
Balança Analítica	Mettler P163 e Denver Instrument APX-200
Banho seco - Termobloco	Eppendorf
Câmara de fluxo laminar	Labconco
Centrífuga para tubo 1,5 mL - 5415 D	Eppendorf
Centrífuga refrigerada	Eppendorf
Cromatógrafo (FPLC)	GE Healthcare
Cuba de eletroforese horizontal	Fisher Scientific
Cuba de eletroforese vertical	BioRad
Cubeta para eletroporação	BioRad
<i>Speed Vac RVC 2-25 CD plus</i>	<i>Christ</i> - Analítica
Eletroporador GenePulser	BioRad
Espectrofotômetro	Beckman Coulter - DU [®] 800
Espectrofotômetro <i>BioSpec-nano</i>	Shimadzu
Estufa	FANEM-315 SE e Fisher Scientific
Fonte para eletroforese	Thermo Electron Corporation
<i>Sonic Dismembrator</i> – Model 500	Fisher Scientific
Termociclador	Eppendorf
Gel Doc [™] EZ System	BioRad
Incubadora com agitação - <i>Shaker</i>	New Brunswick Scientific e Lab. Companion - Analítica
pH-metro – AR 10	Accumet [®] Research

Tabela 3.9. Outros Materiais.

Nome	Marca
<i>10 X Fast Digest Green Buffer</i>	Thermo Scientific
Ampicilina	Sigma®
Anticorpo anti-His (Ni-NTA AP <i>Conjugate</i>)	Qiagen
BSA (albumina de soro bovino)	Sigma®
Clorafenicol	Invitrogen
Coluna Ni-NTA Superflow	Qiagen
Coluna Superdex 75	GE Healthcare
GeneRuler™ Express DNA Ladder (SM1563)	Thermo Scientific
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (SM1163)	Thermo Scientific
GeneRuler™ 100pb Plus DNA Ladder (SM1153)	Thermo Scientific
GeneRuler™ 100pb DNA Ladder (SM1143)	Thermo Scientific
Unstained Protein Molecular Weight Marker (26610)	Thermo Scientific
<i>Molecular Marker Low-Range</i> (RNP755E)	GE Healthcare
Canamicina	Invitrogen
Ligase (5u/μl)	Promega®
Lisozima	Sigma®
MgCl ₂ 25mM	Thermo Scientific
M-MLV 5x <i>Reaction Buffer</i>	Promega®
M-MLV RT (transcriptase reversa) (200u/μl)	Promega®
dNTP Mix (10mM cada)	Thermo Scientific
Oligo dT <i>primer</i> (0,5 μg/μL)	Promega®
Proteinase K	Promega®
Pastilha reveladora SIGMAFAST™ BCIP®/NBT	Sigma®
Tampão 10X ligase	Promega®
<i>Taq</i> Buffer 10X com (NH ₄) ₂ SO ₄	Thermo Scientific
<i>Taq</i> DNA polymerase recombinante 5u/μl	Thermo Scientific
Zeocina™	Invitrogen
α-Lactalbumina	Sigma®

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Condições de Cultivo e Indução de PGase

Linhagem isolada de *L. gongylophorus*, a partir de ninho de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* de laboratório (Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP), foi crescida a 25°C em placas de Petri contendo 25 mL meio de crescimento estéril. O fungo foi mantido nessas condições de laboratório por passagens mensais neste meio de crescimento.

Células com 40 dias de cultura foram raspadas do meio de crescimento e transferidas para 200 mL de meio indutor de PGase, permanecendo por 30 dias estacionário a 25°C. O cultivo após este período passa a ser denominado extrato bruto, que já contém as enzimas secretadas.

4.2 Isolamento, purificação e caracterização da PGase nativa (PGase-Lg)

4.2.1 Isolamento e purificação da PGase-Lg

Após filtração em membrana de poro 0,44 µm, 200 mL do extrato bruto foi liofilizado até 10% do volume e utilizado no experimento de precipitação com sulfato de amônio (*salting out*). A precipitação foi feita nas faixas de 0 a 30% (m/v), 30 a 70% e 70 a 100% de (NH₄)₂SO₄.

O sal pulverizado foi adicionado lentamente ao extrato bruto até atingir a concentração de 30% de sulfato de amônio, em banho de gelo, sob agitação lenta. A solução permaneceu em repouso por 16 horas a 4°C, sendo em seguida centrifugada a 13.000 x g, a 4°C por 20 minutos. O precipitado recolhido foi reservado e ao sobrenadante foi adicionado sal suficiente para atingir 70% de sulfato de amônio. A amostra foi mantida novamente em repouso a 4°C por 16 horas seguida de centrifugação. Ao sobrenadante obtido foi adicionado sulfato de amônio suficiente para atingir 100% de concentração do sal e o mesmo procedimento descrito para as precipitações anteriores foi realizado. Os precipitados produzidos foram ressuspensos em 5 mL de água, dialisados contra tampão citrato-fosfato 75mM pH 5,0 e a atividade enzimática foi avaliada. A fração com maior atividade proveniente do *salting out* foi utilizada em etapa subsequente de cromatografia de exclusão molecular.

A coluna de exclusão molecular utilizada foi a Superdex 75 (GE Healthcare) de volume interno de 120mL, acoplada em um cromatógrafo FPLC (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão citrato-fosfato 75mM pH 5,0 e a cromatografia se deu por eluição isocrática com o tampão citrato-fosfato como eluente, a um fluxo de 0,5 mL por minuto. As amostras eluídas foram coletadas em frações de 1mL e as frações contendo atividade foram corridas em gel de tricina (SCHÄGGER & VON JAGON, 1987) e SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970).

4.2.2 Caracterização da PGase-Lg nativa

Ensaio Enzimático - A atividade poligalacturonase foi determinada pelo acompanhamento da produção total de açúcares redutores, revelada por ácido 3,5-dinitrossalicílico, utilizando o método modificado proposto por MILLER, 1959, tendo como substrato o ácido poligalacturônico 5 mg.mL⁻¹. Substrato e amostra foram incubados, na proporção de 1:1 (v:v), a 60°C, em tampão citrato-fosfato 75mM pH 5. Em intervalos de tempo adequados, 100µL da mistura foram adicionados à 500µL do reagente ADNS. A mistura foi então aquecida a 80°C por 5 minutos e o volume completado para 1000µL com água. Após centrifugação das amostras a 16000g por 5 minutos foi feita a leitura a 540nm das mesmas. O espectrofotômetro foi zerado com um branco contendo 100µL de solução 0,5% de ácido poligalacturônico em tampão citrato-fosfato, 500µL de ADNS e 500µL de água. A curva padrão foi feita com ácido galacturônico (de 1 a 20 mM). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto. A atividade total foi definida como o volume da enzima (mL) requerido para produzir 1 µmol de açúcares redutores por minuto.

Da teoria de carboidratos sabemos que os açúcares redutores podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente fracos, sendo que o carbono carbonil é oxidado a um grupo carboxil. O carbono anomérico que está envolvido em uma ligação glicosídica torna-se uma extremidade não redutora, entretanto a extremidade de uma cadeia que possui um carbono anomérico livre (não envolvido na ligação glicosídica) normalmente é chamada de extremidade redutora. Baseada na hidrólise das ligações glicosídicas, a presença da extremidade redutora/açúcar redutor no meio após a ação da enzima pode ser detectado na presença de ADNS (agente oxidante), o qual é reduzido à ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto

que no caso mais simples o grupamento aldeído parece ser oxidado à ácido aldônico (NELSON & COX, 2011) (Figura 4.1).

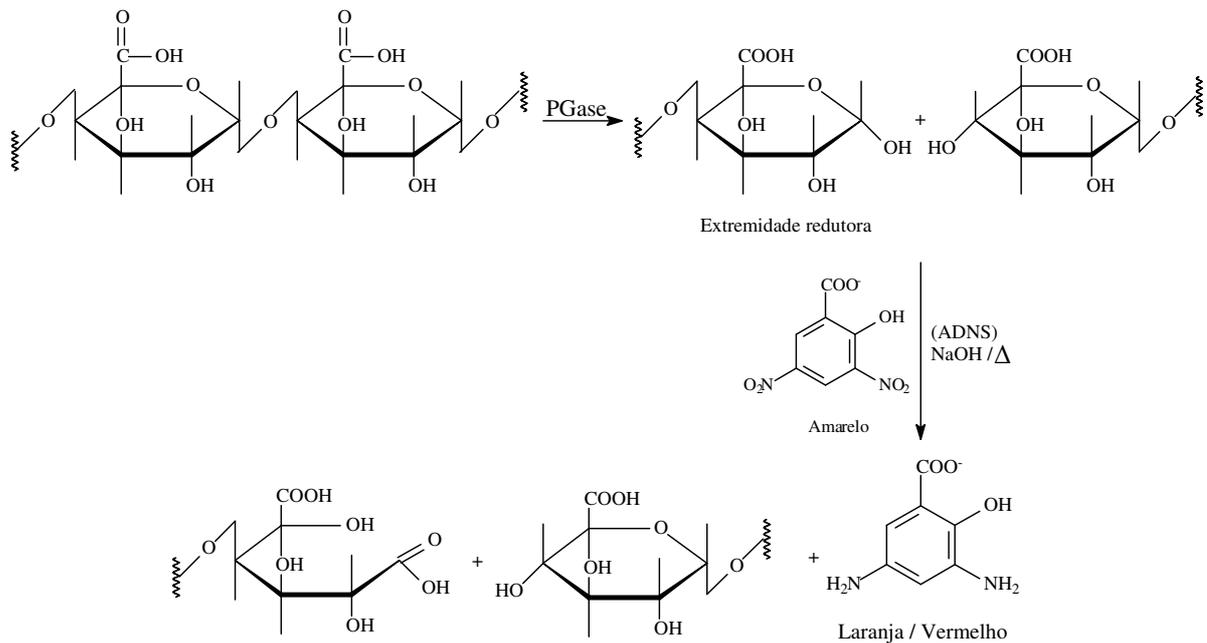


Figura 4.1. Representação simplificada da reação de hidrólise da cadeia principal de ácido poligalacturônico e seus produtos de degradação na reação com ADNS.

Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática - A temperatura ótima da enzima foi determinada por digestão de ácido poligalacturônico 5 mg.mL^{-1} , variando-se a temperatura entre 20 e 80°C , em tampão citrato-fosfato 75mM pH 5,0. O pH ótimo da enzima foi determinado de maneira similar, por incubação em tampão citrato-fosfato, variando-se os valores entre 2,5 e 6,5, à temperatura ótima definida para a enzima, por digestão de ácido poligalacturônico 5 mg.mL^{-1} .

Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} - Os parâmetros de Michaelis–Menten foram determinados a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934), usando diferentes concentrações de ácido poligalacturônico ($0,01$ a 5 mg.mL^{-1}) em tampão citrato-fosfato pH 5,0 a 60°C (pH e temperatura ótimos). Esses experimentos foram realizados em coloração com o Dr. Paulo Roberto Adalberto (DQ/UFScar), que deu continuidade a um estudo de imobilização da PGase-Lg em partículas magnéticas de CoFe_2O_4 que mostrou ser um suporte promissor de imobilização deste enzima (ADALBERTO *et al.*, 2012).

4.3 Estudos da PGase recombinante de *L. gongylophorus* (rPGase-Lg)

4.3.1 Extração de RNA total do fungo *L. gongylophorus*

O RNA total foi obtido a partir de uma cultura do fungo, crescida por 30 dias em meio indutor líquido estéril e estacionário a 25°C. Aproximadamente 120-130mg do micélio foram coletados. A partir disso, iniciou-se o procedimento utilizando-se o método TRIzol[®], proposto por Chomczynski & Sacchi (1987), e modificado como segue:

- 100 - 130mg de micélio foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo;
- Adicionou-se TRIzol[®] e pulverizou-se junto com o micélio, ambos congelados;
- Transferiu-se o material para um tubo limpo e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugou-se a amostra e transferiu-se o sobrenadante (contendo o RNA) para um tubo limpo;
- Adicionou-se clorofórmio, agitou-se e incubou-se a amostra por 2 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugou-se a amostra e transferiu-se a fase aquosa (superior, contendo o RNA) para um tubo limpo;
- Adicionou-se 0,7 a 1 volume de álcool isopropílico e agitou-se;
- Incubou-se a amostra por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se;
- Removeu-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com solução de etanol 75%;
- Agitou-se a amostra e centrifugou-se;
- Retirou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* de RNA por 10 minutos;
- Dissolveu-se o pellet de RNA em água livre de RNase e incubou-se por 10 minutos a 60°C.

A qualidade do RNA é analisada com base na relação da absorbância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , assim como na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose. Um RNA pode ser considerado puro, livre de proteínas, se $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$. Também pode ser considerado livre de solventes orgânicos, se $A_{260}/A_{230} > 1,5$.

Sais de guanidina e fenol (usados em extrações) absorvem fortemente em 230nm, portanto absorvência alta neste comprimento de onda pode ser um indicativo de qualquer um destes compostos na amostra (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A quantidade das amostras de RNA total foi avaliada utilizando-se 2 μ L de amostra por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho BioSpec-nano (Shimadzu).

Amostras de RNA podem ser corridas em gel de agarose não-desnaturante, similar ao empregado na análise de DNA. A qualidade dos RNAs extraídos foi observada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE preparado em água tratada com DEPC (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Os géis foram submetidos à corrente de 120V por 30 minutos. As moléculas de RNAs foram visualizadas por meio de coloração do gel com brometo de etídio (1mg.mL⁻¹) e fotografadas em um fotodocumentador *Gel DocTM EZ System* (BioRad).

4.3.2 Purificação de RNAs mensageiros (mRNAs)

A purificação dos mRNAs foi realizada utilizando o Kit Polytract[®] mRNA Isolation System (Promega). O sistema utiliza oligonucleotídios biotinilados poli-dT para a hibridização específica com a cauda de poli-dA presente nos mRNAs eucarióticos maduros. Os híbridos são capturados por esferas paramagnéticas conjugadas a estreptavidina, que interagem com a biotina e são atraídas magneticamente. A purificação dos mRNAs foi realizada da seguinte maneira:

- Diluiu-se 134 μ g de mRNA em 500 μ L de água livre de RNase e incubou-se por 10 minutos a 65°C;
- Para capturar os mRNAs foram utilizados 3 μ L de sonda de Oligo(dT) Biotinilado, agitou-se e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Adicionou-se todo o conteúdo da reação de anelamento a um tubo contendo 600 μ L de partículas paramagnéticas de estreptavidina (previamente lavadas), que se ligam à biotina, e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos, agitando o tubo a cada 2 minutos;
- O material foi então colocado em estante magnética para atração das partículas de estreptavidina. As moléculas de RNA mensageiro ficaram aderidas à parede do tubo e o sobrenadante foi desprezado;
- O RNA mensageiro foi lavado quatro vezes e eluído em 250 μ L de água livre de RNase;
- O material foi então precipitado com adição de 1/10 do volume de acetato de

sódio 3M pH 5,2 e um volume de isopropanol 100%;

- O material foi lavado com etanol 75% e ressuspendido em 13µL de água livre de RNase.

Os mRNAs obtidos foram analisados por espectrofotometria e por gel SDS-PAGE 15% e fotografados em um fotodocumentador *Gel Doc™ EZ System* (BioRad).

4.3.3 Construção da biblioteca de cDNA de *L. gongylophorus*

A construção da biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* foi realizada utilizando o Kit *CloneMiner™ cDNA Library Construction* (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. O sistema é designado para construção de bibliotecas de cDNA sem o uso de enzima de restrição de métodos de clonagem tradicionais.

Resumidamente, a biblioteca de cDNAs foi construída a partir do mRNA extraído do fungo (conforme item 4.3.2), que serviu como molde para a síntese da primeira fita de cDNA com o uso da enzima transcriptase reversa SuperScript™ II RT. Para isto foi utilizado um iniciador OligodT contendo o sítio de recombinação *attB2* biotilado. A síntese da segunda fita de cDNA e a eliminação do mRNA foram realizadas simultaneamente com a utilização das enzimas, *E. coli* DNA polimerase I, *E. coli* RNase H e *E. coli* DNA ligase. O material foi então extraído com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o sobrenadante foi precipitado com 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M, 20 µg de glicogênio e 2,5 volumes de etanol 100%. Depois as amostras foram lavadas com etanol 70% e ressuspendidas em água livre de RNase.

O adaptador contendo o sítio de recombinação *attB1* foi então ligado às extremidades 5' do cDNA dupla fita por 16 horas a 16°C, com uso da enzima T4 DNA ligase. A biotina presente no adaptador *attB2* protege e evita a ligação do adaptador *attB1* à extremidade 3' do cDNA. Após inativação da ligase o material foi precipitado como descrito acima. A amostra foi então submetida a fracionamento para a seleção de tamanho dos cDNAs dupla fita com uso da coluna *cDNA size fractionation* (Invitrogen). A Figura 4.2 resume esse processo.

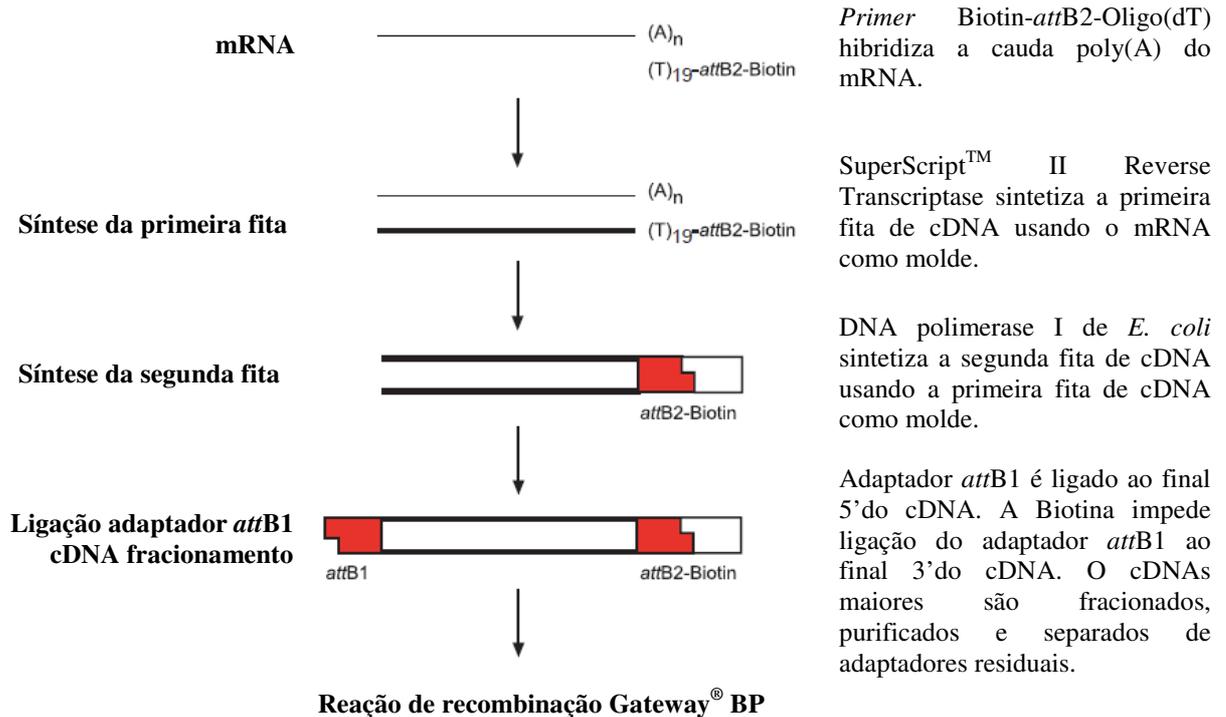


Figura 4.2. Resumo do processo de síntese de cDNA do Kit *CloneMiner™ cDNA Library Construction* (Invitrogen).

As primeiras frações contendo os fragmentos maiores de cDNA foram selecionadas até totalizar 300ng de cDNA que foram precipitados como descrito acima. Depois da precipitação o material foi quantificado e 250ng foram recombinados em plasmídeo pDONR™ 222 por 16 horas a 25°C, com uso da mistura de enzimas *BP Clonase Enzyme Mix* (Invitrogen), para gerar a biblioteca. Uma vez realizada a reação de recombinação BP, a mistura foi inativada pela adição de proteinase K (Invitrogen) e incubação a 37°C por 15 minutos. A proteinase K foi inativada a 75°C por 10 minutos e o cDNA foi precipitado como descrito acima.

Os plasmídeos foram transformados em células *E. coli* eletrocompetentes *ElectroMAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells*. As células foram submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em meio LB ágar contendo 50µg/mL de canamicina. O título da biblioteca de cDNA foi determinado pela contagem de colônias. As colônias foram semeadas em meio LB contendo 50µg/mL de canamicina em placas de 96 poços e incubadas por 22 horas a 300 rpm a 37°C. As culturas foram utilizadas para realizar minipreparações de DNA plasmidial, feita com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega®) de acordo com as especificações do fabricante para o protocolo de centrifugação. O tamanho médio

dos clones foi verificado por clivagem com uso da enzima de restrição *BsrGI* (New England Biolabs).

Os clones obtidos da biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* foram seqüenciados a partir da extremidade 5' com a utilização do oligonucleotídeo M13-Fw 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' em seqüenciador automático *MegaBace 1000[®] Flex* (GE Healthcare), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva. Utilizou-se para o sequenciamento o *Kit DYEnamic[®] ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante.

4.3.4 Estudos com a PGase recombinante de *L. gongylophorus* (rPGase-Lg)

A sequência de DNA de uma poligalacturonase de *L. gongylophorus* depositada em Janeiro de 2011 no banco de dados NCBI (GenBank: ADV30326.1) (SCHIOTT *et al*, 2010) foi utilizada no desenho de oligonucleotídios *sense* e *reverse* para amplificação do gene que codifica a síntese da PGase.

Utilizando a ferramenta SignalP 4.0 Server (disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>), verificou-se que a sequência disponível possui um peptídeo sinal na região N-terminal, sendo este provavelmente clivado entre os resíduos de aminoácidos 17 e 18. Baseado nisso foi sintetizado oligonucleotídeo *forward* iniciando após os primeiros 66 resíduos de nucleotídeos da sequência, eliminando assim os primeiros 22 resíduos de aminoácidos da região N-terminal referente ao peptídeo sinal.

Para obter a enzima de interesse na forma recombinante, dois sistemas de expressão foram utilizados, a expressão em *E.coli* (sistema procarioto) e em *P. pastoris* (sistema eucarioto). Os vetores escolhidos foram o pETSUMO (para expressão em *E.coli*) e o pPICZ α A (para expressão em *P. pastoris*). Entretanto foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeo para amplificar o gene da PGase com os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* para clonagem em pETSUMO e com os sítios das enzimas *EcoRI* e *NotI* para clonagem em pPICZ α A.

A clonagem no vetor pPICZ α A permite que a proteína de interesse seja expressa em fusão com seis resíduos de histidinas na região C-terminal, entretanto

o vetor não possui sítio de reconhecimento para proteases para separar a fusão. Desenhamos então o oligonucleotídeo *reverse* com uma sequência de resíduos que codifica para a trombina, o que permitirá separar a proteína de fusão e obter a PGase-Lg isolada. As sequências dos iniciadores sintetizados podem ser observadas na Figura 4.3.

<p>Primers forward PG: Oligo 5':</p> <p>Sequência (5'-3'): GCC <u>GAA TTC</u> GGA ACC ATT AAT TCG ATG GCT GAC GTC GCA GCC GCT GTA GCC TGC ACG <i>EcoRI</i></p> <p>Primers reverse PG: Oligo 3':</p> <p>Sequência (5'-3'): GCC <u>GCG GCC GC</u> <u>GGA TCC ACG CGG AAC CAG</u> CTG GCT GAA TCC TGT GAT ACC ATT <i>NotI</i> <i>Reconhecimento da Trombina</i></p> <p>Primers reverse PG: Oligo 3':</p> <p>Sequência (5'-3'): GCC <u>AAG CTT</u> TTA CTG GCT GAA TCC TGT GAT ACC ATT GAA GTT <i>HindIII</i> Stop</p>
--

Figura 4.3: Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados para o gene da PGase de *L. gongylophorus* com sítios de clivagem para as enzimas *EcoRI*, *NotI* e *HindIII*.

4.3.4.1 Obtenção de cDNA do gene que codifica a síntese de uma PGase

Reação de transcrição reversa - A obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se aproximadamente 2µg de RNA total (obtido conforme item 4.3.1), adicionou-se 0,5 µg de *primer* poliT e completou-se o volume para 14µL com água livre de RNase. A amostra foi incubada por 5 minutos a 70°C e resfriada imediatamente. Adicionou-se 5µL de M-MLV 5X *Reaction Buffer*, 2mM de dNTP mix (estoque 10mM cada), e 200u de M-MLV RT (transcriptase reversa). A amostra foi homogeneizada e incubada por 60 minutos a 42°C. Foram realizados controles negativos para cada reação sendo utilizado água ao invés de cDNA.

4.3.4.2 Amplificação do gene PGase-Lg através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O cDNA obtido da etapa da reação de transcrição reversa foi utilizado como fita molde para a amplificação do gene PGase por PCR. A PCR foi realizada com concentrações variadas de cDNA molde (de 2 a 20 µL) em volumes finais de 25 a 50µL de reação, contendo 0,2 ou 0,4 µM dos oligonucleotídios *sense* e *reverse* (para

pETSUMO e pPICZ α A), 0,2 ou 0,4mM de dNTP *mix*, 1 ou 2u de Taq DNA polimerase, 2 ou 4mM de MgCl₂ e *Buffer* 10X.

Após a reação de PCR, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE, acrescido de brometo de etídio e a visualização do gel foi realizada em fotodocumentador *Gel DocTM EZ System* (BioRad). Fez-se a purificação da banda correspondente ao DNA amplificado da PGase do gel de agarose usando o kit *PCR Clean-UP System* (Promega[®]), de acordo com o fabricante.

A PCR foi realizada em quatro etapas, a saber: **1:** 94°C durante 5 minutos; **2:** 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 68°C e 3 minutos a 72°C; **3:** 7 minutos 72°C; **4:** 4°C infinito. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos para cada reação.

4.3.4.3 Clonagem do gene PGase-Lg no vetor pETSUMO e Expressão da proteína em *E.coli*

O vetor pETSUMO utiliza uma pequena modificação tipo-ubiquitina (SUMO) para permitir a expressão, a purificação, e a geração de proteínas nativas em *E. coli*. A fusão SUMO pode aumentar a expressão de proteínas recombinantes e melhorar a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. SUMO é uma proteína Smt3 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é um homólogo de 11 kDa da proteína SUMO-1 de mamífero. A estrutura terciária da proteína SUMO é reconhecida especificamente e clivada por uma enzima processadora de proteína tipo-ubiquitina, a SUMO protease. Quando a SUMO está em fusão com o N-terminal da proteína a clivagem por SUMO protease resulta na produção da proteína nativa.

Clonagem do gene PGase-Lg no vetor pETSUMO - O DNA amplificado por PCR contendo os sítios de restrição para clonagem em pETSUMO e o vetor pETSUMO foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Fermentas) utilizando-se 2 μ g de DNA ou vetor acrescidos de 4 μ L de *10 X Fast Digest Green Buffer*, 2 FDU de cada enzima de restrição e água ultrapura quando necessário para um volume final de 40 μ L. Decorridas as 6 horas da reação a 37°C, purificou-se os DNAs duplamente digeridos, aplicou-se uma alíquota em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e o DNA foi quantificado e utilizado na reação de ligação.

As reações de ligação vetor-inserto foram feitas na razão equimolar de 1:1 e 1:3, utilizando-se aproximadamente 100ng do vetor pETSUMO em um volume total de 20 μ L. À mistura de ligação vetor-inserto foram adicionados 2 μ L de tampão 10X ligase, 2u de ligase e água ultrapura (quando necessário) até o volume final de 20 μ L. A reação de ligação foi mantida por 16 horas a 16°C, sendo o produto da ligação utilizado para transformar células de DH5 α *E. coli* competentes.

A preparação das células competentes (quimiocompetentes) foi feita inoculando-se colônia isolada de *E. coli* DH5 α em tubo contendo 10mL de meio LB estéril. A cultura foi crescida a 37°C até que sua DO_{600nm} atingisse de 0,4 a 0,6 (aproximadamente 16 horas). Em seguida, centrifugou-se a cultura a 4.500 x g por 10 minutos a 4°C. No fluxo laminar desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 3mL de CaCl₂ 100mM estéril e incubou-se no gelo por 30 minutos. Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 4.000 x g e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se as células em 600 μ L de CaCl₂ 100mM estéril. Deixou-se no gelo na geladeira e utilizou-se entre 24 e 48 horas.

A transformação do vetor pETSUMO-PGase-Lg em célula DH5 α de *E. coli* foi feita por choque térmico na presença de Ca²⁺. A mistura é incubada no gelo por 30 minutos. Após a incubação, a mistura é colocada por 2 minutos a 42°C. Em seguida incubou-se imediatamente o tubo por 2 minutos no gelo. Adicionou-se 4X o volume de células (de 0,4 a 4mL) de meio LB e incubou-se à 37°C por uma hora sob agitação de 250 rpm. A cultura é centrifugada por 20 segundos a 12.000 x g e uma parte do sobrenadante é desprezado, deixando-se apenas o volume desejado para o semeamento. O *pellet* é ressuscitado no próprio meio LB restante e 50 a 100 μ L de células transformadas são semeadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio LB ágar com o antibiótico necessário para cada caso. As placas foram deixadas por 16 horas na estufa a 37°C.

A construção pETSUMO-PGase foi confirmada nas colônias DH5 α transformantes obtidas, sendo estas crescidas *por 16 horas* para mini preparações e posteriormente submetidas à análise por PCR com os oligonucleotídeos contendo sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *HindIII*, que flanqueiam o inserto PGase-Lg. Os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automático para verificação da integridade do inserto e da junção vetor:inserto. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *MegaBace 1000[®] Flex* (GE Healthcare), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, utilizando-se *primers* que flanqueiam o vetor pETSUMO. O produto do sequenciamento foi analisado pelo alinhamento mediante banco de dados usando o BLAST nucleotídeos.

Expressão da enzima PGase-Lg em *E. coli* - A expressão da PGase-Lg foi feita utilizando-se três linhagens de *E.coli* diferentes: BL21(DE3), BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS. Para tanto, o vetor pETSUMO-PGase foi transformado por choque térmico (como descrito anteriormente) em células quimiocompetentes das três linhagens de *E.coli*. Após a transformação, inoculou-se colônias isoladas de cada uma das linhagens em 5mL de meio LB contendo os respectivos antibiótico para cada linhagem ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina para as 3 linhagens e $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ clorafenicol para BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS) em tubos de 50mL. Deixou-se a 37°C a 250 rpm por 16 horas. Adicionou-se esses 5mL de cultura crescida *por 16 horas* em 250 mL de meio LB na presença dos respectivos antibióticos para cada linhagem de *E. coli*. As culturas foram mantidas a 37°C a 250 rpm até $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,6 e 0,8. Retirou-se uma alíquota da cultura (t_0) e a expressão da proteína foi induzida pela adição de diferentes concentrações de IPTG (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; e 0,4mM). A indução da expressão da enzima foi testada em diferentes temperaturas, sendo elas 18°C (24 horas), 20°C (20 horas), 25°C (18 horas) e 37°C (4 horas).

Após a indução os cultivos foram analisados quanto à expressão intracelular. As culturas foram então centrifugadas a $13.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , e os *pellets* foram ressuspensos em 50 mL de tampão citrato-fosfato 60mM pH 5,0. A lise das células foi feita por ultra-som (Sonic Desmembrator Fisher Scientific mode 500) testando-se diferentes tempos totais de lise, diferentes tempos de sonicação *ON* e *OFF*, e diferentes porcentagem de amplitude. Após a lise, a suspensão foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a $11.500 \times g$. Sobrenadante e *pellet* foram analisados por SDS-PAGE 15% e armazenados a -20°C .

Processo de re-enovelamento da PGase expressa em *E.coli* (refolding) - Após vários testes na tentativa de solubilizar a proteína em fusão expressa em *E. coli*, a proteína encontrou-se principalmente em corpos de inclusão, porém passível de recuperação através da desnaturação utilizando agentes caotrópicos (*refolding*).

O *pellet* celular da expressão em BL21(DE3) a 37°C induzida com 0,6mM de IPTG foi lavado com 5 mL de tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 por 3 vezes,

centrifugando a $11.500 \times g$, a 4°C por 15 minutos cada lavagem. O *pellet* celular foi solubilizado em 8 mL de tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 contendo 6M de uréia e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Centrifugou-se a $11.500 \times g$, a 4°C por 15 minutos e aplicou-se em coluna de 3 mL de níquel Ni-NTA, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Recolheram-se as frações que não se ligam à coluna (*void*) e lavou-se a coluna com 5 volumes de tampão com 6M de uréia (*wash*). Eluíu-se em 2 volumes de tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 com 6M de uréia e 250mM de imidazol e ao eluído adicionou-se 10mM de DTT e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos.

Diluiu-se 3 vezes a solução com tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 com 6M de uréia acrescido de 5mM de cisteína e 1mM de cistina. Dialisou-se *por 16 horas* contra este mesmo tampão em membranas de 7,000 MWCO. Foram feitas então diálises por 5 horas contra tampões de concentrações decrescentes de uréia (5, 4, 3, 2 até 1M de uréia). Todas as amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% e avaliadas quanto à atividade poligalacturonase.

4.3.4.4 Clonagem do gene PGase-Lg no vetor pICZ α A e Expressão da proteína em *P. pastoris*

O vetor pPICZ α A é usado para expressar e secretar proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*. As proteínas recombinantes são expressas em fusão com um peptídeo N-terminal, codificado pelo sinal de secreção fator α de *Saccharomyces cerevisiae*, que direciona a secreção de proteínas recombinantes expressas. O vetor permite alto nível de expressão metanol induzida do gene de interesse em *Pichia*, devido ao fragmento 5' contendo o promotor AOX1, promovendo uma regulação rigorosa da expressão, podendo ser usado em várias cepas de *Pichia*. Este vetor também possui um gene de resistência a ZeocinaTM para seleção em *E. coli* e *P. pastoris*, além de um peptídeo C terminal contendo uma cauda de 6 histidinas para detecção e purificação de proteína de fusão recombinante.

Clonagem do gene PGase-Lg no vetor pPICZ α A - A reação de digestão da ORF codificante da PGase e do pPICZ α A com as enzimas *EcoRI* e *NotI* (Thermo Scientific) foi realizada utilizando-se 2 μ g de DNA ou vetor acrescidos de 4 μ L de *10 X Fast Digest Green Buffer*, 2FDu de cada enzima de restrição e água ultrapura

quando necessário para um volume final de 40 μ L. Decorridas as 6 horas da reação a 37°C, purificou-se os DNAs duplamente digeridos utilizando-se o Kit *Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-UP System* (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante, aplicou-se uma alíquota em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e o DNA foi quantificado e utilizado na reação de ligação.

As reações de ligação vetor-inserto foram feitas na razão equimolar de 1:1 e 1:3, utilizando-se aproximadamente 100ng do vetor pPICZ α A em um volume total de 20 μ L. À mistura de ligação vetor-inserto foram adicionados 2,0 μ L de tampão 10X ligase e 2u de ligase. A reação de ligação foi mantida por 16 horas a 16°C, sendo o produto da ligação utilizado para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes, plaqueando-se em meio LB *low salt* com 25 μ g.mL⁻¹ de zeocina.

A confirmação de transformantes foi feita por PCR do DNA plasmidial extraído de cada colônia analisada, feita com o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega[®]) de acordo com as especificações do fabricante para o protocolo de centrifugação. A PCR foi realizada com os ologonucleotídeos contendo sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NotI*, que flanqueiam o inserto PGase. Os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automático para verificação da integridade do inserto e da junção vetor:inserto. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *MegaBace 1000[®] Flex* (GE Healthcare), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, utilizando-se o *primer* 5'AOX1 (*forward*) do vetor pPICZ α A e o *primer reverse* da PGase com o sítio de restrição da enzima *NotI*.

Como em *Saccharomyces cerevisiae*, um DNA linear pode gerar transformantes estáveis de *Pichia pastoris* via recombinação homóloga entre o DNA transformado e regiões de homologia no genoma. O vetor linearizado na região 5' AOX1 irá integrar-se por inserção genômica na região 5' AOX1 do hospedeiro.

Digeriu-se o DNA plasmidial com a enzima *SacI* (Thermo Scientific) nas seguintes condições: 15 μ g de pPICZ α A-PGase-Lg, 2,5 μ L de *10 X Fast Digest Green Buffer*, 2FDu de *SacI* e água ultrapura se necessário para um volume de 25 μ L de reação. Deixou-se por 6 horas a 37°C. Aplicou-se 5 μ L da digestão em gel de agarose 1% para confirmar a completa linearização.

Após confirmação da completa linearização do vetor pPICZ α A-PGase-Lg fez-se uma precipitação usando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2,5 do

volume de etanol 100%, ambos gelados. Homogeneizou-se e deixou-se por 16 horas a -20°C . Centrifugou-se a solução a $15.000 \times g$ a 4°C por 20 minutos. Verteu-se rapidamente o sobrenadante e deixou-se o *pellet* secando sobre papel absorvente por 5 minutos. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugou-se novamente a $15.000 \times g$ a 4°C por 2 minutos. Verteu-se o sobrenadante e deixou-se secando a 37°C por aproximadamente 30 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* em $10\mu\text{L}$ de água ultrapura autoclavada e utilizou-se o DNA para transformação em *Pichia* eletrocompetente.

Preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* - Células de *P. pastoris* KM71H eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen™), com algumas modificações. A preparação das células eletrocompetentes foi feita inoculando-se uma colônia isolada de *P. pastoris* em tubo de 50mL contendo 5mL de meio YPD estéril, deixando-se *por 16 horas* a 30°C a 250 rpm.

Inoculou-se 250mL de meio YPD estéril em frasco de 1L com $100\mu\text{L}$ de cultura crescida por 16 horas. A cultura foi deixada crescer a 30°C a 250 rpm até que sua $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atingisse de 1,3 a 1,5 (aproximadamente 16 horas). Em seguida, centrifugou-se a cultura a $1.500 \times g$ a 4°C por 5 minutos. No fluxo laminar desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 250mL de água ultrapura estéril e gelada. Centrifugou-se novamente a cultura a $1.500 \times g$ a 4°C por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 120mL de água ultrapura estéril e gelada. Centrifugou-se a cultura a $1.500 \times g$ a 4°C por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20mL de sorbitol 1M estéril e gelado. Centrifugou-se novamente a cultura a $1.500 \times g$ a 4°C por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em $500\mu\text{L}$ de sorbitol 1M estéril e gelado. Deixou-se as células no gelo na geladeira e utilizou-se no mesmo dia.

Transformação do vetor linearizado pPICZ α A-PGase-Lg em *P. pastoris* por Eletroporação - A transformação por eletroporação em *P. pastoris* foi feita misturando-se $10\mu\text{L}$ de DNA linearizado (de 5-10 μg) com $80\mu\text{L}$ de células de *Pichia* eletrocompetentes. Transferiu-se a mistura para uma cubeta para eletroporação de 0,2cm gelada e incubou-se a cubeta contendo as células no gelo por 5 minutos. Pulsou-se as células de acordo com os parâmetros para *Pichia pastoris*: 2.000V,

200 Ω , 25 μ F e tempo de choque de 4,9ms, utilizando-se um eletroporador GenePulser da BioRad.

Imediatamente após o choque adicionou-se à cubeta 1mL de sorbitol 1M estéril e gelado e homogeneizou-se cuidadosamente. Transferiu-se o conteúdo da cubeta para um tubo de 15mL estéril e incubou-se por 1 hora e 30 minutos a 30°C, sem agitação. Semeou-se de 25 a 150 μ L de células transformadas separadamente em placas de Petri contendo 25mL meio YPDS ágar com 100 μ g.mL⁻¹ de Zeocina™. Incubou-se as placas por 2 a 10 dias a 30°C até o aparecimento de colônias. Após o crescimento das colônias, fez-se o repique das colônias para meio YPD com 100 μ g.mL⁻¹ de zeocina.

Seleção de colônias recombinantes de *P. pastoris* - A seleção das colônias transformantes foi feita através de análise do DNA genômico de cada colônia, verificando se este continha o gene PGase. Isto foi feito por amplificação do gene através de PCR (usando os oligonucleotídeos iniciadores). Assim, fez-se a extração do DNA genômico e para isso 20 colônias transformantes da construção pPICZ α A-PGase-Lg foram selecionadas e utilizadas para inocular 600 μ L de tampão de extração em tubo de 1,5mL. Adicionou-se 50 μ L de SDS 20% e agitou-se. Incubou-se a 60°C por 15 minutos. Adicionou-se 300 μ L de acetato de potássio 5M e agitou-se. Centrifugou-se a 15.000 x g por 10 minutos. Retirou-se 700 μ L do sobrenadante e transferiu-se para um tubo de 1,5mL limpo. Adicionou-se 700 μ L de isopropanol e agitou-se brevemente. Centrifugou-se a 15.000 x g por 10 minutos. Verteu-se o sobrenadante, adicionou-se 500 μ L de etanol 70% e centrifugou-se a 15.000 x g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se por 20 minutos a 60°C para completa secagem do DNA. Ressuspendeu-se os *pellets* de DNA em 50 μ L de água ultrapura autoclavada e analisou-se os DNAs extraídos em gel de agarose 1%.

Os DNAs genômicos obtidos foram submetidos à análise por PCR feitas com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição das enzimas *Eco*RI e *Not*I, que flanqueiam o inserto PGase. Das colônias transformantes, confirmadas por PCR, 16 foram semeadas em placas contendo o meio de cultura YPD e o antibiótico Zeocina™ a 500 μ g.mL⁻¹. Deixou-se na estufa a 30°C por 2 ou 3 dias.

Expressão da rPGase-Lg em pequena escala - O propósito da expressão em pequena escala é determinar a melhor condição para a expressão do gene de

interesse. Muitos fatores e diretrizes devem ser considerados antes e durante a expressão em *Pichia pastoris*. Mas como em qualquer sistema de expressão, as condições ideais de expressão dependem das características da proteína que está sendo expressa.

Inoculou-se 6 colônias isoladas em 100mL de meio BMGY em erlenmeyers de 500mL. Inoculou-se também 1 colônia de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICz α A como controle. Deixou-se a 30°C a 250 rpm até que a cultura atingisse DO_{600nm} = 2 – 6 (aproximadamente 16 horas). Centrifugou-se a cultura a 1.500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em 10 mL meio BMMY em tubo de 50 mL até DO_{600nm} = 1 para induzir a expressão. Deixou-se a cultura novamente a 30°C sob agitação de 250 rpm para continuar o crescimento e induzir a expressão. Adicionou-se metanol 100% até uma concentração final de 0,5% a cada 24 horas para manter a indução.

Nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, transferiu-se 500 μ L da cultura de expressão para um tubo de 1,5mL. Essas amostras foram utilizadas para analisar os níveis de expressão e determinar o tempo ideal pós-indução para a coleta. Centrifugou-se as alíquotas a 16.000 x g a temperatura ambiente por 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de 1,5mL. Armazenou-se os *pellets* celulares a -80°C e os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE 15% e por ensaio de atividade.

Expressão da rPGase-Lg em larga escala - A colônia que melhor expressou a rPGase-Lg foi utilizada em ensaio de expressão em larga escala, em 1500 mL de meio BMGY. Inoculou-se também 1 colônia de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICz α A como controle. Deixou-se a 30°C a 250 rpm até que a cultura atingisse DO_{600nm} = 2 – 6 (aproximadamente 18 horas). Centrifugou-se a cultura a 1.500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em 500mL de meio BMMY em erlenmeyer de 2000 mL. Deixou-se a cultura a 30°C a 250 rpm e adicionou-se metanol 100% até uma concentração final de 0,5% a cada 24 horas para manter a indução.

Nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, transferiu-se 10 mL da cultura de expressão para um tubo de 15mL. Centrifugou-se as alíquotas a 16.000 x g a temperatura ambiente por 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo

de 15mL. Filtrou-se o sobrenadante em membrana de 0,20 μ m e o filtrado foi armazenado em alíquotas de 10 mL a -20°C. A proteína rPGase-Lg foi analisada em gel SDS-PAGE 15% e avaliada por sua atividade poligalacturonase através de metodologia de detecção de açúcares redutores, como descrito no item 4.2.2.

Purificação parcial da rPGase-Lg - 30 mL do meio de cultura de *P. pastoris* foi aplicado em uma coluna de afinidade (Ni-NTA) de 5mL previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,5. Coletou-se o *void*, fração das proteínas que não se ligam na resina de níquel, seguida pela lavagem da resina com tampão PBS pH 7,5 com 10mM de imidazol, sendo também coletada essa lavagem (*wash*). A eluição da proteína foi realizada com tampão citrato-fosfato 60mM pH 5,0 com 250mM de imidazol. Para o acompanhamento da etapa de purificação, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e a atividade poligalacturonase foi avaliada através de metodologia de detecção de açúcares redutores, como descrito no item 4.2.2.

A coluna de afinidade Ni-NTA é composta por ácido nitrilotriacético (NTA), que é um quelante adsorvente tetradentado que ocupa quatro dos seis sítios de ligação na esfera de coordenação do íon níquel, deixando dois locais livres para interagir com a cauda de 6 histidinas. Os resíduos de seis histidinas inseridos em algumas clonagens ligam-se de forma específica à matriz Ni-NTA (ácido nitrilotriacético carregado com íons níquel) facilitando a purificação (Figura 4.4).

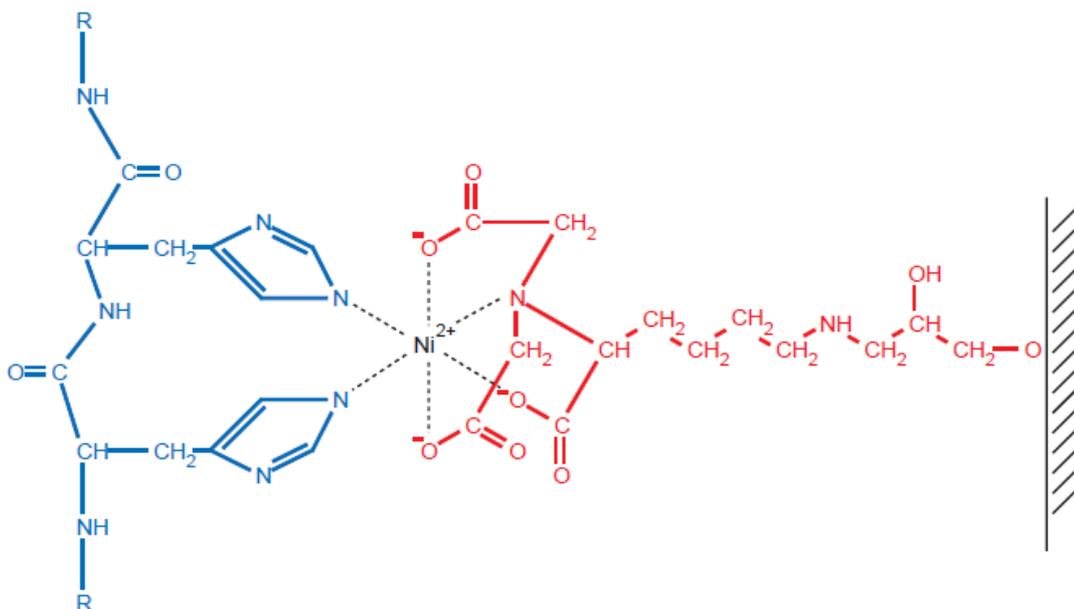


Figura 4.4. Interação entre resíduos vizinhos na cauda de histidina e a matriz Ni-NTA (Fonte: The QIAexpressionist 06/2003).

Os contaminantes (proteínas indesejáveis) são retirados quando a coluna é lavada com o tampão e a proteína desejada será eluída alterando-se as condições de pH, ou adicionando-se competidores aos ligantes, como imidazol, de forma a liberá-la da matriz. Como o anel imidazólico é parte integrante da estrutura da histidina, o imidazol competirá com a histidina na ligação aos íons níquel imobilizados pelo grupo NTA da matriz, permitindo assim a eluição da proteína.

Caracterização da rPGase-Lg através da técnica de *Western Blot* - A técnica de *Western blot* foi utilizada para a identificação das proteínas obtidas. A metodologia consiste na separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e ao terminar a corrida eletroforética o gel foi transferido para uma cuba de transferência contendo tampão de transferência. A membrana de nitrocelulose, os papéis filtro e as esponjas também foram mergulhados nesta cuba. O sistema de transferência foi montado contendo uma esponja, um papel filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel após a corrida eletroforética, mais um papel filtro e mais uma esponja, nesta ordem e sempre tomando cuidado para que nenhuma bolha de ar permanecesse entre o gel e a membrana.

O sistema foi levado na posição correta para a cuba de transferência, a qual foi completada com tampão de transferência e foi mantida uma corrente de 150mA por duas horas. Após a corrida o sistema foi cuidadosamente desmontado e a membrana foi corada com uma solução de *Ponceau* (0,5 % de *Ponceau* em ácido acético 0,1 %), as bandas de interesse foram marcadas e a membrana descorada com ácido acético 0,1%. Posteriormente uma solução de TBS foi preparada e a membrana foi incubada por 20 horas a 4°C com solução de bloqueio. Após o tempo de incubação a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com tampão TBS acrescido de 0,05% de Tween-20. Em seguida a membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo anti-His (Ni-NTA AP Conjugate da Qiagen) preparado na proporção de 1:1000.

A membrana foi lavada como descrito anteriormente e em seguida foi realizada a revelação das bandas. Esta etapa consiste em dissolver 1 pastilha de revelador, Sigma FastTM BCIP/NBT, em 10 mL de água ultrapura protegido da luz e incubar a membrana neste revelador por aproximadamente 15 minutos, ou até que as bandas que apresentaram reação com o anticorpo apareçam. A reação é interrompida lavando a membrana com água ultrapura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho serão divididos e apresentados seguindo-se duas abordagens principais: estudos com a PGase nativa (tópico 5.1) e estudos com a proteína recombinante (tópico 5.3). A construção da biblioteca de cDNA é mostrada e discutida no tópico 5.2.

5.1 Cultivo do *Leucoagaricus gongylophorus*

A linhagem isolada de *L. gongylophorus* foi obtida de ninho artificial de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro-SP (Figura 5.1).



Figura 5.1. Ninhos artificiais de *Atta sexdens rubropilosa* (formiga saúva) da UNESP – Rio Claro/SP.

Quando cultivado *in vitro*, o *L. gongylophorus* exibe uma taxa de crescimento lento e muitas vezes é facilmente invadido por contaminantes. O estipe central foi de 10 a 15 mm, e a cor predominante do micélio crescido em placa é branca, apresentando ocasionalmente pontos marrons (Figura 5.2).



Figura 5.2. Cultivo *in vitro* de *Leucoagaricus gongylophorus*.

5.2 Isolamento e Caracterização de PGase Nativa do *L. gongylophorus*

Determinou-se atividade poligalacturonase sobre ácido poligalacturônico no extrato bruto do meio de cultivo do fungo, comprovando assim sua excreção para o meio extracelular. A purificação da pectinase foi iniciada com a precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do extrato bruto (cultura do fungo). Observou-se através de SDS-PAGE 15% e ensaio de atividade, que a fração com concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 30 e 70% era a que continha a enzima PGase-Lg. Foi observado que houve uma relativa purificação da PGase-Lg nesta fração (dados não mostrados). Esta fração foi utilizada na etapa subsequente, de cromatografia de exclusão molecular. Na Figura 5.3 é apresentado o cromatograma obtido na coluna Superdex75.

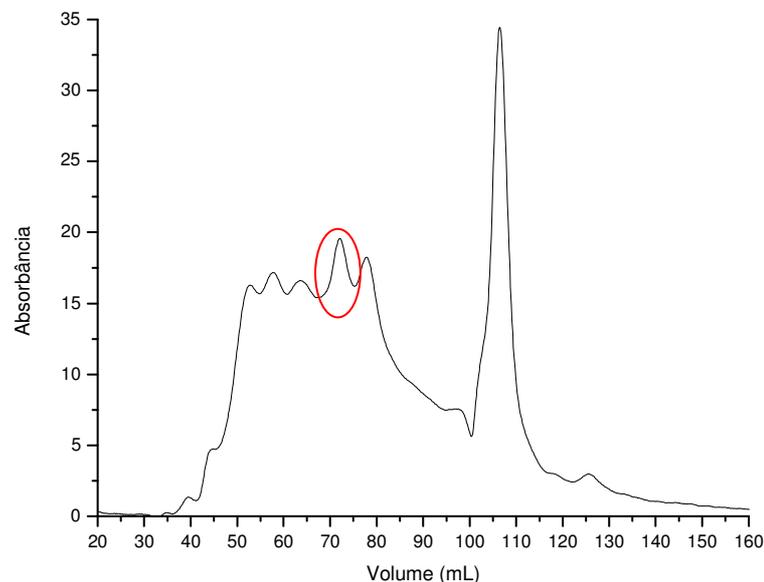


Figura 5.3. Cromatograma resultante da coluna Superdex 75. Círculo vermelho indica as frações contendo atividade.

As frações eluídas em 66 a 76 mL, contendo atividade, foram aplicadas em gel de tricina e coradas com prata (Heukeshoven & Dernick, 1985) (Figura 5.4), preparando-se todas as soluções imediatamente na hora da coloração do gel. O gel de tricina leva à interpretação de uma purificação eficiente das proteínas contidas nessa amostra e mostra a presença de uma proteína de massa molecular de aproximadamente 35 kDa, tamanho esse esperado para a PGase de *Leucoagaricus gongylophorus*, comparado com outras PGases de outros organismos. As frações eluídas da coluna foram avaliadas em ensaios de atividade PGase, e pôde-se verificar maior atividade enzimática na fração eluída em 73 mL.

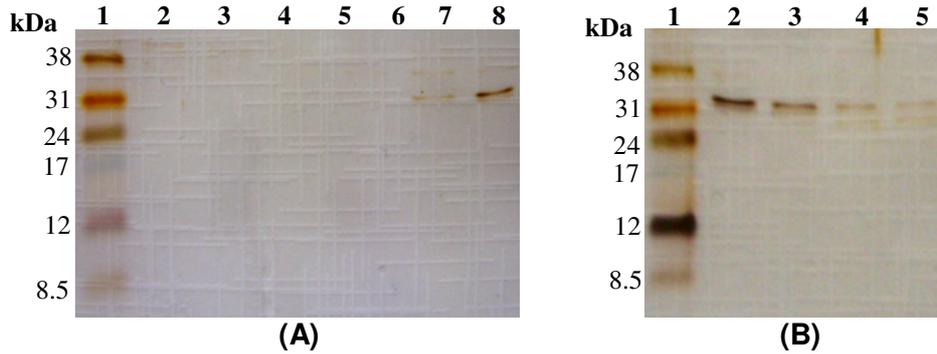


Figura 5.4: Análise em gel de tricina das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular em Superdex75. **1:** marcador de baixo peso molecular (GE - RNP755E). **(A) 2-8:** frações 66-72; **(B) 2-5:** frações 73-76.

As frações 72, 73 e 74 foram reunidas e utilizadas em ensaios de determinação de temperatura e pH ótimos. Inicialmente, foi avaliada a influência da temperatura na atividade da PGase-Lg sendo que os ensaios foram realizados no intervalo de 20 a 80^oC. Neste estudo verificamos que a temperatura ótima foi entre 55 e 65^oC (Figura 5.5 **(A)**).

O efeito do pH na atividade da PGase-Lg foi avaliado, fazendo os experimentos de atividade enzimática à temperatura ótima de 60^oC e variando-se o pH da solução tampão de 2,5 a 6,5. A Figura 5.5 **(B)** mostra os resultados obtidos deste experimento, onde se pôde observar a maior atividade entre pH 4,5 e 5,5.

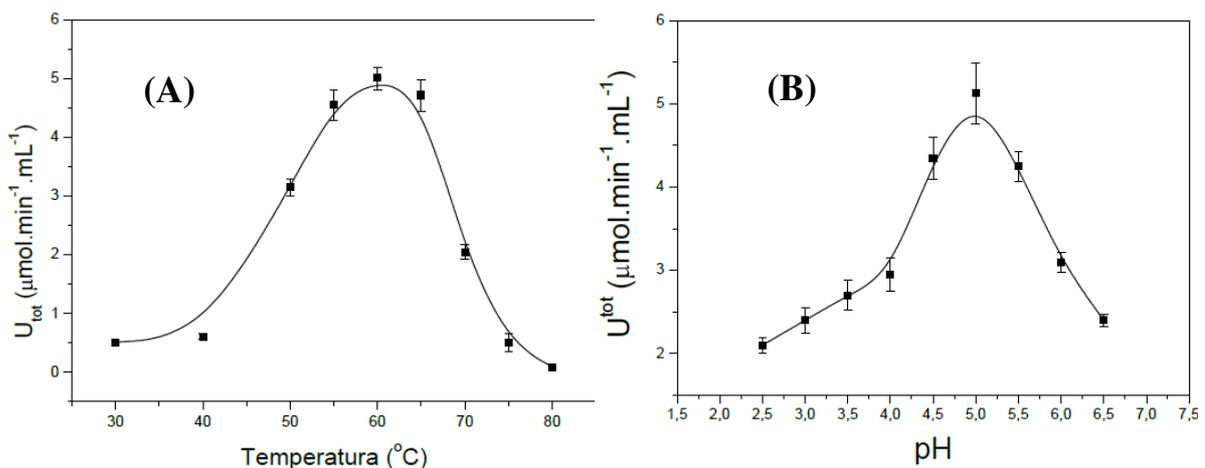


Figura 5.5. Atividade da enzima PGase-Lg em função da temperatura **(A)** e do pH **(B)** (ADALBERTO, P.R *et al*, 2012).

Observa-se também que a atividade de hidrólise diminui para menos de 50% a 45^oC e também acima de 70^oC. Além disso, o perfil térmico da enzima apresenta

um formato assimétrico característico, devido à desnaturação térmica da enzima. É importante mencionar que a temperatura ótima para outras poligalacturonases é de 60-65°C (SORIANO *et al*, 2005; AMINZADEH *et al*, 2010; PEDROLLI & CARMONA, 2010; DAMÁSIO *et al*, 2010). Por outro lado, menores temperaturas ótimas para PGases também são relatadas, variando de 30 a 50°C (POLIZELI *et al*, 1991; DA SILVA *et al*, 2005).

O pico de atividade pectinase para poligalacturonato ocorre em pH 5,0, a 60°C e a enzima retém acima de 50% do máximo da sua atividade no pH de 4,0 a 6,0. Esta faixa de pH ótimo tem sido relatada para uma variedade de poligalacturonases isoladas (POLIZELI *et al*, 1991; DAMÁSIO *et al*, 2010; DA SILVA *et al*, 2005; VOGET *et al*, 2006) e são menos comuns poligalacturonases neutras ou básicas, com um pH ótimo variando de 7,0 a 9,0 (SORIANO *et al*, 2005; CELESTINO *et al*, 2006).

Os parâmetros cinéticos da PGase-Lg para a hidrólise de ácido poligalacturônico foram calculados a 60°C em pH 5,0. O K_M aparente para a hidrólise foi de 0,5 mg.mL⁻¹ e o valor de V_{max} calculado foi de 5.2 μmol.min⁻¹.mL⁻¹ (Figura 5.6) (ADALBERTO, P.R *et al*, 2012).

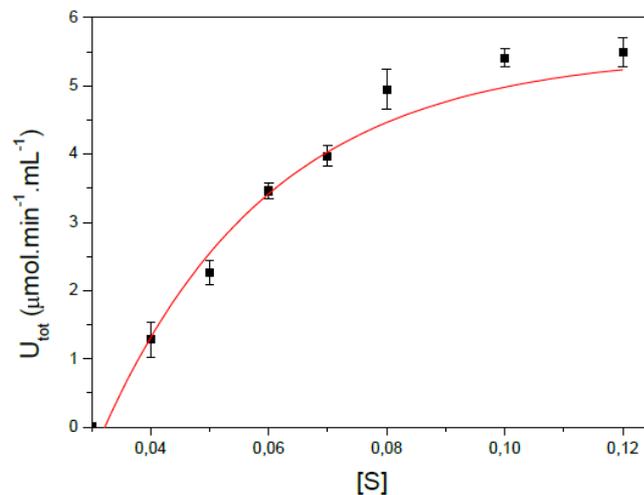


Figura 5.6. Gráfico de Lineweaver-Burk para os parâmetros cinéticos da PGase-Lg para a hidrólise de ácido poligalacturônico a 60°C e pH 5,0.

Podemos propor que a PGase do fungo *L. gongylophorus* tem uma afinidade intermediária (baixo K_M) pelo ácido poligalacturônico quando comparada com PGases de outros organismos (POLIZELI *et al*, 1991, PEDROLLI & CARMONA, 2010, CELESTINO *et al*, 2006, DAMÁSIO *et al*, 2010) que possuem valores de K_M na faixa de 0,24 a 1,87 mg.mL⁻¹ (XIAO *et al*, 2008).

5.3 Construção da biblioteca de cDNA de *L. gongylophorus*

A construção de uma biblioteca de cDNA de *L. gongylophorus* foi realizada com o objetivo de se obter seqüência de DNA que codificam a síntese de poligalacturonases (PGases) deste fungo, pois até aquele momento não havia nenhuma descrita na literatura.

Extração de RNA total do fungo *L. gongylophorus* - A extração de RNA total foi realizada a partir de massa fúngica congelada a -80°C . Foram feitas 18 extrações de RNA total, partindo-se de uma média de 110-130mg de micélio para cada mL de TRIzol[®] em cada extração. A quantidade de RNA total foi avaliada utilizando-se 2 μL de amostra por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho BioSpec-nano (Shimadzu). Para os RNAs extraídos apresentados, a média da razão A_{260}/A_{280} foi de 2,15, sendo que a menor razão foi 2,09 e a maior foi 2,19, indicando alta pureza e qualidade dos RNAs obtidos. O rendimento de RNA partindo-se de uma média de 120 mg de tecido teve média de $878,9 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Os valores obtidos ($A_{260}/A_{280} \geq 2,09$ e $A_{260}/A_{230} \geq 1,52$) mostram-nos que os RNAs extraídos podem ser considerados puros, encontrando-se livres de proteínas, e que o método de extração utilizando-se o reagente TRIzol[®] foi eficiente para o isolamento dos RNAs e para a manutenção da integridade dos mesmos. A confirmação da integridade e da qualidade das amostras foi avaliada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As extrações de RNA total resultaram em produtos íntegros, onde podem ser observadas as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S, 18S e 5S, indicando que os RNAs não estão degradados (Figura 5.7). A resolução em gel não apresentou DNA genômico. O padrão de eletroforese sugere não haver excesso de sal ou proteína.

O cuidado na aquisição das amostras, a purificação correta do RNA bem como uma boa qualidade do RNA são considerados muito importantes na continuação do trabalho, já que muitos dos problemas que podem afetar o experimento podem começar nestas etapas.

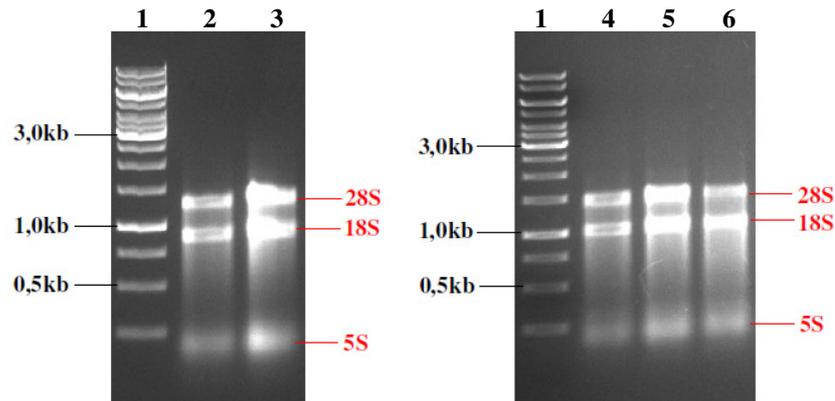


Figura 5.7. Análise da qualidade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando a presença das bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S, 18S e 5S. **1**: 1kb *DNA Ladder* (SM1163 - Thermo Scientific); **2-6**: amostras de RNA de 1 a 6, respectivamente.

Purificação de RNAs mensageiros (mRNAs) - A somatória de 134 μ g de RNA total mostradas no tópico anterior foram agrupadas para o isolamento do mRNA. A purificação dos mRNAs foi realizada utilizando o Kit *Polytract[®] mRNA Isolation System* (Promega), seguindo-se metodologia descrita pelo fabricante, com pequenas modificações. A partir dos RNAs totais foi obtido 1,5 μ g de mRNAs purificados, representando 1,1% da amostra inicial. A quantidade obtida encontra-se de acordo com a faixa percentual esperada (entre 1 e 5%) descrita na literatura (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para se verificar a qualidade dos mRNAs, analisou-se 2 μ L do mRNA por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho BioSpec-nano (Shimadzu). Os valores obtidos de A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} bem como a concentrações da amostra de mRNA estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Valores de A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} e concentração da amostra de mRNA.

	mRNA
A_{260}/A_{280}	1,95
A_{260}/A_{230}	2,25
Concentração (ng. μ L ⁻¹)	150,01

A confirmação da integridade e da qualidade da amostra foi feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 5.8). Foram aplicados 2 μ L de amostra de mRNA obtida. A purificação do mRNA resultou em um produto íntegro, onde o mRNA aparece como uma mancha de 0,5 a 3 kb. As bandas de rRNA podem ser ainda pouco visíveis.

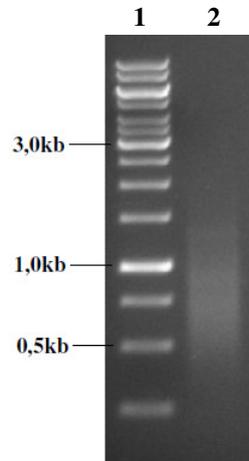


Figura 5.8. Análise da qualidade da amostra de mRNA por eletroforese em gel de agarose 1%. **1:** 1kb *DNA Ladder* (SM1163 - Thermo Scientific); **2:** mRNA.

Construção da biblioteca de cDNA de *L. gongylophorus* - A construção da biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* foi realizada utilizando o Kit *CloneMiner™ cDNA Library Construction* (Invitrogen™). Após a ligação do adaptador *attB1* ao final 5' da fita dupla de cDNA, e após a incubação por 16-24 horas desta reação, foi necessário fracionar o cDNA e estimar o seu rendimento usando uma coluna *cDNA size fractionation* (Invitrogen) e um ensaio “*plate spotting*” respectivamente.

A cromatografia em coluna otimiza o fracionamento do cDNA e faz a clonagem de insertos maiores. A resina porosa retém adaptadores residuais e/ou cDNAs pequenos (<500 bp), impedindo a contaminação da biblioteca. Moléculas maiores ignoram a resina e eluem rapidamente, enquanto moléculas menores são retidas no interior da resina e eluem mais lentamente. Assim, frações eluídas mais cedo contêm fragmentos maiores de cDNA do que frações eluídas mais tarde.

Após lavar a coluna com o tampão TEN, de acordo com as especificações do manual, iniciou-se a adição da amostra de cDNA diluída em tampão TEN na coluna, bem como sua coleta em diferentes tubos, de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e o rendimento das frações de cDNA foi estimada

usando o ensaio “plate spotting”. Calculou-se a quantidade de cDNA de cada fração (Figura 5.9).

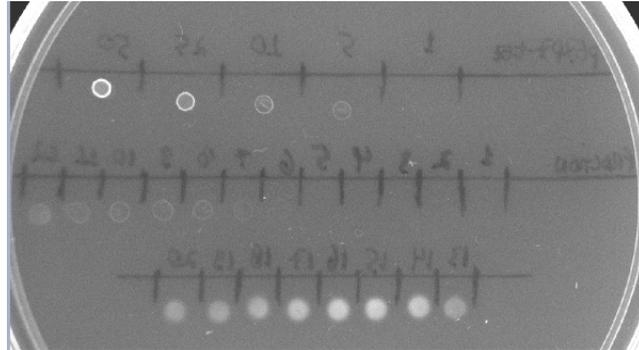


Figura 5.9: Análise de frações de cDNA em placa de agarose 1%. Linha superior: diluições de 50 a 1 ng do plasmídeo pEXP7-*tet*; Linha inferior: fracionamento de cDNA, coletas de 1 a 20.

A análise das frações de moléculas de cDNA dupla-fita, coletadas da coluna, mostrou o padrão de fracionamento esperado. As moléculas maiores foram as primeiras a sair da coluna, a partir da fração 6, como no exemplo mostrado no manual do fabricante do kit *CloneMiner cDNA Library Construction* (Invitrogen).

Após o agrupamento das frações 6, 7 e parte da fração 8, totalizando 250ng de cDNA, essa amostra foi usada para a recombinação. Este material representa os maiores clones de cDNA. Após secagem das amostras na placa, removeu-se a tampa e visualizou-se a placa sob luz ultravioleta (Figura 5.10). Nota-se que os controles e as amostras estão em ordem inversa. Usando as concentrações conhecidas dos padrões de DNA (fornecidos no kit), estimou-se a quantidade de cDNA em cada amostra.

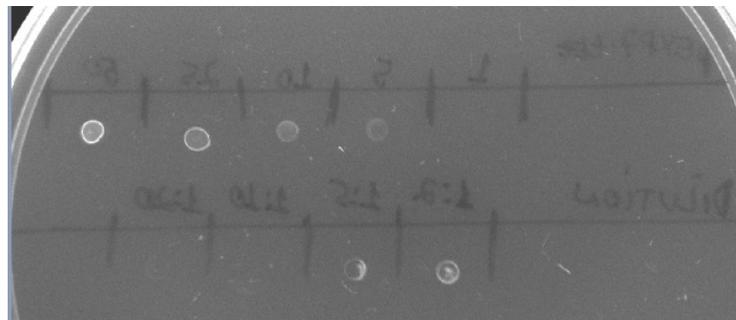


Figura 5.10: Quantificação de fragmentos maiores de cDNA em placa de agarose 1%. Linha superior: diluições de 50 a 1 ng do plasmídeo pEXP7-*tet*; Linha inferior: diluições de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 do cDNA.

Usando a quantidade de 250ng de cDNA pode-se obter uma biblioteca contendo de 5-10 milhões de clones. Devido a perda de cerca de metade da amostra durante o processo de precipitação de etanol procedente, é recomendável que seja reunido um mínimo de 150ng de cDNA a partir das frações, antes de precipitar o material. As primeiras frações contendo cDNA detectável pelo ensaio “*plate spotting*” contém os pedaços maiores e mais puros de cDNA na população. Usamos então cDNA dessas frações para a reação de recombinação BP. É recomendável que também seja incluída a fração que precede a primeira fração de cDNA detectável. Esta fração pode conter fragmentos de cDNA grandes e em quantidades que não são visíveis usando o ensaio “*plate spotting*”.

O controle positivo incluído no kit contém um fragmento de aproximadamente 1,4 kb que consiste do gene de resistência a tetraciclina e seu promotor ladeado por sítios *attB*. Usando o fragmento pEXP7-*tet* na reação BP com um vetor doador resulta em clones de entrada que expressam o gene de resistência a tetraciclina. Incubou-se a reação com a BP clonase por 16-20 horas.

O título da biblioteca, determinado após contagem das placas, foi de $4,5 \times 10^8$ clones, o que é excelente. As contagens, tanto do controle positivo quanto do controle negativo, ficaram dentro dos padrões recomendados pelo fabricante do kit. O controle positivo ficou com título de $3,6 \times 10^8$ clones e o controle negativo com $1,1 \times 10^5$.

Após digestão de 18 plasmídeos pDONR-222 recombinantes com a enzima *BsrGI* (New England Biolabs) (Figura 5.11), quantificou-se a biblioteca de cDNA. É importante quantificar a biblioteca de cDNA para determinar o sucesso da construção da biblioteca. Determinar o tamanho de inserto médio e a porcentagem de recombinantes nos dá uma idéia da representação da biblioteca de cDNA. A média do tamanho dos clones de cDNA calculada foi de 1,3kb, sendo que o ideal é uma média em torno de 1,5kb. Isso é uma média boa, haja visto que os tamanhos de mRNAs para pectinases de fungos variam entre 1200 e 1400pb.

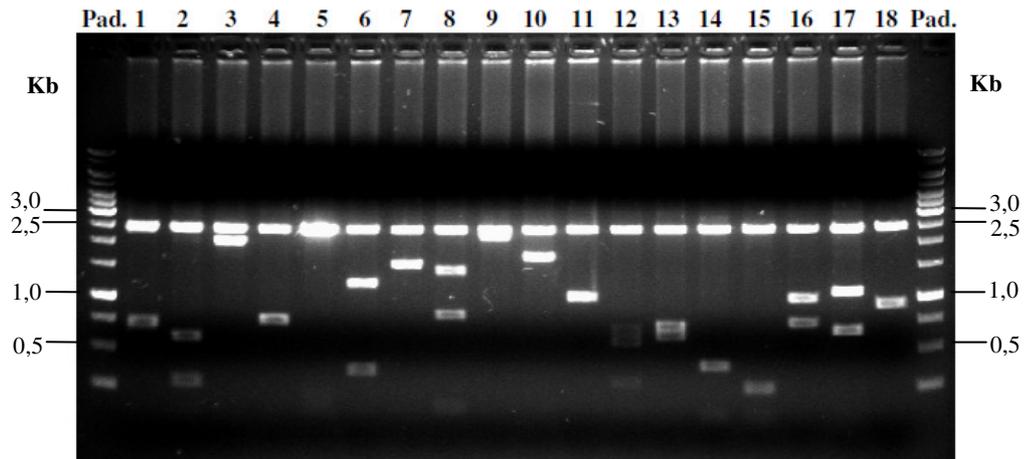


Figura 5.11: Análise de clones da biblioteca por restrição com a enzima *Bsr*GI em gel de agarose 1%. **Pad:** 1kb *DNA Ladder* (SM1163 - Thermo Scientific); **1 a 18:** clones digeridos com a enzima *Bsr*GI.

Sequenciamento e Alinhamento das sequências da biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* - Um total de 816 clones da biblioteca de cDNA de *L. gongylophorus* foram seqüenciados a partir da extremidade 5' com a utilização do oligonucleotídeo M13-Fw 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' em seqüenciador automático *MegaBace 1000[®] Flex* (GE Healthcare), utilizando-se o *Kit DYEnamic[®] ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. Através do sequenciamento dos clones obtidos na biblioteca de cDNA iniciamos a busca pelos clones de interesse, relativos a pectinases.

As sequências obtidas da biblioteca de *Leucoagaricus gongylophorus* foram analisadas com o uso da plataforma de *softwares* dCAS - *Desktop cDNA Annotation System* (GUO *et al*, 2009). Um total de 816 sequências em formato de arquivos brutos com extensão “.esd” foram analisadas. Foram atribuídos valores de qualidade para cada base das sequências brutas com o uso do software “phred” (EWING *et al*, 1998; EWING & GREEN, 1998). As sequências de baixa qualidade foram então removidas com utilização dos critérios de seleção de qualidade *default* da plataforma dCAS. As sequências correspondentes a oligonucleotídeos e plasmídeos foram removidas através de buscas no banco de dados UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Restaram 797 sequências de boa qualidade que foram agrupadas com uso da ferramenta de busca por alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e do programa de agrupamento de sequências Cap3 (HUANG & MADAN, 1999).

Com isso as sequências foram arranjadas em 711 transcritos, sendo 86 *contigs* ou agrupamentos, formados por mais de uma sequência, e 625 sequências que permaneceram isoladas em sequências únicas. Os 711 transcritos foram identificados através de buscas via *blastx* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contra o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes (nr). Os dados analisados foram compilados em uma planilha *Excel* contendo *hyperlinks* para os arquivos de dados gerados e para os localizadores de recurso padrão, ou *URLs*, associados a cada transcrito.

Após análise de todos os dados, não foi encontrada nenhuma similaridade com nenhuma glicosil hidrolase da família 28 (que se refere às poligalacturonases) para essa biblioteca de cDNA, com os clones seqüenciados, nas condições de indução do fungo utilizado. A princípio, pensamos que a ausência de glicosil hidrolases da família 28 nos clones sequenciados pode ter ocorrido devido o uso de glicose no meio indutor contendo ácido poligalacturônico. A glicose pode ter sido um repressor catabólico da expressão de pectinases.

No entanto, o fator de transcrição *cre1* (repressor de catabolismo de carbono) não foi detectado na biblioteca de *L. gongylophorus*. Porém isto não significa que este transcrito não ocorra ou então que seja pouco representado neste fungo. O *cre1* é um importante regulador de assimilação de carbono (PORTNOY *et al*, 2011) e reprime a expressão de algumas enzimas na presença de glicose (ILMÉN *et al*, 1997; NAKARI-SETALA *et al*, 2009).

Na literatura encontramos que a forma truncada de *cre1* em *T. reesei* é uma mutação nula que por si só inviabiliza a repressão da expressão de celulases e hemicelulases na presença de glicose. Entretanto, o trabalho mostra um aumento de atividade celulásica e xilanásica, em condições indutoras, em *T. reesei* transformado com o *cre1* truncado ou anulado, quando comparado ao mesmo fungo contendo o gene selvagem (NAKARI-SETALA *et al*, 2009). Isto torna a inibição do *cre1* uma importante estratégia para aumentar a produção de enzimas hidrolíticas em meios indutores, e esta observação também nos encoraja a planejar ensaios futuros para, uma vez identificada a ORF de *cre1* em *L. gongylophorus*, investigar a atividade hidrolítica deste fungo com o *cre1* obstruído. Além disso, é possível especular que o fungo *L. gongylophorus* pode apresentar algum nível de expressão de glicosil hidrolases da família 28 que não detectado no sequenciamento devido quantidade de clones analisados da biblioteca de cDNA.

Algumas sequências da biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* apresentaram similaridade com algumas quitinases e hidrolases das famílias 5, 10, 18, 32, 56, 61 e 85, porém todas com baixa identidade. Entretanto, a biblioteca é muito rica em informações sobre o organismo em questão, e está sendo de grande utilidade para nosso grupo, uma vez que os alinhamentos apresentaram enzimas de interesse para o nosso laboratório que apresentaram uma boa porcentagem de identidade. Uma delas é a glucuronil hidrolase, que apresentou 71% de similaridade com a enzima do fungo *Agaricus bisporus*. O gene que codifica esta enzima já foi amplificado da biblioteca e clonado em vetor de expressão para *E.coli* e em vetor de expressão para *P. pastoris*. Outra enzima identificada é uma lacase, cujo gene já foi clonado e está sendo usado em ensaios de expressão da enzima em *P. pastoris*.

5.4 Obtenção da ORF (*Open Reading Frame*) da PGase-Lg

Enquanto analisávamos as sequências obtidas da biblioteca de cDNA, a sequência completa do gene da PGase de *Leucoagaricus gongylophorus* foi publicada (SCHIOTT *et al*, 2010). No trabalho, gotas fecais de algumas formigas foram coletadas espremendo-se com fórceps a cabeça e o abdômen até que o inseto depositasse uma gota do material fecal. As amostras foram coletadas e corridas em gel SDS-PAGE 12,5%. As bandas de interesse foram recortadas do gel e prosseguiu-se então a preparação das amostras para o sequenciamento por espectrometria de massas. Após análise dos dados através de duas diferentes abordagens, entre as 33 sequências dos genes identificadas por estes métodos, 7 foram encontradas tendo um grau elevado de similaridade com enzimas envolvidas na degradação de pectina, e dentro dessas 7, uma delas foi identificada como uma poligalacturonase (SCHIOTT *et al*, 2010).

Contudo, com a sequência da poligalacturonase do fungo *L. gongylophorus* depositada, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o gene da PGase com os sítios das enzimas de restrição para clonagem em *E. coli* e *P. pastoris*.

Para a reação de transcrição reversa reuniram-se 2 amostras de RNA total obtendo-se uma concentração final de $1,34\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. A obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se aproximadamente $2\mu\text{g}$ de RNA total. Para confirmar o sucesso da reação de transcrição reversa, verificar a especificidade dos oligonucleotídeos, e amplificação do gene de interesse, fez-se uma PCR utilizando-

se oligonucleotídeos para a PGase-Lg com os sítios de *EcoRI* e *NotI*. Foi feito também um controle negativo, com água ultrapura no lugar do molde de cDNA. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% (Figura 5.12).

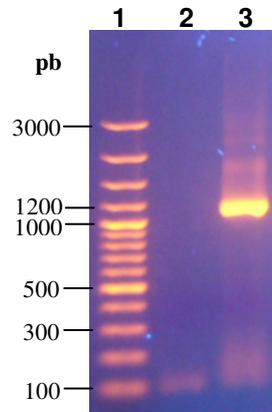


Figura 5.12. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação por PCR do cDNA. **1**: marcador de peso molecular (SM1153 – Thermo Scientific); **2**: controle negativo; **3**: produto de PCR (1058pb).

O produto de amplificação a partir do cDNA resultou em um fragmento único de 1058 pb, correspondente a ORF da PGase (1020 pb), acrescido de 38 pb que correspondem aos sítios de clivagem das enzimas do produto amplificado e do sítio de trombina. O fragmento referente ao gene da PGase foi recortado do gel de agarose e purificado com o Kit *Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-UP System* (Promega). Para a confirmação da purificação aplicou-se 5µL do DNA eluído em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5.13).

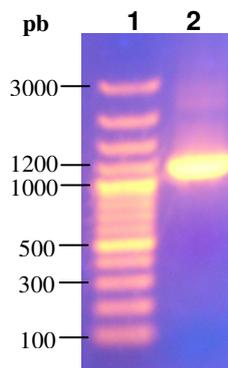


Figura 5.13. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação do cDNA purificado. **1**: marcador de peso molecular (SM1153 – Thermo Scientific); **2**: produto purificado de 1058 pb da amplificação por PCR.

5.5 Clonagem do gene PGase-Lg e Expressão da enzima rPGase-Lg em *Escherichia coli*

5.5.1 Construção do clone pETSUMO-PGase-Lg

Foi feita a amplificação do gene de interesse por PCR utilizando-se oligonucleotídeos para a PGase-Lg com os sítios de *EcoRI* e *HindIII*. Foi feito também um controle negativo, com água ultrapura no lugar do molde de DNA. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% (dados não apresentados). Após a digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* e da purificação da ORF codificante da PGase-Lg e do vetor pETSUMO, as amostras foram quantificadas utilizando-se 2µl em espectrofotômetro, visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5.14) e utilizadas na reação de ligação.

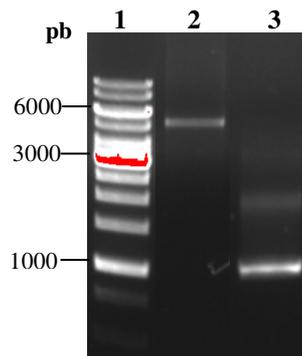


Figura 5.14. Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação da digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. **1**: marcador de peso molecular 1kb (SM1163 - Thermo Scientific); **2**: pETSUMO digerido (5624pb); **3**: ORF da PGase-Lg digerida (1033pb).

O produto da ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* competentes da linhagem DH5α, acrescido de 50µg.mL⁻¹ de canamicina para seleção de recombinantes contendo o vetor pETSUMO, que carrega o gene de resistência a esse antibiótico. Dez colônias recombinantes foram selecionadas na placa de DH5α e crescidas por 16 horas em meio LB com canamicina. Os inóculos que cresceram foram submetidos a uma mini preparação para a extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial purificado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para confirmar a purificação. O DNA plasmidial serviu de molde para a PCR utilizando-se oligonucleotídeos que flanqueiam o gene da PGase

com sítios de *EcoRI* e *HindIII* para a confirmação da clonagem do gene PGase-Lg no vetor pETSUMO (Figura 5.15).

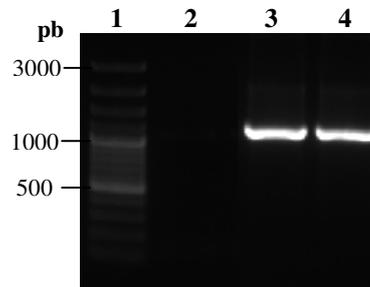


Figura 5.15. Eletroforese em gel de agarose 1% da confirmação por PCR da ligação pETSUMO-PGase-Lg. **1:** marcador de peso molecular (SM1153 - Thermo Scientific); **2:** controle negativo da PCR; **3 e 4:** produtos de 1041 pb da amplificação da ORF da PGase-Lg.

Na Figura 5.16 está uma representação esquemática para esta construção denominada pETSUMO-PGase-Lg. Após a expressão, o motivo SUMO pode ser clivado pela ação da protease SUMO (UPL-1) na porção C-terminal da SUMO.*tag*. O interessante é que a SUMO protease (UPL-1) pode ser expressa e purificada no próprio laboratório, o que minimiza os custos da produção desta enzima.

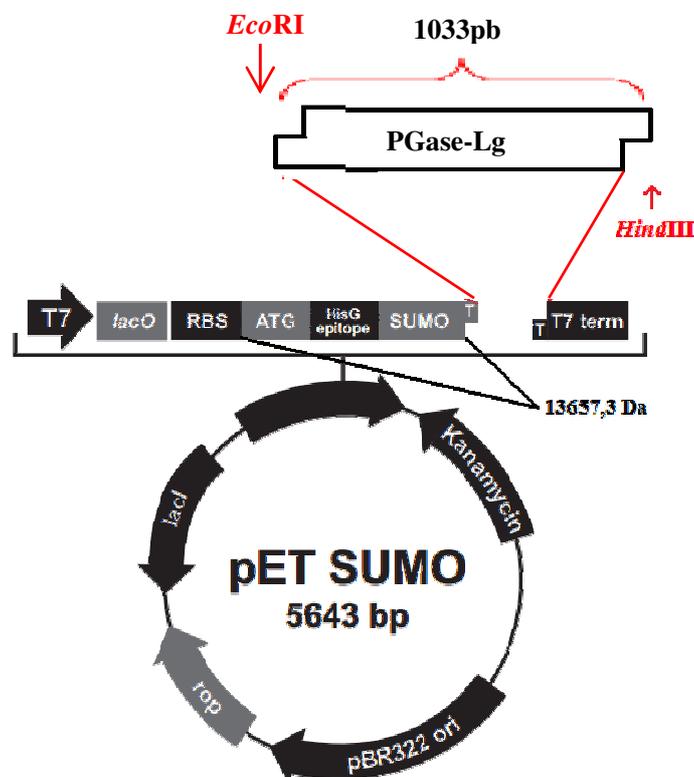


FIGURA 5.16: Representação esquemática para a construção do clone com o gene PGase-Lg no vetor pETSUMO (pETSUMO-PGase-Lg (6657pb)).

Um clone positivo da construção pETSUMO-PGase-Lg foi submetido ao sequenciamento automático para verificação da integridade do inserto e da junção vetor:inserto. Para o sequenciamento, utilizou-se os oligonucleotídeos do vetor pETSUMO, sendo eles SUMO *forward* (5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3') e T7 *reverse* (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'). O produto do sequenciamento foi analisado pelo alinhamento mediante banco de dados usando o BLAST nucleotídeos e o alinhamento da sequência de nucleotídeos de pETSUMO-PGase-Lg apresentou 97% de identidade com a sequência do mRNA da poligalacturonase de *Leucoagaricus gongylophorus*, utilizada como molde para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores. O produto da ligação pETSUMO-PGase-Lg foi utilizado para transformar células de *E. coli* competentes das linhagens BL21(DE3), BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS.

5.5.2 Expressão da PGase-Lg em *E. coli*

A construção pETSUMO-PGase-Lg-DH5 α foi transformada na linhagem BL21(DE3) de *E. coli* competente e semeada em meio LB ágar contendo 50 μ g.mL⁻¹ de canamicina, antibiótico que seleciona transformantes que contém o plasmídeo pETSUMO. Uma colônia isolada de pETSUMO-PGase-Lg-BL21(DE3) foi transferida para 5mL de meio LB contendo canamicina e incubada a 37°C a 250 rpm por 16 horas. Em seguida a suspensão celular foi transferida 250 mL de meio LB contendo canamicina e incubada a 37°C a 250rpm até DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8. Retirou-se uma alíquota da cultura (t_0) e a expressão da proteína foi induzida pela adição de 0,6mM de IPTG, a 37°C por 4 horas (t_4).

Após o tempo de indução as culturas foram centrifugadas a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C, e os *pellets* foram ressuspensos em 30 mL de tampão citrato-fosfato 60mM pH 5,0. A lise das células foi feita por ultra-som a 17% de amplitude por 7 minutos, sendo 10 segundos de sonicação (*ON*) e 10 segundos de repouso (*OFF*). Após a lise, a suspensão foi centrifugada a 4 °C por 20 minutos a 11.500 x g. O *pellet* foi armazenado a -20°C e o sobrenadante da centrifugação analisado por SDS-PAGE 15% (Figura 5.17).

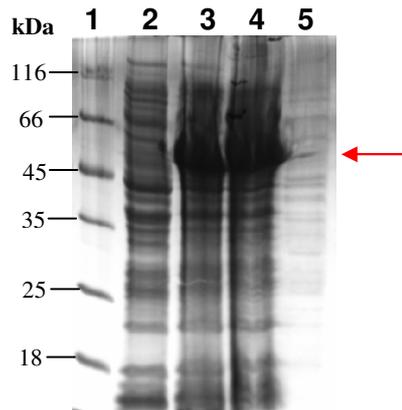


Figura 5.17. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% do meio intracelular da expressão de His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg-BL21(DE3) induzida com 0,6mM de IPTG à 37°C por 4 horas. **1**: marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2**: t_0 – antes da indução; **3**: t_4 – após 4 horas de indução; **4**: pellet t_4 após lise; **5**: sobrenadante lise. A seta indica a expressão da proteína em fusão His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg (48,2kDa).

Através do gel SDS-PAGE verificou-se uma forte banda de expressão após 4 horas de indução com IPTG quando comparamos o componente intracelular antes da indução (t_0). Esta banda encontra-se no tamanho esperado para a proteína em fusão His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg, que tem o seu tamanho estimado em 48,2kDa (34,6kDa correspondente à PGase-Lg madura e 13,6kDa referente à fusão His.*tag*-SUMO.*tag*). Porém, como observado no poço 4 (*pellet*), após a lise das células a proteína em fusão continua no *pellet*, não se observando banda de proteína solúvel no sobrenadante (poço 5), então realizamos alguns testes de ruptura da célula por ultrassom.

Antes de continuarmos com alguns experimentos para solubilizar a proteína em fusão, fizemos um ensaio de *Western Blot*, utilizando-se o anticorpo anti-His, para confirmar se a banda a que nos referimos realmente é da proteína em fusão induzida His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg (Figura 5.18).

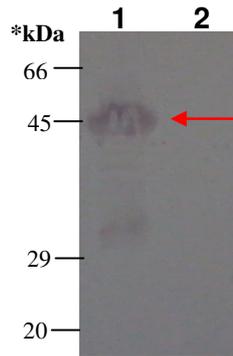


Figura 5.18. Análise por *Western Blot* com anticorpo anti-His. **1**: *pellet* t₄ após lise; **2**: sobrenadante lise. A seta indica a expressão da proteína em fusão His.tag-SUMO.tag-PGase-Lg (48,2kDa), marcada pelo anticorpo anti-His. *Os valores de marcador de peso molecular (preparado com padrões da Sigma[®]) haviam sido marcados na membrana, não sendo possível a visualização das marcações através da foto.

O ensaio de *immunoblotting* (*Western Blot*) comprovou que a proteína em fusão está sendo expressa devido ao reconhecimento da fusão His.tag pelo anticorpo anti-His. Contudo, através deste ensaio também comprovamos que a proteína em fusão His.tag-SUMO.tag-PGase-Lg realmente não está na forma solúvel, pois apesar da sensibilidade da técnica, não observamos nenhuma banda marcada no sobrenadante após a lise.

Diversos parâmetros podem influenciar na expressão e solubilidade de uma proteína recombinante, tais como concentração do indutor, temperatura de indução e método de lise celular. Como discutido acima, apesar de ser visível uma banda de massa esperada para a PGase-Lg em fusão, a proteína está ausente na amostra solúvel do lisado celular, isto é, a proteína está sendo expressa em boa quantidade porém permanecendo na forma insolúvel. Assim, iniciamos o estudo de variação de alguns parâmetros para tentar aumentar a solubilidade da proteína expressa.

Para tentar solubilizar a proteína em fusão expressa testaram-se inicialmente diferentes condições de lise (com menor e maior tempo de lise, menor e maior amplitude, diferentes tempos de sonicação *ON* e *OFF*, diferentes porcentagem de amplitude, com adição de detergentes em diferentes concentrações e com adição de lisozima em diferentes concentrações). Entretanto, em nenhum dos testes obteve-se a proteína em fusão na forma solúvel.

A partir daí, pensamos que a proteína pudesse estar sendo superexpressa, não sendo enovelada corretamente, então resolvemos fazer algumas expressões com diferentes concentrações de IPTG, para testar se, com a expressão da proteína mais lentamente, ela pudesse ser enovelada corretamente. A concentração de IPTG na expressão e solubilidade da PGase-Lg foi avaliada em seis experimentos com diferentes concentrações de IPTG, sendo elas: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; e 0,4mM, testando-se ao final, novamente, várias condições de lise. A proteína foi expressa de maneira crescente conforme houve o aumento da concentração de IPTG, mas também não obtivemos uma proteína solúvel em nenhuma delas.

Para avaliar o efeito da temperatura na expressão da PGase-Lg, a indução da expressão foi feita a 18° C (24 horas), 20° C (20 horas) e 25° C (18 horas), testando-se novamente algumas concentrações de IPTG para cada uma delas, mas não houve mudança significativa na expressão da proteína em fusão quanto à mudança de temperatura. Novamente para nenhuma expressão houve a solubilização da proteína em fusão.

Resolvemos fazer então a transformação da construção pSUMO-PGase-Lg em diferentes linhagens de *E. coli*. Transformou-se a construção pSUMO-PGase-Lg em linhagem BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS, utilizando canamicina e cloranfenicol para ambas. A canamicina confere resistência aos transformantes que contém o plasmídeo pETSUMO e as linhagens BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS são naturalmente resistentes à cloranfenicol, atuando como fator de seleção das linhagens. Além disso, todas as linhagens possuem uma cópia do gene T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac* no seu cromossomo, assim a expressão desta polimerase é induzida pela adição de IPTG.

A linhagem BL21(DE3)pT-GroE possui um plasmídeo (pT-GroE) regulado pelo promotor T7 e é responsável por expressar o complexo de chaperonas GroESL, composto pela GroES e pela GroEL, o qual catalisa o correto enovelamento de novas cadeias polipeptídicas sintetizadas.

Fizemos inicialmente uma expressão a 37°C, com 0,6mM de IPTG por 4 horas. Após o tempo de indução a cultura foi centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C, e o *pellet* ressuspendido em 30 mL de tampão citrato-fosfato 60mM pH 5,0. A lise das células foi feita por ultra-som a 17% de amplitude por 7 minutos, sendo 10 segundos de sonicação (*ON*) e 10 segundos de repouso (*OFF*). Após a

lise, a suspensão foi centrifugada a 4 °C por 20 minutos a 11.500 x g e o sobrenadante foi analisado por SDS-PAGE 15%.

Na expressão em BL21(DE3)pT-GroE já se observam muitas bandas logo no t_0 (antes da indução) e no t_4 (após 4 horas de indução) não se observa o surgimento de uma banda nova referente a proteína em fusão esperada, e sim as mesmas bandas do t_0 mais fortes. Entretanto resolvemos passar o sobrenadante da lise em coluna de afinidade de níquel Ni-NTA, para verificar se haveria alguma ligação da fusão His.tag à resina de níquel, e então separação da proteína em fusão esperada do restante das proteínas expressas pela BL21(DE3)pT-GroE.

Dialisou-se o sobrenadante da lise contra tampão citrato-fosfato 60mM pH 7,0 e aplicou-se 10 mL da amostra dialisada em 1 mL de coluna de níquel previamente equilibrada com o mesmo tampão. Recolheu-se o *void* (fração de proteínas que não se ligam à resina) e lavou-se a coluna (*wash*) com 5 volumes de tampão citrato-fosfato 60mM pH 7,0. Eluiu-se em 2 mL (separadamente eluído 1 e 2) com tampão citrato-fosfato 60mM pH 5,0 contendo 250mM de imidazol. O gel SDS-PAGE 15% que apresenta o resultado da expressão bem como da passagem do lisado em coluna de níquel está apresentado na Figura 5.19.

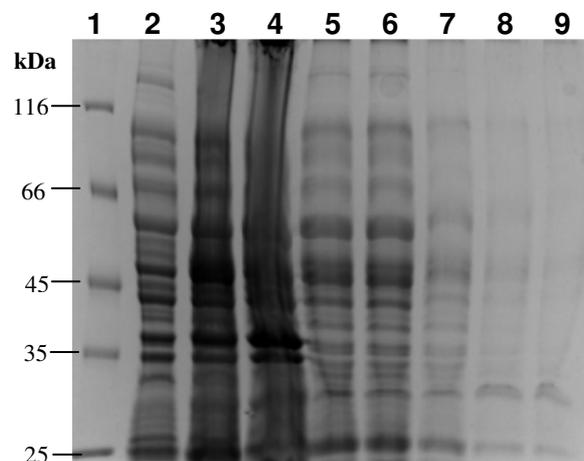


Figura 5.19. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da expressão de His.tag-SUMO.tag-PGase-Lg-BL21(DE3)pT-GroE induzida com 0,6mM de IPTG à 37°C por 4 horas. **1:** marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2:** t_0 – antes da indução; **3:** t_4 – após 4 horas de indução; **4:** *pellet* t_4 após lise; **5:** sobrenadante lise; **6:** *void*; **7:** *wash*; **8:** eluído 1; **9:** eluído 2.

Não se observa a ligação de proteína com a resina de níquel, mostrando que a proteína em fusão esperada não se encontrava no sobrenadante, e talvez nem

tenha sido expressa nesta linhagem de *E. coli*, pois já não havíamos visto uma banda de expressão após indução. Realizamos novamente alguns ensaios de expressão e solubilidade, mas não se observou em nenhum caso banda de expressão da proteína em fusão nessa linhagem. Passamos então para a expressão em linhagem Rosetta(DE3)pLysS.

O diferencial da linhagem Rosetta(DE3)pLysS é que ela foi modificada com relação à BL21(DE3) para aumentar a expressão de proteínas de eucariotos que contenha códons raros e além disso a presença do plasmídeo pLysS suprime a expressão basal de T7 RNA polimerase antes da indução com IPTG. Para essa linhagem, a proteína foi bastante expressa como em BL21(DE3), mas novamente a proteína foi expressa como corpos de inclusão e mesmo após alguns ensaios de expressão e solubilidade, estes se mostraram ineficientes na solubilidade da proteína em fusão expressa para essa linhagem.

Após a construção pSUMO-PGase-Lg ser transformada em diferentes cepas de *E. coli*, e realizados vários ensaios de expressão e solubilidade que se mostraram ineficientes na solubilidade da proteína em fusão expressa, realizou-se o *refolding* da rPGase-Lg em fusão expressa.

Re-enovelamento da PGase-Lg em fusão expressa em *E.coli* - Após vários testes na tentativa de solubilizar a proteína em fusão expressa em *E. coli*, a proteína encontrou-se principalmente em corpos de inclusão, porém passível de recuperação através da desnaturação utilizando agentes caotrópicos (*refolding*).

O *pellet* celular da expressão em BL21(DE3) a 37°C induzida com 0,6mM de IPTG foi lavado 3 vezes com tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 e centrifugado a 11.500 x g, a 4°C por 15 minutos. O *pellet* celular foi solubilizado em tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 contendo 6M de uréia, incubado à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado a 11.500 x g, 4°C por 15 minutos. Aplicou-se em coluna de 3 mL de níquel Ni-NTA, previamente equilibrada com o mesmo tampão e recolheu-se as frações que não se ligam à coluna (*void*). Lavou-se a coluna com 5 volumes de tampão com 6M de uréia (*wash*) e eluíu-se em 2 volumes de tampão citrato-fosfato 60mM pH 8,0 com 6M de uréia e 250mM de imidazol. Prosseguiu-se então com o procedimento de re-enovelamento como descrito no tópico 4.3.4.3. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% (Figura 5.20).

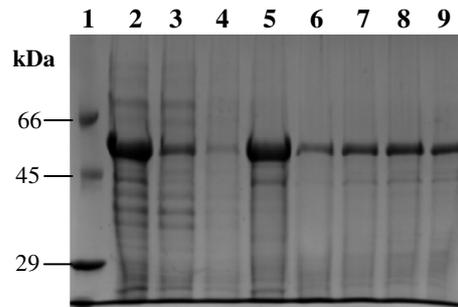


Figura 5.20. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da expressão e purificação em resina de níquel do *refolding* da proteína em fusão His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg. **1**: marcador de peso molecular (preparado com padrões da Sigma[®]); **2**: pré-coluna; **3**: *void*; **4**: *wash*; **5**: amostra eluída com 250mM de imidazole em citrato-fosfato 60mM pH 8,0 com 6M de uréia; **6 a 9**: amostras com 4, 3, 2 e 1M de uréia, respectivamente.

Apesar do *refolding* da proteína em fusão ter sido realizado com sucesso, sendo a proteína obtida na forma solúvel, esta não apresentou atividade PGase, mostrando que o seu enovelamento pode não ter ocorrido de maneira correta ou ainda que a proteína em fusão expressa pela *E. coli* não sofre as modificações pós-traducionais que necessita para possuir atividade enzimática.

A predição dos sítios de N- e O- glicosilações foi realizada utilizando os *softwares online* NetOGlyc 3.1 (JULENIUS *et al.*, 2004; Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>>) e o NetNGlyc 1.0 (Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>>). A proteína madura rPGase-Lg apresenta 3 possíveis sítios de N-glicosilação (¹⁸⁷NLTI¹⁹⁰, ²⁶⁶NITY²⁶⁹ e ³³⁶NWSN³³⁹) e 1 possível sítio de O-glicosilação (²⁶⁰Thr), como pode ser verificado na Figura 5.21.

```

G T I N S M A D V A A V A C T T V N L N S F Q V P A G Q T L A L K L L T G T T V N M N
G D I T F A H E N W A G P L F Q I S G S S I T F N G N G H T F D G N G P L Y W D G L G
G N G G V T K P A P M M K I S M S G T F S N V K V L N S P A R T Y S V S N P A P L V
M D G L T I D N S L G D Q P N S N S N G L A A G H N T D G F D A S T E N L T I Q N S V
I M N Q D D C L A I N R G A N I V F K N N H C S G G H G I S V G S I N S G V T V N G I
T I T G N T I T N N D Q A L R I K T D A A A I G S T V T N I T Y S G N T A T G C K R F G V
I I D Q S Y P S T I G T P G S G V L L S A V N F V S P Q T S I T V N S G A E R V A V N C
G V G S C T G T W N W S N L K V S G G T T G K I T N F N G I T G F S Q

```

Figura 5.21. Sequência de resíduos de aminoácidos da PGase-Lg (SCHIØTT *et al.*, 2010). Os resíduos de aminoácidos destacados em verde indicam possíveis sítios de N-glicosilação e o destacado em vermelho possível sítio de O-glicosilação.

5.6 Clonagem do gene PGase-Lg e Expressão da enzima rPGase-Lg em *Pichia pastoris*

5.6.1 Construção do clone pICZ α A-PGase-Lg

Como organismo eucarioto, a levedura *Pichia pastoris* apresenta vantagens como hospedeira para expressão heteróloga, proporcionando processamento, enovelamento e modificações pós traducionais apropriadas para produzir proteínas ativas originadas de organismos eucariotos, incluindo os eucariotos superiores. A *Pichia pastoris* é fácil de manipular e é capaz de produzir grandes quantidades de proteína em relação a outros hospedeiros eucariotos, além de apresentar opções com sistemas que secretam as proteínas recombinantes, facilitando a purificação.

Após a digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI* e da purificação da ORF codificante da PGase e do vetor pPICZ α A, ambos duplamente digeridos, as amostras foram quantificadas e visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5.22).

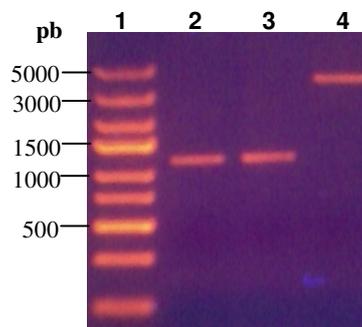


Figura 5.22. Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação da digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI*. **1**: marcador de peso molecular (SM1563 - Thermo Scientific); **2 e 3**: ORF da PGase-Lg digerida (1049 pb); **4**: pPICZ α A digerido (3543 pb).

Observa-se no gel bandas de tamanhos esperados para a ORF da PGase-Lg e para o vetor digeridos, sendo estas amostras utilizadas na reação de ligação. A reação de ligação foi mantida por 16 horas a 16°C, e o produto da ligação foi transformado em células de *E. coli* DH5 α competentes, semeando-se as células transformadas em meio LB *low salt* com 25 μ g.mL⁻¹ de zeocina. Das colônias crescidas, escolheu-se 5 colônias isoladas e inoculou-se em 5 mL de meio LB *low salt* contendo 25 μ g.mL⁻¹ de zeocina. Deixou-se por 16 horas a 37°C a 250 rpm.

O DNA plasmidial foi extraído e analisado por gel de agarose 1%. Para confirmar a clonagem, os DNAs plasmidiais foram usados como molde em PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores com sítios de *EcoRI* e *NotI* para amplificação do gene da PGase-Lg, e analisou-se o resultado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5.23).

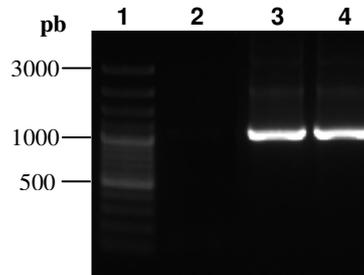


Figura 5.23. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do pPICZ α A-PGase. **1**: marcador de peso molecular (SM1143 - Thermo Scientific); **2**: controle negativo; **3** e **4**: produtos de 1058 pb da amplificação da ORF da PGase-Lg.

Nota-se através do gel de agarose a amplificação do gene da PGase-Lg, mostrando bandas de tamanho 1058pb, tamanho esperado da amplificação do inserto da PGase-Lg contendo as regiões dos sítios de restrição de *EcoRI* e *NotI* e do sítio de trombina, confirmando assim a clonagem e a transformação em DH5 α do pPICZ α A-PGase-Lg. Na Figura 5.24 está uma representação esquemática para esta construção denominada pPICz α A-PGase-Lg.

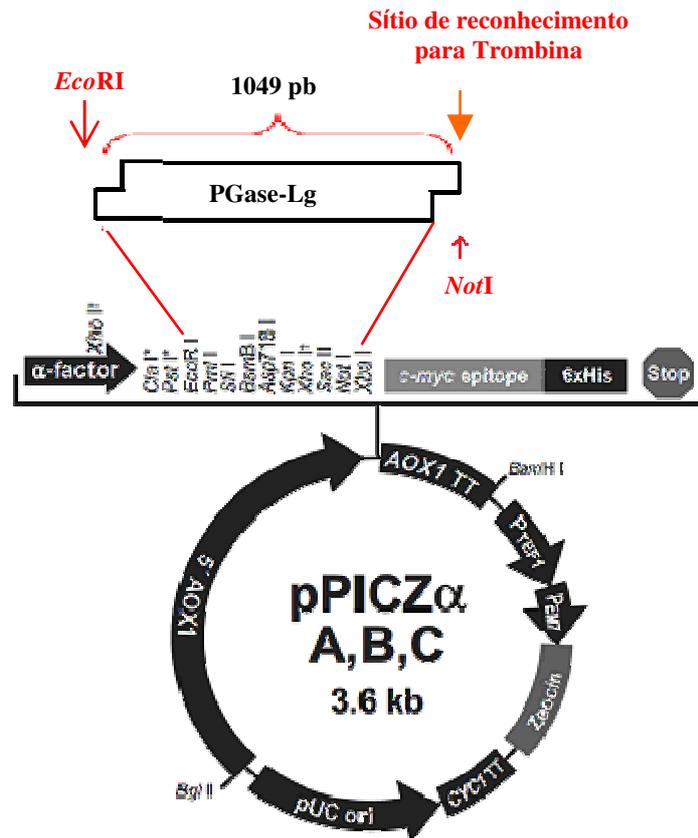


FIGURA 5.24: Representação esquemática para a construção do clone com o gene PGase no vetor pPICzαA (pPICzαA-PGase (4592 pb)).

Um clone positivo da amplificação da construção pPICzαA-PGase-Lg foi submetido ao sequenciamento automático para verificação da integridade do inserto e da junção vetor:inserto. Para o sequenciamento, utilizou-se o oligonucleotídeo 5'AOX1 (*forward*) do vetor pPICzαA e o oligonucleotídeo *reverse* da PGase-Lg com o sítio de restrição da enzima *NotI*.

O produto do sequenciamento foi analisado pelo alinhamento mediante banco de dados usando o BLAST nucleotídeos e o alinhamento da sequência de nucleotídeos de pPICzαA-PGase-Lg apresentou 93% de identidade com a sequência do mRNA da poligalacturonase de *Leucoagaricus gongylophorus*, utilizada como molde para o desenho dos oligonucleotídeos.

5.6.2 Linearização e precipitação do pPICZ α A-PGase-Lg

Digeriu-se 15 μ g do DNA plasmidial pPICZ α A-PGase-Lg com a enzima *SacI* por 6 horas a 37°C e aplicou-se uma alíquota da digestão em gel de agarose 1% (Figura 5.25).

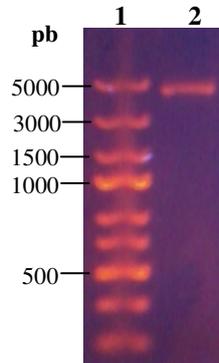


Figura 5.25. Eletroforese em gel de agarose 1% do pPICZ α A-PGase-Lg linearizado com *SacI*. **1**: marcador de peso molecular (SM1563 - Thermo Scientific); **2**: pPICZ α A-PGase-Lg digerido (4592pb).

O gel apresentou banda única no tamanho esperado para a construção pPICZ α A-PGase-Lg linearizada de 4592pb, confirmando a completa linearização e tamanho esperado da construção. Após confirmação da linearização da construção pPICZ α A-PGase-Lg fez-se uma precipitação de DNA plasmidial usando-se acetato de sódio e etanol e ressuspendeu-se o DNA precipitado em 10 μ L de água ultrapura autoclavada.

O DNA precipitado e ressuspendido (pPICZ α A-PGase-Lg) foi utilizado para transformar células de *Pichia pastoris* KM71H eletrocompetente. As células transformadas foram semeadas em 4 diluições diferentes de transformantes (25, 50, 75 e 150 μ l) em placas de YPDS contendo 100 μ g.mL⁻¹ de zeocina. Passados 3 dias, as colônias transformantes foram analisadas quanto a recombinação.

5.6.3 Análise e seleção de recombinantes

Extraiu-se o DNA genômico de 6 colônias transformantes obtidas e analisou-se os DNAs extraídos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5.26).

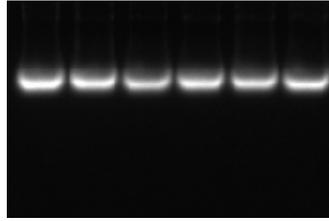


Figura 5.26. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico extraído de 6 colônias transformantes em KM71H.

O gel apresentou DNAs genômicos íntegros e sem contaminação. Para confirmar a recombinação da construção pPICZ α A-PGase-Lg no genoma de *P. pastoris* KM71H, os DNAs genômicos foram usados como molde em PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos com sítios de *Eco*RI e *Not*I para amplificação da PGase-Lg, e analisou-se o resultado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5.27).

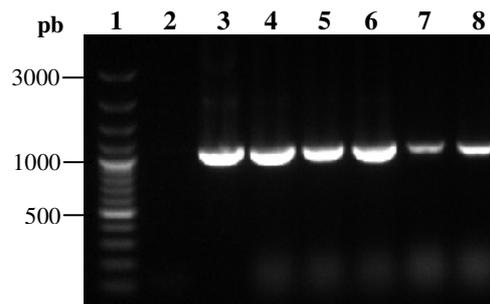


Figura 5.27. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do DNA genômico de pPICZ α A-PGase-Lg. **1:** marcador de peso molecular (SM1153 - Thermo Scientific); **2:** controle negativo; **3 a 8:** produtos de 1058 pb da amplificação por PCR.

Preparou-se placas com 25 mL de meio YPD contendo $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina e estriou-se separadamente 16 colônias isoladas das placas de YPD contendo $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina. Passados 2 dias a 30°C algumas colônias semeadas cresceram em meio contendo $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina, o que confirma a presença do vetor pPICZ α A, que é resistente a este antibiótico. Passamos então diretamente para os ensaios de expressão selecionando para isso as colônias que mais cresceram em $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina, que correspondem às cepas com maior número de transformantes pPICZ α A-PGase-Lg.

5.6.4 Expressão em *Pichia pastoris*

Expressão da rPGase-Lg em pequena escala - Inoculou-se 4 colônias isoladas de pPICZ α A-PGase-Lg em meio BMGY e 1 colônia de *Pichia pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZ α A como controle. Após a fase *log* de crescimento, centrifugou-se as culturas e ressuspendeu-se os *pellets* celulares em meio BMMY, adicionando-se metanol a cada 24 horas para manter a indução. As alíquotas retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados em SDS-PAGE 15%.

Para a proteína expressa neste sistema sabemos que a massa molecular esperada é de 41,1 kDa, correspondente à soma das massa da fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag* (6,5 kDa) e da PGase-Lg madura (34,6 kDa). Na figura 5.28 podemos verificar que a expressão após 48 e 72 horas de indução apresenta uma banda em torno de 45 kDa que corresponde a proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg secretada pela *P. pastoris*.

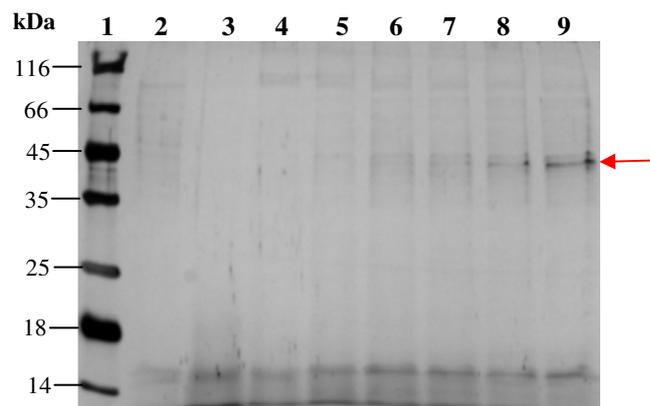


Figura 5.28. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% dos sobrenadantes da expressão em KM71H induzida por metanol à 30°C. **1:** marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2:** t₁₄₄ controle (após 144 horas de indução do controle pPICZ α A-KM71H); **3 a 9:** expressão da proteína de fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg (t₀-t₁₄₄ horas respectivamente).

Observa-se no gel SDS-PAGE a presença de 2 bandas muito próximas de expressão da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg, o que pode se justificar como sendo 2 padrões diferentes de glicosilação da proteína. Essas amostras foram avaliadas em relação à atividade PGase e notou-se que a maior atividade ocorreu para o t₁₄₄ horas de expressão, onde também se observou banda

mais intensa no gel. Então para a expressão em grande escala seguiu-se com a indução até 144 horas.

Expressão da rPGase-Lg em larga escala - Inoculou-se em meio BMGY 1 colônia isolada de pPICZ α A-PGase-Lg da placa de YPD com 1000 μ g.mL⁻¹ de zeocina pré-selecionada como a melhor produtora na expressão em pequena escala, e novamente 1 colônia de *Pichia pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZ α A como controle. Após a fase *log* de crescimento, substituiu-se o meio BMGY por meio BMMY, adicionando-se metanol a cada 24 horas para manter a indução. As alíquotas retiradas foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados em SDS-PAGE 15% (Figura 5.29).

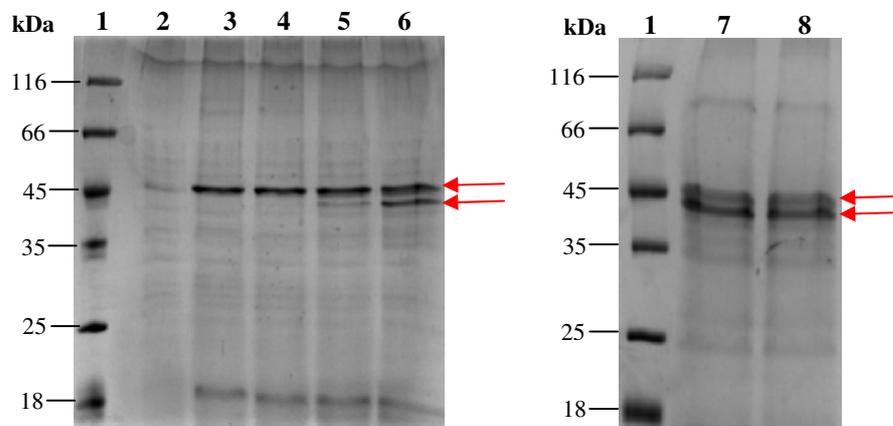


Figura 5.29. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% de 20 μ L dos sobrenadantes da expressão em KM71H induzida por metanol à 30°C por 144 horas. **1**: marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2 a 8**: expressão extracelular da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg (t_0 a t_{144} horas respectivamente). As setas vermelhas indicam as proteínas em fusão expressas.

Na figura 5.29 podemos verificar que há a expressão de uma proteína em 45kDa com 24 horas de expressão e que a segunda banda bem próxima começa a aparecer com 72 horas de expressão. Na análise do gel da expressão em pequena escala, sugerimos que as duas bandas bem próximas pudessem se referir à diferentes padrões de glicosilação da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg. Os sobrenadantes foram avaliados em relação à atividade PGase e notou-se que a atividade aumenta com o passar do tempo de indução, sendo que a maior atividade ocorreu novamente para o t_{144} horas de expressão, onde a banda de menor tamanho aparece mais intensa no gel SDS-PAGE. A Figura 5.30 apresenta

um gráfico mostrando um aumento linear da atividade da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag-His.tag-PGase-Lg* em função do tempo de indução.

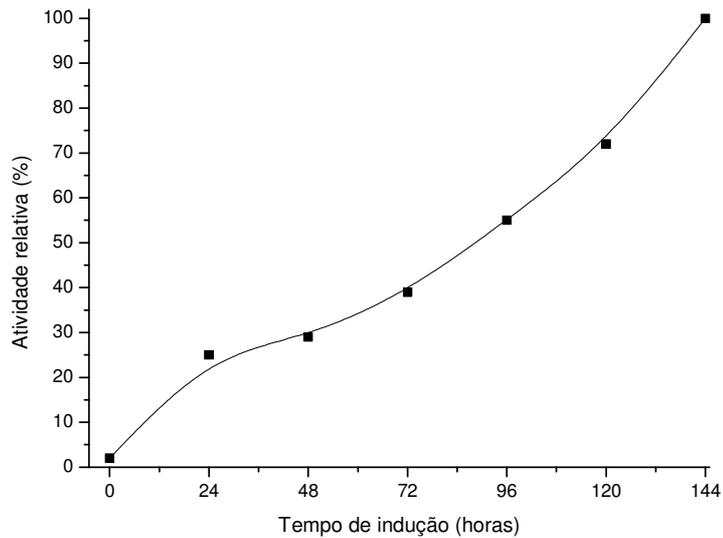


Figura 5.30. Gráfico de atividade relativa *versus* tempo de indução da expressão extracelular da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag-His.tag-PGase-Lg* (t_0 a t_{144} horas).

Essas amostras foram submetidas a um ensaio de *Western Blot* com anticorpo anti-His para detectar se a banda em torno de 45kDa realmente corresponde à proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag-His.tag-PGase-Lg* e qual das duas proteínas serão reconhecidas pelo anti-His (Figura 5.31).



Figura 5.31. Análise por *Western Blot* com anticorpo anti-His. **1**: marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2 a 8**: expressão extracelular da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag-His.tag-PGase-Lg* (t_0 a t_{144} horas respectivamente). A seta vermelha indica a expressão da proteína em fusão His.*tag-SUMO.tag-PGase-Lg* marcada pelo anticorpo anti-His.

Como observado no *immunoblotting*, somente a banda de menor tamanho foi marcada pelo anticorpo anti-His, o que comprova a expressão da proteína em fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg. Contudo o *immunoblotting* marcou muito fracamente a banda de menor tamanho, então o fato de não ter marcado a banda muito próxima de maior tamanho não descarta o fato de poder haver padrões diferentes de glicosilação para a mesma proteína em fusão expressa.

Um volume de 30 mL do sobrenadante t_{144} horas contendo a proteína recombinante em fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg expressa (pré coluna) foi aplicado em uma coluna de 5mL de níquel Ni-NTA previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,5. Coletou-se o *void*, fração das proteínas que não se ligam na coluna e lavou-se a resina com 20 mL de tampão PBS pH 7,5 com 10mM de imidazol (*wash*). A eluição da proteína foi feita com tampão citrato-fosfato 60mM pH 5,0 com 250mM de imidazol. Através do gel SDS-PAGE 15% das amostras eluídas do níquel (Figura 5.32), observa-se ainda a presença das duas bandas bem próximas, comprovando que ambas as proteínas possuem His.*tag*, o que apóia nossa idéia de padrões de glicosilação.

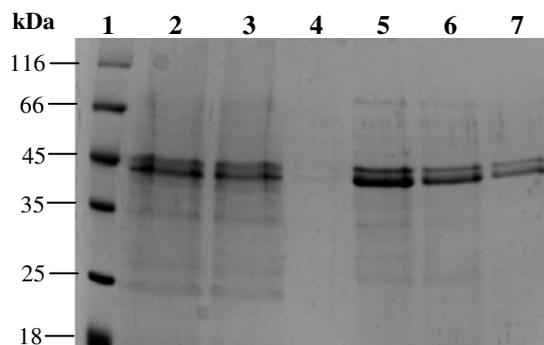


Figura 5.32. Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da purificação na coluna de níquel da proteína de fusão *c-myc* epitopo.*tag*-His.*tag*-PGase-Lg. **1:** marcador de peso molecular (26610 - Thermo Scientific); **2:** pré-coluna; **3:** *void*; **4:** *wash*; **5-7:** amostras eluídas com imidazol.

As frações eluídas com imidazol da resina de níquel foram reunidas e testadas para atividade PGase tendo como substrato o ácido poligalacturônico. Observou-se que a solução eluída da coluna apresenta uma atividade de $0,23 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Tem sido descrito na literatura (Caprari *et al*, 1993) diferentes PGases expressas a partir de um único gene. Por exemplo, é descrito um único gene

codificando PGase para o fungo patogênico *Fusarium moniliforme* com a produção de quatro endo-poligalacturonases que diferem na glicosilação. As diferenças no número de sítios de glicosilação e/ou diferentes níveis de ramificações em cada sítio podem ser responsáveis pelo diferente comportamento das quatro formas observadas. Estruturas glicosil específicas são, em alguns casos, importante para o direcionamento de proteínas ou para funções biológicas (Caprari *et al*, 1993).

A expressão de PGase em bactérias, onde não ocorre glicosilação, pode elucidar se a poligalacturonase precisa da cadeia de carboidrato para a atividade enzimática, bem como se as porções glicosídicas são importantes para a estabilidade da proteína. E por outro lado, a expressão de PGase em leveduras, onde pode ocorrer hiperglicosilação, pode elucidar se as porções glicosídicas são importantes para a determinação da atividade da enzima induzida.

Neste trabalho observamos que o sistema procarioto de expressão de PGase não foi bem sucedido, tendo sido obtido a enzima não ativa. Uma vez que a *E. coli* não possui o maquinário para fazer as modificações pós-traducionais eficientes podemos sugerir que a carência de atividade da enzima expressa é ocasionada pela falta de glicosilação. No sistema de expressão em levedura, que pode levar à hiperglicosilação, observamos a expressão de duas PGases provavelmente com diferentes conteúdos de glicosilação. Ainda não foi possível associar a instabilidade da PGase expressa em *P. pastoris* com os diferentes padrões de glicosilação e estudos devem ser realizados para uma melhor caracterização enzimática da enzima obtida nesse sistema.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, determinou-se atividade poligalacturonase sobre ácido poligalacturônico no extrato bruto do meio de cultivo do fungo, comprovando assim sua excreção para o meio. A purificação da PGase-Lg através de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia em uma coluna de exclusão molecular apresentou bom grau de pureza, com um bom perfil cromatográfico, com picos separados contendo atividade poligalacturonase. Notou-se que a maior atividade está restrita à poucas frações, o que comprova a eficiência do método utilizado. A PGase-Lg nativa foi caracterizada sob o ponto de vista cinético e a temperatura e pH ótimos foram determinados assim como os parâmetros de Michaelis-Menten (K_M e $V_{m\acute{a}x}$).

Foi construída com sucesso uma biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* e um total de 816 clones da biblioteca foram seqüenciados. O sequenciamento da biblioteca de *L. gongylophorus* permitiu a identificação de algumas enzimas envolvidas com a degradação da parede celular vegetal, algumas dessas já em fase de clonagem e expressão em nosso laboratório. No entanto não foram encontrados ORFs relacionados à pectinases. Assim para a obtenção de uma pectinase recombinante de *L. gongylophorus* foi utilizada uma sequencia depositada em banco de dados.

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do gene da PGase cuja sequência está depositada no NCBI. Estes iniciadores foram desenhados já com os sítios de clivagens das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, respeitando a fase de leitura com relação ao vetor pETSUMO (para expressão em *E. coli*), e com os sítios das enzimas *EcoRI* e *NotI*, respeitando a fase de leitura com relação ao vetor pPICZ α A (para expressão em *P. pastoris*). Obteve-se sucesso na obtenção da ORF da PGase, com a utilização dos 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

A transformação em *E. coli* da construção pETSUMO-PGase-Lg foi obtida e experimentos de expressão foram feitos, obtendo-se grande expressão da proteína em fusão His.*tag*-SUMO.*tag*-PGase-Lg. Entretanto, vários ensaios de expressão e solubilidade se mostraram ineficientes na solubilidade da proteína em fusão expressa. Realizou-se com sucesso o *refolding* da proteína em fusão, sendo a proteína obtida na forma solúvel, porém esta não apresentou atividade PGase, mostrando que o seu enovelamento pode não ter ocorrido de maneira correta ou

ainda que a proteína em fusão expressa pela *E. coli* não sofre as modificações pós-traducionais que necessita para possuir atividade enzimática.

Foi feita a transformação da construção pPICZ α A-PGase-Lg em *P. pastoris*, sendo confirmada por extração de DNA genômico e PCR. A extração de DNA genômico e a PCR para a confirmação da construção pPICZ α A-PGase-Lg seguiram metodologias confiáveis e de rotina de nosso laboratório, e apresentaram bandas de produto de PCR no tamanho esperado para a amplificação do gene de interesse. Confirmamos também a recombinação em *P. pastoris* através da seleção de clones em placas contendo altas concentrações de zeocina.

Foi desenvolvido protocolo de expressão heteróloga por *P. pastoris* da enzima poligalacturonase de *L. gongylophorus*, e os ensaios mostrados neste trabalho envolvendo a expressão da enzima recombinante para o meio extracelular foram bem sucedidos e a enzima se mostrou ativa em ensaios qualitativos de atividade enzimática. A expressão recombinante da PGase de *L. gongylophorus* realizada neste trabalho permitiu a realização de ensaios de purificação. Foi comprovado com os estudos de expressão em *E. coli* e *P. pastoris* neste trabalho, que a glicosilação da proteína é importante para a função enzimática da proteína rPGase-Lg.

Com o desenvolvimento do protocolo de expressão heteróloga para a enzima poligalacturonase de *L. gongylophorus*, se abre caminho para estudos que envolvam a caracterização enzimática, determinação de estrutura, mutação sítio dirigida e estudos de imobilização e inibição de atividade enzimática.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Os resultados apresentados demonstraram que a biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* simbiote de formigas cortadeiras pode ser uma boa estratégia para a obtenção de sequências de enzimas envolvidas na degradação de parede celular vegetal. Tais resultados sugerem que diversos estudos podem vir a complementar e gerar avanços no trabalho desenvolvido, visando estudos das enzimas envolvidas na simbiose no sentido de controlar a ação danosa das formigas cortadeiras. Alguns desses estudos são listados a seguir.

- Caracterização cinética da PGase de *L. gongylophorus*.
- O estudo de variantes estruturais da PGase estudada neste trabalho poderia contribuir para o melhor entendimento das porções moleculares responsáveis por sua interação com o substrato e por seus efeitos. A obtenção recombinante de versões estruturalmente diferentes da PGase-Lg poderia ser de interesse em projetos futuros em nosso grupo de pesquisa.
- Métodos experimentais, como RMN e cristalografia, seriam ótima opção para a determinação da estrutura da PGase-Lg. A técnica de espectrometria de massas poderia auxiliar no estudo de glicosilação da enzima. Tais estudos forneceriam valiosas informações sobre características de interações de PGase-Lg ao substrato.
- Construção de novas bibliotecas de cDNA do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, seqüenciamento e comparação dos transcriptomas induzidos para diferentes indutores, podendo fornecer informações importantes sobre a expressão da enzima frente a esses diferentes substratos.
- A produção recombinante da PGase também possibilita futuros ensaios de termo-estabilidade e de mutação sítio dirigida, objetivando a aplicabilidade da enzima na busca de inibidores.
- Com o desenvolvimento do protocolo de expressão heteróloga para a enzima PGase de *Leucoagaricus gongylophorus*, se abre caminho para estudos que envolvem a caracterização enzimática, determinação de estrutura, mutação sítio dirigida de sítios de glicosilação e estudos de imobilização e inibição de atividade enzimática.

8. REFERÊNCIAS

- ADALBERTO, P. R., SANTOS, F. J. DOS, GOLFETO, C. C., IEMMA, M. R. C., SOUZA, D. H. F. & CASS, Q. B. "Immobilization of pectinase from *Leucoagaricus gongylophorus* on magnetic particles". *Analyst*, **137**: 4855-4859, 2012.
- ALBERSHEIM, P. "Pectin lyase from fungi". IN: *Methods in Enzymology*. COLOWIC, S. P (Ed.). New York, Academic Press, 1966. p. 628-631. vol. 8.
- ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A. & DUCHIRON, F. "Yeasts: An attractive source of pectinases-From gene expression to potential applications: A review". *Process Biochemistry*, **46**: 1525–1537, 2011.
- AMINZADEH, S.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; RANJBAR, B. & FARROKHI, N. "Characterization of Acid-Induced Partially Folded Conformation Resembling a Molten Globule State of Polygalacturonase from a Filamentous Fungus *Tetracoccusporium* sp.". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**: 1921, 2010.
- ATKINS, S. D. & CLARK, I. M. "Fungal molecular diagnostics: a mini review". *Journal of Applied Genetics*, **45**(1):3, 2004.
- AYLWARD, F. O., BURNUM-JOHNSON, K. E., TRINGE, S. G., TEILING, C., TREMMEL, D. M., MOELLER, J. A., SCOTT, J. J., BARRY, K. W., PIEHOWSKI, P. D., NICORA, C. D., MALFATTI, S. A., MONROE, M. E., PURVINE, S. O., GOODWIN, L. A., SMITH, R. D., WEINSTOCK, G. M., GERARDO, N. M., SUEN, G., LIPTON, M. S. & CURRIE, C. R. "*Leucoagaricus gongylophorus* Produces Diverse Enzymes for the Degradation of Recalcitrant Plant Polymers in Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens". *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(12): 3770, 2013.
- BARKE, J.; SEIPKE, R.F.; GRÜSCHOW, S.; HEAVENS, D.; DROU, N.; BIBB, M.J.; GOSS, R.J.M.; YU, D.W. & HUTCHINGS, M.I. "A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*". *BMC Microbiology*, **8**(109): 1, 2010.
- BATISTA-PEREIRA, L. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C. & CORRÊA, A. G. "Electrophysiological Responses of *Atta sexdens rubropilosa* Workers to Essential Oils of *Eucalyptus* and its Chemical Composition". *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C-A JOURNAL OF BIOSCIENCES*. Tübingen, **61**(c): 749, 2006.
- BERNFELD, P.. "Amylases, α e β ". IN: *Methods in Enzymology*. COLOWIC, S. P (Ed.). New York, Academic Press, 1955. p. 149-158. vol. 1.
- BLANCO, P.; THOW, G.; SIMPSON, C.G; VILLA, T.G. & WILLIAMSON, B. "Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*". *FEMS Microbiology Letters*, **210**: 187-191, 2002.
- BOARETTO, M. A. C. & FORTI, L. C. "Perspectivas no controle de formigas cortadeiras". *Série Técnica IPEF*, **11**(30): 31, 1997.
- BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding". *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2):248, 1976.

- CANTERI, M. H. G, MORENO, L., WOSIACKI, G. & SCHEER, A. P. "Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final". *Polímeros*, **22**(2):149, 2012.
- CAPRARI, C.; BERGMANN, C.; MIGHELI, Q.; SALVI, G.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A; CERVONE, F. & DE LORENZO, G. "*Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **43**: 453, 1993.
- CARRA, A.; GAMBINO, G. & SCHUBERT, A. "A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues". *Analytical Biochemistry*, **360**(2):318, 2007.
- CARRINGTON, C. M. S.; GREVE, C. & LABAVITCH, J. M. "Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit. VI. Effect of the Antisense Polygalacturonase Gene on Cell Wall Changes Accompanying Ripening in Transgenic Tomatoes". *Plant Physiology*, **103**(2): 429, 1993.
- CELESTINO, S. M. C, FREITAS, S. M. de, MEDRANO, F. J., SOUSA, M. V. de & FILHO, E. X. F. "Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties". *Journal of Biotechnology*, **123**: 33, 2006.
- CHERRETT, J.M. "History of the leaf-cutting ant problems". IN: *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. LOFGREN, C. C. & VANDER MEER, R. K. (Eds.). Londres, Boulder and London Westview Press, 1986b. p. 10-17.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytical Biochemistry*, **162**(1): 156-159, 1987.
- CORRENT, A. R. *Expressão diferencial de cDNAs de maçãs cv. fuji em resposta à inoculação com os fungos Botryosphaeria dothidea e Penicillium expansum e o tratamento térmico em pós-colheita*. Porto Alegre, Programa de pós-graduação em Fitotecnia – UFRGS, 2007. Tese de doutorado, 154 p.
- DA SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. "Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits". *FEMS Yeast Res.*, **5**(9): 859, 2005.
- DAMÁSIO, A. R. de L.; DA SILVA, T. M; MALLER, A. JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F. & POLIZELI, M. L. T. M. "Purification and Partial Characterization of an Exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* Liquid Cultures". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**:1496, 2010.
- EASTWOOD, D. C.; KINGSNORTH, C. S.; JONES, H. E. & BURTON, K. S. "Genes with increased transcript levels following harvest of the sporophore of *Agaricus bisporus* have multiple physiological roles". *Mycological Research*, **105**(10): 1223, 2001.
- ERTHAL, JR., SILVA, C. P., SAMUELS, R. I. "Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization". *Journal of Insect Physiology*, Elsevier Science, **50**: 881, 2004.
- EWING, B. & GREEN, P. "Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities". *Genome Research*, **8**(3): 186, 1998.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C. & GREEN, P. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment". *Genome Research*, **8**(3): 175, 1998.

- GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M. & BELARBI, A. "DETECTION OF POLYGALACTURONASE, PECTIN-LYASE AND PECTIN-ESTERASE ACTIVITIES IN A SACCHAROMYCES-CEREVISIAE STRAIN". *Yeast*, **10**(10): 1311, 1994.
- GOMES, I. A. C. *Expressão de Genes de Enzimas Envolvidas no Adoçamento de Tubérculos de Batata*. Pelotas, Programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal – UFPel, 2008. Tese de doutorado, 83 p.
- GUO, Y., RIBEIRO, J. M. C., ANDERSON, J. M. & BOUR, S. "dCAS: a desktop application for cDNA sequence annotation". *Bioinformatics*, **25**(9): 1195, 2009.
- HASHIMOTO, W.; KOBAYASHI, E.; NANKAI, H.; SATO, N.; MIYA, T.; KAWAI, S. & MURATA, K. "Unsaturated Glucuronyl Hydrolase of *Bacillus* sp. GL1: Novel Enzyme Prerequisite for Metabolism of Unsaturated Oligosaccharides Produced by Polysaccharide Lyases". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **368**(2): 367, 1999.
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. "Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining". *Electrophoresis*, **6**: 103-112, 1985.
- HUANG, X. & MADAN, A. "CAP3: A DNA sequence assembly program". *Genome Research*, **9**(9): 868, 1999.
- ILMEN, M., SALOHEIMO, A., ONNELA, M.L. & PENTTILA, M. E. "Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*". *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(4): 1298, 1997.
- JULENIUS, K.; MOLGAARD, A.; GUPTA, R. & BRUNAK, S. "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites". *Glycobiology*, **15**(2): 153, 2004.
- LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **227**(5259): 680-685, 1970.
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society*, **56**(3): 658, 1934.
- MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; BINNECK, E.; PESKE, S. T. "PROSPECÇÃO DE GENES EM BIBLIOTECAS DE cDNA". *Revista Brasileira de Agrociência*, **12**(1): 07, 2006.
- MARTIN, M. M. & WEBER, N. A. "Cellulose-Utilizing Capability of Fungus Cultured by Attine Ant *Atta Colombica* Tonsipes". *Annals of the Entomological Society of America*, **62**(6):1386, 1969.
- MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G. & ABBOT, P. "Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS*, **103**(28): 10702, 2006.
- MILLER, G. L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry*, **31**(3): 426, 1959.
- MOLINA, A. L. & TOBO, P. R. "Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico". *Revista Einstein*, **2**(2):139, 2004.

- NAKARI-SETALA, T., PALOHEIMO, M., KALLIO, J., VEHEMAANPERA, J., PENTTILA, M. & SALOHEIMO, M. "Genetic Modification of Carbon Catabolite Repression in *Trichoderma reesei* for Improved Protein Production". *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(14): 4853, 2009.
- NEDJMA, M., HOFFMANN N. & BELARBI, A. "Selective and Sensitive Detection of Pectin Lyase Activity Using a Colorimetric Test: Application to the Screening of Microorganisms Possessing Pectin Lyase Activity". *Analytical Biochemistry*, **291**(2):290, 2001.
- NELSON, D. L. & COX, M. M.. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4^a ed., FREEMAN, W.H. (Ed.). Ed. Sarvier, 2005.
- NELSON, D. L. & COX, M. M.. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 5^a ed., FREEMAN, W.H. (Ed.). Ed. Sarvier, 2011.
- OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B. & JARDIM, S. N. *Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*. São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 43 p.
- PAGNOCCA, F. C., BACCI JR, M., FUNGARO, M. H., BUENO, O. C., HEBLING, M. J., SANT'ANNA, A. & CAPELARI, M.. "RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*". *Mycological Research*, **105** (2): 173, 2001.
- PEDROLI, D. B. & CARMONA, E. C. "Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **37**: 567, 2010.
- PITT, D. "Pectin Lyase from *Phoma-Medicaginis* Var *Pinodella*". *Methods in enzymology*, 161: 350-354, 1988.
- POLIZELI, M. de L. T. M., JORGE, J.A. & TERENCEZI, H. F. "Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity". *Journal of General Microbiology*, **137**: 1815, 1991.
- PORTNOY, T., MARGEOT, A., LINKE, R., ATANASOVA, L., FEKETE, E., SÁNDOR, E., HARTL, L., KARAFFA, L., DRUZHININA, I. S., SEIBOTH, B., LE CROM, S. & KUBICEK, C. P. "The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation". *BMC Genomics*, **12**: 269, 2011.
- RICHARD, F. J.; MORA, P.; ERRARD, C. & ROULAND, C. "Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material". *Journal Comparative Physiology B*, **175**: 297, 2005.
- ROMANOS, M. "Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression". *Current Opinion in Biotechnology*, **6**:527-533, 1995.
- RONHEDE, S.; BOOMSMA, J. J. & ROSENDAHL, S. "Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens". *Mycological Research*, **108** (1): 101, 2004.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3^o ed.. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 745.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2^o ed.. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- SANTOS, A. V.; DE OLIVEIRA, B. L. & SAMUELS, R. I.. "Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)". *Mycopathologia*, **163**:233, 2007.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa". *Analytical Biochemistry*, **166**(2): 368-379, 1987.
- SCHIOTT, M.; LICHT, H. H. DE F.; LANGE, L. & BOOMSMA, J. J. "Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants". *BMC Microbiology*, **8**(40): 1, 2008.
- SCHIOTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P. & BOOMSMA, J. J. "Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi". *BMC Biology*, **8**(156): 1, 2010.
- SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H. & SPITELLER, D. "Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants". *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, **108**(5): 1955-1960, 2011.
- SIEIRO, C., SESTELO, A. B. N. F. & VILLA, T. S. G. "Cloning, Characterization, and Functional Analysis of the *EPG1-2* Gene: A New Allele Coding for an Endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(19): 8921-8926, 2009.
- SILVA, A.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. "Production of Polysaccharidases in Different Carbon Sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Linnaeus". *Current Microbiology*, **53**: 68-71, 2006.
- SILVA, A.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. & HEBLING, M. J. A. "Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources". *Journal of Insect Physiology*, **49**: 307, 2003.
- SILVA-PINHATI, A. C.; BACCI JR., M.; HINKLE, M. L.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. "Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae)". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **37**: 1463, 2004.
- SIQUEIRA, C. G.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO O. C. & HEBLING M. J. A. "Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L.". *Applied Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, **64**(12): 4820, 1998.
- SMITH, C. J. S.; WATSON, C. F.; MORRIS, P. C.; BIRD, C. R.; SEYMOUR, G. B.; GRAY, J. E.; ARNOLD, C.; TUCKER, G. A.; SCHUCH, W.; HARDING, S. & GRIERSON, D. "Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes". *Plant Molecular Biology*, **14**(3): 369, 1990.
- SORIANO, M., DIAZ, P. & PASTOR, F.I.J. "Pectinolytic Systems of Two Aerobic Sporogenous Bacterial Strains with High Activity on Pectin". *Current Microbiology*, **50**: 114, 2005.

TIEMAN, D.M. & HANDA, A.K. "Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits". *Plant Physiology*, **106**(2): 429, 1994.

TSUYUMU, S.; ISHII, S. & NAKAMURA, M. "Plate Assay for Differentiation of Different Pectinases". *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**(9): 2509, 1989.

UENOJO, M. & PASTORE, G.M. "PECTINASES: APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E PERSPECTIVAS". *Química Nova*, **30**(2): 388, 2007.

VOGET, C. E., VITA, C. E., CONTRERAS ESQUIVEL, J. C. "One-step concentration and partial purification of *Aspergillus kawachii* non-acidic polygalacturonases by adsorption to glass fiber microfilters". *Biotechnology Letters*, **28**: 233, 2006.

WILLATS, W. G. T; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W. & KNOX, J. P. "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis". *Plant Molecular Biology*, **47**: 9, 2001.

XIAO, Z.; BOYD, J.; GROSSE, S.; BEAUCHEMIN, M.; COUPE, E. & LAU, P. C. K. "Mining *Xanthomonas* and *Streptomyces* genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78**: 973, 2008.

9. ANEXOS

9.1 Mapas dos plasmídeos

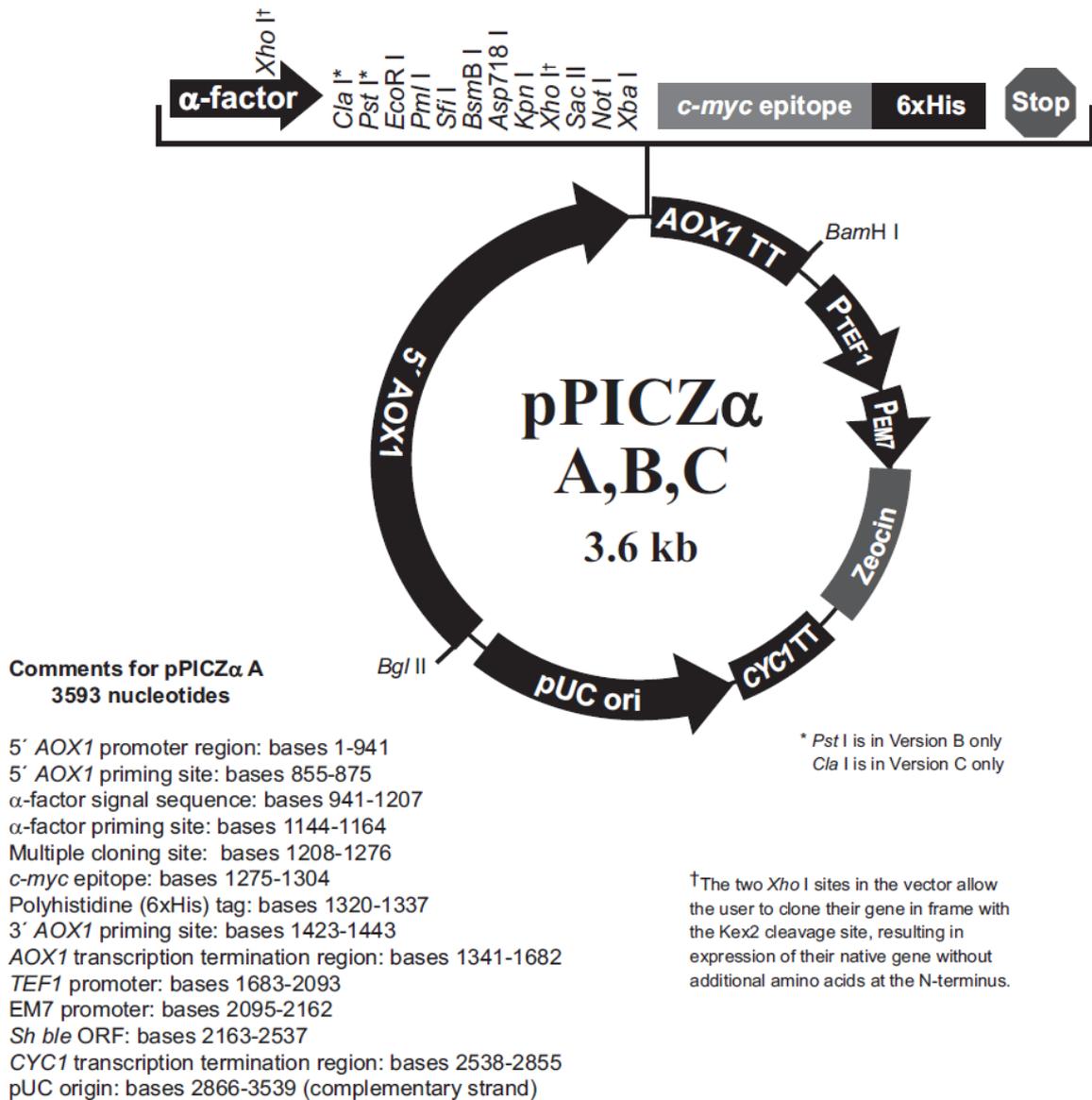


Figura 9.1. Mapa resumido das características do vetor pPICZαA.

5' end of *AOX1* mRNA

811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

5' *AOX1* priming site

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α -factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

α -factor priming site

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Xho I*

Kex2 signal cleavage

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC T GAATTCAC GTGGCCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

EcoR I Pml I Sfi I BsmB I Asp718 I

Ste13 signal cleavage

Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I

1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

c-myc epitope

polyhistidine tag

1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1351 TTAGACATGA CTGTTCTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

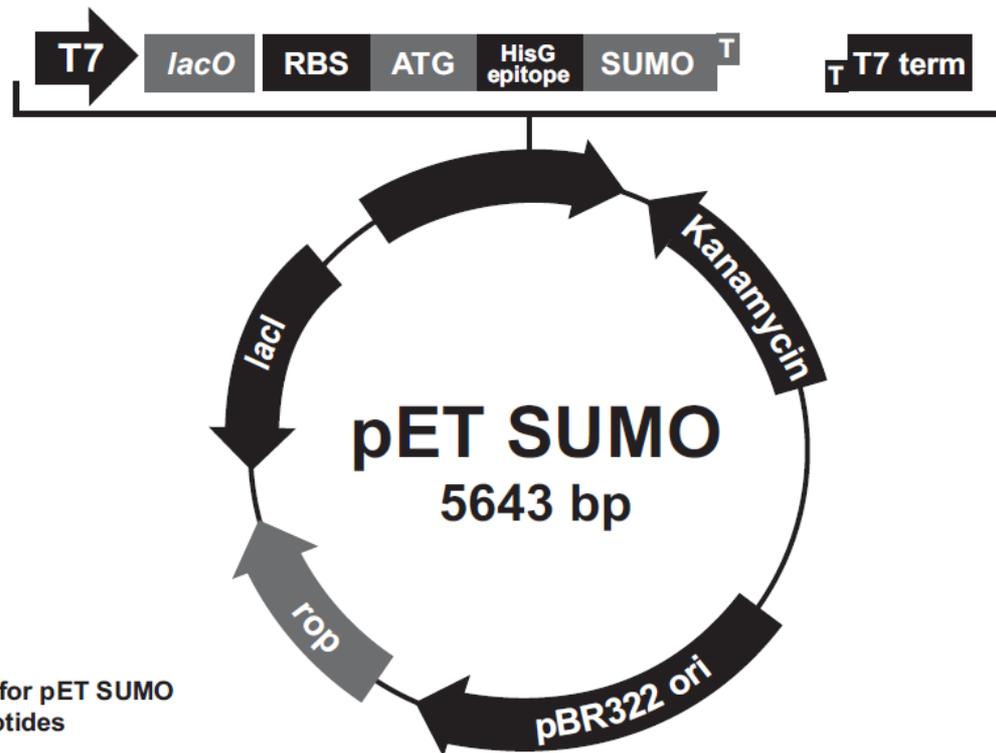
3' *AOX1* priming site

1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT

3' polyadenylation site

1471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

Figura 9.2. Múltiplos sítios de clonagem do vetor pPICZ α A.



**Comments for pET SUMO
5643 nucleotides**

T7 promoter: bases 209-225
lac operator (*lacO*): bases 228-252
 Ribosome binding site (RBS): bases 282-288
 Initiation ATG: bases 297-299
 HisG epitope: bases 309-329
 SUMO ORF: bases 360-653
 SUMO forward priming site: bases 549-571
 TA Cloning site: bases 653-654
 T7 reverse priming site: bases 783-802 (C)
 T7 terminator: bases 744-872
 Kanamycin resistance gene: bases 1431-2246 (C)
 pBR322 origin: bases 2342-3015
ROP ORF: bases 3383-3574
lacI ORF: bases 4383-5474 (C)

(C) = complementary strand

Figura 9.3. Mapa resumindo as características do vetor pETSUMO.



Figura 9.4. Múltiplos sítios de clonagem do vetor pETSUMO.