



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**PRODUÇÃO HETEROLOGA DE INIBIDORES DE PECTINA METIL ESTERASE
(PMEI), PARA ENSAIOS DE INIBIÇÃO COM PME E INVERTASE, ENZIMAS
INTESTINAIS DO *SPHENOPHORUS LEVIS***

Dissertação de mestrado

CAMILO OROZCO ARAQUE

SÃO CARLOS, ABRIL DE 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**PRODUÇÃO HETEROLOGA DE INIBIDORES DE PECTINA METIL ESTERASE
(PMEI), PARA ENSAIOS DE INIBIÇÃO COM PME E INVERTASE, ENZIMAS
INTESTINAIS DO *SPHENOPHORUS LEVIS***

Camilo Orozco Araque

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 Bioquímica e Biologia Molecular

Orientação: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

SÃO CARLOS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Camilo Orozco Araque, realizada em 20/02/2018:

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva
UFSCar

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes
UFSCar

Prof. Dr. Wilson Malagó Júnior
EMBRAPA

Dedico esse trabalho especialmente a meu núcleo familiar, sem o apoio deles não conseguiria os meus triunfos na vida. Quero agradecer-los também por sempre me ensinarem a levar a vida calmamente e ter os pés no chão.

AGRADECIMENTOS

A minha família, Sara O. Araque minha irmã, Elizabeth Araque minha mãe, e Ricardo Orozco meu pai, por me apoiar em tudo momento com suas mensagens de alento nos momentos difíceis do mestrado.

Ao Professor Dr. Flavio Henrique-Silva, pela oportunidade de fazer o mestrado no seu laboratório, ser meu primeiro contato com o Brasil, pelos ensinamentos não somente de trabalho como também pessoais.

As amigadas que fiz em São Carlos e que aportaram muito em minha vida pessoal e que espero ver mais na frente no meu caminho: especialmente Rodrigo Alves pela motivação que me deu para escrever o meu trabalho e nunca desistir de meus objetivos; Estefanía Sepúlveda, Marco Guevara, Camila Martins, Tyler Strobl, Katya Obando, Patricia Lima, Fernando Arriagada, Martha Velasco, Ivan Filho, Adilson Miranda, Carolina Caicedo, Fabiola Oliveira, entre outros.

A meus colegas de laboratório, que me ajudaram muito no começo do mestrado: Elizabeth Baraldi, Chakravarthi Mohan, Adelita Santiago, Danyelle Toyama, Celio Dias, Bruno Salata, Augusto Furio e Danilo Evangelista, e aos que conheci em meu segundo ano de mestrado e que ajudaram muito em meu crescimento pessoal e academico, Andres Ortiz, Fernando Mazur, Priscila Shibao, Heloisa Longhim, e Vanessa Schneider.

A todos meus colegas de pós-graduação do PPGGEV e outros programas, que conheci em esses dois anos.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e à Coordenação do PPGGEV pela valiosa oportunidade de estudar fora de meu país e fazer meu mestrado nesses dois anos.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) convocatória 2015, e seu auxílio financeiro pela qual eu consegui cumprir meu sonho de estudar meu mestrado em Brasil.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A pectina é parte fundamental da parede celular das plantas e é composta principalmente por 4 polissacarídeos. O polissacarídeo mais abundante é o homogalacturano (HG), que representa 65% da pectina e é um homopolímero de ácido galacturônico, predominantemente metilesterificado. O HG é substrato para muitas enzimas pectina-modificadoras, também chamadas pectinases. A pectinase que participa na primeira parte da degradação da pectina é a Pectina Metil Esterase (PME) (E.C 3.1.1.1.1). Esta enzima catalisa a hidrólise de dois grupos metil ester da cadeia principal de HG. Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório foi gerada uma biblioteca de cDNA de um inseto praga da cana-de-açúcar, o coleóptero *Sphenophorus levis*, na qual foi identificada uma PME, nomeada SI-PME. A SI-PME pode ser parte de um arsenal enzimático que possui o inseto, e poderia determinar o potencial patogênico do organismo invasor. As PME de plantas podem ser inibidas por inibidores endógenos proteicos de plantas, os inibidores de pectina metil Esterase (PMEI). Sua inibição é conseguida pela formação de um complexo 1:1 dependente de pH. Até o momento, não existe relato de inibição das PME de insetos por PMEI de plantas, o que foi testado neste presente trabalho. Por outro lado, nosso laboratório também identificou uma invertase de *S. levis*, nomeada de SI-invertase. A SI-Invertase tem função digestiva e atua na hidrólise de sacarose. Os inibidores de invertase (INH) e os PMEI compartilham semelhança estrutural. Esses inibidores constituem uma família chamada de proteínas PMEI-relacionadas (PMEI-RP). Por isso, resolvemos também realizar testes de inibição da SI-invertase usando os PMEI. Inibidores de quatro espécies de plantas: *Actinidia deliciosa* (Kiwi), *Saccharum hybrid* (Cana-de-açúcar), *Solanum lycopersicum* (Tomate) e *Vitis americana* (Uva) foram clonados, produzidos de forma recombinante na levedura *Pichia pastoris* e testados quanto à inibição da SI-PME e SI-invertase, também produzidas na levedura *P. pastoris*. Nenhum dos inibidores foi capaz de inibir a atividade da SI-PME, ainda que tenhamos verificado, utilizando o PMEI de cana-de-açúcar, que forma-se um complexo PME-PMEI, o que, no entanto, não deve afetar o sítio catalítico da enzima. Quanto à SI-invertase, ela teve porcentagens de inibição (20 e 40%) na presença dos PMEI de tomate e de cana-de-açúcar respectivamente.

Palavras chaves: Pectina Metil Esterase (PME), *Sphenophorus levis*, Inibidores de Pectina Metil Esterase (PMEIs), Pectinases, Herbivoria, Invertase.

ABSTRACT

The pectin is a fundamental part of the cell wall from plants and it is composed mainly by 4 polysaccharides. The polysaccharide most abundant is the homogalacturonan (HG) representing up to 65% from pectin, and it is a homopolymer of galacturonic acid, mainly methyl esterified. The HG is a substrate for pectin remodeling enzymes, also called pectinases. The pectinase that participates in the first phase of pectin degradation is the Pectin Methylesterase (PME) (E.C.3.1.1.1.1). This enzyme catalyzes the hydrolysis of two groups methyl ester of the principal chain of HG. In previous works of our laboratory we identified and characterized a PME (SI-PME) in a cDNA library of the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. The PMEs from plants can be inhibited by endogenous inhibitors from plants, the Pectin Methylesterase Inhibitors (PMEIs). The inhibition is achieved by the formation of a pH dependent 1:1 complex. Until now there is no report of an inhibition the insects PMEs by plants PMEIs, which was tested in this work. On the other our laboratory also identified an *S. levis* invertase, called SI-invertase. The SI-invertase has digestive function and hidrolise the sacarore. Structurally PMEIs share high identity with invertase inhibitors (INH). That inhibitors comprise a large plant protein family known as PMEI-related proteins (PMEI-RP). Therefore we also decide to investigate the inhibition of SI-invertase by PMEIs. Inhibitors from four species of plants: *Actinidia deliciosa* (Kiwi), *Saccharum hybrid* (Sugar cane), *Solanum lycopersicum* (Tomato) e *Vitis americana* (Grape) were cloned and recombinantly produced in the yeast *Pichia pastoris*. The SI-PME and SI-invertase were also were expressed in the yeast *P. pastoris*. Neither the inhibitors inhibited the SI-PME activity, although a complex of SI-PME and sugarcane PMEI was identified in vitro. Regarding the SI-invertase it was significantly inhibited by the PMEIs from tomato (20%) and sugar cane (40%).

Key words: Pectin Methyl Esterase (PME), *Sphenophorus levis*, Pectin methylesterase inhibitor (PMEI), Pectinase, Herbivory, Invertase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ponto isoelétrico e massa molecular esperada para os PMEIs.	43
Tabela 2 - Quantificação dos PMEIs após dialise	46
Tabela 3 - Diâmetros obtidos no ensaio gel difusão ágar.....	48
Tabela 4 - Análise estatística do ensaio gel difusão ágar	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição da parede vegetal	12
Figura 2 - Mecanismo de ação das pectinases	13
Figura 3 - Mecanismo de ação da Pectina Metil Esterase	14
Figura 4 - Comparação entre <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Sitophilus oryzae</i>	16
Figura 5 - Alinhamento múltiplo dos inibidores de invertase e PMEI.....	18
Figura 6 - Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPicZ α -A	25
Figura 7 - Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pGapZ α -A	26
Figura 8 - RNA de tomate e PCR para amplificação do To-PMEI.....	32
Figura 9 - DNA de tomate e amplificação do To-PMEI	33
Figura 10 - DNA de kiwi e amplificação do Kw-PMEI.....	33
Figura 11 - DNA de uva e amplificação do Vitis-PMEI.....	34
Figura 12 - Amplificação do Cane-PMEI do clone de <i>Sacharum hybrid</i>	34
Figura 13 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do Cane-PMEI.....	35
Figura 14 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do To-PMEI	36
Figura 15 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do Vitis-PMEI	36
Figura 16 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do Kw-PMEI.....	37
Figura 17 - Alinhamento múltiplo entre os PMEIs procedentes de plantas	38
Figura 18 - Identificação de clones de <i>Pichia pastoris</i> transformados com Cane-PMEI.....	39
Figura 19 - Identificação de clones de <i>Pichia pastoris</i> transformados com pGapZ α -A-To-PMEI	39
Figura 20 - Identificação de clones de <i>Pichia pastoris</i> transformados com Vitis-PMEI	40
Figura 21 - Identificação de clones de <i>Pichia pastoris</i> transformados com Kw-PMEI	40
Figura 22 - Análise da pPicZ α -A-Cane-PMEI expressa em <i>P. pastoris</i>	41
Figura 23 - Análise da pGapZ α -A-To-PMEI expressa em <i>P. pastoris</i>	41
Figura 24 - Análise da pPicZ α -A-Vitis-PMEI expressa em <i>P. pastoris</i>	42
Figura 25 - Análise da pPicZ α -A-Kw-PMEI expressa em <i>P. pastoris</i>	42
Figura 26 - Cane-PMEI recombinante purificada.....	43
Figura 27 - To-PMEI recombinante purificada	44
Figura 28 - Vitis-PMEI recombinante purificada	45
Figura 29 - Kw-PMEI recombinante purificada	46
Figura 30 - Ensaio de interação SI-PME-Cane-PMEI	47
Figura 31 - Ensaio Gel Difusão Ágar (GDA).....	48
Figura 32 - Gráfico de porcentagem de inibição da SI-invertase pelos PMEI.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μ F: microfaraday
 μ L: microlitro
 μ M: micromolar
 $^{\circ}$ C: graus Celsius
 Ω : ohm
AOX: álcool oxidase
BCA: ácido bicinchonínico
BMGY: *Buffered Glycerol-complex Medium*: Meio complexo-Glicerol Tamponado
BMMY: *Buffered Methanol-complex Medium*: Meio complexo-Metanol Tamponado
Cane-PMEI: *Sugar cane* - PMEI
CH₃-OH: Metanol
cDNA: DNA complementar
cm: centímetro
CTAB: Brometo de Cetil Trimetilamonio
DM: dinâmica molecular
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNase: desoxirribonuclease
dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DNS: ácido 3,5 dinitrossalicílico
E.C: *Enzyme Classification* – Classificação Enzimática
EDPCV: Enzimas degradadoras de parede celular vegetal
EDTA: ácido etileno-diamino-tetra-acético
g: gravidade
GalA: ácido galacturônico
GDA: *Gel Diffusion Agar*: Gel difusão ágar
H₃O⁺: água na forma iônica
h: hora
HG: Homogalacturano
HIS: histidina
INH: *Invertase Inhibitor* (inibidor de invertase)
kDa: quilodaltons
Kv: quilovolts
Kw-PMEI: kiwi - PMEI
L: litro
LB: Luria-Bertani
M: molar
mg: miligrama
MgCl₂: cloreto de magnésio
mL: mililitro
min: minuto
mM: milimolar
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
ng: nanograma

Ni²⁺: níquel na forma iônica
ORF: *Open reading frame* – fase aberta de leitura
PAE: Pectina Acetil Esterase
pb: pares de bases
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PCR: reação em cadeia da polimerase SRP: ressonância plasmônica de superfície
PCR: *Polimerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase
PG: Poligalacturonase
pH: potencial de hidrogênio
pI: ponto isoelétrico
PL: Pectatoliase
PME: Pectina Metil Esterase
PMEI: Inibidor de Pectina Metil Esterase
PMEI-RP: Proteínas relacionadas PMEI
PVP: polivinilpirrolidona
qPCR: PCR quantitativo em tempo real
RG-I: Ramnogalacturano I
RG-II: Ramnogalacturano II
RNA: ácido ribonucléico
RNase: ribonuclease
rpm: rotações por minuto
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TAE: tampão Tris-acetato-EDTA
To-PMEI: tomate - PMEI
U: unidade enzimática
Vitis-PMEI: *Vitis americana* - PMEI
YEPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*
YEPDS: *Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Agar*
X: vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Pectina e pectinases	12
1.2 Pectinases de insetos	15
1.3 Pectinases e invertase de <i>Sphenophorus levis</i>	16
1.4 Controle de PMEs por inibidores proteicos.....	17
1.5 INH e PMEI.....	18
1.6 Uso potencial das PMEs e PMEIs na indústria.....	19
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 Obtenção e sequenciamento dos clones dos inibidores proteicos.....	21
3.2 Extração de RNA e DNA a partir de tecido vegetal	21
3.3 Construção dos vetores de expressão	23
3.4 Análises <i>in silico</i>	27
3.5 Expressão das proteínas na levedura <i>Pichia pastoris</i>	27
3.5.1 Obtenção das leveduras <i>Pichia pastoris</i> recombinantes	27
3.5.2 Produção e purificação dos inibidores proteicos recombinantes	28
3.6 Estudo de interação entre a SI-PME e o inibidor proteico PMEI.....	30
3.7 Atividade inibitória	30
3.7.1 Atividade da SI-PME e teste de inibição por PMEI.....	30
3.7.2 Ensaio de atividade da SI-invertase e teste de inibição pelos PMEIs	31
4.1 Extração de RNA e DNA a partir de tecido vegetal	32
4.2 Sequenciamento dos clones PMEI.....	35
4.3 Análises <i>in silico</i>	37
4.4 Expressão heteróloga dos PMEIs.....	38
4.5 Ensaio de interação entre a SI-PME com histidina e o inibidor proteico Cane-PMEI sem histidina	47
4.6 Ensaio de atividade inibitória.....	47

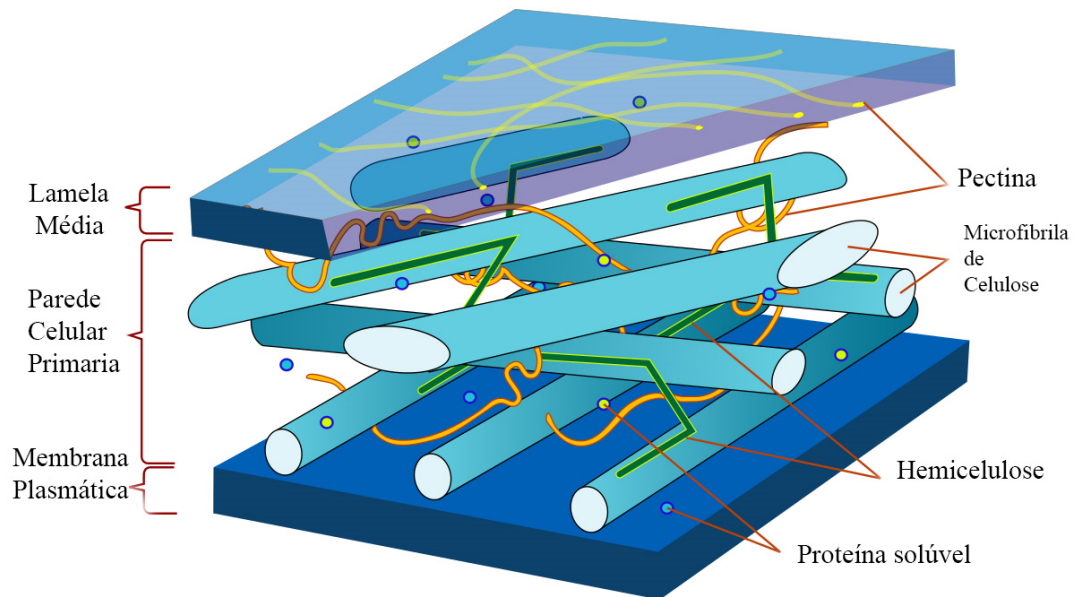
4.6.1 Ensaio de atividade da SI-PME e teste de inibição por PMEI.....	47
4.6.2 Ensaio de atividade da SI-invertase e teste de inibição com os PMEIs	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pectina e pectinases

A pectina pode ser definida como uma família de polissacarídeos complexos que possuem resíduos de 1,4- α -D-ácido galacturônico (GalA), localizada na parede primária de células de vegetais, fazendo parte da lamela média (Figura 1) (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001). A pectina é composta de quatro diferentes polissacarídeos: homogalacturano (HG), ramnogalacturano I (RG-I) e II (RG-II), e xilogalacturano (XGA) (MOHNEN, 2008) (Figura 2). Várias funções são atribuídas às pectinas: determinação da porosidade da parede celular e controle do transito de macromoléculas, adesão celular, hidratação por meio da formação de géis, flexibilidade da parede durante o crescimento e participação em mecanismos de defesa da planta ao ataque de organismos patogênicos (JARVIS, 1984; VORAGEN et al., 2009).

Figura 1 - Composição da parede vegetal



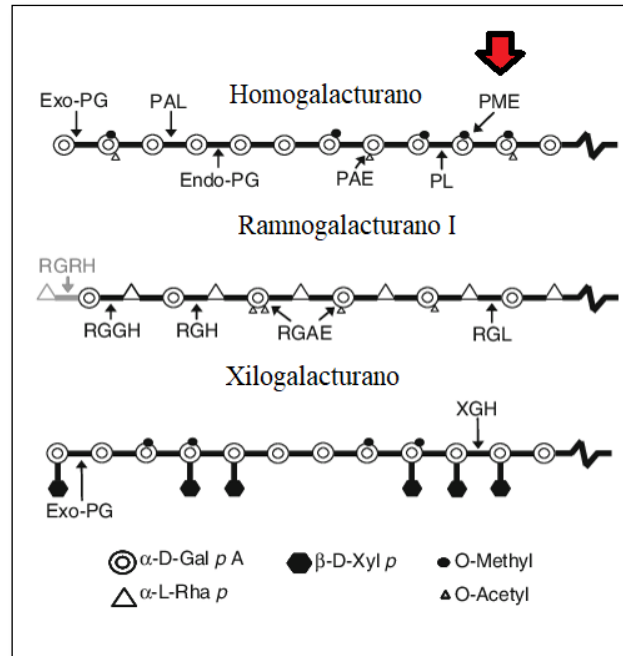
Disposição dos principais componentes da parede celular vegetal ao longo da sua estrutura. A pectina aumenta a concentração na lamela media.

Fonte: Adaptado de Martins et al., 2006.

Seu principal polissacarídeo é o homogalacturano (HG), que representa 65% da pectina em paredes primárias e é um homopolímero de GalA, podendo as unidades estarem acetiladas (0,25-

10%) ou metiladas (mais do 80%) (MOHNEN, 2008; WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009) (Figura 2). A pectina pode ser substrato para enzimas pectina-modificadoras conhecidas como pectinases, produzidas pela planta ou por agentes exógenos (SÉNÉCHAL et al., 2014).

Figura 2 - Mecanismo de ação das pectinases



Pectinases envolvidas na degradação de homogalacturano, ramnogalacturano I, e xilogalacturano. Fazendo ênfase na ação da PME (seta vermelha) ela catalisa a hidrólise dos grupos metil da cadeia de homogalacturano.

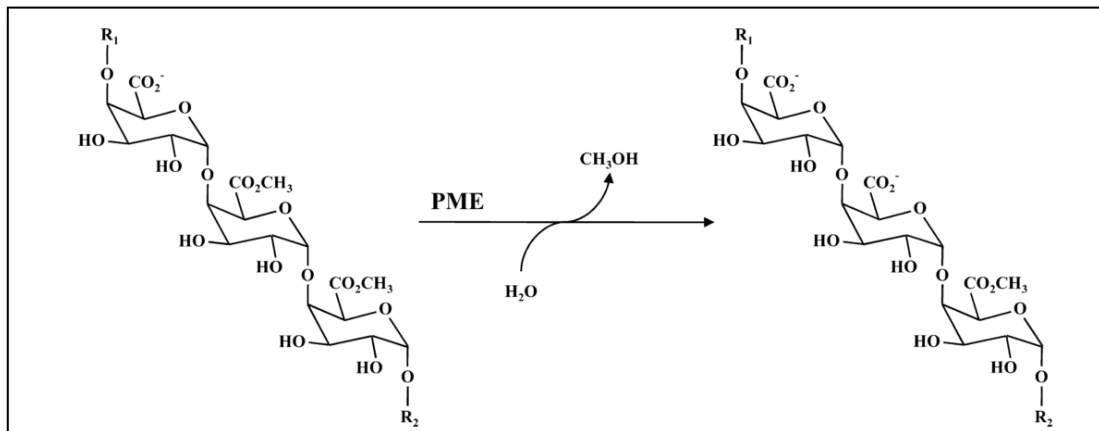
Fonte: Adaptado de Voragen et al., 2009

As pectinases podem ser produzidas por microrganismos fitopatógenos ou por insetos com hábitos de herbivoria (ANTONY et al., 2017; GUMMADI; PANDA, 2003; SÉNÉCHAL et al., 2014), e servem para degradação da parede celular primária e como consequência a penetração na planta (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012), ou o abrandamento do material vegetal para a ovoposição (BOYD; COHEN; ALVERSON, 2002). Algumas pectinases importantes são: a Poligalacturonase (PG) (PRESSEY; AVANTS, 1977). Independente da origem, as PGs hidrolisam os resíduos de GalA da cadeia principal de HG. Elas estão constituídas por dois tipos a Endo-PG (EC 3.2.1.15) e a Exo-PG (EC 3.2.1.67). As Pectato liases (PLs) são principalmente presentes em plantas (DOMINGO et al., 1998), porém, podem estar em microrganismos (POPEIJUS et al., 2000). Elas clivam, por β -eliminação, a ligação α -(1-4) ligado ao GalA (EC 4.2.2.2). As Pectina Acetilesterases (PAE) (EC 3.1.1.6) atuam especificamente na hidrólise das ligações acetilester unidas a carbonos C2 e C3 dos resíduos de GalA. Essas enzimas foram identificadas em plantas,

bactérias e fungos (BONNIN et al., 2008; PHILIPPE; PELLOUX; RAYON, 2017; SHEVCHIK; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, 2003).

Entretanto, a pectinase que participa na primeira parte da degradação da pectina é a Pectina Metil Esterase (PME) (E.C 3.1.1.1). Esta enzima catalisa a hidrólise dos grupos metilesterificados da cadeia principal de HG, liberando metanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$), Hidrônio (H_3O^+) e convertendo o ácido pectínico em ácido péctico (JOLIE et al., 2010; PELLOUX; RUSTÉRUCCI; MELLEROWICZ, 2007) (Figura 3.). A PME está presente em plantas (GIOVANE et al., 2004), microrganismos (PELLOUX; RUSTÉRUCCI; MELLEROWICZ, 2007) e recentemente reportada em insetos herbívoros (EVANGELISTA et al., 2015; SHEN et al., 2005). O mecanismo de reação das PMEs de acordo com a estrutura cristalográfica resolvida da PME de *Erwinia chrysanthemi*, consiste em um ataque nucleofílico e uma catálise ácido/base, por resíduos conservados de aspartato no carbono carbonílico C-6 metilesterificado do GalA (FRIES et al., 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação da Pectina Metil Esterase



Hidrólise específica da ligação metil éster do resíduo C-6 do GalA, da cadeia principal do HG, liberação de metanol e prótons.

Fonte: Adaptado de Jolie et al., 2010.

Porém, as plantas possuem PMEs próprias implicadas em muitos aspectos do desenvolvimento (GUÉNIN et al., 2017), incluindo a adesão celular (WILLATS et al., 2001), enraizamento adventício (GUÉNIN et al., 2011), surgimento dos primórdios no meristema apical (PEAUCELLE et al., 2008), amadurecimento dos frutos (WAKABAYASHI; HOSON; HUBER, 2003), sistema imune da planta (SCHUMAN; BALDWIN, 2016) e o crescimento dos tubos polínicos (LEROUX et al., 2015).

1.2 Pectinases de insetos

As pectinases têm sido estudadas extensivamente em microrganismos e plantas (GIOVANE et al., 2004; PELLOUX; RUSTÉRUCCI; MELLEROWICZ, 2007), mas também tem sido reportadas em vários insetos (EVANGELISTA et al., 2015; SHEN et al., 2003, 2005; ANTONY et al., 2017; VATANPARAST et al., 2014). A função das pectinases em insetos ainda não está bem compreendida, principalmente porque poucas delas têm sido purificadas ou tiveram seus genes clonados. Sugere-se que os insetos que possuem pectinases em secreções salivares, usam as enzimas para facilitar a penetração em seu hospedeiro planta, como é o caso dos afídeos (MCALLAN; ADAMS, 1961).

Os insetos desenvolveram algumas estratégias adaptativas como, mandíbulas, e estruturas específicas no intestino (intestino anterior, intestino médio e intestino posterior) usadas para degradar material vegetal (KIRSCH; HECKEL; PAUCHET, 2016; WATANABE; TOKUDA, 2010). Além as enzimas degradadoras de parede celular vegetal (EDPCV), a clivagem enzimática dos polissacarídeos da parede celular vegetal era considerada dependente de simbioses microbianos intestinais dos insetos (MARTIN; JONES; BERNAYS, 1991). Esse paradigma mudou em 1998, quando foi identificado o primeiro gene codificador de uma celulase funcional em cupim (WATANABE et al., 1998). As primeiras pectinases descritas e caracterizadas de insetos foram uma Endo-PG e uma PME de *Sitophilus oryzae* (SHEN et al., 2003, 2005). Estudos baseados em cDNA demonstraram que essas enzimas eram codificadas pelo inseto e não por microrganismos. Desde então, avanços na tecnologia de sequenciamento e análise bioinformática de genomas e transcritomas têm revelado muitos genes endógenos EDPCV em diferentes linhagens de insetos (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012). Nos últimos anos surgiram outros trabalhos apontando indícios de pectinases em insetos, principalmente nos insetos com hábitos de herbivoria (SHELOMI; HECKEL; PAUCHET, 2016). Entre eles, o besouro vermelho da farinha *Tribolium castaneum*, que ataca produtos e subprodutos provenientes de grãos e cereais (ANTONY et al., 2017). Também no gorgojo vermelho das palmeiras *Rhynchophorus ferrugineus* (VATANPARAST et al., 2014), *Sitophilus oryzae*, praga da cultura de arroz (SHEN et al., 2003, 2005) e *Sphenophorus levis* praga na cultura de cana-de-açúcar no Brasil (EVANGELISTA et al., 2015). Esses dois últimos, compartilham uma grande semelhança morfológica (Figura 4).

Figura 4 - Comparação entre *Sphenophorus levis* e *Sitophilus oryzae*



A imagem da esquerda mostra o *S. levis*. A imagem da direita mostra o *S. oryzae*.
Fonte: Fonseca, 2012; Berger, 2009

1.3 Pectinases e invertase de *Sphenophorus levis*

A ordem Coleoptera (besouros e gorgojos) é a ordem animal mais rica na terra, e sua natureza herbívora é um fator chave que tem permitido que elas se dispersem dentro de muitos ecossistemas ao redor do mundo (PAUCHET et al., 2010; SCHUMAN; BALDWIN, 2016). No entanto, sua capacidade de degradação de parede celular vegetal varia, em alguns casos, guiada pela interação entre inseto e simbiosites, sendo considerado um fator chave para a evolução da herbivoria em besouros (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012).

O coleóptero *Sphenophorus levis* (VAURIE, 1978), um membro da família Curculionidae (GALLO et al., 2002), é popularmente conhecido como o bicudo da cana-de-açúcar. Este inseto é uma importante praga dos canaviais no Brasil, sendo encontrado em mais de 40 municípios no estado de São Paulo (GALLO et al., 2002; DEGASPARI et al., 1987), principal estado produtor de cana-de-açúcar do país. Sua disseminação deve-se principalmente ao transporte de mudas infestadas de uma região para outra, visto que o inseto possui limitada capacidade de vôo, locomoção lenta, e baixa taxa de dispersão (DEGASPARI et al., 1987).

Em trabalhos anteriores no Laboratório de Biologia Molecular foi gerada uma biblioteca de cDNA do *S. levis* (PAULA, 2012), na qual foram identificadas sequências para duas pectinases, uma PME e uma Endo-PG. Essas pectinases foram nomeadas SI-PME e SI-Endo-PG, respectivamente (EVANGELISTA et al., 2015). Estas enzimas foram produzidas de forma recombinante na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (EVANGELISTA et al., 2014), e

caracterizadas quanto a pH, temperatura ótimos e termoestabilidade *in vitro*, e assim como o estabelecimento dos parâmetros cinéticos, inibitórios e sinérgico (HABRYLO et al., 2018).

A partir da biblioteca de cDNA do *S. levis* (PAULA, 2012), a enzima digestiva β -frutofuranosidase ou invertase (SI-Invertase) (EC 3.2.1.26) foi caracterizada em nosso laboratório (PEDEZZI et al., 2014). A Invertase catalisa a hidrólise de sacarose em frutose e glicose. A atividade da Invertase é modulada por inibidores proteicos específicos, inibidor de invertase (INH), uma estratégia geral encontrada em outras enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (HOTHORN et al., 2004).

1.4 Controle de PMEs por inibidores proteicos

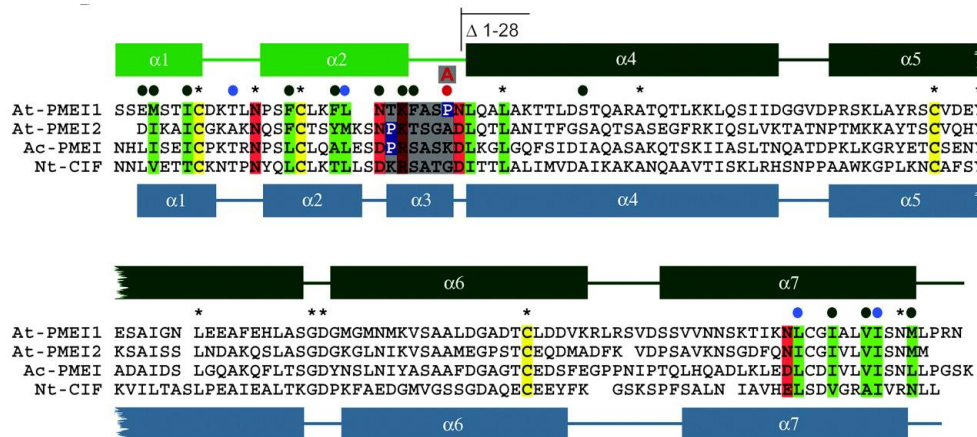
O controle da atividade das pectinases pode ser mediado com interação específica com inibidores endógenos proteicos das plantas, como os Inibidores de Pectina Metil Esterase (PMEIs) (BALESTRIERI et al., 1990b; GIOVANE et al., 2004; PELLOUX; RUSTÉRUCCI; MELLEROWICZ, 2007). Os PMEIs de plantas são ativos contra uma grande gama de PMEs de plantas (PMEs de kiwi, laranja, maçã, tomate, cenoura, batata, damasco e banana) (GIOVANE et al., 2004), mas não inibem PMEs fitopatogênicas de fungos ou bactérias (D'AVINO et al., 2003). Estudos anteriores analisaram a estrutura cristalográfica do complexo entre a PME da bactéria *Erwinia Chrysantemi*, e o PMEI de kiwi, e o complexo PME de tomate e PMEI de kiwi. A interação foi estudada mediante fluorimetria, a PME de tomate possui cinco resíduos de Trp, entretanto a PMEI de kiwi não tem Trp. A formação do complexo fez uma diminuição na fluorescência desses resíduos de Trp na PME de tomate. Os resultados sugerem que a diferença na forma do sítio ativo permite que o PMEI interaja com a PME de planta, mas não com a PME de *E. chrysantemi* (D'AVINO et al., 2003; MATTEO; GIOVANE, 2005). O modo de ação da PMEI ainda não é claro, porém vários estudos bioquímicos suportam que os PMEIs podem interagir em uma proporção estequiométrica 1:1 com PMEs de maneira dependente de pH (LEVESQUE-TREMBLAY et al., 2015; PELLETIER et al., 2010). A estabilidade desse complexo é fortemente influenciada pelo pH, indicando que a atividade da PME pode ser modulada pelo pH diretamente, ou pela modulação da afinidade entre a enzima e seu inibidor (HOCQ et al., 2017; SENECHAL et al., 2017). Além das PMEIs, outras moléculas não proteicas, como as catequinas, fenólicos extraídos da folha do chá verde, foram identificadas como inibidores da atividade de PME de plantas

(HABRYLO et al., 2018; L'ENFANT et al., 2015). Portanto, o uso de PMEIs pode se constituir uma nova estratégia de controle da SI-PME.

1.5 INH e PMEI

Avanços recentes no genoma de plantas têm identificado uma família de proteínas chamada de proteínas PMEI-relacionadas (PMEI-RP), formada por os inibidores de invertase e os inibidores de pectina metil esterase (HOTHORN et al., 2004). Os membros dessa família compartilham uma moderada identidade (~20%) em suas sequências, e se ligam a enzimas que aparentemente não têm relação funcional (PME e Invertase). Se desconhecem as bases moleculares para a especificidade do substrato, por parte de ambos complexos. As estruturas cristalográficas e alinhamentos das sequências do INH do tabaco (Nt-CIF) e o PMEI *Arabidopsis thaliana* (At-PMEI) e *Actinidia chinensis* (Ac-PMEI) revelaram semelhança relevante entre as duas proteínas (Figura 5). Os resíduos de cisteínas importantes para manter a estabilidade dos complexos, permanecem conservados no INH e nos PMEIs, assim como a região N-terminal (CAMARDELLA et al., 2000; SCOGNAMIGLIO et al., 2003) (Figura 5). Por isso, fizemos ensaios de inibição entre a SI-Invertase e os PMEI de tomate, cana-de-açúcar, uva e kiwi, e poderia provar a relevância biotecnológica que tem a inibição da invertase como enzima digestiva de insetos (PEDEZZI et al., 2014; TERRA; FERREIRA, 2012).

Figura 5 - Alinhamento múltiplo dos inibidores de invertase e PMEI



Destacando em amarelo os resíduos de cisteína conservados. Com cor verde e vermelha os resíduos responsáveis da formação do complexo PME-PMEI. Alinhamento entre: dois PMEIs de *Arabidopsis thaliana*, um PMEI de kiwi e um INH de *Nicotiana tabacum*.

Fonte: Hothorn, 2004

1.6 Uso potencial das PME e PMEIs na indústria

As PME ácidas são usadas na extração, clarificação e liquefação de sucos de frutas (ALKORTA et al., 1998). Por enquanto, as PME alcalinas têm usos potenciais para a extração de petróleo, e na indústria têxtil e de papel (KASHYAP et al., 2001). Para uma eficiente aplicação de enzimas exógenas é necessário o conhecimento das suas propriedades físico-químicas. A SI-PME atua em uma ampla faixa de pH (pH 6-9), essa enzima teria a versatilidade para ser usada em processos que envolvam condições ácidas ou alcalinas (HABRYLO et al., 2018). Não obstante as PME podem ser usadas sinergicamente com as PGs, em coquetéis enzimáticos utilizados em processos para a extração de bioetanol de segunda geração (2G). As PME removem os grupos metilesterificados da cadeia principal do HG (PELLOUX; RUSTÉRUCI; MELLEROWICZ, 2007), ajudando a extrair os açúcares presentes na parede celular vegetal do bagaço da cana-de-açúcar junto com a ação de outras EDPCV (LATARULLO et al., 2016).

Os PMEI têm potencial para serem utilizados na indústria de alimentos, com a finalidade de manter as propriedades de firmeza e textura de produtos derivados de frutas e vegetais (CASTALDO et al., 1991; GIOVANE et al., 2004). Por outro lado, na indústria vinícola, para a produção do vinho a redução do metanol tem duas vantagens principais: reduzir o nível de metanol no vinho, permitindo uma menor ingestão dietética, e fornecendo uma maior qualidade em termos de aroma. Em uma patente desenvolvida por Università Degli Studi Di Padova (2008), usou-se o PMEI de kiwi produzido em *P. pastoris* contra a PME de uva, tendo resultados bem sucedidos de inibição, e conseqüentemente a diminuição da formação de metanol no mosto (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Buscar inibidores proteicos da Pectina Metil Esterase de *Sphenophorus levis*, e de sua invertase intestinal. Para concretizar esse objetivo geral foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

2.2 Objetivos específicos

- Clonar e expressar 4 PMEIs de plantas (cana-de-açúcar, tomate, uva e kiwi)
- Expressar a PME e Invertase de *S. levis*
- Testar os inibidores de pectina metilesterase contra a PME de *S. levis*
- Testar os inibidores de pectina metilesterase contra a Invertase de *S. levis*
- Analisar a interação entre a SI-PME e o cane-PMEI

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção e sequenciamento dos clones dos inibidores proteicos

O clone de *Sacharum hybrid* nomeado Cane-PMEI, foi sintetizado a partir da sequência KF184739 descrita no Banco de Dados do NCBI, cujo clone foi adquirido do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), UNESP Jaboticabal. Para a análise qualitativa da sequência codificante contida nos clones, seus DNAs plasmidiais foram multiplicados e sequenciados no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Foi amplificada a ORF (Open Reading Frame) de Cane-PMEI por PCR, com o *primer forward* contendo o sítio de restrição para *EcoRI*, e o *primer reverse* contendo o sítio de restrição para *SalI* (Apêndice 1).

Para a obtenção das outras ORF dos PMEI restantes, realizou-se a submissão da sequência AB091088.1 do PMEI de *Actinidia deliciosa* (Kiwi), nomeado de Kw-PMEI, no algoritmo Blastn sob parâmetros de matriz original. A partir do Kw-PMEI as outras duas sequências foram escolhidas XM_010328327.1 de *Solanum lycopersicum* (Tomate) To-PMEI e XM_010662021.1 de *Vitis vinifera* (Uva) Vitis-PMEI. Porém, para extração do DNA de uva foi usada a *Vitis americana*. As sequências dos PMEIs estão depositadas no Banco de Dados do NCBI. Os *primers* específicos foram desenhados para cada um dos inibidores, o *primer forward* contendo o sítio de restrição para *EcoRI*, e o *primer reverse* contendo o sítio de restrição para *SalI* (Apêndice 1).

3.2 Extração de RNA e DNA a partir de tecido vegetal

Para a extração de RNA total foram usados aproximadamente 200 mg de tecido de folhas jovens. Após macerar o material em cadinho e pistilo com nitrogênio líquido, o macerado foi transferido para tubos cônicos de 1,5 mL e as amostras foram tratadas com 500 µL TRIzol® Reagent (Life Technologies). A essa mistura foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e incubadas por 12 min a 25 °C. O material foi centrifugado por 5 min a 4 °C e 12000 x g e a fase aquosa foi transferida para outro tubo. Depois da transferência, realizou-se uma nova extração com clorofórmio (proporção 1:1). Em seguida, o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com adição de isopropanol gelado. Após incubar por

10 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 x g a 4 °C, o pellet foi lavado com etanol 75% gelado, seco em temperatura ambiente e, finalmente, ressuspendidas em água deionizada.

O RNA foi quantificado no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). As amostras com maior concentração passaram por um tratamento com DNase I RNase Free (Invitrogen), em uma reação contendo 1 U da enzima para cada 3 µg de RNA, incubando por 15 min à temperatura ambiente e inativando em seguida a 65 °C por 5 min. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA utilizando o kit Improm II Reverse Transcription System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, 600 ng de RNA por reação e 0,5 µM de Oligo dT em um volume final de 20 µl.

Depois de obter o *template* (cDNA) para amplificação com os *primers* específicos do To-PMEI, não foi possível conseguir uma amplificação. Devido às dificuldades em obter a amplificação do fragmento do gene To-PMEI, optamos por empregar DNA genômico como molde para a PCR. Da mesma maneira foi feito para os PMEIs de Kiwi e Uva.

Para a extração do DNA genômico de tomate, seguiu-se o protocolo com TRIzol® Reagent (Life Technologies). Após separar as três fases, a fase aquosa foi removida totalmente e continuou-se com o isolamento do DNA genômico. Foram adicionados 0,3 mL de etanol 100% para cada 1 mL de TRIzol®, as amostras foram incubadas por 3 minutos a 25 °C e o material foi centrifugado por 2000 x g por 5 min a 4 °C com o objetivo de precipitar o DNA. A fase contendo fenol-etanol foi removida. O DNA genômico foi lavado com 1 mL do tampão citrato de sódio/etanol (0,1M citrato de sódio em etanol 10%, pH 8,5) para cada 1 mL de TRIzol®. Depois de incubadas a 25 °C por 30 min, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, então as amostras secaram à temperatura ambiente e foram ressuspendidas em 0,3 mL de solução de Hidróxido de Sódio 8 mM, para 70 mg de tecido vegetal. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4 °C o sobrenadante foi transferido a um tubo novo.

Devido às características bioquímicas da uva e o kiwi, que contém grande quantidade de polifenóis, optou-se por usar o método CTAB para extração de DNA genômico (TIWARI; JADHAV; GUPTA, 2012). Após macerar aproximadamente 500 mg de folhas no pilão, adicionou-se o tampão de extração contendo o CTAB e essa mistura foi vertida em um tubo. Então, foram adicionados 10 mg polivinilpirrolidona (PVP) e homogeneizou-se a mistura virando o tubo repetidas vezes. Depois de incubadas as amostras 25 min a 60 °C e esfriado a temperatura ambiente, adicionou-se 1,2 mL de solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1) e a mistura

centrifugou-se a 4000 x g por 15 min à temperatura ambiente. Após transferir a fase aquosa a um tubo novo e de adicionar 2 volumes de isopropanol, as amostras foram incubadas por 20 min a 4 °C. Posteriormente foram feitas duas centrifugações, sendo a primeira a 1000 x g por 3 min, e a segunda a 2800 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 75% e deixado secar a 37 °C. O DNA genômico foi ressuscitado em 200 µL de Buffer TE (Tris:EDTA). O DNA foi quantificado no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e as amostras foram conservadas a -20 °C.

3.3 Construção dos vetores de expressão

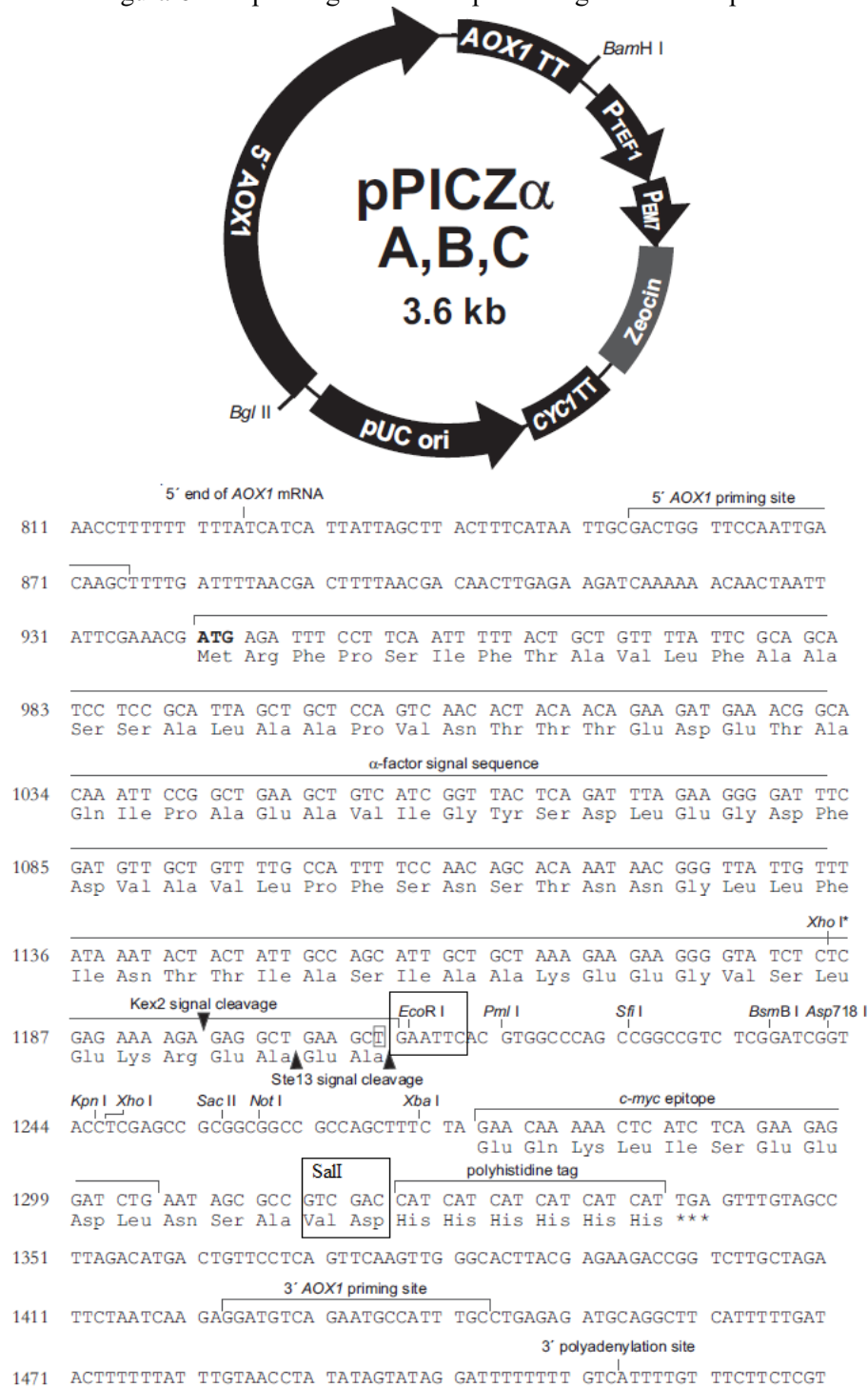
As ORFs foram amplificadas por PCR (reação em cadeia da polimerase). Excluindo as regiões do peptídeo sinal, eles não fazem parte da proteína final. Foram desenhados *primers* específicos contendo sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI* (Apêndice 1). Os sítios de restrição correspondem aos mesmos dos vetores de expressão pPicZ α -A e pGapZ α -A, e direcionam a inserção das ORFs de modo a mantê-las em fase com a sequência do peptídeo sinal Fator Alfa e da cauda de histidina (Figuras 6 e 7).

A PCR foi realizada utilizando 80 ng de DNA molde (DNA genômico); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1x PCR *buffer*; 1,5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific); 0,4 µM de *primer reverse*; 0,4 µM de *primer forward*; 1 U de Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific) e água deionizada para completar um volume final de 25 µL.

A ciclagem utilizada nas reações foi 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C. A temperatura de hibridização foi diferente para cada um dos PMEI (50°C Cane-PMEI, 45°C To-PMEI, 59°C Vitis-PMEI e 44°C Kw-PMEI) por 1 min, com uma etapa final de extensão de 4 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo. As bandas correspondentes à massa molecular esperada foram recortadas e purificadas com o kit Clean-up System (Promega). Os *amplicons* e os plasmídeos de expressão tratados com as enzimas de restrição. Foram ligadas, contendo aproximadamente 125 ng do vetor, e 625 ng de inserto (proporção de inserto/vetor 5:1), tampão da ligase 1 X e 1 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) para um volume final de 20 µl a qual foi incubada a 4 °C por 16 h.

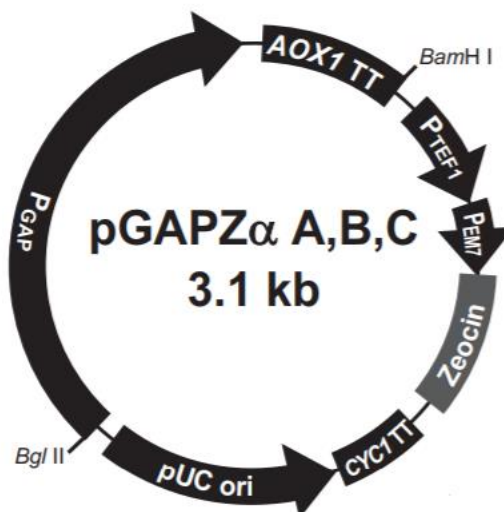
As ORFs dos PMEI foram clonadas em pPicZ α -A e pGapZ α -A e mostradas no Apêndice 2. As células de *Escherichia coli* linhagem DH5 α , cloreto de cálcio competentes foram transformadas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Para a transformação foram adicionados 10 μ L das ligações a 200 μ L de célula competente, que foram deixadas em gelo por 5 min, seguido de incubação a 42 °C por 90 s e 1 min em gelo. Posteriormente adicionou-se 800 μ L de meio LB-Broth líquido *low salt* e incubou-se a 37 °C de 45-60 min. Foram usados 100 μ L da mistura para inocular placas contendo 15 mL de meio Luria-Bertani (LB) Broth Ágar *low salt* e 25 μ g/mL de antibiótico Zeocina (Invitrogen).

As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C e as colônias isoladas foram analisadas por PCR, confirmando assim a presença das ORF alvo no vetor de expressão. Essas colônias foram multiplicadas em 5 mL de meio LB-Broth líquido *low salt*. Com o DNA plasmídial extraído foi possível sequenciar as ORFs, utilizando os *primers* universais 3'AOX1 *reverse* (GCAAATGGCATTCTGACATCC) e Fator Alfa *forward* (TACTATTGCCAGCATTGCTGC), capazes de hibridizar com o plasmídeo nas regiões flanqueadoras do fragmento de interesse. Foi utilizado para sequenciar o kit DYEnamic ET DyeTerminator MEGABace 1000 Flexyble DNA sequencer (GE Healthcare). A reação de sequenciamento, consistiu em 100 ng de DNA, 0,5 pmol de *primers*, 4 μ l do MIX do kit e água deionizada para totalizar um volume de 10 μ l. Após sua obtenção, a sequência foi submetida à clusterização via software BioEdit (HALL, 1999), resultando a sequência completa do gene em questão.

Figura 6 - Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPicZ α -A

Os retângulos pretos indicam os sítios de restrição das enzimas EcoRI e SalI, utilizadas na clonagem.

Fonte: Adaptado de: Easysselect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen).

Figura 7 - Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pGapZ α -A

```

361 GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATA AAAGGCGAAC ACCTTTCCCA ATTTTGGTTT
                                     pGAP forward priming site
421 CTCCTGACCC AAAGACTTTA AATTTAATTT ATTTGTCCCT ATTTCATCA ATTGAACAAC
481 TATTCGAAA CG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA
    Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala
532 GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG
    Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr
                                     α-factor signal sequence
583 GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
    Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp
634 TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG
    Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
685 TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT
    Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
736 CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA GCT GAA GCT GAA GCT GAA GCT GAA GCT
    Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala
    Xho I* Kex2 signal cleavage EcoRI Pml I Sfi I
                                     Ste13 signal cleavage
793 GGTACCTCGA GCCGCGGCGG CCGCCAGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
    Asp718 | Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I myc epitope
    Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
851 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGC CTTA
    Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
                                     polyhistidine tag
905 GACATGACTG TTCCTCAGTT CAAGTTGGGC ACTTACGAGA AGACCGGTCT TGCTAGATTC TAAT
                                     3' AOX1 priming site
969 CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCATT TTT GATACTTTT TATT
1033 TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTTTTTG TCATTTTGT TCTTCTCG

```

Os retângulos pretos indicam os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *SalI*, utilizadas na clonagem.

Fonte: Adaptado de: Easysselect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen).

3.4 Análises *in silico*

As sequências codificantes para os PMEIs foram traduzidas em sequências de aminoácidos. Depois, foram avaliadas quanto à massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico (pI). Além disso, verificou-se as regiões conservadas nas estruturas primárias dos inibidores baseando-se em trabalhos sobre estrutura de PMEIs. Realizou-se o alinhamento múltiplo das sequências dos 4 PMEIs, sem o peptídeo sinal, utilizando o software Multalin online (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (CORPET, 1988).

3.5 Expressão das proteínas na levedura *Pichia pastoris*

3.5.1 Obtenção das leveduras *Pichia pastoris* recombinantes

Foram produzidas células competentes da cepa KM71H segundo o manual EasySelect™ *Pichia* Expression kit (Invitrogen). A transformação das células competentes foi realizada a partir do vetor pPicZ α -A ou pGapZ α -A recombinante (Apêndice 2), previamente linearizado com a enzima de restrição *SacI* (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. Deste modo, aproximadamente 500 ng de vetor linearizado foram adicionados a 40 μ L de células competentes, após a homogeneização, as células foram incubadas em gelo por 5 min. Em seguida, as células foram eletroporadas em cubetas de 0,2 cm a 1,5 Kv, 25 μ F e 200 Ω . Adicionou-se 1 mL de sorbitol 1M, após transferir a um tubo cônico de 15 mL novo, foi incubado por 2 h a 30 °C sem agitação. Posteriormente inoculou-se as células crescidas em placas de Petri contendo meio YEPDS acrescidos de 100 μ g/mL, 250 μ g/mL e 500 μ g/mL de Zeocina (Invitrogen).

Colônias isoladas foram homogeneizadas em 20 μ L de solução SDS 0,2 % e aquecidas por 3 min a 90 °C. Conduziu-se uma PCR de colônia com 1 μ L da solução fervida como DNA molde e 0,1% de Triton X-100 (20%) acrescidos na reação final. O resultado da PCR foi analisado em gel de agarose 1 %, foram obtidas colônias recombinantes positivas para todos os PMEIs, em pPicZ α -A e pGapZ α -A, exceto para o To-PMEI que somente foi conseguida a clonagem no vetor pGapZ α -A, em seguida, as colônias positivas por PCR foram selecionadas para expressarem os PMEIs recombinantes.

3.5.2 Produção e purificação dos inibidores proteicos recombinantes

Para cada um dos inibidores foi escolhida uma colônia recombinante com base na PCR de colônia, para a produção da proteína recombinante em maior escala. Para a expressão dos PMEI de cana-de-açúcar, uva e kiwi com o vetor pPicZ α -A, foi feito um inóculo em 5 mL de meio BMGY por 24 h a 250 rpm 30 °C. Então, foram usados 5 mL para inocular 250 mL de meio BMGY, que foi incubado por 24 h a 250 rpm 30 °C. Após este período, realizou-se a precipitação das células por centrifugação a 1500 x g, 5 min, 4°C, e ressuspensão do precipitado em 100 mL BMMY. A cultura foi incubada por 120 h, 250 rpm a 30 °C. A cada 24h, foi adicionado metanol absoluto ao meio de modo que a sua concentração final fosse de 0,75%. Ao final de 120 h, o meio foi centrifugado a 3000 x g, 5 min, 4 °C, filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (Milipore) e as proteínas expressas foram purificadas.

A SI-invertase e SI-PME do *S. levis* foram expressas no Laboratório de Biologia Molecular, seguindo as condições padronizadas previamente (EVANGELISTA et al., 2014; PEDEZZI et al., 2014). A expressão da SI-invertase realizou-se em meio de cultura BMGY e BMMY. Posteriormente, foi feita a purificação e quantificação da atividade da SI-invertase como também já descrita (PEDEZZI et al., 2014).

Para a expressão no vetor pGapZ α -A do PMEI de tomate, foi feito um inóculo em 10 mL de meio YEPD por 24 h a 250 rpm 30°C. Após, foram inoculados 400 μ L para inocular 200 mL de meio YEPD, que foi incubado por 96 h a 250 rpm 30 °C. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação a 3000 x g, 5 min, 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (Milipore) e a proteína purificada.

A purificação por cromatografia de afinidade foi realizada usando coluna com 5 mL de resina Ni-NTA *Superflow* (Qiagen). Para a eluição e coleta das proteínas, após aplicação do sobrenadante já filtrado, a coluna foi lavada com 2 volumes de tampão de lise (50 mM Na₂PO₄; 100 mM NaCl) com concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). Após a coleta, as amostras foram analisadas em SDS-PAGE 15% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As frações que apresentaram maiores concentrações de proteína pura foram reunidas e dialisadas.

A diálise foi realizada via membranas de diálise SnakeSkin (PIERCE 3,500 MWCO) em tampão PBS (Tampão fosfato-salino) (1,5 M NaCl, 30 mM KCl; 80 mM Na₂PO₄; 20 mM KH₂PO₄,

pH 7,4) em uma proporção proteína/tampão de 1:1000 (V/V). O processo foi realizado em agitador magnético, sob leve agitação a 4 °C. As proteínas foram filtradas em membrana 0,22 (Milipore) sob condições assépticas e armazenadas em tubos falcon de 15 mL a 4 °C. A quantificação das proteínas foi feita por kit BCA (Thermo Scientific), seguindo instruções do fabricante.

3.6 Estudo de interação entre a SI-PME e o inibidor proteico PMEI

Para verificar se havia formação do complexo PME-PMEI, realizou-se um experimento que permitiria comprovar a interação entre as duas proteínas. Foi desenhado o *primer reverse* para o Cane-PMEI com *stop* códon, para produzir o PMEI sem cauda de histidinas (plasmídeo construído pela doutoranda Adelita Carolina Santiago). Para promover a interação entre a SI-PME e o Cane-PMEI, foram feitas duas reações, na primeira usou-se 100 µg de SI-PME (70 µL), 200 µg de PMEI (170 µL) e 60 µL de tampão de lise sem imidazol para um volume final de 300 µL; na segunda reação usou-se 300 µg de SI-PME (210 µL), 600 µg de PMEI (510 µL) e 180 µL de tampão de lise sem imidazol em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente foram adicionados 50 µl de resina de níquel em cada tubo e as amostras foram homogeneizadas e seguiram para incubação por 2 h a 4 °C sob agitação leve. Coletou-se o sobrenadante depois de centrifugar a 72 x g, por 60 min, 4 °C. A resina foi lavada duas vezes com buffer de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol), centrifugada por 10 s a 1000 x g e as lavagens foram coletadas. Adicionou-se 100 µL de buffer de eluição (50 Mm NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol), em seguida, centrifugou-se a 1000 x g por 10 s e coletou-se o eluato. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 15% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.7 Atividade inibitória

3.7.1 Atividade da SI-PME e teste de inibição por PMEI

A atividade da SI-PME foi medida pelo ensaio gel difusão ágar descrito por Downie et al., (1998) com algumas modificações. Preparou-se um gel com pectina de citrus >85% de esterificação a 0,5% (m/v) (P9561-5G, Sigma), agarose 2% (m/v), 12,5 mM de ácido cítrico, e 50 mM de Na₂HPO₄, em dois pH diferentes: 5,0 e 6,0. Após aquecer até dissolver, transferiu-se para uma placa de Petri de 150 mm (60 mL por placa), e deixou-se polimerizar à temperatura ambiente. Foram feitos 24 poços de 2 mm de diâmetro. Em seguida, carregaram-se os poços com cada amostra: controle positivo SI-PME (2 µg), triplicata para cada uma das 4 PMEI (5 µg) com SI-PME (2 µg) completando um volume final de 10 µL, e controles negativos (H₂O). Após incubar por 16 h a 30 °C o gel lavou-se com água estéril, e em seguida, foi corado com 0,05% de vermelho de

rutênio (Sigma) por 45 min. Depois, foi descorado com água deionizada, e os diâmetros foram medidos no software ImageJ 1.51k (RASBAND, 2012). A análise realizada para o teste estatístico foi a de variância (ANOVA) fator duplo com o teste de Sidak. O teste foi aplicado aos dados experimentais diâmetros em mm usando o software GraphPad Prism 6.0 (MILLER, 2003).

3.7.2 Ensaio de atividade da SI-invertase e teste de inibição pelos PMEIs

Para o ensaio de atividade da SI-invertase, foi usado 1 µg de SI-invertase, solução de Sacarose, e tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6), completa com água deionizada para um volume final de 50 µL e o controle negativo foi feito sem adição da enzima. Após incubar a reação por 10 min à temperatura ambiente foram adicionados 100 µL de DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico), reagente que permite detectar açúcares redutores, ou seja, de extremidades redutoras resultantes pela ação da enzima (MILLER, 1959), as amostras foram incubadas por 10 min a 90 °C, e as absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro 5100 Hitachi após as amostras se esfriarem.

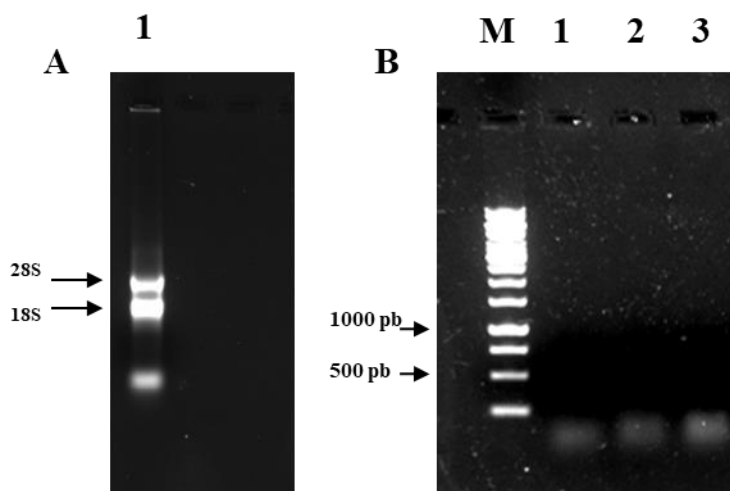
No teste de inibição foram usadas 4 concentrações dos PMEIs (3, 6, 9 e 12 µg) (em triplicata), 1 µg da SI-invertase, solução de Sacarose 100 mM (pH 6,0), tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6), completando um volume final de 50 µL para cada reação. Comparou-se o resultado do controle positivo (SI-invertase), com os PMEIs de diferentes concentrações, foi feito um controle negativo por cada PMEI. Primeiro, realizou-se uma pré-incubação da SI-invertase-PMEI, e o tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0), por 10 min à temperatura ambiente, então, adicionou-se o substrato Sacarose 100 mM (pH 6,0), e deixou-se 10 min incubando, em seguida, adicionou-se 100 µL de DNS, e incubou-se por 10 min a 90 °C. Após as amostras esfriar foram diluídas com 900 µL de água deionizada para fazer a leitura nas cubetas, e as absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro. A análise realizada para o teste estatístico foi a de variância (ANOVA) fator duplo com o teste de Dunnett's. O teste foi aplicado aos dados experimentais absorvâncias usando o software GraphPad Prism 6.0 (MILLER, 2003).

4 RESULTADOS

4.1 Extração de RNA e DNA a partir de tecido vegetal

O RNA total de tomate (Figura 8A) foi usado como molde para a síntese de cDNA por RT-PCR e o produto desta reação foi subsequentemente usado como molde para reação de PCR com *primers* específicos para o To-PMEI. Não foi conseguida a amplificação do gene To-PMEI (Figura 8B). Por essa razão, se tomou a decisão de fazer extração do DNA genômico de tomate e utilizá-lo como molde. Além disso, isso possibilitaria saber se os *primers* estavam funcionando e também se havia introns no gene do PMEI.

Figura 8 - RNA de tomate e PCR para amplificação do To-PMEI



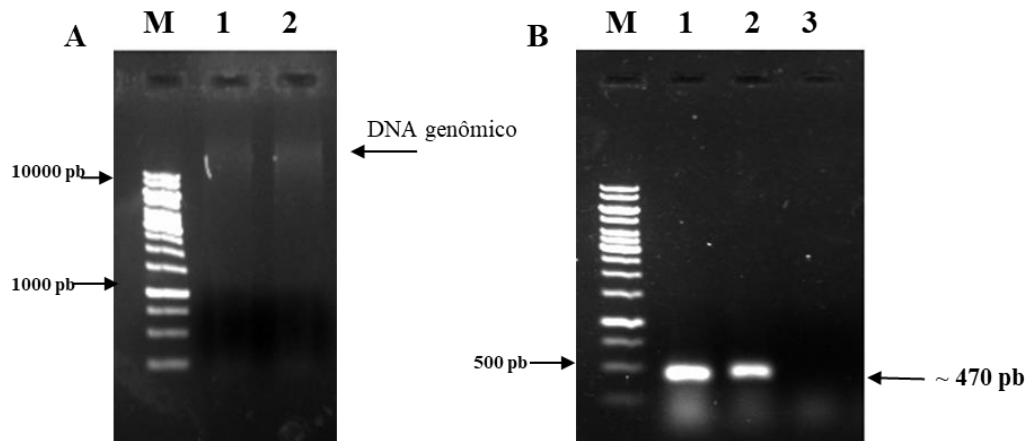
A: RNA de tomate; 1: Subunidades ribossomais maior 28S e menor 18S.

B: PCR de cDNA com *primers* específicos do gene To-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1 e 2: amplificação negativa do gene To-PMEI; 3: controle negativo da reação, reação sem cDNA.

Fonte: Elaborada pelo autor

A extração de DNA de tomate foi bem-sucedida pelo método de TRIzol® Reagent. Esse DNA foi quantificado e usado como molde para o PCR To-PMEI. A Figura 9 mostra o DNA genômico, e a amplificação do gene To-PMEI com um tamanho molecular de 459 pb.

Figura 9 - DNA de tomate e amplificação do To-PMEI



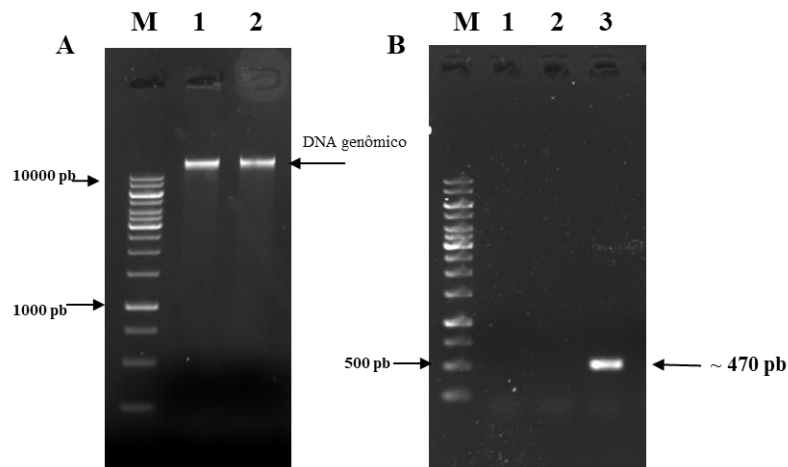
A: DNA genômico de tomate; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1 e 2: extrações positivas para o DNA genômico de tomate.

B: PCR To-PMEI usando DNA como molde para a reação; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1 e 2: ampliações positivas do To-PMEI, com tamanho próximo de 500 pb; 3: controle negativo de reação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Também foram feitas as extrações de DNA genômico de kiwi e uva. As amostras de DNA foram quantificadas e usadas como molde para amplificar os genes de interesse, sendo que Kw-PMEI possui 459 pb, e Vitis-PMEI possui 473 pb. As Figuras 10 e 11 mostram o DNA genômico, e amplificação dos fragmentos para esses PMEIs.

Figura 10 - DNA de kiwi e amplificação do Kw-PMEI

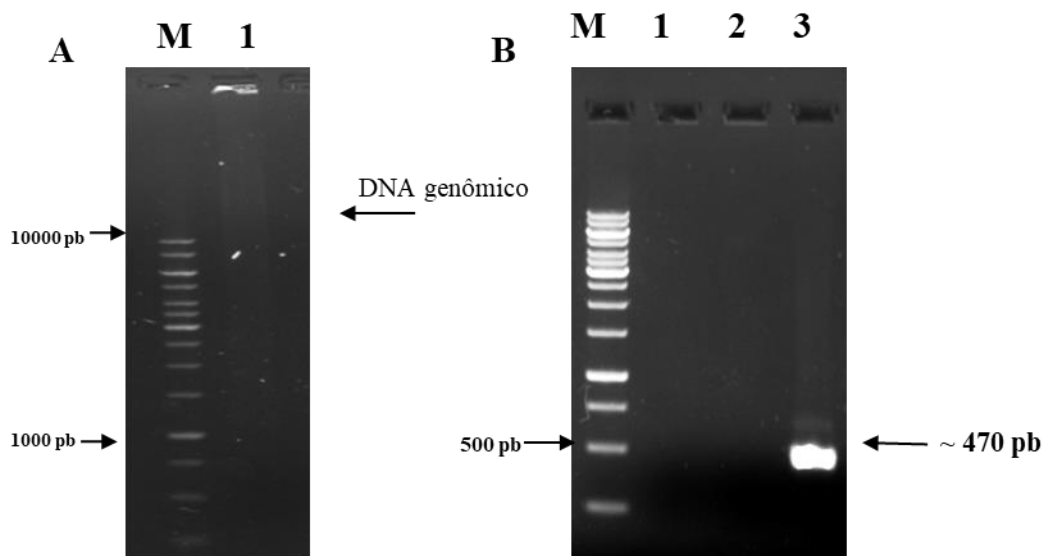


A: DNA genômico de kiwi; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1 e 2: extrações positivas para o DNA genômico de kiwi.

B: PCR Kw-PMEI usando DNA como molde para a reação; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2: não amplificou; 3: amplificação positiva para o Kw-PMEI, com tamanho próximo de 500 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 11 - DNA de uva e amplificação do Vitis-PMEI

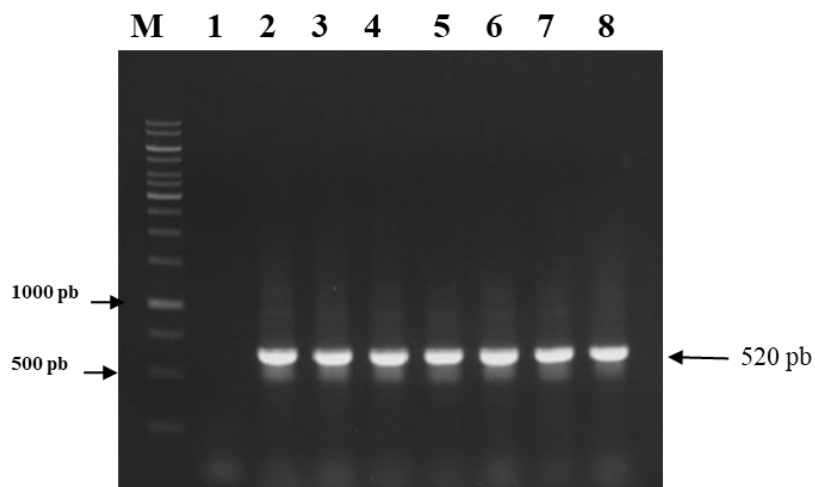


A: DNA genômico de uva; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: extração positiva para o DNA genômico de uva; 2: extração negativa.

B. PCR Vitis-PMEI usando DNA como molde para a reação; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2: amplificação negativa; 3: amplificação positiva para o Vitis-PMEI, com tamanho próximo de 500 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir do clone de *Sacharum hybrid*, conseguiu-se amplificação do gene Cane-PMEI. Obtendo um fragmento aproximado de 520 pb (Figura 12).

Figura 12 - Amplificação do Cane-PMEI do clone de *Sacharum hybrid*

M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2-8: amplificação positiva para o Cane-PMEI, com tamanho maior de 500 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Sequenciamento dos clones PMEI

Após o sequenciamento dos clones dos genes PMEI em seus plasmídeos de expressão pPicZ α -A, e para o PMEI de tomate em pGapZ α -A, confirmou-se a correta ligação dos insertos em fase nos vetores e também as suas seqüências completas (Figuras 13-16), as quais foram idênticas àquelas depositadas em bancos de dados (i.e. [AGT16658.1] Cane-PMEI, [XM_010328327.1] To-PMEI, [XM_010662021.1] Vitis-PMEI, [AB091088.1] Kw-PMEI).

Figura 13 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do Cane-PMEI

```

1 ATGAGATTTCCTTCA ATTTTACTGCTGTT TTATTTCGCAGCATCC TCCGCATTAGCTGCT CCAGTCAACACTACA
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
76 ACAGAAGATGAAACG GCACAAATCCGGCT GAAGCTGTCATCGGT TACTCAGATTTAGAA GGGGATTCGATGTT
26 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V
151 GCTGTTTTGCCATTT TCCAACAGCACAAAT AACGGGTATTGTTTT ATAAATACTACTATT GCCAGCATTGCTGCT
51 A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A
226 AAAGAAGAAGGGGTA TCTCTCGAGAAAAGA GAGGCTGAAGCTGAA TTCGAGCCAGCAGAG ATTCCTTGCGCATTG
76 K E E G V S L E K R E A E A E F E P A E I P C A L
301 CCTGCTTGTAAGACC GTAGGTGGAGGATCA CAATTCTTTGACGTT CAATTCTGTTTGGCA GCCCTTGGATCAGAT
101 P A C K T V G G G S Q F F D V Q F C L A A L G S D
376 GGTAGATCCATTAAC CACTGCATGGATTAC CAGGCATACTCTGTT ATCGCCACAGATTTG CTGGCAGCCAATGTA
126 G R S I N H C M D Y Q A Y S V I A T D L L A A N V
451 ACTGCTACTGCTGCT AAGATTGATGGATTG TTGAGAGAATCAGCT TCAGGTGGATCAAGA GACGATGGTGGAGTT
151 T A T A A K I D G L L R E S A S G G S R D D G G V
526 GATGAAGCAACAAC TGTGTTTGAGAAGT TGCCAAGACTTGAC GGAGGTACAGTGCCT AGACAACCTGATTGC
176 D E A T T R C L R S C Q D L Y G G T V R R Q P D C
601 GTGGCTGCAGTTAGA GGAGTTCGTAAGGGT GAAGCTACAAGATGT TTGGAAGAGGCTGCT GTTGCTGCCAAGCAG
201 V A A V R G V R K G E A T R C L E E A A V A A K Q
676 TGTGAAGACGGATTC AGATCAAGTAAGGCA GCTTCACCTGTTACT GCAGAGAATCAGAAC GCCTTCATGTAGCT
226 C E D G F R S S K A A S P V T A E N Q N A F M L A
751 AAGTTGGCTGTAGCT TTGCTGGGTGAGGTA TACACAAACAAGGTC GACCATCATCATCAT CATCATTGA
251 K L A V A L L G E V Y T N K V D H H H H H H

```

A região referente ao gene PMEI encontra-se destacada em cinza. Sublinhadas duplamente encontram-se as seqüências das enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*; sublinhado encontram-se a cauda de histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 14 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do To-PMEI

```

1 ATGAGATTTCTTCA ATTTTACTGCTGTT TTATTTCGCAGCATCC TCCGCATTAGCTGCT CCAGTCAACACTACA
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
76 ACAGAAGATGAAACG GCACAAATCCGGCT GAAGCTGTCATCGGT TACTCAGATTTAGAA GGGGATTTGCATGTT
26 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V
151 GCTGTTTTGCCATTT TCCAACAGCACAAAT AACGGGTTATTGTTT ATAAATACTACTATT GCCAGCATTGCTGCT
51 A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A
226 AAAGAAGAAGGGGTA TCTCTCGAGAAAAGA GAGGCTGAAGCTGAA TTCGATCTTATAAAT GATGTTTGCTCAAAA
76 K E E G V S L E K R E A E A E F D L I N D V C S K
301 ACACAAAAACCCGCC ACATGTTTATCAGCT CTAAAAGGGGATTCT CGATCTAGAGGTGCA AATCTTGAAGGCCTT
101 T Q K P A T C L S A L K G D S R S R G A N L E G L
376 GCGACTATCTCAATA GACATATCGCTAAAG AACATGCAGTCCACG CATGATCTTGTGAT ACATTGCTTAAACAG
126 A T I S I D I S L K N M Q S T H D L V D T L L K Q
451 GCTACAGATCCAAAA CTAAAGACACGATAT AGTTCGTGTTTGAG AATTACAATGACGGT ATTGATGATCTTAGA
151 A T D P K L K T R Y S S C L E N Y N D G I D D L R
526 GGATTGCCCTGGTTTT TTAAAATCTAAAGAC TATGCTGGTTTGAAT ATTCATGCATCTGCT GCTTTCGATCTTCT
176 G L P G F L K S K D Y A G L N I H A S A A F D D S
601 TCTACGTGTGATGAT AATTTTTTCAGATCCA CCTGCTGAACCCACC CAATTGAAAGCTGCT AGTGACAAGCTTCAA
201 S T C D D N F S D P P A E P P Q L K A A S D K L Q
676 GGACTTATTGATATA ATTTTGGTTATTAGC AATCTACTAAAAGGA AATAATACTATAGTC GACCATCATCATCAT
226 G L I D I I L V I S N L L K G N N T I V D H H H H
751 CATCATTGA
251 H H

```

A região referente ao gene PME1 encontra-se destacada em cinza. Sublinhadas duplamente encontram-se as sequências das enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*; sublinhado encontram-se a cauda de histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 15 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do Vitis-PME1

```

1 ATGAGATTTCTTCA ATTTTACTGCTGTT TTATTTCGCAGCATCC TCCGCATTAGCTGCT CCAGTCAACACTACA
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
76 ACAGAAGATGAAACG GCACAAATCCGGCT GAAGCTGTCATCGGT TACTCAGATTTAGAA GGGGATTTGCATGTT
26 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V
151 GCTGTTTTGCCATTT TCCAACAGCACAAAT AACGGGTTATTGTTT ATAAATACTACTATT GCCAGCATTGCTGCT
51 A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A
226 AAAGAAGAAGGGGTA TCTCTCGAGAAAAGA GAGGCTGAAGCTGAA TTCAGGCCAAGCGTG AAGATCGCAAACAAT
76 K E E G V S L E K R E A E A E F R P S V K I A N N
301 GAGTTGACTGAGATT TGTCCACAACCTCAA GATCCTTCGTTTGT GTTCAAGCTTTGAAG TCTGATCCTGCACT
101 E L T E I C S T T Q D P S F C V Q A L K S D P R T
376 GCCAACGCTGACCTC AAAGGCCTGGCCCAA ATCTCTATCGACTTG GCCAAGGCCAGTGCT AAAAAACCACTACT
126 A N A D L K G L A Q I S I D L A K A S A T K T T T
451 TTGATCACCTCTCTG GTGAAAAAGCCAAT GATCCTAAGCTTAAA GGACGCTATGAAACG TGTGCAGAAAACCTAT
151 L I T S L V E K A N D P K L K G R Y E T C A E N Y
526 GATGATTCCATAAGT TCATTGGATGATTGT ACTCAATCTGTGCT TCTAGAGACTATGTT AGTTTGAATTTCAA
176 D D S I S S L D D C T Q S V S S R D Y V S L N F Q
601 GCGTCTGCTGCCATG GATGGACCTGTGACA TGCTTAGATAGCTTT GAAGGACCACCAAAG GACCCATCTGAACTG
201 A S A A M D G P V T C L D S F E G P P K D P S E L
676 CCTACCAAGTCTGAA GATTTAATACATCTT TGTAGCATCATTTTG GCTATCTCTAAGCGT TTGATAGGAGTCGAC
226 P T K S E D L I H L C S I I L A I S K R L I G V D
751 CATCATCATCATCAT CATGTA
251 H H H H H H

```

A região referente ao gene PME1 encontra-se destacada em cinza. Sublinhadas duplamente encontram-se as sequências das enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*; sublinhado encontram-se a cauda de histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 16 - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do Kw-PMEI

```

1 ATGAGATTTCCCTTCA ATTTTTACTGCTGTT TTATTTCGCAGCATCC TCCGCATTAGCTGCT CCAGTCAACACTACA
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
76 ACAGAAGATGAAACG GCACAAATCCGGCT GAAGCTGTCATCGGT TACTCAGATTTAGAA GGGGATTTCCGATGTT
76 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V
26 GCTGTTTTGCCATTT TCCAACAGCACAAAT AACGGGTTATTGTTT ATAAATACTACTATT GCCAGCATTGCTGCT
151 A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A
51 AAAGAAGAAGGGGTA TCTCTCGAGAAAAGA GAGGCTGAAGCTGAA TTCGAAAACCATTG ATTAGCGAAATCTGT
226 K E E G V S L E K R E A E A E F E N H L I S E I C
76 CCCCCAACTCGCAAT CCTTCTCTGTGCCTG CAGGCTTTAGAAATCC GATCCTCGCTCAGCT AGTAAAGATCTTAAA
301 P K T R N P S L C L Q A L E S D P R S A S K D L K
101 GGCCTTGCCAGTTC TCTATCGACATAGCT CAGGCCAGTGCTAAA CAAACCTCCAAAATC ATTGCCTCGCTTACA
376 G L G Q F S I D I A Q A S A K Q T S K I I A S L T
126 AACCAAGCAACTGAC CCTAAACTCAAAGGT CGATACGAGACTTGC TCAGAAAATTATGCT GATGCGATCGATAGC
451 N Q A T D P K L K G R Y E T C S E N Y A D A I D S
151 CTTGGACAAGCCAAG CAGTTTTTGACATCC GGAGACTATAATAGC CTAAACATTTACGCT TCCGCTGCCTTTGAT
526 L G Q A K Q F L T S G D Y N S L N I Y A S A A F D
176 GGGGCTGGAACCTTGT GAAGATAGTTTTGAA GGACCACCGAATATA CCAACTCAACTCCAC CAAGCAGATCTGAAG
601 G A G T C E D S F E G P P N I P T Q L H Q A D L K
201 TTGGAAGACCTTTGT GATATCGTCTCGTT ATATCTAATCTTTTG CCTGGATCAAAGTC GACCATCATCATCAT
676 L E D L C D I V L V I S N L L P G S K V D H H H H
226 CATCATTGA
751 H H
251

```

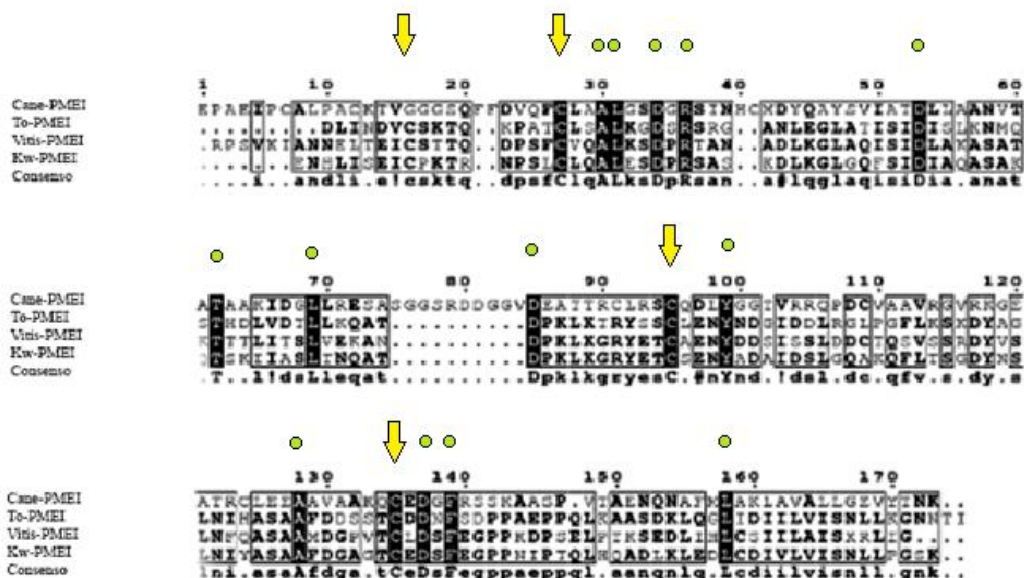
A região referente ao gene PMEI encontra-se destacada em cinza. Sublinhadas duplamente encontram-se as sequências das enzimas de restrição EcoRI e Sall; sublinhado encontram-se a cauda de histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3 Análises *in silico*

O alinhamento dos 4 PMEIs podem ser verificados na Figura 17, destacando-se com uma seta amarela em cima das sequências os 4 resíduos de cisteína que permanecem conservados na família desses inibidores, e com círculo verde os resíduos conservados alguns deles importantes a estabilidade do complexo PME-PMEI.

Figura 17 - Alinhamento múltiplo entre os PMEIs procedentes de plantas



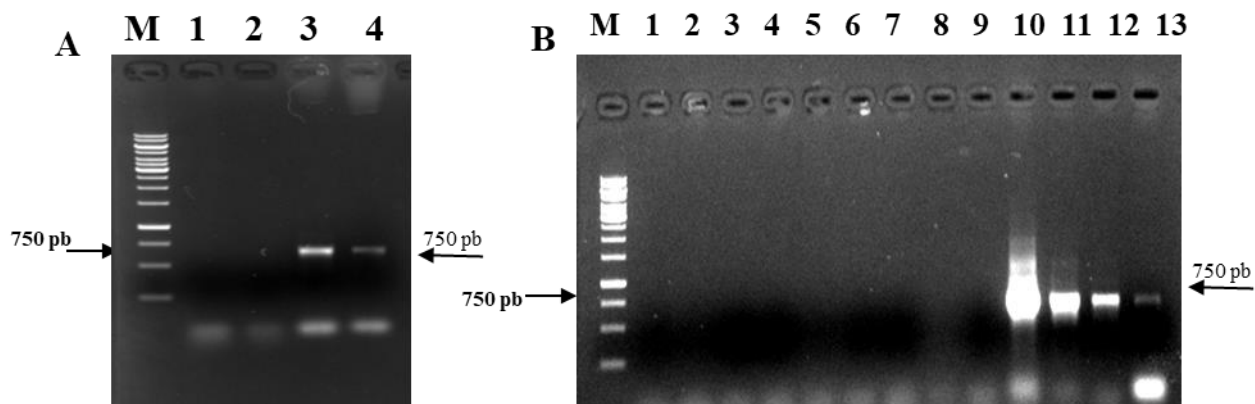
As seqüências de quatro PMEIs foram coletadas em banco de dados do NCBI para alinhamento no software online Multalin, com os parâmetros da matriz original. Em negrito e com um círculo verde se destacam os resíduos conservados entre os PMEIs. Os resíduos conservados de cisteína são indicados com uma seta amarela.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.4 Expressão heteróloga dos PMEIs

Após o sequenciamento dos clones recombinantes e confirmação da correta ligação do inserto em fase nos plasmídeos pPicZ α -A e pGapZ α -A (Apêndice 2), foi feita a linearização do vetor e posterior transformação em *Pichia pastoris*. As colônias foram visualizadas após 72 horas de crescimento em estufa a 30 °C e logo foram submetidas à PCR de colônia (Figuras 18-21) com o propósito de encontrar colônias recombinantes, os *primers* utilizados para essa reação foram o AOX 3' e o Fator Alfa. As colônias positivas apresentaram tamanho aproximado do *amplicon* a 650 pb.

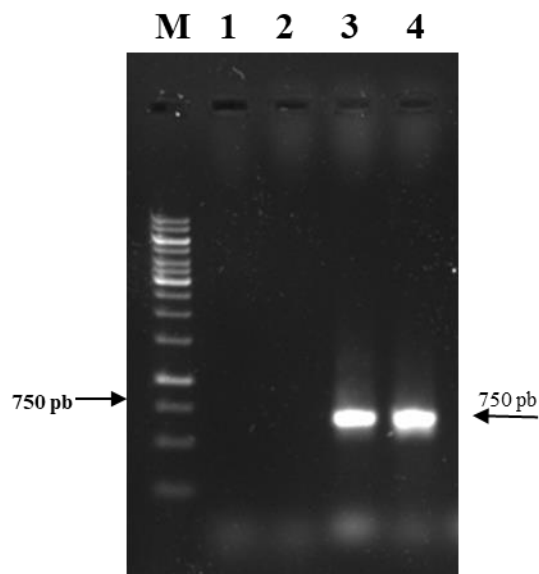
Figura 18 - Identificação de clones de *Pichia pastoris* transformados com Cane-PMEI



A: pGapZ α -A - Cane-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2: não amplificou; 3-4: ampliações positivas, com tamanho próximo de 750 pb.
 B. pPicZ α A-Cane-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2-9: ampliações negativas; 10-13: ampliações positivas, com tamanho próximo de 750 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

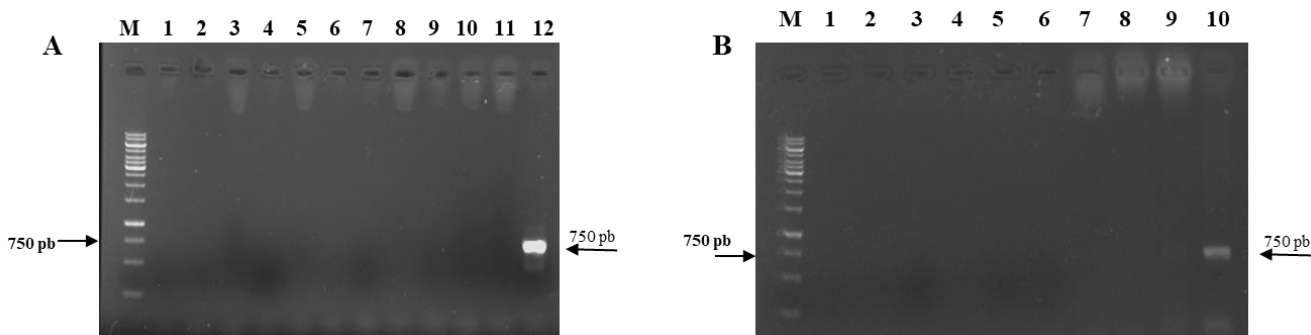
Figura 19 - Identificação de clones de *Pichia pastoris* transformados com pGapZ α -A-To-PMEI



M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2: não amplificou; 3-4: ampliações positivas, com tamanho próximo de 750 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 20 - Identificação de clones de *Pichia pastoris* transformados com Vitis-PMEI

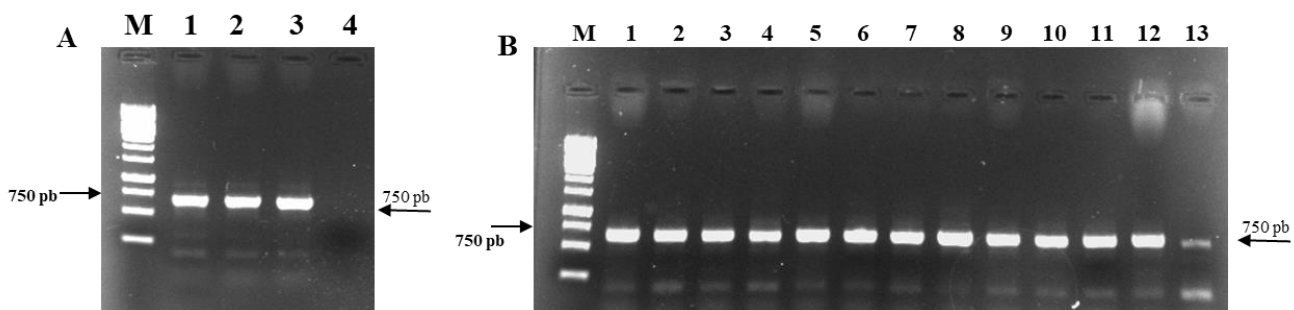


A: pGapZ α -A – Vitis-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2-11: ampliações negativas; 12: amplificação positiva, com tamanho próximo de 750 pb.

B. pPicZ α A – Vitis-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1: controle negativo de reação; 2-9: ampliações negativas; 10: amplificação positiva, com tamanho próximo de 750 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Identificação de clones de *Pichia pastoris* transformados com Kw-PMEI



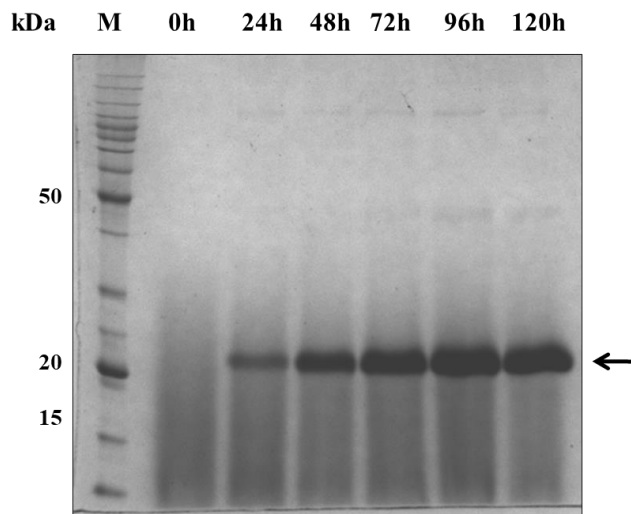
A: pGapZ α -A - Kw-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1-3: ampliações positivas, com tamanho próximo de 750 pb; 4: controle negativo de reação.

B. pPicZ α A-Kw-PMEI; M: marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific) 1 kb; 1-13: ampliações positivas, com tamanho próximo de 750 pb.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para os ensaios de expressão dos PMEIs, alíquotas foram retiradas a cada 24 h de indução, por 120 h de indução (com exceção do To-PMEI, que foi 96 h). A produção de cada PMEI é mostrada nas Figuras 22-25, relativa ao SDS-PAGE 15% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

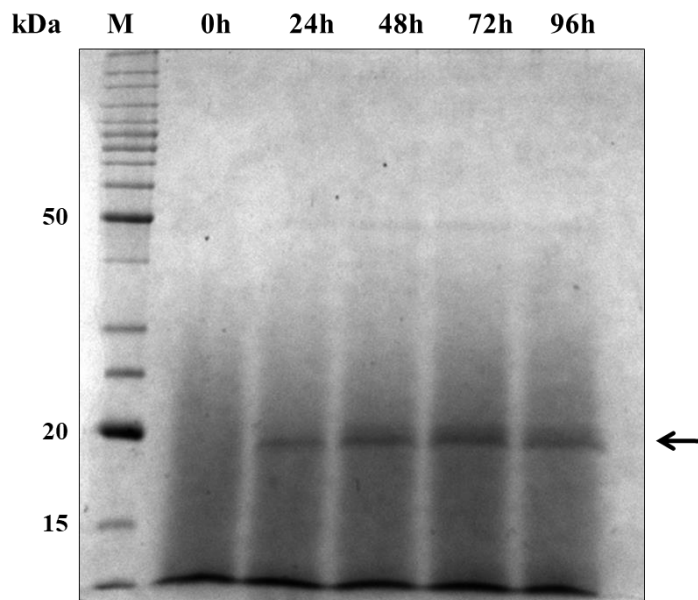
Figura 22 - Análise da pPicZ α -A-Cane-PMEI expressa em *P. pastoris*



A partir do meio de indução em que a levedura recombinante expressa o Cane-PMEI recombinante foram coletadas alíquotas, as quais foram analisadas em SDS-PAGE 15%. M: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen): 0-120 h: tempo de exposição ao metanol, o agente indutor, a seta indica a posição da proteína recombinante.

Fonte: Elaborada pelo autor

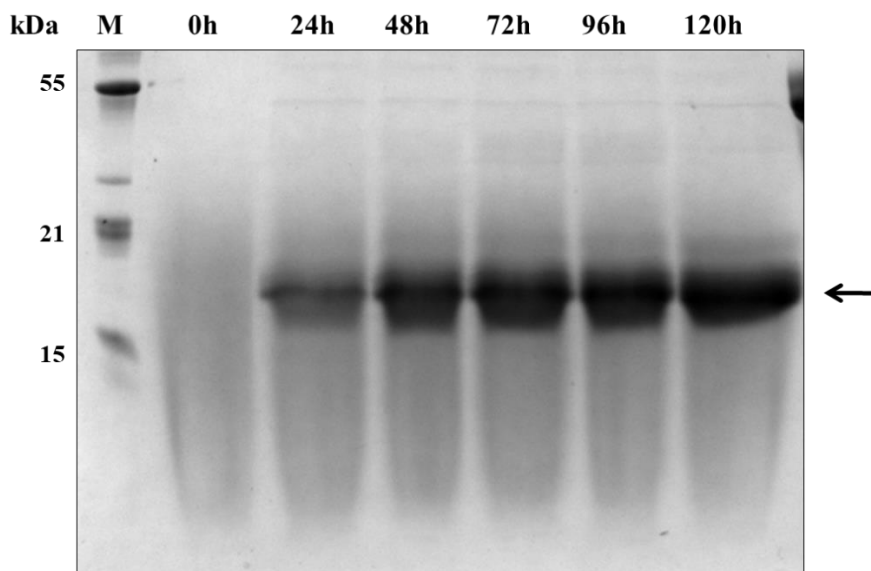
Figura 23 - Análise da pGapZ α -A-To-PMEI expressa em *P. pastoris*



A partir do meio de indução em que a levedura recombinante expressa o To-PMEI recombinante foram coletadas alíquotas, as quais foram analisadas em SDS-PAGE 15%. M: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen): 0-96h: tempo de expressão da proteína, a seta indica a posição da proteína recombinante.

Fonte: Elaborada pelo autor

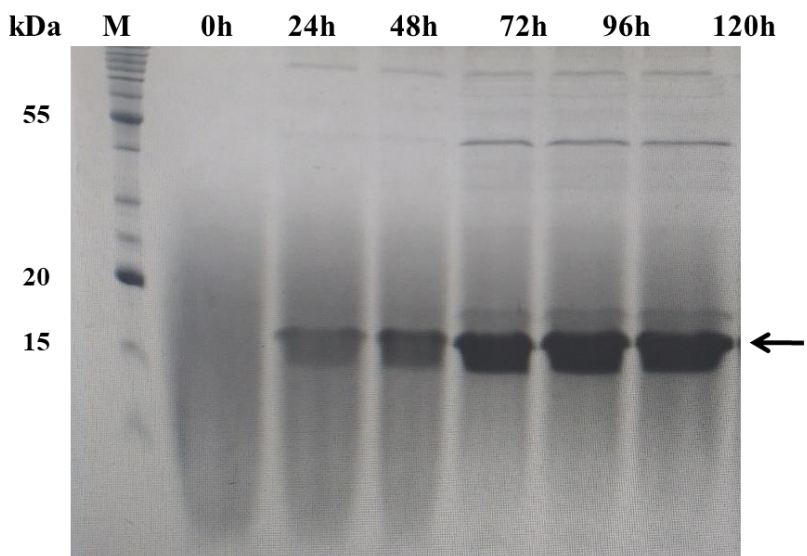
Figura 24 - Análise da pPicZ α -A-Vitis-PMEI expressa em *P. pastoris*



A partir do meio de indução em que a levedura recombinante expressa o Vitis-PMEI recombinante foram coletadas alíquotas, as quais foram analisadas em SDS-PAGE 15%. M: Ladder de proteína padronizado no LBM: tempo de exposição ao metanol, o agente indutor, a seta indica a posição da proteína recombinante.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 25 - Análise da pPicZ α -A-Kw-PMEI expressa em *P. pastoris*



A partir do meio de indução em que a levedura recombinante expressa o Kw-PMEI recombinante foram coletadas alíquotas, as quais foram analisadas em SDS-PAGE 15%. M Ladder de proteína padronizado no LBM: tempo de exposição ao metanol, o agente indutor, a seta indica a posição da proteína recombinante.

Fonte: Elaborada pelo autor

A análise da expressão revelou a banda correspondente a cada inibidor proteico já depois de 24 h, e o tempo escolhido para cada clone foi de 120 h. Os inibidores possuem massa molecular teórica esperada, como mostrado na Tabela 1.

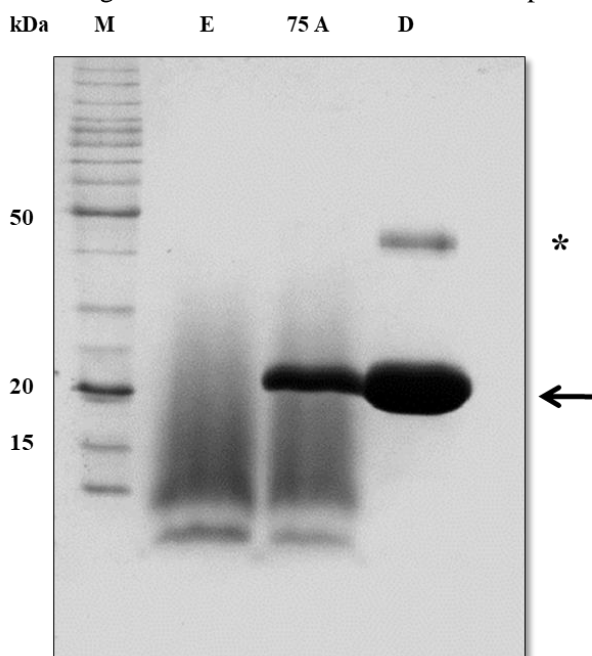
Tabela 1 - Ponto isoelétrico e massa molecular esperada para os PMEIs.

Inibidor proteico	Ponto isoelétrico	kDa
Cane-PMEI	5,57	21,3
To-PMEI	6,16	19,5
Vitis-PMEI	6,03	20
Kw-PMEI	5,51	17,5

Fonte: Elaborada pelo autor

A purificação dos inibidores de PME foi realizada por cromatografia de afinidade. As Figuras 26-29 mostram as frações de purificação. A partir da quantificação das proteínas dialisadas realizou-se o cálculo de rendimento de proteína obtida por litro de cultura de indução (Tabela 2).

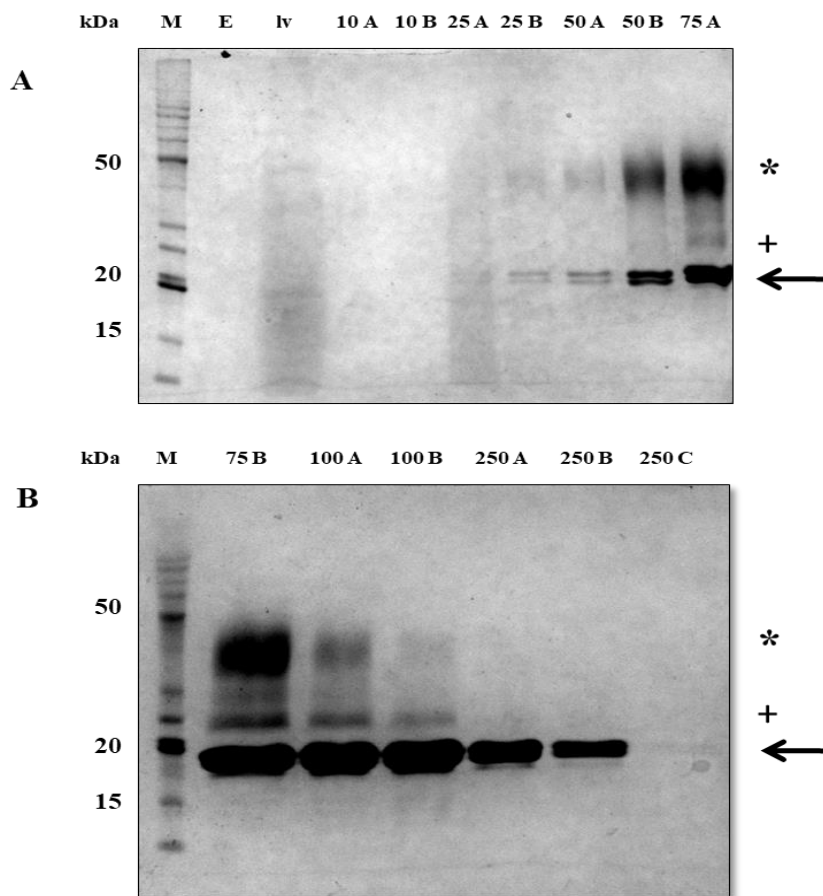
Figura 26 - Cane-PMEI recombinante purificada



Referente à Cane-PMEI recombinante; M: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen). E: Eluato; 75 A concentração de imidazol; D: Dialise; (*) dímero da Cane-PMEI.

Fonte: Elaborada pelo autor

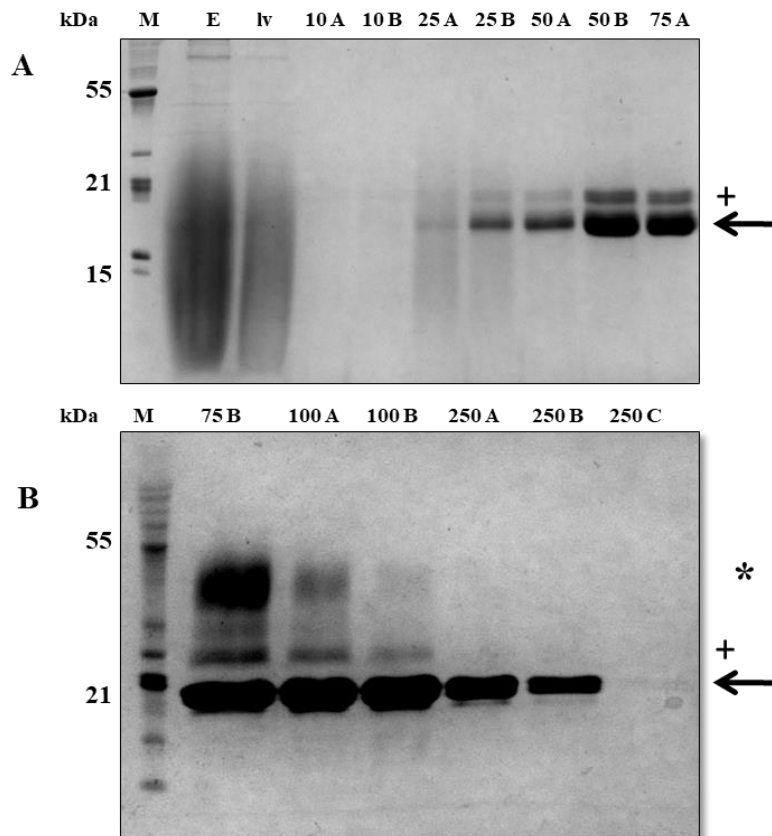
Figura 27 - To-PMEI recombinante purificada



Referente à To-PMEI recombinante; M: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).
 Gel (A): E: Eluato; Lv: Lavagem; 10 A - 75 A concentração de imidazol Gel (B) 75 B-250 C: frações purificadas em coluna de afinidade carregada com Ni⁺², coletadas a partir das diferentes concentrações de imidazol (mM) indicadas na figura. (*) dímero da To-PMEI; (+) glicosilção da To-PMEI.

Fonte: Elaborada pelo autor

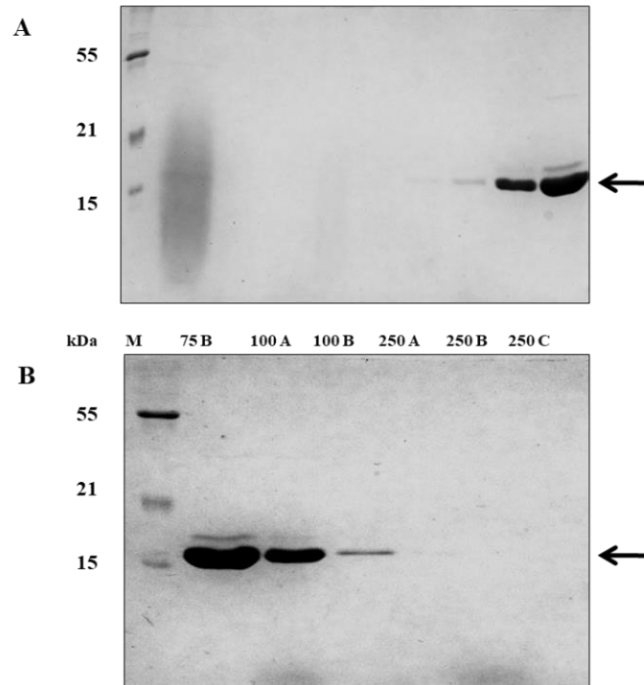
Figura 28 - Vitis-PMEI recombinante purificada



Referente à Kw-PMEI recombinante; M: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen). Gel (A) E: Eluato; Lv: Lavagem; 10 A-75 A. Gel (B) 75 B-250 C: frações purificadas em coluna de afinidade carregada com Ni⁺², coletadas a partir das diferentes concentrações de imidazol (mM) indicadas na figura. (*) dímero da Vitis-PMEI; (+) glicosilção da Vitis-PMEI.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 29 - Kw-PMEI recombinante purificada



Referente à Kw-PMEI recombinante; M: marcador feito no laboratório de biologia molecular. (Invitrogen). Gel (A) E: Eluato; Lv: Lavagem; 10 A-75 A. Gel (B) 75 B-250 C: frações purificadas em coluna de afinidade carregada com Ni^{+2} , coletadas a partir das diferentes concentrações de imidazol (mM) indicadas na figura.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 2 - Quantificação dos PMEIs após dialise

PMEI	Vetor de expressão usado	Rendimento mg/L
Cane-PMEI	pPicZ α -A	578,20
To-PMEI	pGapZ α -A	527,30
Vitis-PMEI	pPicZ α -A	892,00
Kw-PMEI	pPicZ α -A	780,00

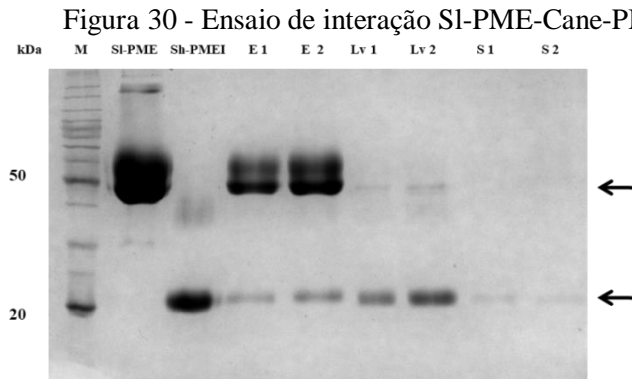
Fonte: Elaborada pelo autor

Os PMEIs purificados aparecem com sua massa molecular respectiva (Tabela 1), não obstante, o To-PMEI e Vitis possuem outra banda com o dobro do tamanho, indicando que estas proteínas podem estar dimerizando, além disso possuem bandas de glicosilação nas frações de purificação. Esse resultado indica que a proteína foi glicosilada pela levedura, evento esperado em virtude da presença de sítios de N- glicosilação na sequência de aminoácidos desses PMEIs. Sugere-se então que a levedura produz a To-PMEI e Vitis-PMEI tanto na sua forma glicosilada quanto na forma não glicosilada. Para o PMEI de tomate, o provável sítio de glicosilação predito

com o programa NetNGlyc 1.0 pode ser observado no Apêndice 3, e encontra-se nos resíduos de asparagina na posição 115 e 150. Para o PMEI de uva, o sítio de provável glicosilação encontra-se no resíduo de asparagina na posição 98 (Apêndice 3).

4.5 Ensaio de interação entre a SI-PME com histidina e o inibidor proteico Cane-PMEI sem histidina

A interação entre a Cane-PMEI e a SI-PME foi confirmada *in vitro*. Na Figura 30, é possível observar na eluição as duas proteínas (SI-PME-Cane-PMEI) foram encontradas.



M: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); SI-PME tamanho molecular 45 kDa, Cane-PMEI tamanho molecular 21 kDa; E: Eluato; Lv: Lavagem; S: Sobrenadante.

Fonte: Elaborada pelo autor

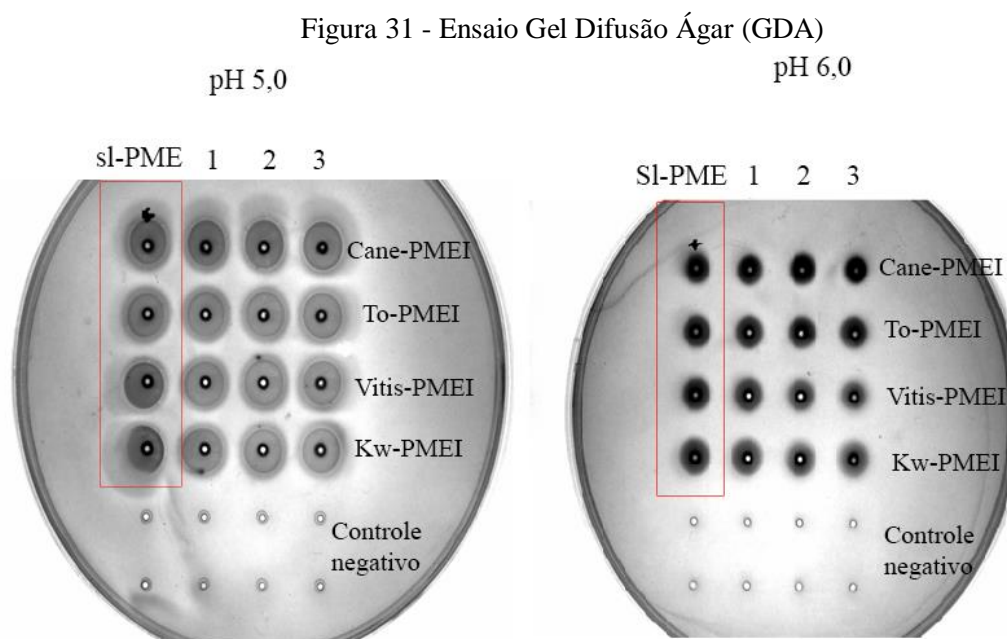
4.6 Ensaio de atividade inibitória

4.6.1 Ensaio de atividade da SI-PME e teste de inibição por PMEI

A enzima SI-PME mostrou-se ativa na presença de todos os inibidores, tendo em vista a presença de halos iguais aos controles nas placas. (Figura 31). Independentemente do pH a SI-PME tem atividade catalítica, mas no pH 5,0 mostrou-se mais efetiva, corroborando possível função fisiológica dela e outras enzimas digestivas no intestino do *S. levis*, que possui este pH (SOARES-COSTA et al., 2011).

A mudança na cor do meio é devido à pectina não-esterificada, o vermelho de rutênio se une nessa pectina e gera uma cor mais escura que no resto da placa. Na seguinte tabela pode-se observar os diâmetros dos halos obtidos (Tabela 3). Depois de analisar no software estatístico

Graphad Prism 6,0 comprovou-se que os inibidores proteicos não tinham uma ação significativa na atividade da SI-PME (Tabela 4).



Ensaio de inibição da SI-PME e os PMEIs. (A) Ensaio feito em pH 5,0 primeira coluna à esquerda SI-PME (1 ug) quatro vezes, quatro fileiras com os diferentes inibidores em complexo com SI-PME por triplicata, as últimas duas fileiras controles negativos dos PMEIs sem aplicação da enzima e H₂O. (B) Ensaio feito em pH 6,0, sendo a ordem a mesma que no ensaio anterior.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3 - Diâmetros obtidos no ensaio gel difusão ágar

pH 5,0	Diâmetro (mm)				pH 6,0	Diâmetro (mm)			
	Triplicata	1	2	3		média	Triplicata	1	2
Controle SI-PME	9,525	10,185	11,379	10,36	Controle SI-PME	12,827	13,360	14,147	13,44
Cane-PMEI	9,779	9,931	8,331	9,35	Cane-PMEI	12,700	13,233	12,979	12,97
To-PMEI	10,058	10,439	9,931	10,14	To-PMEI	12,446	12,700	13,233	12,79
Vitis-PMEI	10,312	9,652	9,652	9,87	Vitis-PMEI	13,766	12,700	12,446	12,97
Kw-PMEI	11,252	11,252	10,845	11,12	Kw-PMEI	13,614	12,573	12,700	12,96

Lado esquerdo o pH 5,0 e lado direito o pH 6,0

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4 - Análise estatística do ensaio gel difusão ágar

pH 5	Diferença média	95%, CI da diferença	Significativo	Resumo
controle SI-PME vs. Cane-PMEI	0,474	-0,8322 - 1,780	Não	ns
controle SI-PME vs. To-PMEI	0,6517	-0,6546 - 1,958	Não	ns
controle SI-PME vs. Vitis-PMEI	0,474	-0,8322 - 1,780	Não	ns
controle SI-PME vs. Kw-PMEI	0,4823	-0,8239 - 1,789	Não	ns
pH 6				
controle SI-PME vs. Cane-PMEI	1,016	-0,2902 - 2,322	Não	ns
controle SI-PME vs. To-PMEI	0,2203	-1,086 - 1,527	Não	ns
controle SI-PME vs. Vitis-PMEI	0,491	-0,8152 - 1,797	Não	ns
controle SI-PME vs. Kw-PMEI	-0,7533	-2,060 - 0,5529	Não	ns

ns: não significativo

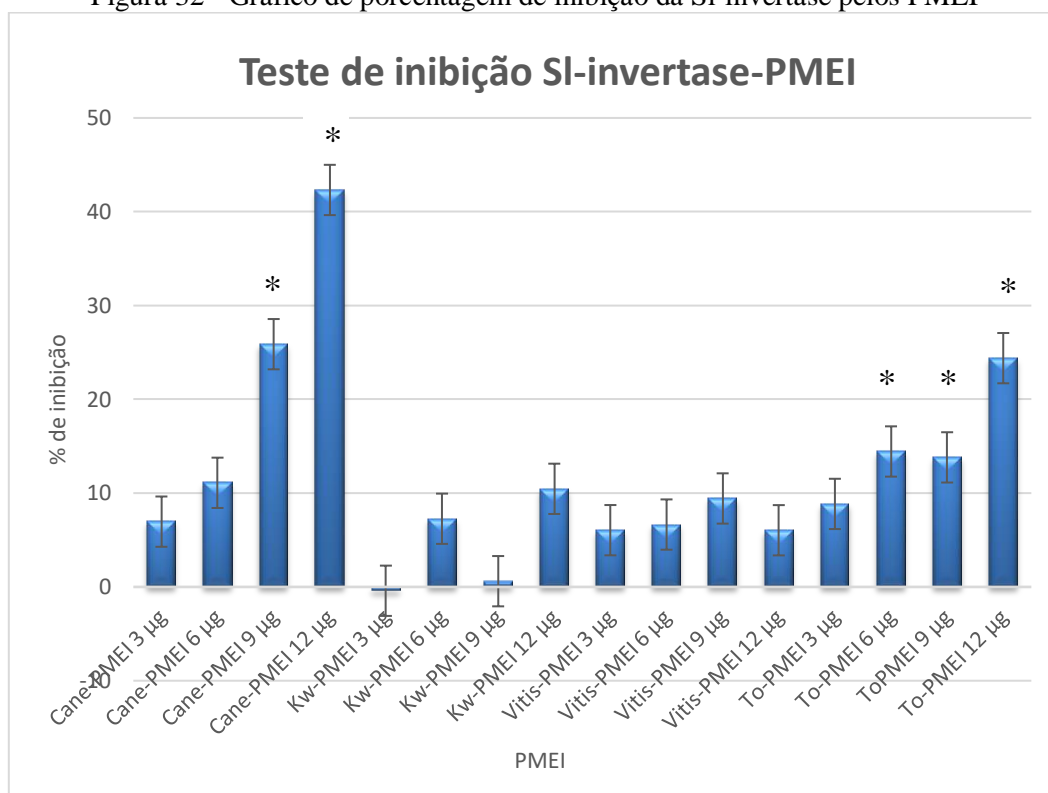
Não foi detectada diferença significativa de acordo com a Anova de fator duplo combinada com o teste Sidak ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor

4.6.2 Ensaio de atividade da SI-invertase e teste de inibição com os PMEI

A atividade da SI-invertase foi testada seguindo as condições descritas por Peduzzi et al., (2014). Após comprovar que a enzima estava ativa, foram feitos os ensaios de inibição com os PMEIs procedentes de plantas. Conseguiu-se uma diminuição na atividade da SI-invertase usando a To-PMEI e Cane-PMEI. A partir das absorbâncias obtidas pelo método de DNS, foi calculada a média aritmética, a porcentagem de atividade e a porcentagem de inibição (Apêndice 4). Na Figura 31 pode-se notar as porcentagens de inibição obtidas, primeiro, para a concentração de 12 μg de cane-PMEI a porcentagem de inibição foi maior a 40%, e segundo, para a concentração de 12 μg de To-PMEI a porcentagem de inibição foi por volta de 20%.

Figura 32 - Gráfico de porcentagem de inibição da SI-invertase pelos PMEIs



Foram usadas quatro (4) concentrações dos diferentes PMEIs (Cane-PMEI, Kw-PMEI, Vitis-PMEI e To-PMEI): 3, 6, 9 e 12 µg para cada inibidor. A porcentagem de inibição representada com barras azuis. * Foi detectada diferença significativa de acordo com a Anova de fator duplo combinada com o teste Dunnett's ($p < 0,05$). As barras acima e abaixo das porcentagens indicam a variação dos testes.

Fonte: Elaborada pelo autor

5 DISCUSSÃO

O sistema de expressão de proteínas em *Pichia pastoris* já foi usado para a produção de enzimas modificadoras de pectina como, por exemplo, a expressão da PG de *Aspergillus niger* (LIU et al., 2014), e de pectinases caracterizadas no Laboratório de Biologia Molecular como a SI-PME e SI-EndoPG de *S. levis*, obtendo excelentes rendimentos (EVANGELISTA et al., 2015; HABRYLO et al., 2018). Além disso, *P. pastoris* tem sido usada para a produção de PMEIs como, por exemplo de kiwi, uva, *A. thaliana* e tomate (LIONETTI et al., 2007; MATTEO; GIOVANE, 2005; PELLOUX; RUSTÉRUCCI; MELLEROWICZ, 2007), e esses inibidores foram ativos contra PMEs de origem vegetal.

O Cane-PMEI foi expresso pela primeira vez em *P. pastoris* e sua atividade de inibição não havia ainda sido reportada. Os três PMEIs (Kw-PMEI, To-PMEI e Vitis-PMEI) já haviam sido expressos anteriormente em *P. pastoris* (BONAVITA et al., 2016; LIONETTI et al., 2015; RECA et al., 2012). Porém, o Vitis-PMEI foi extraído de *Vitis americana*, mas a sequência foi a mesma que do *Vitis vinífera*. Nesses trabalhos os PMEIs inibiram PMEs de origem vegetal, como por exemplo, PME de tomate, laranja, uva ou kiwi, porém, não mostraram efeito inibitório contra as PMEs de origem microbiana como de *Botrytis cinerea* e *Erwinia chrysanthemi*. Estudos filogenéticos revelaram que a estrutura primária da PME de *S. levis* é mais próxima a PMEs bacterianas, como de *E. chrysanthemi* (EVANGELISTA et al., 2015). A complexa inibição de PMEs de patógenos são coerentes com nossos resultados, que mostraram ausência de inibição da SI-PME por PMEIs de quatro plantas distintas. Recentemente, nosso grupo, em colaboração com um grupo Francês, mostrou que a SI-PME não é inibida por inibidores nativos do Kiwi, mas inibida por inibidores químicos, como o ácido tânico (HABRYLO et al., 2018).

Conhecer a estrutura cristalográfica do PMEI de kiwi (MATTEO; GIOVANE, 2005) permitiu avaliar como se dá a formação do complexo PME-PMEI, e como diferenças nos microambientes, como por exemplo, diferentes pHs ou a competição de contatos intramoleculares e intermoleculares da PMEI, são determinantes para a estabilidade do complexo PME-PMEI (SENECHAL et al., 2017). Não entanto, os alvos desses PMEIs de plantas são filogeneticamente diferentes em relaçãoas PME de insetos que possuem resíduos específicos para a formação do complexo, possibilitando o sucesso adaptativo de insetos pelas enzimas digestivas que favoreceram uma dieta herbívora (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012; KIRSCH; HECKEL; PAUCHET, 2016).

As PMEs de plantas cumprem um papel fundamental na remodelação da pectina durante o desenvolvimento da planta (SÉNÉCHAL et al., 2015) e a sua ausência pode fazer com que a planta apresente um desequilíbrio no crescimento (MOHNEN, 2008). Há vários estudos de ocorrência de pectinases em insetos, porém, elas são originárias de microrganismos simbiotes produtores dessas enzimas (ANTONY et al., 2017). Até agora, há apenas duas ocorrências de PMEs endógenas em insetos: A PME de *Sitophilus oryzae* (SHEN et al., 2005) e a PME de *S. levis* (EVANGELISTA et al., 2015; HABRYLO et al., 2018). Não entanto, elas ainda não têm função conhecida, embora as ocorrências de ambas no intestino médio desses insetos no estágio larval sugere um papel digestivo. Uma teoria é que sejam usadas para a obtenção direta de nutrientes (galacturonidos), ou com o propósito de romper a pectina e permitir a ação de outras enzimas digestivas degradadoras dela (PELLOUX; RUSTÉRUCCI; MELLEROWICZ, 2007).

A inibição da SI-PME não foi conseguida nesse trabalho, porém, até agora, não há um nenhum relato de inibição de PME procedente de fungo, bactéria ou inseto por PMEIs de plantas (PAUCHET et al., 2010). As diferenças estruturais entre as PMEs de plantas e as PMEs patogênicas poderiam dificultar a formação do complexo com os PMEIs de origem vegetal (FRIES et al., 2007). Os sítios ativos das PME de várias espécies de plantas estão caracterizados e possuem resíduos distintos da PME de *E. chrisantemi* (OØBRO et al., 2009). Os alinhamentos de PMEs de bactérias e insetos com PMEs de plantas demonstram diferenças em alguns resíduos chaves para a formação do complexo PME-PMEI (WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009).

A estrutura da PMEI de kiwi é composta por quatro longas hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) alinhadas de forma antiparalela, estabilizadas por quatro resíduos de cisteína formando duas ligações dissulfeto (HOTHORN et al., 2004; MATTEO; GIOVANE, 2005). Esses quatro resíduos foram encontrados nas sequências dos PMEIs expressos neste trabalho, sugerindo uma possível estabilização da estrutura tridimensional. Aproximadamente 50 resíduos fazem contato no complexo PME-PMEI (HOCQ et al., 2017) e a diferença estrutural pode ser chave para compreender como se dá essa união. Na SI-PME há uma ausência importante de um resíduo de Trp²⁴⁸ no sítio catalítico, esse resíduo faz contato com os PMEIs, dando uma possível explicação para a ausência de inibição, embora ter demonstrado que a SI-PME interagiu com a Cane-PMEI, a união poderia não ser no sítio ativo (D'AVINO et al., 2003; MARKOVIČ; JANEČEK, 2004). Se sugere que as PMEIs de plantas não cumpram papel de defesa ante ataques por pectinases e seu papel seja mais fisiológico de regulação das PMEs originárias de plantas (GIOVANE et al., 2004).

A formação do complexo PME-PMEI foi testada em uma faixa de (pH de 5,0 – 6,0) utilizando as condições ótimas para a SI-PME (EVANGELISTA et al., 2015; HABRYLO et al., 2018). No entanto, cada PMEI pode agir em diferentes faixas de pH, e as condições necessárias para a formação de um complexo PME-PMEI podem mudar. Estudos reportam este fato, com a formação do complexo do PME-PMEI de kiwi, e a PME de tomate com PMEI de kiwi. (BONAVITA et al., 2016; SÉNÉCHAL et al., 2015b). Esse PMEI conseguiu uma inibição total das enzimas e mostrou-se mais eficiente em faixas ácidas de pH. Com a PME de kiwi o inibidor se dissociava depois do pH 10,0. Entretanto, com a PME de tomate a constante de dissociação do complexo era em pH 7,0 (CIARDIELLO et al., 2008).

Entre algumas das explicações possíveis para a ausência de inibição da SI-PME, está a diferença das interações iônicas, que podem alterar a estabilidade do complexo PME-PMEI. Particularmente mudanças no pH podem ter efeitos importantes na estabilização das proteínas (SENECHAL et al., 2017). De fato, os grupos ionizáveis podem ter uma constante de dissociação ácida (pKa) muito alta ou baixa dependendo de fatores como a proximidade de outros resíduos carregados e o envolvimento de ligações de hidrogênio. A sensibilidade ao pH poderia estar relacionada à mudança no estado de protonação de alguns resíduos que podem modular a estabilidade do complexo PME-PMEI (SÉNÉCHAL et al., 2017). A desprotonação desses resíduos muda as interações intermoleculares e intramoleculares do complexo. No caso de inibição da PME (AtPME3) de *A. thaliana* pelo inibidor AtPMEI7 a inibição mostrou ser pH-dependente, com uma ótima inibição em pH ácido (pH 5,0), sugerindo que, dentro de a parede celular, nesse pH, a maioria de AtPME3 estaria em complexo com a AtPMEI7. Mas isso é uma característica de cada PMEI e para cada complexo PME-PMEI (GUÉNIN et al., 2017; L'ENFANT et al., 2015).

O experimento de interação do complexo SI-PME-Cane-PMEI comprovou que essas duas proteínas interagem, porém, os PMEI talvez não estejam sendo seletivos em nessa união, e terminem-se ligando a regiões diferentes ao sítio ativo da SI-PME. Para compreender melhor a dinâmica dessa união, é necessário a utilização de outras técnicas como a ressonância plasmônica de superfície (SPR), que foi aplicada no estudo do complexo de enzima e inibidor de uva VvPME1-PMEI1 (LIONETTI et al., 2015), revelando quais são os resíduos que interagem entre a enzima e o inibidor. Outra abordagem pertinente é o uso de modelamento molecular, por meio de simulações de dinâmica molecular (DM), como foi usado no estudo do complexo entre enzima e inibidor de *Arabidopsis thaliana* At-PME-At-PMEI (HOCQ et al., 2017). Nesse estudo foram

revelados vários resíduos chave que possuem uma dependência do pH, mostrando que há PMEIs mais dependentes de pH, e outras mais independentes.

A diminuição na atividade enzimática da SI-Invertase por PMEIs é possível pela similaridade estrutural que PMEIs possuem com inibidores de invertase, como mostrado pela comparação entre inibidor de invertase de tabaco (Nt-INH) e PMEI de kiwi, que mostram similaridade em resíduos chave para formação do complexo (HOTHORN et al., 2004; PRESSEY, 1994). Há vários estudos de inibição de invertases por moléculas não proteicas (DMSO, EDTA, β -mercaptoethanol) (RAUSCH; GREINER, 2004), por componentes sintéticos (thiofructofuranoside) (KISO et al., 2003), ou com inibidores proteicos de invertase (INH) de batata, tomate e tabaco (HOTHORN et al., 2004; PRESSEY, 1994). Porém este é o primeiro relato de inibição de invertase de inseto por PMEI de plantas. Desta forma, a utilização deste inibidor poderia ser uma alternativa para o controle de *S. levis*, via inibição de invertase. No entanto, isso deve ser testado por meio de ensaios que envolvam sua inclusão na alimentação do inseto ou, até mesmo, na geração de canas-de-açúcar transgênicas superexpressando o inibidor.

O potencial industrial que poderiam ter essas PMEIs produzidas em nosso laboratório é principalmente na indústria de sucos (ALKORTA et al., 1998; VORAGEN et al., 2009). As PMEs das frutas são responsáveis por tornar os sucos com mais turbidez além de uma perda de consistência (KASHYAP et al., 2001). A adição de PMEIs em sucos e purês poderia evitar processos extras, como a pasteurização, feita para conservar as características por mais tempo, inclusive, melhorando o sabor e a retenção de nutrientes desses produtos (CASTALDO et al., 1991; GIOVANE et al., 2004). Adicionalmente, esses PMEIs podem ser usados para processos como a produção de vinho permitindo que esse produto tenha menos conteúdo final de metanol (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA, 2008).

Visando estratégias para controle do *S. levis* é importante estudar a interação do PMEI do inseto com a PME de cana-de-açúcar e conhecer o papel da Cane-PME, para concluir se ela é um bom alvo. Estudo feito com *A. thaliana* foi feito um knock-out da AtPME3, a planta mostrou-se mais susceptível a patógenos como *B. cinerea* e *Pectobacterium carotovorum*, provavelmente pela inabilidade do patógeno para degradar as formas metilesterificadas do HG (LIONETTI et al., 2015). Estudos envolvendo silenciamento gênico da PME, inclusão de inibidores efetivos na dieta e manipulação via CRISPR-Cas9 poderiam indicar se a PME de *S. levis* é realmente um bom alvo para seu controle. Por outro lado, faz-se necessária a busca de inibidores efetivos, seja pela

utilização de inibidores oriundos de outras fontes, não de plantas, seja pela evolução dirigida dos inibidores já produzidos via DNA Shuffling ou técnicas similares.

6 CONCLUSÕES

- A expressão dos PMEIs via sistema heterólogo *P. pastoris* foi eficiente, gerando proteína pura e em quantidade suficiente para desenvolver os experimentos.
- Este trabalho foi o primeiro a mostrar a expressão recombinante de uma PMEI procedente de cana-de-açúcar em *P. pastoris*.
- Nenhum PMEI foi capaz de inibir a PME de *S. levis*.
- A interação entre a SI-PME e o PMEI de cana-de-açúcar foi confirmada, no entanto, esta interação não resultou em inibição da enzima.
- Este trabalho foi o primeiro PMEI procedente de cana-de-açúcar via *P. pastoris*. Este trabalho é o primeiro em relatar a inibição parcial de invertase de inseto, por PMEI de plantas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Considerando que o Cane-PMEI interage com a SI-PME, estudos de co-cristalização (ou de modelagem) poderiam ser realizados para estudar a razão da não inibição.
- Considerando que os PMEIs de tomate e cana-de-açúcar apresentaram uma atividade inibitória da invertase, estudos estruturais desses complexos poderiam revelar os resíduos importantes nessas uniões.
- Considerando que esses PMEIs têm propriedades atraentes para a aplicação na indústria de sucos, poderiam ser realizados estudos para confirmar se seria útil seu uso na indústria.
- Novos inibidores para a SI-PME podem ser buscados, em outros organismos, ou por meio de evolução *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 33, issue 1, p. 21-28, jan. 1998.
- ANTONY, B. et al. Identification and expression profiling of novel plant cell wall degrading enzymes from a destructive pest of palm trees, *Rhynchophorus ferrugineus*. **Insect Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 469-484, 2017.
- BALESTRIERI, C. et al. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 183-187, 5 out. 1990.
- BONAVITA, A. et al. Influence of pH on the Structure and Function of Kiwi Pectin Methylesterase Inhibitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 29, p. 5866-5876, 2016.
- BONNIN, E. et al. Pectin acetylerases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonan as well as rhamnogalacturonan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 411-418, 2008.
- BOYD, D. W.; COHEN, A. C.; ALVERSON, D. R. Digestive Enzymes and Stylet Morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a Predacious Plant Bug. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 3, p. 395-401, 1 maio 2002.
- CALDERÓN-CORTÉS, N. et al. Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 45-71, 2012.
- CAMARDELLA, L. et al. Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase: Amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 14, p. 4561-4565, jul. 2000.
- CASTALDO, D. et al. Orange Juices and Concentrates Stabilization by a Proteic Inhibitor of Pectin Methylesterase. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1632-1634, 1991.
- CIARDIELLO, M. A. et al. The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methylesterase: Amino acid sequence, oligosaccharides structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 71, n. 1, p. 195-206, abr. 2008.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, 1988.
- D'AVINO, R. et al. Tomato Pectin Methylesterase: Modeling, Fluorescence, and Inhibitor Interaction Studies - Comparison with the Bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) Enzyme. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 53, n. 4, p. 830-839, 2003.

- DEGASPARI, N. et al. Biologia de *Sphenophorus levis vaurie*, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 553–558, jun. 1987.
- DOMINGO, C. et al. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. **Plant Journal**, v. 13, n. 1, p. 17–28, 1998.
- EVANGELISTA, D. E. et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the pectin methylesterase from the sugar cane weevil *Sphenophorus levis*. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications**, v. 70, n. Pt 3, p. 331–4, 2014.
- _____. Pectinases from *sphenophorus levis vaurie*, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): Putative accessory digestive enzymes. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 5, p. 1–8, 2015.
- FRIES, M. et al. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. **The EMBO journal**, v. 26, n. 17, p. 3879–3887, 2007.
- GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Agronômica Ceres. 920p. 2002
- GIOVANE, A. et al. Pectin methylesterase inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 245–252, 2004.
- GUÉNIN, S. et al. Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 192, n. 1, p. 114–126, 2011.
- _____. AtPME3, a ubiquitous cell wall pectin methylesterase of *Arabidopsis thaliana*, alters the metabolism of cruciferin seed storage proteins during post-germinative growth of seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 5, p. 1083–1095, 2017.
- GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987–996, 2003.
- HABRYLO, O. et al. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112 [in progress], jun. 2018.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HOCQ, L. et al. Combined Experimental and Computational Approaches Reveal Distinct pH Dependence of Pectin Methylesterase Inhibitors. **Plant Physiology**, v. 173, n. 2, p. 1075–1093, 2017.

- HOTHORN, M. et al. The invertase inhibitor Nt-CIF from tobacco: a highly thermostable four-helix bundle with an unusual N-terminal extension. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 4, p. 987–995, 23 jan. 2004.
- JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant, Cell and Environment**, v. 7, n. 3, p. 153–164, abr. 1984.
- JOLIE, R. P. et al. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: A review. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 18, p. 2583–2595, 2010.
- KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215–227, 2001.
- KIRSCH, R.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. How the rice weevil breaks down the pectin network: Enzymatic synergism and sub-functionalization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 72–82, 2016.
- KISO, T. et al. Inhibition of β -Fructofuranosidases and α -Glucosidases by Synthetic Thiofructofuranoside. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 8, p. 1719–1724, jan. 2003.
- LATARULLO, M. B. G. et al. Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1401, 2016.
- L'ENFANT, M. et al. Substrate specificity of plant and fungi pectin methylesterases: Identification of novel inhibitors of PMEs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 681–691, 2015.
- LEROUX, C. et al. Pectin Methylesterase48 Is Involved In Arabidopsis Pollen Grain Germination. **Plant physiology**, v. 167, n. 2, p. 367–80, 2015.
- LEVESQUE-TREMBLAY, G. et al. Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. **Planta**, v. 242, n. 4, p. 791–811, 2015.
- LIONETTI, V. et al. Overexpression of Pectin Methylesterase Inhibitors in Arabidopsis Restricts Fungal Infection by Botrytis cinerea. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1871–1880, 2007.
- _____. The grapevine VvPMEI1 gene encodes a novel functional pectin methylesterase inhibitor associated to grape berry development. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2015.
- LIU, M. Q. et al. Cloning, expression of Aspergillus niger JL-15 endo-polygalacturonase A gene in Pichia pastoris and oligo-galacturonates production. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 53–59, 2014.
- MARKOVIČ, O.; JANEČEK, Š. Pectin methylesterases: Sequence-structural features and phylogenetic relationships. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 13, p. 2281–2295, 2004.

MARTIN, M. M.; JONES, C. G.; BERNAYS, E. A. The Evolution of Cellulose Digestion in Insects [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 333, n. 1267, p. 281–288, 29 ago. 1991.

MATTEO, A. D.; GIOVANE, A. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. **The Plant Cell**, v. 17, n. March, p. 849–858, 2005.

MCALLAN, J. W.; ADAMS, J. B. The significance of pectinase in plant penetration by aphids. **Canadian Journal of Zoology**, v. 39, n. 3, p. 305–310, jun. 1961.

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

MILLER, J. M. GraphPad PRISM. **Analysis**, v. 52, n. 1, p. 2–3, 2003.

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

OØBRO, J. et al. High-throughput screening of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase variants using carbohydrate microarrays. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1861–1868, 2009.

PAUCHET, Y. et al. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

PAULA, F. F. P. **Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo de cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis***. 2012. 206 f. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, SP, 2012.

PEAUCELLE, A. et al. Arabidopsis Phyllotaxis Is Controlled by the Methyl-Esterification Status of Cell-Wall Pectins. **Current Biology**, v. 18, n. 24, p. 1943–1948, dez. 2008.

PEDEZZI, R. et al. A novel β -fructofuranosidase in Coleoptera: Characterization of a β -fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, p. 31–38, 2014.

PELLETIER, S. et al. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis hypocotyls*. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 726–739, 2010.

PELLOUX, J.; RUSTÉRUCCI, C.; MELLEROWICZ, E. J. New insights into pectin methylesterase structure and function. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 267–277, 2007.

PHILIPPE, F.; PELLOUX, J.; RAYON, C. Plant pectin acetylerase structure and function: New insights from bioinformatic analysis. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2017.

POPEIJUS, H. et al. Degradation of plant cell walls by a nematode. **Nature**, v. 406, n. 6791, p. 36–37, 2000.

PRESSEY, R. Invertase inhibitor in tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 543–546, jun. 1994.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Occurrence and properties of polygalacturonase in Avena and other plants. **Plant Physiology**, v. 60, n. 4, p. 548–553, out. 1977.

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

RAUSCH, T.; GREINER, S. Plant protein inhibitors of invertases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 253–261, fev. 2004.

RECA, I. B. et al. A functional pectin methylesterase inhibitor protein (SolyPMEI) is expressed during tomato fruit ripening and interacts with PME-1. **Plant Molecular Biology**, v. 79, n. 4–5, p. 429–442, jul. 2012.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929–967, jul. 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual: Vol. 2**. 2. ed ed. S.l.: Cold Spring Harbor, 1989.

SCHUMAN, M. C.; BALDWIN, I. T. The Layers of Plant Responses to Insect Herbivores. **Annual Review of Entomology**, v. 61, n. 1, p. 373–394, 2016.

SCOGNAMIGLIO, M. A. et al. The plant invertase inhibitor shares structural properties and disulfide bridges arrangement with the pectin methylesterase inhibitor. **Journal of Protein Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 363–369, 2003.

SÉNÉCHAL, F. et al. Homogalacturonan-modifying enzymes: Structure, expression, and roles in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 18, p. 5125–5160, 2014.

_____. Tuning of pectin methylesterification: Pectin methylesterase inhibitor 7 modulates the processive activity of co-expressed pectin methylesterase 3 in a pH-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 38, p. 23320–23335, 2015a.

_____. Arabidopsis PME17 Activity can be Controlled by Pectin Methylesterase Inhibitor4. **Plant signaling & behavior**, v. 10, n. 2, p. e983351, 2015b.

_____. Structural and dynamical characterization of the pH-dependence of the pectin methylesterase/pectin methylesterase inhibitor complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, v. 52, p. 21538-21547, nov., 2017.

SHELOMI, M.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. Ancestral gene duplication enabled the evolution of multifunctional cellulases in stick insects (Phasmatodea). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 1–11, 2016.

SHEN, Z. et al. Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. **Journal of insect science**, v. 3, n. 24, p. 1–9, 2003.

_____. Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. **Journal of insect science (Online)**, v. 5, n. 21, p. 21, 2005.

SHEVCHIK, V. E.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. PaeX, a second pectin acetylerase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3091–3100, 2003.

SOARES-COSTA, A. et al. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 4, p. 462–468, abr. 2011.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 365–418.

TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K.; GUPTA, S. Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 6, n. 1, p. 65–73, 1 jan. 2012.

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA. **Use of a protein inhibitor of pectin methylesterase for reducing methanol formation in grape must and marc, and process therefor**. WO 2008104555 A1, 27 fev. 2008, 04 set. 2008.

VATANPARAST, M. et al. Plant Cell Wall Degrading Enzymes , Pectinase and Cellulase , in the Digestive System of the Red Palm Weevil , *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera : Curculionidae). **Plant Protection Science**, v. 50, n. 4, p. 190–198, 2014.

VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America (Coleoptera, Curculionidae, Rhynochoporidae). **American Museum of Natural History**, n. 2656, p. 1–30, 1978.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009.

WAKABAYASHI, K.; HOSON, T.; HUBER, D. J. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 6, p. 667–673, jan. 2003.

WATANABE, H. et al. A cellulase gene of termite origin [6]. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 330–331, 1998.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 609–632, jan. 2010.

WILLATS, W. G. T. et al. Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19404–19413, 1 jun. 2001.

WOLF, S.; MOUILLE, G.; PELLOUX, J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. **Molecular Plant**, v. 2, n. 5, p. 851–860, 2009.

APÊNDICE

Apêndice 1 - **Primers utilizados para a clonagem dos PMEIs**. Os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *SalI* estão sublinhados.

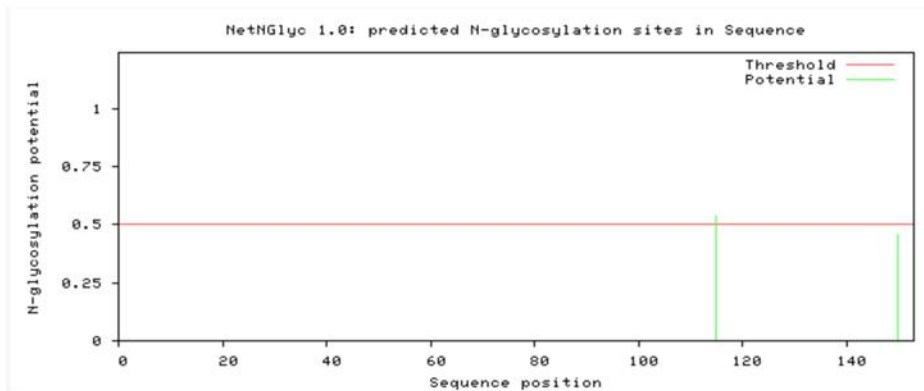
Nome	Sequencia
Cane-PMEI_EcoRI_FW	<u>GAATTC</u> GAGCCAGCAGAGATTCCTT
Cane-PMEI_SalI_RV	GTCGAG <u>CTT</u> GTTTGTGTATACCTCACCC
To-PMEI_EcoRI_FW	<u>GAATTC</u> GATCTTATAAATGATGTTTGCTCA
To-PMEI_SalI_RV	<u>GTCGAG</u> TCCTTTTAGTAGATTGCTAATAAC
Vitis-PMEI_EcoRI_FW	<u>GAATTC</u> AGGCCAAGCGTGAAGATCGCAGC
Vitis-PMEI_SalI_RV	<u>GTCGAG</u> TCCTATCAAACGCTTAGAGATAGCCAA
Kw-PMEI_EcoRI_FW	AAAGA <u>ATTC</u> GTAAAAGCAGAAAACCATTTG
Kw-PMEI_SalI_RV	ATAG <u>TTCGAG</u> TTTTGATCCAGGCCAAAAGATTAG

Apêndice 2. **Clones de pPicZ α -A-PMEI e PMEI-pGapZ α -A.** Clones conseguidos para cada um dos PMEIs.

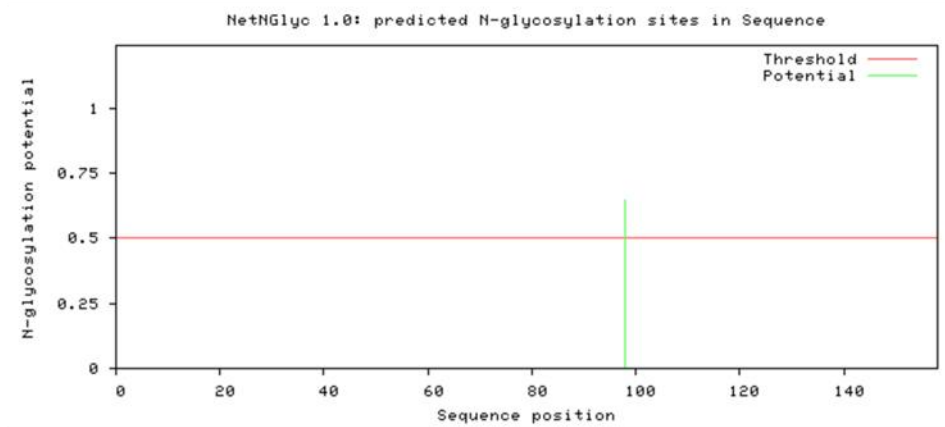
PMEI	Vetor pPICZα-A	Vetor pGapZα-A
Kiwi (KwPMEI)	pPICZ α -A_KwPMEI	pGapZ α -A_KwPMEI
Uva (VitisPMEI)	pPICZ α -A_VitisPMEI	pGapZ α -A_VitisPMEI
Cana-de-açúcar (Cane-PMEI)	pPICZ α -A_Cane-PMEI	pGapZ α -A_Cane-PMEI
Tomate (To-PMEI)	_____	pGapZ α -A_To-PMEI

Apêndice 3 – **Prováveis sítios de glicosilação da To-PMEI e Vitis-PMEI.** O gráfico gerado com o *software* NetNGlyc 1.0 mostra: A. To-PMEI, dois possíveis sítios de N-glicosilação nas asparaginas 115 e 150. B. Vitis-PMEI, um possível sítio de N-glicosilação na asparagina 98.

A. To-PMEI



B. Vitis-PMEI



Apêndice 4 - **Teste de atividade inibitória SI-invertase-PMEIs**. Referente às absorvâncias obtidas pelo método do DNS, destacando-se com uma seta vermelha os dois PMEIs que apresentaram maior atividade inibitória.

	ABS triplicata			Desvio Padrão	Média	% Atividade	% Inibição
SI-Invertase	2,656	2,5	2,413	0,123	2,523	100	0
Cane-PMEI 3 µg	2,242	2,545	2,255	0,171	2,347	93,04	6,96
Cane-PMEI 6 µg	1,922	2,447	2,36	0,281	2,243	88,90	11,10
Cane-PMEI 9 µg	2,122	1,792	1,696	0,223	1,870	74,12	25,88
Cane-PMEI 12 µg	1,235	1,571	1,56	0,191	1,455	57,68	42,32
Kw-PMEI 3 µg	2,496	2,491	2,613	0,069	2,533	100,41	-0,41
Kw-PMEI 6 µg	2,229	2,297	2,493	0,137	2,340	92,73	7,27
Kw-PMEI 9 µg	2,609	2,513	2,401	0,104	2,508	99,39	0,61
Kw-PMEI 12 µg	2,26	2,204	2,313	0,055	2,259	89,54	10,46
Vitis-PMEI 3 µg	2,267	2,439	2,405	0,091	2,370	93,95	6,05
Vitis-PMEI 6 µg	2,374	2,523	2,169	0,178	2,355	93,35	6,65
Vitis-PMEI 9 µg	2,168	2,292	2,395	0,114	2,285	90,57	9,43
Vitis-PMEI 12 µg	2,317	2,265	2,53	0,140	2,371	93,96	6,04
To-PMEI 3 µg	2,221	2,378	2,3	0,079	2,300	91,15	8,85
To-PMEI 6 µg	2,018	2,4	2,058	0,210	2,159	85,56	14,44
To-PMEI 9 µg	2,065	2,276	2,183	0,106	2,175	86,19	13,81
To-PMEI 12 µg	1,845	2,13	1,748	0,199	1,908	75,61	24,39