



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EXPRESSÃO DE UMA QUITINASE DE *Chromobacterium violaceum* EM *Pichia pastoris*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

CÍCERO SILVANO TEIXEIRA

FORTALEZA-CEARÁ
2011

CÍCERO SILVANO TEIXEIRA

EXPRESSÃO DE UMA QUITINASE DE *Chromobacterium violaceum* EM *Pichia pastoris*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho

FORTALEZA-CE
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL, DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo e publicação na Biblioteca Setorial do Centro de Ciências e Tecnologia,
Campus do Pici, Universidade Federal do Ceará.

T265e Teixeira, Cícero Silvano
Expressão de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris*: purificação e caracterização parcial da proteína recombinante /
Cícero Silvano Teixeira. -- Fortaleza, 2011.
110 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho
Área de concentração: Biologia Molecular
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2011.

1. Quitinase. 2. *Chromobacterium violaceum*. 3. *Pichia pastoris*. I. Grangeiro, Thalles Barbosa (Orient.). II. Carvalho, Cristina Paiva da Silveira (Co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

CDD 574.192

“Porventura pode uma mulher esquecer-se tanto de seu filho que cria, que não se compadeça dele, do filho do seu ventre? Mas ainda que esta se esquecesse dele, contudo eu não me esquecerei de ti”.

Isaías 49:15

“Tempo é uma questão de escolha, você que deve escolher o que fazer com seu tempo”.

(Autor Desconhecido)

“Nada em Biologia faz sentido, exceto à luz da evolução”.

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

“Evolução é um Fato”.

Ernst Mayr (1904-2005)

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Eulália Silvana Teixeira (*In memorium*) e João Marques Ferreira, pelo exemplo de ser humano. Por amor e carinho destinados aos seus filhos.

Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo, Thalles Barbosa Grangeiro, pelo exemplo de organização, pela condução desta dissertação, pela oportunidade a mim proporcionada de realizar um trabalho de extrema relevância e belo na área de genética. Por não medir esforços para me dar todas as condições para que eu realizasse este trabalho e por contribuir para aumentar o meu amor pela genética.

À Professora, Cristina Paiva Carvalho da Silveira, por toda atenção e por ser um exemplo de cientista. Por ser uma amiga inestimável, que me escutou durante os meus momentos de angústia científica e me guiou a tomar a decisão correta.

Ao Professor José Tadeu Abreu de Oliveira. A quem tenho honra de chamar mestre e cientista, por sua preocupação com formação intelectual dos discentes.

Ao Professor Marcos Antonio de Moraes Junior, pela disponibilidade em compor a mesa examinadora deste trabalho e por enriquecer esta dissertação com uma visão crítica.

Ao Professor Humberto Muniz Pereira, pelo curso de modelagem molecular ministrado em Fortaleza, pela interpretação dos modelos gerados da quitinase (CHI3316) e pelos ensaios de cristalização da proteína recombinante (rCHI3316).

Ao Professor Antônio José da Costa Filho, por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência.

Ao Professor André Coelho, por me ajudar a interpretar os espectros de dicroísmo circular.

À Professora Maria Aparecida, por seu jeito espontâneo de ser.

À Professora Roselita Mendes, pela amizade, paciência e pelos conselhos. Por ser uma pessoa correta e me falar a verdade quando eu necessitava.

Ao Professor Francisco Átila de Lira Gondim, pelos maravilhosos conselhos e por abrir muitas portas da ciência para mim.

Aos Professores José Airton, Marta e Vera por me estender a mão quando eu mais precisava.

À Professora Fátima Gomes, por me ensinar a descobrir a Biologia.

Ao Professor Benildo Sousa Cavada, por abrir as portas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do mundo científico para mim.

Ao Professor Francisco de Assis de Paiva Campos, por sua preocupação com a formação da consciência social do discente.

Ao meu amigo e Professor, Roberto Araújo Sá, por me mostrar que a ciência não é somente flores.

À Denise Rocha Nepomuceno, por me acolher no laboratório de Genética Molecular e me ajudar a dar os primeiros passos na Biologia Molecular.

À minha querida amiga, Samita, por toda sua atenção e disponibilidade em sempre e sempre me ajudar.

Ao meu amigo Edvar, um irmão, com quem tive o prazer de debater sobre vários assuntos, inclusive o fato da evolução.

Aos queridos ICs, Juliana, Lucas, Raul. Vocês foram essenciais na execução desta dissertação.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular, Mariana, Marina, Paloma, Patrícia, Rafael, Renata, Sandra e Suelen.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia vegetal, Beatriz, Gabriela, Emmanuel, Ivna, Luis Carlos, Marcos e Vitória.

Aos meus amigos do laboratório Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Andrezão, Alysson, Átila, Bruno Anderson, Camila, Eduardo, Emanuel Marinho, Felipe, Felipe Silveira, Helton, Ito, Junior, Kyria, Luciana, Luciana Melo, Maria Júlia, Márcia Marinho, Mônica (baladas), Nagano, Rafael Simões, Rafahel, Ramon, Raquelzinha, Rômulo e Tales.

Aos amigos das turmas de mestrado e doutorado, Abraão, Adilton, Aninha, Carolina, Chistiane, Cícera Raquel, Déborah, Gabriela, João Henrique, Márcio, Milton e Nara.

Aos amigos e futuros cientistas, Fredy e Vladimir, pela amizade, pelo companheirismo e pelos conselhos.

Aos meus queridos irmãos, Alexandre, Elaine, Francisco e Jacira.

Ao casal Djan e Marcela, por me permitir fazer parte das suas famílias, pelo companheiro e pela hombridade.

Aos amigos, Dom veras (Homem dos sete instrumentos), Dogi e Marcelo, pela amizade e pelo auxílio.

Aos meus eternos amigos do Conselho Jedi (Artur, Jam e Rodrigo), pelo companheirismo e pelos ensinamentos compartilhados.

A família Fernandes (minha família), por me acolher.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio das seguintes instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – Através das atividades de capacitação no ensino e na pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular em parceria com os Laboratórios: Genética Molecular, Citogenética, Biotecnologia Vegetal, Mecanismos e Defesa de plantas, Toxinas Vegetais, Biotecnologia Molecular e Moléculas Biologicamente Ativas,.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO CEARÁ (FUNCAP) – Através da concessão da bolsa de mestrado e de fomento à pesquisa.

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS (SÃO CARLOS – SP) – Através da parceria experimental com os grupos de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas e Cristalografia.

DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO À PESQUISA COMO: CNPq, CAPES, RENORBIO e FCPC (UFC) que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv-vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii-ix
RESUMO	x-xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1-3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4-13
2.1. Quitinases.....	4-6
2.2. Quitinases bacterianas.....	7
2.3. Expressão Heteróloga.....	7-9
2.3.1. Expressão Heteróloga de quitinases em microrganismos.....	10
2.4. Fungos Fitopatogênicos.....	11-12
2.5. Atividade antifúngica de quitinases.....	12-13
3. PERGUNTA BIOLÓGICA	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo geral.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. MATERIAL	16-17
5.1. Bactérias e Leveduras.....	16
5.2. Enzimas.....	16
5.3. Plasmídeos.....	16
5.4. Reagentes e outros materiais.....	17
6. MÉTODOS	18-31

6.1. Alinhamento de seqüências e modelagem molecular por homologia.....	18-19
6.2. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	19
6.3. Transformação de células de <i>E.coli</i> TOP10F' com o plasmídeo recombinante.....	20-21
6.4. Extração de plasmídeos.....	22
6.5. Transformação de células de <i>Pichia pastoris</i> GS115 e KM71H com o plasmídeo recombinante.....	23-25
6.6. Indução da Expressão da rCHI3316 em <i>Pichia pastoris</i> GS115 e KM71H.....	25-26
6.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
6.8. Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.....	26-27
6.9. Determinação da concentração de proteínas.....	27
6.10. Caracterização bioquímica da quitinase recombinante (rCHI3316).....	28-29
6.10.1. Atividade enzimática com a utilização de quitina coloidal como substrato.....	28
6.10.2. Atividade enzimática contra substrato sintético.....	29
6.10.3. Avaliação da atividade quitinásica em diferentes valores de pH.....	29
6.11. Caracterização estrutural da quitinase recombinante (rCHI3316).....	30-31
6.11.1. Dicroísmo Circular.....	30
6.11.2. Espectro de fluorescência.....	30
6.12. Atividade antifúngica.....	31
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32-69
7.1. Alinhamento de seqüências e modelagem molecular por homologia.....	32-40
7.2. Transformação de células de <i>E.coli</i> TOP10F' com o plasmídeo recombinante	41-42
7.3. Transformação de células de <i>P. pastoris</i> GS115 e KM71H com o plasmídeo recombinante.....	43-44
7.4. Indução da Expressão da rCHI3316 em <i>Pichia pastoris</i> GS115 e KM71H.....	45-53

7.5. Atividade enzimática com a utilização de quitina coloidal como substrato	54-57
7.6. Purificação e atividade da quitinase recombinante (rCHI3316).....	58-59
7.7. Atividade enzimática sobre substratos sintéticos.....	60-61
7.8. Avaliação da Atividade quitinásica em diferentes valores de pH.....	61-62
7.9. Dicroísmo Circular.....	62-65
7.10. Espectro de fluorescência.....	66-67
7.11. Atividade antifúngica.....	68-69
8. CONCLUSÃO.....	70
9. LITERATURA CITADA.....	71-84
10. ANEXOS	85-90
10.1. Formulação dos meios de cultura.....	85
10.2. Seqüência de nucleotídeos da ORF cv3316 codificante da quitinase (CHI3316) de <i>C. violaceum</i>	86
10.3. Sequência de aminoácidos da quitinase (CHI3316) de <i>C. violaceum</i>	87
10.4. Organização estrutural da quitinase (CHI3316) de <i>C. violaceum</i>	87
10.5. Mapa de restrição do vetor de clonagem e expressão (pPICZ α A).....	88
10.6. Diagrama do vetor de clonagem e expressão (pPICZ α A) com indicação das posições dos sítios de restrição.....	89
10.7. Cristais da quitinase recombinante (rCHI3316) de <i>C. violaceum</i>	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo catalítico das quitinases	6
Figura 2	Alinhamento da seqüência de aminoácidos predita de uma quitinase (CHI3316) de <i>C. violaceum</i> com seqüências de quitinases que possuem estruturas tridimensionais resolvidas e depositadas no PDB	34-36
Figura 3	Sobreposição de estruturas gerada no formato <i>cartoon</i> e visualizada pelo programa <i>Pymol</i> , evidenciando a conservação de estruturas secundária e terciária do domínio catalítico (CaD) das quitinases da família 18 das glicosil hidrolases	37
Figura 4	Sobreposição de estruturas gerada no formato <i>ribbon</i> e visualizada pelo programa <i>Pymol</i> , evidenciando a seqüência de aminoácidos, ([LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIMVF]-[DN]-X-E) que é compartilhada entre os sítios ativos das quitinases pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases	38
Figura 5	Gráfico de Ramachandran para quitinase (CHI3316) gerado pelo programa <i>Procheck</i>	39
Figura 6	Gráfico da validação do modelo de menor energia da quitinase <i>C. violaceum</i> , CHI3316, gerado pelo programa <i>Procheck</i>	40
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose (1,0%) da amplificação da ORF cv3316 de <i>C. violaceum</i> por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de <i>C. violaceum</i>	42
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de produtos da digestão com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> do plasmídeo recombinante (pPICZ α A-CV3316) purificado de células de <i>E. coli</i> TOP10F'	42
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação da ORF cv3316 de <i>C. violaceum</i> por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de <i>P. Pastoris</i> GS115 transformadas com pPICZ α A-CV3316 para expressão extracelular	44

Figura 10	Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação da ORF cv3316 de <i>C. violaceum</i> por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de <i>P. Pastoris</i> KM71H transformadas com pPICZαA-CV3316 para expressão extracelular	44
Figura 11	Crescimento celular de <i>P. pastoris</i> (GS115 e KM71H) após indução com metanol 0,5% (v/v) em relação ao tempo (h)	48
Figura 12	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de <i>Pichia pastoris</i> GS115	49
Figura 13	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de <i>Pichia pastoris</i> GS115	50
Figura 14	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de <i>Pichia pastoris</i> KM71H	51
Figura 15	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de <i>Pichia pastoris</i> KM71H	52
Figura 16	Proteínas totais solúveis secretadas por <i>P. pastoris</i> no meio de cultura em relação ao tempo (h)	53
Figura 17	Atividade quitinolítica total detectada no meio livre de células de culturas de <i>P. pastoris</i>	56
Figura 18	Atividade quitinolítica específica detectada no meio livre de células de culturas de <i>P. pastoris</i>	57
Figura 19	Perfil cromatográfico do processo de purificação de uma quitinase recombinante de <i>C. violaceum</i> expressa em <i>P. pastoris</i> GS115	59

Figura 20	Efeito do pH sobre a atividade enzimática da quitinase recombinante (rCHI3316) de <i>C. violaceum</i> produzida em <i>P. pastoris</i> GS115	62
Figura 21	Espectro de CD (<i>FAR-UV</i>) da quitinase recombinante (rCHI3316) de <i>C. violaceum</i> expressa em células de <i>P. pastoris</i> GS115	63
Figura 22	Efeito da temperatura na estrutura secundária da quitinase recombinante (rCHI3316) monitorado por dicroísmo circular	65
Figura 23	Temperatura média de transição conformacional da quitinase recombinante (rCHI3316) quando submetida à variação de temperatura de 10 a 90 °C, determinada no comprimento de onda de 217 nm, em espectropolarímetro Jasco 815	65
Figura 24	Espectro de fluorescência da rCHI3316	67
Figura 25	Ação da quitinase recombinante (rCHI3316) sobre a germinação e crescimento micelial de fungos fitopatogênicos	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados do gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da quitinase CHI3316 gerado pelo programa <i>Procheck</i>	40
Tabela 2	Purificação da quitinase recombinante (rCHI3316) de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472	59
Tabela 3	Atividade específica (U/mgP) frente a diferentes substratos sintéticos da quitinase recombinante (rCHI3316) de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX1	Gene da álcool oxidase 1
AOX2	Gene da álcool oxidase 2
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMGY	Meio tamponado complexado com glicerol
BMMY	Meio tamponado complexado com metanol
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	Dicroísmo Circular
CTAB	Brometo de cetiltrimetil amônio
C-terminal	Sequência carboxi-terminal
cv	<i>Chromobacterium violaceum</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GlcNAc	N-acetil- β -D-glucosamina
LB (meio)	Luria-Bertani
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanômetro
N-terminal	Sequência amino-terminal
OD₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
ORF	Open Reading Frame – janela de leitura aberta
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rCHI3316	Quitinase 3316 recombinante de <i>C. violaceum</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

TE	Tampão Tris-EDTA
TEMED	N, N, N'. N'' – tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (com sulfato de amônio e sem aminoácidos)
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Medium</i>
YPDS	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Medium</i> (contendo sorbitol)

RESUMO

A utilização de microrganismos como sistemas heterólogos de expressão de proteínas tem se mostrado uma estratégia alternativa e/ou complementar aos passos tradicionais utilizados no processo de purificação de proteínas. Diante deste contexto, quitinases (EC 3.2.1.14), enzimas hidrolíticas capazes de degradar quitina, têm sido expressas em diferentes sistemas heterólogos, incluindo bactérias e leveduras. Quitina é um polímero linear composto de resíduos de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc), sendo um importante constituinte estrutural da carapaça de crustáceos e membrana peritrófica de insetos e, ainda, da parede celular de fungos. Este trabalho teve por objetivo expressar uma quitinase, codificada pela ORF cv3316, de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, estirpes GS115 e KM71H, além de purificar e caracterizar a proteína recombinante (rCHI3316). A estirpe GS115, portando a construção (pPIC α A - CV3316), foi selecionada para os experimentos posteriores, pois apresentou um maior nível de expressão quando comparada à cepa KM71H. Cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado foi utilizada para purificar a quitinase recombinante (rCHI3316), que foi eluída como um único pico com imidazol 0,04 M. A proteína purificada se mostrou homogênea quando submetida à eletroforese em gel de poli(acrilamida) 15% em presença de SDS e β -mercaptoetanol (SDS-PAGE). Nessas condições, uma única banda com massa molecular aparente de aproximadamente 87 kDa foi observada. A quitinase rCHI3316 de *C. violaceum* foi expressa de forma solúvel utilizando o sistema de expressão *P. pastoris* e, além disso, sua purificação foi realizada de forma satisfatória. O conteúdo de estrutura secundária foi estimado por espectroscopia de dicroísmo circular (CD), com a proteína submetida a diferentes temperaturas (10-90 °C). Na temperatura de 24 °C, o espectro de CD revelou a predominância do conteúdo de hélice alfa (38%), folha beta (26 %) e estrutura randômica (37%). Entre as temperaturas de 10-50 °C, rCHI3316 exibiu um espectro característico de folha beta. A partir de 60 °C até 90 °C, rCHI3316 adquiriu uma conformação característica de hélice alfa. A temperatura média para essa transição conformacional foi calculada como sendo $59,6 \pm 1,21$ °C. Experimentos de espectroscopia de fluorescência, com excitação a 280 e 290 nm, produziram espectros de emissão com comprimentos de onda máximos iguais a 339 e 342 nm, respectivamente. Esses valores são característicos de resíduos de triptofano parcialmente expostos ao solvente. Atividade quitinolítica contra vários substratos e dependência de pH da atividade enzimática da proteína pura foram avaliados. A rCHI3316 exibiu atividade hidrolítica sobre os substratos quitina coloidal (1.189,40 U/mgP), 4-nitrofenil N-N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo (30.411,0 U/mgP) e 4-nitrofenil N-N'-N''-triacetilquitotriose (13.150,0 U/mgP); entretanto, nenhuma atividade enzimática da rCHI3316 foi detectada frente a 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo. A enzima exibiu atividade quitinolítica ótima (100%) em pH 5,0; quando quitina coloidal foi utilizada como substrato. Em adição, a atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Penicillium herquei* foi investigada. rCHI3316 não inibiu a germinação e o crescimento micelial dos esporos dos fungos

testados, na concentração de $0,63 \text{ mgP.ml}^{-1}$. Estudos subseqüentes deverão ser realizados na intenção de descobrir potenciais aplicações desta proteína como uma ferramenta biológica no controle de outros fungos fitopatogênicos bem como insetos considerados pragas.

Palavras-chave: *C. violaceum*, *P. pastoris*, Quitinase e Expressão heteróloga.

ABSTRACT

Microorganisms are a valuable tool for the expression of proteins from a variety of sources, including plants, animals and other microorganisms. Thus, chitinases, a group of glycosyl hydrolases capable to hydrolyze chitin, have already been expressed and purified from different systems including bacteria and yeast. Chitin, a linear polymer of N-acetyl- β -D-glucosamine (GlcNAc), is an important structural component found in the crustacean shells, in the peritrophic membrane of insect guts as well as in the fungi cell walls. The aim of this work was to express a chitinase (encoded by the ORF CV3316) from *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71H. Furthermore, purification and partial characterization of the recombinant protein were also achieved. The GS115 strain carrying the expression cassette pPICZ α A-CV3316 was selected due to its higher expression level as compared to KM71H strain. Immobilized metal ion affinity chromatography was employed to purify the recombinant chitinase which was eluted as a single peak at 0.04 M imidazol. The homogeneity of the purified protein was confirmed as judged by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In these conditions, the recombinant chitinase migrated as a single protein band with an apparent molecular mass of about 87 kDa. Thus, a chitinase from *C. violaceum* ATCC 12472 was successfully expressed in *P. pastoris* and the soluble recombinant protein purified. The content of secondary structure was investigated by circular dichroism (CD) spectroscopy. At 24 °C the CD spectrum revealed secondary structure contents of 37% (alpha helix), 26% (beta sheet) and 38% (random coil). The CD spectra obtained in the temperature range 10-50 °C were characteristic of beta sheet. In contrast, the CD spectra generated in the range 60-90 °C were characteristic of alpha helix. The midpoint temperature of this conformational transition was 59.6 ± 1.2 °C as calculated from the CD experimental data. Fluorescence spectroscopy was carried out with excitation at 280 and 290 nm, producing emission spectra in which the wavelengths of maximum emission were 339 and 342 nm, respectively. This behavior is characteristic of tryptophan residues in limited contact with water. Chitinolytic activity against several substrates and the pH dependency of the enzymatic activity of the pure protein were all accessed. The purified enzyme showed hydrolytic activity on the following substrates: colloidal chitin (1,189.4 U.mgP⁻¹), 4-nitrophenyl N-N'-diacetyl- β -D-chitobioside (30,411.0 U.mgP⁻¹) and 4-nitrophenyl β -D-N-N'-N"-triacetylchitotriose (13,150.0 U.mgP⁻¹); and, respectively. In contrast, no activity was detected using 4-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide as substrate. The enzyme presented an optimal chitinolytic activity at pH 5.0 using colloidal chitin as a substrate. Additionally, the antifungal activity against the phytopathogenic fungi, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Penicillium herquei* was investigated. The recombinant chitinase did not inhibit the spore germination and the mycelium growth of the tested fungi, at the 0.63 mgP.ml⁻¹ concentration. Further studies should be carried out in order to discover potential applications of this protein as a biotechnological tool in the control of other phytopathogenic fungi as well as economically important pests.

Keywords: *C. violaceum*, *P. pastoris*, Chitinase and Heterologous expression.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o seqüenciamento de genoma de organismos pertencentes aos três domínios (Bacteria, Archaea e Eukarya) foi realizado (DUJON, 1996; BLATTNER *et al.*, 1997; SLESAREV *et al.*, 2002). Esses projetos de seqüenciamento visam entender melhor a regulação e função biológica dos genes, interação entre genótipo e fenótipo, história evolutiva desses organismos e, além disso, fornecem informações para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos (TOMB *et al.*, 1997; BORK *et al.*, 1998; ARBOURG e ROUZÉ, 2001; FOURNIER *et al.*, 2007). A repercussão dessa revolução em genomas é notável em relação ao conhecimento e à economia (ARBOURG e ROUZÉ, 2001; FERNANDES, 2010).

Neste contexto, estudo de genomas de microrganismos tem contribuído para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para a agricultura, que poderão ser utilizados no combate às pragas e doenças vegetais (VODOVAR *et al.*, 2006). Dentre os genomas de microrganismos seqüenciados, destaca-se o de *Chromobacterium violaceum*, pois este seqüenciamento trouxe um maior entendimento do potencial biotecnológico desta bactéria, bem como a elucidação dos mecanismos e estratégias relacionadas à sua adaptabilidade a diferentes ambientes. O genoma de *Chromobacterium violaceum* estirpe ATCC 12472 foi completamente seqüenciado por um consórcio de laboratórios, integrantes do Projeto Genoma Brasileiro (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

C. violaceum é uma β -proteobactéria Gram-negativa de vida livre presente na água e no solo, descrita pela primeira vez no século XIX (BOISBAUDRAN, 1882; DURÁN e MENCK, 2001). Esta bactéria domina uma vasta área das regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, ela é encontrada nas águas do Rio Negro, o principal afluente do Rio Amazonas (CALDAS, 1990) e nas últimas três décadas têm sido amplamente estudada devido à rica fonte de genes com potenciais biotecnológico e médico (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

A conclusão do seqüenciamento do genoma de *C. violaceum* tem fornecido um panorama mais detalhado da complexidade molecular requerida para se entender a versatilidade desse organismo, assim como um grande número de fases

de leitura aberta (ORF – Open Reading Frame) que aumentou o potencial biotecnológico dessa bactéria de forma marcante. Dentre estas ORFs encontradas, estão algumas que codificam quitinases, as quais podem agir como potentes agentes biológicos no controle de insetos, fungos e nematódeos (PATIL *et al.*, 2000).

Quitinases de origem vegetal são proteínas relacionadas à patogênese (PR) que desempenham papel essencial na defesa de plantas por meio de um ataque direto à quitina, que é o principal componente estrutural de insetos e fungos (COLLINGE *et al.*, 1993; KASPRZEWSKA, 2003). De acordo com Van Loon *et al.* (2006), existem 17 famílias de proteínas relacionadas à patogênese. Sendo que a maioria das quitinases até, então, estudadas pertence à família PR-3 e poucas quitinases pertencem às famílias PR-4, PR-8 e PR-11 (WONG *et al.*, 2010). Essas enzimas são as proteínas PR mais amplamente usadas na engenharia genética no que diz respeito à defesa de plantas, pois possuem um mecanismo de ação bem definido e atuam sobre uma grande diversidade de fungos fitopatogênicos (SHAKHBAZAU e KARTEL, 2008).

Em bactéria, estas proteínas estão envolvidas principalmente na nutrição e no parasitismo (COHEN-KUPIEC e CHET, 1998). A maioria das quitinases bacterianas pertence à família 18 das glicosil hidrolases. Entretanto há relato de quitinase pertencentes à família 19 (OHNO *et al.*, 1996; KAWASE *et al.*, 2004). Estas proteínas também podem ser usadas no biocontrole de fungos fitopatogênicos (ORDENTLICH *et al.*, 1998; SHAKHBAZAU e KARTEL, 2008).

Tendo em vista o potencial biotecnológico das quitinases bacterianas no combate a fungos fitopatogênicos a purificação destas proteínas tem sido objeto de estudo de vários trabalhos. Contudo, o baixo rendimento tipicamente encontrado nos tecidos onde tais enzimas são expressas, aliado à necessidade de laboriosos e dispendiosos processos de purificação, tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas heterólogos de expressão para purificação destas moléculas (SØRENSEN e MORTENSEN, 2005; DEREWENDA, 2004). Dentre os sistemas de expressão de proteínas recombinantes mais utilizados estão *Escherichia coli*, leveduras, insetos, plantas e células de mamíferos (DESAI *et al.*, 2010).

A expressão e purificação de quitinases recombinantes de origem bacteriana têm sido relatadas de forma satisfatória (JANG *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006; YONG *et al.*, 2006; KADOKURA, *et al.*, 2007; PARK, *et al.*, 2008; YANG, *et al.*, 2008).

Esses autores têm ressaltado a importância dessas proteínas como inibidores do crescimento de fungos fitopatogênicos.

Este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão de uma ORF cv3316 codificadora de uma quitinase de *C. violaceum* na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, estirpes GS115 e KM71H. Além disso, a purificação e caracterização bioquímica e estrutural da proteína recombinante, bem como sua atividade biológica contra fungos fitopatogênicos também foram avaliadas. *P. pastoris* foi escolhida como sistema heterólogo de expressão por tratar-se de um excelente hospedeiro para produção de proteínas recombinantes, sejam estas de origem procariótica ou eucariótica (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Vantagens adicionais no uso de células de *P. pastoris* incluem sua maior facilidade de cultivo, quando comparado a células de mamíferos, capacidade de expressar proteínas recombinantes corretamente enoveladas e solúveis e alta densidade celular atingida durante seu cultivo. A capacidade de realizar modificações pós-traducionais requeridas para a correta funcionalidade da proteína representa uma vantagem adicional do uso de *P. pastoris*, sobre o sistema procariótico *Escherichia coli*, que, geralmente, é incapaz de produzir tais modificações. Em adição, os promotores de genes presentes em *P. pastoris* são os mais fortes e estritamente regulados de leveduras e atuam no controle da expressão de genes de interesse (DAILY e HEARN, 2005; DEMAINE e VAISHNAV, 2009).

A produção heteróloga de quitinases de *C. violaceum* em *P. pastoris*, e posterior caracterização bioquímica, contribuirá para o entendimento da função biológica e poderá confirmar o potencial destas proteínas no biocontrole de fungos fitopatogênicos.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas capazes de hidrolisar quitina, um polímero linear de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), cujos resíduos são unidos por ligações β -(1-4) (COHEN-KUPIEC e CHET, 1998; KASPRZEWSKA, 2003; FUNKHOUSER e ARONSON-JR., 2007; WANG e YANG, 2009; ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010). Estas proteínas são encontradas em arqueobactérias, eubactérias, protistas, fungos, plantas e animais, incluindo artrópodes e mamíferos (LI e GREENE, 2010). Em bactérias e fungos, quitinases utilizam quitina como fonte de carbono e nitrogênio (ARONSON-JR. *et al.*, 2003; LI, 2006). Estas enzimas são essenciais para a renovação da parede celular de fungos durante a divisão celular (ADAMS, 2004) e em algumas plantas podem ser importantes na inibição de alguns fungos fitopatogênicos (TAIRA *et al.*, 2002; PRAKASH *et al.*, 2010). Além disso, plantas transgênicas portando genes que codificam quitinases e/ou em combinação com outras proteínas inseticidas podem ser usadas no biocontrole de pragas (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010).

A classificação de quitinases ocorre em duas principais categorias: endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases clivam quitina em sítios internos que geram oligossacarídeos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) de baixa massa molecular, tais como quitotetrose, quitotriose e di-acetilquitobiose. Já as exoquitinases são divididas em duas categorias menores: quitobiosidases (EC 3.2.1.14) que catalisam a liberação de di-acetilquitobioses a partir da extremidade não-redutora do polímero de quitina; e β -1,4-N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.30) que clivam oligossacarídeos produtos de endoquitinases e quitobiosidases, produzindo GlcNAc (SAHAI *et al.*, 1993; HARMAN *et al.*, 1993; SHAKHBAZAU e KARTEL, 2008).

Com base na similaridade da seqüência de aminoácido das glicosilhidrolases, quitinases foram agrupadas em duas famílias 18, 19 (HENRISSAT, 1991). Os membros das famílias 18 e 19 diferem nas suas seqüências de aminoácidos, nas suas estruturas tridimensionais, nos seus mecanismos moleculares das reações

catalíticas (ARONSON *et al.*, 2003) e possuem origens evolucionárias diferentes (KAWASE *et al.*, 2004).

As proteínas da família 18 caracterizam-se por possuir uma estrutura em barril constituída de 8 hélices alfa e 8 folhas beta e, também, por utilizar um mecanismo de catálise assistida pelo substrato, resultando na retenção da conformação do carbono anomérico do produto (Figura 1), (DAVIES e HENRISSAT, 1995; OHNO *et al.* 1996; VAN AALTEN *et al.*, 2001). Essas enzimas são distribuídas em uma diversidade de organismos, como arqueobactérias, eubactérias, fungos, vírus, plantas e animais (LI e GREENE, 2010).

A família 19 é encontrada principalmente em plantas, nematódeos, e algumas bactérias (KASPRZEWSKA, 2003; KAWASE *et al.*, 2004). Os membros dessa família apresentam estrutura rica em hélice alfa e utilizam o mecanismo de catálise ácida, que resulta na inversão da configuração do carbono anomérico do produto (Figura1), (OHNO *et al.*, 1996; BRAMELD e GODDARD III, 1998).

O principal substrato das quitinases é quitina $(C_8H_{13}O_5)_n$, um homopolissacarídeo longo, linear e não ramificado, formado por subunidades de N-acetil-D-glucosamina ligadas através de ligações glicosídicas β 1-4 (WATANABE *et al.*, 1999; KASPRZEWSKA, 2003; GORTARI e HOURS, 2008; PRAKASH *et al.*, 2010). Após a celulose, quitina é o segundo polímero mais abundante na biosfera (THARANATHAN e KITTUR, 2003). Ela também provê um reforço estrutural ao exoesqueleto de invertebrados e é um componente essencial de parede celular de fungos (WATANABE *et al.*, 1999). Estudos de difração de raios-x revelam que a quitina ocorre em três formas α -quitina, β -quitina e γ -quitina. A α -quitina, que é a forma mais abundante, está organizada de modo antiparalelo, enquanto que β -quitina está arranjada de forma paralela e γ -quitina apresenta uma forma mista constituída de cadeias paralelas e antiparalelas (DAHIYA *et al.*, 2006).

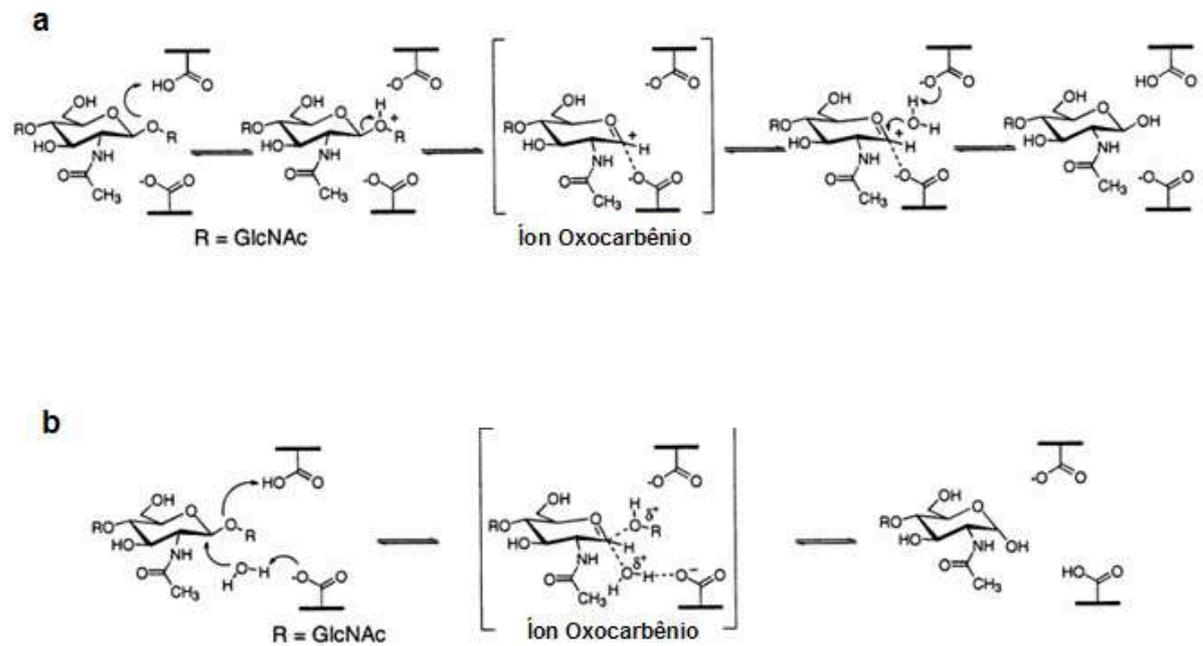


Figura 1. Mecanismo catalítico das quitinases. (a) mecanismo de hidrólise assistida pelo substrato proposto para família 18 das glicosilhidrolases. Protonação do GlcNAc produz um intermediário oxazolina, que pode ser hidrolisado resultando na retenção da configuração anomérica do produto. (b) mecanismo de hidrólise ácida do substrato proposto para família 19 das glicosilhidrolases. Dois ácidos são requeridos no sítio ativo e a hidrólise resulta na inversão do carbono anomérico do produto. Figura retirada de Dahiya *et al.* (2006).

2.2. Quitinases bacterianas

Quitinases bacterianas são encontradas nas famílias 18 e 19 das glicosil hidrolases, mas a maioria dessas enzimas bacterianas são membros da família 18. Essas proteínas são constituídas de múltiplos domínios, tais como domínios de ligação à quitina (ChBDs), domínios semelhantes a fibronectina do tipo-3 (Fn3) ligados ao domínio catalítico (SUZUKI *et al.* 1999). Estas enzimas são importantes na nutrição e parasitismo. Em adição, as quitinases geram quitooligossacarídeos que atuam como agentes antibacterianos, elicitores de lisozimas e no controle patógenos de plantas (DAHIYA *et al.*, 2006).

Com base na similaridade de seqüência de aminoácidos do domínio catalítico, quitinases bacterianas da família 18 foram subdivididas em três subfamílias: A; B; e C (WATANABE *et al.* 1994; SUZUKI *et al.*, 2002; IKEDA *et al.*, 2007). A Subfamília A possui quitinases com regiões, que exibem alta identidade com o domínio catalítico de ChiA1 de *Bacillus circulans*. A subfamília B apresenta quitinases com domínios catalíticos com alta similaridade em relação ao domínio catalítico de ChiD de *B. circulans*. Quitinases da subfamília C não apresentaram identidade com nenhum dos dois domínios (ChiA1 e ChiD) de *B. circulans*.

A família 19 das glicosil hidrolases é caracterizada por possuir, em sua maioria, quitinases de plantas (HENRISSAT, 1991; AKAGI *et al.*, 2006). Entretanto após a descoberta da quitinase C (ChiC) de *Streptomyces griseus* HUT6037 (OHNO *et al.*, 1996), outras enzimas quitinolíticas da família 19 têm sido encontradas em outras espécies de *Streptomyces* (WATANABE *et al.*, 1999), nematódeos e actinobactérias (KAWASE *et al.*, 2004).

2.3. Expressão Heteróloga

A expressão heteróloga é uma importante ferramenta para o estudo de processos biológicos e envolve a transferência de um fragmento de DNA, que codifica um produto biológico funcional, para um sistema hospedeiro (YESILIRMAK e SAYERS, 2009).

Para o desenvolvimento de sistemas recombinantes de expressão, é necessário um plasmídeo ou vetor portando uma origem de replicação (*ori*), um

marcador seletivo de resistência a antibiótico, promotores transcricionais, regiões de iniciação da tradução (TIRs), bem como regiões terminadoras da transcrição e tradução (SØRENSEN e MORTENSEN, 2004).

Sistemas de expressão são escolhidos levando em consideração a massa molecular da proteína de interesse, número de pontes dissulfetos, tipo de modificações pós-traducionais desejadas e destino da proteína expressa (BURGESS e DEUTSCHER, 2009). Além disso, os sistemas de expressão, também, são selecionados, se o objetivo é estudar a produção em larga de proteínas ou investigar os detalhes funcionais da proteína expressa, bem como propriedades físico-químicas são relevantes nessa escolha (YESILIRMAK e SAYERS, 2009).

Os vetores comumente usados são aqueles que portam seqüências de aminoácidos adicionais (“TAGs” ou cauda) para facilitar a purificação da proteína de interesse. Diferentes proteínas, domínios e peptídeos podem ser fusionados com a proteína alvo. Então, as vantagens de usar caudas são para facilitar a purificação e a detecção da proteína de interesse. Os “TAGs” mais utilizadas são: cauda de poliarginina (Arg-tag), cauda de polihistidina (His-tag), Flag-tag, Strep-tag (estreptavidina), epítipo c-myc-tag, S-tag, peptídeo de ligação à calmodulina, domínio de ligação à celulose, SBP-tag (peptídeo de ligação à estreptavidina), domínio de ligação à quitina de *Bacillus circulans*, Glutathione S-transferase-tag (GST), proteína de ligação à maltose e caudas hidrofílicas (NusA, TrxA, DsbA) (TERPE, 2002; ARNAU *et al.* 2006).

Neste contexto, há uma grande variedade de sistemas de expressão disponíveis. Proteínas podem ser expressas em culturas de células de *E.coli*, leveduras, insetos, plantas e mamíferos (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

E. coli é o primeiro e mais usado sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes (FROMMER e NINNEMANN, 1999). Esse sistema é primeiramente escolhido devido à sua simplicidade de cultivo, rápido crescimento e baixo custo (YESILIRMAK e SAYERS, 2009; BURGESS e DEUTSCHER, 2009). Uma desvantagem deste sistema é a sua incapacidade de realizar modificações pós-traducionais, que é requerida para correto enovelamento e atividade da proteína alvo (YIN *et al.*, 2007).

Outra estratégia de expressão de proteínas recombinantes muito requerida são leveduras. Estes microrganismos são eucariotos unicelulares com características bioquímicas, genéticas e moleculares semelhantes aos eucariotos

superiores, dessa forma, podem ser utilizadas na produção de proteínas recombinantes. Estes microrganismos possuem rápida taxa de multiplicação com alta densidade de células, facilidade de manipulação e o custo relativamente menor que outros sistemas, como as células de mamíferos (YESILIRMAK e SAYERS, 2009). As duas leveduras mais utilizadas como sistemas de expressão são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (BURGESS e DEUTSCHER, 2009).

A levedura *S. cerevisiae* possui informações genéticas e fisiológicas bem caracterizadas e apresenta mecanismos de modificações pós-traducionais similares aos encontrados em plantas (COLIGAN *et al.*, 2007). As principais limitações ao uso deste sistema são baixo rendimento de proteínas, estresse celular devido à presença do gene exógeno e produção de proteínas secretadas hiperglicosiladas (YESILIRMAK e SAYERS, 2009; COLIGAN *et al.*, 2007).

P. pastoris é uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. Atualmente, este microrganismo é bastante utilizado como sistema de expressão heteróloga, devido a sua capacidade de sintetizar proteínas com alto rendimento e realizar processamento pós-traducional, além de fácil cultivo e das várias cepas e vetores disponíveis no mercado (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Nesse sistema de expressão, o gene de interesse está sob o controle do promotor da álcool oxidase (*AOX1*) que é fortemente reprimido por glucose ou glicerol e é induzido quando a única fonte de carbono disponível é o metanol (CEREGHINO *et al.*, 2002).

Em adição ao uso de microrganismos para síntese de proteínas heretólogas, eucariotos superiores (insetos, plantas e mamíferos) também têm sido amplamente requeridos para a produção de proteínas recombinantes (YESILIRMAK e SAYERS, 2009)

2.3.1. Expressão heteróloga de quitinases em microrganismos

O uso de microrganismos como sistema de expressão heteróloga de proteínas tem contribuído para o desenvolvimento da biotecnologia, além do entendimento do próprio organismo (PATIL *et al.*, 2000). Neste contexto, a expressão de quitinases recombinantes em *E.coli* tem sido relatada (CHERNIN *et al.*, 1997; MITSUTOMI *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*; 1998).

Em adição, duas quitinases (Chi 25 e Chi 35) da bactéria *Streptomyces thermophilus* foram expressas em *E. coli* (TSUJIBO *et al.*, 2001). Outro exemplo, Park *et al.* (2007) expressaram uma quitinase, Chi54, de *C. violaceum* em *E. coli* de forma solúvel.

Muitas quitinases vegetais têm sido expressas em *E. coli*, como a de classe I de feijão-de-corda (CORREIA, 2007), a de banana (FAN *et al.*, 2007), de cevada (KIRUBAKARAN e SAKTHIVEL, 2007) e de arroz (MIZUNO *et al.*, 2008). A levedura metilotrófica *P. pastoris* é outro microrganismo bastante utilizado para a produção de várias proteínas heterólogas (CREGG e CEREGHINO, 2000). Por exemplo, Fan *et al.* (2007) expressaram uma quitinase de *Beauveria bassiana* (Bbchit1) em *P. pastoris*, sendo a levedura capaz de produzir 153 mg de proteína por litro, enquanto que a expressão da mesma proteína em *E.coli* foi 50 mg/L. A expressão de quitinases de *Oryza sativa* e de fungos demonstrou que *P. pastoris* é um excelente microrganismo para produção de proteínas recombinantes (Park *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; WANG e YANG, 2009; LIU *et al.*, 2010). Adicionalmente, uma endoquitinase (rChi21702), pertencente à família 18, isolada da bactéria *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702, foi expressa de forma satisfatória em *P. pastoris* e com rendimento de 1 mg de rChi21702 por litro de cultura (Lee *et al.*, 2010).

Síntese de quitinases recombinantes em microrganismos tem se mostrado uma ferramenta adequada para a produção, em larga escala, destas proteínas, além de contribuir para o entendimento dos mecanismos de regulação da expressão destes genes.

2.4. Fungos Fitopatogênicos

Fungos constituem um grupo numeroso de organismos bastante diversificado filogeneticamente e de grande importância ecológica e econômica (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995). Estes microrganismos podem colonizar tecidos de plantas, animais e humanos (SELINTRENIKOFF, 2001).

Historicamente, fungos fitopatogênicos têm sido responsáveis por algumas das mais importantes doenças que acometem plantas e continuam a produzir sérios problemas econômicos a muitas culturas (LEE *et al.* 2003). Dentre estes fungos patogênicos, destacam-se alguns gêneros, como *Rhizoctonia*, *Fusarium* e *Penicillium*.

R. solani é um fungo fitopatogênico pertencente ao filo Basidiomycota e à ordem Ceratobasidiales (AGRIOS, 2005). Este microrganismo causa tombamento e queima das folhas. Além disso, *R. solani* só ocorre na forma micelial, não produzindo esporos e sobrevivendo no solo através da formação de escleródios (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995; KUNIEDA-ALONSO *et al.*, 2005).

Outro importante gênero é *Penicillium*, que constituído por fungos conidiais sapróbios, os conhecidos agentes de mofos e bolores presentes em diferentes substratos. Estes fungos são fracos patógenos e atacam órgão de reservas, como sementes e frutos (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995). *Penicillium* é o agente causador dos bolores azul ou verde dos citros, podridões de fruto observadas na fase pós-colheita, além de produzir micotoxinas em sementes (AGRIOS, 2005).

O gênero *Fusarium* pertence ao filo Ascomycota e ordem Hypocreales. Muitas espécies desse gênero têm grande importância fitopatológica e estão associados com o tombamento, podridões de raiz, murchas vasculares e deterioração de sementes (AGRIOS, 2005).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma das principais fontes de proteína para a população de baixa renda, principalmente nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil (SARTORATO *et al.*, 2006). Infelizmente, essa leguminosa é susceptível a várias doenças, tais como murcha de fusário (*F. oxysporum*), podridão radicular seca (*F. solani*), murcha de teia micélica (*R. solani*), podridão cinzenta da haste (*Macrophomina phaseolina*) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (LOBO-JUNIOR, 2005).

Outra cultura de grande relevância que contribui para geração de empregos e arrecadação de impostos para a economia nacional, a cafeicultura, também é susceptível à ação de fungos. Destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que diminuem a qualidade dos grãos de café e produzem micotoxinas (PASIN *et al.*, 2009).

2.5. Atividade antifúngica de quitinases

Fungos são agentes causadores de muitas das principais doenças em plantas. Eles são os únicos patógenos microbianos capazes de penetrar à superfície intacta da planta, ocasionando rapidamente infecções que podem gerar graves perdas econômicas para agricultura (SOANES *et al.*, 2007). Entretanto, a despeito disso, os vegetais apresentam elaborados mecanismos de defesa, incluindo a síntese de proteínas e peptídeos com atividade antifúngica (KITAJIMA e SATO, 1999).

Substâncias com propriedades antifúngicas também são sintetizadas por bactérias, fungos, insetos, moluscos e mamíferos. Muitas dessas substâncias são proteínas e peptídeos que estão envolvidas na resistência constitutiva ou induzida pelo ataque de fungos patogênicos (SELINTRENNIKOFF, 2001). Entre essas proteínas, estão as quitinases, que possuem a capacidade de inibir o crescimento de fungos.

O principal alvo das quitinases em relação aos fungos patogênicos é sua parede celular, constituída por quitina (22-44%), glicanos, lipídeos e peptídeos (SHAKHBAZAU e KARTEL, 2008).

Baseado nas informações acima citadas, quitinases isoladas de vírus, bactérias, fungos, plantas e animais têm potencial para inibir uma grande variedade de fungos patogênicos (SHAKHBAZAU e KARTEL, 2008; SELINTRENNIKOFF, 2001). Por exemplo, Ghasemi *et al.*(2010) relataram a inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* pela ação de 2 quitinases (ChiS e ChiL) isoladas de *Bacillus pumillus* SG2.

Liu *et al.*(2010) descreveram a expressão de uma quitinase recombinante de *Bacillus thuringiensis* subespécie colmeri 15A3 (Bt.15A3) em *E.coli* e esta enzima

inibiu a germinação de esporos de *Penicillium glaucum* com uma concentração inibitória mínima de 11,27 µg/mL.

Apesar do excelente potencial de quitinases como agentes no controle de fitopatógenos, algumas quitinases não apresentam atividade antifúngica. Por exemplo, LIMA (2004) descreveu o isolamento de uma quitinase (Fqpbe) de folha de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) que não inibiu o crescimento micelial dos fungos: *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum truncatum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Lasioidiploidia theobromae* e uma espécie do gênero *Phytium* spp. Finalmente, Kawase *et al.* (2006) relataram expressão duas quitinases (Ch18bA e Chi18aC) de *Streptomyces coelicolor*, pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases, em células de *E.coli*. Ambas as proteínas não inibiram o crescimento dos fungos *Trichoderma viride*, *Trichoderma Reesei* e *Mucor javanicus*.

Quitinases são proteínas importantes no biocontrole de fungos fitopatogênicos, apesar de algumas dessas enzimas não inibirem o crescimento desses microrganismos. Desse modo, é necessário um maior entendimento dessas moléculas e de seus mecanismos de ação a fim de usar o verdadeiro potencial das quitinases no controle de patógenos de plantas.

3. PERGUNTA BIOLÓGICA

“O potencial biotecnológico de quitinases bacterianas no controle de fungos fitopatogênicos tem sido observado na literatura. O seqüenciamento do genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 revelou algumas ORFs, que codificam quitinases (VASCONCELOS *et al.*, 2003).” Com base nessas informações, postularam-se as seguintes perguntas biológicas:

1 - A ORF cv3316, que codifica uma quitinase de *C. violaceum*, será expressa corretamente no sistema heterólogo *Pichia pastoris*?

2- Essa quitinase recombinante (rCHI3316) de *C. violaceum*, sendo corretamente expressa em células de *Pichia pastoris*, apresenta atividade antifúngica sobre fungos fitopatogênicos?

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- ❖ Caracterizar uma quitinase recombinante (rCHI3316) de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 expressa em *Pichia pastoris* e avaliar o potencial da mesma no controle de fungos fitopatogênicos.

4.2. Específicos

- ❖ Induzir a expressão da rCHI3316 em células de *P. pastoris* GS115 e KM71H;
- ❖ Purificar a rCHI3316 por cromatografia de afinidade covalentemente acoplada com níquel;
- ❖ Caracterizar bioquimicamente a rCHI3316 através da: atividade quitinolítica contra diferentes substratos e determinação do pH ótimo de atividade enzimática;
- ❖ Caracterizar estruturalmente a rCHI3316 através de determinação do(a): espectro de dicroísmo circular, espectro de fluorescência, estabilidade estrutural frente a diferentes temperaturas e modelagem molecular por homologia;
- ❖ Avaliar os possíveis efeitos da rCHI3316 sobre a germinação e crescimento vegetativo de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos: *F. solani*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *P. herquei*.

5. Material

5.1. Bactérias e Leveduras

Escherichia coli TOP10F' foi usada nos experimentos de clonagem da ORF cv3316 de *Chromobacterium violaceum* e as células da levedura *Pichia pastoris* estirpes GS115 e KM71H (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas na subclonagem e expressão da ORF cv3316 codificadora da quitinase.

5.2. Enzimas

As enzimas *EcoRI* (10 U/ μ L), *XbaI* (10 U/ μ L), *SacI* (10 U/ μ L) e DNA T4 ligase (10 U/ μ L), acompanhadas dos seus respectivos tampões de reação foram obtidas da Fermentas Life Sciences, EUA. Phusion DNA polimerase (2 U/ μ L) foi adquirida da Finzymes (Finlândia). Go *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L) e Ribonuclease I "A" (pâncreas bovino), também acompanhadas dos seus respectivos tampões de reação foram obtidas da Promega (Wisconsin, EUA) e Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), respectivamente.

5.3. Plasmídeos

DNA genômico de *C. violaceum* foi utilizado como molde para amplificação da ORF cv3316 (2376 pb) por PCR, seguido da clonagem do amplicon no plasmídeo pPICZ α A (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O pPICZ α A (3600 pb) foi utilizado como vetor de clonagem em células de *E. coli* TOP10F' e vetor de expressão em células de *P. pastoris* GS115 e KM71H. Após a linearização, o plasmídeo contendo a ORF cv3316 foi inserido no genoma das células de *P. pastoris* GS115 e KM71H.

5.4. Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores (*Eco*3316, *Xba*3316) complementares à ORF cv3316 e (*AOX*5' e *AOX*3') complementares ao vetor pPICZαA foram sintetizados pela IDT ("Integrated DNA Technologies", San Diego, CA, EUA). O kit de purificação de DNA ("ILLustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification") foi adquirido da (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Os meios de cultura para *E.coli* (LB Low salt – Ágar), *P. pastoris* (YPD - Ágar, YPDS – Ágar, BMGY e BMMY; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) tem suas fórmulas descritas nos anexos. Os antibióticos: estreptomicina (50 mg/mL), Zeocina (100 mg/mL) foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Todos os demais reagentes usados na realização dos experimentos descritos neste trabalho foram de grau analítico e adquiridos de empresas locais.

6. Métodos

6.1. Alinhamento de seqüências e modelagem molecular por homologia

A seqüência de aminoácidos da quitinase deduzida a partir da seqüência de ORF cv3316 de *Chromobacterium violaceum* depositada no Genbank (número de acesso AE016825) foi comparada ao banco de dados de estruturas de proteínas resolvidas (Protein Data Bank - PDB) por meio da ferramenta de alinhamento BLASTp (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Após esta busca, o alinhamento de seqüências foi realizado com as seqüências de proteínas depositadas no PDB, que apresentaram identidade $\geq 30\%$, utilizando o programa *CLC Sequence Viewer* 6.4.

A modelagem por homologia da quitinase foi realizada conforme o padrão de preferência pela estrutura 3D disponível de maior identidade. Logo, a estrutura que apresentou maior identidade com a proteína de interesse (CHI3316), 30%, foi o domínio catalítico da quitinase A1 de *Bacillus circulans* WL-12 (código de acesso 1ITX) resolvido a uma resolução de 1,10 Angstroms por Matsumoto *et al.* (1999). Para quitinase CHI3316, 100 modelos foram gerados pelo programa *Modeller* (SALLI e BLUNDELL, 1993). Os critérios de seleção para escolha do melhor modelo foram a função energética e qualidade do mapa de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963) gerados pelo programa *Procheck* (LASKOWSKI *et al.*, 1993). O modelo com a menor energia gerado e o melhor mapa de Ramachandran foi selecionado, ou seja, o escolhido foi o de energia mais baixa no caso de haver mais de um modelo com quantidades iguais de resíduos fora das regiões favoráveis. O mapa de Ramachandran exibe a distribuição dos ângulos torsionais ϕ e ψ para cada aminoácido. Há regiões energéticas para cada resíduo e a presença de um aminoácido fora dessas regiões indica um erro ou algum fenômeno não convencional naquele local, como uma forte interação causando o deslocamento. Informações adicionais a respeito da qualidade dos modelos foram verificadas com o uso do programa *Verify3D* (BOWIE *et al.*, 1991).

O programa *Verify3D* segundo Bowie *et al.* (1991) interpreta a verossimilhança da vizinhança de cada aminoácido através de três propriedades: a

área exposta ao solvente, a fração da área da cadeia lateral coberta por átomos polares e a estrutura secundária local. A interação destes três parâmetros permite colocar o resíduo em uma das dezoito regiões. Assim, cada tipo de resíduo possui um escore que reflete a sua compatibilidade com tal região (definida estatisticamente através de proteínas de estrutura conhecida). A análise dos modelos escolhidos foi feita através do programa *Pymol* (DELANO, 2002), que é responsável pela visualização das ilustrações dos modelos.

6.2. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores específicos (*Eco3316* e *Xba3316*) para a ORF cv3316 (2376 pb), codificante de uma quitinase de *C. violaceum*, foram desenhados com base na seqüência depositada no banco de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov), com número de acesso AE016825, com a adição de sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *XbaI*. Em adição, iniciadores complementares (AOX5' e AOX3') às regiões do vetor (pPICZ) também foram desenhados. Os oligonucleotídeos iniciadores (*Eco3316* e *Xba3316*) foram utilizados, objetivando a clonagem da ORF cv3316 no vetor de clonagem e expressão (pPICZαA), além disso, outro par de oligonucleotídeos foram usados para confirmar a integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A sequência de bases nitrogenadas dos iniciadores é 5' – CCGGAATTCAGCAAGACCCTGATGCTTGT – 3' (Iniciador senso, *Eco3316*, com sítio para *EcoRI* sublinhado); 5' – GACTGGTTCCAATTGACAAGC – 3' (Iniciador senso, AOX5'); 5' - CCGTCTAGAACGCGCAGATAAGGCAGGTAG – 3' (Iniciador anti-senso, *Xba3316*, com sítio para *XbaI* sublinhado) e 5' – GCAAATGGCATTCTGACATCC – 3' (Iniciador anti-senso, AOX3').

6.3. Transformação de células de *E.coli* TOP10F' com o plasmídeo recombinante

As células eletrocompetentes de *E. coli* foram transformadas com o plasmídeo pPICZ α A contendo a ORF cv3316, que codifica para quitinase. A metodologia para obtenção das células eletrocompetentes foi realizada segundo o protocolo cedido pelo Professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, da UNESP, campus Jaboticabal - São Paulo. As células eletrocompetentes de *E. coli* foram preparadas a partir da cepa TOP10F'. Para produção das células eletrocompetentes, 100 μ L da cepa mantida em estoque glicerol foram utilizados e inoculados em placa de Petri com 25 mL meio LB Agar (peptona de caseína 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 171 mM, pH 7,2) contendo 30 μ g/mL de estreptomicina. As placas foram incubadas a 16 °C por 16 horas. Com auxílio de um palito estéril, uma colônia isolada foi coletada de cada placa e inoculada em 10 mL de meio LB caldo, contendo estreptomicina (30 μ g/mL) em frascos erlenmeyers de 50 mL. Os frascos contendo o pré-inóculo foram incubados a 37 °C por 16 h sob agitação orbital de 250 rpm. Das culturas obtidas, 5 mL foram inoculados em 500 mL de meio 2xYT (peptona de caseína 1,6%, extrato de levedura 1,0%, NaCl 85,5 mM, pH 7,2) seguido por incubação a 37 °C, sob agitação de 250 rpm. Quando a absorbância a 600 nm (A_{600}) da cultura atingiu um valor de 0,4–0,6, as células foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos de centrifuga de 30 mL, centrifugadas a 10.000 x g, a 4 °C por 20 minutos. Depois de repetidas centrifugações para sedimentação completa, o *pellet* celular foi ressuspensão em 20 mL de água Milli-Q estéril resfriada para lavagem das células e depois centrifugado nas condições previamente citadas. Após a lavagem com água Milli-Q, o *pellet* celular foi ressuspensão, 3 vezes, em 10 mL de glicerol 10% (v/v), estéril, e resfriado, seguido de centrifugação para a recuperação do *pellet* celular. Finalmente, as células foram ressuspensas em um volume variando de 1,0 a 1,5 mL de meio GYT (glicerol 10%, extrato de levedura 0,125%, triptona 0,25%, pH 7,0). Aliquotas de 50 μ L das células eletrocompetentes foram distribuídas em tubos de microcentrifugas de 1,5 mL, devidamente identificados, e armazenados a – 80 °C, para posterior uso.

Antes de iniciar a transformação das células eletrocompetentes de *E. coli*, uma PCR foi realizada com a enzima de alta fidelidade (Phusion DNA Polimerase) e oligonucleotídeos específicos (*Eco3316* e *Xba3316*) para a quitinase (*cv3316*), tendo como molde, DNA genômico de *C. violaceum*. Na reação de 20 μL , foram aplicados: 4,0 μL de tampão 5X Phusion HF (1,5 mM de MgCl_2), 4,0 μL dNTPs (1 mM), 2,0 μL de cada iniciador (5 μM), 6,0 μL de DNA molde (300 ng), 1,2 μL de H_2O Milli-Q, 0,6 μL DMSO (3%) e 0,2 μL de Phusion DNA Polimerase. Em seguida, o produto amplificado da PCR foi ligado no plasmídeo pPICZ α A com o uso da enzima DNA T4 ligase. A ligação foi realizada em duas etapas: 1) incubação a 22 °C por 16 horas e 2) inativação da enzima DNA T4 ligase a 65 °C por 10 minutos, em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após a ligação, os materiais clonados no vetor pPICZ α A foram eletroporados a 2.500 V (eletroporador 2510, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em células de *E. coli* TOP10F'. Logo após, 1 mL de meio SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl_2 10 mM, glucose 20 mM, pH 7,0) pré-aquecido a 37 °C foi adicionado às células eletroporadas e estas foram mantidas a 37 °C por 1 hora, sem agitação. Assim, 100 μL da solução contendo as células eletroporadas foram inoculadas em placa de Petri (100 x 20 mm), contendo 30 mL de meio LB "Low-Salt" ágar (triptona 1%, extrato de levedura 1%, NaCl 85,5 mM, ágar 1,5%, pH 7,5) e zeocina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A placa contendo as células eletroporadas foi mantida a 37 °C por 16h, sendo feita a seleção de colônias. Com o intuito de confirmar se as células estavam transformadas com os plasmídeos recombinantes, uma extração de plasmídeos foi realizada a partir das colônias, seguido de análise de restrição (digestão) dos plasmídeos purificados com as enzimas específicas. A reação de digestão foi realizada em duas etapas: 1) incubação com *EcoRI* a 37 °C por 3 horas, seguida de inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos; 2) incubação com *XbaI* a 37 °C por 3 horas, seguida de inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos.

6.4. Extração de plasmídeos

Para extração dos plasmídeos, uma colônia isolada da placa de Petri foi selecionada e inoculada em 5 mL de caldo LB *Low-Salt* contendo zeocina (25 µg/mL) e incubada a 37 °C por 16 h, sob agitação de 250 rpm. Após o crescimento das culturas, as células foram coletadas por centrifugação a 12.500 x *g* por 5 minutos a 25 °C, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. A partir das células sedimentadas, os plasmídeos foram extraídos com auxílio do kit PureLink Quick Plasmid Miniprep da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), usando orientações fornecidas pelo fabricante. De outro modo, também a purificação dos plasmídeos foi realizada seguindo método da lise alcalina desenvolvido por Sambroock *et al.* (1989). As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão GET (Tris -HCl 25 mM, pH 8,0; glucose 50 mM, EDTA 10 mM,) resfriado. Depois, 200 µL de solução de lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%) foram adicionados, seguido pela inversão dos tubos de microcentrífuga, 5 vezes, para homogeneização da solução que foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, 200 µL de acetato de potássio 3 M foram adicionados ao lisado e, novamente, os tubos de microcentrífuga foram invertidos gentilmente, por 10 vezes, para homogeneização da solução, sendo incubados, em gelo, por 5 minutos. Logo após esta etapa, a solução foi centrifugada a 12.500 x *g* por 10 minutos a 25 °C e os sobrenadantes transferidos para outros tubos de microcentrífuga estéreis de 1,5 mL. No próximo passo, 2/3 de isopropanol 100% foram adicionados ao volume dos sobrenadantes transferidos. Os tubos de microcentrífuga foram incubados a 25 °C por 10 minutos e centrifugados a 12.500 x *g* por 5 minutos, a 25 °C. Na próxima etapa, os sobrenadantes foram removidos, cuidadosamente, seguido pela inversão dos tubos de microcentrífugas por 10 minutos até sua secagem completa e o DNA plasmidial foi lavado com 500 µL de etanol 70%, resfriado, sendo, novamente, centrifugado conforme as condições acima citadas. Os sobrenadantes foram novamente descartados, e o DNA plasmidial foi ressuspenso em 40 µL de tampão TE (Tris -HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM,) acrescido de RNase I (1mg/mL) e incubados a 37 °C por 1 hora. Finalmente, os plasmídeos purificados foram mantidos à temperatura de -20 °C, para posterior uso.

6.5. Transformação de células de *Pichia pastoris* GS115 e KM71H com o plasmídeo recombinante

As células de *E.coli* TOP10F' transformadas com o plasmídeo recombinante (pPICZαA-CV3316) foram selecionadas em 5 mL de meio LB Low – Salt contendo 25 µg/mL de zeocina. Essas células foram usadas como fonte de DNA plasmidial. O plasmídeo foi obtido com o kit Pure link HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) ou pelo método de lise alcalina, com a finalidade de se obter 50 µg de DNA plasmidial. Após a purificação do plasmídeo recombinante oriundo das células de *E. coli* TOP10F' transformadas, apenas um clone do plasmídeo foi escolhido. O plasmídeo obtido foi digerido pela enzima de restrição *SacI* (10 U/µL) para sua linearização. A mistura de reação consistiu de 10 µL do plasmídeo extraído, 16 µL de H₂O Milli-Q, 4,0 µL de tampão Tango (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; KCl 100 mM; DTT 1mM ; EDTA 1mM, BSA 0,2 mg/mL e glicerol 50%) e 10 µL de *SacI*. A reação se deu a 37 °C por, 16 horas, sendo parada a 65 °C, por 20 minutos. Após o fim da mesma, uma alíquota de 5 µL foi aplicada em gel de agarose (0,8%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (EtBr), para verificar a eficiência da linearização. Na etapa seguinte, o plasmídeo foi precipitado com acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto, seguido de lavagens do precipitado com etanol 70%. O plasmídeo foi ressuspensão em 10 µL água Milli-Q estéril e usado para transformar células eletrocompetentes de *Pichia pastoris*, estirpes GS115 e KM71H.

A metodologia para obtenção das células eletrocompetentes de *P. pastoris* foi realizada de acordo com o protocolo proposto no manual da Invitrogen (K1740-01). A partir de uma suspensão de células da estirpe apropriada em 5,0 mL de meio YPD, mantidas a 30 °C, por 16 horas, foi feito inóculo de 500 µL da suspensão de células (OD₆₀₀ de 1,3 a 1,5) em 500 mL de meio YPD. Após a centrifugação (3000 x g, por 5 minutos), as células foram submetidas a lavagens sucessivas com água gelada. A última lavagem foi feita com 20 mL de sorbitol 1,0 M e, ao final do processo, as células foram ressuspensas em 3,0 mL da mesma solução. As células foram mantidas em gelo até o momento da transformação. Em cada evento de transformação, 10 µL de plasmídeo linearizado foram adicionados a 80 µL das células da levedura. As amostras foram mantidas em gelo por cinco minutos até serem transferidas para uma cubeta de eletroporação. No tratamento controle, as

células da levedura foram eletroporadas com plasmídeo íntegro, ou seja, o plasmídeo não portando o gene de interesse. As amostras foram submetidas a um pulso de 2500 V, usando o eletroporador 2510 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Logo após o pulso, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de sorbitol 1,0 M e transferidas para tubos de centrifuga de 15 mL. As células eletroporadas foram incubadas a 30 °C, sem agitação, por uma hora. Depois do período de incubação, 100 µL das células foram inoculados em placa de Petri (100 x 20 mm) contendo 30 mL de meio YPDS - ágar e 500 µg/mL de zeocina. As placas foram mantidas a 30 °C, por cinco dias, ao final dos quais, as placas foram observadas quanto ao crescimento de colônias. Da placa contendo colônias de leveduras transformadas com plasmídeo íntegro (pPICZαA) e da placa contendo células transformadas com o plasmídeo recombinante foram escolhidas 3 e 16 colônias, respectivamente, para o isolamento de DNA genômico, conforme a metodologia descrita por WARNER (1996), com algumas modificações. As colônias foram inoculadas em 5,0 mL de meio YPD caldo, contendo 500 µg/mL de zeocina. As culturas foram mantidas por 16 horas, a 30 °C, sob agitação orbital de 180 rpm. Após o crescimento das culturas, um volume de 1,5 mL de cada suspensão foi coletado e centrifugado a 11.500 x g por 3 minutos, a 25 °C. As células foram lavadas com água Milli-Q estéril e, então ressuspensas em 500 µL de tampão de extração CTAB 2x [Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M; CTAB 2% (m/v), β – mercapetanol 0,2% (m/v)] pré aquecido a 60 °C. As amostras foram mantidas a 60 °C por 18 horas, quando 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 11.500 x g por 15 minutos, a fase aquosa (superior) foi transferida para tubos novos e 2/3 de volume de isopropanol foram adicionados. Após as amostras terem permanecido por uma hora em isopropanol, a lavagem com etanol 70% foi feita. No final do processo de extração, o DNA genômico foi dissolvido em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 1,0 mM, pH 8,0; EDTA 1,0 mM) contendo RNase A (1,0 mg/mL). As amostras foram diluídas de 1:20 com água Milli-Q e a absorbância lida a 260 nm. Pressupondo-se que uma OD₂₆₀ igual a 1,0 corresponde a 50 ng/µL de DNA, a concentração de DNA (ng/µL) das amostras foi calculada, multiplicando-se OD₂₆₀ x 50 ng/µL x fator de diluição (ROMANO, 1998).

A confirmação da integração da ORF cv3316 no genoma da levedura foi realizada por PCR, usando como DNA molde, o DNA genômico extraído de cada

clone. Em reações de 10 µL foram aplicados: 2,0 µL tampão 5X Green Go Taq (Tris-HCl 50 mM pH 9,0; NaCl 50 mM; MgCl₂ 5 mM; Promega, Wisconsin, EUA); 2,0 dNTPs (1 mM); 1,0 µL de cada iniciador (5 µM); 0,2 µL de Go Taq DNA polimerase (Promega, Wisconsin, EUA). Os volumes de DNA e água variaram para manter a concentração de DNA molde em torno de 150 ng/µL. Após a confirmação da integração de ORF cv3316 no genoma de *P. pastoris*, os clones foram armazenados em glicerol a -80 °C, para uso posterior.

6.6. Indução da Expressão da rCHI3316 em *Pichia pastoris* GS115 e KM71H

Para induzir a expressão da ORF cv3316 que codifica para a quitinase, 10 clones de *P. pastoris* GS115 e 6 clones de *P. pastoris* KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante (pPICZαA -CV3316) foram selecionados. No tratamento controle, as estirpes da levedura citadas acima foram transformadas com plasmídeo íntegro (pPICZαA), isto é, o vetor desprovido da ORF de interesse. Uma colônia de cada clone selecionada em placa de Petri (100 x 20 mm), contendo meio YPDS - ágar, acrescido de 500 µg/mL de zeocina, foi inoculada em 10 mL de meio BMGY, suplementado com 500 µg/mL de zeocina. O meio BMGY contém glicerol como fonte de carbono, que atua como repressor do promotor da álcool oxidase (AOX). A cultura foi incubada a 30 °C por 18 horas, sob agitação vigorosa de 200 rpm até que as células atingissem OD₆₀₀ de 2,0 a 6,0. Depois as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, e ressuspensas em água Milli-Q estéril, para se obter OD₆₀₀ de 1,0, em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 105 mL de meio BMMY, para induzir a expressão. As culturas foram mantidas a 17 °C sob agitação de 200 rpm. A indução com metanol 0,5% (v/v) foi realizada duas vezes ao dia, ao longo de 7 dias. A cada 24 horas, 15 mL de cada amostra foram coletados em tubos de centrifuga de 15 mL e centrifugados a 3.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi dialisado exaustivamente contra água Milli-Q. Em seguida, sulfato de amônio foi adicionado às amostras, sob agitação, para um intervalo de saturação de 0-95%. As amostras foram mantidas em repouso durante 20 horas, e, posteriormente, centrifugadas a 13.000 x g, por 20 minutos, a 4 °C. Os precipitados foram solubilizados e dialisados exaustivamente contra água Milli-Q.

Após a definição de qual estirpe apresentou maior nível de expressão da quitinase recombinante, uma indução em larga escala (1 L) foi conduzida, usando o mesmo procedimento descrito acima.

6.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a indução da expressão, a produção da proteína recombinante (rCHI3316) foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito por Laemmli (1970), adaptado para géis montados em placas de vidro. Os precipitados solubilizados em água Milli-Q, descrito no item 6.6, e picos cromatográficos foram misturados ao tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)] 4 vezes concentrado. Todas as amostras foram fervidas a 100 °C por 10 minutos e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, em condições desnaturantes. Depois da corrida, os géis foram revelados com kit Plus One Silver Staining (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) e Coomassie Brilliant Blue R-250 para a detecção da rCHI3316. O marcador de proteínas BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado nas corridas eletroforéticas.

6.8. Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

A purificação da proteína recombinante (rCHI3316) foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. A fração 0/95 proveniente da precipitação com sulfato de amônio, descrita no item 6.6, foi concentrada em Vivaspin 20, *cut off* 30 kDa, (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Depois disso, a amostra foi dialisada contra tampão (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 0,005 M) e aplicada em coluna de *Sepharose* covalentemente acoplada com níquel (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*, de 7x1,5 cm, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e, previamente, equilibrada com o mesmo tampão. O material não retido (P1) também foi eluído com o mesmo tampão, no qual a amostra foi dialisada. Os materiais retidos (P2 e P3) foram eluídos com os

seus respectivos tampões (P2 - Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M; Imidazol 0,04 M e P3 - Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M). A cromatografia foi monitorada pela absorbância a 280 nm, em espectrofotômetro Ultrospec 3 (Pharmacia LKB, Upsala, Suécia). O pico retido (P2), contendo a proteína recombinante, foi dialisado exaustivamente contra água Milli-Q, depois concentrado em Vivaspin 6, *cut off* 10 kDa, (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O fluxo de eluição da coluna durante todo o procedimento foi cerca de 1 mL/min. Frações de 1,5 mL foram coletadas. Os tubos referentes a cada pico foram reunidos e dialisados contra água Milli-Q e, posteriormente, liofilizados.

6.9. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com a metodologia de Bradford (1976). Uma alíquota de 100 μ L das frações protéicas obtidas durante o processo de purificação da enzima recombinante foi adicionada a 2,5 mL do reagente de Bradford. Leituras da absorbância, a 595 nm, da mistura reacional, foram feitas após 10 minutos, em espectrofotômetro Ultrospec 3 (Pharmacia LKB, Upsala, Suécia), sendo os resultados expressos em miligrama de proteína por mililitro (mgP/mL). Para o cálculo do teor de proteínas, foi utilizada uma curva padrão construída a partir das leituras obtidas para concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

6.10. Caracterização bioquímica da quitinase recombinante

6.10.1. Atividade enzimática com a utilização de quitina coloidal como substrato

A atividade quitinolítica da proteína recombinante (rCHI3316) produzida em *Pichia pastoris* (GS115 e KM71H) foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por Boller *et al.* (1983), tendo como parâmetro a liberação de N-acetil-D-glucosamina a partir da ação hidrolítica da proteína sobre a quitina coloidal, obtida a partir de quitosana, pela metodologia descrita por Boller (1992). Alíquotas de 250 μL do precipitado, solubilizado em água Milli-Q, descrito no item 6.6, e os picos da cromatografia foram incubados com quitina coloidal, a 37 °C, por 1 hora. A reação foi interrompida por fervura a 100 °C, em banho-maria, por 5 minutos. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x *g*, por 10 minutos, a 25 °C, para retirar o excesso de substrato. Uma alíquota de 300 μL do sobrenadante foi transferida para novo tubo e incubada com solução de glucuronidase (10 μL – 13,3 U/ μL), a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida por nova fervura durante 5 minutos. Em seguida, 190 μL tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e 100 μL de tetraborato de potássio 0,6 M foram acrescentados. A mistura foi fervida por 5 minutos e, após resfriamento, 1 mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) foi adicionado. A mistura foi incubada a 37 °C por 20 minutos e, finalmente, a leitura das absorbâncias a 585 nm foi realizada. Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação, uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de N-acetil-D-glucosamina foi utilizada, variando de 100 a 600 μM (REISSIG *et al.*, 1955). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de N-acetil- β -D-glucosamina/mL/h a 37 °C.

6.10.2. Atividade enzimática contra substrato sintético

O ensaio quitinolítico com substratos sintéticos foi realizado de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (Sigma-Aldrich). Este ensaio tem por base a hidrólise enzimática desses substratos pela quitinase. Essa hidrólise libera *p*-nitrofenol, que, sob ionização em pH básico, pode ser medido por ensaio colorimétrico a 405 nm (DUO-CHUAN *et al.*, 2005; FRANDBERG e SCHNURER, 1994). A hidrólise foi realizada em meio ácido durante 30 minutos a 37 °C, sendo, em seguida, adicionada uma solução básica de carbonato de sódio (solução de parada). Após esta adição, leitura das absorbâncias a 405 nm foi realizada. Os substratos sintéticos utilizados foram: 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo e 4-nitrofenil N-N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e 4-nitrofenil β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriose. A quitinase de *Streptomyces griseus* foi utilizada como controle positivo da reação. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de *p*-nitrofenol/mL/h em pH 4,8 a 37 °C.

6.10.3. Avaliação da Atividade quitinásica em diferentes valores de pH

O efeito do pH na atividade quitinolítica foi avaliado com a proteína recombinante dissolvida nos seguintes tampões, nas concentrações de 50 mM: glicina-HCl (pH 2,0, 3,0 e 10,0), acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). A atividade quitinolítica foi determinada com a utilização de quitina coloidal como substrato, a 37 °C, como descrito anteriormente.

6.11. Caracterização estrutural da quitinase recombinante

6.11.1. Dicroísmo Circular

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica vastamente usada para analisar a conformação e estabilidade de proteínas em solução (KELLY *et al.*, 2005 e PEREZ-IRATXETA e ANDRADE-NAVARRO, 2008).

A técnica de CD detecta a atividade óptica de moléculas quirais originadas pela interação de centros assimétricos e com a luz circularmente polarizada. Este fenômeno dá-se pela diferença de absorção entre a luz polarizada à direita e à esquerda, resultando em luz elipticamente polarizada. Nas proteínas e nos peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são a ligação amida, os resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina, e as pontes dissulfeto (DYSZY, 2008). As medidas de CD foram realizadas no espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco Corporation, Japão), em cubetas cilíndricas de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm. Os espectros de CD foram monitorados no intervalo de 190-250 nm sob N₂ constante. A análise da composição da estrutura secundária da quitinase recombinante (rCHI3316) foi feita por desconvolução do espectro de CD usando o servidor online DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>) (LOBLEY *et al.*, 2002; WHITMORE e WALLACE, 2004).

A estabilidade térmica da rCHI3316 (0,519 mg/mL) foi avaliada por dicroísmo circular. A proteína foi dissolvida em água Milli-Q estéril e incubada em diferentes temperaturas, por 10 minutos, variando de 10 a 90 °C com intervalos de 10 °C.

6.11.2. Espectro de fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados utilizando cubetas de quartzo de 0,5 mL, com caminho ótico de 1 cm e as medidas foram feitas no fluorímetro ISSK₂. A rCHI3316 (0,040 mg/mL) foi excitada em 280 e 295 nm. Com o intuito de avaliar o espectro de emissão de fluorescência, a amostra foi monitorada no intervalo de 310 a 450 nm.

6.12. Atividade antifúngica

Com objetivo de avaliar o efeito sobre a germinação e o crescimento vegetativo de esporos de fungos fitopatogênicos, o ensaio conforme a metodologia descrita por Broekaert *et al.* (1990), com algumas adaptações, foi conduzido. Placas de microtitulação de poliestireno (estéreis), contendo 96 poços, foram utilizadas. A cada poço, 100 µL de meio YPD ~~estéril~~ foram adicionados, seguidos de 10 µL da suspensão de esporos/conídios (2×10^5 conídios/mL) e 100 µL da rCHI3316 (0,63 mg/mL) ou dos controles negativo (água Milli-Q estéril) e positivo (peróxido de hidrogênio, 0,1 M).

As amostras-teste foram filtradas em membranas de 0,22 µm (Millipore) e todo experimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar. As placas de microtitulação foram incubadas na ausência de luz, a 37 °C, e a germinação dos esporos e conseqüente crescimento vegetativo foram avaliados através de leituras de absorbância a 630 nm em leitor de ELISA (EL_x 800 BIO-TEK Instruments), feitas em intervalos de 4 h, até um total aproximado de 72 h.

A avaliação do efeito da rCHI3316 sobre a germinação e o crescimento vegetativo dos esporos dos fungos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Penicillium herquei* foi feita pela análise das curvas de crescimento dos fungos, quando comparadas àquelas dos controles.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Alinhamento de seqüências e modelagem molecular por homologia

A busca, no BLASTp, revelou algumas seqüências que apresentaram identidade com a quitinase CHI3316. No alinhamento, as seqüências exibiram regiões altamente conservadas entre todas quitinases, nas quais três regiões são importantes (Figura 2). A primeira região com a seqüência ²⁵³GGXXX²⁵⁷ está relacionada com o sítio de ligação (PERRAKIS *et al.*, 1994); a segunda região com a seqüência ³¹⁰DXDXE³¹⁴ funciona como centro catalítico das quitinases da família 18 (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2004) e a terceira com a seqüência ³⁹⁵MSYD³⁹⁸ está envolvida na hidrólise do substrato (SYNSTAD *et al.*, 2004).

Para resolução da estrutura da quitinase (CHI3316) por meio de modelagem molecular por homologia, a seqüência que apresentou maior identidade (30%) com a seqüência da quitinase de *C. violaceum* (CHI3316) foi o domínio catalítico da quitinase A de *B. circulans* WL-12, portanto utilizado como modelo. Identidade de 30% é a condição mínima para usar uma estrutura como molde, para sua resolução por modelagem molecular por homologia.

A sobreposição de modelos, observados na figura 3, evidenciou o domínio catalítico conservado das quitinases da família 18 das glicosil hidrolases. Esse domínio catalítico é caracterizado por apresentar uma estrutura em barril TIM ($\alpha 8/\beta 8$) com um resíduo conservado de glutamato que atua, possivelmente, como um ácido durante a catálise (WATANABE *et al.*, 1993; HSIEH *et al.*, 2010). Alças presentes no modelo da quitinase CHI3316, que não se sobrepõem ao molde, são resíduos de aminoácidos que apresentam baixa identidade com o molde, nessas regiões.

O sítio ativo, localizado no domínio catalítico, das quitinases da família 18 das glicosil hidrolases é caracterizado pela presença de um motivo conservado, constituído por nove resíduos de aminoácidos, que são [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIMVF]-[DN]-X-E (HENRISSAT e BAIROCH, 1993; GAN *et al.*, 2007; LIU *et al.* 2008; WANG e YANG, 2009; Figura 4). As diferenças observadas nos sítios ativos

do molde e da CHI3316 são as substituições ¹⁶⁹leucina por ³¹¹isoleucina e ¹⁷¹triptofano por ³¹³fenilalanina, respectivamente (Figura 4).

O melhor modelo, dentre os 100 modelos gerados pelo programa *Modeller*, foi escolhido com base na qualidade do gráfico de Ramachandran e função energética fornecidos pelo programa *Procheck*. A quitinase (CHI3316) exibiu 89,8% de seus resíduos nas regiões mais favoráveis, 9,1% nas regiões adicionalmente permitidas, 0,3% nas regiões geralmente permitidas e 0,8% nas regiões não permitidas (Figura 5 e Tabela 1). Na quitinase CHI3316, existem 50 resíduos de glicina e esses resíduos foram observados em várias regiões do gráfico de Ramachandran, isso demonstrou que esse aminoácido é bem menos impedido estericamente, portanto exibe uma faixa muito maior de conformações permitidas. Já em relação à prolina, existem 23 resíduos e esse aminoácido foi bem menos visualizado nas regiões do gráfico, isso se deve à sua cadeia lateral cíclica, que torna as conformações desse resíduo bastante restritas, a faixa -35 e -85 de graus Φ (NELSON e COX, 2002; Figura 5 e Tabela 1). O modelo um foi o que apresentou a menor energia dentre os 100 modelos gerados pelo programa *Procheck* (Figura 6).

O alinhamento de sequências de aminoácidos, os modelos do domínio catalítico e sítio ativo gerados pelos programas CLC sequence Viewer e *Modeller*, respectivamente, fornecidos para a sequência de aminoácidos predita a partir da ORF cv3316 permitiram classificar essa proteína putativa como uma quitinase pertencente à família 18 das glicosil hidrolases, por causa do domínio catalítico em barril TIM (α_8/β_8), presença de nove resíduos conservados no sítio ativo e regiões altamente conservadas envolvidas com o sítio de ligação ao substrato, centro catalítico e hidrólise do substrato.

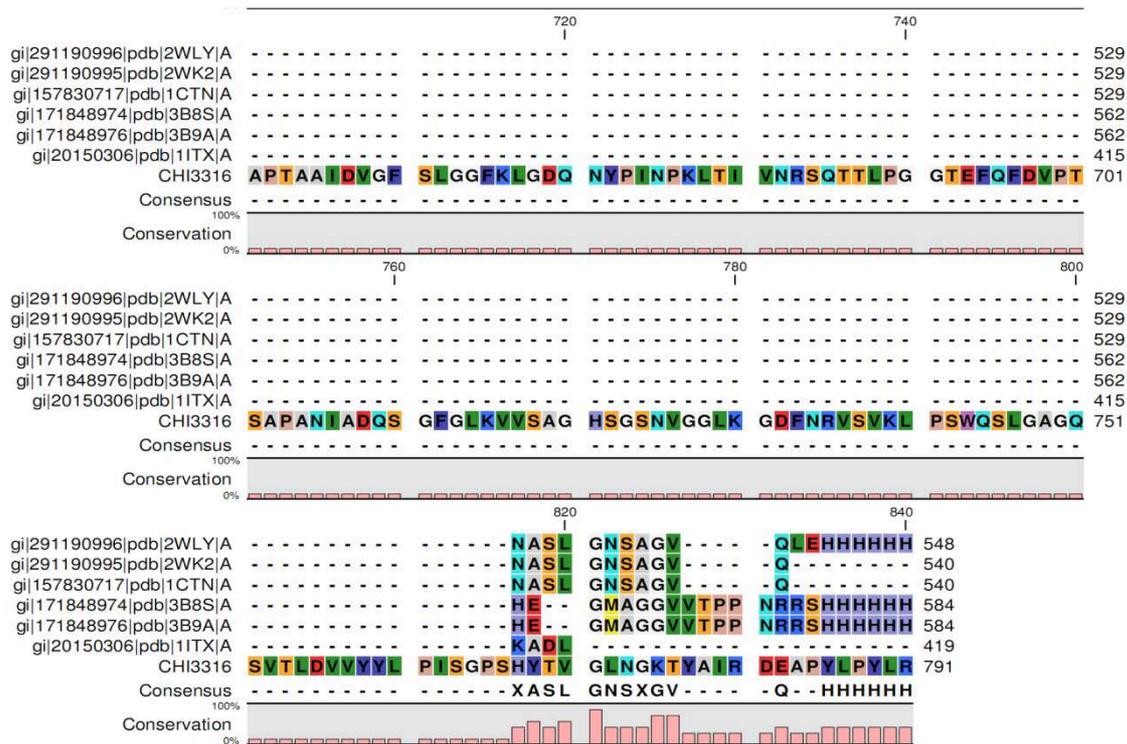


FIGURA 2 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos predita de uma quitinase (CHI3316) de *C. violaceum* com seqüências de quitinases que possuem estruturas tridimensionais resolvidas e depositadas no PDB. A seqüências de aminoácidos de proteínas com estruturas tridimensionais conhecidas foram obtidas no PDB: Quitinase A de *Serratia marcescens* ATCC 990 complexada com quitotrio-tiazolina (2WLY), Quitinase A de *S. marcescens* ATCC 990 complexada com ditioamida quitotrio-tiazolina (2WK2), Quitinase A *Serratia marcescens* (1CTN), Quitinase A de *Vibrio harveyi* (3B8S), Quitinase A de *Vibrio harveyi* complexada com hexassacarídeo (3B9A) e domínio catalítico da quitinase A de *Bacillus circulans* WL-12 (1ITX). O alinhamento das seqüências foi gerado pelo programa CLC Sequence Viewer 6.4.

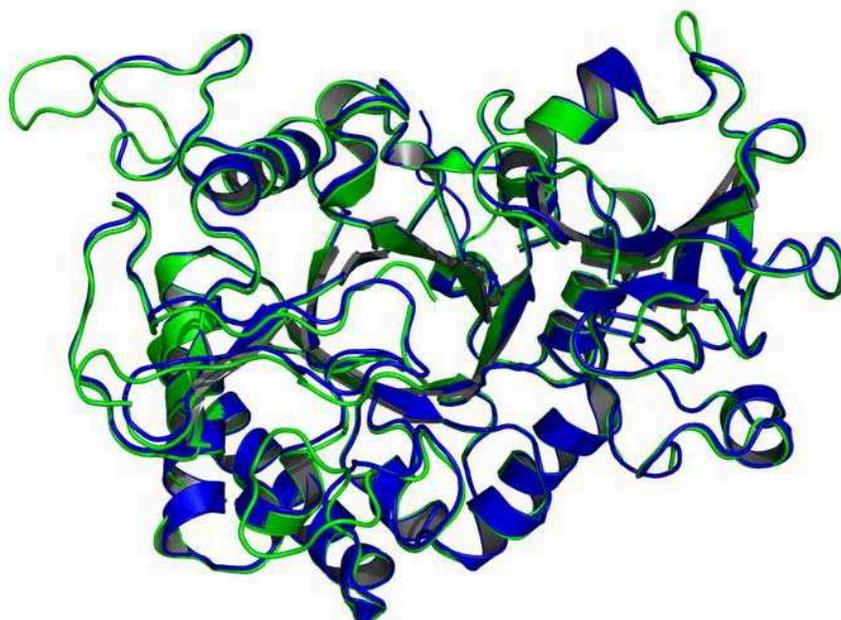


Figura 3 - Sobreposição de estruturas gerada no formato *cartoon* e visualizada pelo programa *Pymol*, evidenciando a conservação de estruturas secundária e terciária do domínio catalítico (CaD) das quitinases da família 18 das glicosil hidrolases. Domínio catalítico da quitinase A1 de *Bacillus circulans* WL-12 (1ITX – azul) foi utilizado como molde e o modelo gerado com base na seqüência de aminoácidos deduzida a partir da ORF cv3316 de *C. violaceum* ATCC 12472 (em verde). Os modelos e a sobreposição foram realizados, utilizando o programa *Modeller* 9v8 (modelagem por homologia). Importante notar que apenas as regiões próximas à seqüência bem conservada, que participa do sítio ativo, e compartilhada entre ambas as proteínas foram utilizadas no processo de modelagem.

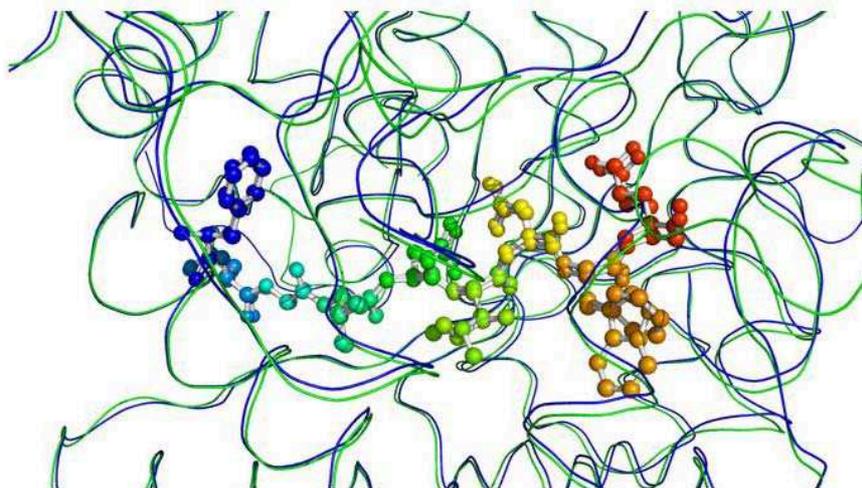


Figura 4 – Sobreposição de estruturas gerada no formato *ribbon* e visualizada pelo programa *Pymol*, evidenciando a seqüência de aminoácidos, ([LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIMVF]-[DN]-X-E) que é compartilhada entre os sítios ativos das quitinases pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases. Os aminoácidos estão destacados nas cores: 1 – azul escuro, 2 – azul, 3 - ciano, 4 - verde, 5 – verde escuro, 6 – verde claro, 7 - amarelo, 8 - laranja e 9 - vermelho. No caso de 1ITX, esses aminoácidos são: FDGVLDWE. Em azul está destacado o detalhe da estrutura do molde (1ITX). Em verde, está representado o modelo gerado com base na seqüência de aminoácidos deduzida a partir da ORF cv3316 de *C. violaceum*. O sítio de CHI3316 é constituído pelos aminoácidos: FDGVDIDFE. Os modelos e a sobreposição foram realizados, utilizando o programa *Modeller* 9v8 (modelagem por homologia).

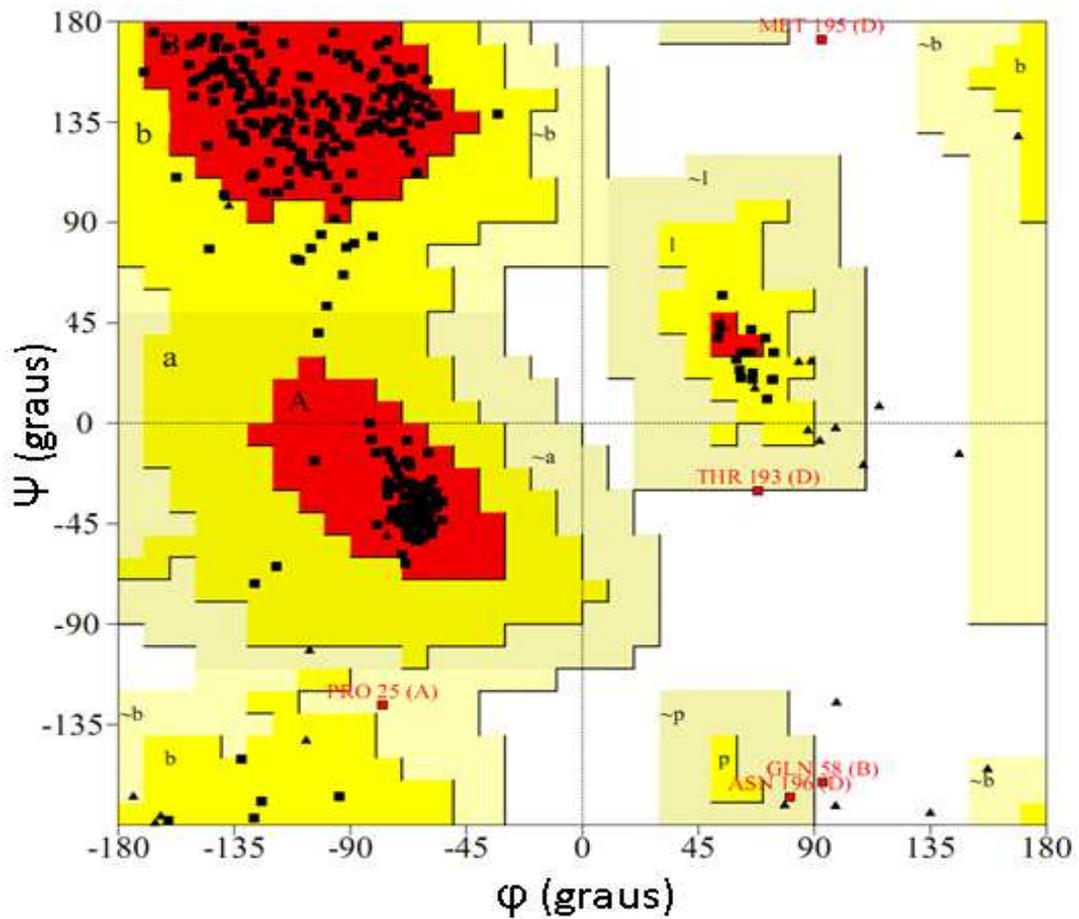


FIGURA 5 – Gráfico de Ramachandran para quitinase (CHI3316) gerado pelo programa *Procheck*. Regiões mais favoráveis [A, B, L], em vermelho. Regiões adicionalmente permitidas [a, b, l, p], em amarelo. Regiões geralmente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p], em amarelo claro.

TABELA 1 - Dados do gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da quitinase CHI3316 gerado pelo programa *Procheck*.

Espécies de resíduos de aminoácidos analisados	Número de resíduos	Percentual de resíduos
Total de resíduos em regiões mais favoráveis (A, B, L)	327	89,8%
Total de resíduos em regiões adicionalmente permitidas	33	9,1%
Total de resíduos em regiões geralmente permitidas	1	0,3%
Total de resíduos em regiões não permitidas	3	0,8%
Número de resíduos à exceção de glicina e prolina	364	100,0%
Número de resíduos de glicina (mostrados como triângulos)	50	
Número de resíduos de prolina	23	

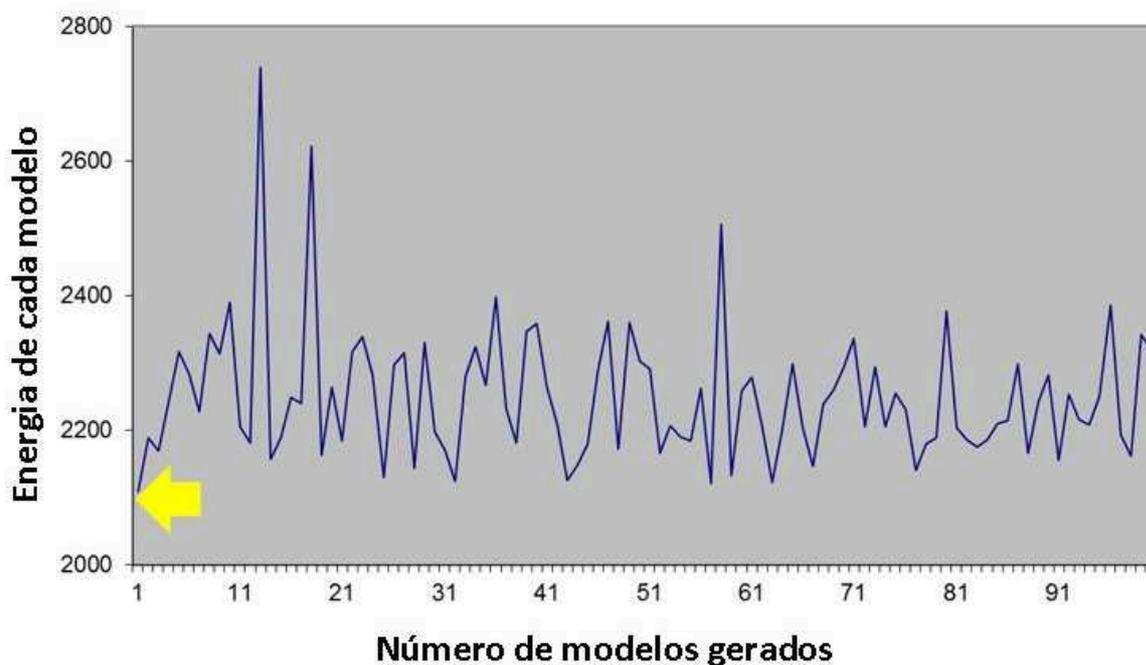


FIGURA 6 – Gráfico da validação do modelo de menor energia da quitinase *C. violaceum*, CHI3316, gerado pelo programa *Procheck*. A seta, em amarelo, indica o modelo de menor energia, ou seja, o melhor modelo é o número um.

7.2. Transformação de células de *E.coli* TOP10F' com o plasmídeo recombinante

A ORF cv3316 foi amplificada por PCR, a partir de DNA genômico extraído de células de *C. violaceum* ATCC12472. A confirmação da amplificação da ORF cv3316 foi visualizada em gel de agarose (1,0%), onde se observou um fragmento com aproximadamente 2435 pb, coerente com a extensão esperada para a amplificação da referida ORF (Figura 7). A sequência depositada no GeneBank referente à ORF cv3316 tem 2376 pb. No desenho dos iniciadores utilizados para a amplificação, sítios de restrição para as enzimas utilizadas na clonagem foram adicionados, além de nucleotídeos adjacentes, somando 59 pb à sequência original.

O DNA amplificado foi purificado da reação anterior e submetido à digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*, bem como o plasmídeo pPICZ α A. Os produtos da digestão foram purificados e, então, ligados por meio da enzima DNA T4 Ligase. O produto da ligação foi eletroporado em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F'. Das colônias selecionadas, seis clones foram expandidos para extração de DNA plasmidial, visando a confirmação da transformação das células de *E. coli*. Após a extração de DNA plasmidial, os clones foram submetidos à análise de restrição (digestão) com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* (Figura 8). A confirmação da transformação das células de *E.coli* com o plasmídeo recombinante (pPICZ α A-CV3316) foi observada em três clones. Dois desses clones exibiram três bandas distintas: uma referente ao plasmídeo recombinante não digerido (6035 pb), uma segunda referente ao plasmídeo digerido (3600 pb) e a terceira correspondente à ORF cv3316, 2435 pb, (Figura 8, colunas 3 e 5). Enquanto, o terceiro clone transformado mostrou duas bandas, a primeira referente ao plasmídeo digerido (3600 pb) e a segunda correspondente à ORF cv3316, 2435 pb, (Figura 8, coluna 4). Outros dois clones dos seis, que foram digeridos, exibiram, somente, uma banda correspondente ao plasmídeo desprovido da ORF cv3316 (3600 pb), isso demonstrou que esses plasmídeos não foram transformados (Figura 8, colunas 2 e 6). Um clone não exibiu nenhuma banda, isso se deve baixa quantidade de plasmídeo utilizado na reação de digestão (Figura 8, coluna 7).

O resultado da digestão dos plasmídeos revelou que as células de *E.coli* TOP10F' foram transformadas com o plasmídeo recombinante (pPICZ α -CV3316) e esse vetor foi utilizado para transformar células de *P. pastoris* GS115 e KM71H.



FIGURA 7 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) da amplificação da ORF cv3316 de *C. violaceum* por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de *C. violaceum*. Coluna 1 - ORF 3316 de *C. violaceum* (2435 pb); Coluna 2 - Marcador DNA de fago λ digerido com *Hind* III (300 ng), em pares de base (pb);

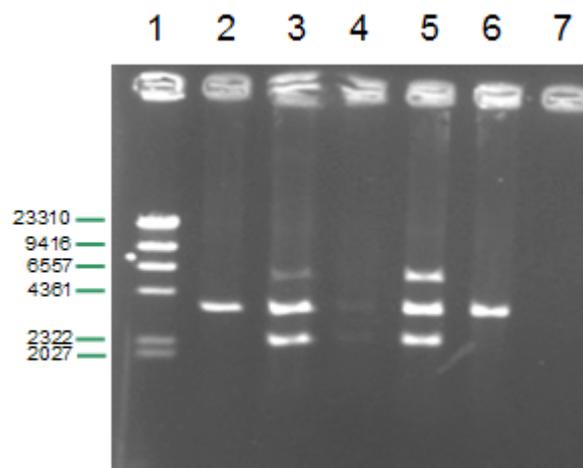


FIGURA 8 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de produtos da digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Xba*I do plasmídeo recombinante (pPICZ α -CV3316) purificado de células de *E. coli* TOP10F'. Coluna 1: Marcador DNA de fago λ digerido com *Hind* III (300 ng), em pares de base (pb); Colunas 2 - 7: Diferentes clones oriundos de células de *E.coli* transformadas com pPICZ α -CV3316.

7.3. Transformação de células de *P. pastoris* GS115 e KM71H com o plasmídeo recombinante

Após a confirmação da transformação das células de *E. coli* TOP10F', o plasmídeo recombinante (pPICZ α A-CV3316) oriundo de um dos clone de células de *E. coli* (Figura 8, coluna 3) foi linearizado e eletroporado em células de *P. pastoris* GS115 e KM71H. A confirmação da transformação das células de *P. pastoris* foi realizada por PCR, que utilizou como molde DNA genômico extraído das células da levedura (Figura 9 e 10). Nove clones e três clones de *P. pastoris* GS115 e KM71H, respectivamente, tiveram a transformação com o inserto de quitinase confirmados. Os clones de GS115 exibiram um fragmento de aproximadamente de 2808 pb, coerente com a extensão esperada para a amplificação da ORF cv3316 (Figura 9). Esse valor de extensão da ORF cv3316 é devido à adição de 21 pb do oligonucleotídeo senso (AOX5') e 352 pb referente à região do vetor, promotor da álcool oxidase 1, que foi amplificada com a utilização desse oligonucleotídeo iniciador (AOX5'). Os clones transformados de KM71H exibiram um fragmento de aproximadamente de 2624 pb, coerente com a extensão esperada para a amplificação da ORF cv3316 (Figura 10). Esse valor de extensão da ORF cv3316 é devido à adição de 21 pb do oligonucleotídeo anti-senso (AOX3') e 168 pb referente à região do vetor, sequência de término da transcrição AOX1, que foi amplificada com a utilização desse oligonucleotídeo iniciador (AOX3').

Após a confirmação da transformação das células *P. pastoris* GS115 e KM71H com plasmídeo recombinante (pPICZ α A-CV3316) por PCR, essas estirpes desse microrganismo foram induzidas, com metanol 0,5% v/v, para expressar a quitinase recombinante (rCHI3316).

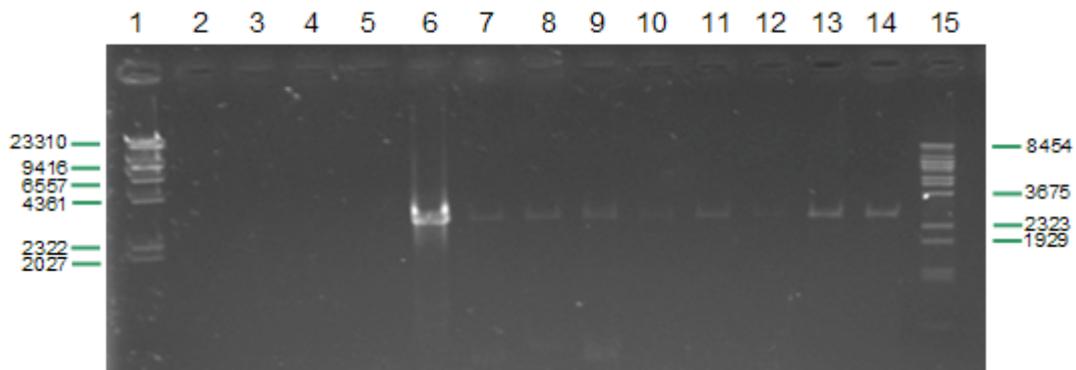


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação da ORF cv3316 de *C. violaceum* por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de *P. Pastoris* GS115 transformadas com pPICZαA-CV3316 para expressão extracelular. Coluna 1: Marcador - DNA de fago λ digerido com *Hind* III (300 ng), em pares de base (pb); Coluna 2: controle negativo (água); Colunas 3 - 4: Clones 1 - 2 do pPICZαA íntegro; Coluna 5 -14: Clones 3a – 3j de pPICZαA – CV 3316; Coluna 15: Marcador - DNA de fago λ digerido com *Bst*E I (300 ng), em pares de base (pb). Nesta reação, os oligonucleotídeos iniciadores (AOX5' e *Xba*3316) foram utilizados.

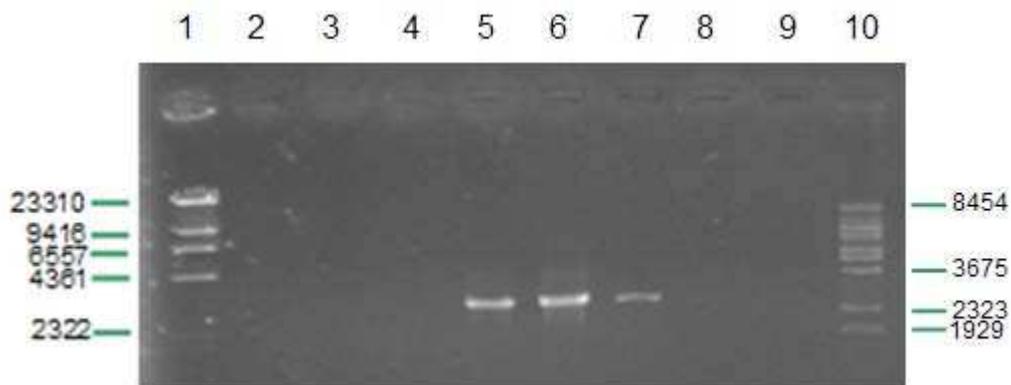


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação da ORF cv3316 de *C. violaceum* por PCR a partir de DNA genômico extraído de células de *P. Pastoris* KM71H transformadas com pPICZαA-CV3316 para expressão extracelular. Coluna 1: Marcador DNA de fago λ digerido com *Hind* III (300 ng), em pares de base (pb); Coluna 2: controle negativo (água); Coluna 3: clones 1 do pPICZαA íntegro; Coluna 4 - 9: Clones 3a – 3f do pPICZαA – CV 3316; Coluna 10: DNA de fago ΦX 174 digerido *Hae* III (300 ng), em pares de base (pb). Nesta reação, oligonucleotídeos iniciadores (*Eco*3316 e AOX3') foram utilizados.

7.4. Indução da Expressão da rCHI3316 em *Pichia pastoris* GS115 e KM71H

Uma das metodologias utilizadas para avaliar a expressão da quitinase recombinante foi o acompanhamento da leitura da OD₆₀₀ dos dez clones (2a-2j, Figura 9) oriundos de células de *P. pastoris* GS115 e 6 clones (2a-2f, Figura 10) de *P. pastoris* KM71H, transformadas com o plasmídeo recombinante (pPICZα - CV3316). Esse experimento foi realizado com intuito de observar crescimento celular desses clones, após a adição de metanol 0,5% (v/v), duas vezes por dia, durante o período de cultivo celular (Figuras 11). Estas células também foram transformadas com plasmídeo não portando o gene de interesse, como controle. Sete clones de células de *P. pastoris* GS115 e todos os transformantes de células de *P. pastoris* KM71H apresentaram diferentes velocidades de crescimento celular, durante todo o período de cultivo (Figuras 11).

Os setes clones de células de *P. pastoris* GS115, induzidos por metanol 0,5% (v/v), expressaram de forma satisfatória a quitinase recombinante (rCHI3316) com massa molecular estimada de 87 kDa a partir das 24 horas até 144 horas (Figuras 12 e 13). Os transformantes da estirpe KM71H também apresentaram uma banda intensa de mesma massa a partir das 48 horas até 144 horas (Figuras 14 e 15). Essa banda protéica foi mais intensa às 96 horas, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) revelado com nitrato de prata (Figuras 12, 13, 14 e 15). Essa massa molecular é devido à sequência predita da proteína (84,5 kDa), acrescida das caudas his-tag e epítipo c-myc presentes no C-terminal da proteína. Essas duas caudas codificam produtos cujas massas moleculares representam juntas 2,5 KDa, estando presentes no plasmídeo pPICZαA e sendo importantes no reconhecimento da proteína. A cauda de histidina é importante no isolamento da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a níquel imobilizado, enquanto que o epítipo c-myc permite a detecção da proteína de fusão com anticorpo anti-myc (Invitrogen, Manual K1740-01).

O padrão de expressão de quitinases dos fungos (*Chaetomium cupreum* e *Beauveria bassiana*), em células de *P. pastoris* GS115, também foi acompanhado por meio de SDS-PAGE, sob condições desnaturantes, onde as proteínas (58 kDa e 38 kDa) exibiram uma banda difusa a partir de 120 e 48 horas, respectivamente,

após indução com metanol 0,5% (v/v) e após esses tempos a intensidade de cada banda protéica diminuiu (FAN *et al.*, 2007; WANG e YANG, 2009).

Liu *et al.* (2010) expressaram uma quitinase do vegetal *Limonium bicolor* (Lbchi31) em células de *P. pastoris* GS115 e KM71. Esta proteína apresentou massa molecular de 31 kDa com uma banda intensa a partir das 96 horas para estirpe GS115 e 72 horas para KM71.

Quanto à dosagem de proteínas totais, os clones da estirpe GS115 e pPICZαA desprovido do gene de interesse (controle) apresentaram variação durante todo o período de coleta (0 h-144 h). O clone 2c foi o que se manteve mais constante, ou seja, apresentou uma menor variação, durante a etapa de coleta. Com uma produção máxima de proteínas totais no horário de 96 horas (0,326 mg), uma queda da síntese de proteínas às 120 horas e um novo aumento da produção protéica partir das 144 horas (0,286 mg, Figura 16A). O clone 2i apresentou a maior produção de proteínas totais (0,479 mg) da estirpe GS115 registrada às 144 horas (Figura 16A). De modo semelhante, todos os clones e o controle da estirpe KM71H apresentaram uma variação da produção de proteínas totais durante todo o período de coleta (0 h-144 h). O clone 2b foi o mais promissor e constante desta cepa com uma produção máxima de proteínas totais (0,367 mg) registrada às 48 horas (Figura 16B).

A variação de proteínas totais para as duas estirpes pode ser explicada pela proteólise dessas proteínas, pois muitos peptídeos e proteínas são susceptíveis à degradação por proteases produzidas pelo organismo hospedeiro (sistema de expressão). A proteólise ocorre durante a expressão e/ou os primeiros estágios da purificação da proteína recombinante. Nesta dissertação, utilizou-se sistema de expressão, que possui a capacidade de secretar a quitinase recombinante para o meio de cultura, além de cepas não deficientes nessas proteases (GS115 e KM71H). Algumas proteínas heterólogas produzidas e secretadas por *P. pastoris*, no meio de cultura, são instáveis, pois são alvos de proteases vacuolares, tais como proteinases A e B, e carboxipeptidase Y, particularmente, quando cultivadas em fermentador por causa do ambiente de alta densidade celular em combinação com a lise de um pequeno percentual de células (HIGGINS e CREGG, 1998). Conseqüentemente, a produção de muitas proteínas, particularmente, proteínas expressas de forma heteróloga, depende da atividade proteolítica que elas são expostas durante a expressão e purificação, e o uso de cepas deficientes em

proteases (SMD1163, SMD1165 e SMD168) pode significativamente melhorar o rendimento total (HIGGINS e CREGG, 1998). Outra hipótese levantada para variação de proteínas seria que as mesmas foram degradadas por proteases extracelulares, que possuem atividade proteolítica ótima em pH neutro, uma vez que o meio BMMY utilizado para o cultivo das células de *P. pastoris* GS115 E KM71H tinha pH 6,0. Um modo de resolver esse problema seria o cultivo de células de *P. pastoris* em meio mínimo contendo metanol e/ou histidina (MMH) não tamponado, onde o pH diminui para 3 ou menos, inativando as proteases neutras (BRIERLEY *et al.*, 1994).

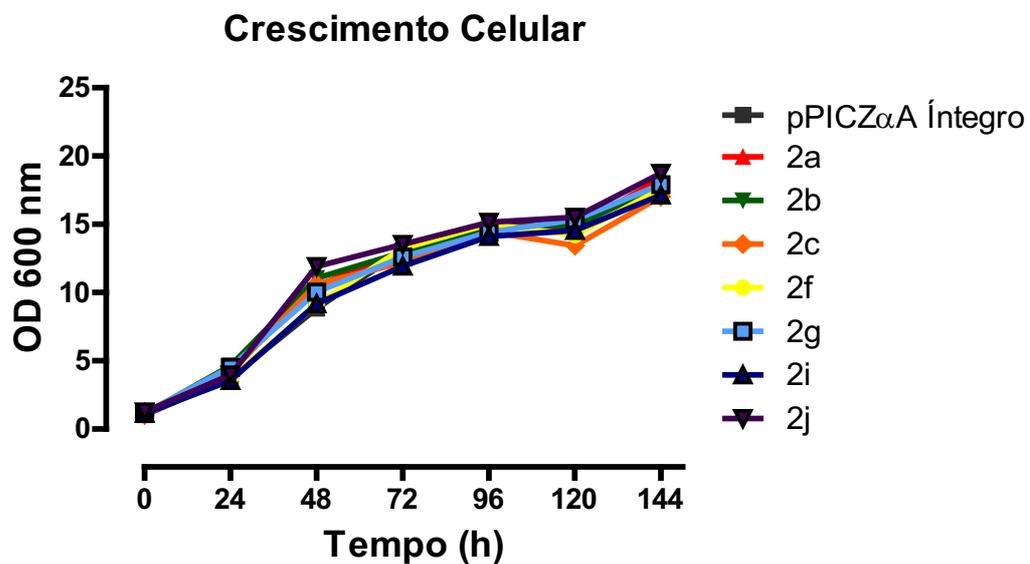
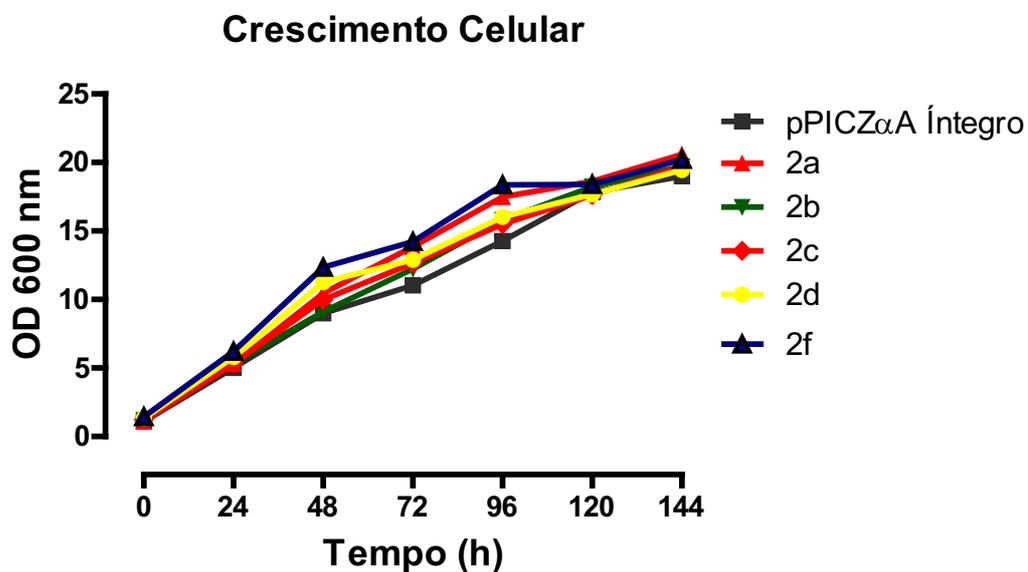
A**B**

FIGURA 11 - Crescimento celular de *P. pastoris* (GS115 e KM71H) após indução com metanol 0,5% (v/v) em relação ao tempo (h). **(A)** Clones oriundos de células *P. pastoris* (GS115) transformadas com pPICZ α A-CV3316. **(B)** Clones oriundos de células *P. pastoris* (KM71H) transformadas com pPICZ α A-CV3316.

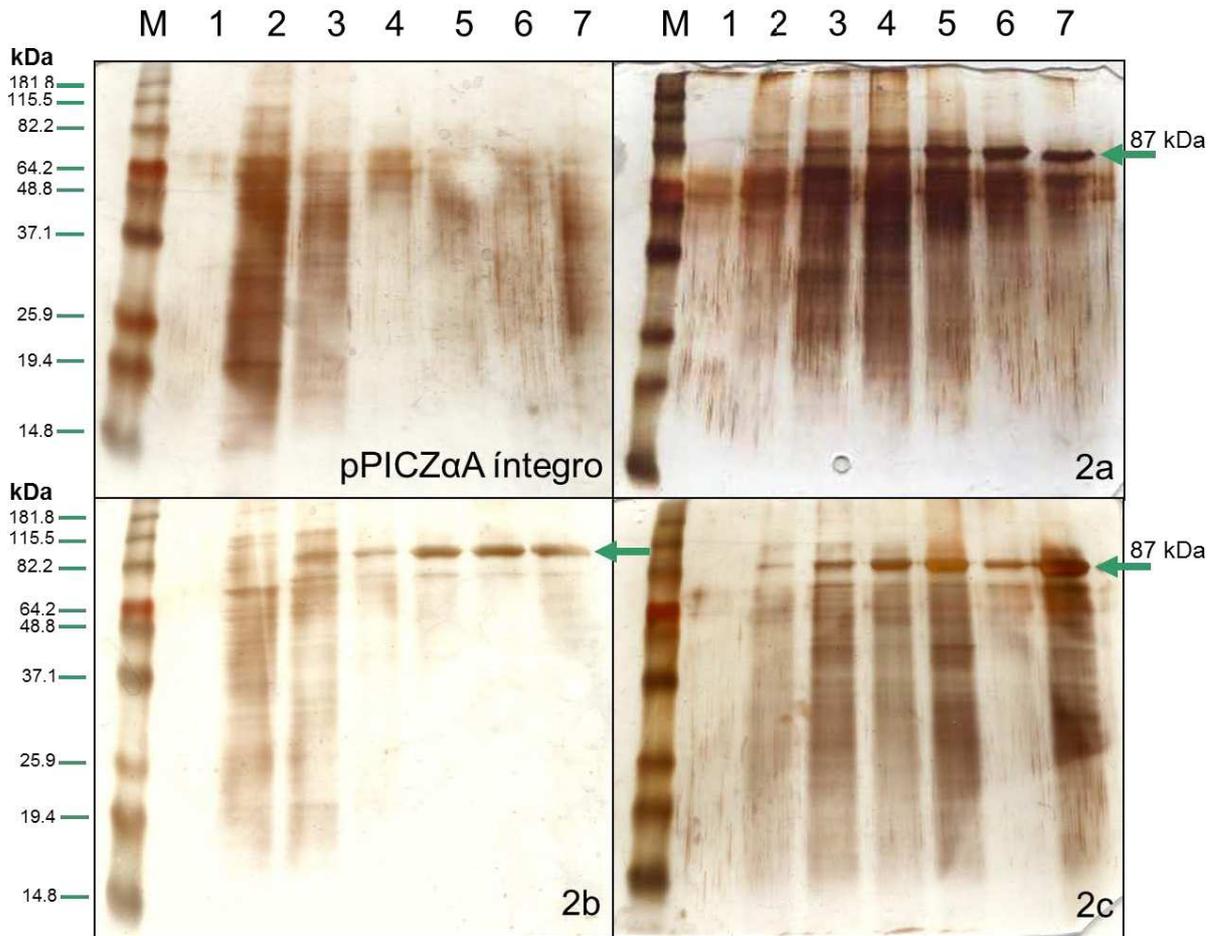


FIGURA 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de *Pichia pastoris* GS115. **(pPICZαA íntegro)** Expressão extracelular do pPICZαA íntegro. Coluna M: Marcador; Coluna 1 – 7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg). **(2a)** Expressão extracelular do clone 2a oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg). **(2b)** Expressão extracelular do clone 2b oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg). **(2c)** Expressão extracelular do clone 2c oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg).

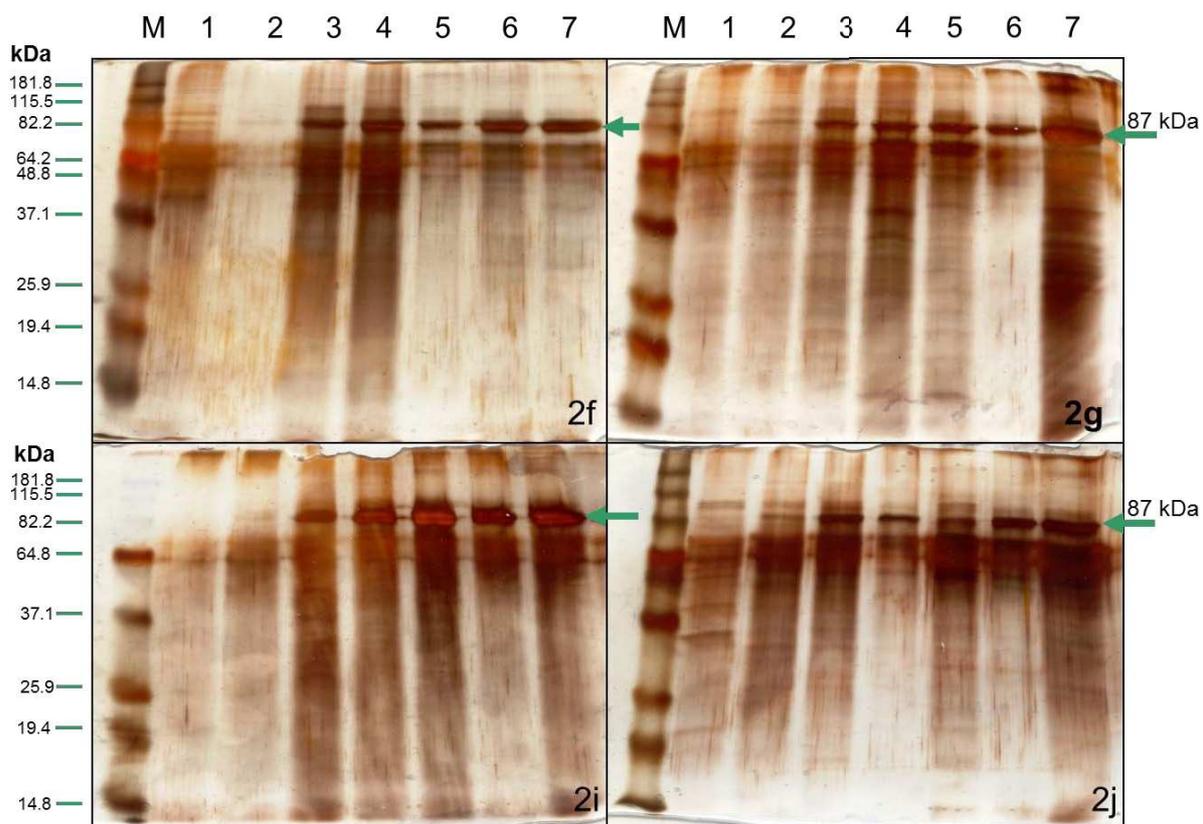


FIGURA 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de *Pichia pastoris* GS115. **(2f)** Expressão extracelular do clone 2f oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1 – 7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg). **(2g)** Expressão extracelular do clone 2g oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg). **(2i)** Expressão extracelular do clone 2i oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144 h (3,0 µg). **(2j)** Expressão extracelular do clone 2j oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0 µg).

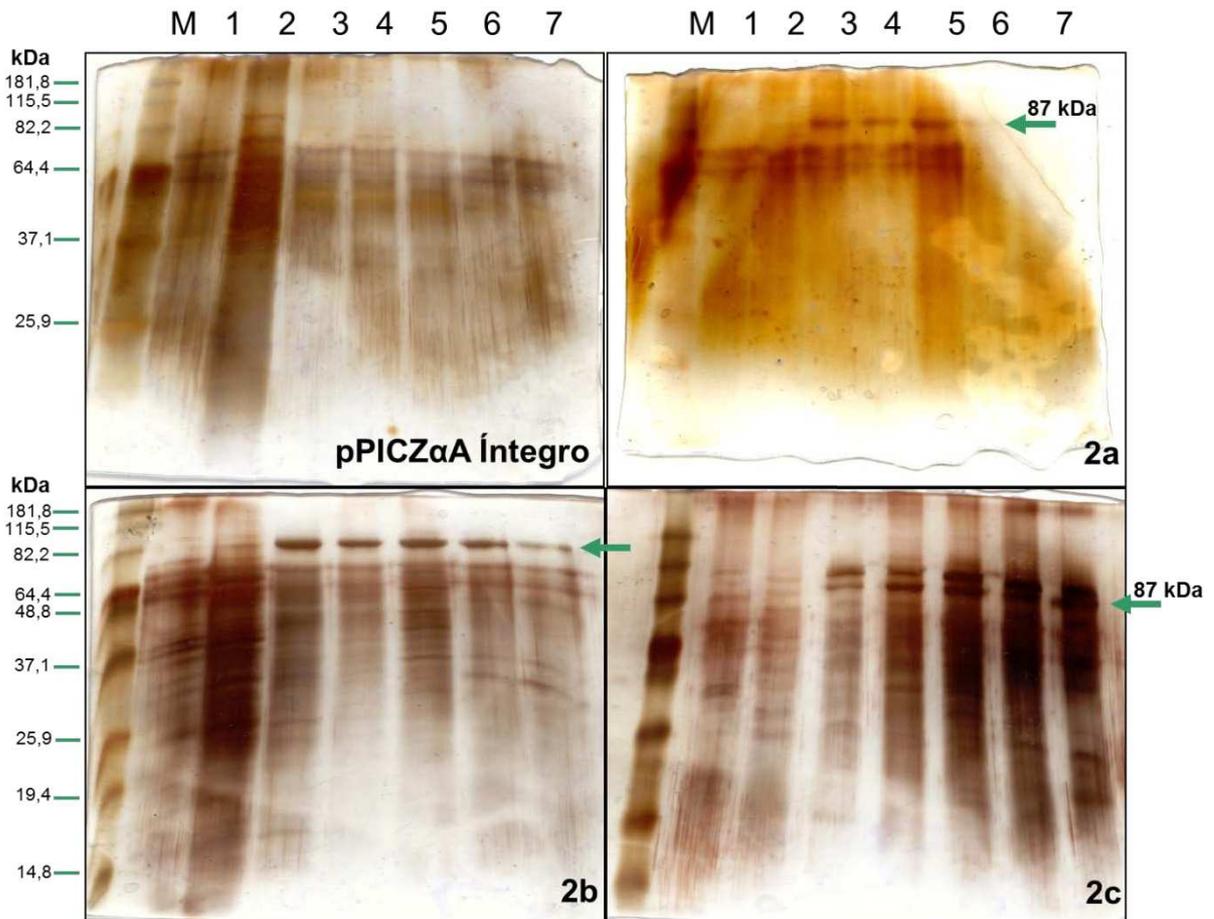


FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de *Pichia pastoris* KM71H. (**pPICZαA íntegro**) Expressão extracelular do pPICZ íntegro. Coluna M: Marcador; Coluna 1 – 7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg). (**2a**) Expressão extracelular do clone 2a oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg). (**2b**) Expressão extracelular do clone 2b oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg). (**2c**) Expressão extracelular do clone 2c oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg).

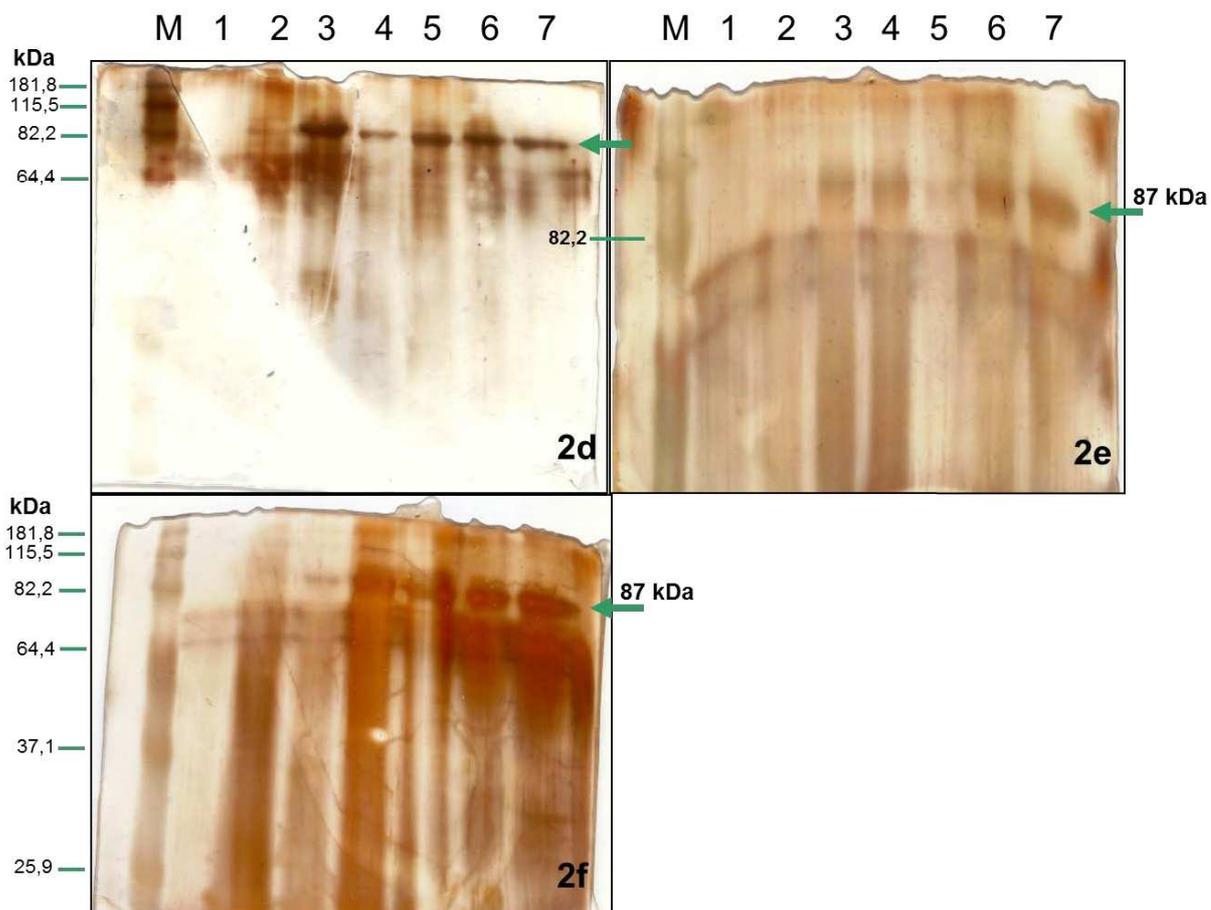


FIGURA 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), revelado com nitrato de prata, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das proteínas totais extraídas a partir da cultura de *Pichia pastoris* KM71H. **(2d)** Expressão extracelular do clone 2d oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1 – 7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg). **(2e)** Expressão extracelular do clone 2e oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg). **(2f)** Expressão extracelular do clone 2f oriundo de células de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA-CV3316. Coluna M: Marcador; Coluna 1-7: período de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (3,0µg).

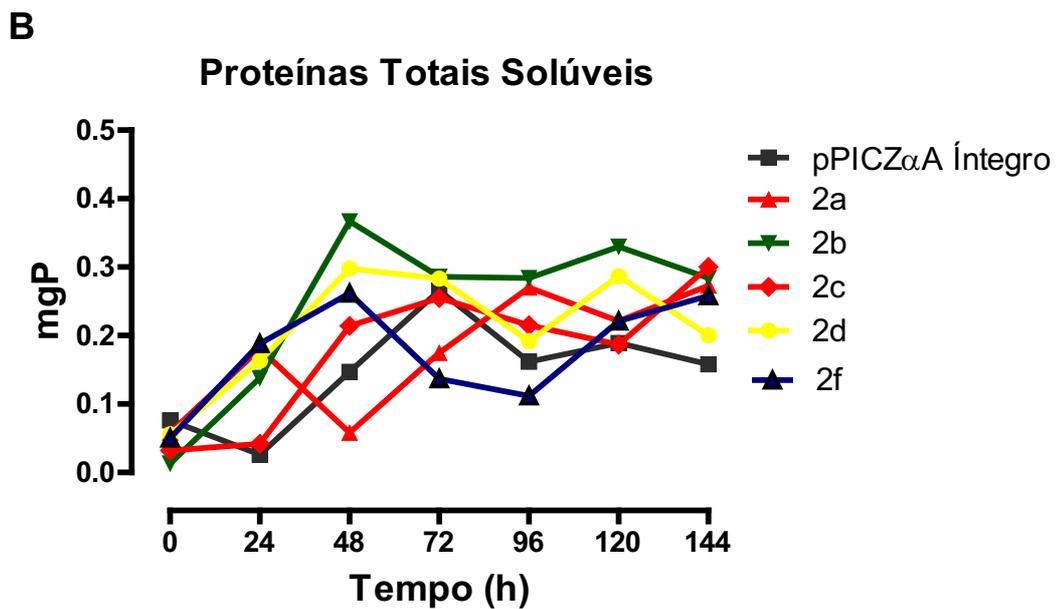
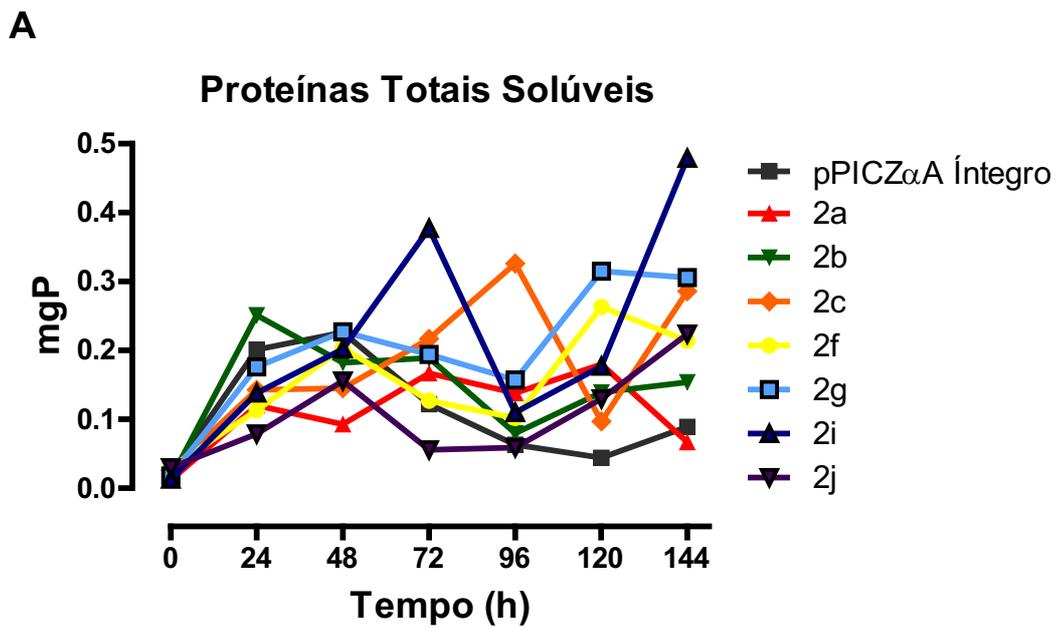


FIGURA 16 - Proteínas totais solúveis secretadas por *P. pastoris* no meio de cultura em relação ao tempo (h). (A) Clones oriundos de células de *P. pastoris* (GS115) transformadas com pPICZ α A-CV3316. (B) Clones oriundos de células de *P. pastoris* (KM71H) transformadas com pPICZ α A-CV3316.

7. 5. Atividade enzimática com a utilização de quitina coloidal como substrato

Em relação à atividade quitinolítica total, foi observada uma variação dessa atividade contra o substrato insolúvel (quitina coloidal) para todos os clones da estirpe GS115, durante o período de coleta (0 h - 144 h), exceto para o controle (plasmídeo sem o gene alvo), que não apresentou atividade (Figura 17A). Os clones 2f e 2i foram os que apresentaram uma menor variação da atividade quitinolítica total em relação aos demais. O clone 2i apresentou a terceira maior atividade (1.155,33 U) registrada às 144 horas, condizente com sua maior produção de proteínas totais. O clone 2c apresentou as duas maiores atividade quitinolítica total às 96 horas (1.234,08 U) e às 144 horas (1.201,45 U), também nesses tempos, houve as maiores sínteses de proteínas totais para esse clone (Figura 17A).

Todos os clones da estirpe KM71H apresentaram um pico máximo de atividade quitinolítica total às 96 horas, exceto clone 2e, que teve pico máximo de atividade às 72 horas. O clone 2c exibiu a maior atividade registrada (961,231 U), seguido pelo clone 2b (920,176 U) (Figura 17B). Quanto à atividade quitinolítica específica, os clones da estirpe GS115 exibiram pico máximo de atividade em diferentes horários: 96 h (2b, 2i e 2j), 120 h (2g) e 144 h (2a, 2f e 2c). O clone 2b apresentou a maior atividade quitinolítica específica (9.649,38 U/mgP), seguido pelo clone 2f (4.445,03 U/mgP) (Figura 18A). Na estirpe KM71H, os clones apresentaram pico máximo de atividade quitinolítica específica às 96 horas. O clone 2c exibiu a maior atividade (4.478,68 U/mgP), seguido do clone 2f (3.825,73 U/mgP) (Figura 18B).

As células de *P. pastoris* GS115 transformadas com pPICZ α A-CV3316 demonstraram as maiores sínteses de proteínas totais e atividades quitinolíticas total e específica do que a estirpe KM71H, durante todo o período de cultivo. Desse modo, a cepa GS115, a partir de então, foi selecionada para os passos subsequentes de produção e purificação da quitinase recombinante. O transformante 2b foi selecionado dos demais clones da cepa GS115, pois exibiu maior atividade quitinolítica específica. A estirpe GS115 apresenta fenótipo de utilização do metanol do tipo selvagem (Mut^+) e contém uma cópia do gene da álcool oxidase 1 (AOX1), que é responsável por 85% da utilização de metanol necessário

para o crescimento celular (CEREGHINO e CREGG, 2000; DALY e HEARN, 2005). Enquanto, a cepa KM71H, derivada da estirpe KM71, é deficiente no gene da álcool oxidase 1 e contém o gene da álcool oxidase 2 (AOX2), portanto apresenta uma menor capacidade de consumir metanol do que AOX1, ou seja possui fenótipo de utilização lenta do metanol, Mut^s (CREGG *et al.*, 1989; DALY e HEARN, 2005). A cepa KM71H, neste trabalho de dissertação, apresentou maior velocidade de crescimento celular do que GS115, durante o período de cultivo, apesar de KM71H utilizar metanol em uma capacidade menor do que GS115. No entanto, por possuir o fenótipo Mut^s apresentou menor expressão da proteína recombinante quando comparado à GS115, pois menos metanol foi metabolizado por KM71H para ativar o promotor da álcool oxidase, que controlou a expressão da quitinase recombinante.

Liu *et al.* (2010) observaram que a atividade quitinolítica de uma quitinase do vegetal *L. bicolor* expressa em células de *P. pastoris* GS 115 foi 1,27 vezes maior do que a mesma enzima expressa pela cepa KM71. Os autores sugerem que a estirpe GS115 é um hospedeiro mais apto para síntese da quitinase recombinante (LbChi31) do que a cepa KM71.

Assim, podemos inferir que a variação das atividades quitinolíticas total e específica para os diferentes clones das estirpes GS115 e KM71H, durante o período de cultivo, pode ser explicada pela degradação de proteínas totais por proteases, como discutida no tópico anterior. Em adição aos resultados obtidos para estirpe GS115, neste trabalho de dissertação, dados na literatura corroboram com a escolha da estirpe GS115 como um hospedeiro adequado para expressão heteróloga de quitinases.

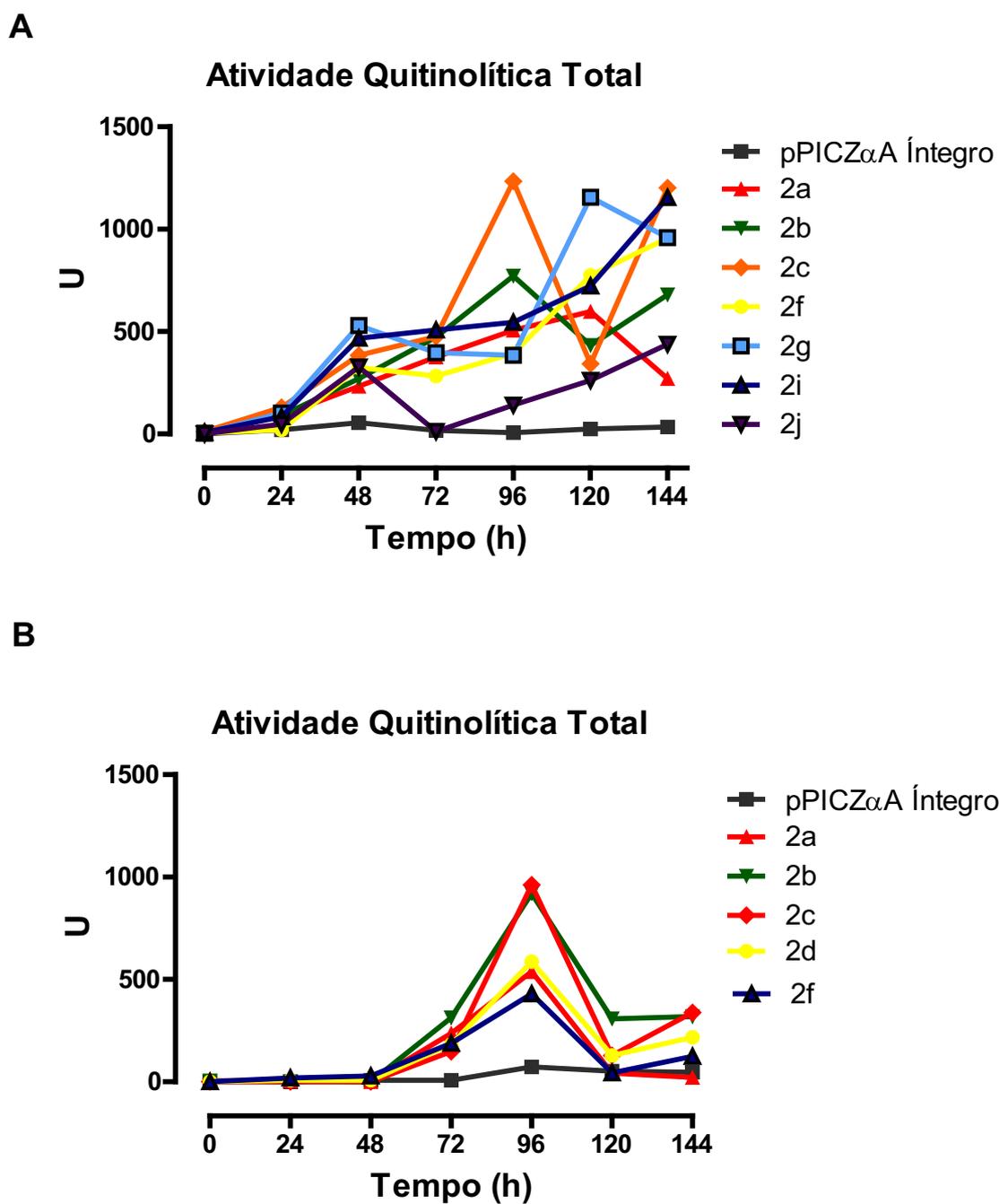


FIGURA 17 - Atividade quitinolítica total detectada no meio livre de células de culturas de *P. pastoris*. **(A)** Clones oriundos de células de *P. pastoris* (GS115) transformadas com pPICZ α A-CV3316. **(B)** Clones oriundos de células de *P. pastoris* (KM71H) transformadas com pPICZ α A-CV3316. Uma unidade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de N-acetil- β -D-glucosamina/ml/h a 37 °C.

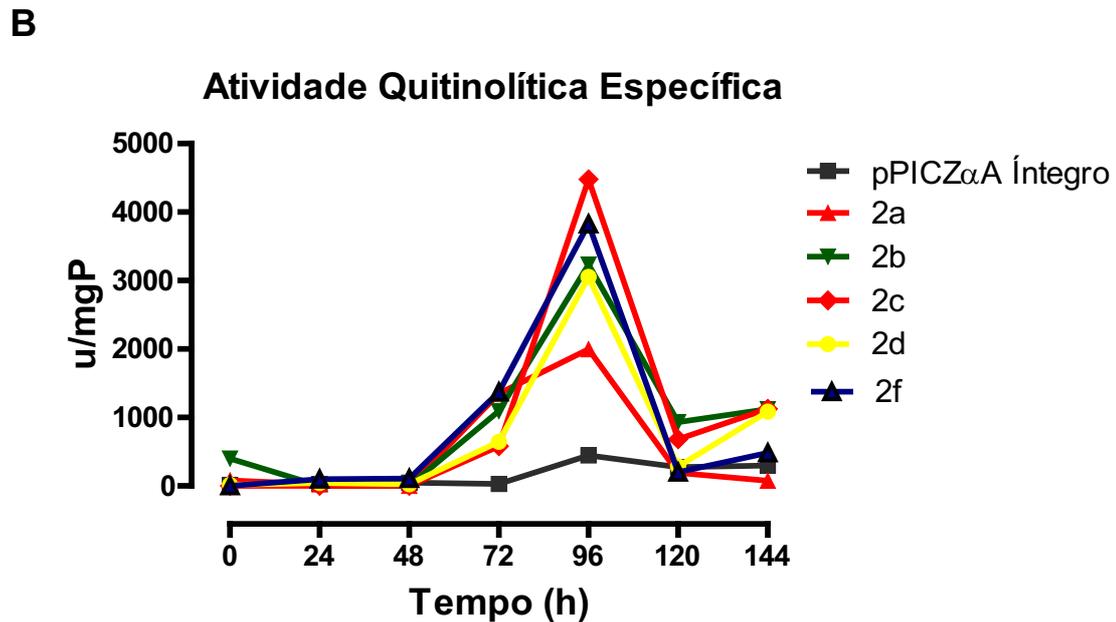
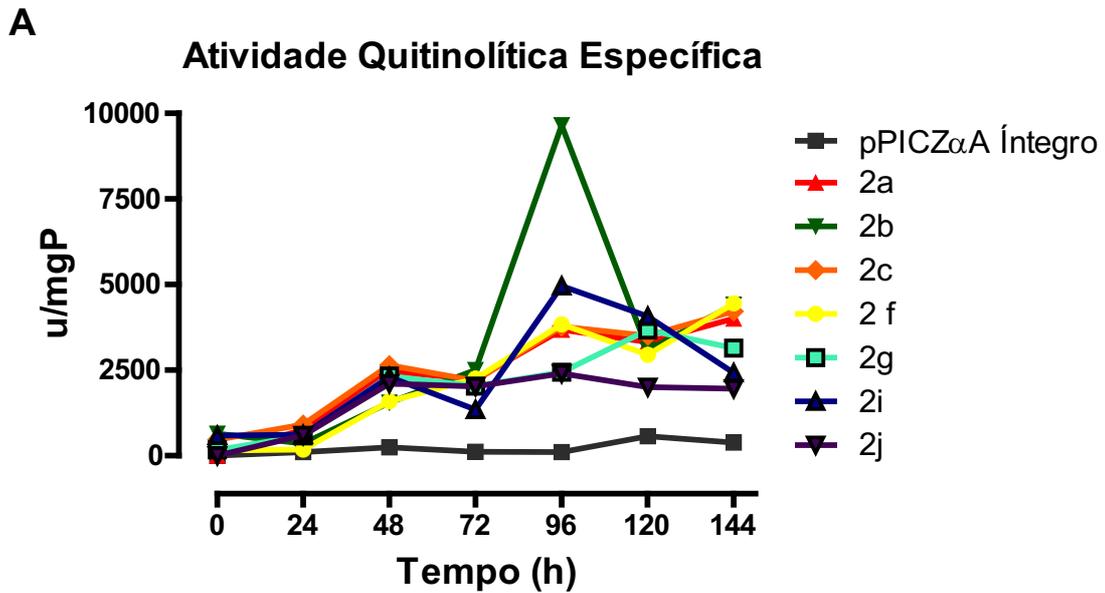


FIGURA 18 - Atividade quitinolítica específica detectada no meio livre de células de culturas de *P. pastoris*. (A) Clones oriundos de células de *P. pastoris* (GS115) transformadas com pPICZ α A-CV3316. (B) Clones oriundos de células de *P. pastoris* (KM71H) transformadas com pPICZ α A-CV3316. Uma unidade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de N-acetil- β -D-glucosamina/ml/h a 37 °C.

7.6. Purificação e atividade da quitinase recombinante

O clone 2b da estirpe GS115 foi utilizado nos passos subseqüentes de produção e purificação da quitinase. A purificação da proteína recombinante (rCHI3316) foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. A fração 0/95, proveniente da precipitação com sulfato de amônio, foi concentrada em Vivaspín 20, *cut off* 30 kDa. Depois disso, a amostra foi dialisada contra tampão (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 0,005 M) e foi então aplicada em coluna de *Sepharose* níquel (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare, previamente equilibrada com o tampão (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 0,005 M).

A amostra foi separada em três frações: P1, pico não retido, eluído com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 0,005 M; P2 e P3, picos retidos, eluídos da coluna com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 0,04 M e 0,5 M, respectivamente (Figura 19). Cada pico foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com o intuito de ver o grau de pureza de cada fração.

O P2 exibiu uma única banda de massa molecular aparente de 87 kDa e apresentou atividade hidrolítica para quitina coloidal com atividade específica de 1.189,40 U/mgP (Figura 19, Tabela 2). Além disso, P1 e P3 não apresentaram banda referente à massa molecular estimada da quitinase e não exibiram atividade hidrolítica para quitina coloidal (Figura 19). A quitinase recombinante apresentou um rendimento de 3,4% (Tabela 2).

Lee *et al.* (2010) relataram expressão de uma quitinase bacteriana (rCHI21702) em células de *P. pastoris* X33. Essa proteína foi precipitada com sulfato de amônio 80%, depois dialisada contra tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, e, em seguida, purificada em matriz de phenil-sepharose. No final desse processo de purificação, a proteína demonstrou um rendimento de 0,3%. Além disso, essa proteína exibiu excelente atividade quitinolítica específica (20 U/mgP), quando o substrato usado foi p-nitrofenil- β -D-N,N'-diacetilquitobiose.

A rCHI3316 purificada apresentou atividade para quitina coloidal, além disso exibiu um rendimento 11 vezes maior do que outra quitinase (LEE *et al.*, 2010).

Desse modo, podemos concluir que rCHI3316 foi purificada de modo satisfatório e utilizada nos passos subseqüentes de caracterização bioquímica e estrutural.

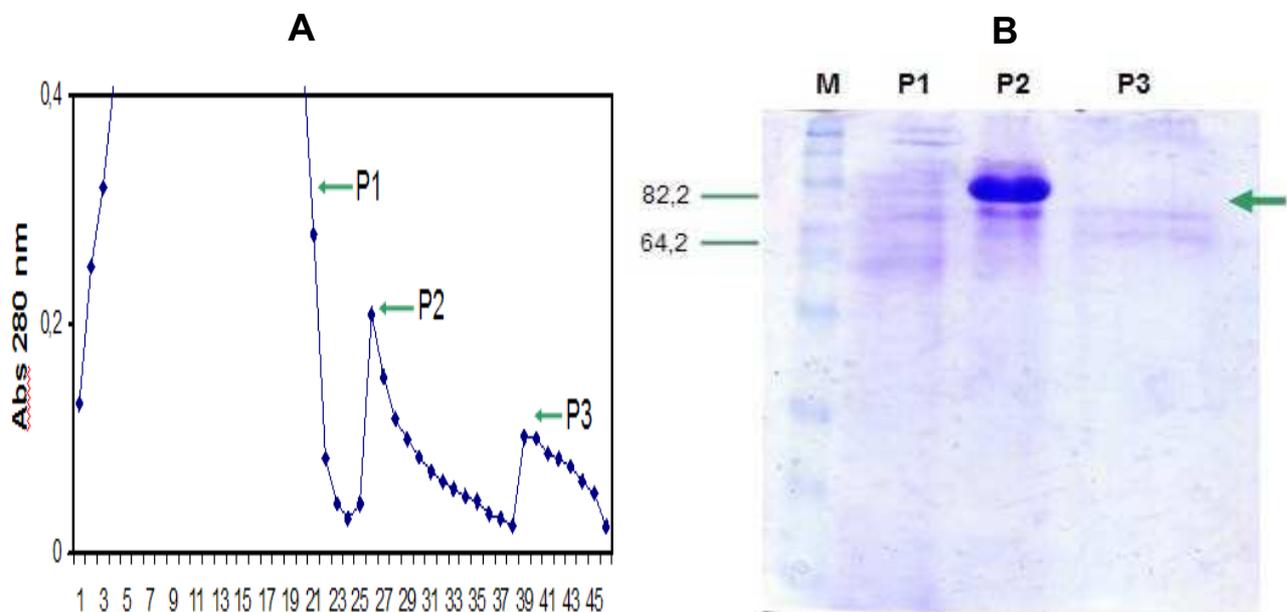


FIGURA 19 – Perfil cromatográfico do processo de purificação de uma quitinase recombinante de *C. violaceum* expressa em *P. pastoris* GS115. **(A)** Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado da quitinase recombinante de *C. violaceum* em coluna de Ni-sepharose 6 Fast Flow, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 0,005 M. Fluxo 1mL/min. Frações de 1,5 mL. Os picos retidos foram eluidos com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; contendo NaCl 0,5 M acrescido de Imidazol 0,04 M (P2) ou Imidazol 0,5 M (P3). **(B)** Eletroforese em gel de poliácridamida (15%), revelado com *Coomsie Brilliant Blue R-250*, das frações obtidas após cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Foram aplicados 5 µg de proteína no P1 e P3, e 20 µg no P2.

TABELA 2 - Purificação da quitinase recombinante (rCHI3316) de *C. violaceum* ATCC12472

Etapa	Volume (mL)	mgP/mL	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mgP)	Rendimento %	Purificação (X)
F0/95	70,0	1,0	13.790,4	197,0	100,0	1,0
Vivaspin 20 (cut off 30kDa)	10,0	1,7	5.639,0	330,0	24,4	1,7
P2 NI-S6FF	2,0	1,2	2.854,0	1189,4	3,4	6,4

7.7. Atividade enzimática sobre substratos sintéticos

A atividade quitinolítica da proteína recombinante (rCHI3316) foi avaliada usando diferentes substratos sintéticos: 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo, 4-nitrofenil N-N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo, 4-nitrofenil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriose. A rCHI3316 não exibiu atividade para o análogo do dissacarídeo (4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo), no entanto apresentou atividade para os análogos do trissacarídeo (4-nitrofenil N-N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo) e tetrassacarídeo (4-nitrofenil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriose) (Tabela 3). Haja vista que a rCHI3316 demonstrou atividade para dois substratos, essa nova enzima pode ser considerada uma endoquitinase.

A atividade endoquinolítica de uma quitinase bacteriana de *Sanguibacter antarcticus* (rCHI21702), expressa em *P. pastoris*, foi comprovada, quando esta enzima foi colocada em contato com diferentes substratos, tais como N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc), N-N'-diacetilquitobiose (GlcNAc)₂, N-N'-N''-triacetilquitotriose (GlcNAc)₃, N-N'-N''-N'''-tetraacetilquitotetrose (GlcNAc)₄, penta-N-acetilquitopentose (GlcNAc)₅, hexa-N-acetilquitohexose (GlcNAc)₆ e quitina coloidal. Essa proteína não apresentou atividade para GlcNAc e (GlcNAc)₂, todavia digeriu (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆ e quitina coloidal, liberando (GlcNAc)₂ como principal produto dessa digestão, que caracterizou essa enzima como uma endoquitinase (LEE *et al.* 2010).

Assim como rCHI21702 demonstrou atividade para diferentes substratos, sendo, desse modo, considerada uma endoquitinase, podemos inferir com base na atividade hidrolítica dessa quitinase, que rCHI3316 também apresenta atividade endoquitinolítica.

TABELA 3 – Atividade específica (U/mgP) frente a diferentes substratos sintéticos da quitinase recombinante (rCHI3316) de *C. violaceum* ATCC 12472. Uma quitinase de *Streptomyces griseus* foi utilizada como controle positivo. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de *p*-nitrofenol/ml/h a pH 4,8 em 37 °C

Substrato sintético	Quitinase de <i>Streptomyces griseus</i>	Quitinase de <i>Chromobacterium violaceum</i>
4-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminídeo	0,0	0,0
4-nitrofenil N-N'-diacetil-β-D-chitobiosídeo	9925,0	30411,0
4-nitrofenil- β-D-N-N'-N''-triacetilquitotriose	8862,5	13150,0

7. 8. Avaliação da Atividade quitinásica em diferentes valores de pH

A atividade enzimática da quitinase recombinante (rCHI3316) foi estável na faixa de pH 5,0 - 9,0 e a rCHI3316 exibiu atividade relativa de 100% quando quitina coloidal foi utilizada como substrato em pH 5,0 a 37 °C. Essa atividade hidrolítica ficou abaixo dos 20% nos pH 2,0 - 4,0, sendo reduzida rapidamente quando pH excedeu o valor 9,0 e inativada no pH 10,0 (Figura 20).

Algumas quitinases bacterianas produzidas comercialmente apresentam pH ótimo em torno de 4,0 – 10,0 (SUZUKI *et al.*, 2002; NEERAJA *et al.*, 2010). Em adição, outras quitinases bacterianas tiveram seus pH ótimos determinados, tais como, pH 5,4 para CHIT60 de *Serratia phymuthica* (JENS *et al.*, 2001), pH 5,5 para *Bacillus* sp. (WOO e PARK, 2003) e *Enterobacter* sp. NRG4 (Lee *et al.* 2007).

Quitinases de fungos, pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases, são ativas em pH 4,0 – 7,0 (GORTARI e HOURS, 2008). Por exemplo, quitinases dos fungos *C. cupreum* e *Chaetomium thermophilum*, expressas em células de *P. pastoris* GS115, exibiram atividade quitinolítica relativa de 100% sobre quitina coloidal em pH 5,8 e 5,5, respectivamente (WANG e YANG, 2009; LI *et al.*, 2010).

O pH ótimo da rCHI3316 está dentro faixa de pH na qual outras quitinases da família 18 glicosil hidrolases estão ativas.

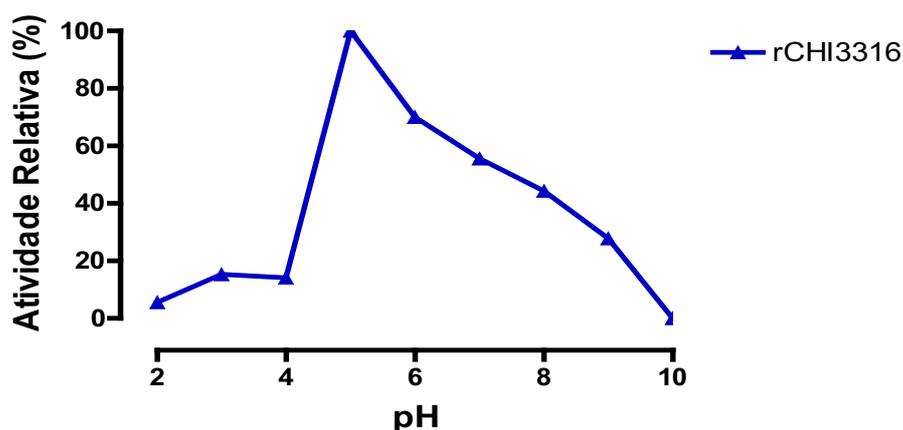


FIGURA 20 - Efeito do pH sobre a atividade enzimática da quitinase recombinante (rCHI3316) de *C. violaceum* produzida em *P. pastoris* GS115. Uma unidade (U) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de açúcar (N-acetil-D-glucosamina)/mL/hora a 37 °C, a partir do substrato quitina coloidal.

7. 9. Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de CD da estrutura secundária da quitinase recombinante (rCHI3316) foi realizado com a finalidade de avaliar sua composição estrutural e estabilidade térmica. A rCHI3316 em temperatura ambiente (24 °C) apresentou picos máximo e mínimo em 202 e 214 nm, respectivamente (Figura 21). Esse espectro é característico de folha beta (KELLY *et al.*, 2005; CORRÊA e RAMOS, 2009). A desconvolução desse espectro permitiu definir os percentuais de estrutura secundária: 37% de hélice alfa, 26% de folha beta e 38% de estrutura randômica.

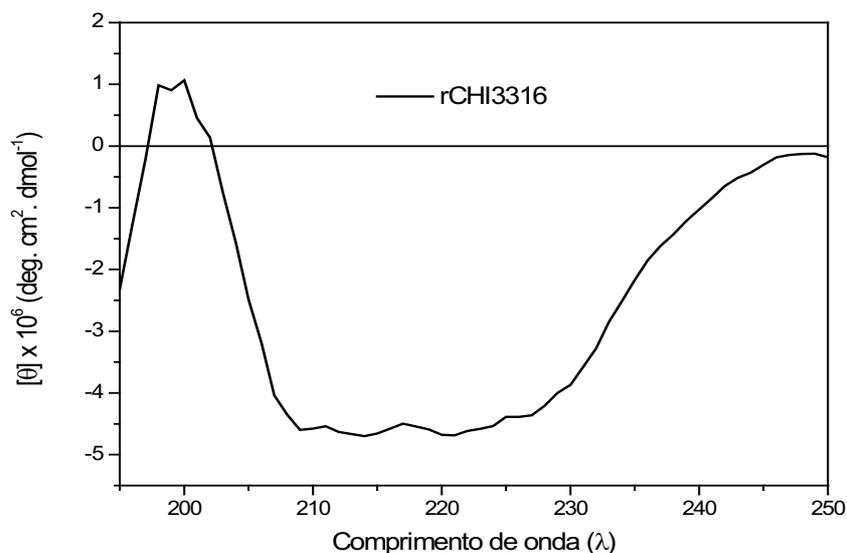


FIGURA 21 – Espectro de CD (*FAR-UV*) da quitinase recombinante (rCHI3316) de *C. violaceum* expressa em células de *P. pastoris* GS115. A proteína foi dissolvida em H₂O Milli-Q, a uma concentração de 0,519 mg/mL e incubada a 24 °C por 10 minutos.

A estabilidade estrutural da proteína recombinante (rCHI3316) foi avaliada quanto à sua termoestabilidade. Para isso, a rCHI3316 foi incubada de 10 a 90 °C, em intervalos de 10 °C, por 10 minutos (Figura 22). Os dados mostram que nas temperaturas de 10 a 50 °C, a quitinase exibiu um espectro de CD característico de folha beta com máximo entre 195 - 200 nm e mínimo observado entre 210 - 220 nm. Nas temperaturas de 60 a 90 °C, o espectro de CD obtido é característico de hélice alfa com máximo em torno de 195 nm e dois mínimos em torno de 208 e 220 nm, ambos os espectros de CD (hélice alfa e folha beta) são característicos do domínio catalítico, barril TIM (α_8/β_8), das quitinases da família 18 das glicosil hidrolases (LU *et al.*, 2002; ARAKANE *et al.*, 2003). Essa mudança conformacional indica uma possível termoestabilidade da rCHI3316, pois a proteína não adquiriu um espectro característico de estrutura desenovelada ou desnaturada com a elipticidade molar tendendo a zero, mas sim exibiu um espectro característico de hélice alfa, seguido de um aumento da elipticidade molar. A partir dos estudos de termoestabilidade da estrutura secundária da rCHI3316 foi possível definir, graficamente, a temperatura média de transição conformacional, que apresenta o valor de $59,6 \pm 1,21$ °C (Figura 23).

Neeraja *et al.* (2010) observaram mudanças conformacionais na estrutura secundária de duas quitinases recombinantes mutantes (BliGH e BliGH-CeBD) de *Bacillus licheniformis* com o aumento gradual da temperatura (30 a 100 °C). O espectro de CD de BliGH revelou não haver mudança conformacional de 30 – 50 °C. Entretanto, em temperaturas superiores (60 a 100 °C), ocorreu diminuição da conformação de hélice alfa e aumento das conformações de folha beta e estrutura randômica. Já para BliGH-CeBD, houve diminuição no conteúdo de hélice alfa a partir de 30 a 100 °C, seguido pelo aumento de folha beta e estrutura randômica. Essas proteínas também foram pré-incubadas, durante 1h, nas temperaturas de 30 a 100 °C, seguido pela análise de CD. A proteína BliGH exibiu diminuição acentuada na conformação de hélice alfa, com concomitante aumento de folha beta e estrutura randômica de 30 a 50 °C. Essa mudança seguiu-se até 100 °C. No entanto, a enzima BliGH-CeBD não apresentou mudança significativa na faixa de temperatura testada (NEERAJA *et al.* 2010).

Os espectros de CD obtidos para rCHI3316 ratificam essa quitinase como membro da família 18 das glicosil hidrolases. Quanto à termoestabilidade da rCHI3316 monitorada por CD, é necessário realizar novos experimentos de CD e atividade quitinolítica com a proteína em um tempo maior de incubação nessas temperaturas (10 – 90 °C) ou incubar a enzima em temperaturas mais elevadas (> 90 °C) para comprovar, realmente, esta estabilidade estrutural.

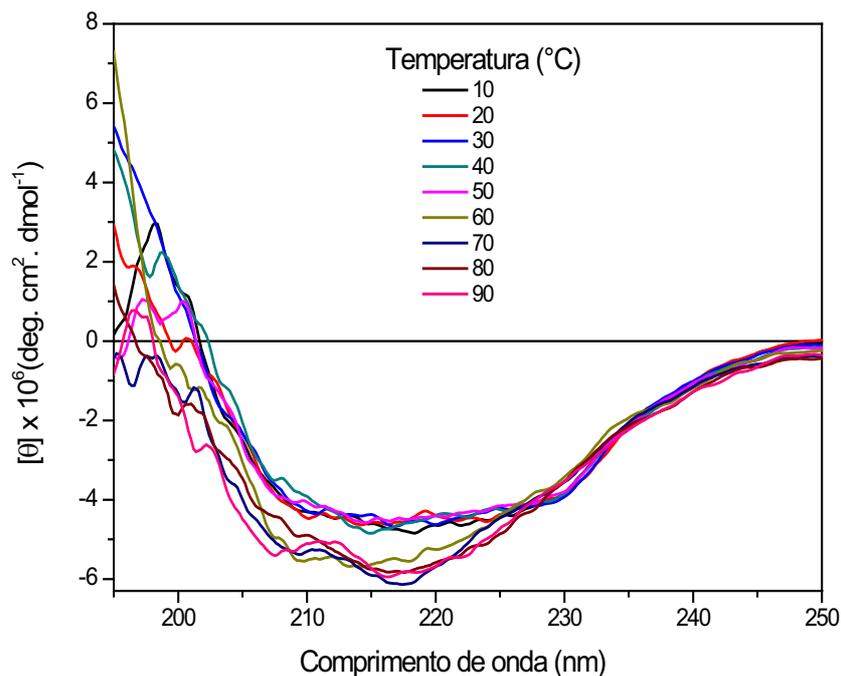


FIGURA 22 – Efeito da temperatura na estrutura secundária da quitinase recombinante (rCHI3316) monitorado por dicroísmo circular. A rCHI3316 foi dissolvida em água Milli-Q, a uma concentração de 0,519 mg/mL e incubadas por, 10 min, a temperaturas sucessivas de 10 a 90 °C, em intervalos de 10 °C.

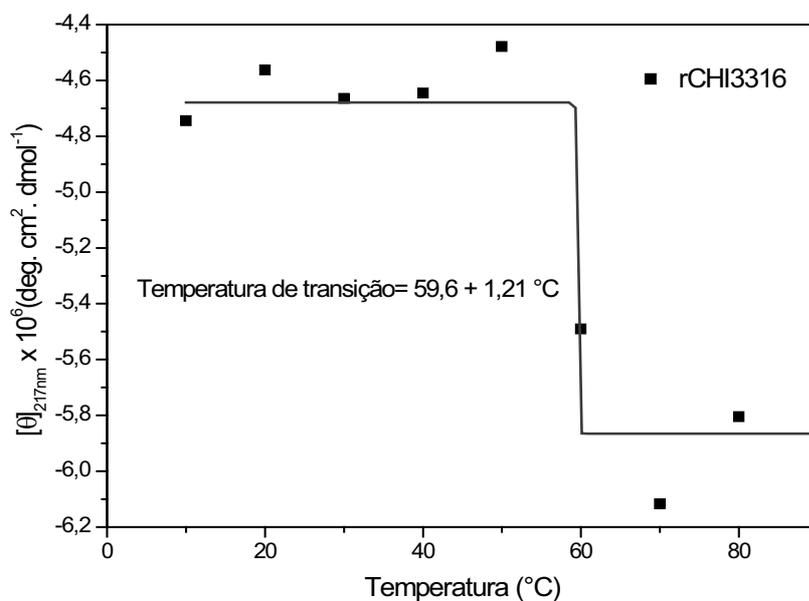


Figura 23 – Temperatura média de transição conformacional da quitinase recombinante (rCHI3316) quando submetida à variação de temperatura de 10 a 90 °C, determinada no comprimento de onda de 217 nm, em espectropolarímetro Jasco 815.

7.10. Espectro de fluorescência

A integridade estrutural da quitinase recombinante (rCHI3316) foi avaliada através de espectroscopia de emissão de fluorescência. Os resíduos de triptofano presentes nas proteínas atuam como sondas espectrais para estrutura terciária. Os máximos de emissão de fluorescência foi em 339 nm para rCHI3316, excitada em 280 nm, e em 342 nm para rCHI3316, excitada em 295 nm (Figura 24). Esses valores máximos de emissão são característicos de resíduos de triptofano parcialmente expostos ao solvente (BURSTEIN *et al.*, 1973). Além disso, os resultados de fluorescência obtidos para rCHI3316 demonstraram que a proteína está na sua conformação nativa, pois os picos máximos de fluorescência foram de 339 e 342 nm. Quando a proteína está desnaturada, os seus resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão expostos ao meio aquoso, caracterizada por emitir um pico de fluorescência em torno de 355 - 360 nm, que é referente ao máximo de fluorescência do triptofano em solução (LADOKHIN *et al.*, 2000).

A espectroscopia de emissão por fluorescência é amplamente usada para caracterizar macromoléculas biológicas e identificar mudanças conformacionais nos fluoróforos como triptofano, tirosina e fenilalanina. A fluorescência desses resíduos é muito sensível ao sítio onde eles se encontram e, logo, é possível monitorar suas alterações por meio de parâmetros como o máximo de emissão (OLIVEIRA, 2009). Os espectros de fluorescência obtidos para rCHI3316 fornecem características estruturais dessa molécula, além de, futuramente, possibilitar os estudos dessa molécula com ligantes, com o intuito de entender o seu papel funcional.

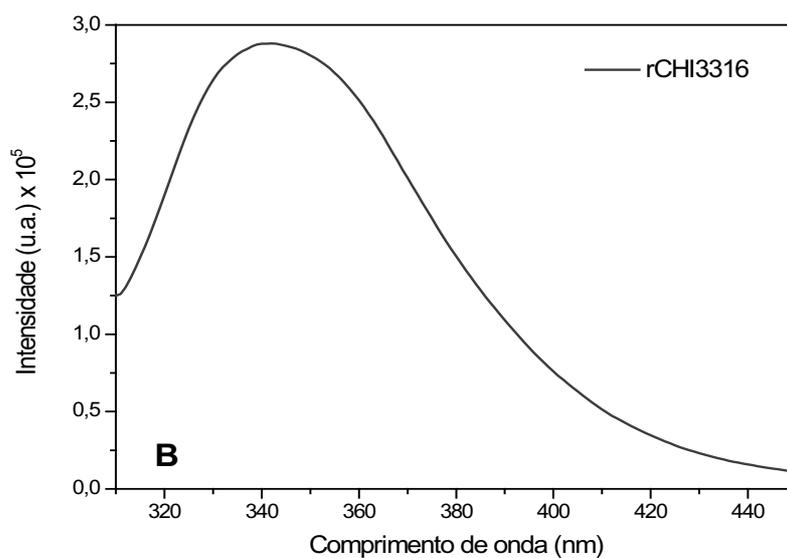
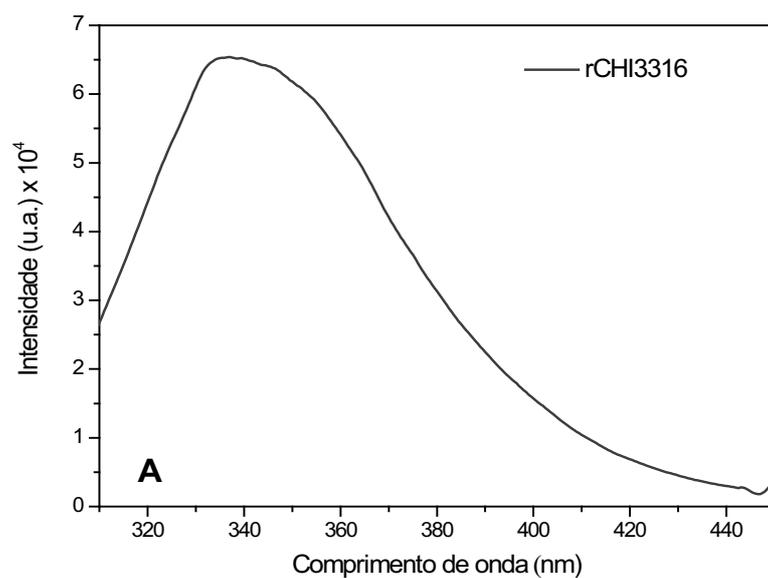


FIGURA 24 – Espectro de fluorescência da rCHI3316. A quitinase recombinante (0,040 mg/mL) foi dissolvida em H₂O Milli-Q e submetida às análises em fluorímetro ISSK₂, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. **(A)** rCHI3316 excitada a 280 nm – máximo de 339 nm. **(B)** rCHI3316 excitada a 295 nm – máximo de 342 nm.

7.11. Atividade antifúngica

O potencial antifúngico da quitinase recombinante (rCHI3316) foi testado através da capacidade de inibir a germinação e o crescimento vegetativo de esporos de espécies patogênicas de interesse na agricultura, tais como *F. solani*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *P. herquei*. A proteína foi utilizada, no ensaio, na concentração de 0,630 mg/mL, a qual não foi capaz de inibir a germinação e o crescimento micelial de esporos das espécies testadas (Figura 25).

Então, quatro hipóteses foram levantadas para a ausência de atividade antifúngica: a primeira possibilidade seria a necessidade de atuação sinérgica com outras proteínas, tais como β -1,3-glucanases. Geralmente, quitinases atuam de modo mais efetivo em combinação com β -1,3-glucanases (MAUCH *et al.*, 1988; COLLINGE *et al.*, 1993; HAM *et al.* 1997; STAHL e BISHOP, 2000; SELINTRENIKOFF, 2001; LIMA, 2004). A segunda possibilidade para ausência de inibição do crescimento de fungos para algumas quitinases seria a variação no percentual de quitina (22-44%) presente na parede celular de fungos (PATIL *et al.*, 2000; LIMA, 2004). A terceira razão seria que quitinases e endoglucanases atacam e degradam a parede celular de fungos e que esses patógenos neutralizam essas enzimas produzindo inibidores (HAM *et al.*, 1997). A quarta hipótese é que alguns fungos cujas paredes celulares são compostas de quitina possuem genes que codificam proteínas, *Avr4* e *Ecp6*, capazes de interagir com a quitina de suas paredes celulares, protegendo-os de uma maneira indireta da ação de quitinases de plantas (VAN DER BURG *et al.*, 2006; BOLTON *et al.*, 2008; STERGIPOULOS e DE WIT, 2009). Portanto, podemos inferir que a ausência de atividade antifúngica da rCHI3316 estará associada com a variação na porcentagem de quitina presente na parede celular dos fungos testados, o contrataque de fungos fitopatogênicos que produzem inibidores de quitinases, os fatores de virulência, *Avr4* e *Ecp6*, que tornam inacessível à quitina constituinte da parede celular dos fungos e a falta de sinergismo com β -1,3-glucanases, que é essencial para degradação da parede celular dos fungos.

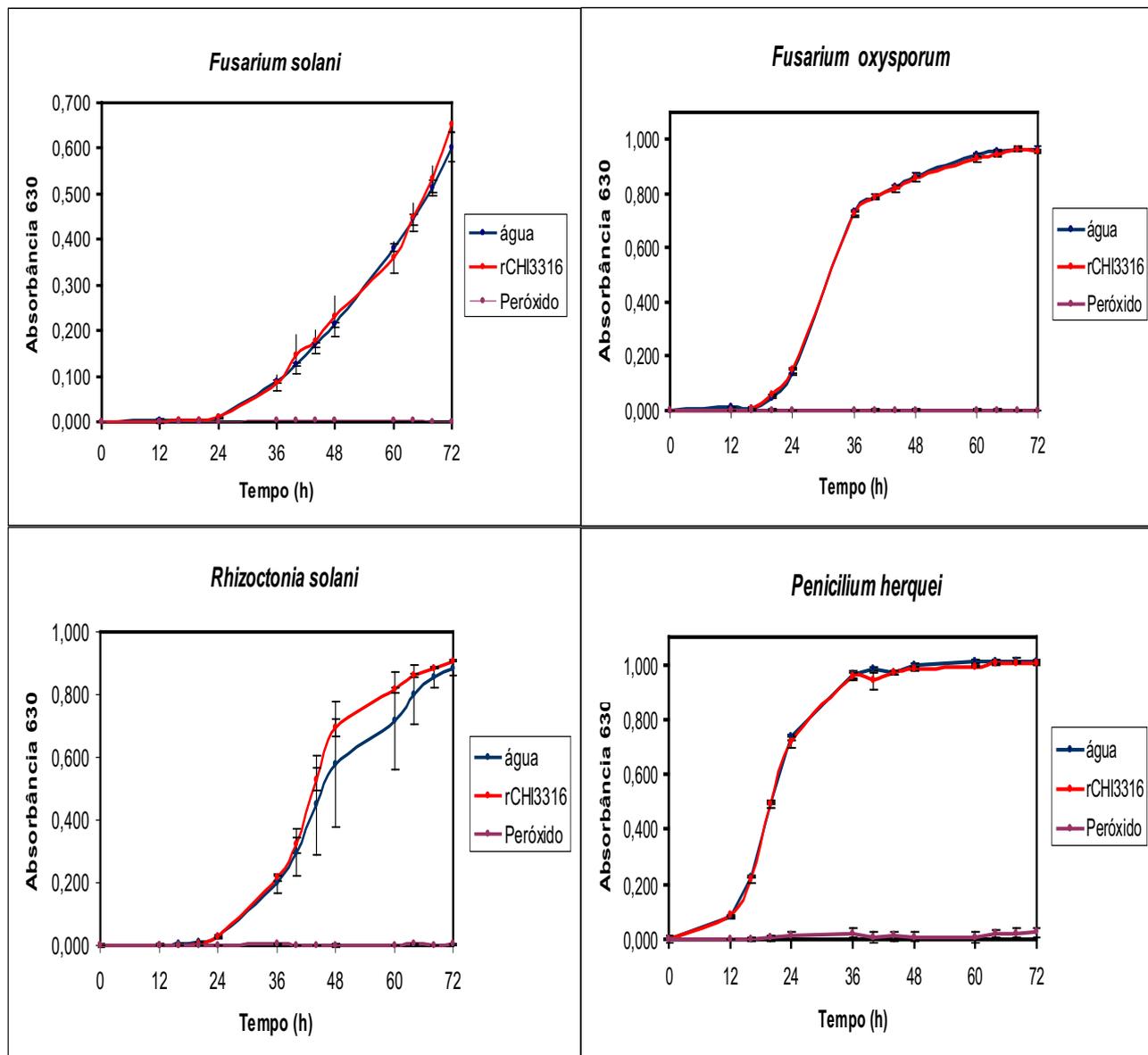


FIGURA 25 - Ação da quitinase recombinante (rCHI3316) sobre a germinação e crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Azul (água - Controle negativo), vermelho (rCHI3316) e roxo (peróxido de hidrogênio - controle positivo).

8.0. CONCLUSÃO

Os testes *in silico* e dicroísmo circular classificaram a enzima recombinante como uma quitinase membro da família 18 das glicosil hidrolases. A quitinase recombinante (rCHI3316) foi expressa de forma solúvel utilizando o sistema de expressão *Pichia pastoris*. Além disso, rCHI3316 foi purificada de forma satisfatória, permitindo a sua caracterização como uma endoquitinase, entretanto rCHI3316 não se mostrou ativa contra os fungos fitopatogênicos testados.

9.0. Literatura Citada

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**. v. 150, p. 2029-2035, 2004.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego, USA: Elsevier, 2005. 393-394 p.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego, USA: Elsevier, 2005. 538 p.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego, USA: Elsevier, 2005. 557 p.

AKAGI, K.; WATANABE, J.; HARA, M.; KEZUKA, Y.; CHIKAISHI, E.; YAMAGUCHI, T.; AKUTSU, H.; NONAKA, T.; WATANABE, T.; IKEGAMI, T. Identification of the substrate interaction region of the chitin-binding domain of *Streptomyces griseus* chitinase C. **Journal of Biochemistry**. v. 139, p. 483-493, 2006.

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cell and Molecular Life Sciences**. v. 67, p. 201-216, 2010.

ARAKANE, Y.; ZHU, Q.; MATSUMIYA, M.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J. Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, p. 631-648, 2003.

ARNAU, J.; LAURIZTEN, C.; PETERSON, G. E.; PEDERSEN, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**. v. 48, p. 1-13, 2006.

ARONSON-JUNIOR, N. N.; HALLORAN, B. A.; ALEXYEV, M. F.; AMABLE, L., MADURA, J. D. Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. **Biochemical Journal**. v. 376, p. 87-95, 2003.

AUBOURG, S.; ROUZÉ, P. Genome annotation. **Plant physiology and Biochemistry**. v. 39. p. 181-193, 2001.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995. 69-85 p.

BLATTNER, F.R.; PLUNKETT III, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. v. 277, p. 1453-1462, 1997.

BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comptes Rendus del Académie des Sciences**, v. 94, p. 562-563, 1882.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1,3 glucanase. In: GURR, S.J.; McPHERSON, M.J.; BOWLES, D.J. **Molecular plant pathology: a practical approach**. vol II, 1992.

BOLLER, T.; GEHRI, A.; MAUCH, F.; VÖGELLI, U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**. v. 157, p. 22-31, 1983.

BOLTON, M. D.; ESSE, H. P.; VOSSEN, J. H.; DE JONGE, R.; STERGIOPOULOS, I.; STULEMEIJER, I. J. E.; VAN DE BERG, G. C. M.; BORRÁS-HIDALGO, O.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; DE WIT, P. J. G. M.; JOOSTEN, M. H. A. J.; THOMMA, B. P. H. J. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. **Molecular Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 119-136, 2008.

BORK, P.; DANDEKAR, T.; EISENHABER, Y.; HUYNEN, M.; YUAN, M. Prediction function: From gene to genomes and back. **Journal of Molecular Biology**. v. 283, p. 707-725, 1998.

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**. v. 253, p. 164-170, 1991.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMELD, K. A.; GODDARD III, W. A. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v.161, p. 435-442, 1998.

BRIERLY, R. A.; DAVIS, G. R.; HOLTZ, G. C. Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells. **United States Patent**. v. 5, p. 324 e 639, 1994.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**. v. 69, p. 61-66, 1990.

BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Guide to protein purification**. 2. ed. Pasadena: Methods in Enzymology, 2009. 133 p.

BURSTEIN, E. A.; VEDENKINA, N. S.; IVKOVA, M. N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochemistry and Photobiology**. v. 18, n. 4, p. 263-279, 1973.

CALDAS, L.R. Um pigmento nas águas negras. **Ciência Hoje**, n. 11, p. 55-57, 1990.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast, *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 329-332, 2002.

CEREGHINO, J. P. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, n.1, p. 45-66, 2000.

CHERNIN, L. S.; DE LA FUENTE, L.; SOBOLEV, V. Molecular Cloning Structural analysis and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. **Applied and Environment Microbiology**. v. 63, p. 834-839, 1997.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of digestion. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, p. 270-277, 1998.

COLIGAN, John E.; DUNN, Ben M.; SPEICHR, David W.; PLOEGH, Hidde L.; WINGFIELD, Paul T. **Currents Protocols in Protein Science**. Maryland: Wiley Interscience, 2007, 628 - 667p.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MILKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant Chitinases. **The Plant Journal**. v. 3, n. 1, p. 31-40, 1993.

CORREIA, T. O. **Quitinase de classe I de feijão-de-corda (*Vigna unguiculat*): estudo preliminar da expressão do gene, clonagem, expressão e purificação em *Escherichia coli* BL21(λ)DE3 e determinação da estrutura através da modelagem por homologia**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular). 2007. 90 f. Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**. v.3, n. 5, p. 164-173, 2009.

CREGG, J. M. MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G.; STILLMAN, C. A.; Functional Characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast, *Pichia pastoris*. **Molecular and Cell Biology**. v. 9, p. 1316-1323, 1989.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.71, n. 6, p. 773-782, 2006.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of Heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**. v. 18, p. 119-138, 2005.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structure and mechanism of glycosil hydrolases. **Structure**. v. 3, p. 853-859, 1995.

DELANO, P. F. The Pymol Molecular Graphics System. Delano Scientific. San Carlos, CA, USA. 2002. [HTTP://www.pymol.org](http://www.pymol.org).

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 297-306, 2009.

DEREWENDA, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**. v. 34, p. 354-356, 2004.

DESAI, P. N.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. **Biotechnology Advances**. v. 28, p. 427-435, 2010.

DUJON, B. The yeast genome project: what did we learn? **Trends in Genetics**. v. 227, n. 7, p. 263-270, 1996.

DUO-CHUAN, L. I.; CHEN, S.; JING, L. U. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. **Mycopathologia**. v. 159, p. 223-229, 2005.

DURÁN, N.; MENCK, C.F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, n. 27, p. 201–222, 2001.

DYSZY, F. H. **Estudos Estruturais de histatina-5 e seu análogo, TAOC° histatina-5: interação com metais e sistemas biomiméticos**. 2004. 51 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FAN, J.; WANG, H.; FENG, D.; LIU, B.; LIU, H.; WANG, J. Molecular characterization of plant in class I chitinase gene and its expression in response to infection by *Gloeosporium musarum* Cke and Masee and other abiotic stimuli. **Journal of Biochemistry**. v. 142, p. 561-570, 2007.

FAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, X.; PEI, X.; GUO, S.; PEI, Y. Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 56, p. 53-59, 2007.

FERNANDES, G. C. **Transformação de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com a região codificadora de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum***. 2010. 10 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FOURNIER, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. **The Lancet**. v. 7, p. 711-723, 2007.

FRANDBERG, E., SCHNURER, J. Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, p-nitrophenyl-beta-D-N,N'-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria. **Journal Applied Bacteriology**. v. 76, n. 3, p.259-63, 1994.

FROMMER, W. B.; NINNEMANN, O. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, plants cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 46, p. 419-444, 1995.

FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON JUNIOR, N. N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**. v. 7, p. 96-111. 2007.

GAN, Z.; YANG, J.; TAO, N.; LIANG, L.; MI, Q.; LI, J.; ZHANG, K. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 76, p. 1309-1317, 2007.

GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; JELODAR, N. B.; RAHIMIAN, H.; GHANDILI, S.; DEHESTANI, A.; SHARIATI, P. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2 preliminary report. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 26, p. 1437-1443, 2010.

GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. **Mycological Progress**. v. 7, n. 4, p. 221-238, 2008.

HAM, K.; WU, S.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- β -1,3-glucanase. **The Plant Journal**. v. 11, n. 2, p. 169-179, 1997.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PRIETO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**. v. 83, p. 313-318, 1993.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**. v. 280, p. 309-316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**. v. 293, p. 781-788, 1993.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. **Pichia protocols**. In *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press. v. 103, 1998.

HSIEH, Y.; WU, Y.; CHIANG, T.; KUO, C.; SHRESTHA, K. L.; CHAO, C.; HUANG, Y.; CHUANKHAYAN, P.; WU, W.; LI, Y.; CHEN, C. Crystal structures of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase complexes with chitoologomers reveal novel substrate binding for catalysis, a chitinase without chitin binding and insertion domains. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 41, p. 31603-31615, 2010.

IKEDA, S.; YTOW, N.; EZURA, H.; MINAMISAWA, K.; MIYASHITA, K.; FUJIMURA, T. Analysis of molecular diversity of bacterial chitinase genes in maize rhizosphere

use culture-independent methods. **Microbes and Environments**. v. 22, n. 1, p. 71-77, 2007.

JANG, M.; LEE, Y.; CHO, Y.; CHOI, Y.; KIM, C.; LEE, Y. Overexpression and characterization of a novel chitinase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. BK1. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. v.42, p.339-344, 2005.

JENS, F.; MATTEO, L.; FELICE, S.; ROLAND, S.; GABRIELE, B.; HUBERT, B. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Archive Microbiology**. v. 176, p. 421-426, 2001.

JOOSTEN, M. H. A. J.; VERBAKEL, H. M.; NETTEKOVEN, M. E.; LEEUWEN, J. V.; VAN DER VOSSSEN, R. T. M., WIT, P. J. G. M. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β 1-3 glucanase defense proteins of its host, tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 46, p. 45-59, 1995.

KASPRZEWSKA, A. Plant Chitinases - regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**. v. 8, p. 809-824, 1993.

KADOKURA, K.; SAKAMOTO, Y.; SAITO, K.; IKEGAMI, T.; HIRANO, T.; HAKAMATA, W.; OKU, T.; NISHIO, T. Production and secretion of a recombinant *Vibrio parahaemolyticus* chitinase by *Escherichia coli* and its purification. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.71, n.11, p. 2848-2851, 2007.

KAWASE, T.; SAITO, A.; SATO, T.; KANAI, R.; FUJII, T.; NIKAIDOU, N.; MIYASHITA, K.; WATANABE, T. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in *Actinobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 2, p. 1135-1144, 2004.

KAWASE, T.; YOKOKAWA, S.; SAITO, A.; FUJII, T.; NIKAIDOU, N.; MIYASHITA, K.; WATANABE, T. Comparison of enzymatic and antifungal properties between Family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3 (2). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 70, n. 4, p. 988-999, 2006.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1751, p. 119-139, 2005.

KIRUBAKARAN, S. I.; SAKTHIVEL, N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 52, p. 159-166, 2007.

KITAJIMA, S.; SATO, F. Plant-Related Proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. **The Journal of Biochemistry**. v. 125, p. 1-8, 1999.

KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 2, p. 164-168, 2005.

KWON, M.; KIM, H. S. YANG, T. H.; SONG, B. K.; SONG, J. K. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 68, p. 104-109, 2009.

LADOKHIN, A. S.; JAYASINGHE, S.; WHITE, S. H. How to measure and analyse tryptophan in membrane properly, and why bother? **Analytical Biochemistry**. v. 285, p. 235-245, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKOWSKI, R. A.; MaCARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. v. 26, p. 283-291, 1993.

LAN, X.; ZHANG, X.; HU, J.; SHIMOSAKA, M. Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.70, n.10, p. 2437-2442, 2006.

LEE, NANCY, SOUZA, C. A. D.; KRONSTAD, J. W.; Of Smuts, Blasts, Mildews and Blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. **Annual Reviews of Phytopathology**. v. 41, p. 399-427, 2003.

LEE, S. G.; KOH, H. Y.; HAN, S. J.; PARK, H.; NA, D. C.; KIM, I.; LEE, H. K.; YIM, J. H. Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. **Protein Expression and Purification**. V. 71, p. 108-114, 2010.

LEE, Y. S.; PARK, I. H.; YOO, J. S.; CHUNG, S. Y.; LEE, Y. C.; CHO, Y. S.; AHN, S. C.; KIM, C. M.; CHOI, Y. L. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp.DAU101. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 2734-2741, 2007.

LI, A.; YU, K.; LIU, H.; ZHANG, J.; HUA, L.; LI, D. Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: Cloning, expression and characterization. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 5546-5552, 2010.

LI, D. C. Review of fungal chitinase. **Mycopathologia**. v. 161, p. 345-360, 2006.

LI, H.; GREENE, L. H. Sequence and Structure Analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. **Plos one**. v. 5, n. 1, p. 1-11, 2010.

LIMA, S. C. G. **Purificação e caracterização parcial de uma quitinase de folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L) Walp.], CV. TE- 97- 411- 1E e avaliação do efeito do ácido jasmônico sobre a atividade quitinásica de folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L) Walp.], CV. TE- 97- 411- 1E.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica). 2004. 77-79 f. Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIU, Z. H.; WANG, Y. C.; QI, X. T.; YANG, C. P. Cloning and characterization of a chitinase gene Lbchi31 from *Limonium bicolor* and identification of its biological activity. **Molecular Biology Reports**. v. 37, p. 2447-2453, 2010.

LIU, Z. H.; YANG, Q.; HU, S.; ZHANG, J. D.; MA, J. Cloning and characterization of a novel chitinase gene (*Chi46*) from and identification of its biological activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 80, p. 241-252, 2008.

LOBLEY, A.; WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Bioinformatics**. v. 18, p. 211-212, 2002.

LOBO JUNIOR, M. **Cultivo do feijão irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais**. In: Sistemas de Produção. Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. n.5, ISSN 1679-8869, 2005.

LU, Y.; ZEN, K.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J. Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site of acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, p. 1369-1382, 2002.

MATSUMOTO, T.; NONAKA, T.; HASHIMOTO, M.; WATANABE, T.; MITSUI, Y. Three dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution. **Proceedings of the Japan Academy Series B**. v. 75B, N. 9, p. 269-274, 1999.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hidrolases in pea tissue, II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanases. **Plant Physiology**. V. 88, p. 936-942, 1998.

MITSUTOMI, O.; ISONO, M.; UCHIYAMA, A.; NIKAIDOU, N.; IKEGAMI, T.; WATANABE, T. Chitosanase activity of the enzyme previously reported as β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL12. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p. 2107-2114, 1998.

MIZUNO, R.; ITOH, Y.; NISHIZAWA, Y.; KEZUKA, Y.; SUZUKI, K.; NONAKA, T.; WATANABE, T. Purification and characterization of a rice class I chitinase, OsChia1b, produced in *Escherichia coli*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 893-895, 2008.

NEERAJA, C.; KONDREDDY, A.; PURUSHOTHAM, P.; SUMA, K.; SARMA, P. V. S. R. N.; MOERSCHBACHER, B. M.; PODILE, A. R. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 30, n. 3, p. 231-241, 2010.

NEERAJA, C.; MOERSCHBACHER, B.; PODILE, A. R. Fusion of cellulose binding domain to the catalytic domain improves the activity and conformational stability of chitinase in *Bacillus licheniformis* DSM13. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 3635-3641, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo: Sarvier, 2002. 126 p.

OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT6037. **Journal of Bacteriology**. v. 178, p. 5065-5070, 1996.

OLIVEIRA, H. D. **Toxinas protéicas de sementes de soja [*Glycine max* (L) Merr.]; aspectos moleculares e funcionais**. 2009. 104 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rofsii*. **Phytopathology**. v. 78, p. 84-88, 1988.

PARK, S.K.; KIM, C.W.; KIM, H.; JUNG, J.S.; HARMAN, G.E. Cloning and high-level production of a chitinase from *Chromobacterium* sp. and the role of conserved or non conserved residues on its catalytic activity. **Biotechnologically relevant enzymes and proteins**, v. 74, p. 791-804, 2007.

PARK, S. M.; KIM, D.; TRUONG, N. H.; ITOH, Y. Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.). **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 697-702, 2002.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botanica Brasilica**. v. 23, n. 4, p. 1129-1132, 2009.

PATIL, R. S.; GHOMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, n. 7, p. 473-483, 2000.

PEREZ-IRATXETA, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **BMC Structural Biology**. v. 8, n. 25, p. 1-5, 2008.

PERRAKIS, A.; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIN, A.B.; CHET, I.; WILSON, K. S.; VORGIAS, C. E. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 angstroms resolution. **Structure**. v. 2, p. 1169-1180, 1994.

PRAKASH, N. A. U.; JAYANTHI, M.; SABARINATHAN, R.; KANGUEANE, P.; MATHEW, L.; SEKAR, K. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of Molecular Evolution**. v. 70, p. 466-478, 2010.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**. v. 7, p. 95-99, 1963.

REISSIG, J.L.; SROMENGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. **Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.

ROMANO, E. **Extração de DNA de tecidos vegetais**. In. Manual de Transformação Genética de Plantas. Ana Cristina Brasileiro e Vera Tavares de Campos Carneiro. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, p. 163-176, 1998.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interactions. **FEMS Microbiology Review**. v. 11, p. 317-338, 1993.

SALLI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**. v. 234, p. 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARTORATO, A.; NECHET, K. L.; VIEIRA, B. A. H. Diversidade Genética de Isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em Feijão-caupi no Estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, n. 3, p. 297-301, 2006.

SELINTRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SHAKHBAZAU, A. V.; KARTEL, N.A. Chitinases in bioengineering research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, n. 8, p. 881-889, 2008.

SOANES, D. M.; RICHARDS, T. A.; TALBOT, N. J. Insights from sequencing fungal and Oomycete genomes: What can We learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? **The Plant Cell**. v. 19, p. 3318-3326, 2007.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v.115, p. 113-128, 2004.

SLESAREV, A. I.; MEZHEVAYA, K. V.; MAKAROVA, K. S.; POLUSHIN, N. N.; SHCHERBININA, O. V.; SHAKHOVA, V. V.; BELOVA, G. I.; ARAVIND, L.; NATALE, D. A.; ROGOZIN, I. B.; TATUSOV, R. L.; WOLF, Y. I.; STETTER, K. O.; MALYKH, A. G.; KOONIN, E. V.; KOZYAVKIN, S. A. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. **PNAS**. v. 99, n. 7, p. 4644-4649, 2002.

STAHL, E. A.; BISHOP, J. G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 3, p. 299-304, 2000.

STERGIOPOULOS, I.; DE WIT, P. J. G. Fungal effector proteins. Annual **Review of Phytopathology**. v. 47, p. 233-263, 2009.

SUZUKI, K.; SUGAWARA, N.; SUZUKI, M.; UCHIYAMA, T.; KATUONO, F. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 66, p. 1075-1083, 2002.

SUZUKI, K.; TAIYOJI, M.; SUGAWARA, N.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; WATANABE, T. The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and relationship of its product to other bacterial chitinases. **Biochemical Journal**. v. 343, p. 587-596, 1999.

SUZUKI, K.; SUZUKI, M.; TAIYOJI, M.; NIKAIDOU, N.; WATANABE, T. Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p.128–135, 1998.

SYNSTAD, B.; GASEIDNES, S.; EIJSINK, V. G.; VAN AALTEN, D. M. F. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. **European Journal of Biochemistry**. v. 271, p. 253-262, 2004.

TAIRA, T.; OHNUMA, T.; YAMAGAMI, T.; ASO, Y.; ISHIGURO, M. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 66, p. 970-977, 2002.

TERPE, K. Over view of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 60, p.523-533, 2003.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S.; Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 43, p. 61-87, 2003.

TOMB, J.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A. R.; CLAYTON, R. A.; SUTTON, G. G.; FLEISHMANN, R. D.; KETCHUM, K. A.; KLENK, H. P.; GILL, S.; DOUGHERTY, B. A.; NELSON, K.; QUACKENBUSH, J.; ZHOU, L.; KIRKNESS, E. F.; PETERSON, S.; LOFTUS, B.; RICHARDSON, D.; DODSON, R.; KHALAK, H. G.; GLODEK, A.; MCKENNEY, K.; FITZGERALD, L. M.; LEE, N.; ADAMS, M. D.; HICKEY, E. K.; BERG, D. E.; GOCAYNE, J. D.; UTTERBACK, T. R.; PETERSON, J. D.; KELLY, J. M.; COTTON, M. D.; WEIDMAN, J. M.; FUJII, C.; BOWMAN, C.; WATTHEY, L.; WALLIN, E.; HAYES, W. S.; BORODOVSKY, M.; KAPP, P. D.; SMITH, H. O.; FRASER, C. M.; VENTER, J. C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**. v. 388, p. 539-547, 1997.

TSUJIBO, H.; OKAMOTO, T.; HATANO, N.; MIYAMOTO, K.; WATANABE, T.; MITSUTOMI, M.; INAMORI, Y. Family 19 chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520:molecular cloning and characterization. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 64, p. 2445–2453, 2001.

VAAJE-KOLSTAD, G.; VASELLA, A.; PEER, M. G.; NETTER, C.; HOUSTON, D. R.; WESTERENG, B.; SYNSTAD, B.; EIJSINK, V. G.; VAN AALTEN, D. M. F.

Interactions of a family 18 chitinase with the designed inhibitor Hm508 and its degradation product, chitobiono- δ -lactone. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 3612-3619, 2004.

VAN AALTEN, D. M. F.; KOMANDER, D.; SYNSTAD, B.; GASEIDNES, S.; PETER, M. G. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exochitinase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 98, p. 8979-8984, 2001.

VAN DEN BURG, H. A.; HARRINON, S. J.; JOOSTEN, M. H. A. J.; VERVOORT, J.; DE WIT, P. J. G. M. *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects fungal Cell Walls Against Hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. **Molecular Plant Microbe Interactions**. v. 19, n. 12, p. 1420-1430, 2006.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERCE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **The Annual Review of Phytopathology**. v. 44, p. 135-162, 2006.

VASCONCELOS, A. T. R.; DE ALMEIDA, D. F., HUNGRIA, M., GUIMARAES, C. T., ANTONIO, R. V.; ALMEIDA, F. C.; DE ALMEIDA, L. G. P.; DE ALMEIDA, R.; ALVES-GOMES, J. A.; ANDRADE, E. M.; ARARIPE, J.; DE ARAUJO M. F. F.; ASTOLFI, S.; AZEVEDO, V.; BAPTISTA, A. J.; BATAUS, L. A. M.; BATISTA, J. D.; BELO, A.; VAN DEN BERG, C.; BOGO, M.; BONATTO, S.; BORDIGNON, J.; BRIGIDO, M. M.; BRITO, C. A.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CARDOSO, D. D.; CARNEIRO, N. P.; CARRARO, D. M.; CARVALHO, C. M. B.; CASCARDO, J. C. M.; CAVADA, B. S.; CHUEIRE, L. M. O.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; DA CUNHA, N. C.; FAGUNDES, N.; FALCAO, C. L.; FANTINATTI, F.; FARIAS, L. P.; FELIPE, M. S. S.; FERRARI, L. P.; FERRO, J. A.; FERRO, M. T.; FRANCO, G. R.; DE FREITAS, N. S. A.; FURLAN, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; GOMES, E. A.; GONCALVES, P. R.; GRANGEIRO, T. B.; GRATTAPAGLIA, D.; GRISARD, E. C.; HANNA, E. S.; JARDIM, S. N.; LAURINO, J.; LEOI, L. C. T.; LIMA, L. F. A.; LOUREIRO, M. D.; DE LYRA, M. D. C. P.; MADEIRA, H. M. F.; MANFIO, G. P.; MARANHÃO, A. Q.; MARTINS, W. S.; DI MAURO, S. M. Z.; DE MEDEIROS, S. R. B.; MEISSNER, R. D.; MOREIRA, M. A. M.; DO NASCIMENTO, F. F.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, J. G.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXAO, R. F. C.; PARENTE, J. A.; PEDROSA, F. D. P.; PENA, S. D. J.; PEREIRA, J. O.; PEREIRA, M.; PINTO, L. S. C.; PINTO, L. D.; PORTO, J. I. R.; POTRICH, D. P.; RAMALHO-NETO, C. E.; REIS, A. M. M.; RIGO, L. U.; RONDINELLI, E.; DO SANTOS, E. B. P.; SANTOS, F. R.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUANEZ, H. N.; SILVA, A. M. R.; DA SILVA, A. L. D.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SIMOES, I. D.; SIMON, D.; SOARES, C. M. D.; SOARES, R. D. A.; SOUZA, E. M.; DE SOUZA, K. R. L.; SOUZA, R. C.; STEFFENS, M. B. R.; STEINDEL, M.; TEIXEIRA, S. R.; URMENYI, T.; VETTORE, A.; WASSEM, R.; ZAHA, A.; SIMPSON, A. J. G. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p.11660-11665, 2003.

VODOVAR, N.; VALLENET, D.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; BARBE, V.; ACOSTA, C.; CATOLLILO, L.; JUBIN, C.; LAJUS, A.; SEGURENS, B.; VACHERIE, B.; WINCKER, P.; WEISSENBACH, J.; LEMAITRE, B.; MEDIGUE, C.; BOCCARD, F.

Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolic versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. **Nature Biotechnology**. v. 24, n. 6, p. 673-679, 2006.

WANG, Y.; YANG, Q. Cloning and Expression of a Novel Chitinase chi58 from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. **Biochemical Genetics**. v. 47, p. 547-558, 2009.

WARNER, S. A. J. Genomic DNA ISOLATION AND LAMBDA LIBRARY CONSTRUCTION. In: FOSTER, G. D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation. Principles and Practice**. John Wiley and Sons. Wets Sussex: England. 1996. p. 51-53.

WATANABE, T.; ITOH, Y.; YAMADA, T.; HASHIMOTO, M.; SEKINE, S.; TANAKA, H. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in degradation. **The Journal of Bacteriology**. v. 176, p. 4465-4472, 1994.

WATANABE, T.; KANAI, R.; KAWASE, T.; TANABE, T.; MITSUTOMI, M.; SAKUDA, S.; MIYASHITA, K. Family 19 chitinase of *Streptomyces* species: characterization and distribution. **Microbiology**. v. 145, p. 3353-3363, 1999.

WATANABE, T.; KOBORI, K.; MIYASHITA, K., FUJII, T.; SAKAI, H.; UCHIDA, M.; TANAKA, H. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 5, p. 18567-18572, 1993.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**. v. 32, p. 668-673, 2004.

WONG, J. H.; NG, T. B.; RANDY, C. F. C.; WANG, H. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHA, Y. S.; FANG, F. E.; NGAI, P. H. K.; XIA, L. X.; YE, X. Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 87, p. 1221-1235, 2010.

WOO, C.J.; PARK, H.D. An extracellular *Bacillus* sp.chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 409-412, 2003.

YAN, R.; DING, D.; GUAN, W.; HOU, J.; LI, M. Control of grey mould rot of loquat with chitinase expressed in *Pichia pastoris*. **Crop Protection**. v. 27, p. 1312-1317, 2008.

YANG, C.Y.; HO, Y.C.; PANG, J.C.; HUANG, S.S.; TSCHEN, J. S.M. Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2008.07.039, 2008.

YESILIRMAK, F.; SAYERS, Z. Heterologous expression of plant genes. **International Journal of Plant Genomics**. v. 2009, p. 1-16, 2009.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERLLER, G. Select you need: a comparative evolution of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Bacteriology**. v. 127, n. 3, p. 335-347, 2007.

YONG, T.; HONG, J.; ZANG-FU, L.; LI, Z.; XIU-QIONG, D.; KE, T.; SHI-GUI, L. Cloning and expression of a chitinase gene from *Sanguibacter* sp. C4. **Acta Genetica Sinica**, v. 33, n.11, p. 1037-1046, 2006.

10. ANEXOS

10.1. Formulação dos meios de cultura

LB “low salt”-ágar: Triptona Bacteriológica 1,0%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2,0%, pH 7,7.

YPD-ágar: Extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2,0%, dextrose 2,0%, ágar 2,0%.

YPDS-ágar: Extrato de levedura 1,0%, peptona bacteriológica 2,0%, dextrose 2,0%, ágar 2,0% e sorbitol (1,0M).

BMGY: Extrato de levedura 1,0%, peptona 2,0%, tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, YNB 1,34%, Biotina 4×10^5 %, Glicerol 1,0%.

BMMY: Extrato de levedura 1,0%, peptona 2,0%, tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, YNB 1,34%, Biotina 4×10^5 %, Metanol 0,5%.

10.2. Seqüência de nucleotídeos da ORF cv3316 codificante da quitinase (CHI3316)
de *C. violaceum*

1	gtgagcaaga	ccctgatgct	tgtgaaaagc	ggcctcgag	ccggcgccat	gggcgggctc
61	gcgttggtgg	ccggcaccgc	gcagaaagtc	gcgcccgc	ccggcgccat	ggcgccctcc
121	tacctggtca	aaaccgcca	cagcagctgc	gccgaccgg	cctggaacgc	cgccgcccgc
181	tacaccggcg	gccagcgct	cagctaccag	aaccagacct	ggcaagccaa	gtggtggagc
241	cagggcaata	ccccggcgg	aggcgagcc	agcccctgg	agctgatcgg	ccaatgcggc
301	ggcggcacgc	cgtccgatcc	gcccgtggtg	caggtgccc	cgccgaccgg	caacgcgctg
361	tgccggccc	aggcgctgg	gcagaccag	ggggtggag	ttccttactg	cgcggtctac
421	aagcagggcg	gcgcgagca	gctggccaac	ggcagccgc	gcccgcacat	cggtactctc
481	accagctggc	gcaccggcaa	ggacggcagc	ccggcctacc	tggccagoga	catcccctgg
541	agcaagctca	cccacatcaa	ctacgccttc	gcccacgtgg	atggaagcaa	caagctgtcg
601	gtcaacgaga	ccgcgcccgg	caaccggcc	accgacatga	gctggcccgg	cgtggcccgg
661	gcagagatgg	acgccagcct	gccgtacaag	ggccacttca	acctgctgac	ccagtacaag
721	cgcaagtatc	ccggcgtaga	gacgctgac	tccgtcggcg	gctgggcccga	aaccggcggc
781	tacttcgacg	ccaacggcaa	acgcgtggcc	agcggcggct	tctacagcat	gaccgtcaac
841	gcccagggca	ccgtcaatca	ggccggcatc	aacgccttct	ccgactccgc	cgctgccttc
901	ctgcccgaat	acggcttcga	cgccgtcgac	atcgacttcg	aatacccgc	ctcgatgaac
961	aacgcccggca	acccgctgga	ctggaccttc	tccaacgccc	gcctgggatc	cttgaacaaa
1021	ggctacgtgg	cgctgctgca	gacgttgcc	gaccggctgg	accgcccgc	cgcccaggac
1081	ggccgctact	accagatcac	cgccgcccgt	ccggcctccg	gctatctgct	gcccggcatg
1141	gaaaccttcc	agggcctgaa	gtatctggac	ttcgtcaacg	tgatgtccta	cgacctgcac
1201	ggcgcgtgga	accgcttcgt	cgcccccaac	gcccgcctgt	acgacgacgg	caaggacggc
1261	gaactggcgt	tctggaacgt	gtacagcacg	ccgcagtagc	gcaatatcgg	ctacctgaac
1321	accgactggg	cctaccacta	ctaccggcgc	ggcctgccc	cctcgcgcgt	caacatgggc
1381	gtgccctact	acaccggcgg	ctggaaaaac	gtcagcggcg	gcagcaatgg	cctgtggggc
1441	agctcgggtg	gcagcaactg	ccggcggcgc	ctgaccgaat	gcccgcagcg	cgcggtgggc
1501	atagacaaca	tctggcacga	tctggacgac	agcggcaagg	agatcccggg	cggtccaac
1561	ccgatgtggc	acgccaagaa	cctggagaaa	ggcctggccg	gcagctacct	cgccgcctac
1621	ggcatcgacc	cgacgctgcc	gatcaaccag	ctcaccggca	gctaccagcg	caactacaac
1681	ggcgcgctgg	ccgcgcccgt	gctgtggaac	gcccggcaaga	aggtgttcc	gtccaccgag
1741	gacgagcagt	cgatcgcgca	gaaggcccgc	tggatagacg	ccaacaacgt	cgccggcgtg
1801	atgttctggg	agctggccc	cgactatgac	tggaaagccc	agcgaacaa	cgccaggggc
1861	gagtacttca	tccgaccac	gctgacctcg	ctgctgtaca	acacctcag	ccagcccgc
1921	aaggtcagcg	cccgcgcgc	cgacgcgcgc	ccggcgcga	ccgcggcgat	agcgtgggc
1981	ttcagcctgg	gcccgttcaa	gctggggcag	cagaactatc	cgatcaacc	caagctgacc
2041	atcgtcaacc	gctcgcagac	cacgctgcc	ggcggcaccg	agttccagtt	cgacgtgccc
2101	acctcggcgc	cgccaatat	cgccgaccag	tccggcttcg	ggctcaaggt	ggtcagcggc
2161	ggccacagcg	gcagcaacgt	cgccggcctg	aagggcgact	tcaaccgcgt	gtcgggtgag
2221	ctgcccagct	ggcagagcct	ggcgcgcga	caaagcgtga	cgctggacgt	ggtgtattac
2281	ctgcccagct	cgcccccag	ccactacag	gtgggcctga	acggcaaac	ctacgctatc
2341	cgcgacgaag	cgccctacct	gccttatctg	cgctga		

10.3. Sequência de aminoácidos da quitinase (CHI3316) de *C. violaceum*

```

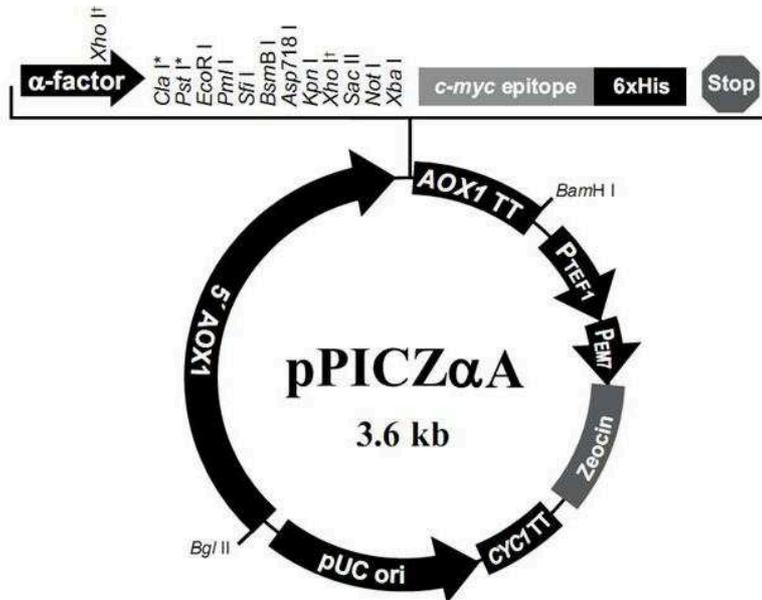
1  msktlmlvks glaagamgv  alvagtaqnv apppaalaps ylvktadssc adpawnaaav
61  ytgqgrvsyq nqtwqakwvt qgntpaagda spwqligqcg ggtpsdpplv qvppptgnal
121 crpealaqtq gvdvpycavy kqggaeqlan gsrrriigyf tswrtgkdgs paylasdipw
181 sklthinyaf ahvdgsnkls vnetapgnpa tdmswpgvag aemdaslpyk ghfnlltqyk
241 rkypgvktli svggwaetgg yfdangkrva sggfysmtvn adgtvnqagi nafsdsavaf
301 lrkygfdgvd idfeyptsmn nagnpldwtf snarlgslnk gyvallqtlr drldraaaqd
361 gryyqitaav pasgyllrgm etfqqglyld fvnvmsydlh gawnrfvgpn aalyddgkda
421 elafwnvyst pqygnigyln tdwayhyryg glpasrvnmg vpyytrgwkn vsggsnglwg
481 ssvgsncpag ltecgdgavg idniwhdldd sgkeipggsn pmwhaknek glagsylaay
541 gidptlpinq ltgsyqrnyn galaapwlwn agkkvflste deqsiaqkaa widannvggv
601 mfwelagdyd wkaqrnnggg eyfigttlts llyntfsqpp kvsarradaa paptaaidvg
661 fslggfklgd qnyypinpklt ivnrsqttlp ggtefqfdvp tsapaniadq sgfglkvvsaa
721 ghsgsnvggl kgdfnrsvsk lpswqslgag qsvtldvvyv lpisgpshyt vglngktyai
781 rdeapylpyl r

```

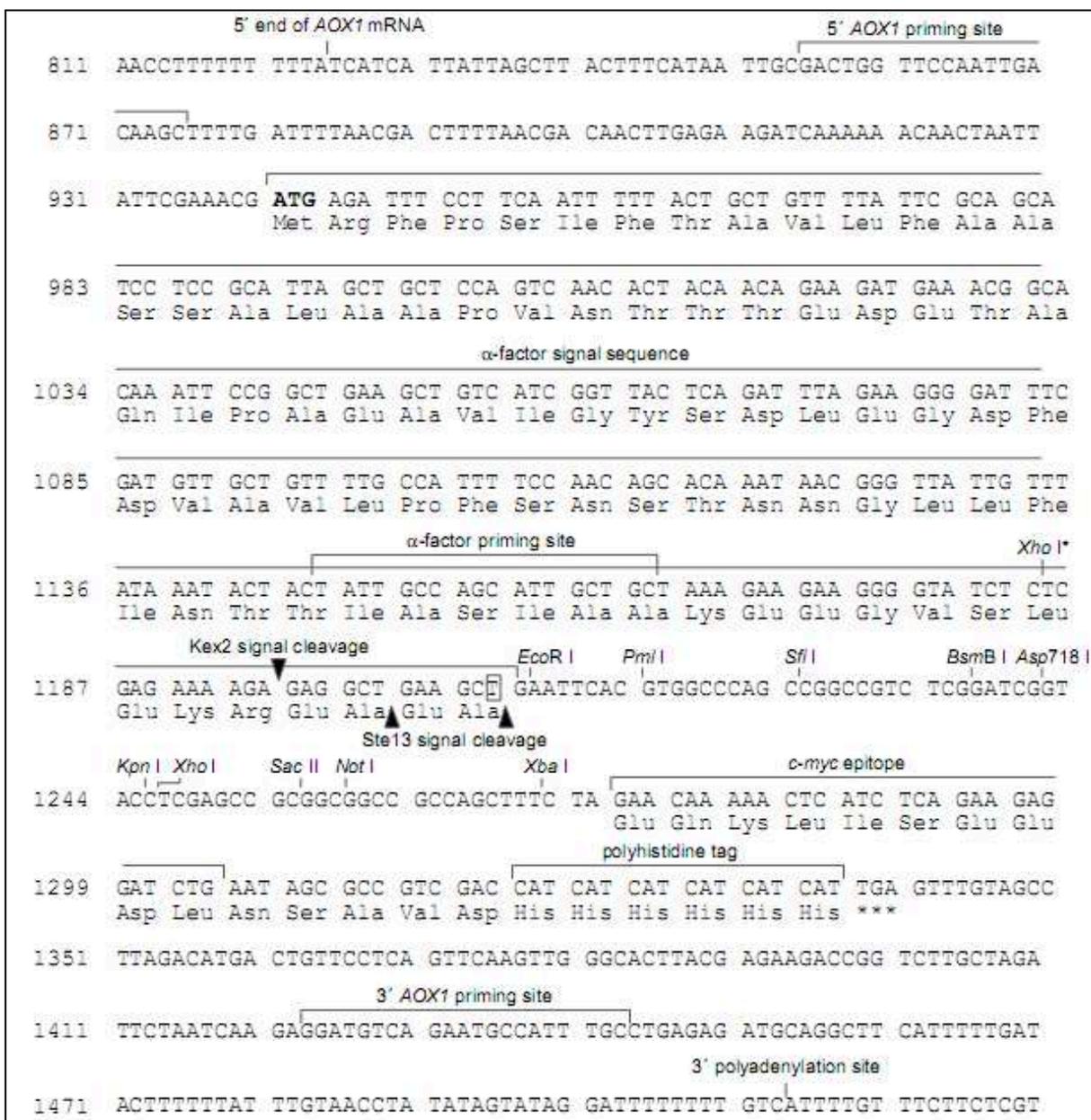
10.4. Organização estrutural da quitinase (CHI3316) de *C. violaceum* fornecida pelo site (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Em destaque, peptídeo sinal (vermelho), domínio de ligação à quitina (verde), domínio catalítico (azul) e C-terminal (~ 170 aa) encontrado nos membros da família 18 das glicosil hidrolases (preto)



10.5. Mapa de restrição do vetor de clonagem e expressão (pPICZ α A) com detalhamento do sítio múltiplo de clonagem



10.6. Diagrama do vetor de clonagem e expressão (pPICZαA) com indicação das posições dos sítios de restrição



10.7. Cristais da quitinase recombinante (rCHI3316) de *C. violaceum*

