



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E ESTUDOS
SOBRE A OCORRÊNCIA DE PECTINASES NO “BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR”
(*Sphenophorus levis*, Curculionidae).**

Daniilo Elton Evangelista

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

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique - Silva

São Carlos - SP
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

E92pr

Evangelista, Danilo Elton.

Produção recombinante, caracterização enzimática e estudos sobre a ocorrência de pectinases no "bicudo da cana-de-açúcar" (*Sphenophorus levis*, Curculionidae) / Danilo Elton Evangelista. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 110 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biologia molecular. 2. Bioquímica. 3. Caracterização enzimática. 4. Relações filogenéticas. 5. *SI-Pectinases*. 6. *Sphenophorus levis*. I. Título.

CDD: 574.88 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Dissertação de Mestrado de
Danilo Elton Evangelista

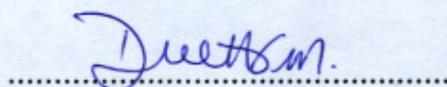
Banca Examinadora

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva



.....

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza



.....

Prof. Dr. André Rodrigues



.....

Orientador

Prof. Dr. Flávio Henrique - Silva

Enxergar o final da escada não é importante, a importância está no início de sua subida, pois mesmo que possível ver o final da trajetória há uma grande diferença entre conhecer o caminho e trilhar o caminho.

Dedicatória

*Dedico aos meus Pais Almerindo e Maria que tanto se
esforçaram e sacrificaram para que hoje eu estivesse aqui.
Dedico aos meus irmãos Nádia e Alex pelo apoio e carinho
sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e preenchê-lo com uma família maravilhosa e verdadeiros amigos.

Agradeço a minha família pela ótima criação e educação que me deram assim como constante apoio e confiança, sendo, portanto, os grandes responsáveis pela minha trajetória até aqui.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, o qual me cedeu uma das maiores oportunidades da minha vida ao me receber em seu laboratório. Agradeço também pelos valiosos ensinamentos, pela orientação, pelos “puxões de orelha” e pela amizade em mim depositadas durante esse curto período de tempo, o qual muito contribuiu na minha formação profissional e pessoal.

Agradeço ao aluno de doutorado Fernando Fonseca Perereira de Paula pelo constante acompanhamento deste projeto, auxiliando sempre gentilmente nos experimentos e interpretações dos resultados. Agradeço pelos ensaios de expressão gênica por qRT-PCR, realizadas por ele. Agradeço também pela grande amizade e sábios conselhos que levarei sempre comigo.

Agradeço a Prof. Dra. Andréa Soares da Costa Fuentes pelos ensinamentos e sugestões

Agradeço ao Prof. Dr. André Rodrigues da Unesp de Rio Claro pela construção das árvores filogenéticas e auxílio na interpretação destes resultados.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Adelita, Ana Lígia, Augusto, Daniela Néó, Dany, Francine, Gabriel, Kesser, Letícia, Lucas, Luciano, Mariana, Natália, Priscila, Rafael, Rafaela, Taíse, Wesley e Wilson por todos os momentos que passamos dentro e fora do laboratório, pelo apoio, sugestões e risadas na hora do café.

Agradeço aos amigos de outros laboratórios pelas saídas e jogos de futebol as quartas, tendo tornado minha estadia na cidade muito mais agradável.

Agradeço aos integrantes da Rep. Auto Posto por me abrigarem e me aguentarem durante estes dois anos. Em especial ao grande amigo Darlan que considero como um irmão e ao Marcelo Bello companheiro pra todas as horas.

Agradeço aos integrantes da Rep. Trem Q' Pula que considero uma segunda família, pelo apoio e torcida.

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

RESUMO

A parede celular vegetal confere à célula vegetal suporte estrutural, proteção contra patógenos e fitófagos. Dentre os polissacarídeos da parede celular vegetal são incluídas as substâncias pécticas, as quais são compostas por resíduos de ácido galacturônico, parcialmente esterificados, ligados em série via ligações glicosídicas α -1,4. As substâncias pécticas são o maior componente da lamela média e são naturalmente degradadas pela ação enzimática das pectinases. A Pectina metilesterase (PME) catalisa a remoção dos grupos metil-éster, e a Endo-Poligalacturonase (Endo-PG) promove a reação de hidrólise aleatória das ligações α -1,4. Essas enzimas são comumente sintetizadas por micro-organismos fitopatógenos para invasão ao hospedeiro ou pelas próprias plantas para modelamento da parede celular vegetal. Na agricultura, uma das mais importantes espécies pragas da família *Curculionidae* (Coleoptera: Curculionidae) é o *Sphenophorus levis*, o bicudo da cana-de-açúcar. As larvas deste inseto penetram no rizoma e constroem galerias ao longo do colmo, causando queda na produtividade ou até mesmo a morte da planta. Grandes danos na cultura como esses são significativos nos custos de produtos derivados da cana-de-açúcar. Considerando o impacto dessa praga na cultura e a ausência de eficientes métodos de controle, novas estratégias ainda são necessárias no combate à praga. A análise de uma biblioteca de cDNA de larvas do inseto *S. levis* mostrou a presença de genes codificantes para uma PME e uma Endo-PG, os quais nomeamos de *Sl-PME* e *Sl-EndoPG* respectivamente. Devido a importância nos estudos de insetos pragas e a extensa aplicação das pectinases em diversos campos industriais, foi promovida a caracterização das sequências genômicas codificantes para as pectinases de *S. levis* (*Sl-Pectinases*). Também foi realizada a produção e caracterização de uma *Sl-PME* e uma *Sl-EndoPG* recombinantes, expressas em sistema heterólogo. Além disso, foram conduzidas análises de expressão gênica por qRT-PCR em diferentes estágios de desenvolvimento e diferentes tecidos; e estudos filogenéticos entre as *Sl-Pectinases* e outras pectinases de diferentes reinos. As sequências das *Sl-Pectinases* identificadas apresentaram maior similaridade com genes homólogos de insetos depositados no GenBank, principalmente como o *Sitophilus oryzae*. A análise filogenética indicou que o grupo dos insetos é mais correlacionado com o grupo das bactérias e com o grupo de fungos, respectivamente para as sequências PMEs e Endo-PGs. As sequências genômicas das pectinases revelaram dois introns para *Sl-EndoPG* com 53 e 166 pb, mas nenhum para o gene *Sl-PME*. Ambas as *Sl-Pectinases* Recombinantes apresentaram atividade catalítica. A *Sl-EndoPG* recombinante mostrou maior atividade em pH $5,06 \pm 0,27$ e $49,74 \pm 2,49$ °C, mas baixa termoestabilidade. Para o substrato ácido poligalacturônico não metilado, a enzima revelou $K_m = 3,88 \text{ mg.mL}^{-1}$, $V_{max} = 21,96 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$ e $K_{cat} = 3.137 \text{ s}^{-1}$, para o substrato pectina de citrus parcialmente metilada, a enzima apresentou $K_m = 4,98 \text{ mg.mL}^{-1}$, $V_{max} = 17,19 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$ e $K_{cat} = 2.456 \text{ s}^{-1}$. Os resultados da análise de expressão sugerem que as pectinases de *S. levis* são enzimas digestivas atuantes no intestino médio. Este trabalho representa as primeiras pectinases de inseto produzidas em sistema heterólogo de *Pichia pastoris* e caracterizadas quanto a condições ótimas de atividade, termoestabilidade e parâmetros cinéticos.

Palavras-chave: Caracterização de enzimas recombinantes; Identificação de introns, Correlações filogenéticas; Papel fisiológico; *Sl-Pectinases*; *Sphenophorus levis*.

ABSTRACT

Plant cell wall confers to the cell plant, structural support as well as protection against pathogens and phytophagous. Among the cell wall polysaccharides includes pectic substances, which are composed of partially methyl-esterified galacturonic acid residues linked by α -1,4 glycosidic bonds. These enzymes are often synthesized by phytophagous micro-organisms for invasion of host plant or by own plant for modeling plant cell wall. The pectic substances are the major component of middle lamella and are naturally degraded by pectinases action. Pectin methyl-esterase (PME) catalysis removes methyl-ester groups, and the Endo-polygalacturonase (Endo-PG) promotes the random hydrolysis reaction of α -1,4 bonds. One of the most important agricultural pest species of the family *Curculionidae* (Coleoptera: Curculionidae) is *Sphenophorus levis*, the sugarcane weevil. The larvae of this insect penetrate into the rhizome and build galleries in the stem, decreasing productivity and causing the death of the plant. Large damages to the crop like that are significant in the costs of products derived from sugarcane. Considering the impact of this pest in the sugarcane crop and the absence of efficient method for control, new strategies for controlling are still necessary. The analysis of the cDNA library of *S. levis* larvae shows the presence of one PME and one Endo-PG genes that we called *Sl-PME* and *Sl-EndoPG* respectively. Considering the importance of studies of insect pests and the extensive use of these pectinases in different industry fields, we performed the characterization of genomic sequences coding for *S. levis* pectinases (*Sl-Pectinases*). It was also carried out the production and characterization of a *Sl-PME* and a *Sl-EndoPG* recombinant, expressed in heterologous system. We also accomplished analysis of gene expression by qRT-PCR in different stages of development as well as different tissues, and phylogenetic studies between *Sl-Pectinases* and other pectinases from different kingdoms. The *Sl-Pectinases* sequences identified, show more similar to homologous insect genes deposited in the GenBank, especially with *Sitophilus oryzae*. The phylogenetic analysis indicates that the insect group is more correlated with bacteria group and fungi group respectively to PMEs and EndoPGs sequences. Pectinases genomic sequences revealed two introns for *Sl-EndoPG* gene with 53 and 166 bp, but no one for *Sl-PME* gene. Both of *Sl-Pectinases* Recombinant showed catalytic activity. The recombinant *Sl-EndoPG* shows optimal activity at pH $5,06 \pm 0,27$ and $49,74 \pm 2,49$ °C, but extremely low thermostability. For the polygalacturonic acid non-methylated as substrate, the enzyme revealed $K_m = 3,88 \text{ mg.mL}^{-1}$, $V_{max} = 21,96 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$ e $K_{cat} = 3.137 \text{ s}^{-1}$; for the citrus pectin partially methylated as substrate, the enzyme presented $K_m = 4,98 \text{ mg.mL}^{-1}$, $V_{max} = 17,19 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$ e $K_{cat} = 2.456 \text{ s}^{-1}$. Results in expression analysis suggest that *S. levis* pectinases have a digestive enzymes role, acting on the midgut. The present work represents the first pectinases of insect produced in *Pichia pastoris* heterologous system and characterized as optimal conditions of activity, thermostability and kinetic parameters.

Key words: Recombinant enzymes characterization; Introns identification; Phylogenetic correlations; Physiological role; *Sl-Pectinases*; *Sphenophorus levis*.

Lista de Figuras

Figura 1. Parede Celular Vegetal	18
Figura 2. Cadeia principal do polímero pectico	19
Figura 3. Composição da parede vegetal	20
Figura 4. Ação das diferentes pectinases sobre as substâncias pecticas	22
Figura 5. Áreas infestadas por <i>S. levis</i>	24
Figura 6. Fases do desenvolvimento do <i>S. levis</i>	24
Figura 7. Ataque do <i>S. levis</i> à cana-de-açúcar	25
Figura 8. <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Sitophilus oryzae</i>	27
Figura 9. Curva de velocidade iniciais para <i>SI-Pectinases</i>	36
Figura 10. Curva padrão	38
Figura 11. Posicionamento dos <i>primers</i> sobre o gene alvo e combinações dos mesmos para PCR	42
Figura 12. Especificidade dos <i>primers</i> a serem usados nas análises de qRT-PCR	44
Figura 13. Estrutura primária das <i>SI-Pectinases</i>	48
Figura 14. Análise das colônias DH5 α recombinantes	49
Figura 15. Vetores de expressão	50
Figura 16. Estrutura primária das <i>SI-Pectinases</i> Recombinantes	51
Figura 17. PCR de colônia para <i>KM71H</i> recombinantes	52
Figura 18. Seleção de transformantes hiperprodutores das <i>SI-Pectinases</i> Recombinantes	53
Figura 19. Produção da <i>SI-PME</i> Recombinante	55
Figura 20. Produção da <i>SI-EndoPG</i> Recombinante	55
Figura 21. <i>SI-Pectinases</i> Recombinantes purificadas	56
Figura 22. Deglicolização das <i>SI-Pectinases</i> Recombinantes	57
Figura 23. Ensaio qualitativo de atividade das <i>SI-Pectinases</i> Recombinantes	58
Figura 24. Caracterização enzimática da <i>SI-EndoPG</i> Recombinante	60
Figura 25. Parametros cinéticos da <i>SI-EndoPG</i> Recombinante	62
Figura 26. Alinhamento múltiplo entre as PMEs de insetos	65
Figura 27. Alinhamento múltiplo entre as PMEs provenientes dos diversos organismos	72
Figura 28. Alinhamento múltiplo entre as EndoPGs de insetos	73
Figura 29. Alinhamento múltiplo entre as EndoPGs provenientes dos diversos organismos	79

Figura 30. Árvore filogenética para a <i>SI-PME</i>	82
Figura 31. Árvore filogenética para a <i>SI-EndoPG</i>	84
Figura 32. Análise de contaminantes no DNA genômico extraído	87
Figura 33. Amplificação das sequências genômicas codificantes para <i>SI-Pectinases</i>	89
Figura 34. Introns indentificados no fragmento genômico amplificado a partir do gene <i>SI-EndoPG</i>	90
Figura 35. Expressão gênica diferencial das <i>SI-Pectinases</i>	92
Figura 36. Imunodeteção das <i>SI-Pectinases</i> nos diferentes tecidos	95
Figura A1. Clone <i>SI-PME</i> caracterizado	108
Figura A2. Clone <i>SI-EndoPG</i> caracterizado	109
Figura A3. Extração de DNA genômico	110

Lista de Tabelas

Tabela 1. PGs ácidas de diversos organismos	64
Tabela A1. <i>Primers</i> utilizados	106
Tabela A2. Sequências utilizadas no alinhamento múltiplo das <i>SI-Pectinases</i>	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: absorvância

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

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

Ca⁺²: Cálcio na forma ionizada

cDNA: DNA complementar

cm: centímetros

CT: *cycle Threshold*: Ciclo limiar

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNS: ácido 3,5 dinitrossalicílico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfato

D.O: densidade óptica

DTT: ditioneitol

E.C: *Enzyme Classification*: Classificação Enzimática

EDPCV: Enzimas de degradação de parede celular vegetal

EDTA: ácido etileno-diamino-tetra-acético

Endo-PG: Endo-poligalacturonase

ESTs: *Expressed sequences tags*

Exo-PG: Exo-poligalacturonase

g: grama

GAPDH: glicerol-3-fosfato desidrogenase

H: hora

H⁺: hidrogênio na forma iônica

H₃O⁺: água na forma iônica

HCl: Ácido clorídrico

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Kb: quilobase

Kcat: Constante catalítica - Turnover

KCl: Cloreto de potássio

kDa: quilodalton

Km: Constante cinética de Michaelis Menten

Kv: kilovatts
M: molar
MAG: D-(+)-ácido galacturônico monohidratado
mA: miliampéres
mg: miligrama
MgCl₂: Cloreto de magnésio
Min: minuto
mL: mililitro
mRNA: RNA mensageiro
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
ng: nanograma
Ni⁺²: Níquel na forma iônica
nm: nanômetros
nmol: nanômols
ORF: *open reading frame* – fase aberta de leitura
pb: pares de bases
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PCR: *Polimerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase
PG: Poligalacturonase
pH: potencial de hidrogênio
pI: Ponto isoelétrico
PME: Pectina metilesterase
PPases: Protopectinases
qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcriptase- Polimerase chain reaction*
RNA: ácido ribonucléico
rpm: rotações por minuto
s: segundo
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato
SI-EndoPG: SI-Endo-poligalacturonase
SI-PME: SI-Pectina metilesterase
TAE: Tris Acetato EDTA
TBE: Tris Borato EDTA
U: unidade enzimática
V: volts

V_{max} : Velocidade máxima

YEPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*

YEPDS: *Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Agar*

°C: graus Celsius

Δ CT: delta cycle threshold

$\Delta\Delta$ CT: delta delta cycle threshold

μ F: microfaraday

μ g: micrograma

μ L: microlitro

μ m: micrômetro

μ M: micromolar

Ω : ohm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Parede celular vegetal	18
1.2 Pectina	19
1.3. Pectinases	20
1.4 Pectina metilesterase	22
1.5 Poligalacturonase	23
1.6 <i>Sphenophorus levis</i>	23
1.7 Ocorrência das Pectinases em <i>S. levis</i>	26
1.8 Microbiota intestinal	28
1.9 Produção de proteína recombinante por <i>Pichia pastoris</i>	28
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Caracterização completa dos clones	31
3.2 Análise da estrutura primária das <i>SI-Pectinases</i>	31
3.3 Construção dos vetores de expressão	32
3.4 Análise da estrutura primária das <i>SI-Pectinases</i> Recombinantes	33
3.5 Obtenção das leveduras <i>Pichia pastoris</i> recombinantes	33
3.6 <i>Screening</i> : Seleção de transformantes hiperprodutores das enzimas recombinantes	34
3.7 Produção e purificação das enzimas recombinantes	34
3.8 Análise de glicosilação das <i>SI-Pectinases</i> recombinantes	35
3.9 Ensaio qualitativo de atividade enzimática	35
3.10 Caracterização enzimática da <i>SI-EndoPG</i>	36
3.10.1 Seleção do método e padronização das reações	36
3.10.2 Determinação de pH ótimo, temperatura ótima e termoestabilidade	37
3.10.3 Determinação dos parâmetros cinéticos	38
3.11 Análise comparativa entre <i>SI-Pectinases</i> e outras pectinases descritas	39
3.12 Construção das árvores filogenéticas	40
3.13 Análise de códons preferenciais	40
3.14 Extração de DNA genômico	41
3.15 Análise das regiões ribossomais 16S e ITS	41

3.16	Análise das <i>SI-Pectinases</i> genômicas	42
3.17	Análise de expressão gênica diferencial das <i>SI-Pectinases</i>	44
3.17.1	Extração do RNA total e síntese do Cdna	44
3.17.2	Padronização das reações	44
3.17.3	qRT-PCR	46
3.18	Ensaio de imunodeteção por Western Blotting	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Caracterização completa dos clones <i>SI-Pectinases</i>	48
4.2	Análise <i>in silico</i> da estrutura primária das <i>SI-Pectinases</i>	49
4.3	Vetores recombinantes de expressão heteróloga	49
4.4	Leveduras <i>Pichia pastoris</i> (KM71H) recombinantes	53
4.5	Transformantes hiperprodutores das enzimas recombinantes	53
4.6	Produção e purificação das enzimas <i>SI-Pectinases</i> recombinantes	55
4.7	Deglicosilação das <i>SI-Pectinases</i> recombinantes	57
4.8	Ensaio qualitativo de atividade enzimática	59
4.9	Atividade ótima e termoestabilidade da <i>SI-EndoPG</i> Recombinante	60
4.10	Parâmetros cinéticos da <i>SI-EndoPG</i> Recombinante	62
4.11	Alinhamento múltiplo das <i>SI-Pectinases</i>	65
4.11.1	Alinhamento múltiplo para <i>SI-PME</i>	65
4.11.2	Alinhamento múltiplo para <i>SI-EndoPG</i>	73
4.12	Análises filogenéticas <i>SI-Pectinases</i>	82
4.12.1	Árvore <i>SI-PME</i>	82
4.12.2	Árvore <i>SI-EndoPG</i>	84
4.13	Análise de Codons preferenciais	86
4.14	PCR das regiões ribossomais 16S e ITS	88
4.15	<i>SI-Pectinases</i> genômicas	89
4.16	Análise de expressão gênica diferencial das <i>SI-Pectinases</i>	92
4.17	Imunodeteção por Western Blotting	95
5.	CONCLUSÕES	97
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	98
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8.	ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Parede celular vegetal

A parede celular vegetal é responsável pelo quadro estrutural básico da célula vegetal, definindo o formato e tamanho das células e tecidos (YORK; DARVILL *et al.*, 1986). A parede também atua na proteção contra desidratação, acúmulo excessivo de água, choques mecânicos e invasores. Essa estrutura é considerada a primeira barreira física contra micro-organismos fitopatogênicos e insetos fitófagos (PRESTON, 1974).

A parede celular vegetal é classificada em parede celular primária e secundária de acordo com sua composição química e localização em relação à membrana plasmática (Figura 1) (YORK; DARVILL *et al.*, 1986). Essa estrutura é altamente organizada e contém diversos polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas (CARPITA; TIERNEY *et al.*, 2001). Os componentes mais abundantes dessa estrutura são celulose, hemicelulose, lignina e pectina (PRESTON, 1974).

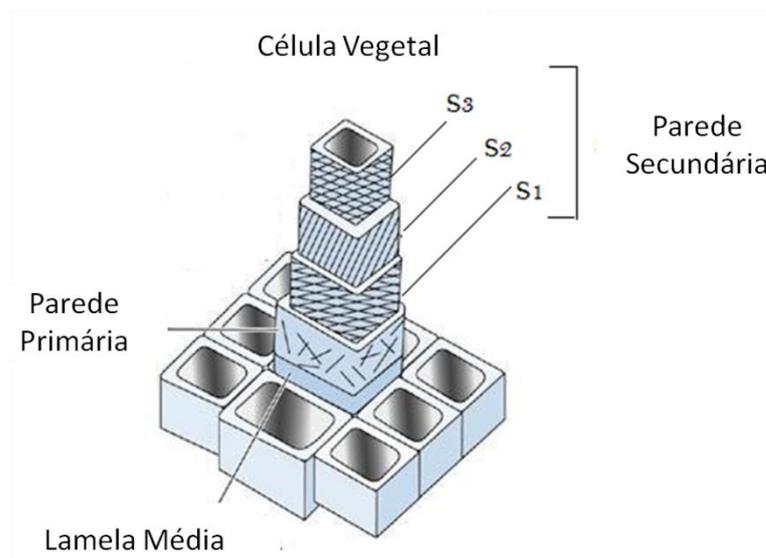


Figura 1. Parede celular vegetal. A figura destaca a classificação das estruturas que compõem a parede celular de acordo com o posicionamento destas em relação a membrana plasmática. Modificado de J.F. Young, *et al.*, (1998).

1.2 Pectina

A pectina é um polissacarídeo heteromolecular, constituído de uma longa cadeia principal, a qual é associada a açúcares secundários como arabinose, ramnose, xilose, apiose e fucose (ALKORTA; GARBISU *et al.* 1998; GUMMADI; PANDA, 2003). A cadeia principal é formada por inúmeros resíduos de ácido galacturônico ligados em série via ligações α -1,4 (Figura 2). Essa estrutura é parcialmente esterificada por grupos metil éster ligados em alguns desses monômeros (TEWARI; KASHYAP *et al.*, 2001; GUMMADI; PANDA, 2003).

Os açúcares secundários, quando associados à cadeia principal, geram cadeias laterais. As regiões da pectina que apresentam essas ramificações são denominadas como regiões peludas (“hairly”). Entretanto a cadeia principal é predominantemente composta pelas regiões lisas (“smooth”), as quais são lineares ou com poucas ramificações de menor tamanho (DE VRIES; VORAGEN *et al.*, 1986).

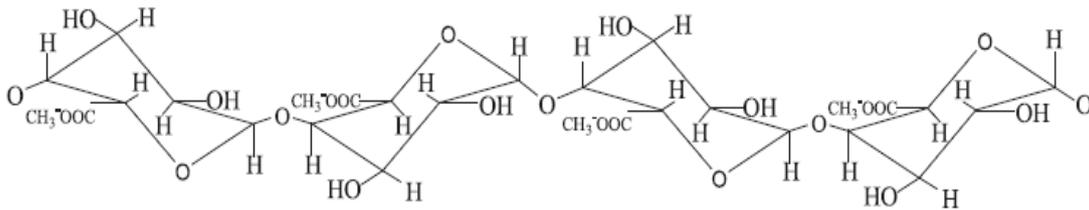


Figura 2. Cadeia principal do polímero péctico. O esqueleto da cadeia é constituído de inúmeros monômeros de α -ácido galacturônico parcialmente esterificadas por grupos metil (ALKORTA; GARBISU *et al.*, 1998).

As substâncias pécticas presentes na parede celular são uma mistura de protopectina, ácido pectínico e ácido péctico. A protopectina é a forma que está associada aos demais polissacarídeos estruturais da parede celular (celulose e hemicelulose) e a íons Ca^{+2} (MARTINS, 2006). O ácido pectínico define a cadeia parcialmente esterificada, diferindo do ácido péctico, cuja cadeia é isenta de qualquer esterificação. O termo genérico pectina é usado para misturas de substâncias pécticas em que o ácido pectínico é o componente em maior proporção (MARTINS, 2006).

Ao contrário das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, a cadeia péctica não possui tamanho definido, apresentando massa molecular de 25 a 360 kDa (SAKAI; SAKAMOTO *et al.*, 1993). Devido a suas propriedades heteromoleculares, a pectina assume importante papel na constituição da célula vegetal (PAIVA, EMANUELA *et al.*,

2009). Apresenta-se como um dos principais componentes formadores da parede celular primária chegando a ser o constituinte predominante da lamela média (ALKORTA; GARBISU *et al.*, 1998) (Figura 3). Desse modo, a pectina está intimamente relacionada com a proteção celular e manutenção da estrutura vegetal. Portanto, grandes alterações na célula vegetal ocorrem quando as substâncias pécnicas são degradadas, o que ocorre naturalmente por ação enzimática das pectinases.

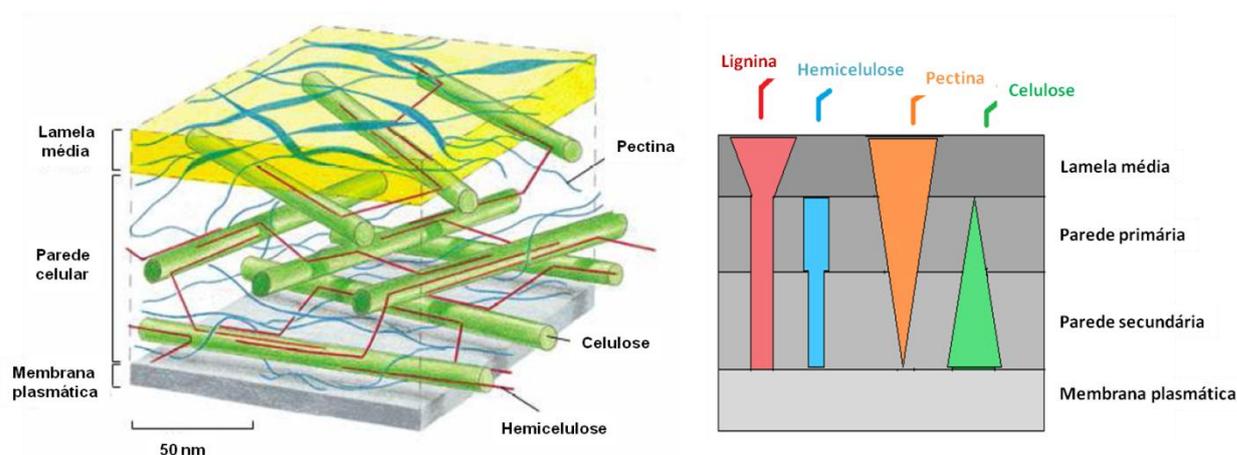


Figura 3. Composição da parede vegetal. Disposição dos principais componentes da parede celular vegetal ao longo da sua estrutura. A pectina aumenta sua concentração à medida que se distancia da membrana plasmática. Modificado de Martins *et al.*, 2006.

1.3 Pectinases

A pectina é usada na indústria de alimentos principalmente como agentes geleificantes e como fibras nutricionais. Todavia, sua presença representa um grande empecilho em etapas críticas de muitos processos industriais, pois promove turbidez do meio e incrustações nos reatores (SANTOS, 2007). Deste modo, a aplicação das enzimas pectinolíticas nessas etapas críticas se apresenta como uma estratégia de alta eficiência para minimizar estes problemas.

O uso das pectinases na indústria iniciou-se por volta de 1930 nas preparações de vinhos e sucos de frutas (KASHYAP; CHANDRA *et al.*, 2000). A partir de 1960, após maior elucidação sobre a natureza química dos tecidos vegetais, essas enzimas foram utilizadas com maior eficácia (KASHYAP; CHANDRA *et al.*, 2000). Nas duas últimas décadas, o uso de enzimas de degradação de parede celular vegetal (EDPCV)

tem aumentado consideravelmente, com grande enfoque nas indústrias de alimentos, têxtil e de papel e celulose (BHAT, 2000). Atualmente, as enzimas pectinolíticas têm vasta aplicação industrial em diversos setores, tais como: amadurecimento artificial 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 na indústria têxtil e de papel; nutrição animal; enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos vegetais (UENOJO; PASTORE *et al.*, 2007). Em 2005, as pectinases correspondiam aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas, representando um valor de vendas em torno de US\$ 2 bilhões (UENOJO; PASTORE *et al.*, 2007).

As pectinases são enzimas capazes de atuar sobre substâncias pécticas alterando sua estrutura e composição. Essas enzimas são geralmente sintetizadas por bactérias, leveduras, fungos filamentosos e plantas em geral (GONZALEZ; LEMKE, 2010). As pectinases vegetais estão relacionadas com mudanças ocorrentes ao longo da expansão celular e fundamentalmente no crescimento e amadurecimento dos frutos (GAINVORS *et al.*, 1994; DA SILVA *et al.*, 2005). As pectinases de micro-organismos estão relacionadas com processos de infecção e podem definir seu potencial de patogenicidade (ROGERS; KIM *et al.*, 2000).

A classificação destas enzimas é baseada no mecanismo de ataque ao polímero péctico, compreendendo três classes distintas: protopectinases (PPases), esterases e despolimerases (Figura 4) (JAYANI; SAXENA *et al.*, 2005). As PPases catalisam a dissociação do polímero com a celulose, hemicelulose e Ca^{+2} , dessa maneira essas enzimas solubilizam protopectina em ácido pectínico (SAKAI; SAKAMOTO *et al.*, 1993). As esterases têm ação desesterificante, ou seja, são responsáveis por remover os grupos metil ester ligados aos monômeros de ácido galacturônico. As despolimerases, por sua vez, promovem a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 entre os monômeros da cadeia (SAKAI; SAKAMOTO *et al.*, 1993).

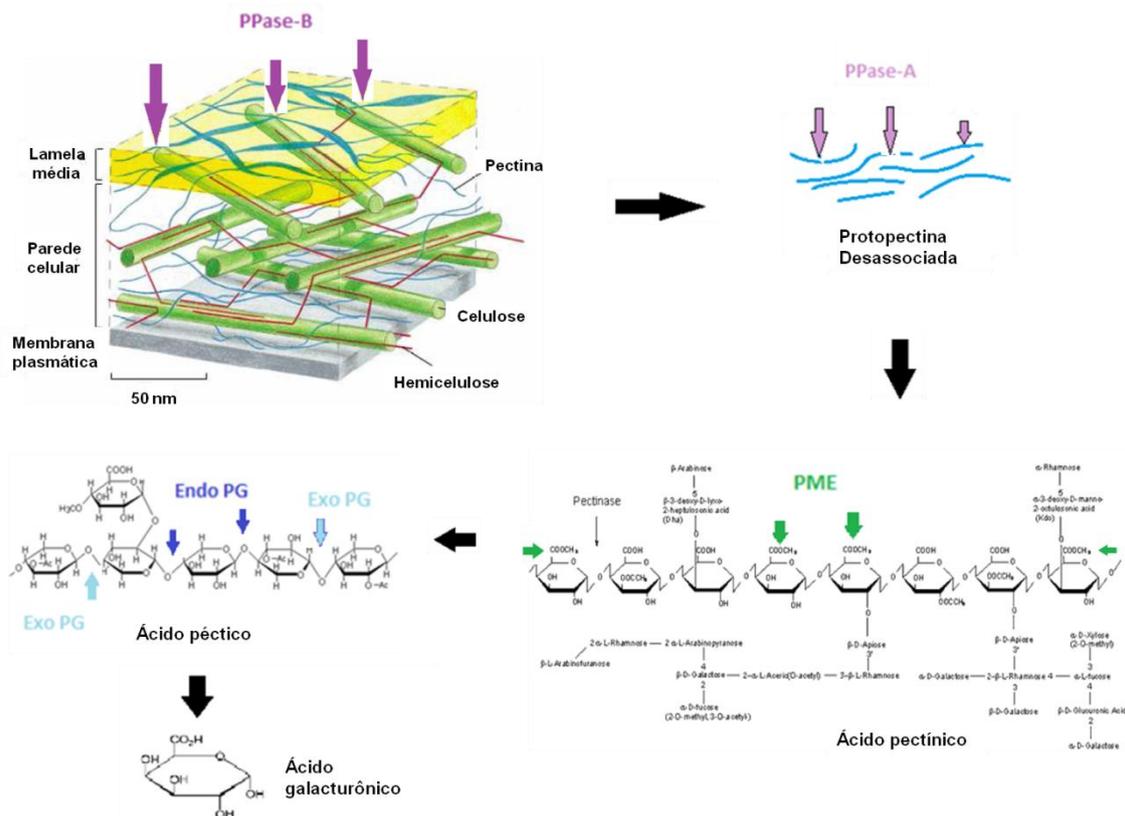


Figura 4. Ação das diferentes pectinases sobre as substâncias pécnicas. As PPases-B agem sobre a protopectina desassociando-a dos demais componentes da parede celular. As PPases-A agem sobre a protopectina desassociando-a dos íons Ca²⁺ e convertendo-a em pectina propriamente dita. A PME catalisa a desesterificação da cadeia retirando os grupamentos metil. As despolimerases Endo-PG e Exo-PG rompem as ligações glicosídicas gerando monômeros de açúcar. Modificado de Martins *et al.*, (2006).

1.4 Pectina metilesterase

A pectina metilesterase (PME) (E.C 3.1.1.11) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da cadeia principal, liberando metanol, H₃O⁺ e convertendo o ácido pectínico em ácido péctico (Figura 4) (GUMMADI; PANDA *et al.*, 2003). Ela age preferencialmente sobre o grupo metil da unidade galacturônica próxima a uma unidade não esterificada (KASHYAP; VOHRA *et al.*, 2001). Esse tipo de enzima está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção, melhoramento da textura, firmeza de frutas e vegetais processados, assim como na extração e clarificação de sucos de frutas. Ela pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécnicas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (ALKORTA, GARBISU *et al.*, 1998).

1.5 Poligalacturonase

Dentre as despolimerases estão as polygalacturonases (PG), as quais são sub classificadas em Endo-Poligacturonase (Endo-PG) (E.C 3.2.1.15) ou em Exo-Poligalacturonase (Exo-PG) (E.C 3.2.1.67) de acordo com seu modo de ação sobre o ácido poligalacturônico (SAKAI; SAKAMOTO *et al.*, 1993). A Endo-PG preferencialmente rompe as ligações glicosídicas internas da cadeia de modo randômico, enquanto a Exo-PG age sequencialmente sobre os monômeros terminais da cadeia (Figura 4) (UENOJO; PASTORE *et al.*, 2007). As PGs têm maior atividade sobre o substrato não esterificado (CRELIER; ROBERT *et al.*, 2001). De fato, em substratos com alto grau de esterificação, as PGs apresentam-se inativas. Deste modo sugere-se a hipótese que a atividade da PME preceda a atividade da PG, uma vez que a PME atua na desesterificação da pectina e que a PG tem maior afinidade pelo substrato linear isento de grupos metílicos (CRELIER; ROBERT *et al.*, 2001). O fato da atividade da PME ser maior em grãos verdes, diminuindo à medida que o grão amadurece e que o inverso ocorre quanto à atividade da PG, corrobora com a hipótese sugerida (ANTUNES; GONÇALVES *et al.* 2006).

1.6 *Sphenophorus levis*

O coleóptero *Sphenophorus levis*, pertencente à família Curculionidae (VAURIE, 1978), sendo popularmente conhecido como “bicudo da cana-de-açúcar”. Este inseto representa uma importante praga dos canaviais do estado de São Paulo e de uma região de Minas Gerais (GALLO *et al.*, 2002). O gênero *Sphenophorus* abrange uma gama de espécies pragas de culturas de importância econômica do grupo das gramíneas. Esse gênero tem representantes em vários continentes e diversos países, sendo 64 identificadas no EUA e 14 descritas no Brasil (REVISTA CULTIVAR, 2005).

A importância do *S. levis* como praga da cana-de-açúcar no Brasil tornou-se conhecida a partir de 1977, sendo que em 1989 sua ocorrência foi detectada em 14 municípios na região de Piracicaba causando a morte de 50 a 60% dos perfilhos ainda na fase de cana-planta (Figura 5) (ALMEIDA, 2005). O *S. levis* tem sido encontrado em mais de 40 municípios, incluindo as regiões: Central (Araraquara, São Carlos, Jaú, etc.); Sul (Assis, Ourinhos); Nordeste (Pradópolis) e Leste (Leme, Pirassununga, Araras, São João da Boa Vista, Santa Cruz das Palmeiras), ou seja, em quase todas as regiões de cultivo de cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Sua disseminação deve-se principalmente ao transporte de mudas infestadas de uma região para outra,

visto que o inseto possui limitada capacidade de voo e conseqüentemente uma baixa taxa de dispersão natural (DEGASPARI *et al.*, 1987).



Figura 5. Áreas infestada por *S. levis*. A imagem à esquerda mostra os perfilhos não-desenvolvidos afetados com o ataque do inseto praga *S. levis*. A imagem à direita mostra uma área de plantio de cana-de-açúcar, onde as touceiras foram retiradas na tentativa de controle desta praga. As imagens foram obtidas em uma usina de açúcar e álcool da região de Ribeirão Preto – SP. Dados não publicados (Fonte: Laboratório de Biologia Molecular Dep. Genética e Evolução).

O inseto adulto (Figura 6) mede cerca de 15 mm e apresenta cabeça alongada, antenas clavadas e conspicuamente geniculadas, corpo compacto de tegumento bastante endurecido e aparelho bucal comprido em forma de rostro, característica responsável pelo nome popular de “bicudo” aos insetos dessa família. As larvas são brancas, enrugadas, sem patas e cabeça de coloração vermelho castanho (Figura 6B).

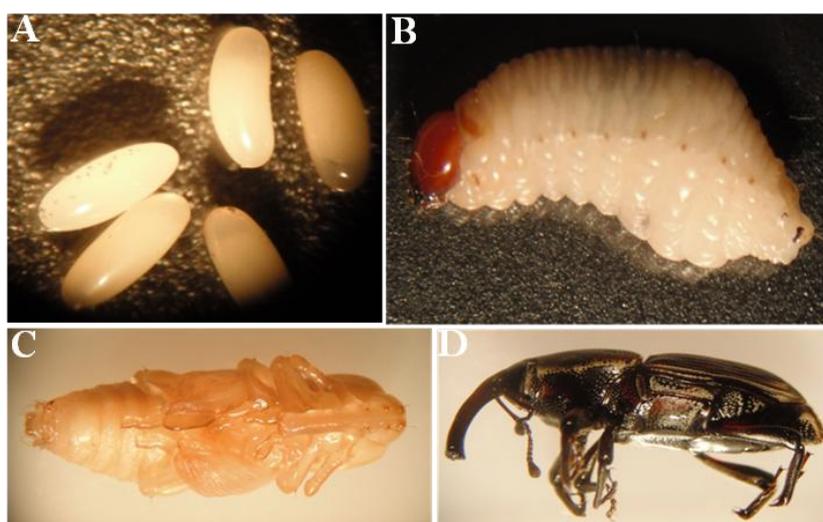


Figura 6. Fases do desenvolvimento do *S. levis*. A- Ovos; B- Larva de aproximadamente 30 dias de idade; C- Pupa; D- Inseto adulto. Dados não publicados (Fonte: FONSECA, 2012; Laboratório de Biologia Molecular Dep. Genética e Evolução).

A fêmea adulta utiliza da mandíbula para abrir pequenos orifícios na base do colmo onde deposita os ovos, os quais após eclodirem liberam as larvas (GIRON-PEREZ; NAKANO *et al.*, 2009). É durante a fase larval que este inseto causa maiores danos a cultura. As larvas atacam o interior do rizoma, abrindo galerias na base da brotação (Figura 7), gerando graves danos à planta e em alguns casos, até a sua morte (PRECETI & ARRIGONI, 1990). Os prejuízos econômicos causados pela ação da larva resumem em redução da produtividade e longevidade do canavial (PRECETI & TERÁN, 1983).

Os adultos e as larvas apresentam dois picos populacionais durante o ano. Em fase adulta, o inseto tem maior intensidade populacional entre fevereiro e março e um menor pico entre outubro dezembro. As larvas tem maior pico entre junho e julho e menor pico em dezembro. Os picos populacionais das pupas são entre dezembro e janeiro e entre agosto e setembro (PRECETTI; ARRIGONI, 1990).

O combate a larva deste coleóptero atualmente é realizado por meio de iscas tóxicas, rotação de cultura, controle biológico por uso de nematoides, inseticidas ou a remoção das soqueiras contaminadas. Entretanto, nenhuma destas alternativas têm se mostrado eficazes e de baixo custo, ressaltando a importância da continuidade de pesquisas na busca de novas estratégias mais eficientes no controle desta praga.

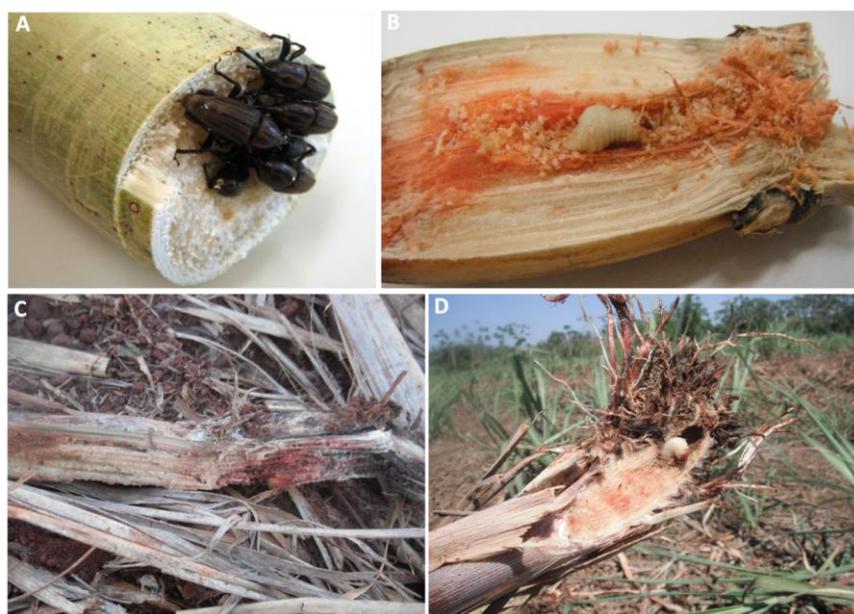


Figura 7. Ataque do *S. levis* à cana-de-açúcar. A- Insetos adultos se alimentando do caldo do colmo; B- larva se alimentando e abrindo galerias no colmo de maneira a abrir galerias neste; C- perfilho morto devido ao ataque das larvas; D- larva encontrada em um dos perfilhos de uma área infestada. Dados não publicados (Fonte: FONSECA, 2012; Laboratório de Biologia Molecular Dep. Genética e Evolução).

Assim, com o intuito de se gerar maior conhecimento sobre esta praga e promover subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle, foi construído recentemente em nosso laboratório, uma biblioteca de cDNA do *S. levis*. A biblioteca foi construída a partir do RNA mensageiro total extraído de larvas do inseto. Deste modo muitos dados referentes ao perfil digestivo do inseto foram obtidos e consequentemente uma visão mais clara da interface entre inseto e ambiente.

1.7 Ocorrência das Pectinases em *S. levis*

Em análises *in silico* da biblioteca de cDNA do *S. levis* 3.804 ESTs foram gerados, dentre os quais foram identificadas cinco sequências para PME gerando um *cluster* e duas sequências gerando dois *singlets* para Endo-PG. Portanto, as pectinases identificadas foram nomeadas de *Sl-Pectinases*, sendo *Sl-PME* e *Sl-EndoPG* respectivamente para as enzimas PME e ENDO-PG (FONSECA, 2012).

As EDPCV, incluindo as pectinases, têm sido extensamente estudadas em plantas, bactérias e fungos (SHEN; DENTON *et al.*, 2003; PAUCHET; WILKINSON *et al.*, 2010). Essas enzimas constituem um arsenal que podem determinar o potencial patogênico do organismo invasor (ROGERS; KIM *et al.*, 2000). Entretanto, recentes estudos têm mostrado fortes indícios de que invertebrados fitófagos, incluindo insetos pragas, também são capazes de sintetizar essas enzimas através de genes endógenos.

O primeiro relato sobre EDPCV do reino animal foi uma celulase (glicosil hidrolase da família IV) identificada no genoma do cupim *Reticulitermes speratus* (WATANABE; NODA *et al.*, 1998). A primeira pectinase (pectato liase) do reino animal descrita foi identificada na biblioteca de cDNA do nematóide *Globodera rostochiensis* (POPEIJUS; OVERMARS *et al.*, 2000) e logo após uma Exo-PG foi identificada em outro nematóide, *Meloidogyne incógnita* (JAUBERT; LAFFAIRE *et al.*, 2002). Marcando como as primeiras pectinases descritas em insetos estão uma PME e uma Endo-PG de *Sitophilus oryzae* (SHEN; DENTON *et al.*, 2003; SHEN; PAPPAN *et al.*, 2005). Esse inseto praga, popularmente conhecido como “Bicudo do arroz”, é também um coleóptero da família Curculionidae, muito semelhante ao *S. levis* (Figura 8).



FIGURA 8. *Sphenophorus levis* e *Sitophilus oryzae*. A imagem à esquerda mostra o coleóptero *S. levis*; dados não publicados (Fonte: FONSECA, 2012; Laboratório de Biologia Molecular Dep. Genética e Evolução). A imagem à direita mostra o coleóptero *S. oryzae*; modificado de Joseph Berger (2009).

Além dos referidos trabalhos, diversos outros surgiram apontando indícios de celulases e pectinases em insetos pragas de cultivares de importância econômica (GIRARD; JOUANIN, 1999; WATANABE; TOKUDA, 2001; ALLEN; MERTENS, 2008), inclusive um trabalho realizado por Pauchet e colaboradores, em que se construiu bibliotecas de cDNA de várias espécies das famílias Chrysomeloidea e Curculionidae (PAUCHET; WILKINSON *et al.*, 2010). Os representantes destas famílias são considerados eficientes herbívoros. Neste trabalho um arsenal de EDPCV diferente para cada espécie foi descrito, mostrando uma nova fonte para bioprospecção dessas enzimas que atualmente têm alto valor comercial, além de enfatizar a importância do estudo das EDPCV em outras espécies ainda não descritas, como o *S. levis*.

Muita pesquisa relacionada à EDPCV de animais vem surgindo e a cada vez há mais evidências de que estes organismos possuem os respectivos genes em seu genoma. Todavia, há sempre a dúvida de que esses genes sejam de micro-organismos, potencialmente produtores de EDPCV, presentes no trato intestinal desses animais.

1.8 Microbiota intestinal

No trato intestinal de insetos há uma ampla diversidade de micro-organismos que constituem a microbiota intestinal e que podem exercer importante papel no processo de digestão e detoxificação (DILLON; DILLON, 2004). A microbiota intestinal pode estar diretamente relacionada à nutrição, podendo conferir ao inseto a habilidade de sobreviver em condições de dietas adversas, aumentarem a sua eficiência digestiva, o abastecimento de vitaminas e a aquisição de enzimas digestivas (DILLON; DILLON, 2004).

Alguns micro-organismos associados ao trato intestinal de diversas espécies de cupins são indispensáveis à sobrevivência desses insetos por serem fontes essenciais de enzimas que degradam celulose e lignina, fornecendo a seus hospedeiros glicose e ácidos graxos que são essenciais como fontes de energia (BREZNAK; BRUNE, 1994). A eliminação de simbioses intracelulares (*Buchnera*) em afídeos afeta diretamente a nutrição e a fisiologia do inseto, causando redução no seu desenvolvimento e falência reprodutiva (DOUGLAS; MINTON *et al.*, 2001). Além disso, os próprios micro-organismos podem ser utilizados como recurso energético pelo hospedeiro (BREZNAK; BRUNE, 1994).

Estudos realizados sobre a diversidade microbiana presente no trato intestinal de larvas de *S. levis* revelaram bactérias e fungos filamentosos capazes de degradar celulose e hemicelulose (RINK; SOARES-COSTA *et al.*, 2011). Tendo em vista que o bagaço de cana-de-açúcar, ingerido pelas larvas deste inseto, é uma dieta rica em celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes da parede celular vegetal, acredita-se que esses micro-organismos desempenham um papel crucial na digestão e desenvolvimento do *S. levis* (RINK; SOARES-COSTA *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

Considerando a importância nos estudos relacionados à EDPCV de insetos pragas e a extensa aplicação das pectinases em diferentes setores da indústria, o presente projeto teve como objetivos gerais: investigar a ocorrência dos genes codificantes para *SI-PME* e *SI-EndoPG* no inseto *S. levis*, investigar o papel dessas enzimas na fisiologia do inseto e produzir as enzimas na forma recombinante, seguida da caracterização enzimática de ambas. Para tanto, a partir da biblioteca de cDNA de *S. levis* mencionada, pretendeu-se atingir os seguintes objetivos específicos:

Produção e caracterização das enzimas *SI-Pectinases* Recombinantes

- Caracterização completa dos clones codificantes para *SI-PME* e *SI-EndoPG* identificados na biblioteca de cDNA de *S. levis*;
- Clonagem da fase aberta de leitura (ORF) em vetor para expressão em *P. pastoris*;
- Isolamento de transformantes hiperprodutores das enzimas recombinantes;
- Purificação das enzimas;
- Caracterização das enzimas quanto a pH e temperatura ótimos e termoestabilidade, assim como estabelecimento dos parâmetros cinéticos;

Investigação sobre a ocorrência e função da *SI-PME* e *SI-EndoPG*

- Extração de DNA genômico do corpo gorduroso e do trato digestivo de larvas do besouro *S. levis*;
- Amplificação por PCR do gene completo a partir do DNA genômico da larva para sequenciamento e análise de possíveis introns;
- Análise de códons preferenciais;
- Análises filogenéticas;
- Síntese de cDNA a partir do mRNA extraído do inseto em diferentes fases de desenvolvimento e dos diferentes tecidos dissecados.
- Análise de expressão, por qRT-PCR, dos genes *SI-PME* e *SI-EndoPG* nas diferentes fases de desenvolvimento do inseto, assim como nos diferentes tecidos na fase larval.
- Imunodeteção, por Western Blotting, das proteínas nativas *SI-PME* e *SI-EndoPG* a partir de anticorpos policlonais produzidos em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização completa dos clones

A biblioteca de cDNA do *S. levis* foi construída em nosso laboratório utilizando o Cloneminer cDNA kit (Invitrogen) (FONSECA *et al.*, 2012). Os clones contendo as sequências codificantes das *SI-Pectinases*, identificados na biblioteca de cDNA do inseto, foram nomeados de MBL_slevis_libr_001H05 e MBL_slevis_libr_005E03 respectivamente para *SI-PME* e *SI-EndoPG*. O DNA plasmidial dos clones foi multiplicado via clonagem das células, crescidas em 5 ml de meio líquido LB-Broth a 37 °C, 250 rpm durante 16 horas. Posteriormente extraiu-se o DNA plasmidial utilizando o kit SV Minipreps - DNA Purification System (Promega) segundo instruções do fabricante. A partir do DNA extraído foi possível o sequenciamento das ORFs (Open reading frames) utilizando-se os *primers* M13-Forward e M13-Reverse, os quais hibridizam no plasmídeo flanqueando o fragmento de interesse, o DYEnamic ET Dye Terminator kit e a plataforma de sequenciamento MEGABace 1,000 Flexyble DNA Sequencer (GE Healthcare). A reação de sequenciamento consistiu aproximadamente de 100 ng de DNA, 0,5 pmol de *primer*, 4 µl do MIX do kit e água destilada para um volume final de 10 µl. Somente com os *primers* M13 não foi possível a completa caracterização do clone MBL_slevis_libr_005E03, pois a sequência central do cDNA permaneceu desconhecida. Para tal objetivo, construiu-se um *primer* interno, *Primer_Endopg_interno* (Tabela A1), o qual nos permitiu obter a sequência completa do cDNA codificante para *SI-EndoPG*.

3.2 Análise da estrutura primária das *SI-Pectinases*

As ORFs completas foram comparadas com outras pectinases contidas no banco de dados do NCBI após submissão das sequências no algoritmo Blastx sob parâmetros da matriz original. Também foi realizada a predição da estrutura primária das enzimas *SI-PME* e *SI-EndoPG* a partir da tradução da sequência nucleotídica das referidas ORFs. As sequências de aminoácidos foram avaliadas quanto à presença de sítios de glicosilação e quanto a peptídeo sinal através dos softwares online NetNGlyc 1.0 (GUPTA; JUNG *et al.*, 2004), NetOGlyc 1.0 (JULENIUS; MOLGAARD *et al.*, 2005), PSORT II (HORTON; NAKAI *et al.*, 1997) e SIGNALP 4.0 (PETERSEN; BRUNAK *et al.*, 2011).

3.3 Construção dos vetores de expressão

As ORFs, excluindo a região codificante para o peptídeo sinal, foram amplificadas por PCR com uso de *primers* específicos contendo sítios de restrição selecionados para correta clonagem no vetor de expressão. Deste modo, a ORF da *SI-PME* foi amplificada com os *primers* Primer_Expressão_PME_Forward_(PstI) e Primer_Expressão_PME_Reverse_(NotI) e a ORF de *SI-EndoPG* com os *primers* Primer_Expressão_Endopg_Forward_(EcoRI) e Primer_Expressão_Endopg_Reverse_(NotI) (Tabela A1). Os sítios de restrição selecionados correspondem aos mesmos dos vetores de expressão e direcionam a inserção das ORFs de modo a mantê-las *em fase* com a sequência do Fator- α e da cauda de histidina. Os plasmídeos de expressão selecionados foram o pPicZ α B e o pPicZ α A respectivamente para *SI-PME* and *SI-EndoPG*. Entretanto, para manter *em fase* o inserto *SI-PME* com o plasmídeo, foi necessário desenhar o *primer* Primer_Expressão_PME_Forward_(PstI) com a adição de dois nucleotídeos (GA) na extremidade 5' anterior ao sítio de restrição. Essa adição, juntamente com mais um G do plasmídeo, acarreta na adição de uma glicina no N-Terminal da proteína recombinante. Escolheu-se a inserção de uma glicina por este ser um aminoácido neutro e, portanto, espera-se que haja menor interferência na configuração original da proteína nativa.

A PCR foi conduzida com 50 ng de DNA molde (DNA plasmidial extraído dos clones *MBL_slevis_libr_001H05* e *MBL_slevis_libr_005E03*); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1x PCR buffer (20 mM Tris HCl) pH 8.4; 1.5 mM de MgCl₂ e 50 mM de KCl; 0,4 μ M de cada *primer* e 1 U de DNA polimerase "High Fidelity" (Invitrogen) em uma reação de 25 μ L. A ciclagem utilizada foi 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, e 1 min a 72 °C; com uma etapa final de 10 min a 72 °C. Após separação dos fragmentos em gel de agarose 1% e TAE 1X, as bandas correspondentes à massa molecular esperada foram recortadas e purificadas em kit PCR Clean-up System kit (Promega). Os *amplicons* purificados e os plasmídeos de expressão foram tratados com as enzimas de restrição correspondentes seguindo as instruções do fabricante (Fermentas). Os produtos digeridos foram avaliados em gel de agarose 1% e TAE 1X, purificados por kit e quantificados em Nanodrop spectrophotometer (ND-1000). Posteriormente realizou-se a ligação dos *amplicons* com os respectivos plasmídeos em uma reação de 30 μ L contendo aproximadamente 120 ng de plasmídeo, 200 ng de inserto, 1 x tampão de ligação e 1 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen), *overnight* a 16 °C.

Os vetores de expressão recombinantes, denominados de *pPicZαB_SI-PME* e *pPicZαA_SI-EndoPG*, foram multiplicados via clonagem em células de *Escherichia coli*. Para isso transformou-se células quimio-competentes (*E.coli* - DH5α) com os vetores recombinantes. Para a transformação foram usados 7 μL da reação de ligação adicionados em 200 μL de células DH5α quimio-competente, seguido da incubação por 90 s a 42 °C e 1 min em gelo; posteriormente adicionou-se 800 μL de meio LB-Broth e incubou-se a 37 °C, 300 rpm durante 45 min. Foram usados 50 μL da mistura para inocular placas contendo 15 mL de meio LB-Broth ágar Low salt e 25 μg/mL de antibiótico Zeocina. As placas foram incubadas por 20 horas a 37 °C e as colônias isoladas foram analisadas por PCR de colônia, onde se confirmou a presença do gene alvo integrado no vetor de expressão. Essa colônia foi multiplicada em meio líquido adequado e após extração do DNA plasmidial, realizou-se o sequenciamento dos vetores recombinantes, por onde foi confirmada a correta inserção *em fase* do gene no plasmídeo.

3.4 Análise da estrutura primária das *SI-Pectinases* Recombinantes

As sequências codificantes para as *SI-Pectinases* Recombinantes foram traduzidas em sequências de aminoácidos, as quais foram avaliadas quanto à massa molecular, pI e presença de sítios de glicosilação. A análise foi realizada como descrito no item 3.2.

3.5 Obtenção das leveduras *Pichia pastoris* recombinantes

Com o intuito de se obter células de *P. pastoris* recombinantes para os genes *SI-Pectinases*, foram produzidas células competentes da cepa *KM71H* segundo manual EasySelect™ *Pichia*Expression kit (Invitrogen). A transformação das células competentes foi realizada a partir do vetor recombinante purificado e previamente linearizado com a enzima de restrição Pme (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. Deste modo, aproximadamente 1 μg de vetor linearizado foi adicionado em 40 μL de células competentes, após a homogenização, as células foram incubadas em gelo por 5 min. Em seguida, as células foram eletroporadas em cubetas de 0,2 cm a 1,5 Kv, 25 μF e 200 Ω. Adicionou-se 1 mL de sorbitol 1M, e incubou-se a 30 °C por 2 h sem agitação. Posteriormente inoculou-se as células crescidas em placas de Petri contendo meio YEPDS acrescidos de 100 μg/mL e 500 μg/mL de Zeocina.

As colônias mais isoladas foram homogeneizadas em solução SDS 0,2% e aquecidas por 3 min a 90 °C. Conduziu-se uma PCR de colônia com 2 µL da solução fervida como DNA molde e 0,1% de Triton x-100 acrescidos na reação final. O resultado da PCR foi analisado em gel de agarose 1% e 22 colônias recombinantes positivas, para o gene de interesse, foram selecionadas para expressarem a proteína recombinante.

3.6 Seleção de transformantes hiperprodutores das enzimas recombinantes

Para selecionar dentre as 22 colônias recombinantes qual produz de fato a proteína de interesse e em maior quantidade, realizou-se o processo de indução de expressão do gene alvo em pequena escala. Tal procedimento foi conduzido em placa 24-well, segundo método descrito por Boettner *et al.* (2002) com modificações. Como controles negativos do experimento, um poço foi isento de inoculação e outro inoculado com levedura contendo o plasmídeo isento do gene alvo. Para a indução, uma quantidade de massa celular foi crescida em 3 mL de meio complexo com glicerol tamponado (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1,34% YNB, 4 x10⁻⁵% de Biotina, 100 mM fosfato de potássio ph 6,0, 1% de glicerol), por 48h, a 30°C e 250 rpm (D.O entre 2 e 6). Posteriormente, o sobrenadante foi substituído por 2 mL de meio complexo com metanol tamponado (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1,34% YNB, 4 x10⁻⁵% de Biotina, 100 mM fosfato de potássio ph 6,0, 0,5% de metanol), incubando a 30°C e 250 rpm. Em intervalos de 24h, até 144h, foi adicionado metanol absoluto a uma concentração final de 0,75%. Os sobrenadantes foram recuperados e analisados em SDS-PAGE 12% (SAMBROOK; FRITSCH *et al.*, 2001) e também por *Western Blotting* com anticorpo anti His-Tag.

As leveduras que mostraram maior produção das proteínas recombinantes foram selecionadas para o processo de indução em maior escala.

3.7 Produção e purificação das enzimas recombinantes

Para ambas as *SI-Pectinases* uma única colônia foi selecionada para a produção da proteína recombinante em maior escala. Desse modo, cresceu-se as células em 25 mL de meio BMGY por 24h a 250 rpm, em seguida utilizou-se dos 25 ml para inocular 500 mL de meio BMGY, o qual incubou-se por 24h a 250rpm. Posteriormente realizou-se a precipitação das células e troca do meio por 100 mL de

meio BMMY. Incubou-se por 144h a 250 rpm adicionando-se metanol absoluto ao meio em uma concentração final de 0,75%. Após término das 114 h o meio foi deslevedurado, por centrifugação, filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Millipore) e purificado. A purificação por cromatografia de afinidade foi conduzida a partir de coluna de resina sílica carregada com 5 mL de níquel (His-Link, Promega), na qual as proteínas ficam aderidas pela cauda de histidina. Para a coleta das proteínas, lavou-se a coluna com soluções tampão de concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). Após coleta, as amostras foram analisadas em SDS PAGE 12%, por onde se selecionou para diálise as frações que apresentaram maiores concentrações da proteína desejada.

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

3.8 Análise de glicosilação das *SI-Pectinases* recombinantes

As enzimas recombinantes, *SI-PME* e *SI-Endo-PG* purificadas, foram tratadas com as N-glicosidases Endo H; PNGase F e com a O-glicosidase Endo-α-N-Acetyl-galactosaminidase acrescido de Neuraminidase (BioLabs) segundo instruções do fabricante. Para cada tratamento um controle negativo (reação isenta de glicosidase) foi realizado. Posteriormente as amostras foram analisadas em SDS PAGE 12% quanto à massa molecular.

3.9 Ensaio qualitativo de atividade enzimática

Em análise de atividade qualitativa das *SI-Pectinases* recombinantes as enzimas puras foram testadas em meio sólido contendo substratos específicos. Em placa de *Petri* preparou-se meio tamponado (100 mM de acetato de sódio pH 5,0) contendo 1% de ágar e 1% de ácido poligalacturônico (Sigma). Em outra placa, o ácido poligalacturônico foi substituído por 1% de pectina 70-75% esterificada (Sigma). Amostras de 10 µl contendo 7 µg de *SI-PME*, *SI-EndoPG* recombinantes e um mix (7 µg de cada) foram aplicadas sobre pontos específicos na superfície dos meios. As

placas foram incubadas a 40 °C por 3 h, em seguida coradas por 20 minutos com solução 0,2% de Congo Red (Vetec) e descorada em solução NaCl 1M. A atividade enzimática das *SI-Pectinases* foi avaliada pela presença ou ausência de halos de alteração no substrato.

3.10 Caracterização enzimática da *SI-EndoPG*

3.10.1 Seleção do método e padronização das reações

Os ensaios de atividade da *SI-EndoPG* foram baseados na quantificação de extremidades redutoras formadas na cadeia pectica após ação da enzima. Todavia aplicou-se o método “DNS” proposto por Miller (1959) com modificações no preparo das reações e o método de Ruller (2006) na quantificação de açúcares redutores gerados. A solução DNS (ácido-3,5-dinitrossalicílico) foi preparada com 32,9 mM de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 350 mM de hidróxido de sódio, 76,6 mM de tartarato de sódio e potássio, 0,54% de fenol e 30 mM de metabissulfito de sódio dissolvidos em de água destilada. A quantificação foi obtida por absorbância em 540 nm utilizando-se o espectrofluorímetro de placa PerkinElmer 1420 Multilabel Counter.

Realizou-se curvas de velocidades iniciais para padronizar a reação quanto à quantidade de substrato, quantidade de enzima e tempo de reação. A reação enzimática constitui-se de 45 µl de substrato 1% dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 5 µl de enzima em diversas diluições. Primeiramente a reação foi pré-incubada a 40 °C por 10 min antes que fosse adicionada a enzima. Posteriormente a reação permaneceu incubada em mesma temperatura com freqüente agitação, atingido o período determinado, a enzima era inativada pela adição de 100 µl da solução DNS. A mistura foi fervida 5 min a 100 °C, esfriada em gelo por 1 min, diluída 1,5 vezes em água destilada e quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. O procedimento foi conduzido em placa com 10 reações, sendo a atividade destas inativada a cada 3 min partindo-se do tempo T= 0 min para a primeira reação. Cada reação foi realizada em triplicata e para cada triplicata havia um controle negativo (reação isenta de enzima), cujo valor foi descontado nos valores de cada triplicata, para que os artefatos gerados no método fossem desconsiderados do valor absoluto. Após análise da curva optou-se por padronizar as reações com 7 nmol de enzima, 0,9% de substrato e 10 min de duração (Figura 9). Todos os ensaios

enzimáticos para determinar pH, temperatura e parâmetros cinéticos foram conduzidos em triplicatas e com controles negativos, assim como descrito acima.

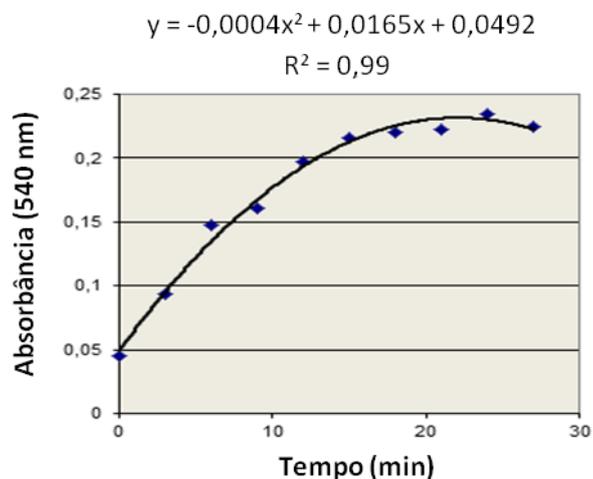


Figura 9. Curva de velocidades iniciais para SI-EndoPG. Reações com 0,9% de ácido poligalacturônico em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 7 nM de SI-EndoPG recombinante purificada. Cada ponto corresponde a quantidade de produto gerado no determinado tempo de reação.

3.10.2 Determinação de pH ótimo, temperatura ótima e termoestabilidade

Para determinar as condições ótimas de atividade da SI-EndoPG, foram testadas diferentes faixas de pH e temperatura a partir das reações padronizadas. Na determinação de pH ótimo, a temperatura foi mantida constante a 45 °C e diferentes valores de pH foram testados. Os seguintes tampões a 100 mM com as respectivas faixas de pH foram usados: Citrato de sódio de 2,5 a 4,0; Acetato de sódio de 4,0 a 6,0; MES de 6,0 a 7,0 e Tris de 7,0 a 9,0. Na determinação da temperatura ótima, o pH foi mantido constante em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e diferentes temperaturas de incubação entre 20 e 70 °C foram testadas em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Para avaliar a termoestabilidade, incubou-se a enzima por 1 h nas temperaturas 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C antes de adicioná-la à reação padronizada sob condições ótimas de pH e temperatura já estabelecidas. Posteriormente, a atividade residual foi mensurada.

Os valores foram determinados com base na atividade relativa entre os diferentes tratamentos, deste modo, o ponto que apresentou maior valor de absorbância foi dito como 100% de atividade naquela análise e tomado como referência para o cálculo proporcional dos demais pontos. Cada ponto da curva é

gerado a partir da média das triplicatas já descontadas o valor do controle negativo. Para definição dos valores de pH e temperatura ótimos, todos os dados gerados foram analisados pelo modelo estatístico “soma de duas distribuições Gaussiana”, com intervalo de confiança igual a 95%, via software GraphPad Prism 5.0. A curva de termoestabilidade foi determinada pelo mesmo software, mas sem uso de modelo estatístico. As curvas que apresentaram valores de R^2 maior que 0,96 foram consideradas confiáveis.

3.10.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros V_{max} , K_m e K_{cat} foram determinados para dois substratos distintos, ácido poligalacturônico e pectina de citrus 20-34% esterificada (Sigma), usando monômeros de D-(+)-ácido galacturônico monohidratado (Sigma) (MAG) como padrão. O mesmo ensaio mostrou-se ineficiente para o substrato pectina de maçã 70-75% esterificada (Sigma), pois a enzima não mostrou atividade.

Primeiramente, foi necessária a construção de uma curva padrão para converter os valores de absorbância em quantidade de produto gerado. Soluções de acetato de sódio 100 mM pH 5,0 com concentrações crescentes e conhecidas de MAG, foram mensuradas pelo método “DNS” e seus valores usados para obtenção da curva padrão (Figura 10). Todos os 10 pontos da curva padrão foram obtidos pela média das triplicatas, após valor descontado do controle negativo (solução isenta de açúcar).

O experimento foi realizado a partir das reações padronizadas, nas condições ótimas de pH e temperatura, com concentrações crescentes de substrato. Inicialmente aumentou-se a concentração dos substratos de 0,1 to 1,5 mg/mL variando de 0,3 mg/mL e, posteriormente, de 2 a 17 mg/mL variando de 1 mg/mL. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em quantidade de MAG (μM), através da equação da reta $y = 0,0499x + 0,00166$ referente a curva padrão. Posteriormente, obteve-se para cada ponto, os valores de velocidade enzimática ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) através da relação $V = x_{\text{MAG}}/t$, onde t é igual 600 s (duração da reação). Os dados foram analisados segundo modelo de Michaelis Menten através do software GraphPad Prism 5.0.

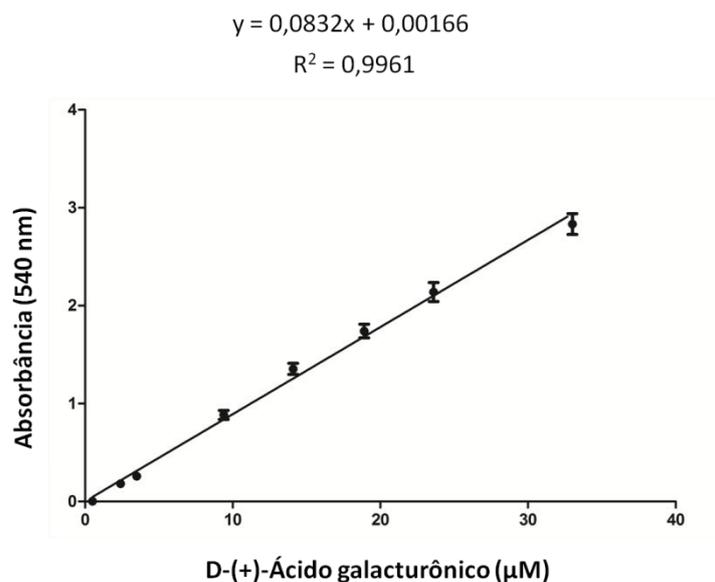


Figura 10. Curva padrão. A figura representa a curva padrão construída para converter os valores de absorbância em quantidade de produto gerado. A curva foi obtida através de soluções de concentrações crescentes de D-(+)-Ácido galacturônico (Sigma), mensuradas pelo método “DNS”. Cada ponto corresponde a média da triplicata com valor descontado do controle negativo (solução isenta de açúcar).

3.11 Análise comparativa entre *SI-Pectinases* e outras pectinases descritas

Com o intuito de se verificar os pontos similares e os diferentes dentre a estrutura primária das *SI-Pectinases* e das outras já descritas na literatura, realizou-se o alinhamento múltiplo das sequências homólogas pelo software online Multialin (CORPET, 1988 a, b). As sequências de amino ácidos a serem comparadas foram selecionadas a partir de duas abordagens: A- obteve-se as sequências homólogas, depositadas no banco de dados do NCBI, que apresentaram maior similaridade (valor de identidade máxima maior que 34%) em análise de Blastx com os parâmetros da matriz original; B- realizou-se uma busca no banco de dados do NCBI das sequências homólogas que representassem organismos de reinos distintos (arqueobactérias, bactérias, fungos e plantas) e quando do mesmo reino, privilegiou-se as sequências de gêneros divergentes. Ao todo 36 sequências foram analisadas para PME e 34 sequências para Endo-PG (Tabela A2 em anexo). Os dados gerados foram analisados quanto a domínios conservados e função, baseando-se em trabalhos sobre estrutura-funcional das pectinases.

3.12 Construção das árvores filogenéticas

As árvores filogenéticas *SI-PME* e *SI-EndoPG* foram construídas em colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues do Departamento de Bioquímica e Microbiologia (IB/UNESP, Campus de Rio Claro, SP). A partir sequências homólogas selecionadas na etapa anterior, um alinhamento múltiplo foi gerado pelo software MUSCLE v. 3.8.31 (EDGAR, 2004a; b). Em seguida, o alinhamento foi inspecionado e editado manualmente utilizando BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Realizou-se a reconstrução filogenética utilizando o algoritmo de Neighbour Joining (SAITOU; NEI, 1987). Para calcular as distâncias entre as sequências foi aplicado o modelo de Poisson para *SI-PME* e *SI-EndoPG*. As árvores foram inferidas utilizando-se MEGA 5.0 (TAMURA *et al.* 2011), implementando taxa uniforme entre os sítios. Regiões apresentando *gaps* ou *missing data* foram excluídas. Foram utilizadas 1.000 pseudo-réplicas de *bootstrap* para acessar o suporte das clades. As árvores geradas foram editadas em Adobe Illustrator v. 6.0.

3.13 Análise de códons preferenciais

Através do software online GCUA: “General Codon Usage Analysis” (MCLNERNEY; 1997) realizou-se a análise de códons preferenciais das ORFs das *SI-Pectinases*; de sequências homólogas a elas e de sequências das principais enzimas digestivas do inseto *S. levis* em fase larval. As sequências homólogas foram selecionadas a partir dos organismos utilizados na construção das árvores filogenéticas. As sequências das enzimas digestivas do inseto foram fornecidas pelo Dr. Fernando Fonseca Pereira de Paula responsável pela construção e análise da biblioteca de cDNA das larvas do referido inseto.

Ao todo foram analisadas 10 sequências homólogas para cada gene e 10 sequências da biblioteca, além das sequências *SI-PME* e *SI-EndoPG*. A partir do resultado do software, montou-se uma tabela, na qual se comparou a frequência de cada códon das *SI-Pectinases* com as frequências apresentadas pelas demais sequências.

3.14 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico a partir do corpo gorduroso de larvas do *S. levis* foi conduzida segundo métodos descritos por Bishoff, Lawrence (1990) e Franklin, Young (1997) com modificações. Na obtenção de material isento de contaminação externa (DNA exógeno) todo procedimento foi realizado com máscaras; luvas sem talco; utensílios, ponteiros de filtros e soluções autoclavados; em ambiente asséptico e isento de ventilação. Para evitar contaminação interna (DNA de endossimbiontes), durante a dissecação foi extraído apenas corpo gorduroso, o qual não estava em contato direto com o tubo intestinal.

Aproximadamente 2-3 mg de tecido foram solubilizados em 700 µL de Tampão salino (150 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,2% SDS) e tratados com 15 µL de proteinase K (10 mg/mL), seguido de incubação a 60 °C, 300 rpm durante 5 h. Adicionou-se a mistura, 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e incubou-se por 30 min a 37 °C e 300 rpm, posteriormente, centrifugou-se a 15.000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde os ácidos nucleicos foram precipitados com adição de 0,1V de acetato de sódio 3M pH 5,8 e 1 mL de etanol absoluto, seguido de centrifugação a 4 °C, 15.000 g por 15 min. O *pellet* foi três vezes lavado com etanol 70%, re-centrifugado e brevemente secado antes de ser ressuspenso em 50 µL de água destilada estéril. A solução contendo DNA genômico foi tratada com RNase (20 mg/mL) a 37 °C, 300 rpm por 30 min e estocada a -20 °C.

A integridade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose 1 % com TAE 1X (Figura A3 em anexo); e sua quantificação em Nanodrop spectrophotometer (ND-1000).

3.15 Análise das regiões ribossomais 16S e ITS

Para checar a qualidade do DNA genômico quanto à contaminação por DNA de micro-organismos, promoveu-se análise das regiões ribossomais 16S e ITS (Internal Transcribed Spacer) por PCR com *primers* específicos para essas regiões. O gene 16S rDNA, codificante para a subunidade menor do RNA ribossômico está presente, ao menos uma cópia no genoma, em todos os procariotos (WANG e QIAN, 2009). Dentro da sequência deste gene, há regiões hipervariáveis, usadas na taxonomia e identificação bacteriana, nas quais os *primers* específicos para 16S se hibridizam. A região ITS localizada no DNA ribossomal nuclear (nrDNA), tem sido usada para taxonomia e identificação entre espécies eucarióticas (HSIAO; CHATTERTON *et al.*,

1994; ARLORIO; COISSON *et al.*, 1999; NISHIKAWA; OKAZAKI *et al.*, 1999; LI; ALEXANDER *et al.*, 2002; ZHANG; CAI *et al.*, 2002; YUAN; LI *et al.*, 2004).

Para a análise 16S ribossomal de procariotos foi realizada PCR com o par de *primers* Primer_787F e Primer_1492R, os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 800 pb. Para a análise ITS ribossomal foi realizado PCR com par de *primers* (Primer_ITS1 e Primer_ITS4), os quais amplificam fragmentos de tamanho distintos para cada espécie. O experimento constituiu-se de amostras de DNA extraídas da gordura; um controle positivo (amostra de DNA extraída do tubo intestinal das larvas) e um controle negativo (reação isenta de DNA). Na análise ITS ribossomal, um controle positivo extra (amostra contendo DNA de *P. pastoris*) foi adicionado ao experimento. A reação de 25 µL foi provida de 80 ng de DNA molde; 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1x PCR buffer (20 mM Tris HCl) pH 8.4; 1.5 mM de MgCl₂ e 50 mM de KCl; 0,8 µM de cada *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). O protocolo começou com 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, e 1 min a 72 °C; com uma etapa final de 10 min a 72 °C. Os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% com TAE 1X.

A análise dos resultados foi baseada no padrão de ausência e presença de bandas para o experimento 16S e no padrão de diferença entre tamanho dos *amplicons* para o experimento ITS. As bandas apresentadas na análise ITS foram coletadas, purificadas, clonadas em DH5α, sequenciadas e analisadas em BLASTn.

3.16 Análise das *SI-Pectinases* genômicas

Em busca de possíveis introns dentro das sequências genômicas das *SI-Pectinases*, foi realizada a amplificação desses genes por PCR. Na reação foi usado combinações dos *primers forward* e *reverse*, previamente construídos (Tabela A1) para a obtenção dos vetores de expressão e das análises de expressão gênica diferencial por qRT-PCR. A posição dos *primers* hibridizados ao gene alvo, assim como as combinações realizadas, pode ser observada no esquema abaixo referente a ambos os genes *SI-PME* e *SI-EndoPG* (Figura 11).

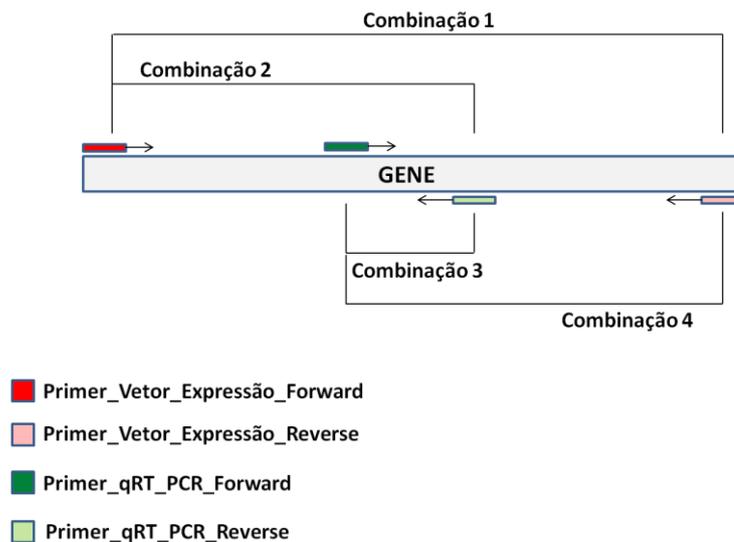


Figura 11. Posicionamento dos *primers* sobre o gene alvo e combinações dos mesmos para PCR. A figura esquematiza a posição onde os *primers*, usados nas PCRs, hibridizam ao gene alvo. Os *primers* construídos para obtenção dos vetores para expressão da proteína recombinante e os *primers* construídos para a análise de expressão gênica diferencial, distinguem entre si de acordo com a legenda. As combinações 1, 2, 3 e 4 são referentes ao par de *primers* usados nas PCRs, com o intuito de se verificar a presença de introns nos genes alvo.

Deste modo o experimento constou, para cada combinação de *primer*, de: uma reação contendo DNA genômico do inseto livre de contaminação por outros genomas; um controle positivo (reação com cDNA sintetizado, vide item 5.17.1) e um controle negativo (amostra isenta de DNA). A PCR de 25 μ L foi provida de 80 ng de DNA molde; 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1x PCR buffer (20 mM Tris HCl) pH 8.4; 1.5 mM de $MgCl_2$ e 50 mM de KCl; 0,4 μ M de cada *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). O protocolo começou com 95 $^{\circ}$ C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 $^{\circ}$ C, 1 min a 54 $^{\circ}$ C, e 3 min a 72 $^{\circ}$ C; com uma etapa final de 10 min a 72 $^{\circ}$ C.

O produto das reações foi analisado em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 0,5X e os fragmentos com maior massa molecular esperada foram coletados, purificados e sequenciados. As sequências obtidas foram comparadas, por alinhamento, com as sequências das ORFs correspondentes.

3.17 Análise de expressão gênica diferencial das *SI-Pectinases*

3.17.1 Extração do RNA total e síntese do cDNA

Todo experimento, desde a extração do RNA até a obtenção dos resultados, foi realizado segundo descrito por Fonseca e colaboradores em 2011. Portanto, foi analisada a expressão gênica das *SI-Pectinases* ao longo de sete fases de desenvolvimento do inseto, assim como em seis diferentes tecidos de larvas com 30 dias de vida.

Primeiramente, extraiu-se o RNA total de ovos; larvas de 10, 20 e 30 dias após eclosão dos ovos; pré-pupas; pupas e insetos adultos fêmeas. A extração foi realizada individualmente para cada inseto, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. A partir de um *pool* de quatro larvas de 30-dias, promoveu-se também, a extração de RNA total dos tecidos: cabeça, hemolinfa, carcaça, corpo gorduroso, intestino médio e intestino posterior. Na dissecação das larvas, essas foram lavadas externamente com álcool 70% e tampão TBS 1X (50 mM de Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM de NaCl); imobilizadas em gelo por 5 min e os tecidos coletados sob condições de total assepsia.

As amostras de RNA extraídas foram tratadas com DNase I Amplification grade (Invitrogen), em uma reação de 2 µg/µl de RNA total, para prevenir contra possível contaminação de DNA genômico. A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1,5% usando tampão TBE 0,5X e a quantificação por espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000).

Na síntese do cDNA foi usado como molde um *pool* representativo de 600 ng de RNA tratado, contendo quantidades iguais de amostras de diferentes espécimes no mesmo estágio de desenvolvimento. Para a síntese de cDNA dos ovos, foram usados 600 ng de RNA tratado de um *pool* de 10 ovos. O cDNA foi obtido em 20 µL de reação contendo 600 ng de RNA molde e 0,5 µg de Oligo dT (x15), seguindo as instruções do fabricante do kit Improm II Reverse Transcription System kit (Promega).

3.17.2 Padronização das reações

A análise de PCR em tempo real foi realizada com o kit Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todavia, foi necessário primeiramente a padronização das reações quanto ao tamanho do *amplicon* gerado, temperatura de *melting*, especificidade dos *primers*, concentração de *primers* e cDNA molde.

Para tal objetivo, construiu-se os *primers* específicos (Tabela A1) para amplificação de uma região dos genes *SI-PME*, *SI-EndoPG* e GAPDH (glicerol-3-fosfato desidrogenase). Os *primers* foram desenhados de modo a flanquear um fragmento de aproximadamente 100 pb com temperatura de *melting* igual a 54 °C. Para testar a especificidade dos *primers*, foi realizada uma PCR utilizando-se o cDNA do intestino médio como molde. A Figura 12 mostra o produto das reações de PCR analisado em gel de agarose 1,5% com TBE 0,5X, onde se verificou a presença de uma banda única para cada reação, satisfazendo, portanto, o quesito especificidade dos *primers*.

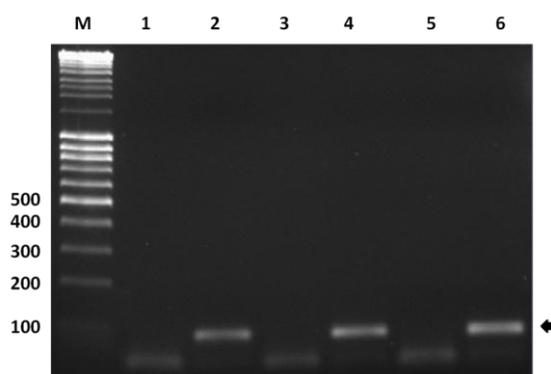


Figura 12. Especificidade dos *primers* a serem usados nas análises de qRT-PCR. Os *primers*, *Primer_qRT_PCR_PME_Forward*; *Primer_qRT_PCR_PME_Reverse*; *Primer_qRT_PCR_Endopg_Forward*, *Primer_qRT_PCR_Endopg_Reverse*, *Primer_qRT_PCR_GAPDH_Forward* e *Primer_qRT_PCR_GAPH_Reverse*, construídos para análise de expressão gênica diferencial das *SI-Pectinases* por qRT-PCR foram avaliados quanto a especificidade. A figura mostra o gel de agarose 1,5% com TBE 0,5X, onde foram aplicadas o produto das reações e a seta indica a posição dos *amplicons* gerados. M: Marcador de massa molecular, Gene Ruler (Invitrogen); 1: *SI-PME*; 2: Controle negativo para *SI-PME*; 3: *SI-EndoPG*; 4: Controle negativo para *SI-EndoPG*; 5: GAPDH; 6: Controle negativo para GAPDH.

Posteriormente, promoveu-se uma curva de eficiência, onde visa que as concentrações dos reagentes satisfaçam a seguinte condição: a cada ciclo que se complete a quantidade de *amplicons* deve dobrar. Para atingir essa meta, diluições seriadas de cDNA e *primers* foram testadas em reação contendo 5 µL de Syber Green PCR Master Mix, 0,4 µL de cada *primer*, 1 µL de cDNA molde e 3,2 µL de água. Portanto, a partir de uma solução estoque de 1 µg/µL de cDNA preparou-se soluções 1x, 0,1x, 0,2x, 0,5x e 0,01x. Na determinação da quantidade de *primers*, testou-se primeiramente a concentração 0,4 µM. Os testes foram feitos em triplicata e com um controle negativo (reação isenta de cDNA). Das reações analisadas, a que atendeu as especificações desejadas foi: cDNA 1x e 0,4 µM de cada *primer*. A curva mostrou eficiência maior que 95%; slope $-3,0 < 3,6$ e $R^2 > 95\%$.

3.17.3 qRT-PCR

Selecionou-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Livak e Schmittgen em 2001, para análise da expressão dos genes *SI-Pectinases* entre as diferentes amostras do inseto. Este método baseia-se na diferença entre a variação de expressão do gene alvo com a variação do gene calibrador, posteriormente gerando um valor relativo da quantidade de *amplicons* entre as amostras analisadas. Utilizou-se o gene GAPDH como calibrador, pois este tem expressão constitutiva, agindo no metabolismo intermediário dos insetos (BEWLEY; RAWLS *et al.*, 1974) e correspondeu aos parâmetros de padronização do experimento (SCHARLAKEN; DE GRAAF *et al.*, 2007).

O experimento foi conduzido da seguinte forma: para cada fase de desenvolvimento ou tecido específico foram preparadas reações em triplicata em análise dos genes *SI-PME*, *SI-EndoPG* e GAPDH, sendo que para cada triplicata um controle negativo (amostra isenta de cDNA molde) foi adicionado. As reações obedeceram aos parâmetros previamente padronizados, segundo descrito no item anterior. Os valores de CT obtidos para as amostras foram descontados dos respectivos valores de CT referente ao gene calibrador, gerando o dado ΔCT de cada amostra. O menor valor de ΔCT , observado entre os estágios de desenvolvimento, foi considerado igual a 1X e tomado como referência para o cálculo relativo da expressão ($\Delta\Delta CT$) entre os demais estágios. Na análise entre os tecidos específicos, tomou-se o maior valor de ΔCT como igual a 1X para o cálculo de $\Delta\Delta CT$ dos demais tecidos.

3.18 Ensaio de imunodeteção por *Western Blotting*

Anticorpos, produzidos em camundongos, foram obtidos a partir das enzimas *SI-Pectinases* recombinantes. Os camundongos albinos Suíços de aproximadamente 20 dias de idade foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de São Carlos, campus – São Carlos, onde permaneceram até data do sacrifício.

Para tal objetivo, 50 μg de enzima purificada foi adicionada em 50 μL de Freund's adjuvante completo (Sigma) para um volume final de 100 μL , o qual foi usado para inocular o camundongo. Uma segunda dose foi aplicada após 45 dias, com 50 μg de enzima purificada em solução final de 100 μL , contendo 50 μL de Freund's adjuvante incompleto (Sigma). Após 15 dias o camundongo foi sacrificado para coleta de sangue, do qual foi extraído o soro por centrifugação a 2.700 g a 4 °C por 10 min. O soro (sobrenadante) foi transferido para micro-tubos 1,5 mL (Eppendorf) e armazenados em 4 °C.

A partir dos mesmos tecidos, dos quais se extraiu o RNA total, foi também extraído o extrato bruto protéico com uso do reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em BCA kit (Thermo Scientific) seguindo as recomendações do fabricante.

O ensaio de imunodeteção das *Sl-Pectinases* foi promovido pelo método Western blotting. Dessa forma, cada experimento constou de amostras de extrato bruto protéico (aproximadamente 4 µg em 12 µL de água); um controle positivo (0,25 µg de enzima recombinante purificada) e 8 µL de Marcador de massa molecular (Bench Marck - Invitrogen). As amostras e o controle positivo foram desnaturados em 6 µL de Tampão de amostra 3X, a 100 °C por 6 min, sendo todo volume aplicado em gel. As amostras em SDS-PAGE 12% foram submetidas à eletroforese (150 mA) por 2 h, posteriormente transferidas em membrana de PVDF. A transferência foi conduzida por eletro-blotting a 150 mA por 2 h em tampão de transferência (200 mM de Tris-HCl, 50 mM de glicina e 20% de metanol). A membrana foi corada com 50 mL de solução Pouceou (250 µL de Ponceou S - Merck, 50 µL de ácido acético em 4,7 mL de água destilada) para marcação das bandas. Descorou-se a membrana com água e em seguida incubou-se *overnight* a 4 °C em solução de bloqueio (50 mL de TBS 1X, pH 8,0 acrescido de 2,5 g de leite em pó desnatado Molico - Nestlé). Lavou-se a membrana com TBS 1X até remover todo excesso de solução de bloqueio, depois se incubou, por 2 horas sob leve agitação, em solução 1:2.500 de anticorpo primário (soro extraído do camundongo). Repetiu-se a lavagem da membrana com TBS 1X e em seguida incubou-se, por 2 horas sob leve agitação, com solução 1:10.000 de anticorpo secundário (Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase – Sigma). Após lavagem com TBS 1X, revelou-se a membrana com 2 mL de NBT-BCIP substrate for Alkaline Phosphatase (Pierce).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização completa dos clones das *SI-Pectinases*

A obtenção das sequências completas das ORFs *SI-Pectinases* foi realizada com sucesso a partir do sequenciamento dos clones MBL_slevis_libr_001H05 e MBL_slevis_libr_005E03. O cDNA *SI-PME* apresentou uma sequência de 10 nucleotídeos referente à UTR5' e 56 nucleotídeos referente à UTR3', sinal de poliadenilação (AATAAA) e cauda poli-A, o que indica procedência eucariótica. A ORF *SI-PME* contém 1.158 pb codificantes para 386 aminoácidos. Em relação ao cDNA *SI-EndoPG* não foi possível a identificação do UTR5' e cauda poli-A. Entretanto, parte do UTR3' (63 pb) foi identificado e a ORF completa foi obtida, a qual apresenta 1.092 pb codificantes para 364 aminoácidos. As Figuras A1 e A2 em anexo, mostram as sequências obtidas referentes aos clones MBL_slevis_libr_001H05 e MBL_slevis_libr_005E03 respectivamente.

Após análise em Blastx das ORFs *SI-Pectinase* completas, verificou-se maior similaridade com pectinases de outros insetos pragas. A *SI-PME* apresentou maior similaridade com as pectinases dos insetos *S. oryzae* (máxima identidade igual 75%) e *Dendroctonus ponderosae* (máxima identidade igual 74%), todavia, as próximas sequências homólogas com maior similaridade a *SI-PME* são todas de origem bacteriana (máxima identidade entre 65 e 34%).

O Blastx da ORF *SI-EndoPG* também indicou maior similaridade com *S. oryzae* e *D. ponderosae*, incluindo mais quatro insetos pragas, *Chrysomela tremula*, *Gastrophysa viridula*, *Leptinotarsa decemlineata* e *Phaedon cochleariae* (todos com máxima identidade maior que 49%), sendo que as sequências seguintes são predominantemente de origem fúngica.

A similaridade das PME's de insetos com as PME's de bactérias, assim como a similaridade das Endo-PGs de insetos com as Endo-PGs de fungos, já havia sido notada por Shen e colaboradores em 2003 e 2005, que sugeriram a hipótese de transferência horizontal. De acordo com Shen e colaboradores em 2003, não há relatos da atividade de PME's e Endo-PGs em animais de taxonomia mais primitiva que os insetos, assim como não há indícios da presença desses genes no genoma de *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* e do bicho-da-seda. Entretanto havia mesmo naquela época fortes indícios de atividade pectinolítica em coleópteros. Esses fatos levaram Shen e colaboradores a propor que a origem é

proveniente de uma transferência horizontal entre bactérias endossimbiontes no caso da PME; e entre fungos endossimbiontes para o caso da Endo-PG.

4.2 Análise *in silico* da estrutura primária das *SI-Pectinases*

As preditas sequências de aminoácidos das *SI-Pectinases* (Figura 13) obtidas por tradução das ORFs, foram analisadas quanto a peptídeo sinal, ponto isoelétrico e sítios de glicosilação. Para ambas as *SI-Pectinases* foi observado a presença de uma pré-região referente a um putativo peptídeo sinal composto por 16 resíduos de aminoácidos para *SI-PME* e 19 para *SI-EndoPG*. A análise da sequência primária da *SI-PME* revelou uma proteína madura (excluindo peptídeo sinal) de aproximadamente 40 kDa com *pI* igual 6,83, um sitio de N-glicosilação (⁵⁴NHTD⁵⁷) e um sitio de O-glicosilação (³³⁸Thr). A mesma análise para *SI-EndoPG* revelou uma proteína de aproximadamente 36 kDa com *pI* igual a 8,77, quatro sitios de N-glicosilação (¹⁸²NSSG¹⁸⁵, ²¹²NLTC²¹⁵, ²³⁹NVTF²⁴¹ e ³⁴⁰NWSG³⁴³) e nenhum sitio de O-glicosilação.

<i>SI-PME</i>	1	MKIIIVLLPVLVALACAN <u>Q</u> NPPGTSSRPILTASEANYTTKEKYLQGWSPPS	50
	51	ISTNHTDYTVGGGGYSTIQAAVNDAINAGGSNRKYIKINTGTYQQVVYIP	100
	101	NTNVPLTIYGAGSRPDNTVITLNMPAQTTPSAYKNLVNPNDAFFKPGDPA	150
	151	YSIYNGCASSSGTIGTSCSTVFWLAPNVQIVNLQIQNSAKNKGDDQAVA	200
	201	LQTNSDRIQVHNVNLLGHQDTLCAGSGGTDQIAHYTNTYIEGDIDYVFG	250
	251	GGTAIFESCTFYSKADRKNDESVIFAPDTPHQMYGYLVIKSTITGDSA	300
	301	SSSKKVYLGRSWDAGVKSANAYVPGTSPNGQLVIRETT <u>I</u> NGIVPNSAPWT	350
	351	TATSGRAYAGNAANSRDLNNQNFNRFWHEYANTGSGA	386
<i>SI-EndoPG</i>	1	MNLLVASLLLVVARAAAY ATPAVGASCTVSSYNDVAGAVSSCTSITLKG	50
	51	TVPAGKALIMKLKSGTTVKVAGTIKFAVSEWKGPLVEISGSKITFSGAGG	100
	101	YFDGQGASYWDGQDKGKTKPKFFRIKTTGGSHFNNIKLLNCPHQCVSIN	150
	151	PASDTHLTDWTVDSAGDSKGGKNTDGFDL <u>S</u> NSSGITIKHAVVKNQDDCV	200
	201	AVNQGSHYVFQNLTC <u>S</u> GGHGLSLSVGSQSSQGNPNTVK <u>NVTF</u> SDCTVTNS	250
	251	RNGIHVKTHNDAGTGAI SDVTYKNIKLSGITNYGINIQEDYENGGSSGNP	300
	301	KANIPI SKLNLQSVTGSMSSGSSMPVYILCGSNGCENN <u>NWSG</u> VSIGNGK	350
	351	KKNSCNYKPSGFSC	364

Figura 13. Estrutura primária deduzida das *SI-Pectinases* nativas. A figura mostra a predição das sequências de aminoácidos das enzimas *SI-PME* e *SI-EndoPG*. Os aminoácidos destacados em negrito indicam um possível peptídeo sinal para secreção extracelular. Os resíduos sublinhados referem-se aos prováveis sitios de glicosilação.

A presença de um peptídeo sinal na extremidade N-terminal de ambas as *SI-Pectinases* e os sítios de glicosilação indicam que essas enzimas são glicoproteínas não citoplasmáticas, portanto são secretadas da célula para agirem em outro local. Essas mesmas características foram verificadas em EDPCV de outros insetos pragas (PAUCHET; WILKINSON *et al.*, 2010).

4.3 Vetores recombinantes para expressão heteróloga

Como a análise prévia da estrutura primária das *SI-Pectinases* mostrou possíveis sítios de glicosilação e ligações de dissulfeto, optou-se pela produção das proteínas recombinantes em sistema eucarioto para satisfazer algumas das modificações pós-traducionais necessárias, deste modo, aumentando a probabilidade de se obter ao final do processo enzimas funcionais. Para isso construiu-se vetores recombinantes para expressão em levedura *Pichia pastoris*.

Os vetores pPicZαB_ *SI-PME* e pPicZαA_ *SI-EndoPG* foram construídos e clonados. A Figura 14 mostra o resultado da PCR de colônia para as DH5α transformadas com os vetores recombinantes. Para o vetor pPicZαB_ *SI-PME*, das quatro colônias transformadas que foram selecionadas para PCR mostram-se positivas para a presença do vetor desejado. No caso do vetor pPicZαA_ *SI-EndoPG*, 10 colônias mostram-se positivas e duas negativas, ou seja, contendo apenas o plasmídeo não ligado a ORF *SI-EndoPG* de interesse.

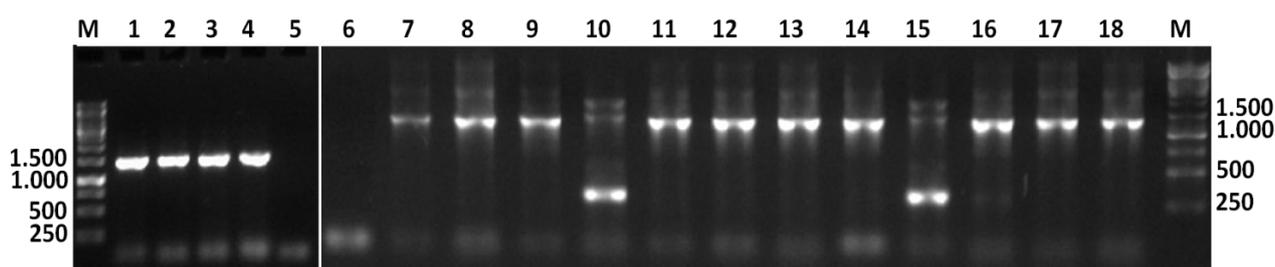


Figura 14. Análise das colônias DH5α recombinantes. A figura mostra os géis onde os produtos da PCR de colônia foram separados por eletroforese. Na PCR utilizou-se os *primers* Fatorα e AOX3', os quais se hibridizam no plasmídeo. M: Marcador de massa molecular GeneRuler 1 kB (Fermentas); 1-4: Amostras de colônias recombinantes para *SI-PME*; 5: Controle negativo para PCR *SI-PME* (Amostra isenta de DNA molde); 6: Controle negativo para PCR *SI-EndoPG* (Amostra isenta de DNA molde); 7-18: Amostras de colônias recombinantes para *SI-EndoPG*.

Para prosseguir os experimentos, as colônias 1 e 9 foram selecionadas para serem multiplicadas e conseqüentemente para multiplicação dos vetores recombinantes. Após extração do DNA plasmidial dessas colônias, foi realizado o sequenciamento do vetor recombinante onde se verificou a correta inserção das ORFs no plasmídeo. A Figura 15 mostra o seqüenciamento da região do vetor recombinante onde a ORF está inserida em fase com as seqüências codificantes para o peptídeo sinal, Fator- α , e a cauda de histidina.

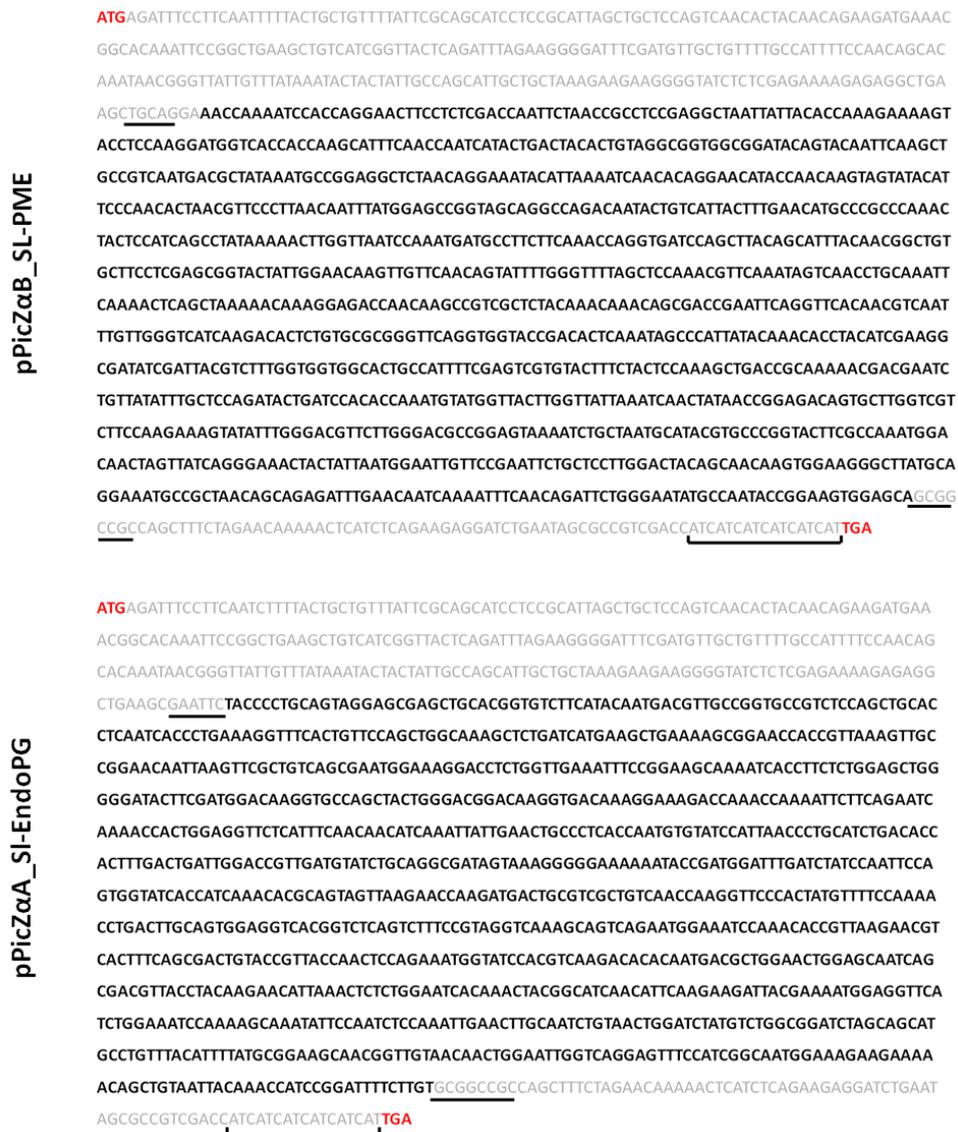


Figura 15. Vetores de expressão. A figura ilustra a região dos vetores recombinantes pPicZ α B_SI-PME e pPicZ α A_SI-EndoPG que contem as ORFs SI-PME e SI-EndoPG respectivamente. As trincas de nucleotídeos destacados em vermelho indicam os códons de início e de terminação na síntese da enzima recombinante. A ORF, isenta das seqüências codificantes para o peptídeo sinal e códon de terminação nativos, está ressaltada em preto. Os nucleotídeos sublinhados reference aos sítios de restrição usados na clonagem dos vetores recombinantes. A chave em preto indica a seqüência codificante para seis resíduos de aminoácidos, conhecidos como cauda de histidina.

As sequências codificantes para as *SI-Pectinases* Recombinantes foram traduzidas em sequências de aminoácidos destas enzimas. A Figura 16 mostra a estrutura primária das *SI-Pectinases* Recombinantes, em que a proteína madura nativa é acrescida de um peptídeo sinal e da cauda de histidina. Na figura também são destacados os pontos de clivagem no peptídeo sinal, pelas peptidases da própria levedura *P. pastoris*, e os sítios de glicosilação. Pode-se observar que em ambas as *SI-Pectinases* há a adição de três sítios de N-glicosilação provenientes do plasmídeo de expressão. Entretanto esses sítios localizam-se anteriormente ao sítio de clivagem, deste modo, não se espera que essas glicosilações extras estejam presentes na proteína secretada. A análise *in silico* dessas enzimas, excluindo o peptídeo sinal, revelam para *SI-PME* Recombinante uma proteína de aproximadamente 43 kDa com *pI* igual a 6,4, e para *SI-EndoPG* Recombinante, uma proteína de 39,5 kDa com *pI* igual a 8,36.

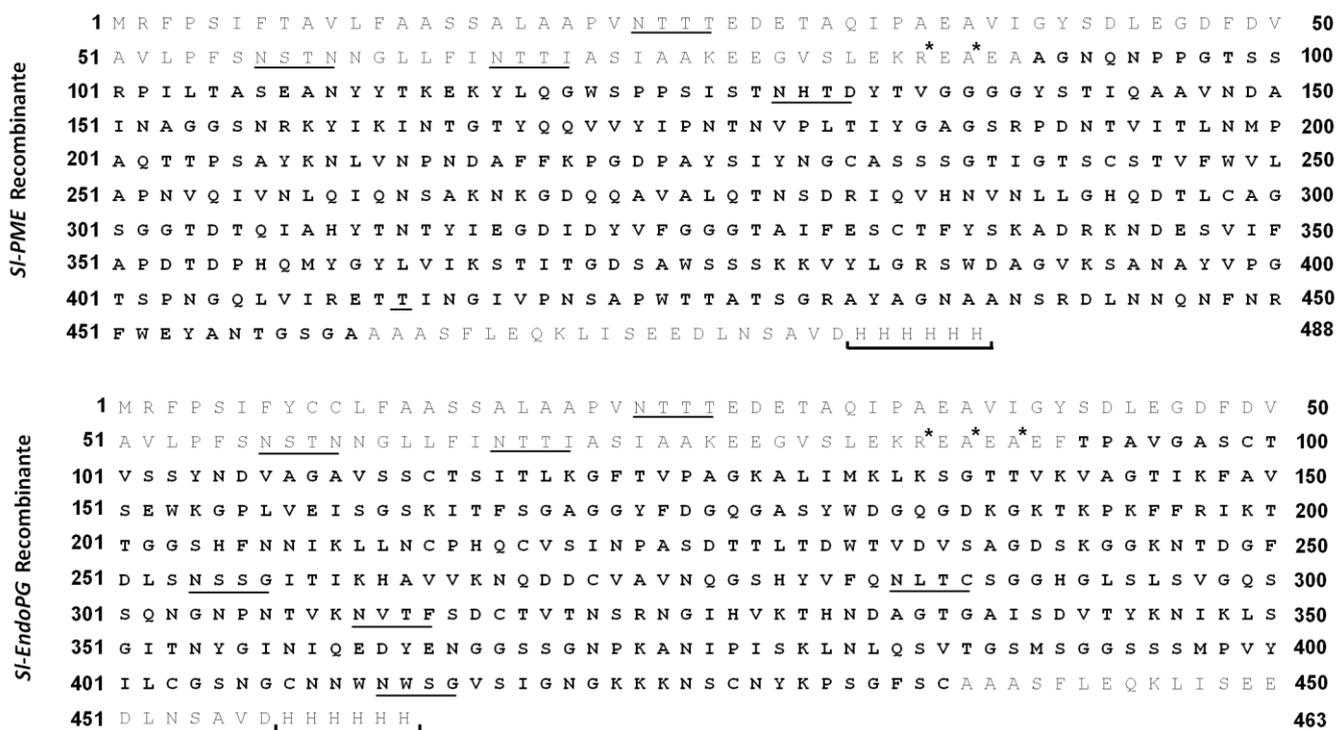


Figura 16. Estrutura primária deduzida das *SI-Pectinases* Recombinantes. Os aminoácidos destacados em negrito são referentes à proteína madura nativa, enquanto os aminoácidos em cinza são de origem do plasmídeo de expressão. O peptídeo sinal se encontra na extremidade N-terminal da enzima, e é clivado pelas peptidases da levedura nos pontos indicados pelos asteriscos. Os sítios de glicosilação são destacados pelos aminoácidos sublinhados e a cauda de histidina, na extremidade C-terminal, é indicada por uma chave.

4.4 Leveduras *Pichia pastoris* (KM71H) recombinantes

A transformação das leveduras *P. pastoris* KM71H com os vetores recombinantes linearizados ocorreu de forma bem sucedida. Diversos clones recombinantes foram obtidos para ambas as *SI-Pectinases*, de maneira que 22 colônias recombinantes para cada enzima foram selecionadas para o *screening*. A Figura 17 mostra parte do resultado da PCR de colônia, onde 10 clones recombinantes, tanto para *SI-PME* quanto para *SI-EndoPG*, foram identificados e selecionados. Outros 12 clones recombinantes para cada enzima foram selecionados (dados não mostrados) para o *screening*.

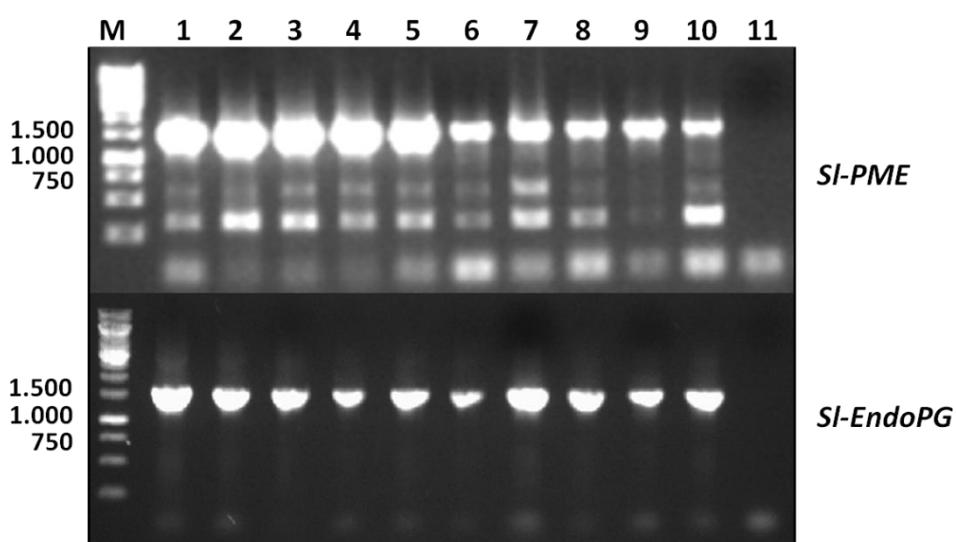


Figura 17. PCR de colônia para KM71H recombinantes. A figura mostra os géis onde os produtos da PCR de colônia foram separados por eletroforese. Na PCR utilizou-se os *primers* AOX5' e AOX3', os quais se hibridizam no plasmídeo. M: Marcador de massa molecular GeneRuler 1 kB (Fermentas); 1-10: Amostras de colônias recombinantes para *SI-PME*; 11: Amostra isenta de DNA molde.

4.5 Transformantes hiperprodutores das enzimas recombinantes

Ao final do *screening* identificou-se, para ambas as *SI-Pectinases* Recombinantes, vários clones com potencial para produção da enzima recombinante em maior escala. Observa-se pela Figura 18 que a maioria das leveduras selecionadas está expressando a proteína recombinante como desejado, e que essa tem sido secretada para o meio de cultura graças ao peptídeo sinal Fator- α , atendendo às nossas expectativas.

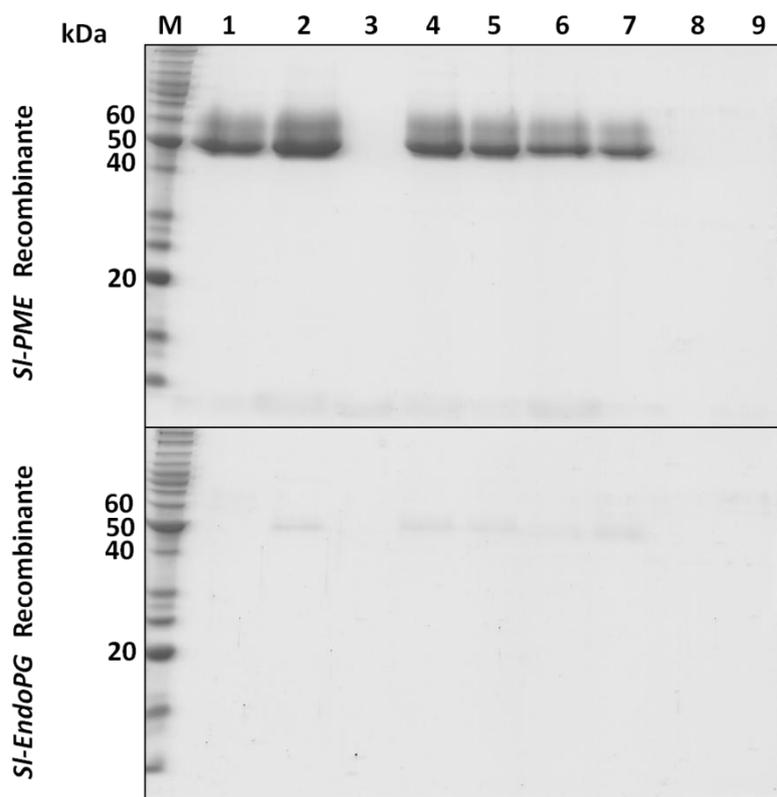


Figura 18. Seleção de transformantes hiperprodutores das *SI-Pectinases* Recombinantes. A seleção de *KM71H* transformantes hiperprodutores das enzimas recombinantes foi realizada em menor escala em placa 24-well. A figura mostra parte do resultado do *screening*, onde alguns clones que estão de fato expressando a proteína de interesse são identificados. M: Marcador de massa molecular Bench Mark (Invitrogen); 1-7: Sobrenadante dos meios inoculados por leveduras recombinantes; 8: Sobrenadante do meio não inoculado, 9: Sobrenadante do meio inoculado com *KM71H* transformada com vetor não recombinante (isento do gene alvo).

Nota-se pela Figura 18 que nem todos os clones expressam a proteína de interesse, assim como também se observa que alguns clones expressam mais que outros. Esse resultado é esperado, pois não se sabe exatamente quantas cópias do gene de interesse é inserido no genoma da levedura ou mesmo a localização exata da inserção, de forma que dependendo desses fatores, o gene pode ser mais expresso, menos expresso ou até reprimido. Por aparentar maior nível de expressão, tanto para *SI-PME* quanto para *SI-EndoPG* Recombinantes, selecionaram-se os clones 2 para produção das proteínas recombinantes em maior escala.

4.6 Produção e purificação das enzimas *SI-Pectinases* Recombinantes

A expressão das *SI-Pectinases* Recombinantes em uma escala maior foi realizada com sucesso. As Figuras 19 e 20 mostram o processo de indução ao longo de 144 horas, respectivamente para a *SI-PME* e *SI-EndoPG* Recombinantes. Como esperado no tempo 0 h não se observa a presença das proteínas desejadas, pois até referido momento não havia sido adicionado o agente indutor, metanol. Após 24 horas de exposição ao metanol já se observa a síntese da enzima de interesse e, também, que ao final das 144 horas a quantidade de proteína aumentou consideravelmente.

Em ambas as enzimas recombinantes, nota-se que a massa molecular está acima do esperado pela predição *in silico*. As bandas em gel indicam uma proteína de aproximadamente 50 kDa para *SI-PME* Recombinante, ou seja, cerca de 7 kDa a mais que o esperado. Para *SI-EndoPG* Recombinante verifica-se duas bandas de massa molecular bastante similares, sendo as duas por volta de 50 kDa, ou seja, cerca de 10 kDa a mais que o esperado. Esse resultado indica que as enzimas de interesse sofreram modificações pós-traducionais que elevaram sua massa molecular. Como a análise *in silico* revelou sítios de glicosilação, sugere-se que as proteínas estejam glicosiladas por manose, pois é sabido que a levedura *P. pastoris* frequentemente adiciona de 8 a 14 monômeros deste açúcar em cada sítio de N-glicosilação e ocasionalmente nos sítios de O-glicosilação (GRINNA; TSCHOPP, 1989; TSCHOPP *et al.*, 1987).

Sugere-se também que a *SI-EndoPG* Recombinante tem dois padrões de glicosilação distintos, em que uma porção das proteínas sintetizadas são mais intensamente glicosiladas que outra porção, o que acarreta na presença de duas bandas bem definidas em gel.

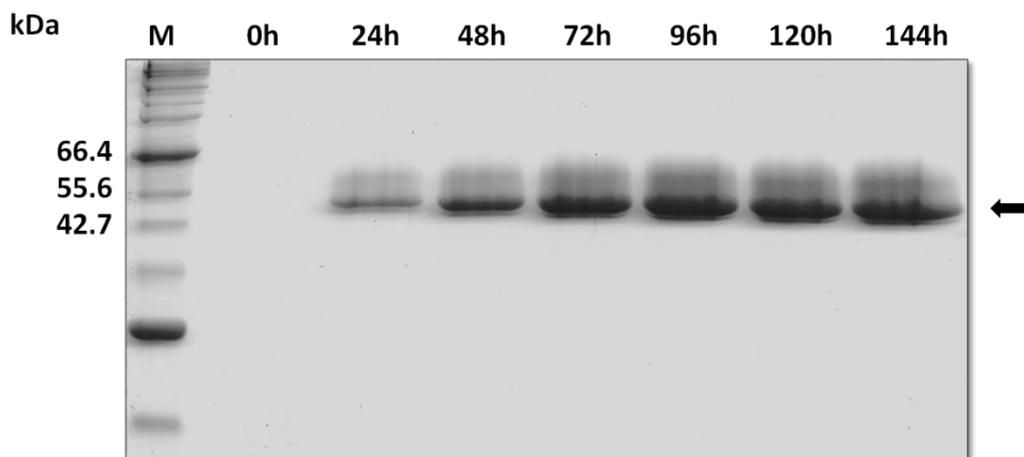


Figura 19. Produção da *SI-PME* Recombinante. A partir do meio de indução onde a levedura recombinante expressa a *SI-PME* Recombinante foram coletadas alíquotas desleveduras, as quais foram analisadas em SDS PAGE 12%. M: Marcador de massa molecular Protein Marker – Broad (Biolabs); 0-144h: tempo de exposição ao metanol, o agente indutor; a seta indica a posição da proteína recombinante.

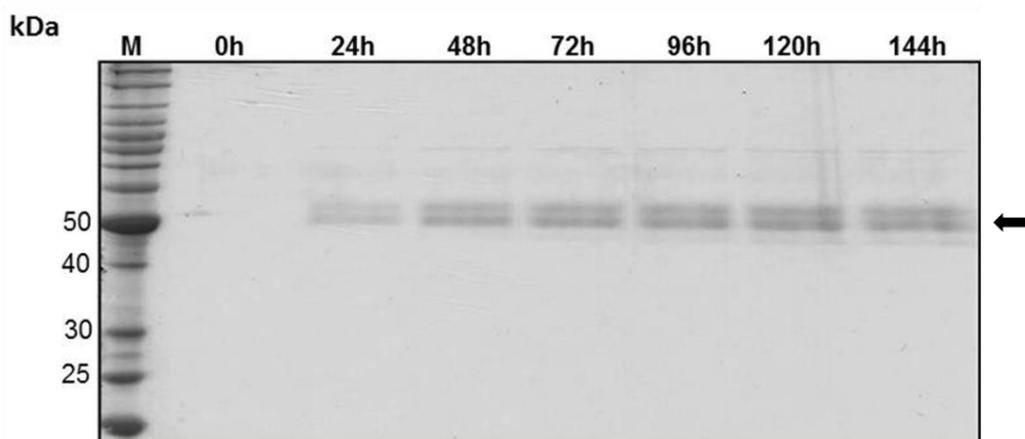


Figura 20. Produção da *SI-EndoPG* Recombinante. A partir do meio de indução onde a levedura recombinante expressa a *SI-EndoPG* Recombinante foram coletadas alíquotas desleveduras, as quais foram analisadas em SDS PAGE 12%. M: Marcador de massa molecular Bench Marck (Invitrogen); 0-144h: tempo de exposição ao metanol, o agente indutor; a seta indica a posição da proteína recombinante.

Grande quantidade de proteína pura foi obtida após processo de purificação em coluna de afinidade com Ni^{+2} . A Figura 21 mostra as frações purificadas das *SI-Pectinases* Recombinantes, em que se selecionou para diálise as frações 75A, 75B, 100A e 100 B para ambos os casos. A partir da quantificação das proteínas dialisadas realizou-se o cálculo de rendimento de proteína obtida por litro de cultura de indução. O resultado obtido foi de 830 e 201 mg/L respectivamente para *SI-PME* e *SI-EndoPG* Recombinantes, demonstrando alto rendimento no processo.

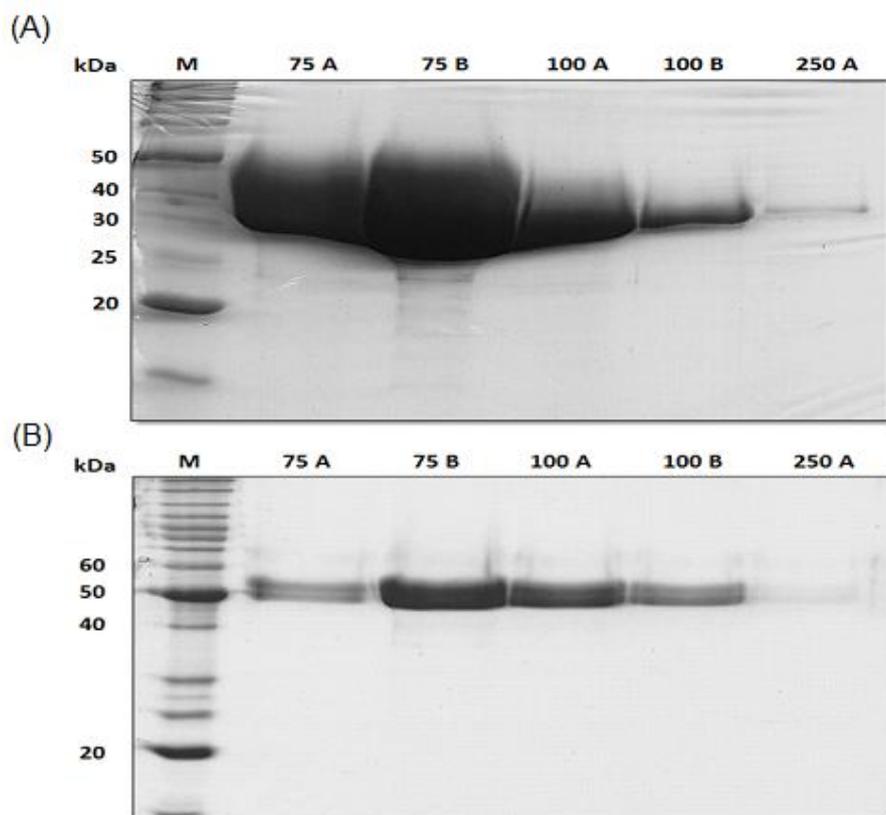


Figura 21. *SI-Pectinases* Recombinantes purificadas. Gel (A) referente à *SI-PME* Recombinante; gel (B) referente à *SI-EndoPG* Recombinante; M: marcador de massa molecular Bench Marck (Invitrogen); 75A-250A: frações purificadas em coluna de afinidade carregada com Ni^{+2} , coletadas a partir das diferentes concentrações de imidazol (de 75 mM a 250 mM) indicadas na figura.

4.7 Deglicosilação das *SI-Pectinases* recombinantes

Devido o fato das *SI-Pectinases* Recombinantes terem apresentado indícios de glicosilação, essas foram tratadas com glicosidases do tipo N e do tipo O. O resultado dos tratamentos é indicado na Figura 22, onde se comprova que a hipótese proposta estava correta, ou seja, as *SI-Pectinases* Recombinantes estão de fato glicosiladas. Em cada tratamento observa-se que há redução da massa molecular em relação à enzima não-tratada. Esse resultado é válido até mesmo para o tratamento com O-glicosidase, mostrando que, mesmo que em eventos pouco frequentes, a levedura *P. pastoris* realiza essa modificação pós-traducional.

Outra hipótese que se confirma é da *SI-EndoPG* Recombinante ter dois padrões distintos de glicosilação, tendo em vista que quando tratada com N-glicosidases ela assume uma única banda em gel de tamanho mais reduzido que a não-tratada. Pode-se inferir também que esses dois padrões de glicosilação distintos

se devem a glicosilações do tipo N, pois quando tratadas com O-glicosidases ainda se observa duas bandas de massas moleculares similares entre si.

Entretanto há um fato intrigante para *SI-EndoPG* Recombinante, pois em análise *in silico* não foi detectado a presença de sítios para O-glicosilações, embora após tratamento com O-glicosidases tenha se observado sua redução na massa molecular. Acredita-se, portanto, que há ao menos um sitio de glicosilação do tipo O que não tenha sido detectado pelo software utilizado.

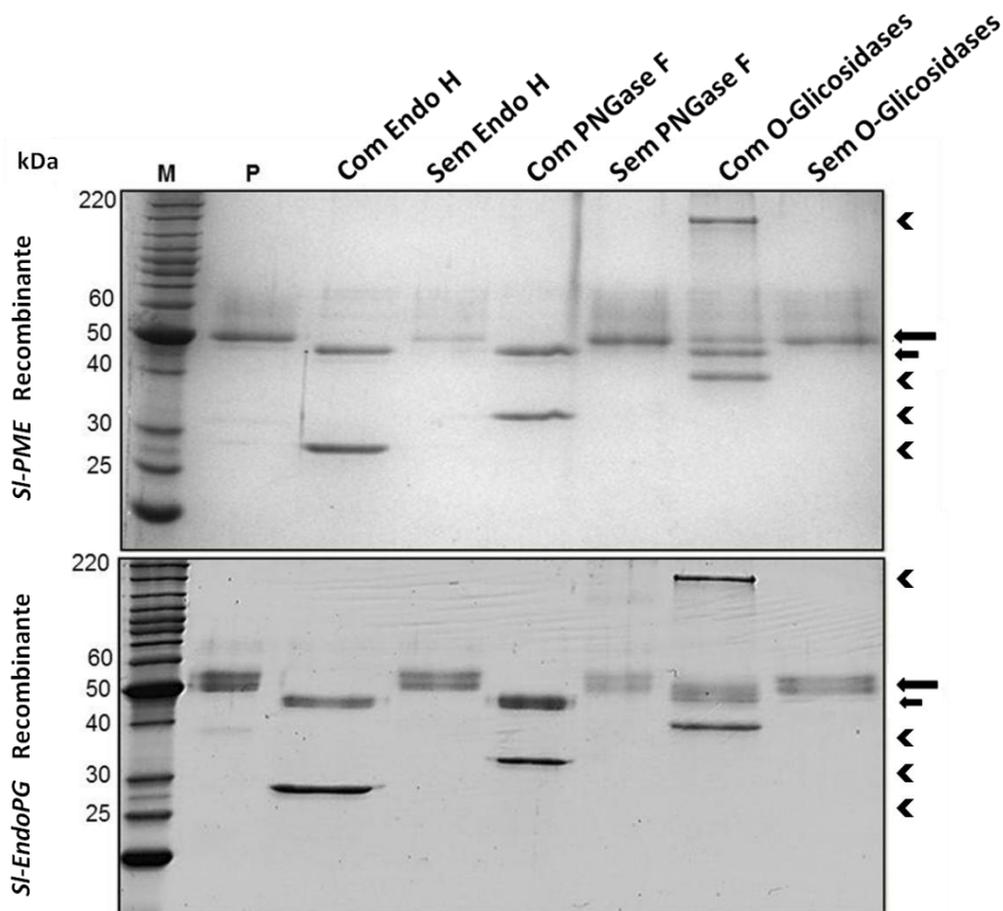


Figura 22. Deglicosilação das *SI-Pectinases* Recombinantes. As enzimas recombinantes purificadas foram tratadas com as N-glicosidases EndoH e PNGase F e com as O-glicosidases, de ação conjunta, Endo- α -Acetyl e neuraminidase. A seta maior indica a posição da enzima não-tratada e a seta menor a posição aproximada da enzima após tratamento. A cabeça-de-seta indica as glicosidases usadas nos tratamentos indicados. M: marcador de massa molecular Bench Marck (Invitrogen); P: enzima purificada não-tratada. Os prefixos “com” e “sem” se referem ao tratamento com a determinada glicosidase e sua respectiva reação controle (isenta da glicosidase).

4.8 Ensaio qualitativo de atividade enzimática

As duas enzimas mostram-se ativas, tendo em vista a presença de halos de alteração de substrato nas placas, especificamente sobre os pontos em que houve a aplicação das amostras (Figura 23). Observa-se que na placa A não há ação da enzima *SI-PME* Recombinante, pois o substrato já se encontra ausente de esterificação, entretanto, nessa mesma placa, nota-se intensa atividade da *SI-EndoPG* Recombinante que degrada o substrato. Na placa B, contendo substrato altamente esterificado, observa-se que a *SI-PME* Recombinante isolada altera a coloração do meio indicando atividade. A mudança na cor do meio é ocasionada pela variação de pH em consequência da liberação de H^+ , devido à ação da enzima sobre os grupos metílicos. A ação conjunta da *SI-EndoPG* com *SI-PME* Recombinantes mostrou-se mais eficiente na degradação do substrato altamente esterificado, quando comparado com a ação isolada da *SI-EndoPG*. Este resultado corrobora com vários outros trabalhos que descrevem uma maior afinidade das Endo-PGs pela pectina não-esterificada, ou seja, após a ação da PME (JANSEN; MACDONNELL, 1945; PRESSEY; AVANTS, 1982).

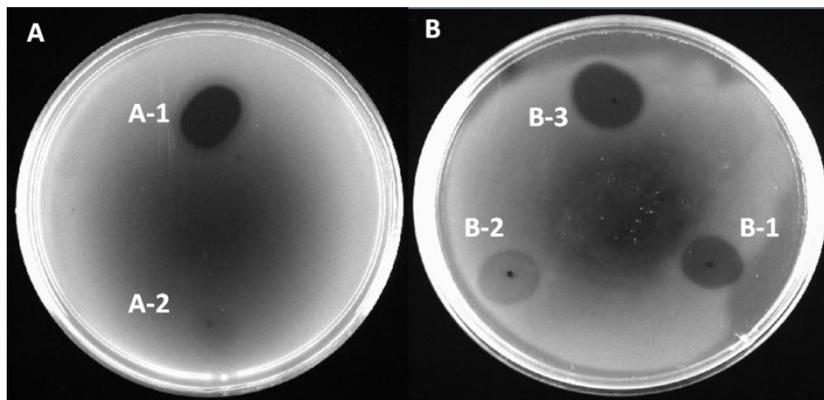


Figura 23 Ensaio qualitativo de atividade das *SI-Pectinases* Recombinantes. Placa A contém 1% de ácido poligalacturônico (Sigma). Placa B contém 1% de pectina 70-75% esterificada. A-1 e B-1: Aplicação da *SI-EndoPG* Recombinante; A-2 e B-2: Aplicação da *SI-PME* Recombinante; B-3: Aplicação do MIX contendo ambas as *SI-Pectinases* Recombinantes.

4.9 Atividade ótima e termoestabilidade da *SI-EndoPG* Recombinante

A *SI-EndoPG* Recombinante foi caracterizada com sucesso quanto a pH e temperatura ótimos, assim como sua termoestabilidade. Os resultados apresentados na Figura 24 revelam que a enzima possui atividade ótima na faixa de pH $5,06 \pm 0,27$ e temperatura em $49,74 \pm 2,49$ °C. O valor obtido para pH ótimo caracteriza essa enzima como uma Endo-PG ácida, cuja característica é bastante visada nas indústrias de vinhos, suco de frutas e outros processamentos vegetais (ZHENG; SHETTY, 2000; KASHYAP; VOHRA *et al.*, 2001; PEDROLLI; MONTEIRO *et al.*, 2009). A temperatura ótima de atividade da *SI-EndoPG* Recombinante também é favorável a esse setor (GOMES; UMSZA GUEZ *et al.*, 2007).

Entretanto, nota-se que essa enzima tem baixíssima termoestabilidade (Figura 24), pois sua atividade reduz drasticamente quando exposta por uma hora em temperaturas superiores a de armazenamento, 4 °C. Em uma hora a 20 °C tem-se a perda de 40% da atividade original e a 36 °C de incubação, a atividade residual restringe-se a menos de 10%. Essa característica é bastante desvantajosa nos processos industriais em que tratamentos com altas temperaturas são frequentemente aplicados. Tendo em vista que, de forma geral, processos conduzidos em elevadas temperaturas têm menor risco de contaminação por micro-organismos indesejáveis. Elevadas temperaturas também favorecem a solubilidade dos reagentes e produtos, assim como redução da viscosidade do meio. Mais especificamente no setor de processamento de sucos e outros produtos vegetais, onde as Endo-PGs ácidas são mais empregadas, a elevada temperatura é usada em várias etapas por diversas finalidades, sendo que em cada etapa há a necessidade de se resfriar o meio até 50 °C para atuação da enzima (GOMES; UMSZA GUEZ *et al.*, 2007). A alta termoestabilidade da enzima, portanto, é uma característica bastante desejada, pois reduziria custos na refrigeração do meio em cada etapa. Todavia, com procedimentos de mutações sítio-dirigidas, acredita-se que o caráter termo-instável da *SI-EndoPG* Recombinante, possa ser contornado gerando um produto de alto interesse comercial.

A partir da análise das condições ótimas de atividade para *SI-EndoPG* Recombinante, outro aspecto interessante deve ser ressaltado: a semelhança com a atividade das pectinases de fungos. Embora haja alguns exemplos de pectinases alcalinas produzidas por fungos (HOONDAL; TIWARI *et al.*, 2002), as pectinases fúngicas geralmente são mais eficientes em pH ligeiramente ácido e temperaturas entre 30 e 50 °C (ZHENG; SHETTY, 2000; UENOJO; PASTORE, 2007). Por outro lado, as pectinases alcalinas geralmente têm origem bacteriana (PEDROLLI; MONTEIRO *et al.*, 2009).

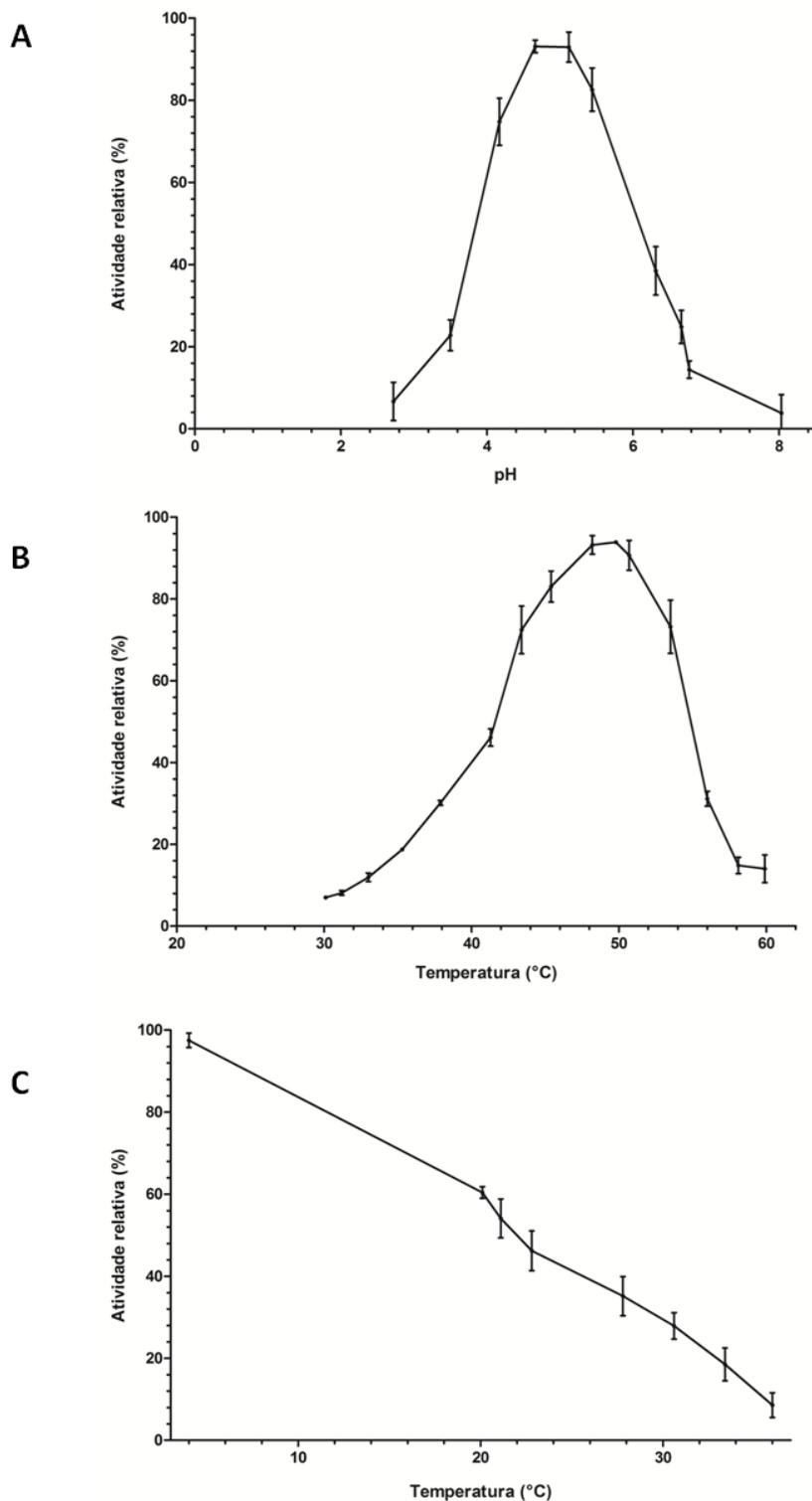


Figura 24. Caracterização enzimática da *SI-EndoPG* Recombinante. As reações constavam de 0,9% de ácido poligalacturônico e 7 nmol da enzima purificada. A: Curva de determinação do pH ótimo, onde a temperatura foi mantida constante a 45 °C e diferentes valores de pH foram testados usando-se diversos tampões a 100 mM. B: Curva de determinação de temperatura ótima, onde o pH foi mantido constante em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e diferentes temperaturas de incubação entre 20 e 70 °C foram testadas. C: Curva de determinação de termoestabilidade, onde se incubou a enzima por 1 h nas temperaturas 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C antes de medir sua atividade.

4.10 Parâmetros cinéticos da *SI-EndoPG* Recombinante

Os parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e K_{cat} foram determinados para dois substratos distintos, ácido poligalacturônico isento de grupos metílicos e pectina de fruta cítrica 20-34% esterificada. Como já mencionado, o mesmo ensaio não foi eficiente para o substrato pectina de maçã 70-75% esterificada, pois não foi detectada atividade da enzima no tempo determinado para a reação padronizada. Esse resultado não é incomum, pois diversos trabalhos na literatura descrevem a baixa afinidade das despolimerases por substratos com alto grau de metoxilação (JANSEN; MACDONNELL, 1945; PRESSEY; AVANTS, 1982; CRELIER; ROBERT *et al.*, 2001; ANTUNES; GONÇALVES *et al.* 2006). Além disso, a baixa afinidade pelo substrato altamente esterificado já havia sido previamente notada no ensaio qualitativo (item 6.8).

As Figuras 25 A e B representam as curvas de Michaelis Menten realizadas para os substratos: ácido poligalacturônico e pectina de fruta cítrica. Como observado na figura, as curvas não detêm da região estacionária, onde o aumento na concentração de substrato já não mais interfere na atividade da enzima. A ausência de pontos nessa faixa é ocasionada por uma falha no método selecionado, tendo em vista que em pH ácido, concentrações acima de 17 mg/mL, para ambos os substratos, acarretada na precipitação dos mesmos e conseqüentemente afeta as condições ideais para ação enzimática. Entretanto, a quantidade e a distribuição dos pontos adquiridos foram suficientes para gerarem as curvas e estimar os valores de K_m , V_{max} e K_{cat} .

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos da *SI-EndoPG* Recombinante estão expostos da Figura 25 C. O valor de K_m (3,88 mg/mL) para o substrato isento de metilação é menor que o verificado para substrato parcialmente esterificado ($K_m = 4,98$ mg/mL), inferindo mais uma vez que quanto maior o grau de metoxilação do substrato menor é a afinidade desta enzima por ele. Os valores de V_{max} (21,96 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) e K_{cat} (3.137 s^{-1}) para o ácido poligalacturônico são maiores em relação a pectina parcialmente esterificada ($V_{max} = 17,9$ $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$; $K_{cat} = 2.456$ s^{-1}). Portanto, conclui-se que quanto menor o grau de metoxilação do substrato, além de maior afinidade, maior também é a velocidade de reação para essa enzima e seu *turn over*.

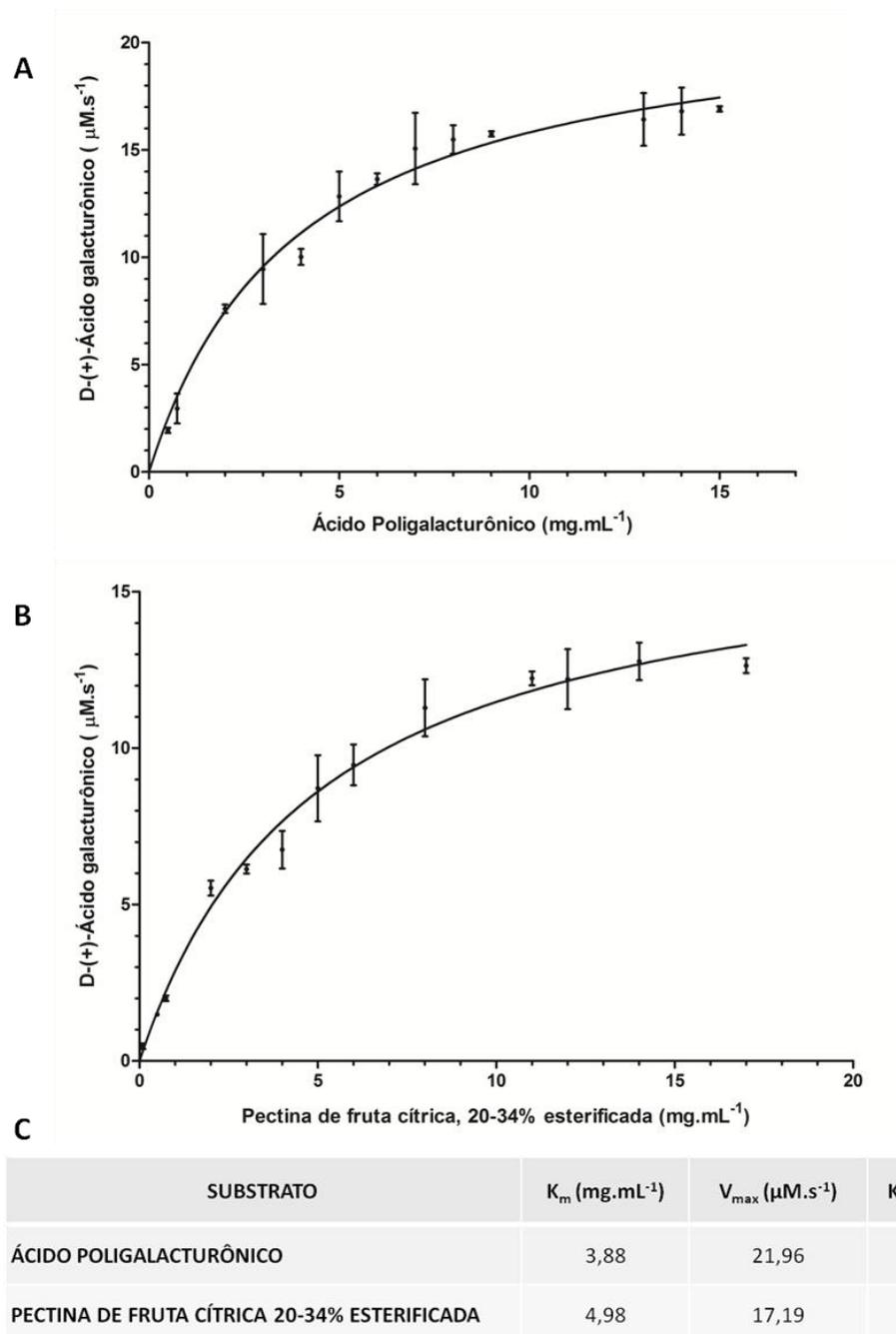


Figura 25. Parâmetros cinéticos da *Sl-EndoPG* Recombinante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em condições ótimas de temperatura e pH previamente estabelecidas, com 7 nmol da enzima purificada. A: Curva Michaelis Menten obtida através reações com concentrações crescentes de ácido poligalacturônico. B: Curva Michaelis Menten obtida através reações com concentrações crescentes de pectina de fruta cítrica 20-34% esterificada. C: Valores obtidos para K_m , V_{max} e K_{cat} através do software GraphPad 5.0, usando o modelo estatístico “Michaelis Menten”.

Na Tabela 1 a *SI-EndoPG* Recombinante é comparada com diversas outras PGs ácidas. O pH ótimo de atividade destas enzimas varia de 3,5 a 6,5, mas a maioria delas, incluindo a *SI-EndoPG* Recombinante, tem maior atividade na faixa 4,0-5,0. A temperatura ótima da *SI-EndoPG* Recombinante também condiz com a maioria das enzimas apresentadas. Em relação à afinidade pelo substrato ácido poligalacturônico, nota-se uma variação muito grande entre as enzimas, pois são encontrados desde valores muito baixos como 0,03 (*K. marxianus*) até 6,7 mg/mL (*A. carbonarius*). A *SI-EndoPG* Recombinante não está no grupo das enzimas que tem alta afinidade pelo substrato, o valor de seu K_m (3,88 mg/mL) aproxima-se mais das PGs de *T. sp* (3,23 mg/mL) e *T. harzianum* (3,4 mg/mL). O *turnover* (K_{cat}) das PGs é também bastante variável, tendo sido verificados na literatura valores muito baixos como 26 s^{-1} para PG II de *A. japonicus* e valores altos como 690 s^{-1} para *A. giganteus*. O K_{cat} (3.137 s^{-1}) da *SI-EndoPG* Recombinante mostrou grande superioridade em relação a todas as outras. A eficiência catalítica determinada pela relação K_{cat}/K_m , também é bastante variável entre as PGs. Deste modo, mesmo que a *SI-EndoPG* Recombinante tenha apresentado baixa afinidade pelo substrato em relação a muitas outras PGs, seu alto valor de K_{cat} garante que essa enzima tenha a maior eficiência catalítica já vista para uma PG, até nosso conhecimento atual.

Em resumo, embora a *SI-EndoPG* Recombinante tenha baixa termoestabilidade, ela apresenta atividade ótima em pH e temperatura adequados para aplicação na indústria de suco de frutas e processamento vegetal. Sua eficiência catalítica superior às outras, também agrega alto valor a este produto. Portanto, independentemente das vantagens e desvantagens aqui apresentadas, esses resultados dão suporte a sugestão de Pauchet (PAUCHET; WILKINSON *et al.*, 2010), em que insetos possam ser usados como novas fontes de bioprospecção para EDPCV.

Tabela 1. PGs ácidas de diversos organismos. A tabela mostra as propriedades de algumas PGs sobre o substrato ácido poligalacturônico, com atividade ótima realizada em pH ácido. A *SI-EndoPG Recombinante* e suas especificações são destacadas na tabela.

Fonte	Enzima	pH	Temp (°C)	K _m (mg/mL)	K _{cat} (s ⁻¹)	Kcat/Km	Referência
<i>Aspergillus carbonarius</i>	PG			6,7			DEVI apud NITURE; PANT <i>et al.</i> , 2001
<i>Aspergillus giganteus</i>	PG	6	55-60	1,16	690	594	PEDROLLI; CARMONA, 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Endo-PG I	3,8-4,3	43	0,12			SINGH; RAO <i>et al.</i> , 2002
	Endo-PG II	3,0-4,6	45	0,72			SINGH; RAO <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Endo-PG	3,8	30	2,5			PARENICOVA; BENEN, 1998
<i>Aspergillus japonicus</i>	PG I	4,0-5,0		1,03	90	87,4	SEMENOVA; GRISHUTIN, 2003
	PG II	4,0-5,0		0,35	26	74,3	SEMENOVA; GRISHUTIN, 2003
<i>Fusarium moniliforme</i>	Endo-PG	4,2	45	0,12	70	583,3	NITURE; PANT <i>et al.</i> , 2001
<i>Fusarium solani</i>	PG	6		1,34			ZHANG; BRUTON, 1999
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	PG	4,5	55	0,03	1,83	61	SERRAT; BERMÚDEZ <i>et al.</i> , 2002
<i>Neurospora rassa</i>	PG	6	45	5			DELOURDES; POLIZELI <i>et al.</i> , 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo-PG	5,5	45	4,7			CORREDIG apud JAYANI; SAXENA, 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo-PG	4,5	45	0,59			BLANCO apud GUMMADI; PANDA, 2003
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	PG	4,2	50	0,62			ASTAPOVICH apud GUMMADI; PANDA, 2003
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Endo-PG I	4	50	0,8			KOBOYASHI apud JAYANI; SAXENA, 2005
	Endo-PG II	3,5	50	0,5			KOBOYASHI apud JAYANI; SAXENA, 2005
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PG	6,5	50	1			BAUNU; DEVI <i>et al.</i> , 2010
<i>Sphenophorus levis</i>	Endo-PG	5	50	3,88	3.137	808,5	
<i>Thermococcus aurantiacus</i>	Endo-PG	5	55	0,13			TAKAO apud JAYANI; SAXENA, 2005
<i>Tetracoccusporium sp.</i>	PG	4,3	40	3,23			AMINZADEH; NADERI-MANESH <i>et al.</i> , 2006
<i>Trichoderma harzianum</i>	PG II	5	40	3,4	592	174	MOHAMED; FARID <i>et al.</i> , 2006

4.11 Alinhamento múltiplo das *SI-Pectinases*

4.11.1 Alinhamento múltiplo para *SI-PME*

As duas sequências que apresentaram maior similaridade com a *SI-PME* são provenientes dos insetos pragas, *S. oryzae* (máxima identidade igual 75%) e *D. ponderosae* (máxima identidade igual 65%). O alinhamento entre essas sequências revelou alta similaridade entre estes insetos (Figura 26). Essas três espécies têm dietas distintas, porém hábitos alimentares semelhantes, pois todas, ao menos em fase larval, se alimentam internamente do vegetal abrindo galerias, indicando que essas enzimas provavelmente desempenham papel similar no sistema biológico destes insetos.

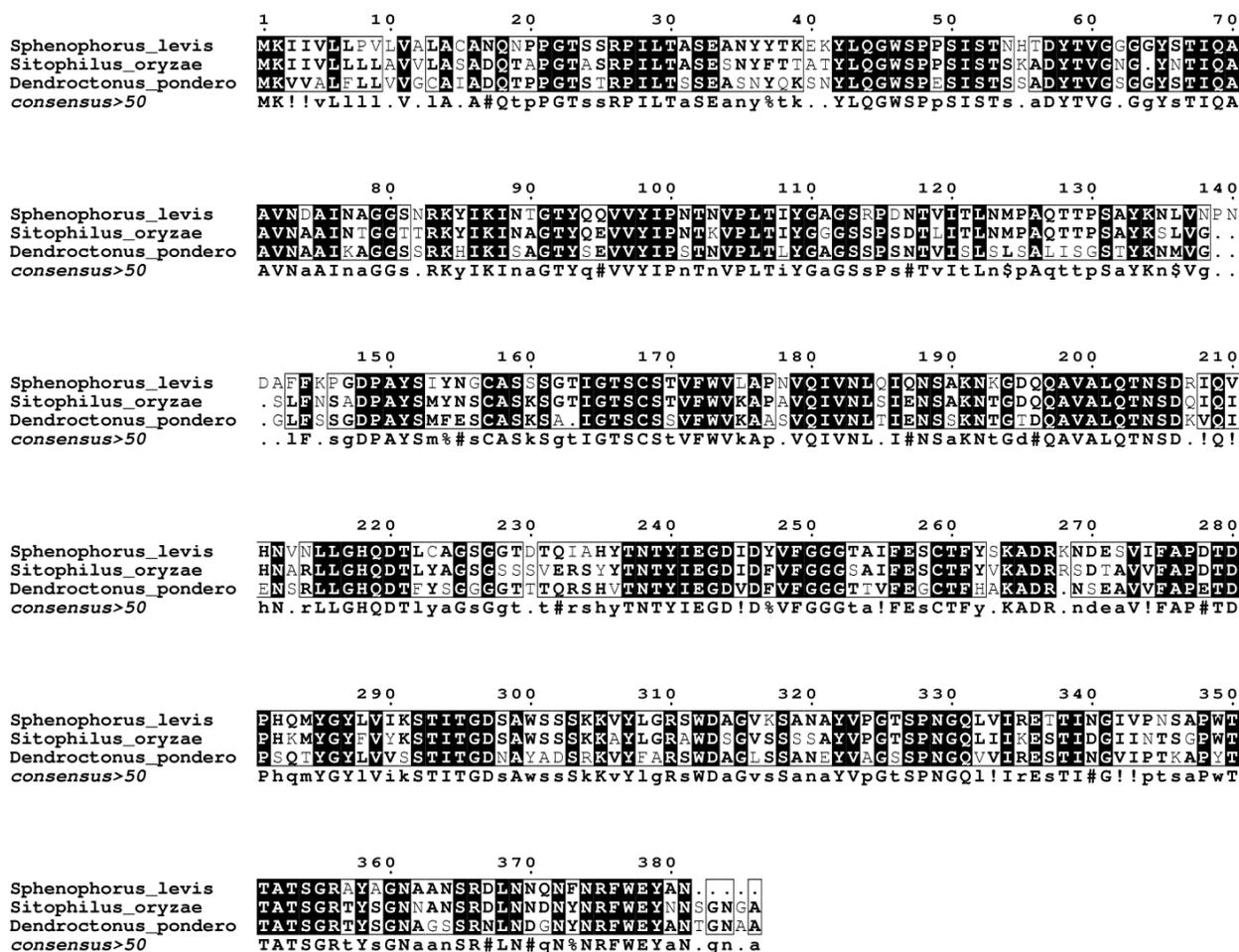


Figura 26. Alinhamento múltiplo entre as PME de insetos. As Endo-PGs de inseto disponíveis no banco de dados NCBI foram alinhadas em software online Multialin sob os parâmetros da matriz original. A contagem dos aminoácidos é baseada na sequência *SI-PME*. Como pode-se observar, os resultados indicam alta similaridade entre as sequências.

Em investigação mais ampla, incorporando ao alinhamento PMEs oriundas de reinos distintos (valor de identidade máxima $\geq 34\%$), os dados gerados foram analisados quanto a regiões conservadas e função. A Figura 27 mostra que as sequências diferem muito até mesmo em organismos pertencentes a um mesmo reino, contudo, há resíduos conservados presentes em todos os organismos independentes do reino ou espécie. Provavelmente esses resíduos têm participação essencial para o correto funcionamento da enzima e alguns destes, já têm seu papel conhecido por análise de resolução estrutural.

A primeira PME de estrutura resolvida, em 2001 por Jenkins e colaboradores, é da bactéria *E. chrysanthemii*. Neste trabalho, os autores sugerem que os resíduos mais diretamente envolvidos no processo de catálise são Asp²²⁰, Asp²⁴⁶ e Arg³¹⁰ (JENKINS; MAYANS *et al.*, 2001). Em 2002, a primeira PME vegetal de estrutura resolvida foi obtida e foi proposto que Asp²²⁰ promoveria o ataque nucleofílico enquanto Asp²⁴⁶

atuaria como ácido/base geral (JOHANSSON; EL-AHMAD *et al.*, 2002). Em 2007, com o uso de mutações sitio dirigidas e ensaios de atividade para mesma PME de *E. chrysanthemi*, Fries e colaboradores definem funções a vários outros resíduos, por exemplo, Arg³¹⁰ e Trp³¹², os quais são responsáveis diretos na manutenção das condições eletrostáticas adequadas no sitio catalítico (FIRES; IHRIG *et al.*, 2007).

Como pode ser verificado na Figura 27, dentre estes quatro aminoácidos considerados mais diretamente responsáveis pela catálise, dois não apresentam padrão de conservação universal, ou seja, são substituídos por outros em algumas espécies. É o caso da Asp²²⁰ e Trp³¹² que, dentro de um grupo de bactérias, são substituídos por uma Asn e uma Lys respectivamente, podendo resultar em mudanças drásticas no comportamento destas enzimas. Em nosso resultado, além dos aminoácidos Asp²⁴⁶ e Arg³¹⁰ outros três apresentaram universalidade entre as espécies. Os resíduos Gln¹⁹⁷, a qual é responsável por manter estável o estado transitório Enzima-Substrato (ES) (JOHANSSON; EL-AHMAD *et al.*, 2002; FIRES; IHRIG *et al.*, 2007), Gly²⁴³ e Gly²⁵⁰ que até nosso conhecimento não há função determinada.

Os aminoácidos associados à ligação da enzima ao substrato (tomando-se a sequência de *S. levis* como referencial) Gln¹⁹⁷, Ser¹⁶⁷, Asp²⁶⁶, Asn²⁶⁹, Val²⁷³, Gly³¹⁵, Tyr³²² e Trp³⁴⁹ não são conservados (FIRES; IHRIG *et al.*, 2007). Esses resíduos variam entre reinos e alguns até mesmo dentro do mesmo reino, entretanto a maioria deles têm se mostrado conservados para os insetos, que é o caso da Ser¹⁶⁷, Asp²⁶⁶, Val²⁷³, Gly³¹⁵ e Tyr³²². Tendo em vista que todos estes resíduos contribuem parcialmente na afinidade da enzima pelo substrato, a variação deles influencia na performance da enzima e, portanto, pode ser considerado um fator determinante para os diferentes graus de patogenicidade entre essas espécies.

Insetos	Sphenophorus levis
	Sitophilus oryzae
	Dendroctonus pondero
	Dickeya dadantii
	Pectobacterium carot
	Rahnella sp
	Escherichia albertii
	Escherichia coli
	Shigella sonnei
	Shigella boydii
Bactérias	Salmonella bongori
	Citrobacter koseri
	Klebsiella pneumonia
	Cronobacter sakazaki
	Xanthomonas perforan
	Ralstonia solanacear
	Erwinia chrysanthemi
	Talaromyces stipitat
	Clostridium acetobut
	Bacillus sp
	Cellulosilyticum rum
Arquéias	Haloferax volcanii
	Halopiger xanaduensi
	Haloterrigena turkme
	Solanum lycopersicumMATPLQPFLTKTHKQNP IIGFNILTFVVTLFVAFILV.....VFLVAPY...
	Pisum sativumMAIQETLIDKPKKSIPKTFWLILSLAAIIGSSALIV.....SHLNKPI...
Plantas	Nicotiana tabacumMANKKVVIIGGIASILVVACVVAACVILT.....KNDETSS...
	Salix gilgiana	MVFQDFDQLSERRRLERQQKLRKKIIIASVSSIAFFVIVGAGVFSLV...SNHDISSPGNNGGSPSAAT
	Allium cepa	MAFQDFGPLSERRRQLEQRKRIRIMIAGGALCTIVIIAAVSAVAIIYVNKNGYISNNTKNNKHSKSGSD
	Arabidopsis thalianaMIGKVVVSVASILLIVGVAIGVVAYI.....NKNGDAN.....
	Physcomitrella paten
	Aspergillus aculeatu
Fungos	Cochliobolus carbonu
	Botryotinia fuckelia
	Phytophthora capsici
	Puccinia graminis
	consensus>50

Insetos	Sphenophorus levis
	Sitophilus oryzae
	Dendroctonus pondero
	Dickeya dadantii
	Pectobacterium carot
	Rahnella sp
	Escherichia albertii
	Escherichia coli
	Shigella sonnei
	Shigella boydii
Bactérias	Salmonella bongori
	Citrobacter koseri
	Klebsiella pneumonia
	Cronobacter sakazaki
	Xanthomonas perforan
	Ralstonia solanacear
	Erwinia chrysanthemi
	Talaromyces stipitat
	Clostridium acetobut
	Bacillus sp
	Cellulosilyticum rum
Arquéias	Haloferax volcanii
	Halopiger xanaduensi
	Haloterrigena turkme
	Solanum lycopersicumQFEIKHS..NLCKTAQDSQLCLSIVSEIV.....TTESDGVTVLKKFLVKYVHQMNAIPVVRK
	Pisum sativumSFFPLSSAPNLCEHAVDTKSCSLTHVSEVVQQALANTKDHKLSLTLISLLTKSTSHIQKAMETANV
Plantas	Nicotiana tabacumSGQVTTSTKSVKAMCQPTPYKQTEKTLSS...AKNASEPKDFIKVAFEATVTDIRNAIMNTDL
	Salix gilgiana	RPAEKAKPISHVARVIKTVCNATTYQDTCQNTLEKGVLGKDPSSVQPKDLLKIAIK.AADEEIDKVIKKA
	Allium cepa	SDSTSSHAASTSSKLVQTLCSPTDYKETCISLSKAT...NSSSKPKDIIKAAVS.VIYKEASTAFEKA
	Arabidopsis thalianaLSPQMKAVRGICEATSDKASCVKTLEP.VKSDDPNKLIKAFMLATRDA.ITQSSNFTGKTEE
	Physcomitrella paten
	Aspergillus aculeatu
Fungos	Cochliobolus carbonu
	Botryotinia fuckelia
	Phytophthora capsici
	Puccinia graminis
	consensus>50

(Continua)

			1	10
Insetos	Sphenophorus levisMKIIVLLPVLV
	Sitophilus oryzaeMKIIVLLLLLV
	Dendroctonus ponderoMKVVALFLLV
	Dickeya dadantiiMSLTHYSGLAAAVSMSLILTACGGQTP
	Pectobacterium carotMKISTLSRACAMLSASLILAACSSS..
	Rahnella spMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
	Escherichia albertiiMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
	Escherichia coliMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
	Shigella sonneiMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
	Shigella boydiiMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
Bactérias	Salmonella bongoriMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
	Citrobacter koseriMNTFSVSRALALAFGVTLTACSSTPP
	Klebsiella pneumoniaMNTYSVSRALALAFGVTLTACSSTPA
	Cronobacter sakazakiMSATHIRSLCLAAAVLS
	Xanthomonas perforanMTGKITMQSKTLLSLKAAALLGGCT
	Ralstonia solanacear
	Erwinia chrysanthemi
	Talaromyces stipitat
	Clostridium acetobut
	Bacillus sp
	Cellulosilyticum rum
	Haloferax volcanii
Arquéias	Halopiger xanaduensi
	Haloterrigena turkme
	Solanum lycopersicum	IKNQINDIRQQGALTD	CLELLDQSV	DLVSDSIAAIDKRSRSEHANA...QSWLSGVLTNHVTCLEDEL.T
	Pisum sativum	IKRRVNSPKKETA	LNDCQELMDL	SMDRVWDSVLTLLTKNNIDSQDA...HTWLSVLTNHATCLNGL.E
Plantas	Nicotiana tabacum	IMQAASDPKTKDAL	HACEELFLA	IEDLRTSVSKLESFDLTKIKDIVDDLKTWLSAVVAYEETCLDAF.E
	Salix gilgiana	SSFKFDKPREKAAF	DDCLELIEDA	KEELKNSVDCIG.NDIGKLASNAPDLNWL SAVMSYQQTCDGFPPE
	Allium cepa	KEHKTSDPQT	VGAIEVCER	LLNESKSDLMESMDKIDVSSLEDLPKAGPVLNVWLSAVRSYQETCVDSFPE
	Arabidopsis thaliana	NLGGISPNNAKAV	LDYCKKVF	MYALEDLSTIVEEMG.EDLNQIGSKIDQLKQWLTGVYNYQTDCLDDIEE
	Physcomitrella patenMG
	Aspergillus aculeatu
Fungos	Cochliobolus carbonu
	Botryotinia fuckelia
	Phytophthora capsici
	Puccinia graminis consensus>50

		20	30	40	50
Insetos	Sphenophorus levis	ALACANQNP	PGTSSRP	ILTASEA	NYTKEKYL.....QGWSPPS..IST.....
	Sitophilus oryzae	VLASADQ	TAPGTASRP	ILTASEA	NYFTTATYL.....QGWSPPS..IST.....
	Dendroctonus pondero	GCAIADQ	TPPGTSTRP	ILTSSEA	SNYQKSNYL.....QGWSPES..IST.....
	Dickeya dadantii	NSARFQ	PVFPPTVSRP	VLSAQEA	GRFTTPQHYFAHGGEYAKPVADGWTPP..IDTSP..
	Pectobacterium carot	...MTKTTY	PGTVHRP	ILSAQEA	ERFTLPHYFTLRGHDDQTEADIWQPAP..IEVDP..
	Rahnella sp	HQGLSSQ	VAPGTASLP	VLSADEA	ANFTTKNYLAFGGPSLQVQQQWFPKL..ASTDG..
	Escherichia albertii	DQRPSDQ	TAPGTSSRP	ILSAQEA	QNFDQAHYFSA...SLTPGAAAWNPSP..ITL.P..
	Escherichia coli	DQRPSDQ	TAPGTSSRP	ILSAQEA	QNFDQAHYFSA...SLTPGAAAWNPSP..ITL.P..
	Shigella sonnei	DQRPSDQ	TAPGTSSRP	ILSAQEA	QNFDQAHYFSA...SLTPGAAAWNPSP..ITL.P..
	Shigella boydii	DQRPSDQ	TAPGTSSRP	ILSAQEA	QNFDQAHYFSA...SLTPGAAAWNPSP..ITL.P..
Bactérias	Salmonella bongori	DQIPSDQ	IAPGTASRP	ILSASEA	AKNFVATRYFA...SLTPNTAPWSPSP..ISL.P..
	Citrobacter koseri	DQIPSDQ	IAPGTASRP	ILSASEA	AKNFVAAHYFSA...SLTPNTAPWSPSA..ITL.P..
	Klebsiella pneumonia	DQQPSTQ	TAPGTTARP	ILNAEAA	KNFTPAAYFQ...SLAPNAAAWTPSA..ISL.P..
	Cronobacter sakazakiNIDPNAAPWSPSP..IRL.P..
	Xanthomonas perforan	LVSATALAL	TGTATRP	QLTSSEA	ASSYTIAKALAKAGPISALVTDNWNPTAGVALLS..
	Ralstonia solanacear	VFAATALAV	TSTATRP	QLSRADA	ARTYTIANYLASFGTIGSLTTDNWDFGGVGA
	Erwinia chrysanthemi
	Talaromyces stipitat
	Clostridium acetobut
	Bacillus sp
	Cellulosilyticum rum
	Haloferax volcanii	MFALLT	SLAVAVG	CLAVAAGTVGTLGGADDDPDAGESDDTENAD..
Arquéias	Halopiger xanaduensi
	Haloterrigena turkmeMRCRTEP..
	Solanum lycopersicum	SFSLSTK	NGTV..LDEL	ITRAKVAL	AMLASV..T.TPNDVLRQGL.GKMPYV..
	Pisum sativum	GTSRVV	MESD...LQDL	ISRARS	SSLAVLVS
Plantas	Nicotiana tabacum	KTDGDT	GKMKVLL	NTTREL	SINGLAMVNSFGEMITQTTGLSRKLLTDESSFV..
	Salix gilgiana	GKLS	DMEKTF	KATRE	LTSNSLA
	Allium cepa	GESRD	KMKDAM	KTVEL	TSNALAI
	Arabidopsis thaliana	DDL	RKTIG	EGIAS	KILTSNALAI
	Physcomitrella paten
	Aspergillus aculeatu
	Cochliobolus carbonu
Fungos	Botryotinia fuckelia
	Phytophthora capsici
	Puccinia graminis consensus>50

(Continua)

		60	70	80
Insetos	<i>Sphenophorus levis</i>	NHTDYIVG.....	GGGYSTIQAAVNDAINA.GGSNRK
	<i>Sitophilus oryzae</i>	SKADYIVG.....	NG.YNTIQAAVNAINT.GGTTTRK
	<i>Dendroctonus pondero</i>	SSADYIVG.....	SGGYSTIQAAVNAIKA.GGSSSRK
	<i>Dickeya dadantii</i>	VTAAYVVGPRAGVAGATHTSIQAAVNAALRQHPGQTRV	
	<i>Pectobacterium carot</i>	ATP.VWVVGPHVGDGATHAVHQAAVNAALRQHPGQTRV	
	<i>Rahnella sp</i>	VNTHFVVGPLGTDGAEYSNVQAAVNAALAVRNHGRI	
	<i>Escherichia albertii</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.IKRTNKRQ	
	<i>Escherichia coli</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.IKRTNKRQ	
	<i>Shigella sonnei</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.IKRTNKRQ	
	<i>Shigella boydii</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.IKRTNKRQ	
Bactérias	<i>Salmonella bongori</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.VKRTNKRQ	
	<i>Citrobacter koseri</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.TQRSSKRL	
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	AQPDFVVG.PAGTPGVTHTTIQAAVDAAI.ARHSNRRL	
	<i>Cronobacter sakazaki</i>	EKADFVVGQ.AGEQGVTHTSIQAAVDAAI.ARHATARQ	
	<i>Xanthomonas perforan</i>ADYAVA...ADGSTRYRTVQSAIDAIAVA.AGGTTRR	
	<i>Ralstonia solanacear</i>	FRANYAVA...ADGTAQYKTVQAAIDAIAVA.AGGVARR	
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>MLKTTISGTLALSLLIAASAIVHQAQAATTY..	
	<i>Talaromyces stipitat</i>MKFLTKNLWKTLSISILIPALSAPASRIDSRIPCAGIISACPANTIIV	
	<i>Clostridium acetobut</i>	
	<i>Bacillus sp</i>	
Arquéias	<i>Cellulosilyticum rum</i>
	<i>Haloferax volcanii</i>	DSGDPESVDDPDDAG
	<i>Halopiger xanaduensi</i>MTSSEGG
	<i>Haloterrigena turkme</i>	LYRRAAPQLRASMQVE
	<i>Solanum lycopersicum</i>	SSRDRKLMESSGKDI
Plantas	<i>Pisum sativum</i>	TSKDRRLESTVGDII
	<i>Nicotiana tabacum</i>	EASNRKLLQIS.NA
	<i>Salix gilgiana</i>	LDKDGVPGWMS.....	HEDRRILKGDADKDF
	<i>Allium cepa</i>	SLVDDQGLPWWVMGHEHRRSLVDDQGLPWWVMGHEHRRSLVDDQGLPWWVMGHEHRRSLVQNAAATL	HEHRRSLVQNAAATL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PPVADDSPVADDPGPARRLLEDIDETGIPTWVSGADKKL.....	MAKAGRGSNDGGRI
Fungos	<i>Physcomitrella paten</i>	SVLGVDETMTTQAP
	<i>Aspergillus aculeatu</i>	AVSALASRALASPAG
	<i>Cochliobolus carbonu</i>	MHPTLVFFLSLVAATAAAPAENVLRRAASFDRTSAPAG	
	<i>Botryotinia fuckelia</i>	MRSFALLSLTASLLGSVSASPALVNRRAAFNRTVAPAG	
	<i>Phytophthora capsici</i>	MYTFTLPLFALIGLASGARASISPCNGPNARTVPPFG	
<i>Puccinia graminis consensus>50</i>	av.aa.....	

		90	100	110	120	130	140	150
Insetos	<i>Sphenophorus levis</i>	YIKINAGTYQEVVYIPNTNVLPTIYAGAGSRPNDTIVITLNMPPAQITPFSAYKLVNPNDAFFKPGDPAYSIV						
	<i>Sitophilus oryzae</i>	YIKINAGTYQEVVYIPNTNVLPTIYAGAGSRPNDTIVITLNMPPAQITPFSAYKLVNPNDAFFKPGDPAYSIV						
	<i>Dendroctonus pondero</i>	HIKISAGTYSEVVYIPSTNVLPTLYGAGSSPNDTIVISLISLISALISGTYKVMVG...GLFSSGDPAYSIMF						
	<i>Dickeya dadantii</i>	YIKLLPGTYTGTVYIPADAPPLTLGAGGKPDVVIIQLALDSMFSPATYRKTVNSH...GEYQPGDPAWMYM						
	<i>Pectobacterium carot</i>	EIKLLPGTYTGTVYIPADAPPLTLGAGGKPDVVIIQLALDSMFSPATYRKTVNSH...GEYQPGDPAWMYM						
	<i>Rahnella sp</i>	FIKLLPGTYNGAVYIPAGSPVTLGAGGSSADVTKIAGGLEAAAPATYRSTVSPN...GQFLPGDRAFMYM						
	<i>Escherichia albertii</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Escherichia coli</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Shigella sonnei</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Shigella boydii</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
Bactérias	<i>Salmonella bongori</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Citrobacter koseri</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Cronobacter sakazaki</i>	YIAVMPGEYQGTVYVPAAPGGITLYGTGEKPIDVKIIGLSLDGGMSPADWRHDVNP...GKYMFGKPAWYMY						
	<i>Xanthomonas perforan</i>	YISIKAGTYTELVCVFNAPPITLFLGLTNTGDTIVIRFN.NANPTPKPAGTASHP.....						
	<i>Ralstonia solanacear</i>	YISIKAGTYTELVCVFNAPPITLFLGLTNTGDTIVIRFN.NANPTPKPAGTASHP.....						
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	NAVVSXSSSDGKTFKTIADATASAPAGSTP.FVILIKNGVYNERLITR.NN.LLLK...GESRNG...AVIAA						
	<i>Talaromyces stipitat</i>	SNDHSSPSSQHAHFTSIQSAIILSLPHDNSS.ATILIRAGNYTEQLNITR.PGPVTL...GETWDPPLTATENQ						
	<i>Clostridium acetobut</i>	MIVSK...NDDGDFDTIQKAVDSVSKNNKRVIIKVKAGVYKELKSIR...KPFISLIGEDVSSSTVITFND						
	<i>Bacillus sp</i>	MIVAQIGSNESADYQSIQAAIDSIPEDNTQPIIFIRSGVYNEKLHIT.KPFITLIGENAKNTIISYSD						
Arquéias	<i>Cellulosilyticum rum</i>	MIVAQIGSNESADYQSIQAAIDSIPEDNTQPIIFIRSGVYNEKLHIT.KPFITLIGENAKNTIISYSD						
	<i>Haloferax volcanii</i>	AYDYVVAQDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Halopiger xanaduensi</i>	EYDGVVDPDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Haloterrigena turkme</i>	SFDFVVARDESQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Solanum lycopersicum</i>	IANRVVAQDGTGDTLAEAVASAPDNKTRVYIYVKGMYKENVVVTKKKNNMLVGDGMNATIITGSL						
Plantas	<i>Pisum sativum</i>	KANRVVAQDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Nicotiana tabacum</i>	KPNVVAQDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Salix gilgiana</i>	KPNVVAQDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Allium cepa</i>	KPNVVAQDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RATFVVAQDGSQDYETIQAAIDGAKSFPPERIRILVRDGVYDEKVEVHAWNPDIITLVE...SAEGTVITHDD						
Fungos	<i>Physcomitrella paten</i>	KGKTIYVVKQKGPYRTVQAVNAVPKGNTRVYIYVKGMYKENVVVTKKKNNMLVGDGMNATIITGSL						
	<i>Aspergillus aculeatu</i>	AIIVVAKS...GGDYTTIGDAIDALSTSTDTQTIFIEEGTYDEQVYLPAMTKVYIYQGTENTDSYADNL						
	<i>Cochliobolus carbonu</i>	CLTVGGS...GKYKTVQSAVNALDKSTSKAQIFLAKGTYTEQVYIQQLSPLTIYGETKDRSYSGNT						
	<i>Botryotinia fuckelia</i>	AIIVDETCEIAGSYTTFQEGDALSTSTDTAQYIFVAPGTYFEQVYLPPLASNLTIQGYTTDARTYENNE						
	<i>Phytophthora capsici</i>	ATVVDITGAYNGSYQTMAEGMLYLP.NTTEHTLFFVFGGLYQEQVYLPKLAGPLVQGYSCDATSYSANQ						
<i>Puccinia graminis consensus>50</i>	

(Continua)

		160	170	180	190
Insetos	<i>Sphenophorus levis</i>	NGCASS.SGTIG.....	TSCSITVFWVLA	PNVQIVNLQIONS	...AKNKG.....
	<i>Sitophilus oryzae</i>	NSCASK.SGTIG.....	TSCSITVFWVKA	PAVQIVNLSIENS	...AKNTG.....
	<i>Dendroctonus pondero</i>	ESCASK.SA.IG.....	TSCSSVFWVKAAS	SVQIVNLTIEENS	...SKNTG.....
	<i>Dickeya dadantii</i>	NACATKAGATIN.....	TTCSSAVMWSQSN	DFQLKNTLVVN	ALLDITVDSG
	<i>Pectobacterium carot</i>	DLCASKQNTTID.....	TICCAAVVWSQSN	DFQMKNLTVVN	LLDSDVNR
	<i>Rahnella sp</i>	QNCATLTTETIG.....	TGCTATVWSQSN	NGVQIQNLTIEN	SLLDITVDGG
	<i>Escherichia albertii</i>	DSCQSKRSNSIG.....	VLCSAVFWSQNN	GLQLQNLTIEN	TLGDSVDAG
	<i>Escherichia coli</i>	DSCQSKRSDSIG.....	VLCSAVFWSQNN	GLQLQNLTIEN	TLGDSVDAG
	<i>Shigella sonnei</i>	DSCQSKRSDSIG.....	VLCSAVFWSQNN	GLQLQNLTIEN	TLGDSVDAG
	<i>Shigella boydii</i>	DSCQSKRSDSIG.....	VLCSAVFWSQNN	GLQLQNLTIEN	TLGDSVDAG
Bactérias	<i>Salmonella bongori</i>	DNCQSKRAATIG.....	VMCSAAFWSQNN	GLQLQNLTIEN	TLGDSVDAG
	<i>Citrobacter koseri</i>	DNCQSKRGASIG.....	VMCSAVVWSQND	GLQLQNLTIEN	NLGDSVDAG
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	DSCQSKSAATVG.....	VMCSAVFWSQNN	GLQLQNLTIEN	NLGDSVDAG
	<i>Cronobacter sakazaki</i>	DNCQNRNRGSVG.....	LMCSAVFWSQNN	GLQLQNLTIEN	SLGDAAGEG
	<i>Xanthomonas perforan</i>	.CASNASATTVG.....	TNSSATFTVRAAN	FEARHLRVDNN	NYVEGYTD
	<i>Ralstonia solanacear</i>	.CMGTSNATVG.....	TLRSATAMVRAAD	FHARNLTFKN	SYVEGYAD
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ATAAGTLKSDGSK..W.G	TAGSSTITISAKD	FSAQSLTIRN	DFDFPANQAKSDSDSSKI
	<i>Talaromyces stipitat</i>	VTVYWSAANSNSR..YMD	NAFTSILTVAPTQ	NASLGTAGPT	GWVPADTPYGNSDFRAYNIDFRNVFSEY
	<i>Clostridium acetobut</i>	SANTLMANKERM.....	TFNSYTMFVGD	DFICENITVEN	NAGD...GD
	<i>Bacillus sp</i>	YANKLEDDSKKMG.....	TFGSYSCIVTGD	DFLAENITFENN	NAGK...GS
Arquéias	<i>Cellulosilyticum rum</i>	YAKKQFPSPGQSYG.....	TFNSYTAFIGTND	FTAKNITFENTAGI	...GD
	<i>Haloferax volcanii</i>	HFERIDR..GRNS.....	TFEYTLKVRGN	DFRARDLTVEN	SAG...P
	<i>Halopiger xanaduensi</i>	HFERIDR..GRNS.....	TFEYTLKVRGN	DFRARDLTVEN	SAG...P
	<i>Haloterrigena turkme</i>	YNGEANRFGEEMG.....	TTESSCFLFGD	DFARDLTFQNTAG	...A
	<i>Solanum lycopersicum</i>	NVVD...GS..T.....	FPNNTLAAVQG	GFILQDICIQNTA	...GP
	<i>Pisum sativum</i>	NFID...GT..T.....	TFNSATVAAVGD	GFIAQDIGQNTA	...GP
	<i>Nicotiana tabacum</i>	SVKG...PGIGS.....	TWHICTVGVSGE	GFVARDIGFENTA	...GP
	<i>Salix gilgiana</i>	N..F...ADGVQ.....	TFRTATFAVLG	GFCKFMGFRNTA	...GP
	<i>Allium cepa</i>	N..F...NAGTP.....	TFLTATFAVMGD	GFMCIGMFRNTA	...GP
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SVKL...SPGTT.....	TSLSGTVQVES	EGFMAKWIFKNTA	...GP
Plantas	<i>Physcomitrella paten</i>	AAKA...GG.....	TAKSASTAIESK	GFIAYDCTFANSAPAPP	GGGA
	<i>Aspergillus aculeatu</i>	VTITHAISYEDAG.....	ESDDLATFRNKAVG	SQVYNLNIANTCGQ	...
	<i>Cochliobolus carbonu</i>	VTITQRKSQNDTP.....	SNDELATLRAHTFN	LKVYNINLVNTRQ	...
	<i>Botryotinia fuckelia</i>	ATLTYNLALINT.....	TSDDLATFRAHNTN	TKVYNLIENTFGHIN	...
	<i>Phytophthora capsici</i>	VTITHMAQKDLPEVKNN	RNDLITMRLKSRNGV	KIYNLVANPAGPIE	...
	<i>Puccinia graminis consensus>50</i>	MANPSSAPPRA.....	LIVRKNPLPGEH	EFKMFNINVVNNYGTG	...
		d.....	t..s.....	n.fq..nl	ntien.....

		200	210	*	230	240	
Insetos	<i>Sphenophorus levis</i>	DQQ.AVALQTNSDRIQVHN	VNVLGH	QDTL	AGSG.....	GTDITQ.....	TAHYTNTYIEGDID
	<i>Sitophilus oryzae</i>	DQQ.AVALQTNSDRIQVHN	VNVLGH	QDTL	AGSG.....	SSSVE.....	RSYYTNTYIEGDID
	<i>Dendroctonus pondero</i>	TDQ.AVALQTNSDKVQIENS	RILGH	QDTF	YAGSGG.....	GTITQ.....	RSHVNTYIEGDVD
	<i>Dickeya dadantii</i>	THQ.AVALRTDGD	RVQLENVRLSR	QDTF	FVNTS.....	DRQNSYVTDHYS	RAYIKDSYIEGDVD
	<i>Pectobacterium carot</i>	AHQ.AVALRTDGD	KVQLEKVRLLGR	QDTF	FVNTS.....	NLQNEYVTNRY	RAYITDSYIEGDVD
	<i>Rahnella sp</i>	DHS.AVALRTDGD	NVILDNVRLGR	QDTF	FVNTA.....	NIHNQTDNSRY	RAYVHNSLIVGDVD
	<i>Escherichia albertii</i>	NHP.AVALRTDGD	KVQINNVLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Escherichia coli</i>	NHP.AVALRTDGD	KVQINNVLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Shigella sonnei</i>	NHP.AVALRTDGD	QVQINNVLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Shigella boydii</i>	NHP.AVALRTDGD	QVQINNVLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
Bactérias	<i>Salmonella bongori</i>	NHP.AVALRTDGD	KVQINKVNLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Citrobacter koseri</i>	NHP.AVALRTDGD	KVQINKVNLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	THQ.AVALRTDGD	QVQINKVNLGR	QNTF	FVNTS.....	GVQNRLETNRQP	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Cronobacter sakazaki</i>	QHQAVALRTDGD	RVQINKVNLGR	QNTF	FVNTS.....	DIRRFTPDRLT	RTLVTNSYIEGDVD
	<i>Xanthomonas perforan</i>	NNQSAVALAVRGDKANF	QDVLVTGN	QDTL	LISAT.....	SASNVI.....	RAYFKNSTIEGDVD
	<i>Ralstonia solanacear</i>	NNQSAVALAVRGDKAILE	NVSVIGN	QDTL	VGAT.....	NTSTVI.....	RAYFKNSFIQGDID
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	TQAVAVLVTKSGDRAY	FKDVSLVGY	QDTL	VYS.....	G.GRSFFSDCRIS	GTVD
	<i>Talaromyces stipitat</i>	SAGPSLAVSVSYANAG	FYSYSGE	QDTV	YIG.....	KLGNAYFNSI	IAGQTD
	<i>Clostridium acetobut</i>	LVGQAVAMYVDADQTE	FHNCAF	LARQDT	VFTAPLPPKPIEG	SFGPRDGMKRRD	VQYYENCYIRGDID
	<i>Bacillus sp</i>	EVGQAVAMYVDADQTE	FHNCAF	LARQDT	VFTAPLPPKPIEG	SFGPRDGMKRRD	VQYYENCYIRGDID
Arquéias	<i>Cellulosilyticum rum</i>	EVGQALAAVVDGDRIA	FMDCSFLGY	QDTL	F	TGPPAPVPIG	SFKGPRENAPRNGRQYYENCYIRGDID
	<i>Haloferax volcanii</i>	V.GQAVALHVVDADRA	VFENCREFLGH	QDTI	Y	AAG.....	EAGCQYFSDCYVEGTD
	<i>Halopiger xanaduensi</i>	EKGQAVALHVVDADRA	VFENCREFLGH	QDTI	Y	AAG.....	EAGCQYFSDCYVEGTD
	<i>Haloterrigena turkme</i>	V.GQAVAVRVDGDRAV	FENCREFLGH	QDTL	Y	THG.....	EDSRQYRDCYVEGRVD
	<i>Solanum lycopersicum</i>	EKKQAVALRVGADMSV	INRCRIDAY	QDTL	Y	HSQRQFYRDSYVTGTD
	<i>Pisum sativum</i>	EKKQAVALRVGADQSV	INRCRIDAF	QDTL	Y	HSQRQFYRDSFITGTD
	<i>Nicotiana tabacum</i>	AQEQAVALRVNADKAV	IYNCKIDGY	QDTL	Y	HSGRQFYRDCIISGTD
	<i>Salix gilgiana</i>	EKKQAVAIRVQADRAI	FLNCRFEGY	QDTL	Y	QTHRQFYRSCVITGTD
	<i>Allium cepa</i>	EGHQAVALRVQADCAV	FLNCRMEAY	QDTL	Y	QSKRQFYRGCVIITGTD
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MGHQAVAIRVNGDRAV	IFLNCREFDGY	QDTL	Y	NNGRQFYRNIVVSGTD
Plantas	<i>Physcomitrella paten</i>	VGKQAVALRIQDQGA	FYRCALF	GAQDTL	Y	KEGRQFYRDCYIRGSID
	<i>Aspergillus aculeatu</i>	ACHQALALSADWADQ	QGYGCSNFTGY	QDTL	Y	QTGNQLYRNSYIEGAVD
	<i>Cochliobolus carbonu</i>	GS.QALAVSADWADQ	QGYGCSNFTGY	QDTL	Y	QLGNQVLYAKSYIEGAVD
	<i>Botryotinia fuckelia</i>	SNGQNLALSASYASNV	GYATQFWGY	QDTV	Y	EAGYQLYAKCLIVGAVD
	<i>Phytophthora capsici</i>	NLGQAVAVYADATNYG	FYGCSEFTGF	QDTL	Y	HARGQLYARTHISGTD
	<i>Puccinia graminis consensus>50</i>	TNTQAVALTQGE	RHVYNSMCSFSSY	QDTL	Y	KSTSAFYLCNIEGAVD
		n..qavalr.dgd.....	nm..lg.Q#tly	r.yy.nsyieGdvD

(Continua)

	250	260	270	280	290	300			
Insetos	Sphenophorus levis	YVFGG.GT	AIFESCT	FYSKADR..KNDESVI..	FAPDTPDHP	QMGYGLVVKST	ITGDSAWSSSKKV..	YL	
	Sitophilus oryzae	FVFGG.GS	AIFESCT	FYVKADR..RSDTAVV..	FAPDTPDHP	HMKYGFVYKST	ITGDSAWSSSKKA..	YL	
	Dendroctonus pondero	FVFGG.GT	VFEGCT	FHAKADR...NSEAVV..	FAPETDPSQ	TYGYLVVSS	ITGDNAYADSRKV..	YF	
	Dickeya dadantii	YVFGG.AT	AVFDRVR	FHTVSSR...GSKEAYV..	FAPDSIFSVK	YGLVINS	QLTDNGYRGAQKA..	KL	
	Pectobacterium carot	YVFGG.AT	AVFEVRH	FHTVSSR...GAKDHSV..	FAPDSMPWAQ	YGLAVTICR	FTGDEGFSGGKKA..	KL	
	Rahnella sp	YVFGG.AN	AVFDHVE	FHTVSSR...GVKQASV..	FAPNTPAAAP	YGLVIDSNL	TGDRGFQQAQA..	KM	
	Escherichia albertii	IVSGR.GAV	VFDNTE	FRVVNSR..TQQEAYV..	FAPATLSNI	YGLAVNSRF	NA...SGDGVA..	QL	
	Escherichia coli	IVSGR.GAV	VFDNTE	FRVVNSR..TQQEAYV..	FAPATLSNI	YGLAVNSRF	NA...SGDGVA..	QL	
	Shigella sonnei	IVSGR.GAV	VFDNTE	FRVVNSR..TQQEAYV..	FAPATLSN	MYGLAVNSR	NA...FGDGVA..	QL	
	Shigella boydii	IVSGR.GAV	VFDNTE	FRVVNSR..TQQEAYV..	FAPATLSNI	YGLAVNSRF	NA...FGDGVA..	QL	
	Salmonella bongori	MVSGR.GAV	VFDNTT	FQVVNSR...TQKEAYV..	FAPATLSNI	YGLAINS	RFNA...SGDGVA..	QL	
	Citrobacter koseri	MVSGR.GAV	VFDNTD	FRVVNSR..TQQEAYV..	FAPATLSNI	YGLAINS	RFNA...AGDGVA..	QL	
Bactérias	Klebsiella pneumonia	IVSGR.GAV	VFDNTD	FRVVNSR..TQKEAYV..	FAPATLKS	SVTYGLATNS	RFNA...SGDNVA..	QL	
	Cronobacter sakazaki	LVAGR.GAV	VFDNTD	FRVVNSR..TQKEAYV..	FAPATLKS	SVTYGLATNS	RFNA...AGEGVA..	QL	
	Xanthomonas perforan	FIFGS.GV	GVDGAT	IRSTGARL	SGSRGGYI..	FAPSTRP	GSSYGLAINS	FTGVSG.SPDNNT..	YL
	Ralstonia solanacear	FIFGA.GT	AVFDGCT	IQYTAARL	GAKGSSQI..	FAPSTAP	DNPYGLAHS	TFNATGN.PQNNRL..	RL
	Erwinia chrysanthemi	FIFGD.GT	ALFNDCD	LVSRYRAD	VKSGNSVGLT	APSTNIN	NQKYGVI	TNSVRESDSVPAKSYG..	L
	Talaromyces stipitat	FLYGF.GT	AWLQACS	LQLRSCG...GGITAWK	GNTNTYYPN..	KFGVYIVDS	TNSVRESDSVPAKSYG..	L	
	Clostridium acetobut	FIFGS.AT	AVFNKCE	IFSNKDKN	EVNGFIA..	AASPEGK	EFGYVFLDCK	FISSDARKHTV...YL	
	Bacillus sp	FIFGS.AT	SVFEDCE	IHSLDLN	RDVNGYIT..	AASPFDD	Q.EHGKVF	INCLTSKAAARTV...YL	
	Cellulosilyticum rum	FIFGS.AT	AFFHNCI	FISNDIGK	KVNGYIT..	APSTAAQ	Q.AYGVVFD	SKLISNAPNETV...YL	
	Haloferax volcanii	FIFGG.AT	AVFEDCR	VHSHKAD...S.YVT..	AASPEDE	PFGFVFLDCE	ELTADPDVSEV...YL		
	Halopiger xanaduensi	FVFGG.AT	AVFDNCE	VHSHKAD...S.YVT..	AASPEDE	PFGFVFLDCE	ELTADPDVSEV...YL		
	Haloterrigena turkme	FIFGW.ST	AVFEDCE	IFCTGD...KGYVT..	AASPEDE	DYGLVFRNCE	ELTADPDVSEV...YL		
Plantas	Solanum lycopersicum	FIFGN.AA	VVFQKCI	IVARKEPN	KRQKNMVA..	QGRIDPN	Q.ATGTSIQ	FCDIASPDLPEVMNEYKT	
	Pisum sativum	FIFGN.AG	VVFQKCI	LVARKEPN	KRQKNMVA..	QGRIDPN	Q.NTATSI	QCCNVIPSSDLKPVQSGIKY	
	Nicotiana tabacum	FVFGD.AA	VVFQKCI	LIVRRP	GQDQNCMVTA..	QGRITSA	S.KGAFV	IQCNKAEPEFLAACPQMKAF	
	Salix gilgiana	FIFGD.AT	SVFQNCI	ITVRKPLE	NQNVITA..	QGRIDGHE	TTGIVLQ	SCRIEPPDKDLVPVKNKIRS	
	Allium cepa	YIFGD.AS	AIFQNCV	LAVRRP	GDNQNVITA..	HGRIDKHE	STGFI	VHNCKIIPANDDDLAPVQATFKS	
	Arabidopsis thaliana	FIFGK.SAT	VIQNSLI	IVVRKPN	KRQKNMVA..	DGNEKGL	AMKIGIVL	QNCRIIPANDDDLAPVQATFKS	
	Physcomitrella paten	FVFGD.GQ	SIYKCKLI	..ESIAGN	TSGSITA..	QKRESFS	..RTGPF	VFDQCTIRGSGSI...YL	
	Aspergillus aculeatu	FIFGQ.HA	RAFQNCI	I...RVVEG	PTSASIT..	ANGRSSE	TDTSYV	VINKSTVAAKEGEDDVAEGTYI..	
	Cochliobolus carbonu	FIFGQQA	RAFQNCI	I...RVVEG	PTSASIT..	ANGRSSE	TDTSYV	VINKSTVAAKEGEDDVAEGTYI..	
	Botryotinia fuckelia	FIFGEKAL	AWFENNDI	I...RTI...ANGAIT..	ASGRISA	AVDSWY	VVNN	SNIA.NLNSLSTPYNN..YL	
	Phytophthora capsici	FIFGMRAM	AWFENNDI	I...RTI...ANGAIT..	ANGN	TNSI	IQSEY	VFNRRARVFGSSGNSST...FL	
	Puccinia graminis consensus>50	FIFGG.GT	AWFEKAN	IIVVKPP...RSFAT	ITAHKRV	QAQSSPA	KVFVNL	SNIVGAPGTRAGSA...YL	

	320	330	340	350	360	370																																
Insetos	Sphenophorus levis	GRSWDAGV	KSANAYVPGT	SPNQQLVIRE	TTINGI	IVPNSAPWTTA	TSGRAYAGNAAN...SRD	LNN																														
	Sitophilus oryzae	GRAWDSG	VSSSAYVPGT	SPNQQLVIRE	TTINGI	IVPNSAPWTTA	TSGRAYAGNAAN...SRD	LNN																														
	Dendroctonus pondero	ARSWDAGL	SSANAYVPGT	SPNQQLVIRE	TTINGI	IVPNSAPWTTA	TSGRAYAGNAAN...SRD	LNN																														
	Dickeya dadantii	GRAWDQG	AKQTGYLPGKT	PANGQLVIR	DSITD	SSYDLANPWGA	AATDRPF	KGNI...SP...QRD	LDD																													
	Pectobacterium carot	GRAWDQG	AKQTGYLPGKT	PANGQLVIR	DSITD	SSYDLANPWGA	AATDRPF	KGNI...SP...QRD	LDD																													
	Rahnella sp	GRAWDAD	G.....	ASQLVIR	DSISF	NSYDQMN	PWGA	AVFSGP	FFAGNVPKDEQ...QRN	LND																												
	Escherichia albertii	GRSLDVD	A.....	NTNGQV	IRDSAIN	EGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
	Escherichia coli	GRSLDVD	A.....	NTNGQV	IRDSAIN	EGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
	Shigella sonnei	GRSLDVD	A.....	NTNGQV	IRDSAIN	EGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
	Shigella boydii	GRSLDVD	A.....	NTNGQV	IRDSAIN	EGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
	Salmonella bongori	GRSLDVD	A.....	NTNGQV	IRDSAIN	EGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
	Citrobacter koseri	GRSLDVD	A.....	NTNGQV	IRDSAIN	EGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
Bactérias	Klebsiella pneumonia	GRALDVD	G.....	NSNGQV	IRDSAIN	EGFN	AQPWAAAV	GVSGRPF	SGNTGSADDKGNLQRN	LND																												
	Cronobacter sakazaki	GRAWDM	AAAN.GYTPGQ	TPNGQV	IRDSV	DAGFN	TAKPWADAV	ISNRPF	AGNTGNVDDSDVQRN	LND																												
	Xanthomonas perforan	GRAWDES	VSVSSLSAYVNGT	SPNQQLVIRE	TTINGI	IVPNSAPWTTA	TSGRAYAGNAAN...SRD	LNN																														
	Ralstonia solanacear	GRAWDQ	SVSSLSAYVNGT	SPNQQLVIRE	TTINGI	IVPNSAPWTTA	TSGRAYAGNAAN...SRD	LNN																														
	Erwinia chrysanthemi	GRPWHT	TTTFSDGRYADPN	AI...GQIV	FLNTSMDN	HIYGD	KMSGDK	KNGNTI	WFNPEDSRFFE.YKSY																													
	Talaromyces stipitat	GRPWNS	LHRISFARTYED	EIES	GYTHV	WNGGAEN	YKLV	TLOAE	FEFTYGP	WNETGR	LSGGWDTI	LNR																										
	Clostridium acetobut	GRPWNR	DYAKTVFIRCFMGE	HI	IPE	GPHN	WKNANA..	EKESY	YAEYKSY	GGPA	ANDKRK...WAKL	LND																										
	Bacillus sp	GRPWNR	DYAKTVFIRCFMGE	HI	IPE	GPHN	WKNANA..	EKESY	YAEYKSY	GGPA	ANDKRK...WAKL	LND																										
	Cellulosilyticum rum	GRPWNR	FAKSVFINCEMGP	HI	IPE	GPHN	WKNANA..	EKESY	YAEYKSY	GGPA	ANDKRK...WAKL	LND																										
	Haloferax volcanii	GRPWNR	NHARTAFIRTWMD	SHV	RS	DGWHN	WSR	DA..EAT	VEYAE	FDSR	GP	AE.GERVS...WATA	LTE																									
	Halopiger xanaduensi	GRPWNR	DHAHVTLFRSHMD	HL	LP	AGWHN	WR	DPV..VDD	VYAE	YENR	GGP	SRIDDRVP...WSET	LSP																									
	Haloterrigena turkme	GRPWNR	PYAQTVFACHLGE	HV	RP	EGWHN	WR	DPV..VDD	VYAE	YENR	GGP	SRIDDRVP...WSET	LSP																									
Plantas	Solanum lycopersicum	GRPWKK	HSRTVMQSYLD	GHIDP	S	GWFE	WRGDF	FA..LKT	LYG	EFMNN	GGPA	GTSKR	VKWP	GYH	ITDP																							
	Pisum sativum	GRPWKK	YSRTVVLQSVVD	SHIDP	A	GWFE	WRGDF	FA..LKT	LYG	EFMNN	GGPA	GTSKR	VKWP	GYH	ITDP																							
	Nicotiana tabacum	GRPWKE	YSRTIIMQSFIDG	FI	DP	S	GWFE	WRGDF	FA..LKT	LYG	EFMNN	GGPA	GTSKR	VKWP	GYH	ITDP																						
	Salix gilgiana	GRPWKE	FYSRTVIMDS	TIGD	I	HP	G	WLP	Q	DFG	LKT	LYG	EFMNN	GGPA	GTSKR	VKWP	GYH	ITDP																				
	Allium cepa	ARPWKAY	SRTVIMETI	ADL	IP	EGYL	P	W	G	D	S	TVG	Q	D	T	CFY	GE	YSNR	GGPA	ANDQRAT	WKGVKKA	LTK																
	Arabidopsis thaliana	GRPWKK	FSTTVIINSE	IGD	I	RP	EGWK	W	D	GE	SF	HK	SCR	Y	VE	Y	ENNR	GGPA	ITNRRV	W..VKI	ARSA																	
	Physcomitrella paten	GRAWGTH	SRVVFRCRNM	ANI	IR	P	IGW	D	W	D	DKR	..KQ	TV	F	Y	AE	Y	ACT	GGPA	NRKGRAP...WSKV	LSA																	
	Aspergillus aculeatu	GRPWSE	YARVVVFQ	TSM	TN	IN	SL	G	W	E	T	S	T	P	N	T	E	Y	V	F	G	E	Y	ANT	GAGS...EGT...RAS	FAE												
	Cochliobolus carbonu	GRPWGN	YARVVVFQ	HTD	LS	NV	IN	P	G	A	W	N	T	G	D	A	R	D	H	V	L	F	G	E	Y	Q	N	T	GAGA...SGK...R	SEGO								
	Botryotinia fuckelia	GRPWNR	DYARVVVFQ	NS	Y	L	G	D	N	I	K	A	G	W	Q	E	S	T	P	N	T	D	G	V	F	G	E	Y	ENNR	GGP	S	V	L	E	G	P	...RAN	FSS
	Phytophthora capsici	GRPWNR	PYARVVVFQ	N	S	L	G	D	N	I	K	A	G	W	Q	E	S	T	P	N	T	D	G	V	F	G	E	Y	ENNR	GGP	S	V	L	E	G	P	...RAN	FSS
	Puccinia graminis consensus>50	GRPW	SALA	AVTFQFC	SLS	N	V	N	P	A	G	W	A	W	N	T	G	D	A	R	D	H	V	L	F	G	E	Y	Q	N	T	GAGA...SGK...R	SEGO					

(Continua)

		QNEFRFEYAN.....
Insetos	Sphenophorus levis	QNEFRFEYAN.....
	Sitophilus oryzae	DNYNRFWEYNSGNGA.....
	Dendroctonus pondero	GNYNRFWEYANTGNAA.....
	Dickeya dadantii	IHFNRRLWEYNTQVLLHE.....
	Pectobacterium carot	VHFNRLWEYHNIDEA.....
Rahnella sp	TNFRRLWQYNNVLTQPAK.....	
Escherichia albertii	TNYNRMWEYNNRGVGSKVVAEAKK.....	
Escherichia coli	TNYNRMWEYNNRGVGSKVVAEAKK.....	
Shigella sonnei	TNYNRMWEYNNRGVGSKVVAEAKK.....	
Shigella boydii	TNYNRMWEYNNRGVGSKVVAEAKK.....	
Bactérias	Salmonella bongori	TNYNRMWEYNNRGVGSKVVAEPKQ.....
	Citrobacter koseri	TNFRNRWEYNNRGLGSKVVAEPKQ.....
	Klebsiella pneumonia	NGFNRMWEYNNRGVGSKVVAEPKQ.....
	Cronobacter sakazaki	ANANRLWEYNNRGLGSKVVAEPKK.....
	Xanthomonas perforan	NSANRFWEYNSGPGGAN.....
	Ralstonia solanacear	YSANRFWEYNNTGAGSGN.....
	Erwinia chrysanthemi	GAGAAVSKDRRLTDAQAAEYTSQSKVLGDWTPPTLP.....
	Talaromyces stipitat	SIWEYGEPAKVFQFGYESGGFGYVDWIDWTPWF.....
	Clostridium acetobut	KEVEKYSIITNILKG.NDDWKVI.....
	Cellulium_sp	EQVKEYKLENIFGS.LKGWPKLGLPYSTAG.....
Cellulosilyticum rum	SAAY..YSREKVLSSG.EDHWTPWVLSI.....	
Arquéias	Haloferax volcanii	DEAAQYSKANVL.G.SASGGEWWDWEE.....
	Halopiger xanaduensi	AEAEERYAAENVLLR.RDSPKSDWYWHRAIC.....
	Haloterrigena turkme	EEATEYTTREITVLDG.WDPLERLADADD.....
	Solanum lycopersicum	NEAMPFTVAELIQ..GGSWLNSTSVAYVEGLVE.....
	Pisum sativum	AEASKFTVTQLIQ..GNVWLNKNTGVAFIEGL.....
Plantas	Nicotiana tabacum	DVANSTFTAGVFNPTDNSFLPKADIPYEAGMMKV.....
	Salix gilgiana	EAMKFTIENFYQG..D.WISASGSPVHLGL.....
	Allium cepa	QEAECFTASSFLVDVLT.WVKNKGVPPVRLTFFKA.....
	Arabidopsis thaliana	AEVNDFTVANWL.GPIN.WIQEANVPVTLGL.....
	Physcomitrella paten	AQAKPFLDYGFID..AKQWLPYV.....
Fungos	Aspergillus aculeatu	KLDAKLTITDILGSDYTS..WVDTSYF.....
	Cochliobolus carbonu	TLKAALSITDILGSNYKD..WVDVSYLS.....
	Botryotinia fuckelia	QFTAPVDITITVLGTSYTFSEFYDASYM.....
	Phytophthora capsici	HLNAPVGITTEILGEGFSEWVVDKSYL.....
	Puccinia graminis	VLGPEVQYVQEPFPQKAKTNTFHRPVPQNFASIIIGQLTLRETPhelyiIKLLLKDFKIYPVGD
consensus>50	.n.n.f.e.n.....	

Figura 27. Alinhamento múltiplo entre as PMEs provenientes dos diversos organismos de reinos distintos. As sequências de origens distintas foram coletadas em banco de dados do NCBI para alinhamento no software online Multialin, sob os parâmetros da matriz original. A contagem de aminoácidos é baseada na sequência do inseto *S. levis*, mas os aminoácidos marcados foram identificados a partir da sequência de *E.chrysothemii*, a qual possui sua estrutura resolvida. As setas apontam os aminoácidos diretamente associados à função de catálise, o asterisco destaca o resíduo diretamente relacionado com a estabilidade do complexo E-S e os triângulos indicam os resíduos não conservados que contribuem na afinidade da enzima pelo substrato.

4.11.2 Alinhamento múltiplo para *SI-EndoPG*

Assim como observado no Blastx para *SI-PME*, as sequências que apresentaram maior similaridade com a *SI-EndoPG* são provenientes dos insetos pragas *S. oryzae* (máxima identidade igual 74%) e *D. ponderosae* (máxima identidade igual 68%). As seguintes quatro sequências mais similares (máxima identidade entre 49 e 54%) identificadas, também têm origem de insetos fitófagos (*C. tremulae*, *G. viridula*, *L. decemlineata* e *P. cochleariae*). O alinhamento múltiplo entre essas sequências revelou, mais uma vez, alta similaridade entre os insetos (Figura 28).

A dieta entre esses insetos são distintas e até mesmo o mecanismo de ataque difere em alguns casos, como, por exemplo, a *G. viridula* que consome a planta externamente ao invés de abrir galerias internas como *S. levis* e outros. Todavia, todas essas espécies pertencem à infraordem Cucujiformia, a qual é conhecida por reunir os mais eficientes insetos herbívoros. Acredita-se, portanto, que essas pectinases

estejam associadas diretamente com a eficiência na herbivoria destes insetos, e o fato de serem similares entre si sugere um provável ancestral comum.

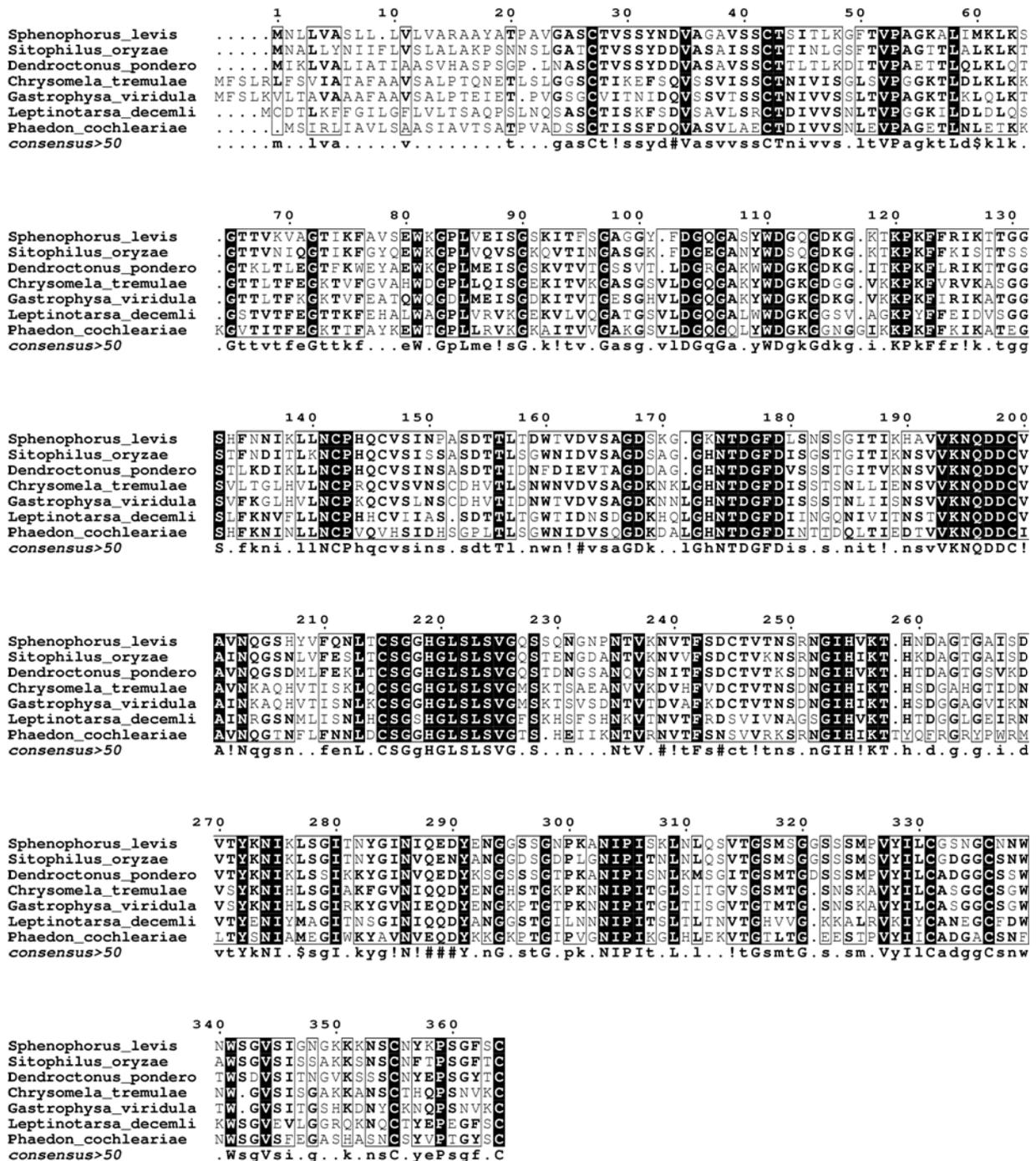


Figura 28. Alinhamento múltiplo entre as Endo-PGs de insetos. As Endo-PGs de inseto disponíveis no banco de dados NCBI foram alinhadas em software online Multialin sob os parâmetros da matriz original. A contagem dos aminoácidos é baseada na sequência *Sl-EndoPG*. Como pode-se observar, os resultados indicam alta similaridade entre as sequências.

Em uma análise maior, englobando organismos de reinos distintos, os dados gerados após alinhamento múltiplo das Endo-PGs foram analisados quanto a regiões conservadas e função.

Nota-se pela Figura 29 que as sequências diferem principalmente entre organismos de reinos distintos, contudo, há resíduos conservados presentes em todos os organismos independentes do reino ou espécie. Estes resíduos fazem parte do sítio catalítico da enzima e estão relacionados diretamente com a atividade da mesma, sendo eles os aminoácidos Asn¹⁷⁴, Asp¹⁷⁶, Asp¹⁹⁷ e Asp¹⁹⁸. Em 1998 Pickersgill e colaboradores obtiveram a estrutura resolvida da primeira poligacturonase, uma Endo-PG de *E. carotovora*. Neste trabalho sugere-se que essa enzima tem mecanismo de glicosidase por inversão e que dentre os resíduos ácidos conservados, um deveria ser o doador de prótons (ácido geral) e o outro o receptor (base geral). Essa sugestão é fortalecida pela análise da estrutura resolvida da End-PG II de *A. niger* (VAN SANTEN; BENEN *et al.*, 1999). Com o uso de mutações sítio dirigidas e ensaios de atividade enzimática, Van Santen e colaboradores propuseram que o doador de prótons é Asp¹⁷⁶ e os ativadores da molécula de água são Asp¹⁹⁷ e Asp¹⁹⁸.

Outros resíduos relacionados diretamente com a catálise ou ligação ao substrato também foram identificados no trabalho de Van Santen e colaboradores. Com base nos organismos selecionados, pode-se dizer que embora esses resíduos não apresentem padrão de conservação universal, eles são muito conservados para alguns grupos. A His²¹⁹ quando trocada por Ala resultou na perda de 99,5% da atividade original da enzima sem afetar o *K_m* da mesma, indicando estar fortemente associado à função catalítica (VAN SANTEN; BENEN *et al.*, 1999). Esse resíduo é conservado para o grupo de insetos, fungos e plantas, em contraste com o grupo das bactérias que apresentou ser muito variável para aminoácidos desta mesma posição. O resíduo Lys²⁵⁸ apresentou padrão semelhante a His²¹⁹, pois é extremamente conservada no grupo de insetos, fungos e plantas, sendo variável para o grupo de bactérias. A Lys²⁵⁸ assim como a Arg²⁵⁶ está intimamente ligada à função de ligação ao substrato (VAN SANTEN; BENEN *et al.*, 1999). Este último resíduo é conservado apenas nos grupos dos fungos e plantas, sendo mais uma vez variável para bactérias e substituído por His em todos os insetos observados.

Como evidenciado por Van Santen e colaboradores, a substituição destes resíduos conservados ou semi-conservados, acarreta em drásticas alterações na atividade das Endo-PGs, deste modo, a partir do resultado apresentado no alinhamento múltiplo é possível inferir que a menor afinidade ao substrato da *SI-EndoPG* em relação à algumas Endo-PGs de fungos é provavelmente devido à troca da Arg²⁵⁶ por uma His na mesma posição.

	Sphenophorus_levis
	Sitophilus_oryzae
Insetos	Dendroctonus_pondero
	Chrysomela_tremulae
	Gastrophysa_viridula
	Leptinotarsa_decemli
	Phaedon_cochleariae
Fungos	Talaromyces_stipitat
	Penicillium_marneffe
	Cryphonectria_parasi
	Colletotrichum_lupin
	Glomerella_lindemuth
	Phaeosphaeria_nodoru
	Verticillium_dahliae
	Aspergillus_oryzae
	Aspergillus_niger
	Penicillium_olsonii
Plantas	Saccharomyces_cerevi
	Athelia_rolfsii
	Thanatephorus_cucume
	Postia_placenta
	Arabidopsis_thaliana
	Brassica_napus
Plantas	Malus_domestica
	Glycine_max
	Prunus_
Bactérias	Oryza_sativa
	Erwinia_chrysanthemi
	Pectobacterium_carot
	Xylella_fastidiosa
	Dickeya_dadantii	MKAMRFSQHHALVLIITSVYLFNSQVQAIPTSEPTSPALQAVAPSLDDHSVVLAWHAPEDTSAIADYQIYQ
	Enterobacteriaceae_b
	Pectobacterium_atros
	Faecalibacterium_pra
	consensus>50

	Sphenophorus_levis
	Sitophilus_oryzae
Insetos	Dendroctonus_pondero
	Chrysomela_tremulae
	Gastrophysa_viridula
	Leptinotarsa_decemli
	Phaedon_cochleariae
Fungos	Talaromyces_stipitat
	Penicillium_marneffe
	Cryphonectria_parasi
	Colletotrichum_lupin
	Glomerella_lindemuth
	Phaeosphaeria_nodoru
	Verticillium_dahliae
	Aspergillus_oryzae
	Aspergillus_niger
	Penicillium_olsonii
Plantas	Saccharomyces_cerevi
	Athelia_rolfsii
	Thanatephorus_cucume
	Postia_placenta
	Arabidopsis_thaliana
	Brassica_napus
Plantas	Malus_domestica
	Glycine_max
	Prunus_
Bactérias	Oryza_sativa
	Erwinia_chrysanthemi
	Pectobacterium_carot
	Xylella_fastidiosa
	Dickeya_dadantii
	Enterobacteriaceae_b
	Pectobacterium_atros
	Faecalibacterium_pra
	consensus>50

(Continua)

	1	10	20	30	40	50
<i>Sphenophorus levis</i>	...M	NLLV	ASLL	LVLV	ARAA	YATPA
<i>Sitophilus oryzae</i>	...M	NALLY	NII	FLV	SLAL	AKP
<i>Dendroctonus pondero</i>	...M	KLVA	LIAT	IAAS	VHASP	SGP
<i>Chrysomela tremulae</i>	F	SLR	LFSV	IATA	FAAV	SALPT
<i>Gastrophysa viridula</i>	F	SLK	VLT	AVAAA	FAAV	SALPT
<i>Leptinotarsa decemli</i>	...M	CDT	LKFF	GILG	FLVL	TSAP
<i>Phaedon cochleariae</i>	...M	SIR	LIAV	LSAAS	IAVTS	ATPV
<i>Talaromyces stipitate</i>	A	GLA	CLSS	VVLAV	PAPAP	TAPAK
<i>Penicillium marneffe</i>	A	GLA	FFSS	VVLAV	PAPAV	TTPAT
<i>Cryphonectria parasi</i>	L	LLA	ALL	LPLI	QAAP	PAVTP
<i>Colletotrichum lupin</i>	..M	VSS	LLAL	GALAA	TAAI	AAP..
<i>Glomerella lindemuth</i>	..M	VSY	LFLV	LALAS	VVAI	ASP
<i>Phaeosphaeria nodoru</i>	..M	VAM	QVT	SLLL	SAGAL	AYA
<i>Verticillium dahliae</i>	N	VIL	LAL	GALAS	TATAN	PLPA
<i>Aspergillus oryzae</i>	Q	LLG	LAL	GSLA	AAAP	PSRT
<i>Aspergillus niger</i>	Q	LLG	LA	AVG	SLVA	SAAP
<i>Penicillium olsonii</i>	I	L	SML	LALG	AAAV	SAAP
<i>Saccharomyces cerevi</i>	..M	S	ANS	LL	LL	LL
<i>Athelia rolfsii</i>	V	L	GAS	LFLA	SVA	VPY
<i>Thanatephorus cucume</i>	...M	RFS	LGFL	ATL	PIA	LVA
<i>Postia placenta</i>	...M	LGI	L	L	L	L
<i>Arabidopsis thaliana</i>	...D	E	T	L	E	A
<i>Brassica napus</i>	...A	R	A	S	L	R
<i>Malus domestica</i>	T	G	G	I	A	T
<i>Glycine max</i>	..G	K	L	G	D	I
<i>Prunus</i>	V	F	M	I	N	S
<i>Oryza sativa</i>	...M	L	I	A	G	A
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	E	K	V	A	P	D
<i>Pectobacterium carot</i>	F	A	S	D	R	T
<i>Xylella fastidiosa</i>	T	V	L	P	A	R
<i>Dickeya dadantii</i>	N	E	V	T	V	T
<i>Enterobacteriaceae_b</i>	..M	K	L	A	I	S
<i>Pectobacterium atros</i>	..M	D	L	M	K	H
<i>Faecalibacterium pra</i>	..M	V	M	S	V	T
<i>consensus>50</i>	..c	t	..c	..i	..v	..g

	60	70	80	90	100
<i>Sphenophorus levis</i>	M	K	L	K	S
<i>Sitophilus oryzae</i>	L	K	L	K	T
<i>Dendroctonus pondero</i>	L	K	L	Q	T
<i>Chrysomela tremulae</i>	L	K	L	K	K
<i>Gastrophysa viridula</i>	L	Q	L	K	T
<i>Leptinotarsa decemli</i>	L	D	L	Q	S
<i>Phaedon cochleariae</i>	L	E	T	K	K
<i>Talaromyces stipitate</i>	L	T	N	L	N
<i>Penicillium marneffe</i>	L	T	G	L	N
<i>Cryphonectria parasi</i>	L	T	K	L	N
<i>Colletotrichum lupin</i>	M	T	G	L	K
<i>Glomerella lindemuth</i>	M	T	G	L	K
<i>Phaeosphaeria nodoru</i>	L	T	K	L	K
<i>Verticillium dahliae</i>	L	S	S	L	K
<i>Aspergillus oryzae</i>	L	S	K	A	K
<i>Aspergillus niger</i>	L	S	D	A	A
<i>Penicillium olsonii</i>	L	S	N	L	K
<i>Saccharomyces cerevi</i>	L	T	G	L	S
<i>Athelia rolfsii</i>	I	S	N	L	A
<i>Thanatephorus cucume</i>	I	A	A	L	D
<i>Arabidopsis thaliana</i>	S	F	P	T	L
<i>Brassica napus</i>	L	R	N	F	I
<i>Malus domestica</i>	Q	L	T	L	O
<i>Glycine max</i>	D	I	E	V	I
<i>Prunus</i>	N	A	I	T	F
<i>Oryza sativa</i>	D	D	S	E	I
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	L	H	L	E	K
<i>Pectobacterium carot</i>	L	L	I	D	K
<i>Xylella fastidiosa</i>	L	W	I	D	E
<i>Dickeya dadantii</i>	L	N	L	L	Q
<i>Enterobacteriaceae_b</i>	L	H	L	E	A
<i>Pectobacterium atros</i>	L	Q	L	E	A
<i>Faecalibacterium pra</i>	L	H	L	E	Q
<i>consensus>50</i>	l	..g	..f	..y	..e

(Continua)

	110	120	130	140	150		
Insetos	<i>Sphenophorus levis</i>	SYW.....	DGQGDKG.KTKPK	FFRIKTTGSSHFN.	NIKLLNCPHQCVSIN	PASDITLITD	
	<i>Sitophilus oryzae</i>	NYW.....	DSQGDKG.KTKPK	FFKISTTSSSTFN.	DIITLKNCPHQCVSIS	SASDITLISG	
	<i>Dendroctonus pondero</i>	KWW.....	DGKGDKG.ITKPK	FLRIKTTGSSTLK.	DIKLLNCPHQCVSIN	SASDITLIDN	
	<i>Chrysomela tremulae</i>	KYW.....	DGKGDGG.VKKPK	FVRVKAGSSVLT.	GLHVLNCPHQCVSIN	SCDHVITLSDN	
	<i>Gastrophysa viridula</i>	KYW.....	DGKGDKG.VKKPK	FIRIKATGSSVFK.	GLHVLNCPHQCVSIN	SCDHVITIDN	
	<i>Leptinotarsa decemli</i>	LWW.....	DGKGSV.AGKPY	FFEIDVSGGSLFK.	NVFLNCPHQCVSIN	ASDITLITG	
	<i>Phaedon cochleariae</i>	LYW.....	DGKGGN.GIKPK	FFKIKATEGSHFK.	NINLLNCPHQVHSID	HSGLITLISG	
	<i>Talaromyces stipitat</i>	RWW.....	DGKGSN.GGKTKPK	FFYAHNLKSSSIS.	NIKILNCPHQVFSID	GAQTLITLIDH	
	<i>Penicillium marneffe</i>	RWW.....	DGKGSN.GGKTKPK	FFYAHNLKSSSIS.	NIKVLNCPHQVFSIN	GAETLITLIDH	
	<i>Cryphonectria parasi</i>	AWW.....	DGEGSN.GGKTKPK	MFYAHSLKQSTIH.	NLKVKNTPVQFMSIN	SATDLNVID	
Fungos	<i>Colletotrichum lupin</i>	RWW.....	DSKGSN.GGKTKPK	FFYAHSLKSSNIK.	GLNVLNTPVQAFSIN	SATLITLVYD	
	<i>Glomerella lindemuth</i>	RWW.....	DSKGN.GGKTKPK	FFYAHSLKDSSTIR.	GLHTLNTVQAFSIN	GAANLGVYD	
	<i>Phaeosphaeria nodoru</i>	KWW.....	DGKGSN.GGKTKPK	FFFAHSLTSSRIT.	NLNKNTVQAFSIN	QATSLITLIDH	
	<i>Verticillium dahliae</i>	RWW.....	DGKGGN.GGKTKPK	LLAVKGLNNSIVK.	GLNFKDQVHGISVN	TVNNLQILID	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	RWW.....	DGKGTN.GGKTKPK	FIYGHKLQSSSTIK.	GLHVKNYVQVFSV.	OGNDVHLTD	
	<i>Aspergillus niger</i>	RWW.....	DSKGTN.GGKTKPK	FMYIHVDEDSSTFK.	GINIKNTVQAFISV.	QATNVHLND	
	<i>Penicillium olsonii</i>	SWW.....	DGKGTN.GGKTKPK	FFYAHSLDSSSTIT.	GLNVKNTPVQAFSIN	QADNLVLDH	
	<i>Saccharomyces cerevi</i>	KWW.....	DGLG.DSGKVKPK	FVKLALTGTSKVT.	GLNIKNAHQVFSIN	KCSDLITISD	
	<i>Athelia rolfsii</i>	QYW.....	DGKGTN.GGKTKPK	PMVKLYHGTGSFK.	DVTVLNCPHQVSVG	TSAAFTISG	
	<i>Thanatephorus cucume</i>	KYW.....	DGKGSN.GGKTKPK	PMMKIKM.SGTYS.	NVKVLNCPHQVFSIN	PAALVMSK	
Plantas	<i>Postia placenta</i>	YYW.....	DGLGTN.GGKTKPK	PFMRF.....VFK.	TSAILNCPHQAFISV	PAGPLTINH	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	KTWWQ.....	NSCKIDKSKPC.	TKAPTALTYLNKLNKLNK.	NLRVKNNAQIQISIE	KCNKVEVSN	
	<i>Brassica napus</i>	ETWWE.....	NSCKRNEAKKC.	TKAPTALTYNKNLNRVN.	NLRVKDAQIQISIE	KCNVQVSN	
	<i>Malus domestica</i>	NIWVK.....	NSCKIKPQPPCGTYAP.	AVTFNRCNNLVVK.	NLNIQDAQIHFVIF	QNCINVOASC	
	<i>Glycine max</i>	NIWQ.....	NSCKVNEKLPCKN.	APTALTYKCKDLTVE.	DLTIKNGQQMQVSV	QNSENVQASD	
	<i>Prunus</i>	ALW.....	ACKASHGES.	CPSGA.TTLGFS	SDSNIVVSLASL	NSQMFHIVIND	SCQNVQMG
	<i>Oryza sativa</i>	LLRSV.....	SPANVSQ.....	LIRFYSFNVSVR.	NIRITNSPQCHLKF	DSGGIKVKN	
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	VWVER.....	WRAAIRATGKKGGTDR.	PLIYVTRSNRVLID.	GVTLNTPVQAFISV	HVVFRYAH	DVTVNG
	<i>Pectobacterium carot</i>	VKLQDKKVS.....	WDLAA.	DAKVKKLNKNT.	PRLIQINKSKNFTLY.	NVSLINSNFHVV	SDGDFGTAWK
	<i>Xylella fastidiosa</i>	SILTGKQYARQRTWDLAY.	QNKRRHALHQVPR.	LIQIRGGNDFITLY.	RVAIENAPNFHVV	ADIVSGVITAWG	
Bactérias	<i>Dickeya dadantii</i>	KRSADGKDELGNLQYVKS.	SSKVSNDGILAKNQVAAVAKG.	IDIKLAYSQLRSSL.	VTLRQVKNAYIAD		
	<i>Enterobacteriaceae_b</i>	AYFS.....	ATPN.	EQGYRPLELR.	PRIVFEGCQNVQLR.	EFTIEHAPMWTIHLV	SCNPKVISE
	<i>Pectobacterium atros</i>	AYFS.....	AEPDQGYRLPAKYE.	PRIVFEDCEHVRLC.	DFTIEHAPMWTIHLV	SCRCQIIVER	
	<i>Faecalibacterium pra</i>	A.FM.....	KRASRYVENGDFYPR.	ETMVVVEHCNHF.	ISEH.DVTLQNSFPH.	MTLHPACGNDVLI	SN
	<i>consensus>50</i>	.w.....	dg.g.gg.kpk.s.i.	n.v.n.p.q.vsin.n.v.d	

	160	170	180	190	200		
Insetos	<i>Sphenophorus levis</i>	WTVDVSA.....	GDS.....	KG.GKNTDGFDDISN	SSGITIKRHAVVK	NQDDCVAVNQG	
	<i>Sitophilus oryzae</i>	WNIDVSA.....	GDS.....	AG.GHNTDGFDISG	STGITIKRNSVVK	NQDDCVAVNQG	
	<i>Dendroctonus pondero</i>	FDIEVTA.....	GD.....	AG.GHNTDGFVSS	STGITIKRNSVVK	NQDDCVAVNQG	
	<i>Chrysomela tremulae</i>	WNVDVSA.....	GDK.....	NKLGHNTDGFDIS	STSNLLIENSVVK	NQDDCVAVNKAG	
	<i>Gastrophysa viridula</i>	WTVDVSA.....	GDK.....	NNLGHNTDGFDIS	STSNLLIENSVVK	NQDDCVAVNKAG	
	<i>Leptinotarsa decemli</i>	WTIDNSD.....	GDK.....	HQLGHNTDGFDI	NGQIVITNSTVKN	QDDCVAINRG	
	<i>Phaedon cochleariae</i>	WNIDVSA.....	GDK.....	DALGHNTDGFDI	NTDQLTIEDTVK	QDDCVAVNQG	
	<i>Talaromyces stipitat</i>	ITIDNSA.....	GDS.....	Q.GHNTDAFDVGD	SNGVTISNAIVQ	NQDDCLAVNSG	
	<i>Penicillium marneffe</i>	ITIDNSA.....	GDS.....	T.GAHTDAFDVGS	SNGVTISNAIVQ	NQDDCLAVNSG	
	<i>Cryphonectria parasi</i>	VTMDNSA.....	GAS.....	K.G.HNTDAFDVGS	SENIYISGAVIN	NQDDCLAVNSG	
Fungos	<i>Colletotrichum lupin</i>	VIIDNSA.....	GDS.....	A.GHNTDAFDVGS	STGVYISGANV	KNQDDCLAVNSG	
	<i>Glomerella lindemuth</i>	VSVDNSA.....	GDS.....	A.GHNTDAFDVGS	STGVYISGANV	KNQDDCLAVNSG	
	<i>Phaeosphaeria nodoru</i>	ITIDNSA.....	GDV.....	ANGHNTDAFDVGS	STGVYISGANV	KNQDDCLAVNSG	
	<i>Verticillium dahliae</i>	VTLDASA.....	GDS.....	K.GHNTDGFVGN	AQNILISGAIVK	NQDDCLAVNSG	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	ITIDNSD.....	GDN.....	NGGHNTDAFDV	SENGVYITGANV	KNQDDCLAVNSG	
	<i>Aspergillus niger</i>	FTIDNSD.....	GD.....	NGGHNTDGFDIS	STGVYISGATV	KNQDDCLAVNSG	
	<i>Penicillium olsonii</i>	ITIDNTD.....	GDK.....	TNGGHNTDAFDV	SESTYITISGANV	KNQDDCLAVNSG	
	<i>Saccharomyces cerevi</i>	ITIDIRD.....	GDS.....	A.GHNTDGFVGS	SSNVLIQCTVY	NQDDCLAVNSG	
	<i>Athelia rolfsii</i>	VTIDNSA.....	G.....	SSKGHNTDGFV	SADDVTITGNV	CKNQDDCLAVNKG	
	<i>Thanatephorus cucume</i>	LTIDNSA.....	GDKPNKSGTSAAGHNTDGFV.	STIDLIEDSTIF	NQDDCLAVNSG		
Plantas	<i>Postia placenta</i>	VTVNNTA.....	GN.....	TEGHNTDGFV.	SASDLTIMNSV	VENQDDCVAINAG	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	VEITAPG.....	DSBNTDGIHINTQ	NIIRVNSDIIGT	GDDCISIEDG	
	<i>Brassica napus</i>	VEVTAPG.....	DSBNTDGIHINTQ	NIIRVNSDIIGT	GDDCISIESG	
	<i>Malus domestica</i>	LTVTAPG.....	DSBNTDGIHINTQ	NIIRVNSDIIGT	GDDCISIVSG	
	<i>Glycine max</i>	LTVTAPG.....	DSBNTDGIHINTQ	NIIRVNSDIIGT	GDDCISIVSG	
	<i>Prunus</i>	VRVSASG.....	NSBNTDGIHQMS	SSGVTILNSKI	ATGDDCVSISGP	
	<i>Oryza sativa</i>	ITISSPG.....	DSLNTDGIHLQNT	TRDVIIRS	SSIGCGDDCISIQTG	
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	THIIAPW.....	HAPNTDAIDPID	SNIRITMNV	IDCNDHIAIKAE	
	<i>Pectobacterium carot</i>	TIKTPS.....	TARNTDGDIPMS	SKNITIASN	ISTGDDNVAIKAY	
	<i>Xylella fastidiosa</i>	IRILTPS.....	LVYTTTPGYHCPPGTTDP.	DVVTATCFPTDPTVKN	TDDGFDPGQSNH	VLLAYSYISTGDDHVAIKAG	
Bactérias	<i>Dickeya dadantii</i>	VTIRNPA.....	NHGIIFLESRN	VVENSVIHQTFDAN	NGDGVFINSQ	NIMVNSVFDTGDD	SINFAG
	<i>Enterobacteriaceae_b</i>	LTQNDL.....	TMANTDALDID	SCQLVITNSL	FASAADRICKTT	
	<i>Pectobacterium atros</i>	LTQNDL.....	SMANTDALDID	SCQLVITNSL	FASAADRICKTT	
	<i>Faecalibacterium pra</i>	IRVLNPL.....	DCNTSDGIDPH	STNVRIIGCHV	QACADDICLKT	
	<i>consensus>50</i>	vtidnsa.....	gd.....	ghNtDgfdv.	sqnv.i.nsvv.nq	DDciain.g	

(Continua)

3

	210	230	240	250	* * 260
Insetos	Sphenophorus levis Sitophilus oryzae Dendroctonus pondero Chrysomela tremulae Gastrophysa viridula Leptinotarsa decemli Phaedon cochleariae Talaromyces stipitat Penicillium marneffe Cryphonectria parasi Colletotrichum lupin Glomerella lindemuth Phaeosphaeria nodoru Verticillium dahliae Aspergillus oryzae Aspergillus niger Penicillium olsonii Saccharomyces cerevi Athelia rolfsii Thanatephorus cucume Postia placenta Arabidopsis thaliana Brassica napus Malus domestica Glycine_max Prunus_ Oryza sativa	SHYV.....FQNLTCSSGGHLSLSVGGSSQNGNPNIVKNTVFSDCIVTN...SRNGIHVKT.HND SNLV.....FESLTCSSGGHLSLSVGGSTENGDANTVKNVVFSDCTVKN...SRNGIHIKT.HKD SDML.....FEKLTCSGGHLSLSVGGSTDNGSANQVSNITVFSDCIVTK...SDNGIHVKT.HTD QHVT.....ISKLQCSGGHLSLSVGMKTSAEANVVKDVHFVDCIVTN...SDNGIHIKT.HSD QHVT.....ISNLKCSGGHLSLSVGMKTSVSDNITVDVAFKDCIVTN...SDNGIHIKT.HSD SNML.....ISNLHCSGGHLSLSVGFSSKHSFSSHKVTNVTFRDSVIVN...AGSGIHVKT.HTD TNFL.....FNNLDCSGGHLSLSVGTSHHEIKNTVKNVTFSSNSVVRK...SRNGIHIKT.TYQF TNII.....FTGGTCSGGHLSIG...SVGGRSDNITVQTVHIENSTIKN...SQNGVRIKT..VY TNII.....FTGGTCSGGHLSIG...SVGGRSDNITVQTVHIENSTIKN...SQNGVRIKT..VY TNIT.....FTSGTCTGGHLSIG...SVGGRSDNITVKTVSIITNSKIIN...SQNGVRIKT..VY TNIT.....FTGGTCSGGHLSIG...SVGGRSDNITVKTVSIITNSKIIN...SDNGVRIKT..VS TNIT.....FTGGTCSGGHLSIG...SVGGRSDNITVKTVSIITNSKIIN...SDNGVRIKT..VA SDIT.....FTGGICSGGHLSIG...SVGGRSDNITVKNVNLNSISIN...SDNGVRIKT..VY TNIT.....FTGGNCSGGHLSIG...SVGNRSDNITVKNVNLNSISIN...SDNGVRIKT..IS ENIE.....FTGATCSGGHLSIG...SIGNRSDNITVKNVNVADSTVVD...SDNGIRIKT..IS ESIS.....FTGGTCSGGHLSIG...SVGGRDDNITVKNVITISDSTVSN...SANGVRIKT..IY ENII.....FTGGTCSGGHLSIG...SVGGRDDNITVKNVITISDSTVSN...SDNGIRIKT..IY STIK.....FMNNYCYNGHGISV...SVGGRSDNITVNGFVAENNHVIN...SDNGIRIKT..VE SNIE.....FSDNKCSGGHLSIG...SVKSDHNVES.VTISGNITVD...SANGIRIKT.VYG SNII.....FQRNTCTGGHLSIG...SVSTGAGCQHPDLEQTRWST...TTKALRIKT.KSD SNIL.....FEGNYCSGGHMSIG...SISSSKGVVSG.VTIFIGNTVSN...SMYGRITKV.DSA TQNL.....QIFDLTCGPGHISIG...SLGDDNSKAYVSGINVDGAKFVE...SDNGVRIKT.Y.Q SQNV.....QINDLTCGPGHISIG...SLGDDNSKAFVSGVTVDGAKLSSG...TDNGVRIKT.N.Q SQRV.....QATDITCGPGHISIG...SLGEDGSEDDVSGVFWNGAKLSSG...TSNGIRIKT.W.K SKDV.....LATDI CGP GHISIG...SLGAEKSDDFVSGITVKGAKLSSG...TTNGLRIKT.W.Q TSNL.....WIEGVA CGP GHISIG...SLGKEQEEAGVQNVTKTITVFTG...TQNGIIRIKS.WGR CSNV.....HMKNIN CNP GHISIG...GLGKDNSLACVSDVFAEHINVEN...ALYGVRIKT.W.Q	Erwinia chrysanthemi Pectobacterium carot Xylella fastidiosa Dickeya dadantii Enterobacteriaceae_b Pectobacterium atros Faecalibacterium pra consensus>50	KPDSRFPNGVVDNIYIANNVLKQGRG.I...SIGSE.TSGVNNVLENNRFE...SMYGIIRIKS.L.R KGRSE...TRNISILHNEFGYGHG.M...SIGSE.T.MGVYNTVDDLVMTG...TTNGIIRIKS.D.K RGKMP...SYALISFLNHFYGHG.M...SIGSD.TESGVHDMVSVLSDIDGDFSPNSNGLQMS.D.A LGQDAKQEPSONAQLFNRYFRHGAV...VMGSM.TGAGIVNVLAEENISIQ...SDVGLRAKS.A.P RKPAFL.QQPAQQIVISNCTLOSKSCAL...KIGTE.TFADIEDVSVNCTIYQ...SNRGIIS.R.D HKPPHL.QRKVQVVISNCLLRKSCAL...KIGTE.TFADIEDVSVNCAIYD...TNRAIGLIS.R.D AGNNEY.G.PTKNVIISNCTLTSTSAAI...KIGTE.GVADENILVDCIITG...TNRGLSIQT.R.D .n.....f...csqghg.sig...s.e...n.v.nv.v.n...sdngirikt....	

4

	270	280	290	300	310	320	330
Insetos	Sphenophorus levis Sitophilus oryzae Dendroctonus pondero Chrysomela tremulae Gastrophysa viridula Leptinotarsa decemli Phaedon cochleariae Talaromyces stipitat Penicillium marneffe Cryphonectria parasi Colletotrichum lupin Glomerella lindemuth Phaeosphaeria nodoru Verticillium dahliae Aspergillus oryzae Aspergillus niger Penicillium olsonii Saccharomyces cerevi Athelia rolfsii Thanatephorus cucume Postia placenta Arabidopsis thaliana Brassica napus Malus domestica Glycine_max Prunus_ Oryza sativa	AGTGATSDVTYKNIKLSGITNYGINIQEDYENGSSGNPKANIPISKLNLSVITGSMSSGSSSMPVYILC AGTGATSDVTYKNIKLSGITNYGINVQENYANGGDSGDP LGNIPITNLNLQSVITGSMSSGSSSMSVYILC AGTGSVKDVTYKNIKLSGIKKGYNVQEDYKSGSSSGTPKANIPISNLKMSGITGSMSTGSSSMPVYILC GAHGTDVNSYKNIHLSGIAKFGVNIQDYENGHSTGKPKNNIPITGLSITGSGSMTG.SNSKAVYILC GGAGVIRKNSYKNIHLSGIRKYGVNIEQDYENGKPTGTPKNNIPITGLTISGVTGTMGT.SNSKAVYILC GGLGEIRNVTYENIYMAGITNSGAINIQDYENGSTGILNNSNIPITSLTLTNTGHVVG.KKALRVKIYC RGRYPWRMLTYSNIAMEGIKWYAVNVEQDYKKGKPTGTPVGNIPITKGLHLEKVTGLTG.ESTPVPYIIC GATGSSVSGVTYKGITLSGITIKYGVIEQDYENGSPGTPTNGVPIITGLTIDGVTGVT..SSATDVYILC GATGSSVSGVTYKGITLSGITIKYGVIEQDYENGSPGTPTNGVPIITGLTIDGVTGVT..SSATDVYILC DATGSSVSGVTYSGITLSGITIKYGVIEQDYENGSPGTPTNGVPIITGLTIDGVTGVT..SSATDVYILC GATGSSVSGVTYSGITLSGITIKYGVIEQDYENGSPGTPTNGVPIITGLTIDGVTGVT..SSATDVYILC GATGSSVSGITYKNIKLSNIAKYGIVVEQDYENGSPGTPTAGVPIITGLTIQDVTGVA..AKGTNVYILC GATGSSVDVIYDITITLSNIAKNGVIEQDYENGSPGTPTAGVPIITGLTINKVVTGVA..SKGTNVYILC GATGSSVSGVTYENITLKNIAKNGVIEQDYKNGSPGTGKPTTGVPIITGLTIDGVTGVA..SKATPVYILC KETGDVSEITYSNIQLSGITIDYGVIEQDYENGSPGTPTSTGIPITDVTVDGVTGLTLE..DDATQVYILC KAKGEVADVTFSNIELSNIAKYGIVIEQDYENGSPGTGKPTTGVPIITGLTIDGVTGVA..SSGTDVYILC GATGTVNVTNIFSNKISGIKSYGVIEQDYENGKTTGTATGVPISNLVMTGVTGVS..STAKRVKILV ATDAAVTNIVYKDNITVSGIKSYGVIEQDYENGSPGTGKPSNGVITLGPVTFEGT.NKVSVN.SGAKEVYVLC ATNASVTNVFNGNTATGKIKFGVIVDQGYE..TTLGTPGNVAMSGISF.GT.MNIAVTSDAQRVAVNC ATSGAVSNVYTGNNISGCTKYGVLVQSYP..EDASTPGNDTTISNVNFIQSPTTVEVD.SNAERVTVDC GGSGTAKNIKFNIRMENVN.KPIIIDQYCDKDK...CEDQESAVQVKNVYKNIISGTSATDVAITLN GGSGTASNIFQNIQMNVEN.PIIIDQYCDKDK...CTEQKSAVQIKNVYRNISGTSASDIAITFN GGSGSATNIVFNQVQMDVNTN.PIIIDQYCDHKTkd...CKQKSAVQVKNVLYQNIIRGTSASGDAITLN GGSGSATNIVFNQVQMDVNTN.PIIIDQYCDQETP...CEEQKSAVQIRNVLYQNIISGTSASDVGQVFD PSTGFARNILFHATMVNVEN.PIIDQYCDKDK...CPGQVSGVQISDVTYEDIHGTSATEVAVKFD GKGGEVKNVTYRHRTRMLDVEV.PLVFSGY.YQAGPIVQAEVDKLLQAGGFTLQEQIYP.P...DTEP SAAQVNVGVRYSNVMKNVAK.PIVIDTY.YEKKEGNSVVDWSDITVFKDITSTKGVV...VVLN DHGGVVDHVTYSKICMRRLKR.PLAFDFT.YKPSNGNSVPLFKNIVLQDITHVLESFVF.GAGQLLFMGIL	Erwinia chrysanthemi Pectobacterium carot Xylella fastidiosa Dickeya dadantii Enterobacteriaceae_b Pectobacterium atros Faecalibacterium pra consensus>50	g..g.v.nvt%.ni.ls.i.kygivieqdy.ng...g.p..nvpil..l.e.v.g.v...s...vyilc			

(Continua)

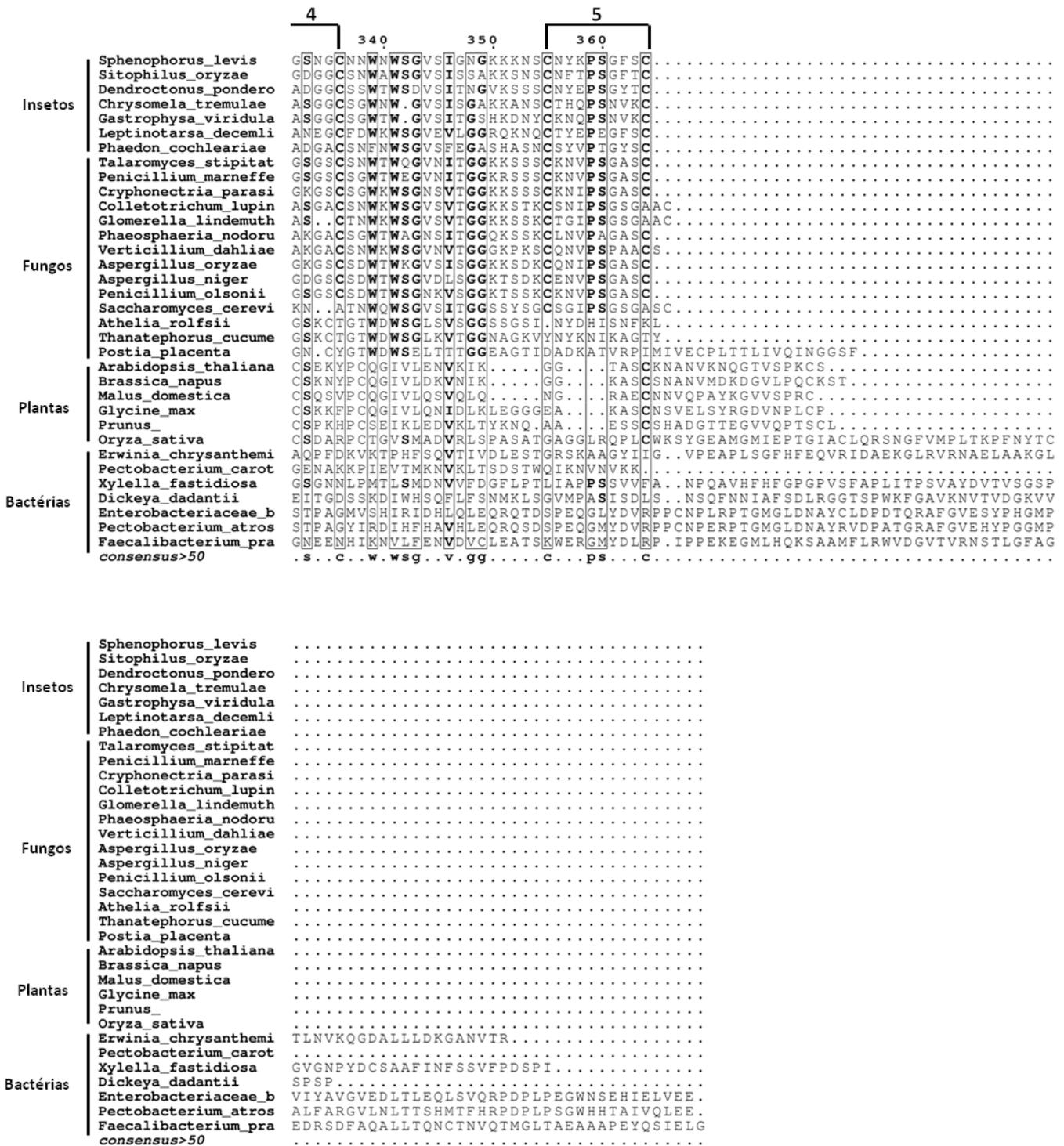


Figura 29. Alinhamento múltiplo entre as Endo-PGs provenientes dos diversos organismos de reinos distintos. As seqüências de origens distintas foram coletadas em banco de dados do NCBI para alinhamento no software online Multialin, sob os parâmetros da matriz original. A contagem de aminoácidos é baseada na seqüência do inseto *S. levis*, mas os aminoácidos marcados foram identificados a partir da seqüência do *A. niger*, o qual possui sua estrutura resolvida. As chaves numeradas 1, 3, 4 e 5 indicam os resíduos de cisteínas conservados, para o grupo de insetos e fungos, que formam ligações dissulfeto. A chave 2 indica uma possível ligação dissulfeto extra entre as cisteínas conservadas de inseto. As setas apontam os aminoácidos diretamente associados a função de catálise e os asteriscos destacam os resíduos diretamente relacionados com a afinidade da enzima pelo substrato.

Tomando-se uma nova abordagem, nota-se ainda pelo alinhamento múltiplo que o grupo dos insetos tem maior proximidade com o grupo dos fungos em vários pontos característicos, dos quais os grupos de plantas e bactérias não compartilham.

O primeiro ponto a ser ressaltado é a presença de uma longa sequência peptídica na extremidade N-Terminal da enzima, a qual somente é observada em bactérias e plantas. Essa característica foi verificada pela primeira vez por Van Santen e colaboradores em 1999 e confirmada após dois anos, em trabalho com Endo-PG de *A. aculeatus* (CHO; LEE *et al.*, 2001). Neste último trabalho 43 sequências homólogas foram analisadas, todas as 17 de plantas e 5 de bactérias apresentaram a cauda N-Terminal, em contraste com as 21 de fungos que não a tinham. Em nosso resultado observa-se que todas as plantas contêm a cauda N-Terminal, assim como observado para a maioria das sequências bacterianas. Por outro lado, para todos os fungos e insetos analisados essa característica demonstrou-se ausente.

Na extremidade C-Terminal embora menos frequente, também é observado a presença de uma longa cauda. Novamente essa característica tem sido notada apenas em plantas e bactérias e ausente em todos os fungos descritos, com exceção do fungo *Claviceps purpurea* (CHO; LEE *et al.*, 2001). Pode-se observar, portanto, que o grupo dos insetos assemelha ao grupo dos fungos nesse quesito também, pois nenhuma das sequências de insetos mostra tal característica.

Outro ponto que ressalta semelhança entre insetos e fungos é a presença de 8 resíduos de cisteína conservados unicamente nesses grupos. Estes resíduos estão distribuídos ao longo da estrutura primária da proteína e são responsáveis por gerar 4 ligações dissulfeto (Cys²⁷-Cys⁴², Cys¹⁹⁷-Cys²¹⁵, Cys³³¹-Cys³³⁶ e Cys³⁵⁵-Cys³⁶⁴) (VAN SANTEN; BENEN *et al.*, 1999; CHO; LEE *et al.*, 2001). Bactérias e plantas também podem apresentar as ligações dissulfeto (PICKERSGILL; SMITH *et al.*; 1988; CHO; LEE *ET AL.*, 2001) entretanto o posicionamento não é conservado como observado para os insetos e fungos (PAUCHET; WILKINSON *et al.*, 2010). Além dos pontos destacados, é possível verificar ao longo de todo alinhamento, semelhanças entre as sequências de insetos e fungos, assim como a distinção entre os outros grupos.

Apesar das semelhanças entre as sequências de insetos com as fúngicas, há uma particularidade no grupo dos insetos compartilhado somente por eles próprios. Com a exceção do *P. cochleariae*, todos os insetos analisados apresentam dois resíduos de Cys conservados (Cys¹⁴² e Cys¹⁴⁶). Essa particularidade já havia sido notada por Pauchet e colaboradores (2010), os quais sugerem uma possível ligação dissulfeto extra, que diferencia as Endo-PGs de inseto de todas as outras conhecidas até presente data.

4.12 Análises filogenéticas *SI-Pectinases*

Os resultados obtidos nas análises filogenéticas sugerem que a enzima *SI-PME* está relacionada com outras PME's provenientes de bactérias e a enzima *SI-EndoPG* relacionada com enzimas semelhantes de fungos. Embora, as árvores filogenéticas serem inferidas a partir do método de neighbour-joining, o qual utiliza distâncias genéticas para inferir a filogenia e considerado pouco robusto, grupos distintos foram claramente definidos nas análises realizadas. No geral as clades obtidas apresentaram valores de *bootstrap* acima de 50%, permitindo maior suporte para os grupamentos formados.

4.12.1 Árvore filogenética *SI-PME*

A Figura 30 representa a árvore inferida a partir das sequências de aminoácidos de PME's de organismos representantes de diversos reinos. É possível notar que, com exceção da clade dos fungos, as outras clades são bem estabelecidas, pois são formadas unicamente por representantes de um mesmo reino.

Segundo a inferência baseada na enzima *SI-PME*, o organismo *Phytophthora capsici*, considerado um Oomiceto e representante do reino Stramenopila agrupou-se na clade dos fungos. A classificação taxonômica atual agrupa os fungos no Reino Fungi, o qual é considerado monofilético (HIBBETT; BINDER *et. al.*, 2007). Organismos não relacionados filogeneticamente, como é o caso de *P. capsici*, foram estudados por muitos anos juntamente com os representantes fúngicos devidos às semelhanças morfológicas. Atualmente, organismos como *P. capsici* são classificados no reino Stramenopila, o qual reúne parentes próximos das algas marrons, pardas e diatomáceas (PARK; SIMPSON, 2010). Todavia, o fato de *P. capsici* estar inserido no grupo de fungos sugere que a PME deste organismo compartilha numerosas semelhanças com as PME's de fungos.

Outro aspecto interessante é que o grupo das bactérias compreende duas clades distribuídas na árvore, sendo uma mais correlacionada com arqueobactérias e a outra que inclui o grupo dos insetos. Este resultado sugere, que para bactérias a PME provavelmente tem origem polifilética, ao contrário dos outros grupos que indicam uma origem monofilética para essa enzima.

Considerando ainda as bactérias, verifica-se que as PME's de inseto formam uma clade isolada os grupos de origem bacteriana, o que indica sua relação filogenética com este grupo. Conforme mencionado, a proximidade das PME's de insetos com as PME's bacterianas foram reveladas pela primeira vez por Shen e

colaboradores em 2005, um dos motivos que os levaram a propor a teoria da transferência horizontal, onde bactérias endossimbiontes teriam passado o gene codificante para PME a um ancestral deste inseto. Nossos dados incorporam um número maior de sequências que o estudo de Shen *et al.* (2005), compreendendo uma variabilidade maior de organismos. Os resultados corroboram a teoria de Shen e colaboradores.

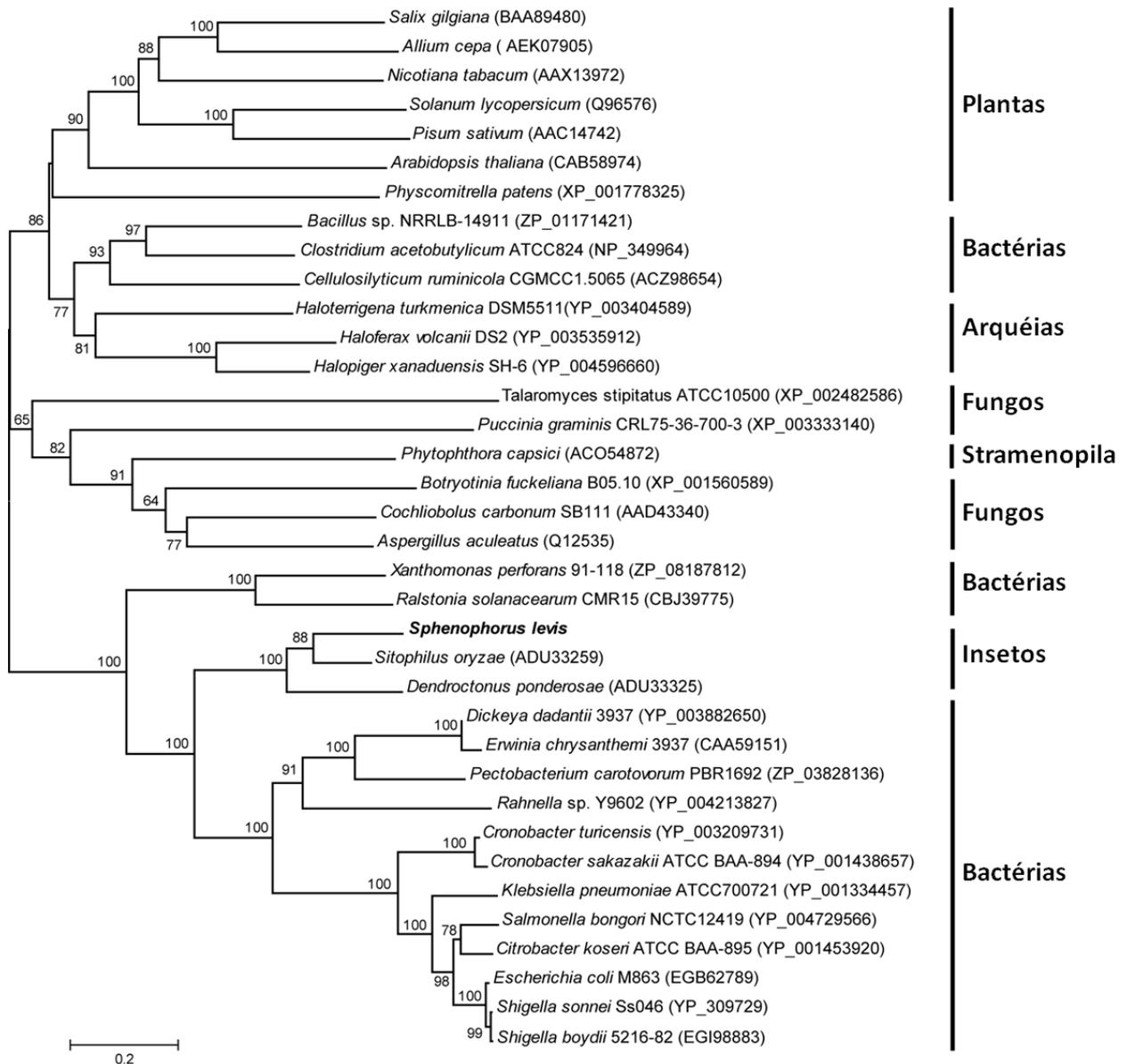


Figura 30. Árvore filogenética para a SI-PME. A reconstrução filogenética de 36 PME representativas de plantas, fungos, bactérias, arqueias e insetos foi realizada segundo método de neighbor-joining. Valores destacados nos ramos representam valores de *bootstrap* após 1.000 pseudoréplicas. O organismo portador da sequência e seu respectivo número de acesso (em parêntese) ao banco de dados do NCBI-GenBank estão demonstrados na árvore. A espécie em estudo, *Sphenophorus levis*, está destacada em negrito.

4.12.2 Árvore filogenética *SI-EndoPG*

A Figura 31 representa a árvore filogenética inferida a partir das sequências de aminoácidos de Endo-PGs de diversos organismos representantes de distintos reinos. Nota-se que, ao contrário dos obtidos para *SI-PME*, todos os agrupamentos gerados são unicamente formados por representantes de mesmo reino. Excluindo a clade dos fungos, a qual inclui o grupo dos insetos, todas as clades restantes apresentam somente representantes do mesmo reino. Especificamente, a clade dos fungos demonstrou uma clara separação entre *SI-Endo PG* derivadas de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo que o grupo de insetos está relacionado a essas duas clades. Assim, diferentemente das *PMEs*, a *SI-EndoPG* está mais relacionada com EndoPGs de origem fúngica.

Os resultados também evidenciam que as Endo-PGs de insetos formam um grupo coeso associado aos dois grupos de fungos, dentre os quais apresentou relação filogenética com filo Ascomycota. O fato das Endo-PGs de insetos serem mais próximas com as de fungos já era esperado, tendo em vista a clara semelhança observada entre as referidas sequências durante análise do alinhamento múltiplo (Figura 30).

Esta proximidade também já havia sido identificada por Shen e colaboradores em 2003. A partir do mesmo raciocínio anteriormente descrito, estes autores propuseram uma transferência horizontal, onde fungos endossimbiontes teriam passado o gene codificante para Endo-PG a um ancestral deste inseto. Em 2008, Allen *et al.* verificou para três PGs de *Lygus lineolaris* a mesma proximidade com fungos (ALLEN; MERTENS *et al.*, 2008). Novamente, nossos dados são similares aos descritos na literatura, portanto, corroborando a teoria de transferência horizontal sugerida.

4.13 Análise de Códon preferenciais

O resultado da análise de códon preferenciais é demonstrado abaixo na Tabela 1. Nela, verifica-se que alguns códon apresentam frequências semelhantes entre as *SI-Pectinases* e o conjunto de peptidases do *S. levis*. Já para outros códon são observadas frequências similares entre as *SI-Pectinases* e o conjunto de sequências homólogas dos micro-organismos. Entretanto, o número de códon com frequência semelhante entre as *SI-Pectinases* e o conjunto *S. levis* é superior ao número de códon de frequência próxima aos micro-organismos. Para *SI-PME* foram identificados 16 codons com frequência similar ao conjunto do inseto enquanto apenas 3 códon foram identificados para as bactérias. Em mesma análise a *SI-EndoPG* revelou 5 códon para o inseto e 2 para os fungos.

Tabela 1. Análise de códon preferenciais. Utilizando-se o software online GCUA foram obtidas as taxas de frequência dos códon das sequências analisadas. *SI-PME* e *SI-EndoPG* são as sequências das ORFs completas; *S. levis* é um conjunto de sequências codificantes para 10 peptidases identificadas na biblioteca de cDNA do inseto; PMEs de bactérias é um conjunto de 10 sequências homólogas a *SI-PME* todas de origem bacteriana, assim como Endo-PGs de fungos são um conjunto de sequências homologas a *SI-EndoPG* todas de origem fúngica. Os valores destacados em vermelho indicam proximidade das frequências entre a *SI-PME* com outro grupo; os valores destacados em azul ressaltam a semelhança das frequências entre a *SI-EndoPG* com grupo

Aminoácido	Codon	<i>S. levis</i>	<i>SI-PME</i>	PMEs de Bactérias	<i>S. levis</i>	<i>SI-Endo-PG</i>	Endo-PGs de Fungos
		N (Frequência)	N (Frequência)	N (Frequência)	N (Frequência)	N (Frequência)	N (Frequência)
Phe	UUU	37 (0.85)	3 (0.67)	61 (0.76)	37 (0.85)	2 (0.36)	56 (0.74)
	UUC	50 (1.15)	6 (1.33)	99 (1.24)	50 (1.15)	9 (1.64)	96 (1.26)
Ser	UCU	30 (0.98)	7 (1.24)	30 (0.64)	30 (0.98)	12 (1.57)	92 (1.19)
	UCC	30 (0.98)	5 (0.88)	61 (1.29)	30 (0.98)	11 (1.43)	101 (1.31)
	UCA	47 (1.53)	7 (1.24)	25 (0.53)	47 (1.53)	5 (0.65)	85 (1.10)
	UCG	34 (1.11)	4 (0.71)	34 (0.72)	34 (1.11)	0 (0.00)	75 (0.97)
Leu	UUA	29 (0.87)	4 (1.26)	15 (0.38)	29 (0.87)	3 (0.86)	33 (0.46)
	UUG	63 (1.88)	9 (2.84)	22 (0.55)	63 (1.88)	4 (1.14)	60 (0.84)
Tyr	JAU	23 (0.60)	8 (0.73)	76 (1.05)	23 (0.60)	1 (0.20)	41 (0.84)
	UAC	54 (1.40)	14 (1.27)	69 (0.95)	54 (1.40)	9 (1.80)	57 (1.16)
Cys	UGU	26 (0.93)	3 (1.20)	15 (1.00)	26 (0.93)	5 (0.91)	51 (0.82)
	UGC	30 (1.07)	2 (0.80)	15 (1.00)	30 (1.07)	6 (1.09)	74 (1.18)
Trp	UGG	49 (1.00)	6 (1.00)	61 (1.00)	49 (1.00)	5 (1.00)	91 (1.00)
Leu	CUU	36 (1.07)	0 (0.00)	19 (0.48)	36 (1.07)	3 (0.86)	99 (1.38)
	CUC	25 (0.75)	1 (0.32)	28 (0.71)	25 (0.75)	3 (0.86)	113 (1.58)
	CUA	14 (0.42)	3 (0.95)	8 (0.20)	14 (0.42)	2 (0.57)	37 (0.52)
	CUG	34 (1.01)	2 (0.63)	146 (3.68)	34 (1.01)	6 (1.71)	88 (1.23)
Pro	CCU	20 (0.76)	2 (0.38)	42 (0.82)	20 (0.76)	5 (1.82)	59 (1.07)
	CCC	18 (0.69)	4 (0.76)	20 (0.39)	18 (0.69)	0 (0.00)	48 (0.87)
	CCA	46 (1.75)	14 (2.67)	34 (0.66)	46 (1.75)	6 (2.18)	76 (1.38)
	CCG	21 (0.80)	1 (0.19)	109 (2.13)	21 (0.80)	0 (0.00)	38 (0.69)
His	CAU	19 (1.06)	3 (1.20)	20 (0.89)	19 (1.06)	1 (0.29)	78 (0.96)
	CAC	17 (0.94)	2 (0.80)	25 (1.11)	17 (0.94)	6 (1.71)	84 (1.04)
Arg	CGU	9 (0.68)	1 (0.60)	76 (2.21)	9 (0.68)	0 (0.00)	53 (1.26)
	CGC	5 (0.38)	1 (0.60)	97 (2.83)	5 (0.38)	0 (0.00)	29 (0.69)
	CGA	11 (0.84)	2 (1.20)	3 (0.09)	11 (0.84)	0 (0.00)	38 (0.90)
	CGG	5 (0.38)	0 (0.00)	9 (0.26)	5 (0.38)	0 (0.00)	52 (1.24)
Gln	CAA	52 (1.24)	17 (1.89)	60 (0.59)	52 (1.24)	9 (1.80)	118 (1.29)
	CAG	32 (0.76)	1 (0.11)	145 (1.41)	32 (0.76)	1 (0.20)	65 (0.71)

Ile	AUU	50 (1.25)	16 (1.85)	73 (1.23)	50 (1.25)	7 (1.05)	61 (0.82)
	AUC	47 (1.17)	5 (0.58)	88 (1.48)	47 (1.17)	13 (1.95)	116 (1.55)
	AUA	23 (0.57)	5 (0.58)	17 (0.29)	23 (0.57)	0 (0.00)	47 (0.63)
Thr	ACU	42 (1.29)	19 (2.11)	41 (0.54)	42 (1.29)	8 (1.14)	76 (0.86)
	ACC	31 (0.95)	7 (0.78)	169 (2.25)	31 (0.95)	16 (2.29)	145 (1.65)
	ACA	37 (1.14)	10 (1.11)	26 (0.35)	37 (1.14)	3 (0.43)	69 (0.78)
	ACG	20 (0.62)	0 (0.00)	65 (0.86)	20 (0.62)	1 (0.14)	62 (0.70)
Met	AUG	46 (1.00)	3 (1.00)	60 (1.00)	46 (1.00)	4 (1.00)	60 (1.00)
Asn	AAU	36 (0.74)	17 (0.94)	112 (0.72)	36 (0.74)	14 (0.88)	57 (0.62)
	AAC	61 (1.26)	19 (1.06)	197 (1.28)	61 (1.26)	18 (1.12)	128 (1.38)
Ser	AGU	18 (0.59)	5 (0.88)	22 (0.47)	18 (0.59)	5 (0.65)	34 (0.44)
	AGC	25 (0.82)	6 (1.06)	111 (2.35)	25 (0.82)	13 (1.70)	76 (0.98)
Lys	AAA	76 (1.11)	12 (1.60)	96 (1.42)	76 (1.11)	19 (1.36)	35 (0.45)
	AAG	61 (0.89)	3 (0.40)	39 (0.58)	61 (0.89)	9 (0.64)	121 (1.55)
Arg	AGA	36 (2.73)	2 (1.20)	15 (0.44)	36 (2.73)	2 (4.00)	36 (0.86)
	AGG	13 (0.99)	4 (2.40)	6 (0.17)	13 (0.99)	1 (2.00)	44 (1.05)
Val	GUU	36 (1.12)	9 (1.44)	66 (0.79)	36 (1.12)	13 (1.79)	70 (0.91)
	GUC	35 (1.09)	7 (1.12)	66 (0.79)	35 (1.09)	8 (1.10)	119 (1.55)
	GUA	24 (0.75)	7 (1.12)	36 (0.43)	24 (0.75)	6 (0.83)	52 (0.68)
	GUG	33 (1.03)	2 (0.32)	167 (1.99)	33 (1.03)	2 (0.28)	67 (0.87)
Ala	GCU	58 (1.80)	17 (1.89)	51 (0.48)	58 (1.80)	9 (1.64)	75 (1.19)
	GCC	34 (1.05)	13 (1.44)	143 (1.35)	34 (1.05)	5 (0.91)	73 (1.15)
	GCA	26 (0.81)	5 (0.56)	63 (0.59)	26 (0.81)	7 (1.27)	57 (0.90)
	GCG	11 (0.34)	1 (0.11)	167 (1.58)	11 (0.34)	1 (0.18)	48 (0.76)
Asp	GAU	46 (1.06)	7 (0.78)	141 (1.16)	46 (1.06)	8 (1.00)	74 (0.85)
	GAC	41 (0.94)	11 (1.22)	103 (0.84)	41 (0.94)	8 (1.00)	101 (1.15)
Gly	GGU	50 (1.59)	12 (1.37)	81 (0.94)	50 (1.59)	13 (1.13)	93 (1.08)
	GGC	22 (0.70)	6 (0.69)	207 (2.41)	22 (0.70)	5 (0.43)	153 (1.77)
	GGA	44 (1.40)	17 (1.94)	35 (0.41)	44 (1.40)	26 (2.26)	55 (0.64)
	GGG	10 (0.32)	0 (0.00)	21 (0.24)	10 (0.32)	2 (0.17)	45 (0.52)
Glu	GAA	79 (1.44)	5 (1.43)	87 (1.57)	79 (1.44)	4 (2.00)	76 (1.20)
	GAG	31 (0.56)	2 (0.57)	24 (0.43)	31 (0.56)	0 (0.00)	51 (0.80)
Terminação	UAA	18 (0.00)	0 (0.00)	10 (0.00)	18 (0.00)	1 (0.00)	31 (0.00)
	UGA	21 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	21 (0.00)	0 (0.00)	49 (0.00)
	UAG	17 (0.00)	1 (1.00)	0 (0.00)	17 (0.00)	0 (0.00)	28 (0.00)

Os dados gerados indicam, de forma geral, que os genes codificantes para as *SI-Pectinases* são mais adaptados para o sistema biológico do inseto *S. levis* em relação aos micro-organismos avaliados. Isso sugere que se comprovada a teoria de Shen e colaboradores referente à transferência horizontal destes genes, observa-se que estes provavelmente sofreram modificações que tornaram-os mais adaptados ao sistema biológico dos insetos.

Todavia, maiores estudos ainda são requeridos para melhor entendimento da origem destes genes. Acredita-se que os dados gerados nesta análise ainda são insuficientes para inferir com convicção sobre a origem destes genes. Uma análise mais robusta, com tratamento estatístico, abrangendo um número superior de sequências do inseto, fungos e bactérias, esta sendo realizada em nosso laboratório. Além disso, o sequenciamento das sequências genômicas adjacentes aos referidos genes poderão auxiliar no esclarecimento desta questão.

4.14 PCR das regiões ribossomais 16S e ITS

Os DNAs genômicos extraídos foram analisados quanto à presença de DNA contaminante. A Figura 32 representa o perfil de amplificações da região 16S e ITS ribossomais, a partir do DNA genômico extraído do corpo gorduroso e do tubo intestinal de larvas de *S. levis*. O padrão de amplificação da região 16S procariótica evidencia a presença de DNA procarioto apenas no tubo intestinal, o qual abriga diversos micro-organismos endossimbiontes. O perfil de amplificação da região ITS evidencia três bandas distintas de aproximadamente 1.700, 400 e 600 pb. No DNA extraído da gordura, unicamente o *amplicon* de 1.700 pb é identificado, em contraste do DNA do tubo intestinal, onde se verifica as três bandas. As sequências obtidas após análise em Blastn, revelaram que os fragmentos amplificados 1.700, 600 e 400 pb têm alta similaridade com *Sitophilus oryzae*, *Candida intermedia* e *Candida Stellimalicola*, respectivamente. *S. oryzae*, como já mencionado neste trabalho, é um coleóptero da família Curculionidae extremamente semelhante ao *S. levis*; e o gênero *candida* têm sido identificado no trato digestivo de uma ampla gama de insetos.

Tendo em vista a sensibilidade da técnica de PCR, os resultados comprovam que o DNA de gordura extraída da larva está isento de contaminação por DNA procarioto e de eucariotos inferiores, o que possibilita o uso deste material para investigação de introns nos genes *SI-PME* e *SI-EndoPG*.

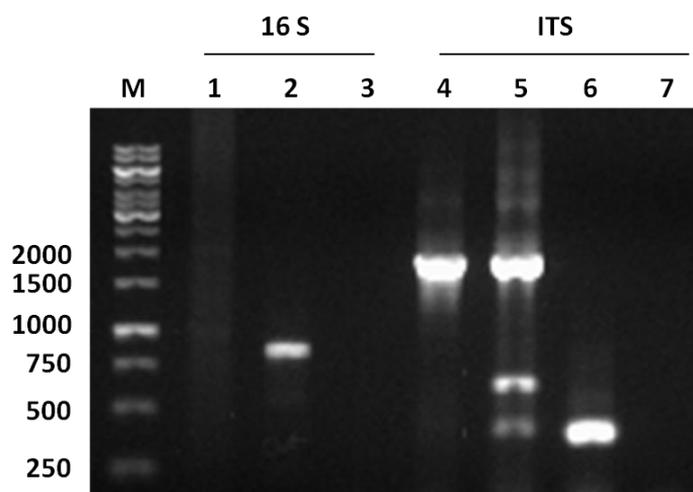


Figura 32. Análise de contaminantes no DNA genômico extraído. A análise foi baseada no perfil de amplificações das regiões ribossomais 16S e ITS. As reações com *primers* para região 16S são indicadas na figura pelos números de 1 a 3, enquanto as reações com *primers* para região ITS são indicadas pelos números de 4 a 7. M: marcador de massa molecular GeneRuler 1Kb (Fermentas); 1 :Amostra de DNA extraído da gordura da larva; 2: Amostra de DNA extraído do tubo intestinal; 3: Amostra isenta de DNA; 4: Amostra DNA extraído da gordura da larva; 5: Amostra de DNA extraído do tubo intestinal; 6: Amostra de DNA extraído de levedura *P. pastoris*; 7: Amostra isenta de DNA.

4.15 Análise das sequências genômicas condificantes para *SI-Pectinases*

A investigação quanto à presença de introns nos genes *SI-Pectinases*, revelou que o gene *SI-PME* não possui introns, ao contrário do gene *SI-EndoPG*, no qual foram detectados dois. A Figura 33 mostra o resultado das amplificações por PCR das *SI-Pectinases* genômicas, as quais são comparadas com os *amplicons* gerados a partir do cDNA sintetizado.

Para a *SI-PME* nota-se que os fragmentos de origem genômica são do mesmo tamanho que os de origem de cDNA, indicando a ausência de introns para esse gene. No caso da *SI-EndoPG* não se conseguiu amplificar do genoma, utilizando-se *primers* da combinação 1 e combinação 2. Embora para o cDNA, utilizando-se as combinações 1 e 2, obteve-se os fragmentos esperados de 1.054 e 527 pb respectivamente. Na terceira combinação de *primers*, há um único fragmento de 109 pb para o cDNA, enquanto para o genômico há um único fragmento de aproximadamente 250 pb. A última combinação de *primers* gera para o cDNA uma banda de 547 pb e cerca de 800 pb para o genômico. A partir destes dados é possível afirmar que o gene *SI-EndoPG* possui no mínimo dois introns, assim como também foi possível estimar suas posições. Esperava-se, portanto, ao menos um intron com aproximadamente 150 pb entre os sítios dos *primers* da combinação 3 e ao menos um segundo intron de aproximadamente 50 pb na região entre os sítios dos *primers* da combinação 4. O fato das combinações 1 e 2 não terem gerado amplicon pode ser indícios da presença de introns maiores que impossibilitaram a amplificação desta região.

O sequenciamento do fragmento de cerca de 800 pb revelou dois *introns* na porção mediana do gene, um de 166 pb e outro de 53 pb como indicado na Figura 34. Os dois *introns* apresentam o padrão de splicing mais conhecido, denominado de “GT-AG role”, principalmente caracterizado pela presença de um GT na extremidade 5' e de um AG na extremidade 3' do intron (WU; KRAINER, 1999).

Considerando a teoria de transferência horizontal de Shen e colaboradores, nossos resultados estão dentro do esperado, pois é sabido que a presença de introns em genomas de procariotos é rara, enquanto em fungos são bastante comuns e de tamanhos semelhantes aos identificados. Portanto neste contexto, mais uma vez a *SI-PME* se assemelha as características de bactéria e a *SI-EndoPG* com as de fungos, gerando mais evidências a favor desta teoria.

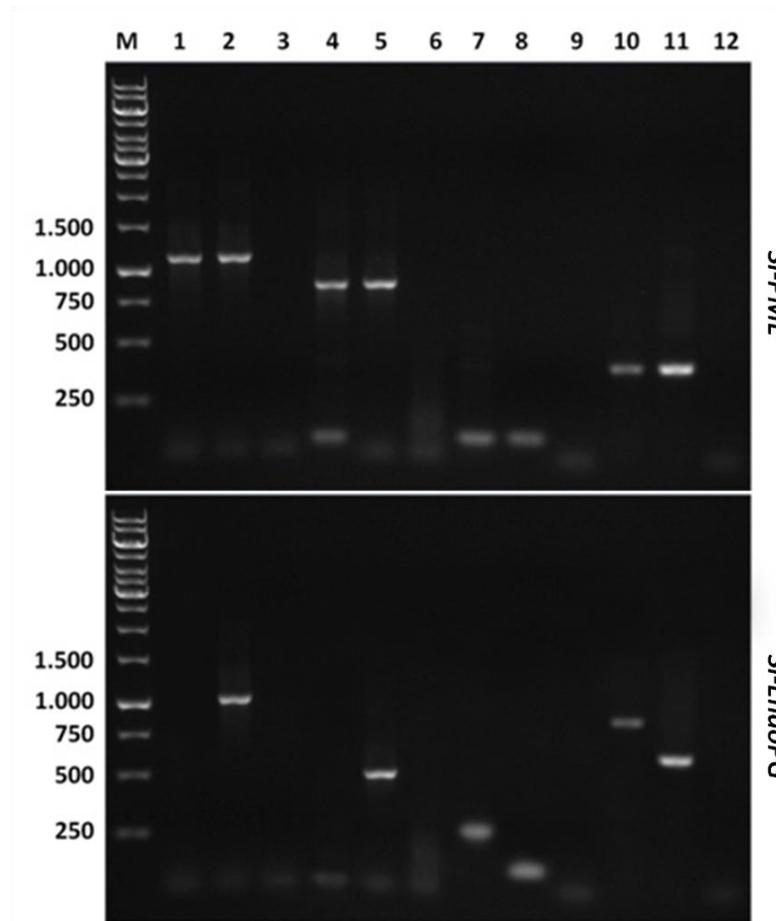
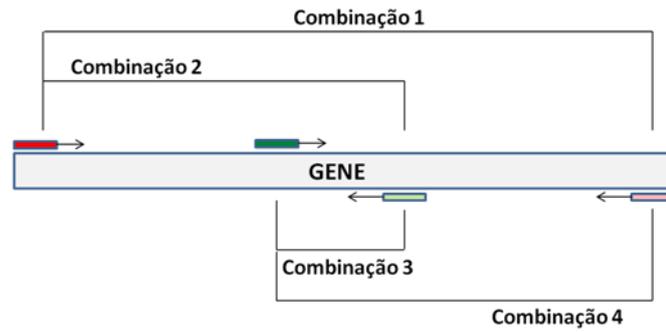


Figura 33. Amplificação das seqüências genômicas codificantes para *SI-Pectinases*. O experimento constou, para cada combinação de *primer* nesta ordem, de: uma reação contendo DNA genômico do inseto; uma reação contendo cDNA e uma reação isenta de DNA. M: marcador de massa molecular GeneRuler 1Kb (Fermentas); 1-3: Reação com combinação 1; 4-6: Reação com combinação 2; 7-9: Reação com combinação 3; 10-12: Reação com combinação 4. Evidencia-se que para o gene *SI-PME* não há introns, diferentemente do gene *SI-EndoPG* no qual foi identificado dois introns na região delimitada pelos *primers* da combinação 4.

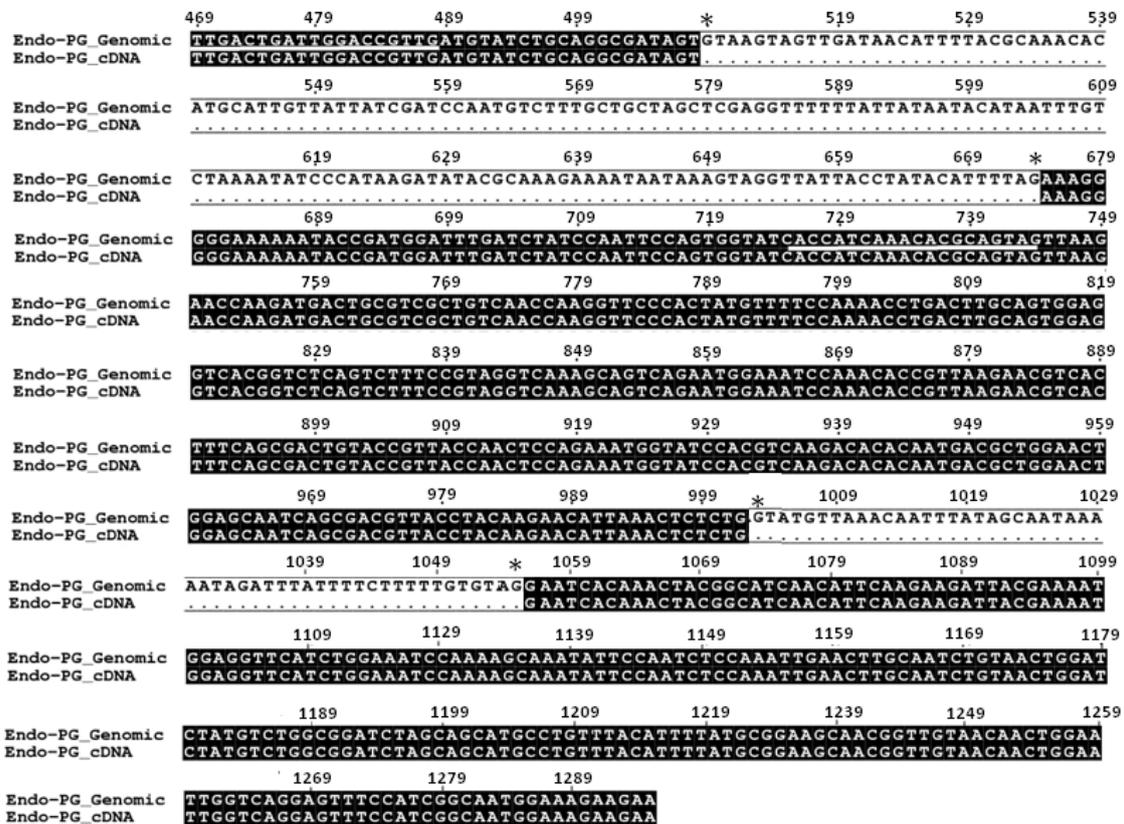


Figura 34. Introns identificados no fragmento genômico amplificado gene *SI-EndoPG*. O alinhamento foi realizado em software online Multalin (F.CORPET, 1988). As seqüências sublinhadas em branco marcam a posição dos *primers* usados no seqüenciamento. Os asteriscos indicam o início o fim dos dois introns.

4.16 Análise de expressão gênica diferencial das *SI-Pectinases*

Para gerar maior conhecimento sobre o papel fisiológico das pectinases no inseto *S. levis*, foi determinado por qRT-PCR as fases de desenvolvimento e os tecidos específicos, nos quais esses genes são expressos.

A Figura 35 A e C mostra o padrão de expressão dos genes *SI-PME* e *SI-EndoPG* ao longo do ciclo de vida do inseto. Para a *SI-PME*, o menor nível de expressão significativo foi observado na fase de pupa, por isso essa foi escolhida como estágio calibrador com valor de expressão relativa igual a um (1x). O maior pico de expressão detectado foi em adultos (90,78x), seguido pelos estágios larvais, também com altos níveis de expressão. Ovos, assim como pré-pupas revelaram expressão de nível basal deste gene. Para *SI-EndoPG*, a fase pré-pupa foi

selecionada como estágio calibrador, devido às mesmas razões mencionadas acima. O maior valor de expressão foi identificado durante as fases larvais com um pico, de aproximadamente o dobro da taxa de expressão (71,14x), nas larvas de 20 dias de idade. Ovos e pré-pupas exibiram expressão de nível basal, assim como verificado para o gene *SI-PME* para as mesmas fases. A análise das fases pupa e adulto mostraram valores similares entre si, muito baixos em relação às fases larvais, mas ainda assim considerados altos para expressão de nível basal.

Os dois genes são preferencialmente expressos nas fases em que o inseto alimenta-se, o que é esperado para enzimas que, de maneira direta ou indireta, estão associadas ao processo digestivo. A reduzida taxa na síntese de mRNA durante as fases pré-pupa e pupa, pode ser explicado pelas drásticas mudanças ocorrentes na morfologia do inseto ao longo deste período, o qual o leva a uma condição de imobilidade (FONSECA; SOARES-COSTA *et al.*, 2011). Distintos níveis de expressão são observados entre larvas e adultos, provavelmente em decorrência dos diferentes hábitos alimentares e mecanismos de ataque a planta, pois o adulto utiliza-se do rostró para sugar o caldo da cana-de-açúcar, enquanto as larvas usam a mandíbula para abrir galerias ao longo do rizoma e base do colmo (FONSECA; SOARES-COSTA *et al.*, 2011). O fato da *SI-PME* ser mais expressa em adultos que em outras fases ainda continua sob investigação, assim como o pico de expressão proveniente das larvas de 20 dias durante o estágio larval.

A Figura 35 B e D mostra os tecidos específicos, em cujas enzimas *SI-PME* e *SI-EndoPG* são produzidas. A maior expressão detectada foi no intestino médio, para ambas as *SI-Pectinases*, sendo por isso este tecido selecionado como calibrador com valor de expressão relativa igual a um (1x). As *SI-Pectinases* demonstraram nível de expressão significativa apenas no intestino médio, o que aponta um padrão de enzima digestiva. A expressão relativa entre os outros tecidos são tão baixos que foram considerados artefatos da técnica, por exemplo, para o caso dos valores detectados no intestino posterior, que provavelmente é proveniente de contaminação do intestino médio, considerando-se a proximidade destes tecidos e a dificuldade do método de dissecação.

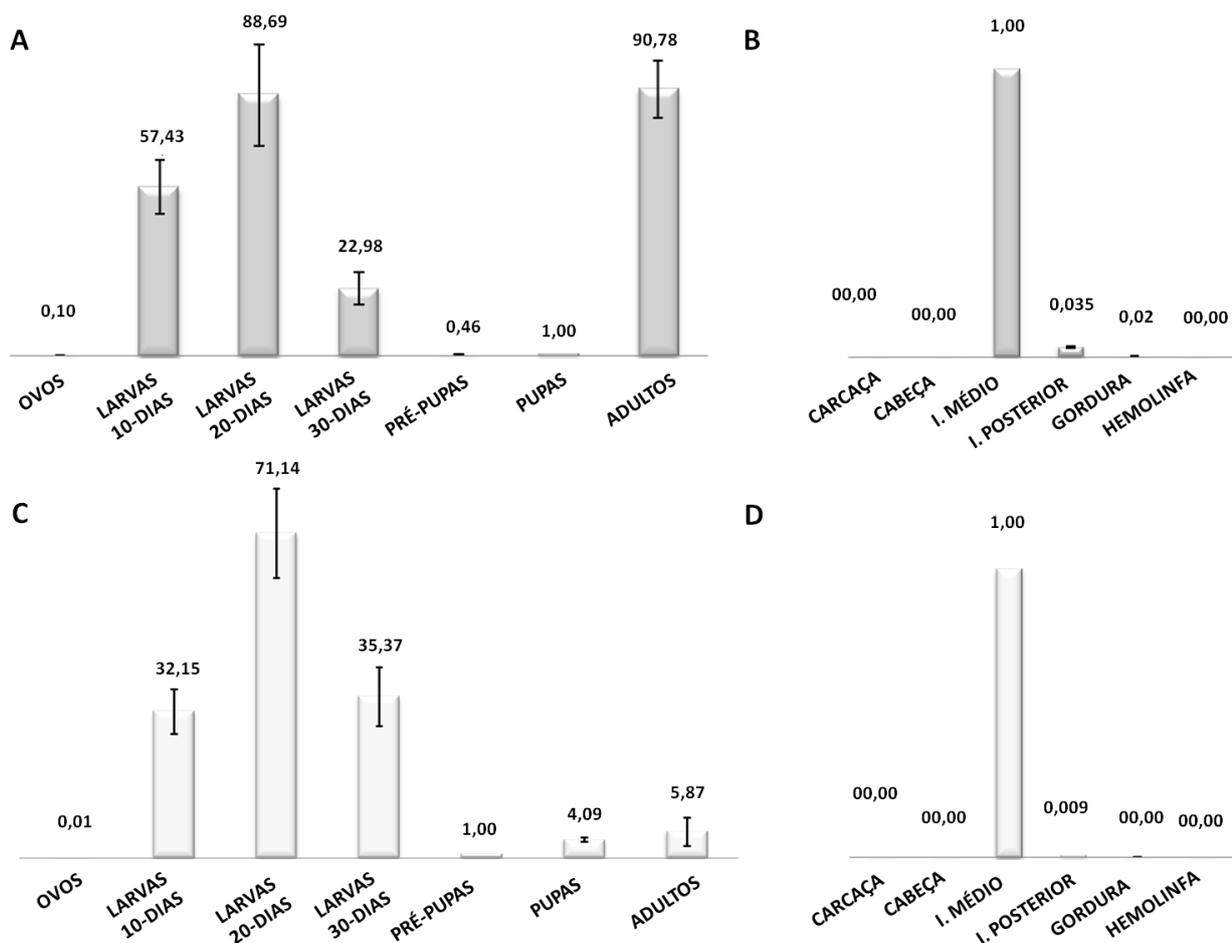


Figure 35. Expressão gênica diferencial das *SI-Pectinases*. A análise de expressão dos genes *SI-PME* e *SI-EndoPG* foi realizada por PCR em tempo real, usando o gene, de expressão constitutiva, *GAPDH* como calibrador. A: Expressão gênica da *SI-PME* nos diferentes estágios de desenvolvimento; B: Expressão gênica da *SI-PME* nos diferentes tecidos de larvas de 30 dias de idade; C: Expressão gênica da *SI-EndoPG* nos diferentes estágios de desenvolvimento; D: Expressão gênica da *SI-EndoPG* nos diferentes tecidos de larvas de 30 dias de idade.

A análise do padrão de expressão gênica das *SI-Pectinases* indicam uma notável semelhança com a *SI-CathL*, a principal enzima digestiva do *S. levis* em fase larval (FONSECA; SOARES-COSTA *et al.*, 2011). Essa similaridade do perfil de expressão reforça a provável atuação das *SI-Pectinases* como enzimas digestivas. Entretanto, dois pontos importantes devem ser enfatizados: o primeiro ponto é o fato de a cana-de-açúcar ser uma das maiores fontes naturais de açúcares como a sacarose, glicose e frutose. Todos esses açúcares são de fácil assimilação pelas células como fonte energética, pois são moléculas simples que necessitam de baixo consumo energético para serem metabolizados, diferentemente do complexo pectínico, uma substância de cadeia longa. O complexo pectínico também pode ser

usado para gerar monômeros de açúcar (ácido galacturônico) como fonte de energia para célula, todavia, são requeridos passos metabólicos mais complexos e maior aparato enzimático, por consequência há maior consumo energético (GRADEL; DEHORITY, 1972; ROJAS; CAVALITTO *et al.*, 2008; RICHARD; HILDITCH, 2009). Considerando este contexto seria energeticamente inviável, para o sistema biológico do inseto, usar pectinases na obtenção de energia a partir da pectina em uma dieta rica de açúcares de rápida assimilação.

O segundo ponto a ser enfatizado é a ausência de Exo-PGs no transcriptoma do *S. levis*. De fato, até nosso conhecimento atual, não há relatos sobre Exo-PGs identificadas em insetos. A Exo-PG, assim como a Endo-PG, catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 entre monômeros de ácido galacturônico e também tem atividade intensificada após ação prévia da PME (CRELIER; ROBERT *et al.*, 2001). A ação sequencial da Exo-PG na extremidade da cadeia libera monômeros de açúcar como produto, diferentemente da Endo-PG que cliva a cadeia pectínica aleatoriamente (KASHYAP; VOHRA *et al.*, 2001). De acordo com os distintos mecanismos de ataque ao polímero pectínico entre essas duas enzimas, é plausível afirmar que a Endo-PG é mais eficiente na desestruturação da cadeia que em gerar monômeros de açúcar livres e a Exo-PG tem padrão oposto.

Por essas razões, neste trabalho é sugerido que as *SI-Pectinases* são na verdade enzimas digestivas acessórias, cuja função está mais relacionada em desorganizar e desestruturar a parede celular vegetal para ganhar acesso aos nutrientes intracelulares da planta. A ação prévia da *SI-PME* em desesterificar a pectina, habilita a maior eficácia na ação da *SI-EndoPG*, responsável pela desestruturação da lamela média, contribuindo na desorganização da parede celular vegetal e por consequência no acesso intracelular das outras enzimas digestivas do inseto.

4.17 Imunodeteção por *Western Blotting*

A análise *in silico* da estrutura primária das *SI-Pectinases* (item 6.2) revelou a presença de provável peptídeo sinal, indicando a exportação destas enzimas para fora das células em que são sintetizadas. Como identificado em análise de expressão gênica por qRT-PCR, o local de produção dos mRNA das *SI-Pectinases*, no inseto durante a fase larval é o intestino médio. Com a meta de verificar se as enzimas *SI-Pectinases* atuam de fato no mesmo tecido nas quais são sintetizadas, foi conduzido o ensaio de imunodeteção destas enzimas pelo método *Western Blotting*.

A Figura 36 evidencia a presença da proteína *SI-PME* nativa no intestino médio e intestino posterior com massa molecular aproximada de 45 kDa, cerca de 5 kDa a menos que a *SI-PME* Recombinante. Destes 5 kDa extras presentes na enzima recombinante, 2,5 kDa correspondem a adição do epítotope c-myc e da cauda de histidina no C-Terminal (Manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit). Os 2,5 kDa restantes correspondem à glicosilação, pois como observado nos ensaios de deglicosilação (item 6.7), a *SI-PME* Recombinante após tratamento com glicosidases apresentou massa molecular reduzida de aproximadamente 47,5 kDa. Mesmo que a *SI-PME* nativa tenha os sítios de glicosilação em sua estrutura, o padrão de glicosilação do sistema biológico do *S. levis* certamente difere do padrão da levedura *P. pastoris* e ao que indica a proteína nativa é menos glicosilada que a recombinante.

A localização da enzima no intestino sugere fortemente que a ação enzimática da *SI-PME* ocorre de fato neste tecido. Considerando a expressão gênica da *SI-PME* detectada no intestino médio, era esperada a presença desta enzima nesse tecido, entretanto não houve expressão gênica significativa para o intestino posterior, o que sugere que essa proteína seja carregada pela comida até esse tecido. Infelizmente para *SI-EndoPG* não houve a detecção da proteína nativa, provavelmente pela baixa especificidade do anticorpo policlonal. Ensaios com uso de anticorpos monoclonais, possivelmente trariam resultados mais satisfatórios. Todavia, como as enzimas PME e Endo-PG geralmente agem juntas em reação acoplada, ou seja, a primeira gera o substrato da segunda, acredita-se que a *SI-EndoPG* esteja presente nos mesmos tecidos.

Interessantemente, o pH ótimo determinado para a *SI-EndoPG* Recombinante (pH $5,06 \pm 0,27$) está próximo ao pH fisiológico do intestino médio da larva de *S. levis* ($5,5 \pm 0,2$ na porção anterior, $6,5 \pm 0,1$ na porção mediana e $7,6 \pm 0,2$ na porção posterior) (SOARES-COSTA, DIAS *et. al.*, 2011), assim como a *SI-PME* Recombinante também mostrou-se atividade nessa faixa de pH nos ensaios qualitativos (item 6.8). Portanto, esse resultado permite-nos estimar que as *SI-Pectinases* nativas são funcionais nas condições fisiológicas do intestino médio das larvas de *S. levis*.

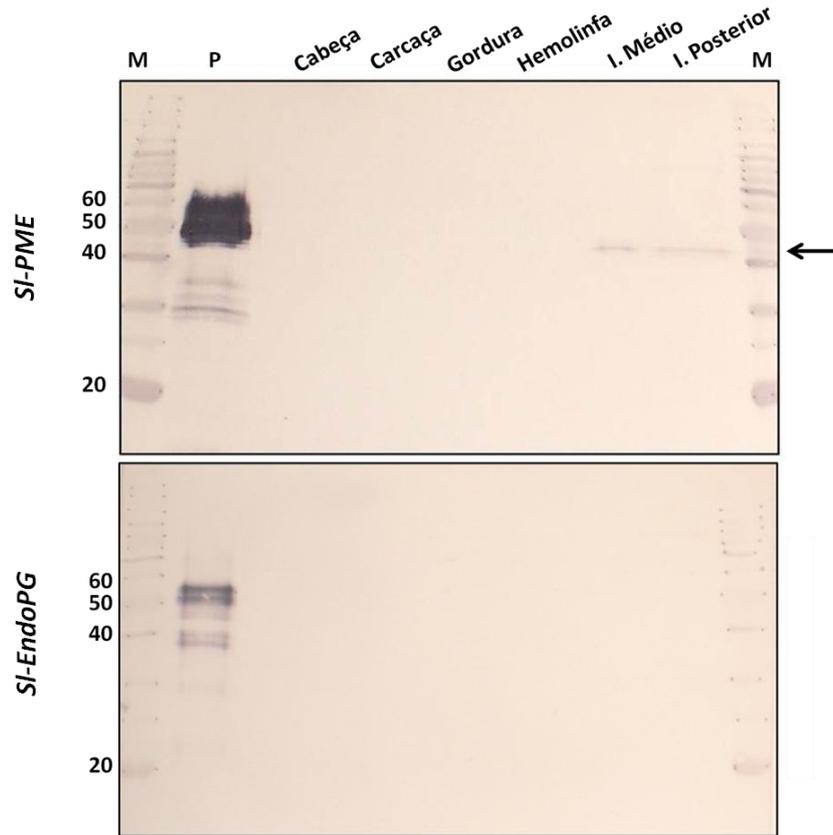


Figure 36. Imunodeteção das *SI-Pectinases* nos diferentes tecidos. A imunodeteção foi realizada por Western blotting, usando anticorpos policlonais produzidos em camundongos. O ensaio foi realizado com aproximadamente 4 µg de cada amostra e anticorpo primário em diluição 1:2.500. M: Marcador de massa molecular, Bench Marck (Invitrogen); P: Proteína recombinante purificada; Cabeça- Intestino posterior: Amostras dos extratos brutos protéico dos tecidos especificados; a seta indica a posição da proteína nativa detectada.

5. CONCLUSÕES

- A expressão das *SI-Pectinases* via sistema heterólogo em *Pichia pastoris* foi eficiente na obtenção de grande quantidade de enzimas puras e funcionais.
- As *SI-Pectinases* Recombinantes são glicosiladas tanto em sítios do tipo N quanto do tipo O. A *SI-PME* nativa é pouco glicosilada em relação à enzima *SI-PME* Recombinante.
- A enzima *SI-EndoPG* Recombinante tem propriedades interessantes (pH, temperatura ótimos adequados e alta eficiência catalítica) par aplicação industrial, principalmente nos setores de produção de sucos de frutas e vinhos. Entretanto, ela apresenta baixíssima termoestabilidade, inviabilizando seu uso nestes setores.
- Este trabalho comprova que insetos fitófagos podem ser utilizados como novas fontes de bioprospecção de EDPCV com alto potencial biotecnológico.
- A análise das sequências genômicas codificadoras para as proteínas maduras, *SI-PME* e *SI-EndoPG*, revelou não haver introns para *SI-PME*. Diferentemente para *SI-EndoPG*, dois introns de tamanhos similares aos de fungos foram identificados.
- Os resultados gerados neste trabalho dão indícios muito fortes de que as *SI-Pectinases* estão de fato integradas no genoma do inseto. Além disso, dão indícios de que a *SI-PME* tem origem bacteriana e a *SI-EndoPG* tem origem fúngica, corroborando com teoria de transferência horizontal de Shen e colaboradores (2003, 2005).
- Independente da origem das *SI-Pectinases*, concluí-se por fim que ambas atuam, no intestino médio das larvas, provavelmente como enzimas digestivas acessórias, as quais estão envolvidas na desestruturação da parede celular vegetal e ganho de acesso aos nutrientes intracelulares.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Até presente momento, este trabalho representa o primeiro relato de pectinases de inseto que foram produzidas na forma recombinante sob sistema heterólogo em *Pichia pastoris*. Também é o primeiro trabalho em que pectinases de inseto são caracterizadas quanto a condições ótimas de atividade, termoestabilidade e parâmetros cinéticos.
- Considerando que a *SI-EndoPG* Recombinante mostrou propriedades atraentes para aplicação na indústria, mas sua termoinstabilidade inviabiliza seu uso, acredita-se que essa enzima seja um ótimo objeto de estudo em evolução *in vitro*. Pois alterações na estrutura proteica poderiam torná-la mais termoestável, gerando um produto de alto valor agregado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.C. Bicudo da cana-de-açúcar. **Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba**. (Boletim Técnico C.T.C.): p.1-3. 2005.
- ALKORTA, I.; C. GARBISU *et al.* Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, Jan, p.21-28. 1998.
- ALLEN, M. L.; J. A. MERTENS. Molecular cloning and expression of three polygalacturonase cDNAs from the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. **Journal of Insect Science**, v.8, Apr 1. 2008.
- AMINZADEH, S.; H. NADERI-MANESH *et al.* Purification, characterization, kinetic properties, and thermal behavior of extracellular polygalacturonase produced by filamentous fungus *Tetracoccusporium* sp. **Appl Biochem Biotechnol**, v.135, n.3, Dec, p.193-208. 2006.
- ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D. *et al.* Poligalacturonase and Pectinmetilesterase alterations on fruits of blackberries (*Rubus spp.*) postharvest. **Rev. Bras. Agrociência, Pelotas**, v. 12, n. 1, Jan-Mar, p. 63-66. 2006.
- ARLORIO, M.; J. D. COISSON *et al.* Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. **European Food Research and Technology**, v.209, n.3-4, p.185-191. 1999.
- BANU, A. R.; DEVI, M. K.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP; B. V.; PALANISWAMY, M. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, Apr, p. 377-381. 2010.
- BEWLEY, G. C.; RAWLS, J. M.; JR.; LUCCHESI, J. C. α -Glycerophosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*: Kinetic differences and developmental differentiation of the larval and adult isozymes. **Journal of Insect Physiology**, v. 20. Jan. p. 153-165. 1974.
- BISHOFF, S. T.; LAWRENCE M.SCHWARTZ. Characterization of a ubiquitin-fusion gene from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. **Nucleic Acids Research**, Vol. 18, n.20, Jun. p. 6039-6043. 1990.
- BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOLZ, C.; STAHL, U.; LANG, C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, May. p. 51-62. 2002.
- BREZNAK J. & BRUNE A. Role of microorganisms in the digestion of lignocelluloses by termites. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 453-487. 1994.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol Adv**, v.18, n.5, Aug, p.355-83. 2000.
- CARPITA, N.; M. TIERNEY *et al.* Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Molecular Biology**, v.47, n.1-2, p.1-5. 2001.

CEREGHINO, L. J.; CREGG, J. M.. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CREGG, J. M., VEDVICK, T. S., RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 11, p. 905-910. 1993.

CRELIER, S.; M. C. ROBERT *et al.* Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. **J Agric Food Chem**, v.49, n.11, Nov. p.5566-75. 2001.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.22, Nov. p.10881-90. 1988.a

CORPET, F. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.22, Nov. p.10881-10890. 1988.b

CHO, S. W.; LEE, S.; SHIN, W. The X-ray Structure of *Aspergillus aculeatus* Polygalacturonase and a Modeled Structure of the Polygalacturonase-Octagalacturonate Complex. **J. Mol. Biol.** v. 314, p. 863-878. 2011.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M.; ALMEIDA, L.C.; CASTILHO, H.J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 22, p. 553-558. 1987.

DE VRIES JA, VORAGEN AGJ, ROMBOUTS FM, PILNIK W. Structural studies of apple pectins with pectolytic enzymes. In: Fishman ML, Jen JJ, editors. **Chemistry and Function of Pectins**. Washington, DC: American Chemical Society; pp. 38–48. 1986.

DELOURDES, M.; T. M. POLIZELI *et al.* Pectinase Production by *Neurospora-Crassa* - Purification and Biochemical-Characterization of Extracellular Polygalacturonase Activity. **Journal of General Microbiology**, v.137, Aug. p.1815-1823. 1991.

DILLON, R. J.; V. M. DILLON. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annu Rev Entomol**, v.49, p.71-92. 2004.

DOUGLAS, A. E., MINTO, L. B. & WILKINSON, T. L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. **The Journal of Experimental Biology**. v.204, p.349-358, 2001.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, Aug. p.113. 2004a.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v.32, n.5, p.1792-7. 2004b.

FONSECA, F. P.; A. SOARES-COSTA *et al.* Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (Sl-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 42, Nov. p. 58-69. 2011.

FONSECA, F. P. Biologia Molecular Aplicada à Identificação de Alvos para o Controle do Bicudo da Cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*. 2012. 184 f. **Tese (Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos**. 2012.

FRANKLIN, S. E.; YOUNG, L.; WATSON, D.; CIGAN, A.; MEYER, T.; BULLA JR, L. A. Southern analysis of BT-R1, the *Manduca sexta* gene encoding the receptor for the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Mol Gen Genet**, v. 256, Jun. p.517-524. 1997.

FRIES, M.; IHRIG, J.; BROCKLEHURST, K.; SHEVCHIK, V. E.; PICKERSGILL, R. W. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. **The EMBO Journal**, v. 26, Aug. p. 3879-3887. 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO S.; CARVALHO, S. R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ed. Agrícola Ceres Ltda. 649 p. 2002.

GAINVORS, A.; V. FREZIER *et al.* Detection of Polygalacturonase, Pectin-Lyase and Pectin-Esterase Activities in a *Saccharomyces-Cerevisiae* Strain. **Yeast**, v.10, n.10, Oct, p.1311-1319. 1994.

GIRARD, C.; L. JOUANIN. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, n.12, Dec, p.1129-1142. 1999.

GIRON-PEREZ, K.; O. NAKANO *et al.* Attraction of *Sphenophorus levis* Vaurie Adults (Coleoptera: Curculionidae) to Vegetal Tissues at Different Conservation Levels. **Neotropical Entomology**, v.38, n.6, Nov-Dec. p. 842-846. 2009.

GOMES, E.; UMSZA GUEZ, M. A. *et al.* Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications – review. **Quim. Nova**, v. 30, n.1, Jan-Fev. p. 136-145. 2007.

GONZALEZ, SAMANTHA LEMKE. Determinação da atividade da pectina metilesterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco da manga. Disponível em: <<http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=41425802>>. Acesso em: 20 maio 2010.

GRADEL, C. M.; B. A. DEHORITY. Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Appl Microbiol**, v.23, n.2, Feb. p.332-40. 1972.

GRINNA, L. S., AND TSCHOPP, J. F. Size Distribution and General Structural Features of N-Linked Oligosaccharides from the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 5, p. 107-115. (1989).

GUMMADI, S. N.; T. PANDA. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, v.38, n.7, Feb 28. p. 987-996. 2003.

GUPTA, R.; E. JUNG *et al.* Scanning the available *Dictyostelium discoideum* proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using neural networks. **Glycobiology**, v.9, n.10, Oct. p.1009-22. 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [s.n.], p. 95-98. 1999.

HIBBETT, D. S.; M. BINDER *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v.111, May, p.509-547. 2007.

- HOLLENBERG, C. P., GELLISSEN, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 554-560. 1997.
- HOONDAL, G. S.; R. P. TIWARI *et al.* Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.59, n.4-5, p.409-18. Aug, 2002.
- HORTON P.; NAKAI, K. Proceeding of the 5th international conference on intelligent systems for molecular biology, **AAI Press**, p. 147–152. 1997.
- HSIAO, C.; N. J. CHATTERTON *et al.* Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. **Genome**, v.37, n.1, Feb. p.112-20. 1994.
- JANSEN E. F.; MACDONNELL, L. R. Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase. **Arch. Biochem.** v. 8, p. 97-112. 1945.
- JAUBERT, S.; J. B. LAFFAIRE *et al.* A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Febs Letters**, v.522, n.1-3, Jul. p.109-112. 2002.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**. v.40, Mar. p. 2931–2944. 2005.
- JENKINS, J.; MAYANS, O.; SMITH, D.; WORBOYS, K.; PICKERSGILL, R. W. Three-dimensional Structure of *Erwinia chrysanthemi* Pectin Methylesterase Reveals a Novel Esterase Active Site. **J.Mol.Biol**, v. 305, p. 951-960. 2001.
- JOHANSSON, K.; EL-AHMAD, M.; FRIEMANN, R.; JO, H.; MARKOVIC, O.; EKLUND, H. Crystal structure of plant pectin methylesterase. **FEBS Letters**, v. 514, Jan. p. 243-249. 2002.
- JOSEPH BERGER. Center for Invasive Species and Ecosystem Health, USDA Forest Service and International Society of Arboriculture. <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5389312>. Acesso em 22 de nov. de 2011.
- JULENIUS, K.; A. MOLGAARD. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. **Glycobiology**, v.15, n.2, Feb, p.153-64. 2005.
- KASHYAP, D. R.; S. CHANDRA *et al.* Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, n.3, Apr. p.277-282. 2000.
- KASHYAP, D. R.; P. K. VOHRA *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour Technol**, v.77, n.3, May. p.215-27. 2001.
- LI, J.; J. ALEXANDER, 3RD *et al.* Phylogenetic relationships of Empetraceae inferred from sequences of chloroplast gene *matK* and nuclear ribosomal DNA ITS region. **Mol Phylogenet Evol**, v.25, n.2, Nov. p.306-15. 2002.
- LIVAK, K. J.; T. D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, Dec. p.402-8. 2001.

MARTINS, E. Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 2006. 108 f. **Tese (Doutor em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.** 2006.

MCLNERNEY, J. O. GCUA: General Codon Usage Analysis. **BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE**, v. 14, n. 41998, Nov. p. 372-373. 1997.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-428. 1959.

MOHAMED, S. A.; N. M. FARID *et al.* Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **J Biotechnol**, v.127, n.1, Dec. p. 54-64. 2006.

NISHIKAWA, T.; K. OKAZAKI *et al.* A molecular phylogeny of *Lilium* in the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. **J Mol Evol**, v.49, n.2, Aug. p. 238-49. 1999.

NITURE, S. K.; A. PANT *et al.* Active site characterization of the single endopolygalacturonase produced by *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. **Eur J Biochem**, v.268, n.3, Feb, p.832-40. 2001.

PAIVA, EMANUELA P.; LIMA, MARIANNE S.; PAIXÃO, JO'SE A. Pectina: Propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**. 10: 196: 211. 2009.

PARENICOVA, L.; J. A. E. BENEN *et al.* pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry**, v.251, n.1-2, Jan 15, p.72-80. 1998.

PARK, J. S; SIMPSON, A. G. B. Characterization of halotolerant Bicosoecida and Placididea (Stramenopila) that are distinct from marine forms, and the phylogenetic pattern of salinity preference in heterotrophic stramenopiles **Environmental Microbiology**. v. 12. Aug. p.1173–1184. 2010.

PAUCHET, Y.; P. WILKINSON *et al.* Diversity of Beetle Genes Encoding Novel Plant Cell Wall Degrading Enzymes. **PLoS One**, v.5, n.12, Dec. 2010.

PEDROLI, D. B.; E. C. CARMONA. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.37, n.6, Jun. p. 567-573. 2010.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C. *et al.* Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v.3, Aug. p. 9-18. 2009.

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

- POPEIJUS, H.; H. OVERMARS *et al.* Enzymology - Degradation of plant cell walls by a nematode. **Nature**, v.406, n.6791, Jul 6, p. 36-37. 2000.
- PRECETTI, A.A.C.; ARRIGONI, E.B. Aspectos bioecologicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleóptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. Piracicaba: Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (**Boletim Técnico COPERSUCAR**), São Paulo, p. 3-15. 1990.
- PICKERSGILL, R.; SMITH, D.; WORBOYS, K.; JENKINS, J. Crystal Structure of Polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, vol. 273, Sep, No. 38, p. 24660–24664. 1998.
- PRECETI, A. A. C. M. & TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col., Curculionidae). In: **COPERSUCAR (Ed.). Reunião Técnica Agrônômica: pragas da cana-de-açúcar**. São Paulo, p.32-37. 1983.
- PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Solubilisation of cell walls by tomato polygalacturonases: Effects of pectinesterases. **J. Food Biochem.** v.8, p. 67-74. 1982.
- PRESTON, R.D. *The Physical Biology of Plant Cell Walls*, **Chapman & Hall**, London. p. 457-479. 1974.
- PRECETTI, A.; ARRIGONI, E. Aspectos bioecologicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, p. 15,1990.
- REVISTA CULTIVAR. http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=39. Acesso em: 22 de nov. de 2011.
- RICHARD, P.; S. HILDITCH. d-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, n.4, Mar, p.597-604. 2009.
- RINKE, R.; A. S. COSTA *et al.* Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). **Genet Mol Res**, v.10, n.4, p.2679-91. 2011.
- ROGERS, L. M.; Y. K. KIM *et al.* Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.17, Aug 15, p.9813-8. 2000.
- ROJAS, N. L.; S. F. CAVALITTO *et al.* Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.11, n.1, Jan 15. 2008.
- RULLER, R. Criação de uma endo-xilanase termoestável através da evolução molecular in “*in vitro*”. Ribeirão Preto: USP, 2006. 203 f. **Tese (Doutorado): Programa de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto**. 2006.
- SAITOU, N.; M. NEI. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v.4, n.4, Jul, p.406-25. 1987.

SAKAI, T.; T. SAKAMOTO *et al.* Pectin, Pectinase, and Protopectinase - Production, Properties, and Applications. **Advances in Applied Microbiology, Vol 39**, v.39, p.213-294. 1993.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. ed 2. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

SANTOS, S. F. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. **Tese (Doutor em Eng. Química) - Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Tecnologia**. 2007.

SCHARLAKEN, B.; De GRAAF, D. C.; MEMMI, S.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F. J. Differential protein expression in the honeybee head after a bacterial challenge. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 65. p.223 - 237. 2007.

SEMENOVA, M. V.; S. G. GRISHUTIN *et al.* Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry-Moscow**, v.68, n.5, May, p.559-569. 2003.

SERRAT, M; BERMÚDEZ, R. C; VILLA, T. G. Production, Purification, and Characterization of a Polygalacturonase from a New Strain of *Kluyveromyces marxianus* Isolated from Coffee Wet-Processing Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 97, Nov. p. 193-208. 2002.

SHEN, Z.; M. DENTON *et al.* Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. **J Insect Sci**, v.3, p.24. 2003.

SHEN, Z.; K. PAPPAN *et al.* Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. **J Insect Sci**, v.5, p.21. 2005.

DA SILVA, E. G.; M. D. BORGES *et al.* Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **Fems Yeast Research**, v.5, n.9, Jun, p.859-865. 2005.

SINGH, S. A.; A. G. A. RAO. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.35, Apr, p.115-123. 2002.

SOARES-COSTA, A.; A. B. DIAS *et al.* Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **J Insect Physiol**, v.57, n.4, Apr, p.462-8. 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER G.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

- TEWARI, R.; D. R. KASHYAP *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v.77, n.3, May, p.215-227. 2001.
- TSCHOPP, J. F., SVERLOW, G., KOSSON, R., CRAIG, W., AND GRINNA, L. High Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Bio/Technology** v. 5, p. 1305-1308. (1987).
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, Apr. 2007.
- VAN SANTEN, Y.; J. A. BENEN *et al.* 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, v.274, n.43, Oct 22, p.30474-80. 1999.
- VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. **American Museum Novitates**, n. 2656, p. 1 -30, 1978.
- WANG, Y.; QIAN, P-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **Plos One**. 4(10): e7401. 2009.
- WATANABE, H.; H. NODA *et al.* A cellulase gene of termite origin. **Nature**, v.394, n.6691, Jul 23, p.330-1. 1998.
- WATANABE, H.; G. TOKUDA. Animal cellulases. **Cell Mol Life Sci**, v.58, n.9, Aug, p.1167-78. 2001.
- YORK, W. S.; A. G. DARVILL *et al.* Isolation and Characterization of Plant-Cell Walls and Cell-Wall Components. **Methods in Enzymology**, v.118, p.3-40. 1986.
- YUAN, C. C.; P. X. LI *et al.* [The confirmation of putative natural hybrid species *Meconopsis x cookei* G. Taylor (Papaveraceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS region sequence]. **Yi Chuan Xue Bao**, v.31, n.9, Sep, p.901-7. 2004.
- WANG, Y.; QIAN, P-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **Plos One**. 4(10): e7401. 2009.
- WU, Q.; A. R. KRAINER. AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. **Mol Cell Biol**, v.19, n.5, May, p. 3225-36. 1999.
- ZHANG, J. X.; B. D. BRUTON *et al.* *Fusarium solani* endo-polygalacturonase from decayed muskmelon fruit: purification and characterization. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.54, n.5-6, May-Jun, p.171-186. 1999.
- ZHANG, L.; Y. M. CAI *et al.* [Sequence of the ITS region of nuclear ribosomal DNA(nrDNA) in Xinjiang wild *Dianthus* and its phylogenetic relationship]. **Yi Chuan Xue Bao**, v.29, n.6, Jun, p.549-54. 2002.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v.35, p. 825-830. 2000.

8. ANEXOS

Tabela A1. Primers utilizados. A tabela mostra a sequência dos *primers* utilizados obtenção das ORFs completas, construção dos vetores recombinantes e análise de expressão gênica diferencial por qRT-PCR.

<i>Primers</i>	Sequência
Primer_Expressão_Endopg_Forward_(EcoRI)	5'-GGAATTCACCCCTGCAGTAGGAGCGAG-3'
Primer_Expressão_Endopg_Reverse_(NotI)	5'-AAAAGCGGCCGCACAAGAAAATCCGGATGG-3'
Primer_Endopg_interno	5'-GACCGTTGATGTATCTGC-3'
Primer_Expressão_PME_Forward_(PstI)	5'-CTGCAGGAAACCAAATCCACCAGG-3'
Primer_Expressão_PME_Reverse_(NotI)	GCGGCCGCTGCTCCACTTCCGGTATTGGC
Primer_qRT_PCR_Endopg_Forward	5'-TTGACTGATTGGACCGTTG-3'
Primer_qRT_PCR_Endopg_Reverse	5'-CTACTGCGTGTGGATGGTG -3'
Primer_qRT_PCR_PME_Forward	5'-GACCGCAAAAACGACGAA-3'
Primer_qRT_PCR_PME_Reverse	5'-TGGAAGACGACCAAGCAC-3'
Primer_qRT_PCR_GAPDH_Forward	5'-CAACTGGCGTTTTTACCACA-3'
Primer_qRT_PCR_GAPDH_Reverse	5'-AACATACATTGGGGCGTCA-3'

Tabela A2. Sequências utilizadas no alinhamento múltiplo das *SI-Pectinases*. Ao todo 36 sequências foram analisadas para *SI-PME* e 34 para *SI-EndoPG*. A busca foi realizada em banco de dados do NCBI, de modo que o número de acesso de cada sequência está inserido ao lado.

Sequências PME		Sequências Endo-PG	
Organismo	Número de Acesso	Organismo	Número de Acesso
<i>Sphenophorus_levis</i>		<i>Sphenophorus_levis</i>	
<i>Sitophilus_oryzae</i>	ADU33259.1	<i>Sitophilus_oryzae</i>	ADU33253.1
<i>Dendroctonus_ponderosae</i>	ADU33325.1	<i>Dendroctonus_ponderosae</i>	ADU33302.1
<i>Dickeya_dadantii</i>	YP_003882650.1	<i>Chrysomela_tremulae</i>	ACP18831.1
<i>Pectobacterium_carotovorum</i>	ZP_03828136.1	<i>Gastrophysa_viridula</i>	ADU33339.1
<i>Erwinia_chrysanthemi</i>	CAA59151.1	<i>Leptinotarsa_decemlineata</i>	ADU33355.1
<i>Rahnella_sp</i>	YP_004213827.1	<i>Phaedon_cochleariae</i>	O97400.1
<i>Escherichia_albertii</i>	ZP_02903590.1	<i>Talaromyces_stipitatus</i>	XP_002484837.1
<i>Escherichia_coli</i>	EGB62789.1	<i>Cryphonectria_parasitica</i>	AAB36616.1
<i>Shigella_sonnei</i>	YP_309729.1	<i>Aspergillus_oryzae</i>	XP_001820953.1
<i>Shigella_boydii</i>	EGI98883.1	<i>Aspergillus_niger</i>	Q9P4W4.1
<i>Cronobacter_sakazakii</i>	YP_001438657.1	<i>Colletotrichum_lupini</i>	ABL01533.1
<i>Klebsiella_pneumoniae</i>	YP_001334457.1	<i>Verticillium_dahliae</i>	EGY23539.1
<i>Salmonella_bongori</i>	YP_004729566.1	<i>Glomerella_lindemuthiana</i>	Q00446.1
<i>Xanthomonas_perforans</i>	ZP_08187812.1	<i>Athelia_rolfsii</i>	BAH14957.1
<i>Clostridium_acetobutylicum</i>	NP_349964.1	<i>Thanatephorus_cucumeris</i>	ABH12113.1
<i>Bacillus_sp</i>	ZP_01171421.1	<i>Penicillium_olsonii</i>	Q9Y834.1
<i>Citrobacter_koseri</i>	YP_001453920.1	<i>Penicillium_marneffeii</i>	XP_002149326.1
<i>Ralstonia_solanacearum</i>	CBJ39775.1	<i>Postia_placenta</i>	XP_002471034.1
<i>Cellulosilyticum_ruminicola</i>	ACZ98654.1	<i>Phaeosphaeria_nodorum</i>	XP_001804945.1
<i>Solanum_lycopersicum</i>	Q96576.1	<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	EDN63471.1
<i>Pisum_sativum</i>	AAC14742.1	<i>Arabidopsis_thaliana</i>	NP_191310.1
<i>Salix_gilgiana</i>	BAA89480.1	<i>Prunus_persica</i>	AAC64184.1
<i>Nicotiana_tabacum</i>	AAX13972.1	<i>Brassica_napus</i>	CAC05657.1
<i>Arabidopsis_thaliana</i>	CAB58974.1	<i>Malus_domestica</i>	P48978.1
<i>Physcomitrella_patens</i>	XP_001778325.1	<i>Glycine_max</i>	AAL30418.1
<i>Allium_cepa</i>	AEK07905.1	<i>Oryza_sativa</i>	AAX95165.1
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	Q12535.1	<i>Erwinia_chrysanthemi</i>	CAC83614.1
<i>Cochliobolus_carbonum</i>	AAD43340.1	<i>Dickeya_dadantii</i>	YP_003881986.1
<i>Botryotinia_fuckeliana</i>	XP_001560589.1	<i>Enterobacteriaceae_bacterium</i>	ZP_07949263.1
<i>Puccinia_graminis</i>	XP_003333140.1	<i>Pectobacterium_carotovorum</i>	AAA03624.1
<i>Talaromyces_stipitatus</i>	XP_002482586.1	<i>Pectobacterium_atrosepticum</i>	YP_051640.1
<i>Phytophthora_capsici</i>	ACO54872.1	<i>Xylella_fastidiosa</i>	YP_001830252.1
<i>Haloferax_volcanii</i>	YP_003535912.1	<i>Faecalibacterium_prausnitzii</i>	CBL02678.1
<i>Halopiger_xanaduensis</i>	YP_004596660.1		
<i>Haloterrigena_turkmenica</i>	YP_003404589.1		

Clone MBL_slevis_libr_001H05 (*SI-PME*)

-11 TTGCTTTCAAA

1 **ATG**AAGATTATCGTCTTGTGCCTGTGTTAGTAGCATTAGCTTGCCTAACCAAAATCCACCAGGAAGCTT

71 CCTCTCGACCAATTCTAACCGCTCCGAGGCTAATTATTACACCAAAGAAAAGTACCTCCAAGGATGGTC

141 ACCACCAAGCATTTCAACCAATCATACTGACTACACTGTAGGCGGTGGCGGATACAGTACAATTCAAGCT

211 GCCGTCAATGACGCTATAAATGCCGAGGCTCTAACAGGAAATACATTAAATCAACACAGGAACATAACC

281 AACAAAGTAGTATACATTCCCAACTAACGTTCCCTTAACAATTTATGGAGCCGGTAGCAGGCCAGACAA

351 TACTGTCATTACTTTGAACATGCCGCCCCAACTACTCCATCAGCCTATAAAAACTTGGTTAATCCAAAT

421 GATGCCTTCTTCAAACCAGGTGATCCAGCTTACAGCATTACAAACGGCTGTGCTTCCTCGAGCGGTACTA

491 TTGGAACAAGTTGTTCAACAGTATTTTGGGTTTTAGCTCCAAACGGTTCAAATAGTCAACCTGCAAATTCA

561 AAACTCAGCTAAAAACAAAGGAGACCAACAAGCCGTCGCTCTACAAACAACAGCGACCGAATTCAGGTT

631 CACAACGTCAATTTGTTGGGTCATCAAGACACTCTGTGCGGGTTTCAGGTGGTACCGACACTCAAATAG

701 CCCATTATACAAACACCTACATCGAAGGCGATATCGATTACGTCCTTGGTGGTGGCACTGCCATTTTCGA

771 GTCGTGTACTTTCTACTCCAAAGCTGACCGCAAAAACGACGAATCTGTTATATTTGCTCCAGATACTGAT

841 CCACACCAAATGTATGGTTACTTGGTTATTAAATCAACTATAACCGGAGACAGTGCTTGGTCGTCTTCCA

911 AGAAAGTATATTTGGGACGTTCTTGGGACGCCGGAGTAAATCTGCTAATGCATACGTGCCCGGTACTTC

981 GCCAAATGGACAACACTAGTTATCAGGGAACTACTATTAATGGAATTGTTCCGAATTCTGCTCCTTGGACT

1.051 ACAGCAACAAGTGGAAGGGCTTATGCAGGAAATGCCGCTAACAGCAGAGATTTGAACAATCAAATTTCA

1.121 ACAGATTCTGGGAATATGCCAATACCGGAAGTGGAGCAT**TGA**TTTAGTATATTTTCATTTTGTAATCATCT

1.191 AAAAATAAGTGAAATAGCACTTATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura A1. Clone *SI-PME* caracterizado. A figura mostra a sequência dos cDNA *SI-PME* presente no clone MBL_slevis_libr_001H05. Os nucleotídeos destacados em vermelho indicam os códons de início e terminação das ORFs e os nucleotídeos sublinhados são referentes aos UTR'5 e UTR3'. A cauda poli-A pode ser notada na extremidade 3'.

Clone MBL_slevis_libr_005E03 (*Sl-EndoPG*)

1 **ATG**AATCTTCTCGTCGCATCACTGCTACTTGTCTTAGTGGCTAGGGCTGCTTACGCCACCCCTGCAGTAG
71 GAGCGAGCTGCACGGTGTCTTCATACAATGACGTTGCCGGTGCCGTCTCCAGCTGCACCTCAATCACCCCT
141 GAAAGGTTTCACTGTTCAGCTGGCAAAGCTCTGATCATGAAGCTGAAAAGCGGAACCACCGTTAAAGTT
211 GCCGGAACAATTAAGTTCGCTGTCAGCGAATGAAAAGGACCTCTGGTTGAAATTTCCGGAAGCAAAATCA
281 CCTTCTCTGGAGCTGGGGGATACTTCGATGGACAAGGTGCCAGCTACTGGGACGGACAAGGTGACAAAAGG
351 AAAGACCAAACCAAAATCTTCAGAATCAAACCCTGGAGGTTCTCATTTCAACAACATCAAATTATG
421 AACTGCCCTCACCAATGTGTATCCATTAACCCCTGCATCTGACACCCTTTGACTGATTGGACCGTTGATG
491 TATCTGCAGGCGATAGTAAAGGGGAAAAAATACCGATGGATTTGATCTATCCAATTCAGTGGTATCAC
561 CATCAAACACGCAGTAGTTAAGAACCAAGATGACTGCGTCTGTCAACCAAGGTTCCCACTATGTTTTTC
631 CAAAACCTGACTTGAGTGGAGGTCACGGTCTCAGTCTTTCCGTAGGTCAAAGCAGTCAGAATGGAAATC
701 CAAACACCGTTAAGAACGTCACCTTCAGCGACTGTACCGTTACCAACTCCAGAAATGGTATCCACGTCAA
771 GACACACAATGACGCTGGAACCTGGAGCAATCAGCGACGTTACCTACAAGAACATTAAACTCTCTGGAATC
841 ACAAACTACGGCATCAACATTCAAGAAGATTACGAAAATGGAGGTTCACTCTGGAATCCAAAAGCAAATA
911 TTCCAATCTCCAATTGAACTTGCAATCTGTAACCTGGATCTATGTCTGGCGGATCTAGCAGCATGCCTGT
981 TTACATTTTATGCGGAAGCAACGGTTGTAACAACCTGGAATTGGTCAGGAGTTTCCATCGGCAATGGAAAG
1.051 AAGAAAAACAGCTGTAATTACAAACCATCCGGATTTTCTTGT**TAA**CTCATTGTACTAGTGTTAAAaCCTA
1.121 CTATTTAAAAaCAATATACCATATACCATGG

Figura A2. Clone *Sl-EndoPG* caracterizado. A figura mostra a sequência do cDNA *Sl-EndoPG* presente no clone MBL_slevis_libr_005E03. Os nucleotídeos destacados em vermelho indicam os códons de início e terminação das ORFs e os nucleotídeos sublinhados são referentes aos UTR'5 e UTR3'. Não foi possível a identificação da cauda poli-A.

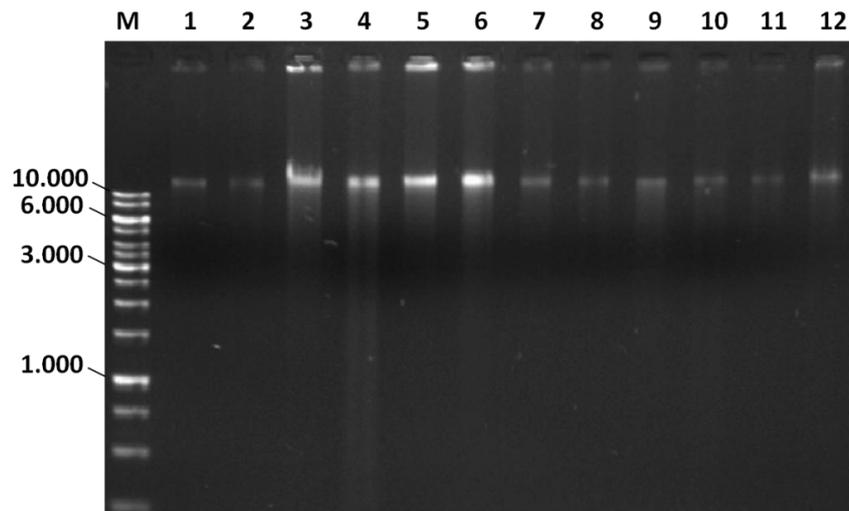


Figura A3. Extração de DNA genômico do *S. levis*. A extração foi realizada a partir do corpo gorduroso após dissecação de larvas do inseto. Durante a dissecação procurou evitar o máximo contato direto com o trato intestinal, cujo interior comporta DNA microbiano. Aproximadamente 2-3 mg de tecido foi usado na extração de DNA segundo método descrito por Bishoff e Lawrence (1990) com modificações. M: marcador de massa molecular GeneRuler 1Kb (Fermentas); 1-12: amostras de DNA genômico extraídos.