



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

MARINA DUARTE PINTO LOBO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA E ESTRUTURAL DE
UMA QUITINASE RECOMBINANTE DE *CHROMOBACTERIUM*
*VIOLACEUM***

FORTALEZA
2012

MARINA DUARTE PINTO LOBO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA E ESTRUTURAL DE
UMA QUITINASE RECOMBINANTE DE *CHROMOBACTERIUM*
*VIOLACEUM***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

**FORTALEZA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L784c Lobo, Marina Duarte Pinto.

Caracterização bioquímica, biológica e estrutural de uma quitinase recombinante de *chromobacterium violaceum* / Marina Duarte Pinto Lobo. – 2012.
154 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

1. Quitinase. 2. *Chromobacterium*. I. Título.

CDD 572

MARINA DUARTE PINTO LOBO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA E ESTRUTURAL DE
UMA QUITINASE RECOMBINANTE DE *CHROMOBACTERIUM*
*VIOLACEUM***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Humberto D’Muniz Pereira
Universidade de São Paulo – São Carlos (USP)

*A Deus e
a minha amada família.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*. Por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Sem Ele, eu não sou nada.

Ao meu grande orientador, e por quem eu tenho muita admiração, Prof. Dr. *Thalles Barbosa Grangeiro*. Pela orientação, idéias, incentivo, investimento, paciência, confiança, disposição, entusiasmo e esforços desmedidos para fazer tudo dar certo. Por ter acreditado em mim e no meu trabalho durante esses 5 anos de convivência. Serei sempre grata.

Ao Prof. Dr. *José Tadeu Abreu de Oliveira*. Pela participação em minha banca, sugestões e questionamentos sempre relevantes. Por ter estado sempre disponível quando fui tirar dúvidas e por ser um grande incentivador da ciência para mim.

Ao Dr. *Humberto D’Muniz Pereira*. Pela participação relevante em minha banca, bem como pela atenção, disposição, dedicação e esforços dispensados nos experimentos de cristalização e resolução da estrutura no Laboratório de Cristalografia, do Instituto de Física de São Carlos.

À Profa. Dra. *Ilka Maria Vasconcelos* e sua orientanda *Helen*. Pelo auxílio nos ensaios de atividade antifúngica, bem como pela realização do seqüenciamento N-terminal da proteína em estudo. Pela parceria que vem rendendo bons frutos.

À Profa *Leila Beltramini* e ao Dr. *José Luiz* e demais integrantes do laboratório de Biofísica Sérgio Mascarenhas, do Instituto de Física de São Carlos. Por ter disponibilizado os equipamentos necessários para realização dos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência, bem como pela atenção e orientação.

À Profa. Dra. *Nádia Aciolly* e sua orientada *Andrea Bessa*. Pela atenção dispensada e o auxílio nos experimentos de atividade antimicrobiana.

À Profa. *Ana Cristina Moreira* e Dr. *Frederico Moreno*. Pela contribuição nos experimentos de espectrometria de massa e purificação da proteína recombinante. Pela atenção e disponibilidade.

À Profa. Ms. *Maria Aparecida Oliveira Alves*. Por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, dando início a minha caminhada na ciência. E pelos almoços, sempre divertidos.

Ao colega *Fredy*. Por ajudar sempre que precisei e pelos momentos de discussão científica que nos fazem crescer sempre mais.

Aos integrantes do Lab. de Genética Molecular *Lucas, Bruno, Marcel, Juliana,*

Priscila, Edvar, Cícero, Emmanuel e Raquel. Pela colaboração quando foi necessária.

As minhas queridas alunas de iniciação científica *Renata e Paloma*, que se mostraram incansáveis ao longo de todo o desenvolvimento dessa dissertação. Pelas conversas, brincadeiras e companheirismo.

Ao amigo *Pedro*. Pelas palavras de apoio, por compartilharmos juntos momentos difíceis nesse percurso, pela fiel amizade.

Ao amigo *Vladimir*. Pela companhia sempre divertida, pelos chocolates quando tudo parecia “desandar”, pelos conselhos e conversas. Por ser uma pessoa incrível, de quem eu sou fã.

Às amigas, e companheiras de laboratório, *Patrícia, Sandra, Wal*, e em especial, *Denise e Suelen*. Pelas inúmeras conversas divertidas no almoço, pelas palavras confortantes e animadoras, pelo carinho e pelos sorrisos que me proporcionaram diariamente no laboratório ao longo desses anos.

Às amigas de infância *Bia, Carol, Kamila e Larissa*. Pelos 17 anos inabaláveis anos de amizade, repletos de alegrias, confiança e companheirismo.

Aos amigos e amigas inesquecíveis da graduação *Felipe, Marcelo, Nicholas, Débora, Ticiane e Juliana*. Pela alegria proporcionada a cada reencontro, que nos faz perceber que o tempo passa e o que é bom fica sempre do mesmo jeito.

Aos meus amados pais, *Walter e Margaret*. Por todo esforço em me proporcionarem uma educação de qualidade e uma vida digna e honesta. Pelo amor sem medidas dedicado a mim e as minhas irmãs todos esses anos. Por juntos formarmos essa família tão feliz e unida, que é o meu porto-seguro.

As minhas irmãs *Raquel e Nathália*, meu meio-irmão *Rilke* e meu cunhado *Walder*. Pela presença constante em minha vida, proporcionando tantos momentos felizes.

Aos amores da minha vida *Danielle e Matheus*. Por encherem nossa casa de alegria, e bagunça, conseguindo me fazer sorrir mesmo nos momentos de ansiedade e cansaço. Por preencherem os nossos corações de um amor imensurável.

Ao *meu amor*. Por todo carinho, apoio, incentivo, atenção, brincadeiras e compreensão. Obrigada por me fazer perceber que o amor realmente vale a pena.

E a todas as outras pessoas, que pequei em esquecer, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“Sucesso = 5% de inspiração + 95% de transpiração.”

Albert Einstein (com modificações)

RESUMO

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa, saprófita, não patogênica e de vida livre. O seqüenciamento completo do genoma dessa espécie revelou muitos genes codificando produtos com potenciais aplicações em diversas áreas. Dentre esses produtos, estão várias quitinases. Quitinases, enzimas capazes de degradar a quitina, um biopolímero de *N*-acetil- β -D-glucosamina bastante insolúvel, são de grande interesse biotecnológico, podendo ser utilizadas para converter quitina em derivados úteis, e também para o controle de fungos e insetos que causam danos em culturas agrícolas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar bioquímica, biológica e estruturalmente uma quitinase recombinante (CV2935), da família 18 das glicosídeo hidrolases, de *C. violaceum* ATCC 12472. A ORF codificando a proteína CV2935 foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonada nos vetores pET303/CT-His e pPICZ α A, para expressão em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente. Em ambos os sistemas, a enzima foi secretada para o meio de cultura, na sua forma solúvel e funcional, sendo purificada a homogeneidade por cromatografia de afinidade em matriz de quitina, seguida de cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superdex75. Os rendimentos da quitinase pura, expressa em *E. coli* e *P. pastoris*, foram 2,6 e 44 mg por litro de cultura, respectivamente. A quitinase produzida em ambos os microorganismos mostrou atividade ótima em pH 3,0 e foi ativa quando tratada a temperaturas de até 60 °C. A enzima produzida em *P. pastoris* (45 kDa) foi *N*-glicosilada, como revelado por coramento com reagente de Schiff e digestão com *N*-glicosidase F, mostrando-se ligeiramente mais termoestável do que a enzima não glicosilada, produzida em *E. coli* (43 kDa). A rCV2935 apresentou atividade hidrolítica (endoquitinásica) frente a quitina coloidal, matriz de carapaça de caranguejo obtida comercialmente, glicol-quitina (em gel SDS-PAGE), substratos sintéticos solúveis contendo *p*-nitrofenol, além de apresentar pequena atividade quitosanásica. Os espectros de fluorescência revelaram que as proteínas foram produzidas na sua conformação enovelada. A enzima teve sua estrutura cristalográfica resolvida a uma resolução de 2.1Å e seu domínio catalítico apresentou um dobramento do tipo barril (β/α)₈ (barril TIM) e resíduos essenciais para catálise conservados, características essas, comuns às proteínas da mesma família. A quitinase recombinante retardou o crescimento do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, e, em bioensaios com o caruncho *Callosobruchus maculatus*, a rCV2935 possivelmente interferiu com a alimentação do inseto, o que acarretou na diminuição do peso dos mesmos. Os estudos bioquímicos, biológicos e estruturais da rCV2935 poderão ser úteis para aplicação biotecnológica dessa enzima.

ABSTRACT

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative, saprophytic, non-pathogenic and free living bacterium. The complete sequencing of its genome has revealed many genes encoding products of biotechnological interest. Among these products are several chitinases. Chitinases, enzymes capable of degrading chitin, an insoluble polymer of $\beta(1,4)$ -linked *N*-acetyl- β -D-glucosamine (GlcNAc), are of great biotechnological interest, because they can be used to convert chitin in useful derivatives as well as being exploited for the control of fungi and insects that cause damages in crops. This study aimed to carry out the biochemical, biological and structural characterization of a recombinant chitinase, belonging to family GH18, from *C. violaceum* ATCC 12472. The ORF CV2935 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the vectors pET303/CT-His and pPICZ α A, for expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, respectively. In both systems, the enzyme was secreted into the culture medium, in its soluble and functional form, and purified to homogeneity by affinity chromatography on a chitin matrix followed by size-exclusion chromatography on Superdex75 matrix. The yields of pure chitinase expressed in *E. coli* and *P. pastoris* were 2.6 and 44 mg per liter of culture, respectively. The recombinant chitinase produced in both microorganisms showed optimal activity at pH 3.0 and it was active after treated at temperatures up to 60 °C. The enzyme produced in *P. pastoris* (45 kDa) was *N*-glycosylated as revealed by Schiff's reagent and digestion with *N*-glycosidase F. Moreover, the glycosylated chitinase was found to be slightly more thermostable than the enzyme produced in *E. coli* (43 kDa). The rCV2935 showed hydrolytic activity against colloidal chitin, crab shell, and synthetic substrates containing *p*-nitrophenol. It was also able to hydrolyse glycol-chitin in SDS-PAGE and showed low chitosanase activity. The fluorescence spectra revealed that the proteins were produced in their folded conformation. The crystal structure of the recombinant chitinase produced in *P. pastoris* was determined by X-ray crystallography at a resolution of 2.1 Å. Its catalytic domain adopts an $(\beta/\alpha)_8$ triose-phosphate isomerase (TIM) barrel fold, and the residues essential for catalysis are conserved. The recombinant chitinase reduced the growth of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, and bioassays with cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* showed that the rCV2935 possibly interfered with the insect feeding, which resulted in decreased weight of adults. The biochemical, biological and structural studies of rCV2935 may be useful for biotechnological application of this enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da violaceína.	21
Figura 2	Estrutura da <i>N,N</i> -diacetilquitobiose [<i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminil-(1 \rightarrow 4)- <i>N</i> -acetil- β -D-glucosamina].	24
Figura 3	Mecanismo de hidrólise das quitinases.	27
Figura 4	Estrutura modular da quitinase CV2935 de <i>Chromobacterium violaceum</i> .	61
Figura 5	Alinhamento múltiplo da CV2935 com sequências de aminoácidos de diferentes quitinases e outras proteínas relacionadas disponíveis em bancos de dados	63
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos da amplificação por PCR da ORF CV2935 a partir do DNA genômico de <i>C. violaceum</i> .	65
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos extraídos pET303/CT-His :: CV2935 de células de <i>E. coli</i> TOP10F'.	66
Figura 8	Experimentos para confirmação da clonagem em pET303/CT-His.	66
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pPICZ α A :: CV2935 extraídos de células de <i>E. coli</i> TOP10F'.	68
Figura 10	Experimentos de confirmação da transformação da clonagem em pPICZ α A.	68
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA genômico de <i>Pichia pastoris</i> KM71H após transformação com pPICZ α A :: CV2935.	69
Figura 12	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizada com os iniciadores 5'- <i>AOX1e</i> CV2935/ <i>Pichia-rev</i> utilizando como molde DNA genômico de <i>Pichia pastoris</i> KM71H :: PICZ α A::CV2935.	70
Figura 13	Eficiência de secreção da rCV2935.	71
Figura 14	Perfil de expressão e detecção da quitinase recombinante de <i>Chromobacterium violaceum</i> produzida em <i>Pichia pastoris</i> .	76
Figura 15	Atividade quitinásica e dosagem de proteínas totais solúveis presentes na fração F0/95 do meio livre de células durante a indução da expressão da quitinase recombinante rCV2935 em <i>P. pastoris</i> KM71H.	77
Figura 16	Detecção das quitinases recombinantes de <i>Chromobacterium violaceum</i> produzida em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> com kit <i>InVision His-tag</i>	78

in-gel Stain.

Figura 17	Purificação da quitinase recombinante de <i>C. violaceum</i> produzida em <i>E. coli</i> .	79
Figura 18	Purificação da quitinase recombinante de <i>C. violaceum</i> produzida em ambos os sistemas heterólogos em cromatografia de exclusão molecular	80
Figura 19	Estruturas químicas dos substratos sintéticos utilizados nos ensaios enzimáticos.	83
Figura 20	Atividade quitinásica da rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, frente a diversos substratos.	85
Figura 21	Detecção de atividade quitinolítica em gel (zimograma) das quitinases recombinantes, produzida em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> , em diferentes concentrações.	87
Figura 22	Alinhamento da sequência N-terminal obtida, por meio da técnica de degradação de Edman, com a sequência de aminoácidos deduzida da quitinase CV2935 de <i>Chromobacterium violaceum</i> .	88
Figura 23	Atividade relativa das quitinases recombinantes de <i>C. violaceum</i> , produzidas em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> , após incubação em diferentes temperaturas (30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C) durante 30 minutos em banho-maria.	89
Figura 24	Efeito do pH na atividade enzimática relativa das quitinases recombinantes de <i>C. violaceum</i> , produzidas em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> .	91
Figura 25	Efeito da presença de íons metálicos e agentes químicos na atividade da quitinase recombinante de <i>C. violaceum</i> CV2935, produzida em <i>E. coli</i> .	92
Figura 26	Saída gráfica da análise da sequência de aminoácidos deduzida de CV2935, utilizando a ferramenta <i>NetNGlyc</i> .	94
Figura 27	Eletroforese em gel de acrilamida 15%, em condições desnaturantes e na presença de β-mercaptoetanol, dos picos obtidos na cromatografia em coluna ConA Sepharose 4B.	95
Figura 28	Detecção de N-glicosilação nas amostras das quitinases recombinantes, produzidas por <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> .	96
Figura 29	As três classes de N-glicanos que são sintetizados pela adição co-traducional de Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ à cadeia polipeptídica, pela oligossacaril transferase, em <i>P. pastoris</i> .	97
Figura 30	Efeito da temperatura na estrutura secundária de rCV2935, produzida	98

nos diferentes sistemas heterólogos, medido por dicroísmo circular.

Figura 31	Curvas de desnaturação térmica das rCV2935, produzidas nos diferentes sistemas heterólogos, obtidas com os dados de dicroísmo circular.	99
Figura 32	Espectro de dicroísmo circular para avaliação da reversibilidade da desnaturação térmica.	100
Figura 33	Efeito do pH na estrutura secundária de rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, medido por dicroísmo circular.	101
Figura 34	Efeito do SDS na estrutura secundária de rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, medido por dicroísmo circular.	102
Figura 35	Espectros de fluorescência nativos das rCV2935. Os espectros foram obtidos em fluorímetro ISSK2, utilizando-se cubeta de 0,5 mL, com caminho ótico de 1 cm.	104
Figura 36	Espectros de fluorescência das rCV2935 em diferentes pHs. Os espectros foram obtidos em fluorímetro ISSK2, utilizando-se cubeta de 0,5 mL, com caminho ótico de 1 cm.	105
Figura 37	Resíduos identificados por espectrometria de massa das amostras de rCV2935, produzida em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> , digeridas com tripsina.	106
Figura 38	Cristais da rCV2935, produzida em <i>P. pastoris</i> , crescidos na condição de 0,1 M de Tris-HCl pH 8,5 e 0,7 M de citrato de sódio dihidratado.	107
Figura 39	Padrão de difração de raios X dos cristais obtidos de rCV2935, produzida em <i>P. pastoris</i> .	107
Figura 40	Estrutura tridimensional da rCV2935.	110
Figura 41	Estrutura tridimensional dos domínios presentes na molécula da quitinase rCV2935.	111
Figura 42	Ilustração evidenciando a sequência consenso (DXXDXDXE), comum às quitinases da família GH18.	111
Figura 43	Sobreposição da rCV2935 com a estrutura da quitinase de <i>Bacillus cereus</i> Nctu2.	113
Figura 44	Perfil de hidrofobicidade da rCV2935, evidenciando a glicosilação.	114
Figura 45	Potencial eletrostático na superfície da rCV2935	115
Figura 46	Ilustração da tendência de interação entre dois monômeros de rCV2935, produzida por <i>P. pastoris</i> .	117

- Figura 47** Efeito da rCV2935, produzida em *E. coli*, sobre o crescimento de bactérias. 119
- Figura 48** Efeito da rCV2935, produzida em *E. coli*, sobre o crescimento de *Candida albicans*. 120
- Figura 49** Esquema que ilustra a composição da parede celular de *C. albicans*. 121
- Figura 50** Efeito de rCV2935, produzida em *E. coli*, sobre o crescimento fúngico. 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da quitinase CV2935 de <i>C. violaceum</i> , com peptídeo sinal, para clonagem em <i>E. coli</i> e, sem peptídeo sinal, para clonagem em <i>P. pastoris</i>	40
Tabela 2 -	Purificação da quitinase recombinante CV2935 de <i>C. violaceum</i> , expressa em <i>E. coli</i>	81
Tabela 3 -	Purificação da quitinase recombinante CV2935 de <i>C. violaceum</i> , expressa em <i>P. pastoris</i>	81
Tabela 4 -	Análise da especificidade de substrato da quitinase recombinante rCV2935, de <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 expressa em <i>Escherichia coli</i> .	83
Tabela 5 -	Estatísticas da Coleta de dados e Refinamento	109
Tabela 6 -	Avaliação da atividade da fração secretada por células de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3), contendo o plasmídeo pET-Cv2935, sobre o caruncho <i>C. maculatus</i> .	126

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Caldo de infusão cerebral (<i>brain heart infusion</i>)
CD	Dicroísmo circular
DMAB	para-dimetilbenzaldeído
dNTP	desoxiribonucleotídeo
DO₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EtBr	Brometo de Etídio
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosídeo
kDA	Quilodalton
LB	Caldo Luria Bertani
N- terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pET303	Vetor para expressão em <i>Escherichia coli</i>
pET-CV2935	Vetor recombinante pET303/CT-His com a região codificadora da CV2935
pPIC-CV2935	Vetor recombinante pPICZ α A com a região codificadora da CV2935
rCV2935	CV2935 recombinante
rCV2935-E	CV2935 recombinante, produzida em <i>Escherichia coli</i>
rCV2935-P	CV2935 recombinante, produzida em <i>Pichia pastoris</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletenodiamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	20
2.2 Quitina.....	23
2.3 Glicosídeo hidrolases e quitinases.....	24
2.4 Quitinases bacterianas.....	29
2.5 Expressão Heteróloga de proteínas	31
2.5.1 Expressão Heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	31
2.5.2 Expressão Heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	32
2.6 Expressão de quitinases bacterianas em sistemas heterólogos.....	33
3. HIPÓTESES	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo geral.....	37
4.2 Objetivos específicos	37
5. MATERIAIS	38
5.1 Cepas (Bactérias e Leveduras).....	38
5.2 Enzimas.....	38
5.3 Plasmídios.....	38
5.4 Reagentes e outros materiais.....	38
6. MÉTODOS	39
6.1 Análise <i>in silico</i> da seqüência deduzida da CV2935.....	39
6.2 Amplificação da ORF CV2935.....	39
6.3 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pET303/CT-His.....	41
6.4 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pPICZ α A.....	41
6.5 Extração de DNA plasmidial.....	42
6.6 Eletroforese em gel de agarose.....	43
6.7 Transformação de células de <i>Pichia pastoris</i> KM71H com o vetor recombinante pPICZ α A::CV2935.....	43
6.8 Extração de DNA genômico de <i>P. pastoris</i>	44
6.9 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em <i>Escherichia coli</i>	45
6.10 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em <i>Pichia pastoris</i>	45
6.11 Purificação da quitinase recombinante.....	46

6.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol (PAGE-SDS).....	47
6.13 Determinação da concentração de proteínas.....	48
6.14 Caracterização bioquímica e estrutural da quitinase recombinante.....	49
6.14.1 Atividade Quitinásica.....	49
6.14.2 Ensaio enzimático com substratos sintéticos.....	49
6.14.3 Ensaio quitinásico com diferentes substratos.....	50
6.14.4 Ensaio de atividade quitinásica em gel.....	51
6.14.5 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal.....	51
6.14.6 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da rCV2935.....	52
6.14.7 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV2935.....	52
6.14.8 Efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática da rCV2935.....	52
6.14.9 Verificação de N-glicosilação na quitinase recombinante produzida por <i>Pichia pastoris</i> KM71H.....	53
6.14.9.1 Cromatografia em matriz de ConA Sepharose.....	53
6.14.9.2 Reação de deglicosilação.....	53
6.14.9.3 Revelação de glicoproteínas pelo método de Schiff.....	54
6.14.10 Espectro de Dicroísmo Circular (CD).....	54
6.14.11 Espectro de Fluorescência.....	55
6.14.12 Espectrometria de massa.....	56
6.14.13 Cristalização e Resolução da estrutura.....	56
6.15 Atividades Biológicas.....	57
6.15.1 Atividade antibacteriana.....	57
6.15.2 Atividade antifúngica (levedura).....	58
6.15.3 Atividade antifúngica (fungos filamentosos).....	58
6.15.3.1 Cultivo dos fungos.....	58
6.15.3.2 Obtenção da suspensão de conídios.....	59
6.15.3.3 Ensaio de inibição da germinação de conídios em meio líquido..	59
6.15.4 Atividade inseticida.....	59
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
7.1 Análise <i>in silico</i> da seqüência deduzida da CV2935.....	61

7.2 Amplificação da ORF CV2935.....	64
7.3 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pET303/CT-His.....	65
7.4 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pPICZ α A.....	67
7.5 Confirmação da transformação de células de <i>Pichia pastoris</i> KM71H, com o vetor recombinante pPICZ α A-CV2935.....	69
7.6 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em <i>Escherichia coli</i>	70
7.7 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em <i>Pichia pastoris</i>	75
7.8 Purificação da quitinase recombinante.....	77
7.9 Caracterização bioquímica e estrutural da quitinase recombinante.....	82
7.9.1 Ensaio enzimático na presença e ausência de β -glucuronidase.....	82
7.9.2 Ensaio enzimático com substratos sintéticos.....	82
7.9.3 Ensaio quitinásico com diferentes substratos.....	84
7.9.4 Ensaio de atividade quitinásica em gel.....	86
7.9.5 Determinação da seqüência de aminoácidos N-terminal.....	87
7.9.6 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da rCV2935.....	87
7.9.7 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV2935.....	90
7.9.8 Efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática da rCV2935.....	92
7.9.9 Verificação de N-glicosilação na quitinase recombinante produzida por <i>Pichia pastoris</i> KM71H.....	93
7.9.10 Espectro de Dicroísmo Circular (CD).....	97
7.9.11 Espectro de Fluorescência.....	103
7.9.12 Espectrometria de massa.....	106
7.9.13 Cristalização e Resolução da estrutura da rCV2935.....	107
7.9.14. Análise da estrutura tridimensional da CV2935.....	110
7.10 Atividades Biológicas.....	118
7.10.1 Atividade antibacteriana.....	118
7.10.2 Atividade antifúngica (levedura).....	120
7.10.3 Atividade antifúngica (fungos filamentosos).....	121
7.10.4 Atividade inseticida.....	125
8. RESUMO DOS RESULTADOS.....	129
9. CONCLUSÕES.....	132
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
11. ANEXOS.....	151

1. INTRODUÇÃO

Muitos microorganismos possuem a habilidade de tolerar e prosperar em ambientes desfavoráveis, vivendo constantemente sob diversas condições de estresse. Essa competência reside em uma versatilidade nutricional e metabólica que constitui uma intrincada rede de mecanismos de adaptação. Em outras palavras, o “código” necessário para lidar eficientemente com as adversidades, sejam elas bióticas ou abióticas, está inserido no seu genoma. Assim, genomas de microorganismos constituem uma fonte de novas biomoléculas, que podem ter diferentes aplicações biotecnológicas, em áreas como biocontrole, biocatálise, biossensores, biorremediação e biomedicina.

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa de vida livre que habita água e solos em áreas tropicais e subtropicais de diversos continentes (DURÁN, 2010). Com o seqüenciamento completo do genoma da estirpe ATCC 12472 de *C. violaceum*, vários mecanismos que podem estar relacionados com a sua grande capacidade de adaptação foram revelados na íntegra. Muitas ORFs (fase de leitura aberta) codificando produtos de interesse biotecnológico com potenciais aplicações em agricultura e medicina foram encontradas, e, dentre esses produtos, estão várias quitinases (VASCONCELOS et al., 2003).

Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar quitina, que é um biopolímero insolúvel de *N*-acetil- β -D-glucosamina, importante constituinte da parede celular de fungos, carapaça de crustáceos, ovos de nematóides e exoesqueleto de insetos. Essas enzimas, classificadas nas famílias 18 e 19 das glicosil-hidrolases, estão presentes em uma ampla gama de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas superiores e mamíferos, desempenhando diferentes funções (DAHIYA et al 2006; YANG et al., 2008).

Quitinases são de grande interesse biotecnológico, pois podem ser utilizadas para converter biomassa contendo quitina em derivados (despolimerizados) úteis, serem exploradas para o controle de fungos e insetos-praga de plantas, além de serem empregadas em cuidados com a saúde humana, como por exemplo, no uso de preparações oftálmicas com quitinases e microbicidas (BRURBERG et al.; PATIL et al., 2000).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular tais como clonagem e expressão de genes, em diferentes sistemas heterólogos, permitem a produção de proteínas recombinantes em larga escala. Essa abordagem facilita as análises bioquímicas, estruturais e dos mecanismos de ação das proteínas, contribuindo para identificar e demonstrar o potencial biotecnológico de novas moléculas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Chromobacterium violaceum*

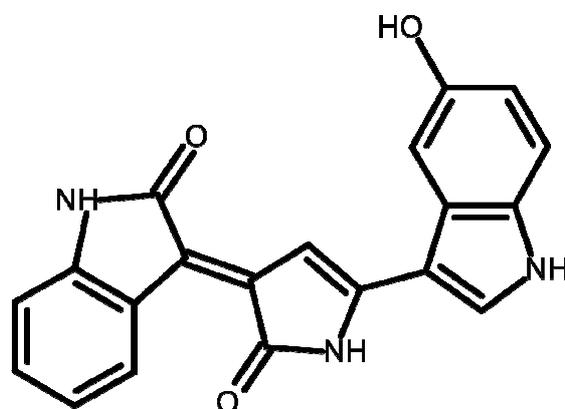
Chromobacterium violaceum é uma β -proteobactéria Gram-negativa de vida livre, saprófita, não patogênica e aeróbica facultativa, da família Neisseriaceae. Essa é uma das milhões de espécies de microorganismos de vida livre que habita o solo e a água em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo encontrada, por exemplo, na água e nas bordas do Rio Negro, na Amazônia. A espécie *C. violaceum* foi descrita pela primeira vez no fim do século 19 por Bergonzini e Boisbaudran, de forma independente (BERGONZINI, 1881; BOISBAUDRAN, 1882; DURÁN MENCK, 2001; DURÁN, 2010). No final de março de 1880, o cientista Curzio Bergonzini (na Universidade de Modena, Itália) estava preparando soluções de ovalbumina, para estudar os mecanismos que causam o retardamento da putrefação. Após os experimentos, ele esqueceu de eliminar os controles, e no final de abril, o mesmo observou um aspecto singular das amostras, que ele descreveu como “fantástico”. O pesquisador reduziu então o volume das soluções por evaporação, obtendo uma solução coberta por um filme muito denso e fino, de cor violeta. Bergonzini descreveu o microorganismo como “uma nova espécie de bactéria colorida”, denominando-a *Cromobacterium violaceum* (com cr). Essa ortografia foi corrigida posteriormente para *Chromobacterium violaceum* (com ch) por Zimmerman, ainda em 1881 (DURÁN & MENCK, 2001).

Muito raramente, *C. violaceum* pode atuar como um patógeno oportunista em alguns animais e no homem, causando septicemia fatal a partir de lesões na pele expostas a solo ou água contaminada, produzindo abscessos no fígado, pâncreas e pulmão (DURÁN et al., 2001). O primeiro registro de *C. violaceum* como patógeno foi feito por Woolley (1905), em búfalos nas ilhas Filipinas. Em humanos, o primeiro caso de infecção por *C. violaceum* foi documentado na Malásia, em 1927 (SNEATH, 1953). Desde então, pouco mais de 100 casos de infecções em seres humanos foram relatados em todo o mundo, com uma taxa de mortalidade de 53% (YANG; LI, 2011). No Brasil, um caso fatal de infecção por *C. violaceum* foi documentado em 2000, em um agricultor de 30 anos do interior do Estado de São Paulo (MARTINEZ et al., 2000). Em maio de 2004, três irmãos foram infectados por *C. violaceum* após exposição às águas de uma lagoa no município de Ilhéus, Estado da Bahia, dois deles vindo a óbito em virtude de septicemia (SIQUEIRA et al., 2005).

A *C. violaceum* produz, majoritariamente, dentre outros compostos secundários,

um pigmento púrpura, 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (Figura 1), conhecido como violaceína, isolado pela primeira vez em 1944 (STRONG, 1944). A violaceína é um derivado do indol, sendo sintetizada a partir de L-triptofano em uma via composta por cinco enzimas (vioA, vioB, vioC, vioD e vioE) codificadas pelo operon *vioABCDE* (HOSHINO 2011). Esse composto dá às colônias de *C. violaceum* uma cor violeta característica, apesar de existirem estirpes não pigmentadas, que não produzem violaceína. Além disso, outras espécies de β -proteobactérias também produzem esse pigmento, tais como *Janthionobacterium lividum* (PANTANELLA et al., 2007), *Pseudomonas* sp. 520P1 e 710P1 (YADA et al., 2008), *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (YANG et al., 2007), *Dunganelia* sp. (JIANG et al., 2010; ARANDA et al., 2011), *Collimonas* sp. (HAKVÅG et al., 2009), dentre outras. A violaceína exibe diferentes atividades biológicas interessantes: atividade bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus* sp, *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa* (SOUZA et al., 1999; LICHSTEIN & VAN DE SAND, 1945; DURÁN & CAMPOS, 1983; DURÁN, 1990) e atividade contra os protozoários *Trypanosoma cruzi* (DURÁN et al., 1994), *Leishmania* sp. (LEON et al., 2001) e *Plasmodium* sp. (LOPES et al., 2009). Além disso, existem relatos mostrando que a violaceína possui atividade antiviral (DURÁN & MENCK, 2001) e antitumoral (UEDA et al., 1994; MELO et al., 2000). A violaceína e outros metabólitos secundários produzidos por *C. violaceum* provavelmente atuam como substâncias de defesa contra competidores e/ou predadores (STEPHENS, 2003).

Figura 1 – Estrutura química da violaceína



A violaceína {3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona}, é um pigmento púrpura produzido pela *Chromobacterium violaceum*. A estrutura foi desenhada com o programa Accelrys Draw versão 4.0 (disponível no endereço eletrônico www.accelrys.com).

Como a *C. violaceum* ocorre em ecossistemas tropicais pobres em nutrientes, é um organismo que está, frequentemente, submetido a estresses ambientais, tais como alta temperatura, exposição aos raios UV e acidez. Vários mecanismos que podem estar relacionados com a notável capacidade de adaptação desta bactéria foram revelados com o seqüenciamento completo do genoma da estirpe ATCC 12472 (VASCONCELOS et al., 2003). Desta forma, a análise genômica de *C. violaceum* revelou caminhos alternativos para a geração de energia; um número significativo de proteínas relacionadas ao transporte, mobilidade celular e secreção; proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro; proteínas osmoticamente induzidas; e proteínas relacionadas à tolerância a temperatura, acidez e estresse a luz UV bem como a utilização de *quorum sensing* para o controle de sistemas induzidos. Esse perfil metabólico e fisiológico sustenta, portanto, a versatilidade, competitividade e tolerância desse microorganismo às variadas condições de estresse (GRANGEIRO et al., 2004; HUNGRIA et al., 2004 ; BARRETO et al., 2008).

C. violaceum é resistente a uma ampla gama de antibióticos (ampicilina, penicilina, rifampicina, eritromicina e vancomicina) e mostrou-se também resistente ao brometo de etídio em concentrações superiores a 50 µg/ml. A presença de genes de resistência no genoma de *C. violaceum* pode explicar a capacidade de sobrevivência dessa bactéria na presença de antibióticos e pode representar um desafio ao tratamento de eventuais infecções (GOMES DE OLIVEIRA et al., 2009).

Além do operon responsável pela síntese do pigmento violaceína, muitas outras ORFs codificando produtos de interesse biotecnológico, com potenciais aplicações em medicina e agricultura, foram identificadas no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472. Dentre esses produtos, estão várias quitinases que são potenciais agentes de biocontrole contra insetos, fungos e nematóides. Nesse contexto, identificou-se também um gene cujo produto possui similaridade com uma proteína nematocida de *Xenorhabdus bovienii* e com proteínas inseticidas de *Photorhabdus luminescens*, dois microrganismos que têm propriedades inseticidas já comprovadas experimentalmente (BOWEN, 1995; BOWEN et al., 1998). A identificação de ORFs de *C. violaceum* que apresentam similaridade com proteínas inseticidas de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus luminescens* pode ser um indicativo do potencial dessa bactéria no controle de insetos (VASCONCELOS et al., 2003).

ORFs codificando para quitinases extracelulares têm sido reportadas sobre controle *quorum-sensing*. Essas ORFs provavelmente são responsáveis pela capacidade da *C. violaceum* de degradar tanto quitina coloidal como quitina cristalina, em culturas mantidas em laboratório, como única fonte de carbono e nitrogênio (STREICHBIER, 1983).

2.2 Quitina

Em 1799, A. Hachett, um cientista inglês, descobriu um “material resistente aos agentes químicos habituais”. Em seguida, em 1811, Henri Braconnot, um professor francês de História Natural, nomeou esse material de fungina. Alguns anos depois, um pesquisador chamado Lassaigue demonstrou a presença de nitrogênio nessa substância e, finalmente, em 1823, Odier encontrou o mesmo material em insetos, nomeando-o de quitina (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

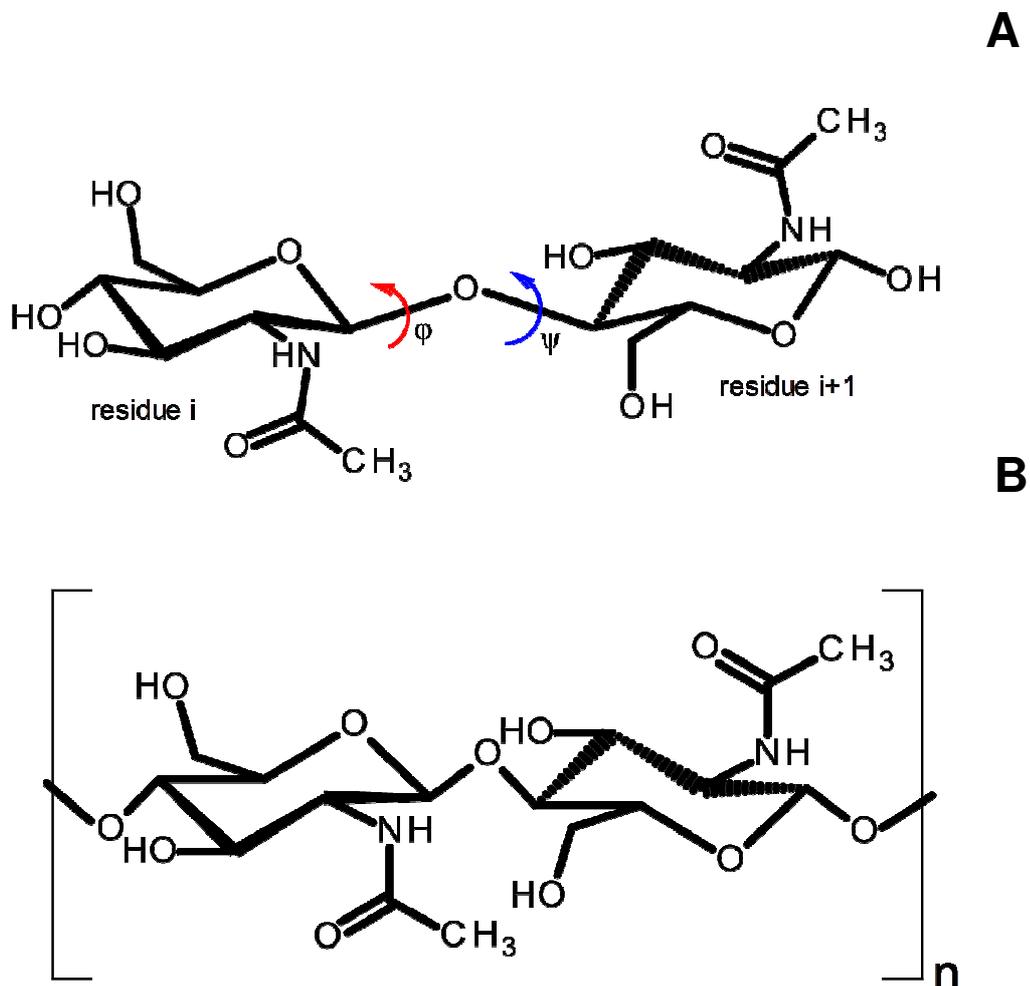
A quitina é um biopolímero insolúvel, linear e não ramificado de *N*-acetil- β -D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranoose; GlcNAc), com os resíduos de GlcNAc unidos por ligações *O*-glicosídicas β -(1,4) [nomenclatura IUPAC: (1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucano]. Na cadeia de poli-GlcNAc, cada resíduo de monossacarídeo sofre uma rotação de 180° em relação ao resíduo adjacente, que é a conformação mais estável que resulta em virtude da liberdade de rotação em torno dos ângulos de diedro da ligação glicosídica, definidos como ϕ (O5_i-C1_i-O4_{i+1}-C3_{i+1}) e ψ (C1_i-O4_{i+1}-C4_{i+1}-C3_{i+1}). Desta forma, o dissacarídeo *N,N'*-diacetilquitobiose [*N*-acetil- β -D-glucosaminil-(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil- β -D-glucosamina] pode ser considerado a unidade estrutural básica da quitina (Figura 2). Esse polissacarídeo é um importante constituinte estrutural da parede celular de muitos fungos e de algumas algas, do exoesqueleto de insetos, da carapaça de crustáceos, das conchas de moluscos e dos ovos de nematóides. Quitina também ocorre na matriz peritrófica, uma camada de quitina e glicoproteínas que reveste o intestino da maioria dos invertebrados (LEHANE et al., 1997; HEGEDUS et al., 2009). Depois da celulose, a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (LEE et al., 2007; YANG et al., 2008).

As cadeias lineares de poli-GlcNAc da quitina se agrupam formando hélices, constituindo as microfibrilas, que são estabilizadas por pontes de hidrogênio entre os grupamentos amina e carbonila. Dessa forma, a quitina pode ser classificada em três diferentes formas cristalinas: α , β e γ . Na forma α , as microfibrilas estão dispostas em orientação antiparalela, enquanto que na forma β , as microfibrilas são orientadas em paralelo. Já a forma γ possui uma formação mista de microfibrilas em orientações antiparalelas e paralelas. Esses três tipos de quitina diferem principalmente no grau de hidratação, no tamanho da célula unitária e no número de cadeias de quitina por célula unitária (SIKORSKI et al., 2009; NISHIYAMA et al., 2011).

Quitina é biocompatível, biodegradável e bio-absorvível, com capacidades antibacteriana e cicatrizante de feridas, além de baixa imunogenicidade. Por esses motivos,

existem na literatura vários relatos sobre suas aplicações biomédicas e em diversos outros campos, tais como tecnologia de alimentos, ciência dos materiais, microbiologia, agricultura, tratamento de águas residuais, molécula adequada para carrear medicamentos, engenharia de tecidos e bionanotecnologia (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

Figura 2 – Estrutura da *N,N'*-diacetilquitobiose [*N*-acetil- β -D-glucosaminil-(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil- β -D-glucosamina], na qual a orientação relativa dos monossacarídeos é definida pelos valores dos ângulos diedros φ ($O5_i-C1_i-O4_{i+1}-C3_{i+1}$) e ψ ($C1_i-O4_{i+1}-C4_{i+1}-C3_{i+1}$), que definem a conformação da ligação glicosídica



(A). Esse dissacarídeo é a unidade estrutural básica da quitina (B). As estruturas foram desenhadas com o programa Accelrys Draw versão 4.0 (disponível no endereço eletrônico www.accelrys.com)

2.3 Glicosídeo hidrolases e quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.14) são glicosídeo hidrolases que clivam as ligações covalentes β -1,4 entre os resíduos de GlcNAc das cadeias que formam a quitina [nome sistemático: (1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucano glucanohidrolase]. Essas enzimas

estão presentes em uma ampla gama de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas superiores e mamíferos. A presença de diferentes quitinases em um mesmo organismo tem sido frequentemente reportada. A transferência lateral de genes, duplicação de genes e modificações pós-traducionais colaboram para isso. O funcionamento dessas várias quitinases em conjunto, em um mesmo organismo, favorece para uma maior eficiência da digestão das diferentes formas nas quais a quitina está presente no meio ambiente.

Glicosídeo hidrolases (GHs), também conhecidas como glicosil hidrolases, carboidrases ou glicosidases (EC 3.2.1.-), constituem um grupo diverso de enzimas amplamente distribuídas na natureza, e que são capazes de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais açúcares ou entre um açúcar e outro composto de natureza distinta. No último caso, a hidrólise leva à formação de um açúcar hemiacetal ou hemicetal e da aglicona livre correspondente. Henrissat (1991) agrupou inicialmente as GHs em famílias, de acordo com similaridades nas estruturas primárias dos seus domínios catalíticos. Nesse trabalho, 301 sequências de glicosidases e enzimas relacionadas foram classificadas em 35 famílias. Nas últimas duas décadas, o número de sequências protéicas de GHs, oriundas de diferentes organismos, principalmente com o advento das técnicas de sequenciamento de genomas em larga escala, aumentou cerca de 100 vezes (NAUMOFF, 2011). Uma parte considerável dessas novas sequências pertence às famílias previamente conhecidas, enquanto que o restante constitui novas famílias de GHs (HENRISSAT; BAIROCH, 1993; 1996; HENRISSAT; DEVIES, 1997; HIMMEL et al., 1997). Atualmente, existem 125 famílias de GHs (GH1-GH130), como listadas no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*; <http://www.cazy.org>; CANTAREL et al., 2009). Cinco famílias (GH21, GH40, GH41, GH60 e GH69) foram eliminadas, pois investigações mais detalhadas mostraram que as enzimas dessas famílias não possuíam atividade glicosidásica (HENRISSAT, 1998).

Todas as quitinases cujas estruturas primárias são conhecidas até o momento são classificadas em duas dessas 125 famílias válidas de GHs, GH18 e GH19. A família GH18 contém quitinases de arqueias, bactérias, fungos, vírus, animais e plantas (classes III e V). Essa família também inclui endo- β -*N*-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.96) e outras proteínas (por exemplo: inibidores de xilanase, concanavalina B e narbonina), essas últimas sendo quitinases inativas (não catalíticas) devido a mutações em resíduos do sítio ativo (HENNIG et al., 1995; PAYAN et al., 2003; DURAND et al., 2005). Esses membros de GH18 sem atividade catalítica são também chamados de quitolectinas (ZAHEER-UL-HAQ et al., 2007). Já a família GH19 contém lisozimas (EC 3.2.1.17) e quitinases de plantas (classes I, II e IV), de nematódeos e algumas quitinases bacterianas, como de *Streptomyces griseus* e *Vibrio* sp.,

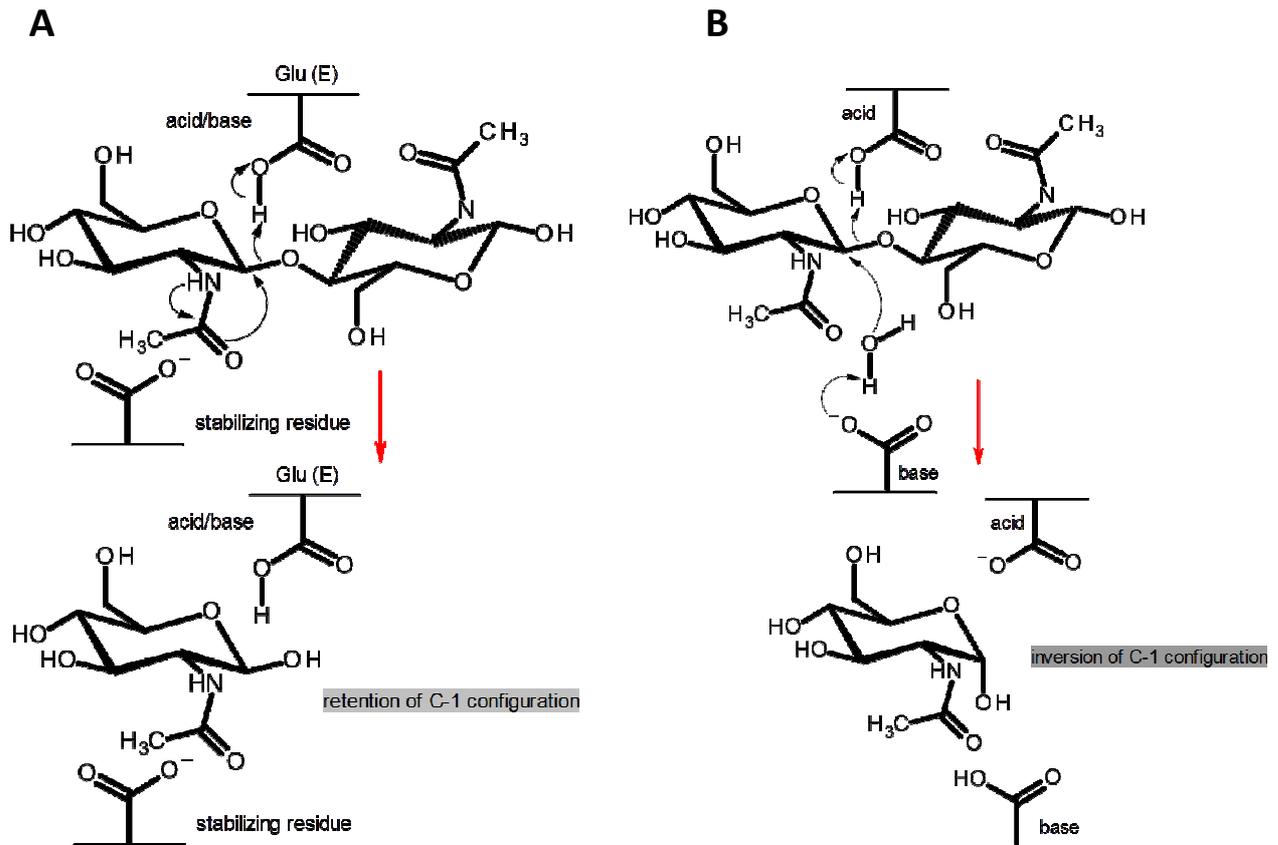
recentemente identificadas. Atualmente, a ocorrência de quitinases da família GH19 em espécies de *Streptomyces* e outros gêneros da classe Actinobacteria é um aspecto bem estabelecido (WATANABE et al., 1999; KAWASE et al., 2004). Além de Actinobacteria, as bactérias verdes não sulfurosas (filo Chloroflexi) e as bactérias púrpuras (filo Proteobacteria) são os únicos grupos de Bacteria que possuem quitinases GH19 (UDAYA PRAKASH et al., 2010), o que revela uma distribuição mais restrita dessas quitinases em relação àquelas da família GH18. Dados recentes indicam atividade quitinásica presente também em proteínas das famílias GH20 e GH48. As *N*-acetil- β -D-glucosaminidases, como aquelas encontradas na família GH20, também podem participar na degradação da quitina por liberar um resíduo de GlcNAc a partir da extremidade não redutora de quitooligossacarídeos (FUNKHOUSER; ARONSON JR, 2007).

É provável que as quitinases das famílias GH18 e GH19 tenham evoluído de ancestrais diferentes, pois além de não compartilharem similaridade em suas seqüências de aminoácidos, possuem estruturas tridimensionais e mecanismos enzimáticos completamente diferentes. Assim, os domínios catalíticos de quitinases da família GH18 possuem uma estrutura tridimensional caracterizada por um barril (β/α)₈, ou barril TIM (triose fosfato isomerase) (BANNER et al., 1975), enquanto que aqueles de quitinases da família GH19 têm um elevado conteúdo de α -hélices e uma estrutura semelhante aquelas encontradas em quitosanases e lisozimas (CHUANG et al., 2008).

Quando uma quitinase hidroliza uma ligação β -1,4 a GlcNAc reduzida até o fim contém um carbono assimétrico, e existe como dois estereoisômeros diferentes: configuração α ou β . Em oligômeros de quitina, a configuração β é normalmente dominante. Quitinases da família GH19, como a quitinase de classe I de feijão (32 kDa), invertem a configuração anomérica do resíduo de GlcNAc hidrolisado. Quitinases da família GH18, por sua vez, tal como a quitinase de classe III do pepino (27 kDa), mantém a configuração do resíduo de GlcNAc hidrolisado (PERRAKIS et al., 1994; OHNO et al., 1996; COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; LEE et al., 2007; AAM et al., 2010). O mecanismo de hidrólise está ilustrado na Figura 3.

Com base na similaridade da seqüência de aminoácidos de quitinases oriundas de diferentes organismos, cinco classes de quitinases têm sido propostas, dentro das duas famílias GH18 e GH19. Quitinases das classes I, II e IV são de origem vegetal e compõem a família 19 das glicosil hidrolases. Essas quitinases compartilham um domínio catalítico homólogo, além do peptídeo sinal encontrado em todas elas. Quitinases de classe I consistem

Figura 3 – Mecanismo de hidrólise das quitinasases



(A) Mecanismo de hidrólise por duplo deslocamento proposto para quitinasases da família GH18. A protonação de um resíduo de GlcNAc leva à formação de um intermediário, que pode ser hidrolisado para formar um produto com a retenção da configuração anomérica. (B) Mecanismo de hidrólise por deslocamento único, proposto para as quitinasases da família GH19. Dois resíduos de aminoácidos são requeridos no sítio ativo e a hidrólise resulta na inversão do carbono anomérico do produto. As estruturas foram desenhadas com o programa Accelrys Draw versão 4.0 (disponível no endereço eletrônico www.accelrys.com).

de um domínio amino-terminal rico em cisteínas ligado ao domínio catalítico por uma região curta rica em glicina/prolina. O domínio rico em cisteína é importante para a ligação à quitina, mas não para a atividade catalítica. A maioria das quitinasases de classe I possui um peptídeo sinal na região carboxi-terminal que é essencial para o direcionamento para o vacúolo da célula vegetal. Já quitinasases de classe II, encontradas principalmente em dicotiledôneas, caracterizam-se pela ausência do domínio rico em cisteínas e do peptídeo sinal, indicando que essas quitinasases não se ligam a quitina e são secretadas para o apoplasto. Quitinasases de classe IV, também encontradas majoritariamente em dicotiledôneas, compreendem um grupo de quitinasases extracelulares que compartilham uma identidade de sequência de 41-47% com quitinasases de classe I no domínio catalítico e também contêm regiões ricas em cisteínas, quitina assemelhando-se domínios de ligação, no entanto, quitinasases classe IV são menores devido a deleções em ambos os domínios. Quitinasases da classe III são principalmente de

plantas e fungos e juntamente com as quitinases de classe V formam a família glicosil hidrolases 18. A classe V é principalmente composta de quitinases bacterianas, entretanto, duas proteínas de classe V com a atividade endoquitinásica, assemelhando-se a quitinases bacterianas, foram isoladas de tabaco (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

De acordo com a nomenclatura sugerida por Sahai e Manocha (1993) as enzimas quitinolíticas são divididas em três tipos principais. Endoquitinases são definidas como enzimas que catalisam a hidrólise randômica de ligações β -1,4 de GlcNAc em sítios internos ao longo de todo o comprimento das microfibrilas de quitina. Os produtos da reação são multímeros solúveis de GlcNAc, de baixa massa molecular, como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose. Exoquitinases, também chamadas “quitobiosidades” ou quitina-1,4- β -quitobiosidases, catalisam a liberação progressiva de unidades de diacetilquitobiose em um passo como o único produto de cadeias de quitina, de forma que monossacarídeos nem oligossacarídeos são formados. O terceiro tipo é *N*-acetil- β -1,4-D-glucosaminidase, uma enzima quitinolítica que também atua em cortes de extremidades em diacetilquitobiose e muitos análogos de quitina, incluindo quitotriose e quitotetraose, resultando em monômeros de GlcNAc. Essa definição inclui, inerentemente, a atividade da quitobiase que hidrolisa especificamente diacetilquitobiose, formando monômeros de GlcNAc (CHERNIN et al., 1998; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

O catabolismo de quitina tipicamente ocorre em duas etapas envolvendo uma clivagem inicial de um polímero de quitina por endoquitinases ou exoquitinases em oligossacarídeos de quitina, e por último, ocorre a clivagem em monômeros de β -*N*-acetilglucosamina por quitobiase (DRABORG et al., 1996; WATANABE et al., 1999 apud YANG et al., 2008).

Atividade quitinásica é freqüentemente analisada por medição de viscosidade, ensaios radioquímicos, ensaios fluorogênicos, ou atividade em gel SDS-PAGE (zimograma). Entre esses alguns são mais sensíveis que outros, mais complexos ou demorados. A escolha será de acordo com o propósito do trabalho (ZOU; NONOGAKI; WELBAUM, 2002).

Diferentes organismos produzem uma grande variedade de enzimas hidrolíticas que apresentam diferentes especificidades de substrato e outras propriedades úteis para várias funções. Em bactérias, as quitinases desempenham um papel na nutrição e parasitismo, considerando que, em fungos, protozoários e invertebrados, elas também estão envolvidas na morfogênese. As quitinases dos fungos, por exemplo, estão envolvidas no crescimento e ramificação apical normal das hifas. Entre os insetos, as quitinases são necessárias para digerir a quitina presente no exoesqueleto durante o processo de muda. Quitinases estão

também envolvidas no mecanismo de defesa de plantas e animais vertebrados. Os baculovírus, que são utilizados para o controle biológico de pragas e insetos, também produzem quitinases para a patogênese. Atividade quitinásica no soro humano foi recentemente descrita e o possível papel sugerido seria uma forma de defesa contra fungos patogênicos (ALAM, 1995; PATIL et al., 2000).

Atualmente, o interesse por quitinases é crescente, para diferentes aplicações biotecnológicas, devido a sua capacidade de degradar quitina presente na parede celular de fungos e exoesqueleto de insetos, levando seu uso como agentes fungicida e inseticida. Além disso, outra aplicação interessante de quitinases é para a bioconversão de quitina, um biomaterial barato, em produtos farmacológicos ativos, ou seja, N-acetilglucosamina e quitooligosacarídeos. A produção de derivados de quitina com enzimas adequadas é mais apropriada tendo em vista que a separação é mais fácil e mais barata, além da poluição ambiental resultado do uso de reações químicas. Outras aplicações interessantes incluem a preparação de protoplastos de fungos filamentosos e biocontrole de insetos. Assim, tem havido muitos relatos sobre a expressão, clonagem e caracterização de quitinases de vários organismos, incluindo bactérias, fungos plantas e animais (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

O sucesso na utilização de quitinases para diferentes aplicações depende do fornecimento de preparações altamente ativas a um custo razoável. A maioria dos fornecedores usa tanto a biodiversidade microbiana natural como também estirpes microbianas para produção de quitinases geneticamente engenheiradas para obtenção de preparações eficiente. A compreensão da bioquímica de enzimas quitinolíticas irá torná-las mais útil em uma variedade de processos em um futuro próximo (PATIL et al., 2000).

2.4 Quitinases bacterianas

A capacidade de degradar quitina é encontrada entre vários grupos taxonômicos de procariontes, incluindo as bactérias, os vibriões, *Photobacterium* spp., bactérias entéricas, actinomicetos, bacilos, clostrídios, e archaea (COTTRELL et al., 1999). Em bactérias Gram-negativas, atividade quitinolítica tem sido descrita para estirpes dos gêneros *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Ewingella* e *Vibrio*, para citar alguns (ALAM et al., 1995; BURBEG et al., 1996; SHIRO et al., 1992; GLEAVE et al., 1995).

Um elevado número de genes que codificam quitinases tem sido identificado de fontes bacterianas, como por exemplo, de *Bacillus circulans*, *Serratia marcescens*,

Streptomyces plicatus, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces thermoviolaceus* e *Streptomyces coelicolor*. Em particular, estreptomicetos já são bem conhecidos por serem decompositores de quitina no solo e possuir múltiplos genes que codificam diferentes quitinases com características enzimáticas variadas (NAZARI et al., 2011).

A quitina é um elemento constituinte do exoesqueleto de zooplâncton, de larvas de invertebrados, da parede celular de algumas clorofíceas e do material extracelular de algumas diatomáceas (COTTRELL et al., 1999). Somente na biosfera aquática, estima-se que mais de 10^{11} toneladas de quitina são produzidas por ano pelo zooplâncton, em processos de muda e senescência. Se essa quantidade enorme de carbono e nitrogênio insolúvel não fosse convertida para material biologicamente útil, os oceanos estariam esgotados destes elementos em questão de décadas. Na verdade, os sedimentos marinhos contêm apenas vestígios de quitina, e a reciclagem do grande volume desse polissacarídeo é atribuída principalmente às bactérias marinhas (KEYHANI; ROSEMAN, 1999).

Atualmente, está bem estabelecido que as quitinases bacterianas desempenham papéis importantes na ciclagem de quitina, especialmente no ambiente marinho. Porém, quitinases bacterianas também podem contribuir para infecções humanas e animais como já relatado para *Legionella pneumophila*, onde uma quitinase secretada promove a infecção bacteriana no pulmão de camundongos. Além disso, estudos mostram que, no caso de *Salmonella* SL1344, a expressão de uma quitinase da família GH18 é fortemente aumentada durante a infecção de células de macrófagos de camundongo murino (LARSEN, et al., 2011).

Quitinases de bactérias podem pertencer às classes GH18 e GH19 e geralmente são proteínas modulares, consistindo de múltiplos domínios funcionais, como domínio de ligação à quitina e domínio de fibronectina tipo III, associados ao domínio catalítico (LEE et al., 2007).

Além disso, as quitinases bacterianas são separadas em três grandes subfamílias: A, B e C, com base na seqüência de aminoácidos de cada um dos domínios catalíticos (WATANABE et al. 1993). Há um domínio de inserção nas quitinases da subfamília A entre a fita sete e fita 8 da estrutura de barril $(\beta/\alpha)_8$, que é ausente nas subfamílias B e C. A estrutura tridimensional (3D) conhecida de três quitinases bacterianas da família GH18, todas pertencentes à subfamília A, são quitinase A (Chia) e quitinase B (ChiB) de *Serratia marcescens* QMB1466 e quitinase A1 (ChiA1) de *Bacillus circulans* WL-12. Chia de *S. marcescens* compreende três domínios: um domínio N-terminal, um domínio barril $(\beta/\alpha)_8$ catalítico e um pequeno domínio de α -hélice + folhas β inserido dentro do domínio barril $(\beta/\alpha)_8$. Um domínio de ligação a quitina na região C-terminal, além do domínio barril $(\beta/\alpha)_8$

catalítico, está presente na quitinase ChiB de *Serratia*. Por outro lado, ChiA1 de *B. circulans* é composta por um domínio catalítico, dois domínios de fibronectina tipo III e domínio de ligação a quitina no C-terminal. A estrutura 3D do domínio catalítico da ChiA1 de *B. circulans* é semelhante ao da ChiA de *Serratia*. Dois pequenos domínios de inserção situados na parte superior do barril (β/α)₈ da ChiA1 de *B. circulans* oferece uma profunda fenda para ligação do substrato. Já a quitinase C (Chic) de *Streptomyces griseus* HUT6037 foi a primeira quitinase da família GH19 que não é de planta e cuja estrutura 3D foi determinada. É composta de um domínio de ligação à quitina na região N-terminal e um domínio catalítico C-terminal, sendo os dois domínios conectados por um peptídeo *linker* composto por 10 resíduos (CHUANG et al., 2008).

Sabe-se que as bactérias produzem quitinases com a função principal de degradar quitina e usar esse polissacarídeo abundante na natureza como fonte de carbono. Porém, encontra-se na literatura trabalhos mostrando que quitinases de algumas bactérias possuem elevada atividade anti-fúngica (WATANABE et al., 1999; FUKAMIZO, 2000; WANG et al., 2002; JUNG et al., 2003; KAWASE et al., 2006; MEHMOOD et al., 2009; VELUSAMY; KIM, 2011), o que torna os genes que as codificam potenciais alternativas para a proteção de plantas.

2.5 Expressão Heteróloga de proteínas

A expressão de proteínas heterólogas em microorganismos usando a tecnologia do DNA recombinante é uma ferramenta essencial no desenvolvimento e exploração da biotecnologia moderna. Uma variedade de sistemas de expressão designados para diversas aplicações estão disponíveis. Para a escolha do sistema de expressão ideal, devem ser levados em conta a produtividade, a bioatividade, o propósito e as características físico-químicas da proteína de interesse, além do custo e segurança do próprio sistema (YIN et al., 2007).

2.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli tem sido bastante usada como hospedeiro celular para a expressão de proteínas heterólogas, por ser um organismo geneticamente bem conhecido, devido a sua alta taxa de crescimento, capacidade de fermentação contínua e relativo baixo custo (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Como um sistema procariótico de expressão, *E. coli* pode não realizar modificações pós-traducionais, como por exemplo glicosilação,

acilação, fosforilação e formação de pontes dissulfeto, que muitas vezes são requeridas para o dobramento correto das estruturas secundárias, terciária e quaternárias e para as características funcionais da proteína de interesse (YIN et. al., 2007).

As proteínas podem ser expressas em *E. coli* de diferentes maneiras: secretadas para o meio extracelular ou para o espaço periplasmático, ou produzidas intracelularmente, de forma solúvel ou formando os corpos de inclusão, que resultam de uma falha do sistema de reparo ou remoção de proteínas desenoveladas ou enoveladas incorretamente (SCHUMANN et al., 2004).

A alta concentração de proteases no ambiente intracelular pode também interferir nas características do produto final, dificultando a expressão de proteínas bioativas em *E. coli*. Estirpes de expressão devem ser deficientes em proteases naturalmente nocivas, para manter a expressão estável do plasmídeo e conferir os elementos genéticos relevantes para o sistema de expressão. Cepas vantajosas estão disponíveis para um número variado de aplicações. *E. coli* BL21 é o hospedeiro mais comum e tem se mostrado excelente para sistemas de expressão de proteínas recombinantes. BL21 é um derivado da *E. coli* estirpe B, capaz de crescer vigorosamente em meios mínimos, e não é patogênica. Além disso, foi geneticamente engenherada para ser deficiente em *ompT* e *lon*, duas proteases que poderiam interferir com a proteína recombinante (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

A expressão em altos níveis de proteínas heterólogas em *E. coli* pode resultar na produção de grande quantidade de proteína dobrada de forma incorreta, gerando agregados de proteína inativa conhecidos como corpos de inclusão. Enquanto o agregado de proteína pode ser fácil para purificar, obter a proteína ativa de corpos de inclusão normalmente requer etapas de reenovelamento, que nem sempre garantem um produto biologicamente ativo. Pode-se afirmar que essa formação de corpos de inclusão em sistemas de expressão recombinantes é resultado de um desequilíbrio entre a agregação e solubilização de proteínas *in vivo*. Dessa forma, essa agregação pode ser minimizada através do controle de parâmetros como temperatura de cultivo, taxa de expressão, metabolismo do hospedeiro, engenharia da proteína de interesse, tecnologia de proteínas de fusão e pela co-expressão de chaperonas codificadas em plasmídios (JONASSON et al., 2002).

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é largamente empregada com o propósito do baixo custo e conveniência. Muitas proteínas podem agora ser produzidas rotineiramente com rendimento na escala de grama/litro (GEORGIU; SEGATORI, 2005).

2.5.2 *Pichia pastoris*

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* pode ser geneticamente modificada com a finalidade de expressar proteínas tanto para pesquisa básica como para uso industrial. Mais de 400 proteínas, de endostatina humana a proteína da seda de aranha, tem sido produzidas por essa levedura (CEREGHINO et al., 2002).

Pichia pastoris tem se tornado um sistema para expressão heteróloga de genes de grande sucesso. Vários fatores têm contribuído para a sua rápida aceitação, dentre os mais importantes se incluem: um promotor derivado do gene da álcool oxidase I (AOXI) de *P. pastoris* que é adequado para a expressão controlada de genes; a semelhança das técnicas necessárias para a manipulação genética molecular de *P. pastoris* com as de *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados na biologia moderna e a grande preferência da *P. pastoris* para crescimento respiratório, uma característica fisiológica chave que facilita muito o seu cultivo em altas densidades celulares em relação a leveduras fermentadoras (CREGG et al., 2000; CEREGHINO et al., 2002).

Como é uma levedura, *P. pastoris* é um microorganismo unicelular de fácil manipulação e cultivo. No entanto, é também um eucarionte e capaz de executar muitas das modificações pós-traducionais executadas por células eucarióticas, tais como processamento proteolítico, dobramento, formação de pontes dissulfeto e glicosilação. Dessa forma, muitas proteínas que são produzidas como corpos de inclusão inativos em sistemas bacterianos são expressas como moléculas biologicamente ativas em *P. pastoris*. O sistema *P. pastoris* também é geralmente considerado como sendo mais rápido, mais fácil e mais barato do que sistemas de expressão derivados de eucariontes superiores, tais como células de insetos e de mamíferos e, normalmente, resulta em níveis mais altos de expressão (CREGG et al., 2000).

A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser intracelular ou secretada. A secreção requer a presença de uma sequência sinal na proteína expressa para o devido endereçamento na via secretória. O sinal de secreção (fator α) de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usado com sucesso (CREGG et al., 1993). Uma grande vantagem de obter a proteína secretada é que *P. pastoris* secreta um nível muito baixo de proteínas, fazendo com que a proteína recombinante compreenda a maioria do total de proteínas secretadas no meio (BARR et al., 1992).

2.6 Expressão de quitinases bacterianas em sistemas heterólogos

Quitinases expressas em sistemas heterólogos podem conferir maior resistência contra patógenos que contém quitina, ou até mesmo ajudar na reciclagem de quitina em

ambientes ricos desse polissacarídeo. A fim de conseguir atingir essas metas, são necessárias mais informações sobre quitinases oriundas de várias fontes, dos seus elementos reguladores e proteínas reguladoras que influenciam a expressão de quitinases (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

A expressão e purificação de quitinases bacterianas recombinantes têm sido relatadas com sucesso (JANG et al., 2005; LAN et al., 2006; YONG et al., 2006; KADOKURA, et al., 2007; PARK, et al., 2008; YANG, et al., 2008; CHO et al., 2011). Quitinases bacterianas têm recebido grande atenção devido à sua potencial aplicação no controle biológico de pragas e fungos fitopatogênicos, bem como na bioconversão de restos de quitina (YONG et al., 2006).

A bactéria *Streptomyces coelicolor* A3(2) possui 13 genes que codificam 11 quitinases da família GH18 e duas que pertencem à família GH19. Para comparar as propriedades enzimáticas das quitinases das famílias 18 e 19 produzidas por essa mesma bactéria, quatro quitinases (Chi18bA, Chi18aC, Chi18aD, e Chi19F), cujos genes são expressos em níveis elevados em presença de quitina, foram produzidas em *Escherichia coli* e purificadas. Observou-se que o efeito do pH na atividade hidrolítica era muito diferente, não só entre as quatro quitinases, mas também entre os substratos. A atividade hidrolítica da Chi19F, quitinase da família 19, contra substratos solúveis era extremamente alta, em comparação com as três da família 18 quitinases, mas foi a menor contra substratos cristalinos entre as quatro quitinases. Pelo contrário, Chi18aC, uma quitinase da família 18, sub-família A, mostrou maior atividade contra substratos cristalinos. Apenas Chi19F exibiu atividade antifúngica significativa (KAWASE et al., 2006).

Okay e colaboradores (2008) clonaram e expressaram um gene que codifica uma quitinase de *Serratia marcescens* em uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* que infecta coleópteros. Observou-se que a quitinase de *S. marcescens* foi expressa, de forma heteróloga, em níveis ainda mais elevados do que quando produzida pelo organismo de origem, e o plasmídeo recombinante foi estável por 240 gerações. Assim sendo, os autores concluíram que o *Bacillus thuringiensis* co-expressando uma proteína Cry e a quitinase de *S. marcescens* oferece uma alternativa viável ao uso de micróbios/enzimas quitinolíticas em combinação com bactérias entamopatogênicas para um aumento na potência bioinseticida devida interação sinérgica entre eles.

Segundo Yang e colaboradores (2008), a quitinase de *Bacillus subtilis* expressa em *E. coli* exibiu elevada e estável atividade quitinásica em quitina coloidal e inibiu o crescimento do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

O gene que codifica um quitinase de *Serratia proteamaculans* 18A1 foi clonado, seqüenciado e expresso em *Escherichia coli* M15 por Mehmood e colaboradores (2009) e a enzima recombinante purificada foi ativa em uma ampla faixa de pH (pH 4.5 a 9) e temperatura (4 a 70 °C), com um pico de atividade em pH 5,5 e 55 °C, e além disso, mostrou atividade inibitória na germinação dos esporos e crescimento das hifas dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*.

Hassan e colaboradores (2009) expressaram a quitinase de *Streptomyces olivaceoviridis* em *Pisum sativum* e os resultados mostraram que as plantas transgênicas inibiram ou retardaram a extensão das hifas de *Trichoderma harzanium*.

Recentemente, Lobo (2009) relatou a expressão em *E. coli* da ORF para a quitinase CV2935 de *C. violaceum*. Nesse trabalho, a proteína recombinante foi secretada para o meio extracelular após 24 horas de cultivo a 37 °C, com massa molecular aparente de 43 kDa, e foi parcialmente purificada por meio de cromatografia de afinidade em matriz de quitina. Além disso, a enzima apresentou elevada atividade quitinásica contra quitina coloidal.

3. HIPÓTESE

Tendo em vista que, embora raramente, *C. violaceum* possa atuar como um patógeno oportunista no homem, causando septicemia fatal a partir de lesões na pele expostas a material contaminado, para a caracterização da quitinase CV2935, bem como para a avaliação do biotecnológico dessa proteína, a produção em larga escala da mesma em sistemas heterólogos de expressão se faz necessária. Desta forma, essa dissertação foi desenvolvida com o propósito de testar as seguintes hipóteses:

1 - A quitinase CV2935 de *C. violaceum* pode ser produzida com sucesso em dois sistemas heterólogos de expressão: *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*;

2 - A enzima recombinante poderá ser purificada a partir do meio de cultura, apresentar-se funcional, o que permite sua caracterização bioquímica, biológica e estrutural;

4- A quitinase recombinante é uma enzima adequada para aplicação na conversão de restos de quitina em produtos úteis;

3 - A rCV2935 é ativa contra fungos e insetos pragas de plantas, podendo constituir uma ferramenta biotecnológica para o biocontrole dos mesmos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Clonar e expressar em *E. coli* e *P. pastoris* a quitinase codificada pela ORF CV2935 de *C. violaceum*, bem como, purificar e realizar a caracterização bioquímica, biológica e estrutural da proteína recombinante.

4.2 Objetivos específicos

- Clonar a sequência codificadora da quitinase CV2935 de *C. violaceum* em vetores adequados para os dois sistemas heterólogos: *E. coli* e *P. pastoris*;
- Expressar, na forma solúvel, e purificar a proteína recombinante obtida nos dois sistemas;
- Realizar a caracterização bioquímica, analisando as condições ótimas para sua atividade enzimática, bem como, avaliar a sua capacidade de hidrólise frente a diferentes substratos;
- Realizar a caracterização estrutural, resolvendo a estrutura cristalográfica e construir um modelo 3D da proteína;
- Avaliar os efeitos da proteína recombinante sobre bactérias, levedura, fungos fitopatogênicos e insetos por meio de ensaios biológicos.

5. MATERIAIS

5.1 Cepas (Bactérias e Leveduras)

Escherichia coli TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi usada nos experimentos de clonagem. Após a subclonagem, a expressão da proteína recombinante foi conduzida em *Escherichia coli* BL21(DE3) (Stratagene, Texas, USA) e *Pichia pastoris* KM71H (Invitrogen).

5.2 Enzimas

As enzimas de restrição *EcoRI* (10 U/ μ L), *SacI* (10 U/ μ L), *XhoI* (10 U/ μ L) e *XbaI* (10 U/ μ L), acompanhadas dos seus respectivos tampões de reação, foram obtidas da Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá). T₄ DNA ligase e *Go Taq* DNA Polimerase foram adquiridas da Promega (Madison, WI, USA), também acompanhadas de seus tampões de reação apropriados. A DNA Polimerase *Phusion*, de alta fidelidade, juntamente com seus tampões, foi adquirida da Finzymes (Vantaa, Finlândia).

5.3 Plasmídios

Os vetores de expressão utilizados foram o plasmídio pET303/CT-His para expressão em *E. coli*, e pPICZ α A para expressão em *P. pastoris*. Ambos os plasmídios foram adquiridos da Invitrogen.

5.4 Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores, apropriados para reações de PCR, foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, San Diego, CA, USA).

Marcadores de massa molecular de ácidos nucléicos usados nas eletroforeses em gel de agarose foram λ DNA/*HindIII* e ϕ X174/*HaeIII* (New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, USA).

Marcadores de massa molecular de proteínas, usados nas eletroforeses em gel de poliacrilamida, foram os seguintes: *Bench Mark Pre-stained Protein Ladder*, *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen) e *Low Molecular Weight* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA).

Todos os demais reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico e com alto grau de pureza.

6. MÉTODOS

6.1 Análise *in silico* da sequência deduzida da CV2935

O ponto isoelétrico teórico (pI) e a massa molecular da proteína CV2935 foram preditos usando *Compute pI/Mw* no servidor ExPASy (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html).

Pesquisas por proteínas similares, em bancos de dados públicos de sequências, foram realizadas usando BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990). A presença de peptídeo sinal e provável sítio de clivagem pela peptidase sinal foram preditos por meio da ferramenta *SignalP* versão 3.0 (VON HEIJNE, 1986; BENDTSEN et al., 2004), disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, e PRED-TAT (BAGOS et al., 2010) em www.compgen.org/tools/PRED-TAT/, respectivamente.

Já a presença e delimitação de domínios na proteína foram realizadas usando os programas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), CDD (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) e Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>).

Alinhamentos múltiplos de sequências de aminoácidos foram gerados usando *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) e *T-Coffee* (NOTREDAME et al., 2000). A identidade entre um par de sequências alinhadas foi calculado como o número de resíduos idênticos dividido pelo número de posições alinhadas, excluindo os sítios com lacunas (*gaps*), e expresso em porcentagem.

Alinhamentos estruturais com base em comparações de estruturas 3D depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) foram obtidos a partir do banco de dados *Dali* (HOLM; ROSENSTRÖM, 2010) acessível em http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server. Os domínios funcionais foram nomeados seguindo a nomenclatura adotada pelo banco de dados *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZy), <http://www.cazy.org/> (CANTAREL et al., 2009).

6.2 Amplificação da ORF CV2935

Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram projetados, para amplificação da sequência de DNA (1.320 pb; Anexo 1) da ORF CV2935 de *C. violaceum* ATCC 12472 (Tabela 1). A ORF CV2935 está localizada na fita complementar do cromossomo de *C. violaceum* (número de acesso no GenBank: NC_005085), estendendo-se da posição 3.211.716 a 3.213.035. Para expressão em *E. coli*, a ORF completa foi amplificada, enquanto que para

expressão em *P. pastoris*, o produto de amplificação excluía os primeiros 72 nucleotídeos, que codificam o peptídeo sinal nativo da quitinase, com 24 resíduos de aminoácidos (Anexo 2). Sítios para as enzimas de restrição (*Xho*I, *Eco*RI ou *Xba*I) foram adicionados à extremidade 5' de cada oligonucleotídeo, para facilitar a manipulação dos produtos amplificados.

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da quitinase CV2935 de *C. violaceum*, com peptídeo sinal para clonagem em *E. coli* e sem peptídeo sinal, para clonagem em *P. pastoris*

Sequência de nucleotídeos

CV2935Ecoli-for	5' - CCG <u>TCTAGA</u> ¹ ATG CGC AGA ACG ACA GGC AGG - 3'
CV2935Ecoli-rev	5' - CCG <u>CTC GAG</u> ² CCA GGC CGT CCG CGT CGC GCG - 3'
CV2935Pichia-for	5' - CCG <u>GAA TTC</u> ³ TGC CCG GGC TGG GCC GAG G - 3'
CV2935Pichia-rev	5' - CCG <u>TCTAGA</u> ¹ <u>AC</u> ⁴ CCA GGC CGT CCG CGT CG - 3'

¹ O sublinhado apresenta o sítio para a enzima *Xba*I

² O sublinhado apresenta o sítio para a enzima *Xho*I

³ O sublinhado apresenta o sítio para a enzima *Eco*RI

⁴ Nucleotídeos adicionados para manter a sequência da ORF em *frame* com as sequências codificadoras do epítipo *c-myc* e cauda de histidina.

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL (*Axygen Scientific Inc.*, Union City, CA, USA), utilizando uma DNA polimerase termoestável de alta fidelidade, para um volume final de 20 µL contendo DNA genômico (50 ng), dNTPs (200 µM cada), oligonucleotídeos iniciadores (0,5 µM cada um), tampão GC 1X com MgCl₂ (Finzymes), *Hot Phusion* DNA polimerase (0,4 U; Finzymes) e água ultra-pura estéril (q.s.p. 20 µL). Além das amostras testadas na reação de PCR, um controle negativo, que continha todos os componentes da reação exceto DNA, foi sempre usado. O processo de amplificação ocorreu em um termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), programado para uma etapa inicial de desnaturação (3 min a 98 °C), seguida por 35 ciclos de 10 s a 98 °C (desnaturação), 30 s a 65 °C (para iniciadores destinados a clonagem em *E. coli*) ou 68 °C (para iniciadores destinados a clonagem em *P. pastoris*) e 2 min e 30 s a 72 °C (extensão). Após o último ciclo, uma última fase de extensão prolongada (72 °C por 5 min) foi realizada. Posteriormente, as amostras permaneceram estocadas a 4 °C no termociclador até que, em seguida, fossem estocadas a -20 °C até uso posterior. Para análise dos produtos da reação, uma alíquota de 5 µL foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%.

6.3 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pET303/CT-His

Os produtos amplificados por PCR (item 6.2) e cerca de 2 µg do plasmídio pET303/CT-His (Anexo 3) foram digeridos com *Xho*I (20 U) e *Xba*I (20 U), a 37 °C por 6 h, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas. Após o término da reação, os fragmentos digeridos foram purificados utilizando-se o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo fornecido.

Os produtos de PCR e o plasmídio pET303/CT-His, digeridos e purificados, foram submetidos a uma reação de ligação com T₄ DNA ligase (9 U), nas condições sugeridas pelo fabricante da enzima. A reação de ligação foi incubada a 4 °C por 16 h.

Os produtos da reação de ligação foram inseridos em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F' por eletroporação, a 2.500 V (Eletroporador 2510, Eppendorf). As células submetidas à eletroporação foram recuperadas em 1 mL de meio SOC pré-aquecido a 37 °C e mantidas sob agitação orbital constante (180 rpm) por 90 min a 37 °C.

Após o período de incubação, 100 µL da cultura foram semeados em meio LB ágar suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL). As culturas foram mantidas a 37 °C por 24 h, até a visualização de colônias. Algumas colônias foram escolhidas ao acaso e inoculadas em 5 mL de caldo LB (contendo carbenicilina 100 µg/mL e estreptomicina 30 µg/mL) e incubadas sob agitação constante (180 rpm) a 37 °C, por aproximadamente, 16 h. Ao final desse período, uma alíquota (3 mL) de cada cultura foi usada para isolamento de DNA plasmidial, pelo método de lise alcalina, como descrito por Sambrook et al. (1989). A presença do inserto nas preparações de DNA plasmidial foi, então, determinada por PCR e digestão com as endonucleases apropriadas.

O plasmídio recombinante pET-CV2935 (50 ng) foi então inserido por eletroporação (como descrito anteriormente) em células do hospedeiro de expressão, *E. coli* BL21(DE3), para posterior indução da expressão da proteína recombinante. Clones de *E. coli* BL21(DE3) portando o pET-CV2935 foram mantidos em meio estoque contendo glicerol 15% e armazenados a -80 °C.

6.4 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pPICZαA

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR (item 6.2) e o plasmídio pPICZαA (Anexo 4) foram digeridos com *Eco*RI (20 U) e *Xba*I (20 U), a 37 °C por 6 h, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas. Após o término da reação, os fragmentos

digeridos foram purificados utilizando-se o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo fornecido.

Os produtos de PCR e o plasmídio pPICZ α A, digeridos e purificados, foram submetidos a uma reação de ligação com T₄ DNA ligase (9 U), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima. A reação de ligação foi conduzida a 4 °C por 16 h, e ao final desse período, os produtos foram inseridos em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F', por eletroporação, de acordo com o procedimento descrito no item anterior. Células transformadas foram, inicialmente, selecionadas em meio LB *low salt* ágar suplementado com zeocina (25 μ g/mL) e incubadas a 37 °C por 16 h. Algumas colônias isoladas foram escolhidas ao acaso e inoculadas em 5 mL de caldo LB *low salt* (contendo zeocina 25 μ g/mL) e incubadas sob agitação constante (180 rpm) a 37 °C por, aproximadamente, 16 h. Ao final desse período, uma alíquota (3 mL) de cada cultura foi usada para isolamento de DNA plasmidial, pelo método de lise alcalina, como descrito por Sambrook et al. (1989). A presença do inserto nas preparações de DNA plasmidial foi, então, determinada por PCR e digestão com as endonucleases apropriadas. Clones transformados com o plasmídio recombinante (pPIC-CV2935) foram mantidos em meio estoque contendo glicerol 15% e armazenados a -80 °C.

O plasmídio recombinante (pPIC-CV2935; 20 μ g) foi, posteriormente, submetido à linearização para transformação genética em *P. pastoris* KM71H, como descrito no item 6.7.

6.5 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial, a partir de culturas de *E. coli*, foi realizada de acordo com o método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989), com algumas modificações.

A cultura bacteriana (3 mL) foi centrifugada a 13.000 x g, por 5 min, a 25 °C, e as células foram ressuspendidas em 100 μ L de tampão GET (Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0). A lise das células foi realizada pela adição de 150 μ L de uma solução de NaOH/SDS (150 μ L de NaOH 4 M; 300 μ L de SDS 10%; água ultrapura q.s.p. 3 mL) à suspensão de células. A mistura foi invertida seis vezes, para homogeneização, e, posteriormente, incubada em banho de gelo por exatos 5 min. Ao lisado foram adicionados 200 μ L de acetato de potássio 3M e a mistura novamente invertida seis vezes e centrifugada a 13.000 x g por 20 min, a 25 °C, em microcentrífuga *minispin* (Eppendorf).

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e ao mesmo foram adicionados 2/3 do seu volume de isopropanol 100%. Após incubação à temperatura ambiente por 10 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 x g por 15 min, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pelete foi seco por 15 min a temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi então recuperado em 50 µL de água ultrapura estéril.

6.6 Eletroforese em gel de agarose

Géis de agarose para análise eletroforética de DNA foram preparados de acordo com o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras de DNA foram previamente misturadas com tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30% em TE pH 8,0) e aplicadas em gel de agarose contendo 0,5 µg/mL de Brometo de Etídio (EtBr). As corridas eletroforéticas foram realizadas sob voltagem constante de 100 V, com o gel submerso em tampão de corrida TBE (Tris-Borato 45 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM) em cuba horizontal.

Ao final da corrida eletroforética, as bandas foram visualizadas por exposição à luz UV, em um transiluminador *Vilber Lourmat* (Marne-la-Vallée, France), e a imagem foi capturada por um sistema de fotodocumentação acoplado ao equipamento.

6.7 Transformação de células de *P. pastoris* KM71H com o vetor recombinante pPICZαA::CV2935

O plasmídio recombinante pPIC-CV2935 (20 µg) foi submetido a digestão com *SacI* (40 U), para linearização. A reação foi incubada em termociclador *PTC-200 Thermo Cycler* (MJ Research, Waltham, MA, USA), a 37 °C por 4 horas, e ao final desse período, a enzima foi inativada por incubação a 65 °C por 20 min. Ao término da reação, uma pequena alíquota foi aplicada em gel de agarose 0,8% para verificar a eficiência da linearização. O restante da amostra foi precipitado pela adição de 1/10 do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 100%. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000 x g por 10 min, a 25 °C, e o precipitado lavado com etanol 80%. Após eliminação e evaporação do etanol, o precipitado foi ressuspendido em 15 µL de água ultrapura estéril.

Uma alíquota de DNA plasmidial pPIC-CV2935 linearizado (aproximadamente 10 µg) foi misturada às células eletrocompetentes de *P. pastoris* KM71H e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação, previamente resfriada, e submetida a um pulso de 2.500 V. Para a reação controle, células da mesma estirpe foram eletroporadas com pPICZαA íntegro e linearizado com *SacI*. Imediatamente após o pulso, as células foram recuperadas em 1 mL de solução resfriada de sorbitol 1 M, transferidas para um tubo estéril e incubadas a 30 °C por 1 h, sem agitação. Um alíquota (100 µL) da cultura foi então semeada em meio YPDS ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glucose 2%, sorbitol 1 M, ágar 2%), suplementado com zeocina 300 µg/mL. As placas foram mantidas a 30 °C por 3 dias até a visualização de colônias.

6.8 Extração de DNA genômico de *P. pastoris*

Para confirmação da transformação genética e integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris*, alguns clones (como obtidos no item 6.7) foram selecionados e submetidos à extração de DNA genômico, seguindo o protocolo de Warner (1996). Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio YPD, contendo zeocina 300 µg/mL, e incubada a 30 °C, por 16 h, a 200 rpm. Desta cultura, uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para microtubo e centrifugada a 13.000 x g, por 3 min, a 25 °C. O meio de cultura foi descartado e as células lavadas com 800 µL de água ultrapura estéril. As células foram novamente coletadas por centrifugação a 13.000 x g, por 3 min, a 25 °C, e resuspendidas em 600 µL de tampão CTAB 2x (Tris-HCl 100 mM pH 8; CTAB 2%; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M), contendo β-mercaptoetanol 0,2% (v/v), pré-aquecido a 60 °C. A suspensão foi incubada em banho-maria a 60 °C por aproximadamente 16 h. Após essa etapa, um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionado e o material foi centrifugado por 30 min a 13.000 x g, a 25 °C. A fase aquosa (superior) foi recuperada e transferida para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol 100%, para precipitação dos ácidos nucleicos. O material foi incubado a 4 °C por 1 h e, em seguida, centrifugado por 5 min a 13.000 x g, a 25 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e coletado novamente por centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e, após evaporação do etanol, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura estéril contendo RNase A (20 µg/mL). A qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (como descrito em 6.6) e a concentração de DNA genômico estimada pela medida da absorbância a 260 nm, como sugerido por Sambrook et al. (1989).

Para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* KM71H, amostras de DNA genômico (50 ng) de clones selecionados em meio contendo zeocina foram submetidas a reações de PCR, realizadas com os seguintes iniciadores: α -factor (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'), que anela na porção 5' da região codificadora do fator α de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, presente no vetor, e CV2935Pichia-rev, que anela na porção 3' da sequência codificadora da ORF CV2935.

6.9 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em *E. coli*

A indução da expressão da quitinase recombinante em *E. coli* seguiu o protocolo de Lobo (2009).

Células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET303/CT-His::CV2935 foram plaqueadas em meio LB ágar contendo carbenicilina (200 μ g/mL), para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB, contendo carbenicilina (200 μ g/mL), e incubada sob agitação orbital a 180 rpm, 37 °C, por 16 h. Da cultura obtida, uma alíquota de 1 mL foi inoculada em 100 mL de meio LB suplementado com carbenicilina (200 μ g/mL). A cultura foi incubada nas mesmas condições anteriores (180 rpm, 37 °C) e quando sua densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) atingiu um valor em torno de 0,5, a indução da expressão da proteína recombinante foi iniciada pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,5 mM. Após a adição de IPTG, a cultura foi incubada sob agitação orbital vigorosa (200 rpm), a 37 °C, por 21 h. Ao final desse período, a cultura foi centrifugada (8.000 x g por 10 min, a 4 °C), e o meio de cultura livre de células (contendo a quitinase recombinante) foi exaustivamente dialisado contra água destilada, e armazenado a -20 °C até uso posterior.

6.10 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em *P. pastoris*

Uma colônia isolada de um clone recombinante, crescida em meio YPDS ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glucose 2%, sorbitol 1 M, ágar 2%) contendo zeocina 300 μ g/mL, foi inoculada em 10 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB 1,34%, glicerol 1%, biotina 0,00004%) suplementado com zeocina 300 μ g/mL. A suspensão foi incubada a 30 °C, 200 rpm, até que atingisse uma DO_{600} na faixa de 8-12.

As células dessa cultura foram então coletadas por centrifugação (3.000 x g por 5 min a 4 °C) e ressuspendidas em meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB 1,34%, metanol 0,5%, biotina 0,00004%), em um volume tal que a OD₆₀₀ fosse igual a 1,0. As novas culturas foram incubadas a 17 °C e 200 rpm, por até 144 h. Para manutenção da indução, metanol P.A. foi adicionado ao meio de cultura a cada 24 h, para uma concentração final de 1%.

Alíquotas de 10 mL de cultura foram coletadas a cada 24 h após o início da indução, para verificação do nível de expressão da quitinase recombinante e para se determinar o melhor tempo de indução (maior atividade enzimática total secretada). Imediatamente após a coleta, cada alíquota foi centrifugada (3.000 x g por 5 min a 4 °C) e o sobrenadante (meio livre de células) armazenado a -20 °C até uso posterior. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, para posterior precipitação de proteínas totais. As amostras coletadas foram utilizadas em ensaios de determinação de atividade quitinolítica e para visualização de proteínas totais em gel SDS-PAGE.

6.11 Purificação da quitinase recombinante

Para purificação da proteína recombinante produzida em ambos os sistemas heterólogos, induções em maior escala (volumes de 500 e 1000 mL) foram realizadas, seguindo-se os procedimentos já descritos (itens 6.9 e 6.10).

Ao final de cada indução, o meio de cultura (contendo a proteína recombinante secretada) foi centrifugado e o sobrenadante livre de células dialisado exaustivamente contra água destilada. Em seguida, sulfato de amônio sólido foi adicionado ao material dialisado, sob agitação, para um intervalo de saturação de 0-95%. As amostras foram mantidas em repouso durante 20 h, e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 x g, por 20 min a 4 °C. O precipitado (F0/95) foi solubilizado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, contendo NaCl 1 M, e centrifugado (12.000 x g por 10 min a 4 °C) para remover proteínas que ainda se apresentavam insolúveis. O sobrenadante límpido foi aplicado a uma matriz de quitina (1,7 cm x 16 cm; *Chitin Poly-[1→4]-β-D-N-acetyl-glucosamine, Practical Grade From Crab Shells C-7170*, Sigma, USA), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra permaneceu em contato com a matriz cromatográfica por cerca de 16 h, a temperatura de 6-8 °C. Proteínas que não interagiram com a matriz (Pico I; PI) foram eluídas com o tampão de equilíbrio, até que a A₂₈₀ do eluato fosse menor que 0,050, após o que as proteínas retidas (PII) foram, então, eluídas com ácido acético 0,1 M. As frações do PII com A₂₈₀ > 0,100

foram reunidas e dialisadas exaustivamente contra água ultrapura. Para obter amostras com elevado grau de pureza, a fração contendo a proteína recombinante obtida após cromatografia de afinidade em matriz de quitina (pico retido eluído com ácido acético 0,1 M) foi dialisada contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, contendo NaCl 0,15 M, e submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em uma matriz de Superdex 75 10/300GL (GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão, acoplada a um sistema de FPLC *ÄKTApurifier 10* (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o tampão de equilíbrio, e durante todo o processo, foram coletadas frações de 500 μ L.

Em todos os processos cromatográficos o fluxo de eluição foi de 1 mL/min e todas as alíquotas foram analisadas por medida da absorbância a 280 nm (A_{280}) em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (ThermoFischer Scientific - Waltham, MA, USA).

6.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e em condições redutoras (PAGE-SDS)

Eletroforeses em géis de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), com os géis montados entre placas de vidro. Os géis de concentração (contendo poliacrilamida em uma concentração final de 3,5%) e de separação (poliacrilamida em concentração final de 15%) foram montados pela mistura dos seguintes componentes:

	Gel de concentração (3,5%)	Gel de separação (15%)
Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8%)	625 μ L	5 mL
Tris-HCl 3 M, pH 8,8	-	1,25 mL
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1,25 mL	-
SDS 10% (m/v)	50 μ L	100 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L
Persulfato de amônio 1,5 mg/mL	250 μ L	500 μ L
Água destilada	2,82 mL	3,15 mL

As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); β -mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)], aquecidas a 100 °C por 7 min, resfriadas a temperatura ambiente e quando não usadas imediatamente, foram armazenadas a -20 °C.

A corrida eletroforética foi realizada a voltagem constante de 120 V em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). Após a corrida, os géis foram corados com solução de Azul Brilhante de Coomassie R-250 0,2% (m/v), preparado em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) ou com *Simply Blue Safe Stain* (Invitrogen), para detecção das bandas de proteínas, e descorados com uma solução de isopropanol 12,5% (v/v), ácido acético 10% (v/v) ou com água (no caso de corado com *Simply Blue Safe Stain*).

Alternativamente, a detecção da quitinase recombinante foi realizada com o *kit InVision His-tag in-gel stain* (Invitrogen), que consiste no reconhecimento da cauda de histidina, presente na proteína recombinante, por um corante fluorescente conjugado ao Ni²⁺ (complexo ácido nitrilotriacético). Após a corrida eletroforética, o gel ficou imerso por 1 h em solução de metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e, em seguida, foi lavado com água ultrapura. O gel foi então mergulhado na solução corante, fornecida pelo fabricante, por mais 1 h, e posteriormente, lavado com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8. A revelação das bandas protéicas se deu por exposição à luz UV, em transiluminador *Vilber Lourmat* (Marne-la-Vallée, France).

6.13 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas solúveis foi determinada usando a metodologia descrita por Bradford (1976). A cada 100 μ L de amostra (diluída ou não) foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford, e a mistura agitada (vortex) e deixada em repouso por 10 min a temperatura ambiente. As leituras de absorbância a 595 nm foram realizadas a seguir, em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (ThermoFischer Scientific - Waltham, MA, USA). A concentração protéica foi estimada utilizando uma curva obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

6.14 Caracterização bioquímica e estrutural da quitinase recombinante

6.14.1 Atividade Quitinásica

A atividade quitinolítica da proteína recombinante rCV2935 produzida em *E. coli* BL21(DE3) e em *Pichia pastoris* KM71H foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por Boller (1985), 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 (MOLANO et al., 1977), pela metodologia descrita por Boller (1992).

As amostras (250 μ L) foram incubadas com quitina coloidal 1% (m/v) (250 μ L) a 37 °C, por 1 h, com agitação constante. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C, em banho-maria, por 5 min. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas (13.000 x g, 15 min, a 25 °C) e o sobrenadante (300 μ L) foi transferido para novo tubo, contendo β -glucuronidase (10 μ L). A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e a reação interrompida por aquecimento (100 °C, 5 min). Em seguida, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 (100 μ L) e tetraborato de potássio 0,6 M (190 μ L) foram adicionados à mistura, que foi novamente aquecida (100 °C, por exatos 5 min). Após resfriamento em banho de gelo, foi adicionada solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído [DMAB 10% (m/v) preparado em ácido acético contendo 12,5% de HCl 11,5 M] diluída 1x em ácido acético PA. A mistura foi incubada a 37 °C por 20 min e, a leitura da absorbância a 585 nm foi realizada. Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação, foi utilizada uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de *N*-acetil-D-glucosamina, variando de 100 a 1.000 μ M (REISSIG et al., 1955). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida por 1 nmol de GlcNAc liberado por 1 mL, por 1 h a 37 °C.

Para avaliar se a quitinase recombinante purificada possuía atividade endo e/ou exoquitinásica, aplicou-se a mesma metodologia, mas na ausência da enzima β -glucuronidase, que foi então substituída por tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2.

6.14.2 Ensaio de atividade quitinásica com substratos sintéticos

O ensaio enzimático com substrato sintético baseia-se na hidrólise de substratos sintéticos por quitinases. Nessa hidrólise, realizada em meio ácido, *p*-nitrofenol é liberado como produto da reação, e o mesmo sofre ionização em pH básico, que é alcançado após a

adição de uma solução básica que interrompe a reação, podendo assim ser mensurado por calorimetria a um comprimento de onda de 405 nm.

Os substratos sintéticos utilizados foram 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo, 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e 4-nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose (Sigma Aldrich), dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, para uma concentração de 1 mg/mL.

O experimento, baseado em um kit de ensaio quitinásico comercial (código CS0980 – Sigma Aldrich), foi realizado em placa de poliestireno de 96 poços, de fundo chato. Amostras purificadas tanto da rCV2935 produzida em *E. coli*, como da produzida por *P. pastoris*, ambas na concentração de 3 mg/mL, em água, foram utilizadas.

Para montagem do ensaio, nos poços foram adicionados 90 μ L de cada substrato e 10 μ L de rCV2935 diluída 5x em água. Como padrão para análise foi utilizada uma solução de carbonato de sódio 0,4 M contendo 10 μ mol de *p*-nitrofenol. Os controles negativos foram 100 μ L de cada substrato. A placa foi então incubada a 37 °C por 30 min e, em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L da solução de carbonato de sódio 0,4 M (solução de parada). Posteriormente, a absorbância das amostras foi lida em aparelho de ELISA a 405 nm.

Os cálculos de atividade enzimática foram feitos utilizando a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(A_{405} \text{ amostra} - A_{405} \text{ branco}) \times 0,05 \times 0,3 \times \text{FD}}{A_{405} \text{ padrão} \times \text{tempo} \times V_{\text{enzima}}}$$

Onde 0,05 representa os μ mol/mL de *p*-nitrofenol na solução padrão; 0,3 é o volume final da reação após adição da solução de parada, em mL; FD é o fator de diluição; Tempo, em min, de incubação a 37 °C e V_{enzima} é o volume de amostra utilizado em mL.

Neste ensaio, uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol de um substrato apropriado por hora, a pH 5,2, a 37 °C.

6.14.3 Ensaio de atividade quitinásica com diferentes substratos

Visando avaliar a atividade quitinásica da quitinase recombinante, produzida em *E. coli* e em *P. pastoris*, frente a diferentes substratos, foi realizado um ensaio enzimático utilizando quitina coloidal, carapaça bruta de caranguejo moída, matriz de carapaça de caranguejo obtida comercialmente (Sigma Aldrich) e quitosana. Todos os substratos testados

foram preparados para uma concentração final de 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2.

As amostras, na concentração de 1 mg/mL, foram diluídas 10 vezes em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 para mensuração da atividade quitinolítica.

O ensaio foi realizado como descrito no item 6.14.1, apenas alterando os substratos, em triplicatas para cada amostra.

6.14.4 Ensaio de atividade quitinásica em gel

Atividade quitinolítica em gel foi realizada como descrito por Trudel e Asselin (1989), com algumas modificações. Para isso, um gel de poliacrilamida 15% foi preparado, substituindo-se o volume de água por etileno-glicol-quitina 0,1% (m/v).

A proteína recombinante purificada (200 µg) foi ressuspendida em 50 µL de tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); azul de bromofenol 0,001% (m/v)], isento de β-mercaptoetanol. Quantidades de 40 e 80 µg da proteína recombinante foram aplicadas no gel.

Após corrida eletroforética, o gel foi imerso em tampão de renaturação (acetato de sódio 50 mM pH 5,0, contendo Triton X-100 1%) e incubado por 24 h, a 37 °C. No dia seguinte, o gel foi lavado 3 vezes com água destilada por 30 s, e, em seguida, foi incubado com solução de Calcoflúor MR 28 0,01% (m/v) em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,9, por 1 h, a 37 °C. Ao final desse período, o gel foi lavado novamente com água destilada e a visualização da atividade quitinolítica foi obtida por exposição à luz UV, em transiluminador *Vilber Lourmat* (Marne-la-Vallée, France), e a imagem foi capturada por um sistema de fotodocumentação acoplado ao equipamento.

6.14.5 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal

A amostra a ser analisada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (PAGE-SDS), como descrito anteriormente (6.11). Em seguida, foi feita a eletrotransferência da banda protéica presente no gel para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), através de um sistema TE 70 *Semidry Transfer Unit* (GE Healthcare). Posteriormente, a membrana foi mergulhada em metanol 100% por alguns segundos, e em seguida, transferida para uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v) em metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v), por alguns min. O descolorimento da membrana

foi realizado em solução de metanol 50% até que as bandas protéicas pudessem ser cortadas. As amostras assim obtidas foram mantidas em água ultrapura até o seqüenciamento.

A sequência de aminoácidos NH₂-terminal da proteína recombinante purificada foi determinada de acordo com o método de degradação de Edman (1950), utilizando-se um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-213A), sob as condições recomendadas pelo fabricante.

6.14.6 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da rCV2935

As amostras das proteínas purificadas (1 mg/mL) foram incubadas em diferentes temperaturas (30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C) durante 30 min, em banho-maria. Após cada tratamento, as amostras foram resfriadas e a atividade quitinolítica residual frente à quitina coloidal foi determinada, como descrito no item 6.14.1.

6.14.7 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV2935

Para se avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática, uma solução da proteína recombinante (1 mg/mL) foi diluída em tampões com diferentes valores de pH (2 a 10), todos na concentração de 50 mM. Os tampões utilizados foram: Glicina-HCl pH 2; Glicina-HCl pH 3; Acetato de sódio pH 4; Acetato de sódio pH 5; Fosfato de sódio pH 6; Fosfato de sódio pH 7; Tris-HCl pH 8; Glicina-NaOH pH 9 e Glicina-NaOH pH 10. Após incubação por 1 h a temperatura ambiente, o ensaio enzimático utilizando quitina coloidal como substrato foi realizado, na presença dos respectivos tampões, como descrito no item 6.14.1.

6.14.8 Efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática da rCV2935

O efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática da quitinase recombinante produzida por *E. coli* foi investigado realizando ensaio com o substrato sintético 4-nitrofenil N,N'-diacetil-β-D-quitobiosídeo, na concentração de 0,2 mg/mL, seguindo o protocolo descrito no item 6.14.2.

Para isso, foram adicionados aos poços, soluções de CuSO₄, NH₄Cl, ZnSO₄, MgCl₂, NiCl, KCl, CaCl₂, MnCl₂, FeSO₄ e BaCl₄ para uma concentração final de 5 mM.

Foram testados também EDTA para uma concentração final de 5 mM, SDS para concentrações finais de 0,5, 1 e 2% e β -mercaptoetanol para concentração final de 0,5%.

A atividade quitinolítica da rCV2935 tratada foi comparada com a atividade do controle, amostra livre de íons e agentes químicos.

6.14.9 Verificação de N-glicosilação na quitinase recombinante produzida por *Pichia pastoris* KM71H

A seqüência deduzida de aminoácidos da quitinase CV2935 (*GenBank*, número de acesso AAQ60603), foi analisada com o uso da ferramenta *NetNGlyc 1.0 Server* (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) para realização de uma busca por sítios putativos para N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr).

Após serem encontrados 5 sítios putativos para N-glicosilação, a comporvação de que esses sítios foram reconhecidos pela levedura e que, portanto, a N-glicosilação de fato ocorreu foi feita por meio de cromatografia em matriz de ConA *Sepharose*, reação de deglicosilação com a enzima N-glicosidade F e revelação de glicoproteínas pelo método de Schiff.

6.14.9.1 Cromatografia de afinidade em matriz de ConA *Sepharose*

Como uma alternativa para comprovar a glicosilação da quitinase recombinante produzida por *P. pastoris*, uma alíquota do pico retido obtido em cromatografia de afinidade em matriz de quitina foi dialisado contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,45, contendo NaCl 0,5 M, centrifugado e o sobrenadante límpido aplicado a uma coluna de ConA *Sepharose* 4B (GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão.

A matriz foi lavada com D-manose 0,2 M, tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e tampão borato 100 mM pH 6,5 para eluição das proteínas que interagiram com a matriz.

O fluxo de eluição da coluna durante todo o procedimento foi de 1 mL/min e todas as alíquotas, recuperadas em um volume de 1 mL, foram analisadas através da medida da absorbância a 280 nm (A_{280}) ao longo de todo processo cromatográfico, para, posteriormente, serem dialisadas contra água ultra pura.

6.14.9.2 Reação de deglicosilação

Amostras purificadas da quitinase recombinante, expressa nos dois sistemas heterólogos, na concentração de 1 mg/mL, foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e SDS 0,1% (p/v) para realização da reação de deglicosilação. Fetuína (Sigma-Aldrich) foi usada como controle positivo, dissolvida no mesmo tampão, para concentração de 1 mg/mL, e tratada da mesma forma.

As amostras (100 µg de proteína recombinante) foram inicialmente aquecidas em banho-maria a 100 °C por 5 min. Em seguida, Triton X-100 foi adicionado para uma concentração final de 1% (v/v). Finalmente, 25 mU da enzima N-glicosidase F recombinante de *Chryseobacterium meningosepticum* (Calbiochem - Merck KGaA, Darmstadt, DEU) foram adicionadas a cada amostra, e a mistura incubada a 37 °C, em banho-maria, por 16 h. A visualização dos produtos da reação se deu por SDS-PAGE, concomitantemente com revelação do gel com reagente de Schiff.

6.14.9.3 Revelação de glicoproteínas pelo método de Schiff

A revelação de glicoproteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Alfenas (1998). Inicialmente, a quitinase recombinante purificada, produzida tanto em *E. coli* como em *P. pastoris*, digerida e não digerida pela N-glicosidase F, foi aplicada em gel de poliacrilamida 15%, sob condições desnaturantes. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de TCA 12% durante 30 min e, posteriormente, em solução de periodato 1% em ácido acético 3%, por 1 h a 25 °C. Em seguida, o gel foi mantido em água destilada por 16 h. Após esse período, o gel foi imerso na solução de Schiff, em ambiente escuro, por 50 min, e finalmente foi descorado com solução de meta-bissulfito de potássio 0,5%.

6.14.10 Espectro de Dicroísmo Circular (CD)

Algumas biomoléculas possuem assimetria molecular, isto é, suas imagens especulares não são idênticas. Tais moléculas são chamadas de quirais. Um dos mais conhecidos exemplos é um átomo de carbono que é tetraedricamente ligado a quatro átomos ou grupos diferentes de átomos. Dessa forma, biomacromoléculas também mostram quiralidade. A interação de uma molécula quiral com a luz polarizada é muito específica e provou ser um método importante para a caracterização tanto de pequenas moléculas como de estruturas macromoleculares. Essencialmente, um tipo de medida comumente feita para determinar os efeitos da luz polarizada em moléculas assimétricas é o dicroísmo circular

(*Circular dichroism*, CD), que é definido como a diferença de absorção da luz circunferencialmente polarizada à esquerda e à direita com compostos opticamente ativos (RANJBAR; GILL, 2009).

Todas as medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão), em cubetas cilíndricas de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. Os espectros foram observados no intervalo de 195-250 nm, sob N₂ constante, e recuperados empregando-se médias de 8 varreduras. Além disso, as contribuições dos tampões obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros foram corrigidos a fim de eliminar qualquer ruído.

Os espectros originais foram tratados com Filtro de Fourier, preservando as bandas típicas de cada espectro e, em todos os casos, os espectros foram transformados em elipticidade molar ($[\theta]$).

Assim, a estabilidade térmica das proteínas produzidas foi avaliada por dicroísmo circular. Amostras das proteínas purificadas, em água, na concentração de 0,2 mg/mL, foram submetidas, por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 e 90 °C, com intervalos de 5 °C.

Já para observar possíveis mudanças conformacionais induzidas por pH do meio, soluções concentradas das proteínas recombinantes foram diluídas, também para concentração de 0,2 mg/mL, nos seguintes tampões Glicina HCl pH 2 e pH 3, Acetato de sódio pH 5, Fosfato de sódio pH 7, Glicina NaOH pH 9 e Fosfato NaOH pH 11, todos na concentração de 50 mM, e incubadas por 30 min antes das medidas.

Para avaliar se a presença de SDS influenciaria alguma mudança conformacional, ou mesmo desnaturação protéica, amostras da proteína foram incubadas com SDS, para uma concentração final de 1%, por 30 min e submetidas às medidas de CD.

6.14.11 Espectro de Fluorescência

Para os ensaios de fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e as medidas foram feitas no fluorímetro ISSK₂ *Multifrequency Phase Fluorimeter*. A quitinase recombinante expressa tanto em *E. coli* como em *P. pastoris* estava na concentração de 0,2 mg/mL, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo NaCl 100 mM, e foi excitada em 280 e 295 nm. Com a finalidade de avaliar o espectro de emissão de fluorescência nativo, a amostra foi monitorada no intervalo de 305 a 450 nm.

Além disso, os espectros de emissão de fluorescência também foram monitorados quando as proteínas estavam diluídas em tampões com diferentes valores de pH, da mesma forma, com excitação em 280 e 295 nm.

6.14.12 Espectrometria de massa

A fim de avaliar se houve alguma modificação na sequência de aminoácidos, amostras purificadas da quitinase recombinante produzida nos dois sistemas heterólogos testados nesse estudo, foram digeridas e submetidas à análise por espectrometria de massa, pela técnica de ionização por eletropulverização (*electrospray*), em espectrômetro *Synapt HDMS ESI-Q-TOF* (Waters).

Inicialmente, 20 μ L de uma solução de NH_4HCO_3 50 mM foram adicionados a 100 μ g da proteína. A mistura foi incubada a 80 °C, por 15 min. Em seguida, foi dado um *spin* nos tubos e adicionados a eles 5 μ L de ditionitrotol (DTT) 100 mM, para abertura da proteína, o que facilita o acesso para alquilação e digestão. Após um *vortex*, o tubo foi colocado em chapa aquecedora a 60 °C. Após incubação de 30 min, o tubo resfriou a temperatura ambiente e novamente foi dado outro *spin*. Então, adicionou-se 5 μ L de iodoacetamida (IAA) 300 mM à mistura, para alquilação das cisteínas, e mais uma vez foi dado um *vortex*. As amostras foram então colocadas em local escuro, a temperatura ambiente, para que a reação de alquilação ocorresse por 30 min. Decorrido esse tempo, 1 μ g da enzima tripsina (Promega) foi adicionado à amostra e a digestão ocorreu em estufa, a 37 °C, por aproximadamente 16 h. Por fim, a amostra foi centrifugada a 13000 x g, por 30 min, a 6 °C, e o sobrenadante foi transferido para frascos apropriados (*Waters Total Recovery vial*; Waters).

6.14.13 Cristalização e difração de raios-X

Amostra da proteína purificada, produzida em *E. coli* e em *P. pastoris*, nas concentrações de 4,5 mg/mL e 20 mg/mL, respectivamente, foi submetida a diferentes condições iniciais de cristalização.

A cristalização foi realizada pelo método de difusão a vapor, utilizando a técnica de gota sentada, em placas de 96 poços (Greiner – Bio-One) a uma temperatura de 18 °C. Cada placa foi preparada pela mistura de 1 μ L da condição com 1 μ L da solução de proteína com equilíbrio 80 μ L da condição. Para *screening* das condições iniciais foram utilizados os kits Classic I, Classic II, PEG I, PEG II, Cryo, MDP (Qiagen) e SaltRX (Hampton Research),

utilizando o sistema robotizado *Cartesian Dispensing Robot Systems* (Genomic Solutions), totalizando 672 condições de cristalização.

Os melhores cristais foram escolhidos, resfriados a 100 K, e submetidos à coleta de dados na linha I04 do *Diamond Light Source* (DLS - UK's National Synchrotron, Oxfordshire, UK). Todos os cristais foram testados em temperatura criogênica (100 K), crioprotetidos com adição de etilenoglicol 20% (v/v) da solução de cristalização a qual o cristal foi obtido. O conjunto de dados foi coletado a um comprimento de onda de 0.97950 Å.

Após a coleta do conjunto de dados, as imagens foram indexadas e integradas com o programa XIA2 e o escalonamento foi realizado com o programa XDS. O número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente foram estimados utilizando-se o programa *Matthews_coeff* do CCP4.

A estrutura tridimensional da proteína em estudo foi determinada por substituição molecular, utilizando o programa Phaser, que também pertence ao pacote CCP4, utilizando como molde a estrutura da quitinase de *Bacillus cereus* Nctu2, com identidade de 43%, depositada no banco de dados PDB (Protein Data Bank – www.pdb.org) sob código de acesso 3N17.

O modelo resultante de substituição molecular foi submetido a um ciclo automático da construção do modelo utilizando o programa AutoBuild do PHENIX e, em seguida, foi refinado com o programa PHENIX (espaço recíproco) intercalando com ajustes manuais do modelo com o mapa de densidade eletrônica utilizando o programa Coot (espaço real).

Por fim, todas as imagens foram produzidas com o programa PyMOL (De Lano Scientific).

6.15 Atividades Biológicas

6.15.1 Atividade antibacteriana

A realização dos ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana foi baseada na norma M7-A6 (Vol. 23 Nº 2, CLSI, 2003) seguindo o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima, de acordo com Baron e colaboradores (1994).

Atividade antibacteriana da proteína recombinante em estudo foi avaliada contra *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 9027. Para isso, amostra purificada, filtrada em filtro 0,22 µm (Milipore), da rCV2935, expressa em *E. coli*, na concentração de 1,1 mg/mL foi utilizada.

Inicialmente, cada microorganismo testado foi cultivado em caldo BHI (*brain heart infusion*) e incubado a 35 °C por 4-6 h. Em seguida, um ajuste da densidade celular, também em caldo BHI, equivalente a escala McFarland 0,5 (1×10^8 UFC/mL) foi realizado. Após esse ajuste, foi realizada uma diluição de 100 vezes do inóculo, mais uma vez em meio BHI, para uma concentração final bacteriana de 1×10^6 UFC/mL.

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação (96 poços) de poliestireno, de fundo chato. Cada poço da placa continha o inóculo (100 µL), o meio de cultura líquido BHI (80 µL) e a solução de rCV2935, para concentrações finais que variaram de 110 a 0,5 µg/mL, considerando o volume final de 200 µL por poço. O controle positivo consistiu do antibiótico amicacina, nas concentrações de 120 a 0,5 µg/mL, e o controle negativo consistiu de água ultrapura estéril. Logo após a micropipetagem, as placas foram tampadas e incubadas a 35 °C por 24 h, sem agitação, em ambiente escuro. Decorrido esse período, foi realizada a observação da placa a olho nu (verificação de turvação visível) e leitura da CIM (concentração inibitória mínima) em leitor de Elisa, nos comprimentos de onda de 492 e 690 nm.

6.15.2 Atividade antifúngica (levedura)

O ensaio com *Candida albicans* ATCC 10231 foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item anterior, com duas modificações: o meio de cultura *Sabouraud* foi utilizado (ao invés de BHI) e o controle positivo consistiu do antifúngico Nistatina, em uma concentração inicial de 10 UI.

6.15.3 Atividade antifúngica (fungos filamentosos)

6.15.3.1 Cultivo dos fungos

Os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*; *Penicillium herquei* e *Rhizoctonia solani* foram cultivados em placas de Petri (100 x 15 mm), contendo 30 mL de meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) estéril. As culturas foram renovadas transferindo-se *pellets* de uma placa contendo o fungo (estoque) para outra contendo somente o meio de cultura. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. As placas inoculadas foram

mantidas em câmara de germinação do tipo BOD a 27 ± 2 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro).

6.15.3.2 *Obtenção da suspensão de conídios*

As suspensões de conídios foram obtidas de acordo com a metodologia estabelecida por Melo e colaboradores (1997), com algumas modificações. Os conídios foram coletados a partir da adição de 10 mL de água destilada estéril sobre o micélio de cada fungo. Para a liberação de conídios, movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados com auxílio de alça de Drigalski. Para a retirada de hifas, as suspensões obtidas foram filtradas em dois panos de nylon de malha fina estéreis. Os conídios foram contados com auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (*Olimpus System Microscope BX 60*). As suspensões foram ajustadas para uma concentração de 2×10^5 conídios/mL.

6.15.3.3 *Ensaio de inibição da germinação de conídios em meio líquido*

O ensaio de inibição da germinação dos conídios em meio líquido foi realizado segundo a metodologia descrita por Broekaert e colaboradores (1990), em placas de microtitulação de poliestireno, de fundo chato com 96 poços. Para montagem do ensaio, nos poços foram adicionados 10 μ L da suspensão de conídios, equivalente a uma quantidade de 2×10^3 conídios, 100 μ L da proteína recombinante rCV2935, expressa em *E. coli*, na concentração de 1 mg/mL, e meio YPD (100 μ L). O controle negativo utilizado foi tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2.

O crescimento fúngico foi monitorado pela leitura da absorbância a 630 nm, em intervalos de 4 h, durante 76 h, em leitor de ELISA (*Biotrack II Plate Reader*, Amersham Biosciences, USA). A avaliação do potencial antifúngico da proteína recombinante foi feita pela análise das curvas de crescimento dos fungos, quando comparadas àquelas dos controles.

6.15.4 *Atividade inseticida*

O efeito da quitinase recombinante rCV2935, expressa em *E. coli*, sobre o crescimento e desenvolvimento do caruncho *C. maculatus* (Fabricius, 1775), foi avaliado em bioensaios. Para tal, as proteínas secretadas pela *E. coli* para o meio de cultura, durante a indução da expressão de rCV2935, foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio (para 95% de saturação) e a fração obtida (F0/95), contendo a proteína recombinante,

foi liofilizada e incorporada em sementes artificiais preparadas com cápsulas de gelatina, como descrito por Leite et al. (2005).

A fração F0/95 foi incorporada em farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) nas concentrações de 0,5, 1,0, e 2,0% (p/p). O controle consistiu de sementes artificiais contendo apenas farinha de feijão-caupi. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três (3) repetições para cada tratamento, com 10 sementes artificiais em cada repetição. As sementes artificiais foram acondicionadas em pequenos potes plásticos com tampa perfurada. Adultos (machos e fêmeas), com até 24 h de emergência de sementes de feijão-caupi, foram colocados em contato com as sementes artificiais para que houvesse a postura dos ovos sobre as mesmas. Os insetos permaneceram em contato com as sementes por uma semana para que todas elas apresentassem seis a oito ovos. Quando necessário, o excesso de ovos foi eliminado com auxílio de um estilete. Durante todo o experimento, os potes foram mantidos a uma temperatura média de 28 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa ambiente (cerca de 70%).

Após o final do período de oviposição, as sementes foram monitoradas diariamente até a emergência dos adultos. Nessa ocasião, o número de adultos emergidos de cada repetição e o dia em que emergiram, em relação ao início da oviposição, foi registrado. O peso de cada adulto emergido também foi determinado. Com esses dados, foram calculados o tempo médio de desenvolvimento e a percentagem de emergência de adultos.

Todos os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GENES, desenvolvido pelo Prof. Cosme Damião Cruz, da Universidade Federal de Viçosa.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Análise *in silico* da seqüência deduzida da CV2935

A ORF CV2935 de *C. violaceum* ATCC 12472 codifica uma quitinase GH18 (AAQ60603), conforme classificação no banco de dados CAZy (CANTAREL et al., 2009). A estrutura primária da proteína codificada tem 439 resíduos de aminoácidos (aa) e um pI predito e massa molecular de 8.9 e 45,7 kDa, respectivamente.

A proteína tem uma estrutura modular (Figura 4), compreendendo um domínio de ligação à quitina tipo 3 de 49 aa (ChtBD3; resíduos de 26 a 74) na região N-terminal, seguido por um *linker* rico em prolina/treonina/glicina (resíduos de 75-106) e um domínio catalítico constituído por 310 aa (CatD GH18; resíduos de 107 a 416), na região C-terminal. Um peptídeo sinal (resíduos 1 a 23) no N-terminal também foi predito pelo software *SignalP*, sugerindo que a proteína codificada pela ORF CV2935 é sintetizada como uma pré-proteína, presumivelmente alvo para a via secretória (Sec) de *C. violaceum*. A proteína é aqui referida como CvChi45 (para precursor da quitinase, de 45 kDa, de *C. violaceum*).

Figura 4 - Estrutura modular da quitinase CV2935 de *Chromobacterium violaceum*



A estrutura primária da proteína codificada tem 439 resíduos de aminoácidos (aa), compreendendo um domínio de ligação à quitina de 49 aa (em amarelo; resíduos de 26 a 74) na região N-terminal, seguido por um *linker* rico em prolina/treonina/glicina (em rosa; resíduos de 75-106) e um domínio catalítico constituído por 310 aa (em azul turquesa; resíduos de 107 a 416), na região C-terminal. Um peptídeo sinal (sublinhado; resíduos 1 a 23) no N-terminal também foi predito pelo software *SignalP*.

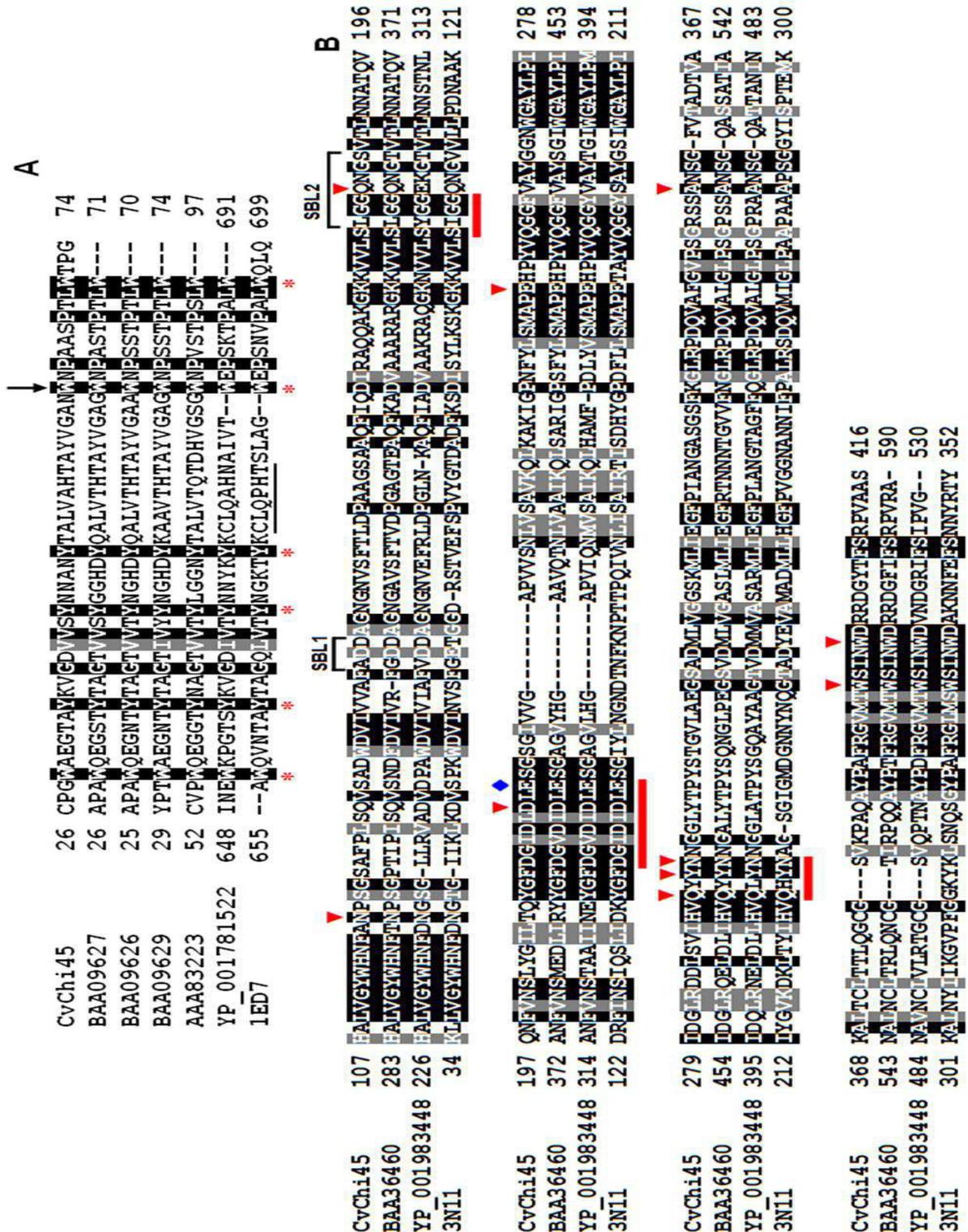
Buscas nos bancos de dados CDD, Smart e Pfam revelaram que o domínio de ligação à quitina (ChBD – *chitin binding domain*) de CvChi45 (ChBD_{CvChi45}) é de tipo 3 (ChtBD3), pertencente à família 12 de módulos de ligação à carboidratos (CBM12) na classificação CAZy. Já análise no banco de dados de proteínas utilizando a ferramenta

BLAST (NCBI) demonstrou elevada similaridade de ChBD_{CvChi45} com diversos domínios de ligação à quitina de origem bacteriana, tais como aqueles encontrados em três quitinases de *Aeromonas* sp. 10S-24 (59,0%, 61,3% e 63,6%, de identidade, respectivamente) (SHIRO et al., 1996), para ChBD de uma quitinase de *Janthinobacterium lividum* (54,5% de identidade) (GLEAVE et al., 1995) e para uma proteína de ligação a carboidrato de *Clostridium botulinum* B1 estirpe Okra (52,2% de identidade) (SMITH et al., 2007) (Figura 5-A).

Os domínios de ligação à quitina (ChtBD) ocorrem frequentemente como módulos acessórios em quitinases, e três tipos de tais domínios não catalíticos foram reconhecidos: ChtBD1 e ChtBD2 e ChtBD3 (HENRISSAT, 1999). A superfamília ChtBD3 inclui módulos de aproximadamente 40-60 resíduos que se ligam a celulose e/ou quitina, e que compreendem as famílias CBM5 e CBM12 da classificação CAZy. Uma característica desse tipo de ChBD é a presença de seis resíduos aromáticos conservados (correspondentes a Trp²⁹, Tyr³⁵, Tyr⁴³, Tyr⁴⁸, Trp⁶² e Trp⁷¹ na estrutura primária de CvChi45; Figura 5-A), bem como três resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas (Val⁴¹, Ala⁵⁰ e Leu⁷⁰ na seqüência de aminoácidos de CvChi45) que, acredita-se, serem importantes na determinação da estrutura do domínio e na ligação à quitina. Por exemplo, o ChBD da quitinase A1 de *Bacillus circulans* WL-12 (ChBD_{ChiA1}) tem uma estrutura globular e compacta, com a topologia de “sanduíche-β” trançado, contendo duas folhas-β antiparalelas, que são compostas de três e duas fitas, respectivamente, e um *core* formado por resíduos aromáticos e hidrofóbicos (IKEGAMI et al., 2000). Os cinco resíduos aromáticos (Trp⁶⁵⁶, Tyr⁶⁶², Tyr⁶⁷⁰, Tyr⁶⁷⁵ e Trp⁶⁹⁶) e os três resíduos hidrofóbicos (Val⁶⁶⁸, Cys⁶⁷⁷, e Leu⁶⁹⁵) que contribuem para o *core* de ChBD_{ChiA1} são conservados no ChBD_{CvChi45}, exceto que Cys⁶⁷⁷ é substituído por Ala⁵⁰ (na CvChi45). O sexto resíduo aromático conservado em ChBD_{ChiA1}, Trp⁶⁸⁷ (correspondente a Trp⁶² na estrutura primária de CvChi45) está localizado na superfície da proteína, onde ele tem um papel importante na ligação ao substrato, provavelmente mediada por interações hidrofóbicas de empilhamento com os anéis de piranose do substrato, como sugerido por ensaios de ligação e dados de mutagênese (HASHIMOTO ET AL, 2000;. FERRANDON ET AL, 2003;. HARDT; LAINE, 2004).

Além disso, os ChtBD3s tem sido ainda subdivididos nos grupos A e B: grupo A tem um motivo stWWst (s para um resíduo de cadeia lateral pequeno e t para um resíduo *turn-like*, respectivamente), que é ausente no grupo B (BRUN et al, 1997) . No ChBD_{CvChi45} este motivo está ausente, sendo então substituído pela seqüência de ⁵⁰ALVAHT⁵⁵ (Figura 5-A) e, portanto, ele é classificado como um ChtBD3 do grupo B.

Figura 5 – Alinhamento múltiplo da CV2935 com seqüências de aminoácidos de diferentes quitinasas e outras proteínas relacionadas disponíveis em bancos de dados



(A) Alinhamento da região codificadora do domínio de ligação à quitina de CV2935 com seqüências de quitinasas de *Aeromonas* sp (BAA09627, BAA09626, BAA09629), proteína que se liga a carboidrato de *Clostridium botulinum* B1 (YP_001781522), quitinase de *Janthinobacterium lividum* e quitinase de *Bacillus circulans* WL-12 (1ED7). (B) Alinhamento do domínio catalítico de CvChi45 com os domínios quitinolíticos encontrados em quitinasas de *Xanthomonas* sp. AK (BAA36460), *Cellvibrio japonicus* (YP_001983448) e de *Bacillus cereus* (3N11).

O ChBD_{CvChi45} está conectado ao domínio catalítico (CatD) por uma seqüência de 31 resíduos rica em prolina, treonina e glicina (Figura 4). Em GHs bacterianas modulares, como celulasas, xilanases e quitinases, segmentos desordenados, e flexíveis, ricos em prolina e resíduos de hidroxiaminoácidos (serina e treonina), bem como alanina e glicina, que são chamados *PT-rich linkers*, são comumente encontrados conectando o domínio de ligação ao substrato, não catalítico, com o domínio enzimático (RABINOVICH et al, 2002;. GILKES et al 1991).

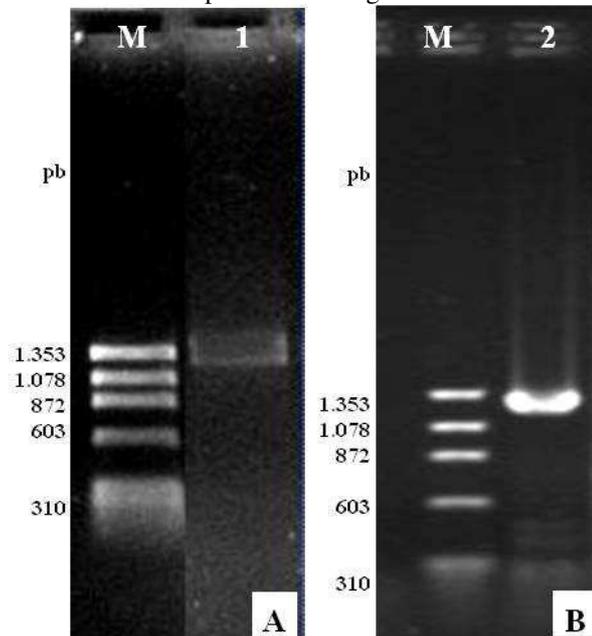
O domínio catalítico de CvChi45 (CatD_{CvChi45}), ilustrado nas figuras 4 e 5-B, compreende cerca de 2/3 da proteína codificada, no qual o padrão de “assinatura” do sítio ativo das quitinases pertencentes à família GH18 (seqüência consenso: [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-x-E) corresponde ao segmento ²¹²FDGIDL²²⁰DLE. Três motivos consensos conservados nos domínios catalíticos de todas as quitinases GH18 são encontrados no CatD_{CvChi45} (Figura 5-B). Esses motivos estruturais estão envolvidos na ligação ao substrato (¹⁸⁰SxGG¹⁸³) e na catálise (²¹³DxxDxDxE²²⁰ e ²⁹²QXYN²⁹⁵; esses números referem-se a seqüência de aminoácidos de CvChi45), respectivamente (PERRAKIS ET AL, 1994;. SYNSTAD et al, 2004; VAAJE-KOLSTAD et al., 2004).

O domínio catalítico de CvChi45 mostrou valores de identidades elevadas com os domínios quitinolíticos encontrados em quitinases de *Xanthomonas* sp. AK (SAKKA et al., 1998), *Cellvibrio japonicus* Ueda107 (DEBOY et al., 2008) e de diferentes cepas de *Vibrio cholerae*, como ilustrado na Figura 5-B.

7.2 Amplificação da ORF CV2935

O resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada com os iniciadores específicos para a ORF CV2935, completa e sem os nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal, para posterior clonagem em *Escherihcia coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente, utilizando como molde o DNA genômico de *C. violaceum*, pode ser observado na eletroforese em gel de agarose 1,0 % evidenciada na Figura 6 (A, B). Foi observada a especificidade da banda para ambos os produtos amplificados nas temperaturas de 65 °C (utilizando iniciadores destinados à clonagem em *E. coli*) e 68 °C (utilizando iniciadores destinados à clonagem em *P. pastoris*). As bandas observadas, de tamanho aproximado a 1.320 pb e 1.248 pb, estão coerentes com o tamanho da ORF CV2935 completa e da ORF CV2935 sem a região codificadora do peptídeo sinal, respectivamente, de acordo com a seqüência que foi depositada no banco de dados *GenBank*.

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos da amplificação por PCR da ORF CV2935 a partir do DNA genômico de *C. violaceum*



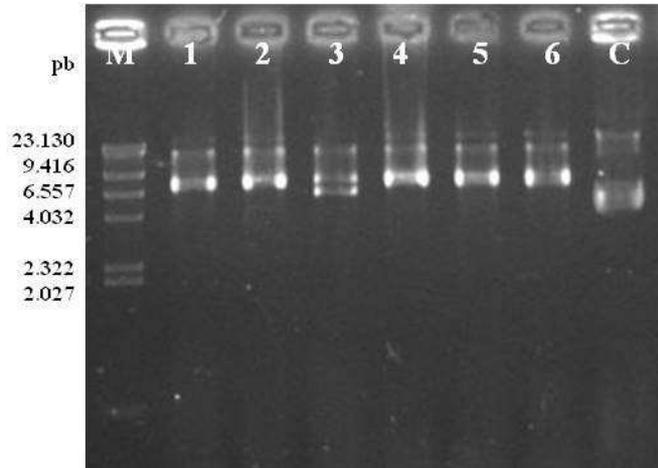
Foram utilizadas as temperaturas de anelamento de 65 e 68 °C, para amplificação da seqüência completa (A) e da seqüência sem a região codificadora do peptídeo sinal (B), para clonagem em *E. coli* e *P. pastoris*, respectivamente. Os poços M contém 300 ng do marcador ϕ -X174 RF DNA/*Hae*III Fragments (Biolabs).

7.3 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pET303/CT-His

Após a confirmação da amplificação específica dos produtos desejados, reações de PCR em quintuplicata foram realizadas a fim de obter uma quantidade satisfatória de produto para digestão e posterior inserção no vetor pET303/CT-His. Dessa forma, produtos de PCR purificados e o plasmídeo pET303/CT-His foram digeridos com as enzimas *Xho*I e *Xba*I e posteriormente foi realizada a reação de ligação com a enzima T₄ DNA ligase. Em placas de meio LB ágar (contendo carbenicilina 100 μ g/mL e estreptomicina 30 μ g/mL) inoculadas com os produtos eletroporados com as reações de ligação, foi observado o aparecimento de colônias de *E. coli* TOP10F' possivelmente transformadas. Assim sendo, foram selecionadas 6 colônias para a extração de DNA plasmidial e verificação da transformação. A Figura 7 mostra a eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídios extraídos das colônias selecionadas. Para confirmação da transformação, reações de PCR com os iniciadores específicos para a ORF CV2935 e digestão com as enzimas *Xho*I e *Xba*I dos plasmídios pET-CV2935 foram realizadas. Os resultados estão mostrados nas Figuras 8-A e 8-B, respectivamente. Houve a amplificação de uma banda correspondente a 1.320 pb em todos os

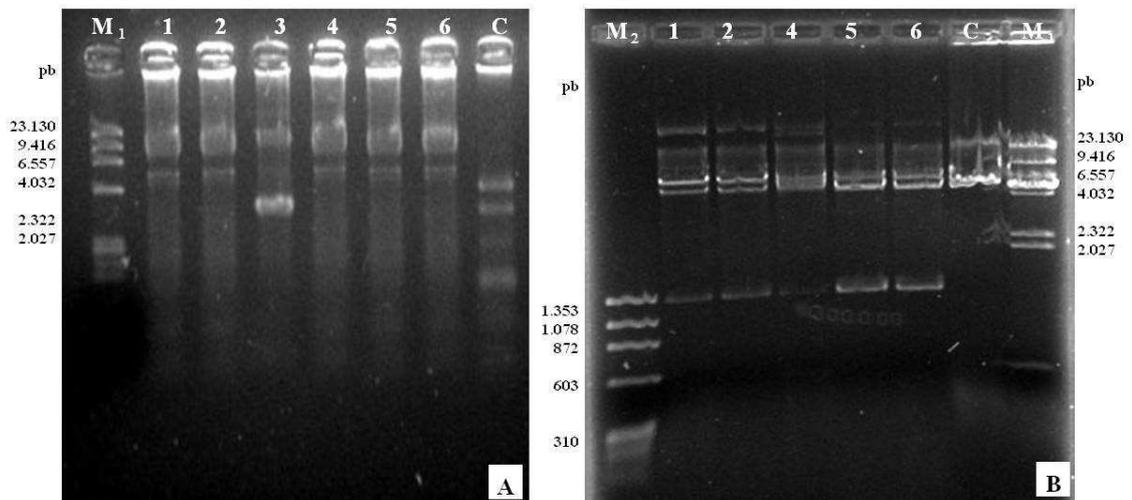
clones, com exceção do clone 3. Assim sendo, os clones 1, 2, 4, 5 e 6 foram digeridos e todos apresentaram um produto liberado do vetor de tamanho coerente para a ORF CV2935 (1.320 pb).

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídios extraídos pET303/CT-His :: CV2935 de células de *E. coli* TOP10F'



O poço M contém 300 ng do marcador λ DNA/Hind III Fragments (BioLabs) e os poços 1 a 6 contém cerca de 2 μ g dos plasmídios pET303/CT-His :: CV2935 extraídos dos clones 1 a 6, respectivamente. O poço C contém 2 μ g do plasmídio pET303/CT-His íntegro.

Figura 8 – Experimentos para confirmação da clonagem em pET303/CT-His



(A) Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR amplificados a partir de plasmídios pET303::CV2935 purificados de *E. coli* TOP10F', realizada com os iniciadores específicos para a sequência codificadora da quitinase de *C. violaceum*. Os poços 1 a 6 contém 5 μ L das reações dos clones 1 a 6, respectivamente. O poço C contém 5 μ L da reação com o plasmídio íntegro. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de digestão obtidos a partir de plasmídios pET303::CV2935 purificados de *E. coli* TOP10F', realizada com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I. Os poços 1 a 6 contém 10 μ L das reações dos clones 1, 2, 4, 5 e 6, respectivamente. O poço C contém o produto da digestão do plasmídio pET303/CT-His íntegro. O poço M₁ contém 300 ng do marcador λ DNA/Hind III Fragments (BioLabs) e M₂ contém 300 ng do marcador ϕ X174 DNA/*Hae* III Fragments.

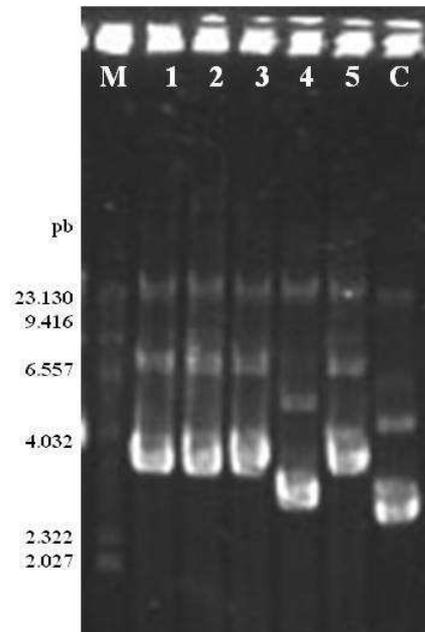
Com esses resultados da confirmação, uma solução de 50 ng de plasmídio pET-CV2935, do clone 5, foram eletroporados em células de *E. coli* BL21(DE3) para expressão da proteína recombinante.

7.4 Clonagem da ORF CV2935 no vetor de expressão pPICZ α A

Mais uma vez, foram realizadas reações de PCR em quintuplicata a fim de obter uma quantidade satisfatória de produto para digestão e posterior inserção no vetor pPICZ α A. Em seguida, produtos de PCR purificados e o plasmídio pPICZ α A foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* e, posteriormente, foi realizada a reação de ligação com a enzima T₄ DNA ligase. Foi observado, em placas de meio LB *low salt* ágar (contendo zeocina 25 μ g/mL) inoculadas com os produtos eletroporados com as reações de ligação, o aparecimento de colônias de *E. coli* TOP10F' possivelmente transformadas. Assim sendo, foram selecionadas 5 colônias para a extração de DNA plasmidial e verificação da transformação. A Figura 9 mostra a eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídios extraídos das colônias selecionadas. Para confirmação da transformação, reações de PCR com os iniciadores específicos para a ORF CV2935, sem a região codificadora do peptídeo sinal, e digestão com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* dos plasmídios pPIC-CV2935 foram realizadas, e os resultados estão mostrados nas Figuras 10-A e 10-B, respectivamente. A amplificação de uma banda correspondente a 1.248 pb é observada em todos os clones, com exceção do clone 4. Assim, todos os clones foram submetidos à reação de digestão e, com exceção do clone 4, como esperado diante do resultado obtido com a reação de PCR, todos outros apresentaram um produto liberado do vetor de tamanho coerente para a ORF CV2935 (1.248 pb) e outro coerente para o plasmídio pPICZ α A (3.600 pb).

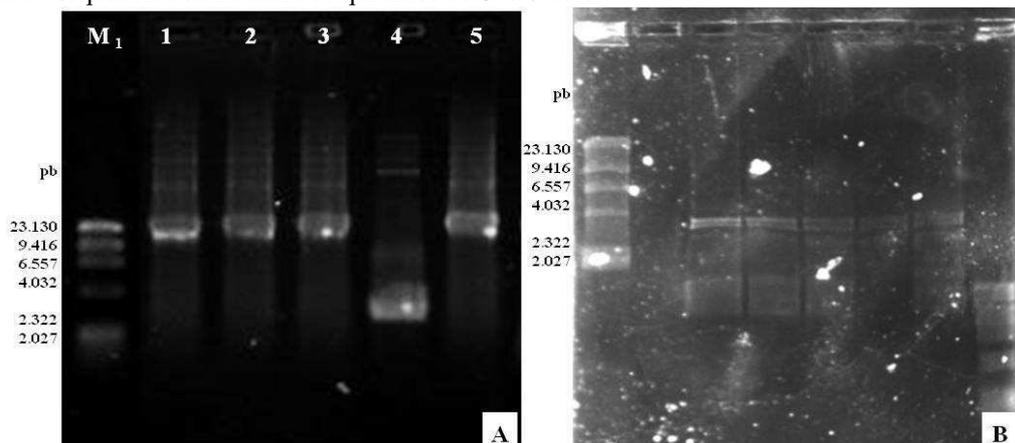
Para prosseguir com a transformação de células de *Pichia pastoris*, o clone 1 foi cultivado em meio LB *low salt* (contendo zeocina 25 μ g/mL) para extração de DNA plasmidial em larga escala (midiprep), visto que é necessária uma quantidade maior (10 μ g) de plasmídio recombinante para as etapas seguintes da clonagem.

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pPICZ α A :: CV2935 extraídos de células de *E. coli* TOP10F'



O poço M contém 300 ng do marcador λ DNA/Hind III *Fragments* (BioLabs) e os poços 1 a 5 contém cerca de 2 μ g dos plasmídios pPICZ α A:: CV2935 extraídos dos clones 1 a 5, respectivamente. O poço C contém 2 μ g do plasmídio pPICZ α A íntegro.

Figura 10 – Experimentos de confirmação da transformação da clonagem em pPICZ α A. (A) Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR amplificados a partir de plasmídios pPICZ α A::CV2935 purificados de *E. coli* TOP10F', realizada com os iniciadores específicos para a seqüência codificadora da quitinase de *C. violaceum*



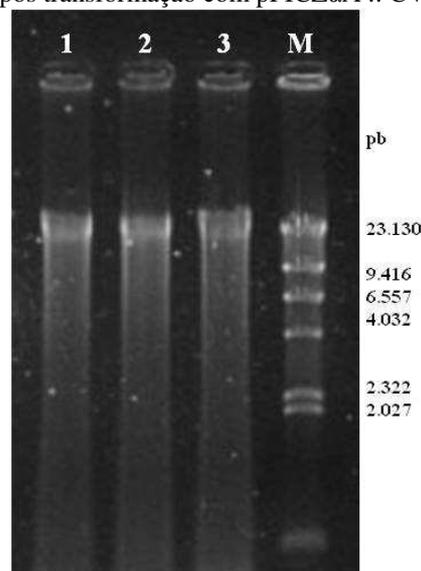
Os poços 1 a 5 contém 5 μ L das reações dos clones 1 a 5, respectivamente. O poço C contém 5 μ L da reação com o plasmídio íntegro. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de digestão obtidos a partir de plasmídios pPICZ α A::CV2935 purificados de *E. coli* TOP10F', realizada com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Xba*I. Os poços 1 a 5 contém 10 μ L das reações dos clones 1 a 5, respectivamente. O poço M₁ contém 300 ng do marcador λ DNA/Hind III *Fragments* (BioLabs) e M₂ contém 300 ng do marcador ϕ X174 DNA/*Hae* III *Fragments*.

7.5 Confirmação da transformação de células de *Pichia pastoris* KM71H, com o vetor recombinante pPICZ α A-CV2935

Em placas de meio YPDS ágar (contendo zeocina 300 μ g/mL) inoculadas com os produtos da eletroporação do vetor recombinante linearizado foi observado o aparecimento de colônias de *P. pastoris* possivelmente transformadas. A utilização do antibiótico em uma concentração elevada para a seleção de colônias putativamente recombinantes se deu tendo em vista que, quanto maior a resistência ao antibiótico, maior a probabilidade de que um número maior de cópias do plasmídeo recombinante tenha sido integrado ao DNA genômico da levedura.

A extração do DNA genômico de 3 colônias escolhidas ao acaso foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 11). A extração e integridade do DNA genômico dos 3 clones de *P. pastoris* KM71H foram confirmados pela presença de uma única banda, de altura elevada (próxima a primeira banda do marcador que corresponde a 23.000 pb), visualizada no gel. Além disso, é possível perceber que o rendimento da extração de DNA genômico de *P. pastoris* foi satisfatório, devido à intensidade da banda referente ao DNA extraído.

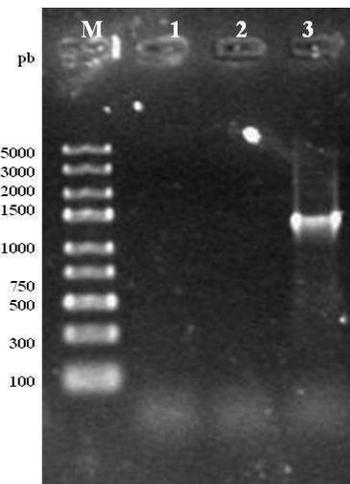
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA genômico de *Pichia pastoris* KM71H após transformação com pPICZ α A :: CV2935



Os poços 1 a 3, contém cerca de 3 μ g de DNA genômico extraídos dos clones 1 a 3, respectivamente. O poço M contém 300 ng do marcador λ DNA/Hind III *Fragments* (BioLabs)

O resultado da confirmação da integração do vetor recombinante do DNA genômico de *P. pastoris* KM71H, por meio de reação de PCR, está representando na Figura 12. Houve amplificação de uma banda correspondente a 1.338 pb para a amostra do clone 3, tamanho esperado para o produto da amplificação utilizando os iniciadores α -factor e CV2935Pichia-rev, uma vez que o *primer* senso utilizado (α -factor) anela em uma porção do plasmídio pPICZ α A, anterior a região do inserto. O clone 3 foi o único cuja a transformação foi confirmada, e por esse motivo, utilizado na etapa de indução da expressão da proteína recombinante.

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizada com os iniciadores α -factor e CV2935Pichia-rev utilizando como molde DNA genômico de *Pichia pastoris* KM71H :: PICZ α A::CV293



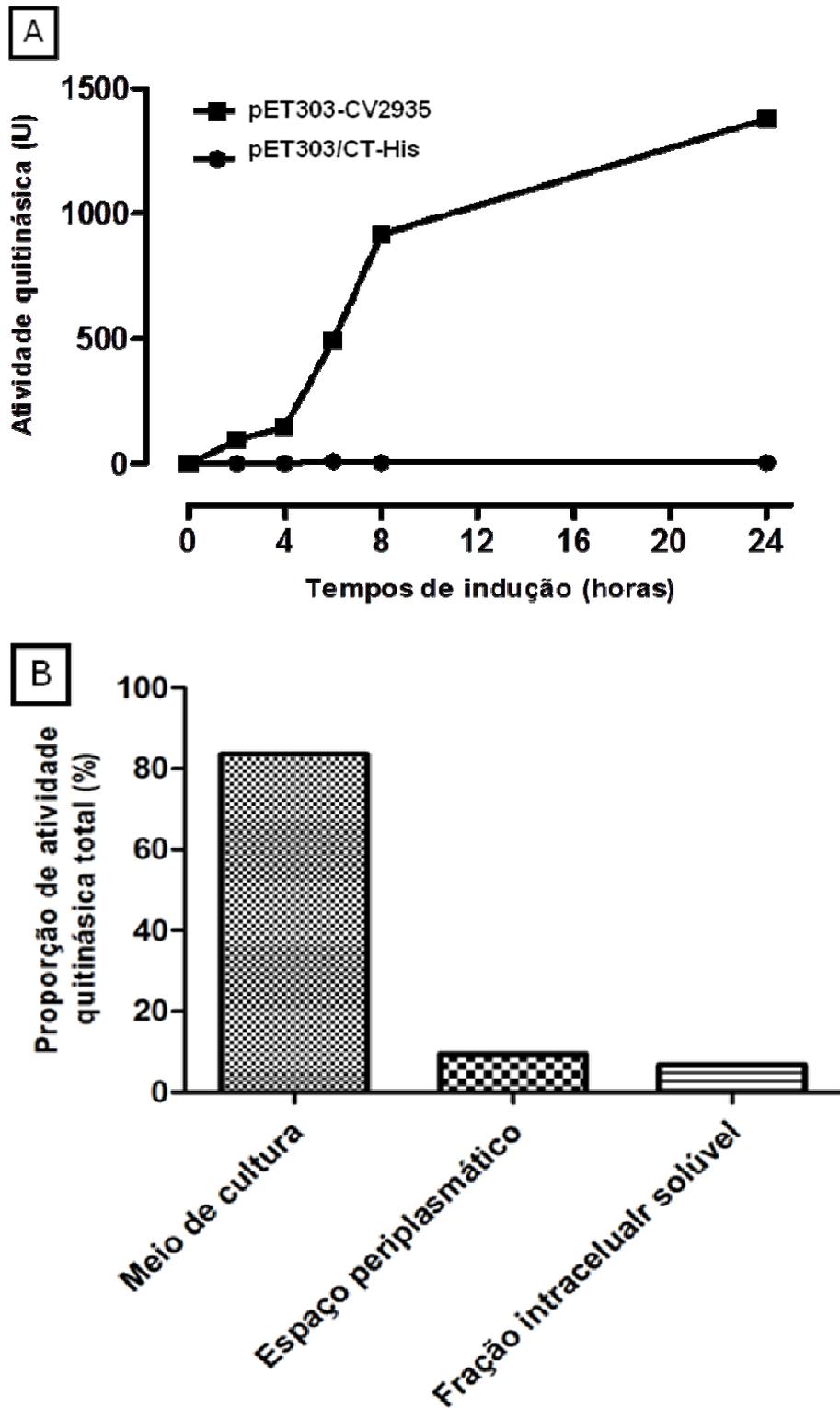
Os poços 1 a 3 contém 5 μ L de reação de PCR dos clones 1 a 3, respectivamente. O poço M contém 400 ng do marcador *GeneRuler™ Express DNA Ladder* (Fermentas).

7.6 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em *Escherichia coli*

A indução da expressão da quitinase recombinante em células de *E. coli* BL21 (DE3) foi realizada com um clone escolhido de forma aleatória. A indução da expressão, como já realizada por Lobo (2009), foi conduzida a 37 °C, sob agitação constante, com a adição de IPTG 500 mM para uma concentração final de 0,5 mM. A coleta do sobrenadante foi realizada após 24 horas de indução.

Como esperado, a quitinase rCV2935 foi detectada no meio de cultura livre de células. É possível observar na Figura 13-A, por meio de ensaio enzimático utilizando quitina coloidal como substrato, que a atividade quitinásica presente no meio de cultura aumenta com

Figura 13 – Eficiência da secreção da rCV2935



(A) Atividade quitinásica, expressa em nmol de GlcNAc liberado por mL por hora, detectada na fração 0/95 do meio de cultura livre de células, portando plasmídeo recombinante e não-recombinante, nos tempos de coleta 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. (B) Gráfico que ilustra a eficiência da secreção da quitinase rCV2935 produzida em *E. coli*, demonstrando a atividade quitinásica mensurada nas diferentes frações celulares.

o passar das horas da indução, o que confirma a produção e secreção da proteína recombinante na sua forma funcional.

A Figura 13-B ilustra a eficiência do peptídeo sinal intrínseco da proteína na secreção da mesma pela célula hospedeira [*E. coli* BL21(DE3)]. A atividade quitinolítica detectada no meio extracelular é cerca de 10 vezes maior do que a detectada na fração celular periplasmática e na fração celular solúvel.

Bruberg e colaboradores (1995) clonaram e expressaram um gene que codifica uma quitinase de *Serratia marcescens* em *E. coli* e em outra estirpe de *S. marcescens*. A localização celular da quitinase foi estudada utilizando dois métodos de fracionamento celular (choque osmótico e esferoplasto) e técnicas imunocitoquímicas. Essas análises mostraram que a quitinase localizava-se no citoplasma da *E. coli*, enquanto que em *S. marcescens* ela era exportada para o periplasma. A análise de atividade enzimática da quitinase isolada de frações periplasmáticas de *S. marcescens* portando o gene clonado mostrou que a exportação da enzima não é acompanhada de processamento N-terminal. A quitinase não mostrou nenhuma das características que têm sido propostas que direcionam a exportação de outras proteínas extracelulares não-processadas, como a hemolisina de *E. coli* e pode portanto ser secretada por um mecanismo até então desconhecido. Além disso, como demoraram vários dias para *E. coli* produzir um halo de degradação da quitina, os autores suspeitaram de que a atividade quitinolítica extracelular poderia ser devido à lise das células, ao invés de secreção da quitinase recombinante.

Bactérias gram-negativas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, produzem muitas proteínas que são exteriorizadas para o ambiente extracelular através das vias de secreção I, II e III. Folders e colaboradores (2001) identificaram um gene (*Chic*) que codifica para uma enzima quitinolítica extracelular. O gene codifica uma cadeia polipeptídica de 483 resíduos de aminoácidos, sem uma seqüência N-terminal típica. No entanto, um segmento N-terminal de 11 resíduos foi encontrado como sendo clivado após a secreção da proteína. A proteína identificada apresenta similaridade com quitinases secretadas de *Serratia marcescens*, de *Vibrio harveyi* e de *Bacillus circulans*, e consiste em um domínio catalítico e um domínio de ligação à quitina, que são separados por um domínio de fibronectina tipo III. Após 24 horas de crescimento, a maior parte da quitinase produzida foi encontrada no meio intracelular, enquanto que apenas pequenas quantidades foram detectadas no meio de cultura. No entanto, depois de vários dias de indução, uma grande quantidade de quitinase intracelular foi quase esgotada, e a proteína foi, então, encontrada no meio de cultura.

O gene que codifica uma quitinase (ChiaA) de *Xanthomonas* sp estripe AK foi clonado em *E. coli* e sua seqüência de nucleotídeos foi determinada. A seqüência deduzida de ChiaA mostrou que se tratava de uma enzima composta de um peptídeo sinal localizado na porção N-terminal e quatro domínios na seguinte ordem: um domínio de ligação de quitina; dois domínios de fibronectina tipo III; e um domínio catalítico típico da família GH18. Após a expressão da proteína recombinante e determinação da seqüência N-terminal, foi observado que a seqüência encontrada correspondia ao 25º resíduo de aminoácido em diante, indicando que a seqüência N-terminal dos 24 aminoácidos iniciais era de fato um peptídeo sinal, que foi reconhecido pela célula hospedeira, clivado, sendo a enzima recombinante secretada para o espaço periplasmático (SAKKA et al., 1998).

Uma quitinase de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (Chia-HD73), foi, também secretada, pela bactéria recombinante (*E. coli* DH5 α F) utilizando seu peptídeo sinal nativo. Ensaios com quitoligosacarídeos fluorogênicos [4-MU-GlcNAc, 4-MU (GlcNAc)₂ 4-MU-(GlcNAc)₃] mostraram que a Chia-HD73 apresentou maior atividade hidrolítica contra o derivado tetramérico, indicando que Chia-HD73 atua, principalmente, como uma endoquitinase (BARBOZA-CORONA et al., 2008).

Ghasemi e colaboradores (2011) produziram duas quitinases recombinantes de *Bacillus pumilus* SG2, que, em sua forma nativa, são secretadas para o meio extracelular. Porém, os autores amplificaram por PCR e clonaram apenas a região codificadora das proteínas, sem a região dos peptídeos sinais, e, dessa forma, as proteínas recombinantes expressas por 4 horas, induzidas com IPTG em uma concentração final de 1 mM, ficaram retidas no citoplasma de *E. coli* M15.

O gene *chi*, que codifica para uma quitinase da família GH18 da bactéria gram-positiva *Bacillus licheniformis* DSM13 (ATCC 14580) foi clonado em vetores induzíveis para expressão em lactobacilos e então produzida em *Lactobacillus plantarum* WCFS1. No entanto, foi visto que tanto a construção que continha apenas a região codificadora da proteína como a construção com a seqüência completa contendo o peptídeo sinal original resultaram em produção intracelular da proteína recombinante, não sendo detectada nenhuma atividade quitinolítica no meio de cultura. Os autores sugeriram que o tamanho da quitinase expressa (65 kDa) teria sido uma das razões para que não houvesse a secreção. Além disso, a produção global da quitinase recombinante nesse estudo foi relativamente baixa, e se a eficiência da secreção foi baixa, não foi possível detectar atividade quitinásica no sobrenadante (NGUYEN et al., 2012).

A secreção de proteínas recombinantes para o meio de cultura ou periplasma de *E. coli* tem muitas vantagens sobre a produção intracelular. Algumas dessas vantagens incluem maior estabilidade do produto e solubilidade, provavelmente devido aos níveis mais baixos de proteases de *E. coli* que podem ser encontradas nesses locais, aumento da atividade biológica e autenticidade do N-terminal da proteína expressa porque muitas vezes envolve a clivagem de uma seqüência sinal. Além disso, facilitar a purificação de proteínas recombinantes tendo em vista a presença de menos proteínas contaminantes nestes locais (CHOI et al 2000; MERGULHÃO et al, 2005).

Os peptídeos sinais bacterianos normalmente consistem de 15-30 resíduos de aminoácidos e todos compartilham uma característica estrutural comuns: um domínio hidrofóbico (domínio H) de cerca de 10-20 aminoácidos, que pode ser precedido por um curto domínio de cerca de 2 a 10 aminoácidos carregados positivamente (domínio N); em geral, as seqüências sinais são ricas em aminoácidos hidrofóbicos, tais como alanina, valina e leucina, um recurso essencial para a secreção das proteínas no periplasma de *E. coli*; o sítio de clivagem (domínio C) é geralmente menos hidrofóbico, contém uma seqüência reconhecida pela peptidase sinal, e conforme a regra -3, 1, ou seja, o resíduo na posição -1 deve ter uma cadeia lateral pequena e neutra, como é o caso da alanina, glicina, e serina, e isso também vale para o resíduo na posição -3; alanina é mais freqüentemente encontrada nas posições -1 e -3, formando a seqüência Ala-Ala-X, que é reconhecida e clivada pela peptidase sinal I (PUGSLEY 1993, CHOI; LEE, 2004).

Embora a secreção de proteínas em *E. coli* seja um processo complexo, os mecanismos mais utilizados para secreção de proteínas recombinantes, bem como proteínas nativas, são os do tipo I e tipo II, que são maquinarias que envolvem muitas proteínas, tais como HlyB, HlyD e Tolc, para o tipo I, e muitas vias, como via de secreção dependente de SecB, partícula de reconhecimento do sinal (SRP) e da translocação *twin*-arginina (TAT), para o tipo II. Porém, é comum encontrar, na literatura, autores que sugerem que o mecanismo pelo qual proteínas recombinantes são secretadas para o meio de cultura é devido ao “vazamento” do conteúdo periplasmático.

Especula-se que a via utilizada para a secreção da proteína recombinante rCV2935 na hospedeira *E. coli* foi a via de tipo II. O sistema de secreção tipo II é o mais complexo e apresenta um maior grau de especificidade das espécies e especificidade da proteína secretada que o sistema tipo I. O transporte de proteínas recombinantes através do periplasma é realizado através do sistema de secreção de *E. coli*, e, presumivelmente, existem sistemas homólogos em outras bactérias gram-negativas. Em muitas proteínas, a fusão de uma

seqüência sinal procariótica é suficiente para promover sua translocação através da membrana citoplasmática no periplasma com a remoção concomitante da seqüência sinal (SANDKVIST; BAGDASARIAN, 1996). No caso da rCV2935, não foi necessária a fusão de uma seqüência sinal, visto que ela já é uma proteína oriunda de um organismo procariótico e Gram-negativo (*C. violaceum*) que possui peptídeo sinal próprio.

Takahara et al. (1984) mostraram, pela primeira vez, que o híbrido de enzimas pré-formadas pela fusão do peptídeo sinal da proteína OmpA, de *Escherichia coli*, com a nuclease A estafilocócica, uma proteína secretada pelo *Staphylococcus aureus*, foi translocado através da membrana citoplasmática de *E. coli* e secretado no espaço periplasmático concomitante com clivagem do peptídeo sinal.

Hoje em dia, muitos peptídeos sinais, originados de organismos diferentes, estão sendo usados para a secreção eficiente de proteínas recombinantes em *E. coli*, podendo citar como exemplo OmpA (BARTHELEMY et al., 1993), PelB (LUCIC et al. 1998), OmpF (SHIBUI et al., 1991), LamB (KLEIN et al. 1992) e endoxilanase (LEE et al., 2000). No entanto, a presença de um peptídeo sinal não é sempre uma garantia da secreção de proteínas recombinantes de forma eficiente, principalmente para o meio de cultura. Muitos fatores atuam para isso, como o estresse do hospedeiro, a própria seqüência sinal, e do tipo de proteína desejada a ser secretada. Não há regra universal na escolha de um peptídeo sinal adequado que garanta a secreção de determinada proteína recombinante, isso deve ser examinado em uma abordagem do tipo tentativa e erro (CHOI; LEE, 2004).

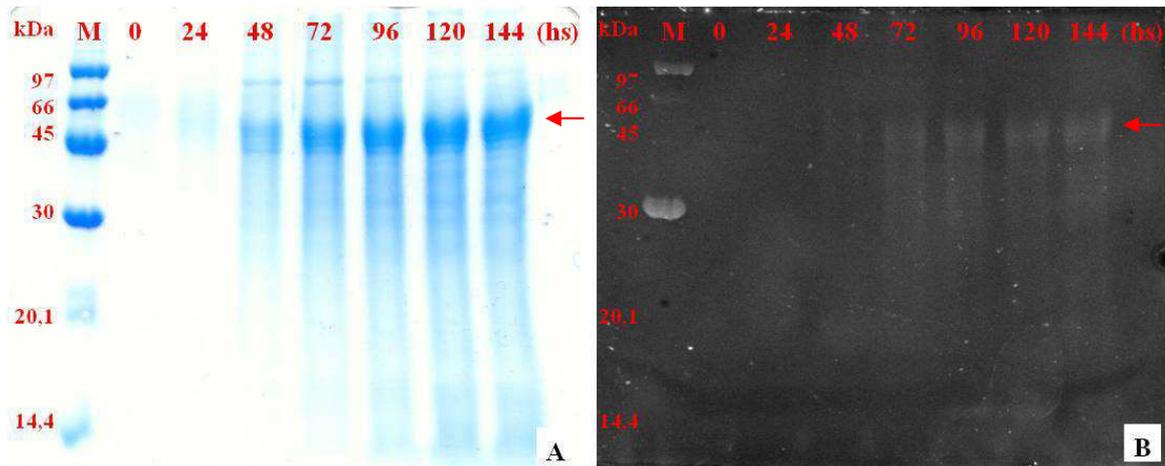
7.7 Indução da expressão da proteína recombinante rCV2935 em *Pichia pastoris*

Um experimento de indução da quitinase recombinante de *C. violaceum* em *P. pastoris*, com duração de 144 horas, foi realizado em caráter de varredura para análise da expressão da rCV2935. O metanol, indutor da expressão, foi adicionado a cada 24 horas, para uma concentração final de 1%. A Figura 14-A representa a eletroforese SDS-PAGE 15% com amostras da fração 0/95 do meio livre de células coletado a cada 24 horas. O clone testado expressou a quitinase rCV2935 a partir de 24 horas, como detectado no gel, caracterizado pelo aparecimento de uma banda significativa de massa molecular aparente de 45 kDa. Esse resultado indica que a proteína rCV2935 foi produzida com sucesso pela levedura *Pichia pastoris* KM71H, sendo secretada para o meio de cultura, por meio do fator *alpha*.

O perfil da expressão da proteína foi também evidenciado pelo kit *Invision His-tag in-gel Stain* (Figura 14-B) que revela especificamente a cauda de histidina presente na

extremidade C-terminal da proteína recombinante. Um aumento crescente da intensidade da banda correspondente a quitinase recombinante no decorrer dos diferentes tempos de coleta pode ser facilmente observado.

Figura 14 – Perfil de expressão e detecção da quitinase recombinante de *Chromobacterium violaceum* produzida em *Pichia pastoris*

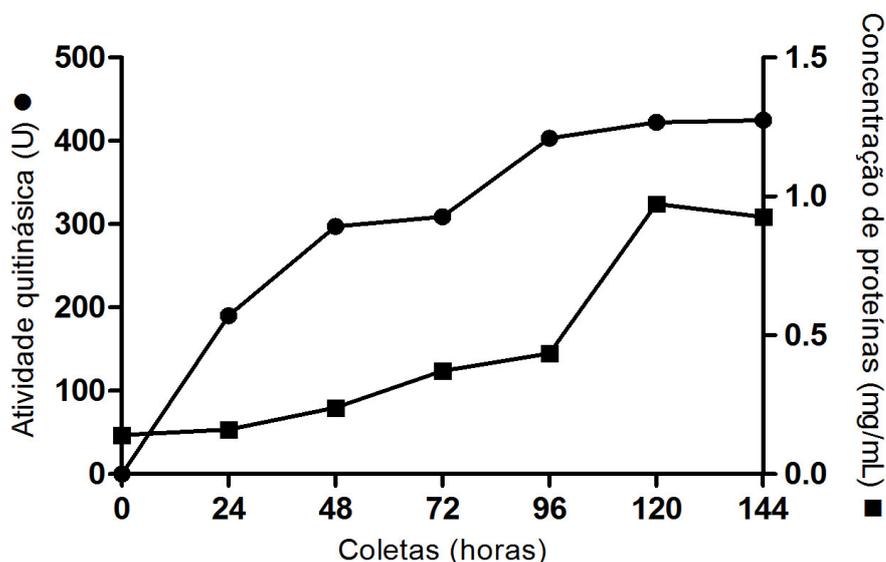


(A) Análise por SDS-PAGE da fração F0/95 do meio livre de células obtido a partir da indução da expressão de rCV2935 em células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o vetor pPICZ α A::CV2935 - clone 3. As amostras foram coletadas a cada 24 horas (0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 hs). A massa molecular aparente (kDa) da banda referente à quitinase recombinante, indicada pela seta vermelha, foi estimada utilizando-se o marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare), representado no poço M. (B) Detecção da rCV2935 com kit *InVision His-tag in-gel Stain*

Com a finalidade de avaliar a funcionalidade da proteína recombinante produzida, um ensaio enzimático, com quitina coloidal como substrato, foi realizado, utilizando a fração de 0/95 do meio de cultura livre de células coletado a cada 24 horas. Concomitantemente, foi também analisado o teor de proteína solúvel presente nos diferentes momentos de coleta. O resultado está representado na Figura 15. A atividade quitinolítica aumentou continuamente a partir de 24 horas, atingindo seu valor máximo de 425 nmol/ml/hora em 144 horas, embora valores bastante similares a esse tenham sido observados a partir de 96 horas de coleta. O tempo ótimo de expressão da rCV2935 em *P. pastoris* foi definido em 96 horas de indução, uma vez que nesse momento de coleta foi observada maior atividade quitinásica específica.

Já foi relatada na literatura a clonagem e expressão de quitinases, de diferentes organismos, em *Pichia pastoris*, tais como: dos fungos *Chaetomium cupreum* (WANG; YANG, 2009), *Limonium bicolor* (LIU et al., 2010), *Trichoderma atroviride* (ARRIAGA, et al., 2010) e *Aspergillus fumigatus* (JAQUES et al., 2003), das plantas *Bambusa oldhamii* (KUO et al., 2008), *Oryza sativa* (TRUONG et al., 2003), entre outras, e até de uma quitinase humana (GOODRICK, et al., 2001).

Figura 15 – Atividade quitinásica e dosagem de proteínas totais solúveis presentes na fração F0/95 do meio livre de células durante a indução da expressão da quitinase recombinante rCV2935 em *P. pastoris* KM71H



A indução ocorreu durante 144 horas e o meio livre de células foi coletado a cada 24 horas. Uma unidade (U) foi definida como 1 nmol de GlcNAc liberado/mL/hora, a 37 °C.

O único relato de expressão de uma quitinase bacteriana em *P. pastoris* foi o trabalho publicado por Lee e colaboradores (2010), no qual o gene que codifica para uma endoquitinase da bactéria psicrófila da Antártica *Sanguibacter antarctius* (KCTC 13.143) foi clonado e expresso em *P. pastoris*, com otimização de códons. Ou seja, para gerar a enzima madura, 25 aminoácidos de um peptídeo sinal putativo foram eliminados, assim como foi feito para a CV2935, e a região codificadora otimizada de acordo com *codon usage* de *Pichia pastoris* usando algoritmos que substituem códons raros, estruturas problemáticas de mRNA e vários elementos-cis que possam atrapalhar na transcrição e tradução. Por fim, a quitinase recombinante foi purificada por cromatografia hidrofóbica em coluna de fenil-Sepharose, apresentou atividade quitinásica em baixas temperaturas e o rendimento obtido foi de apenas 1 mg por litro de cultura em biorreator, para surpresa dos pesquisadores, que esperavam um rendimento significativamente maior.

7.8 Purificação da quitinase recombinante

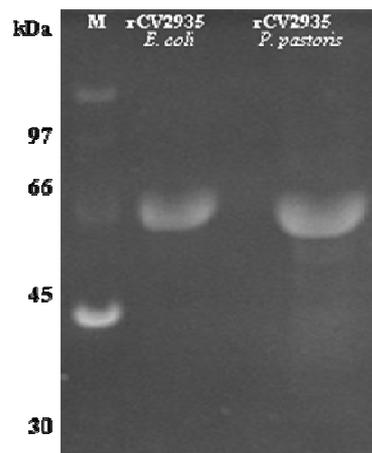
A indução da expressão da quitinase rCV2935 em maior escala foi realizada sob as mesmas condições descritas anteriormente, modificando-se apenas os volumes de cultura para 500 mL e 1 L para indução da expressão em *E. coli* e em *P. pastoris*, respectivamente.

Ao final das induções o meio de cultura foi centrifugado e dialisado exaustivamente contra água destilada para posterior precipitação de proteína com sulfato de amônio para um intervalo de saturação de 0-95.

Três métodos de purificação foram testados: cromatografia de afinidade em níquel imobilizado; cromatografia de afinidade em matriz de quitina e cromatografia de exclusão molecular em matriz de *Superdex 75*.

Como estratégia inicial, uma matriz de *Sepharose* com níquel imobilizado foi utilizada na tentativa de purificar a quitinase recombinante, uma vez que as mesmas foram produzidas com a cauda de histidina, como confirmado pela detecção em gel com o kit *InVizion His-tag in-gel Stain* (Figura 16). É importante ressaltar que, nesse ensaio de detecção da cauda de histidina em gel, as proteínas estavam completamente desnaturadas, e, portanto, a cauda de histidina estava acessível ao fluoróforo.

Figura 16 – Detecção das quitinases recombinantes de *Chromobacterium violaceum* produzida em *E. coli* e *P. pastoris* com kit *InVizion His-tag in-gel Stain*



O marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare) está representado no poço M.

O material retido na matriz foi eluído com concentrações crescentes de imidazol (10 a 500 mM) sendo observado que ambas as proteínas recombinantes não interagiram com a matriz. Portanto, elas foram eluídas imediatamente com o tampão de equilíbrio na ausência de imidazol (Tris-HCl 50 mM contendo NaCl 0,5M) logo no início do processo cromatográfico.

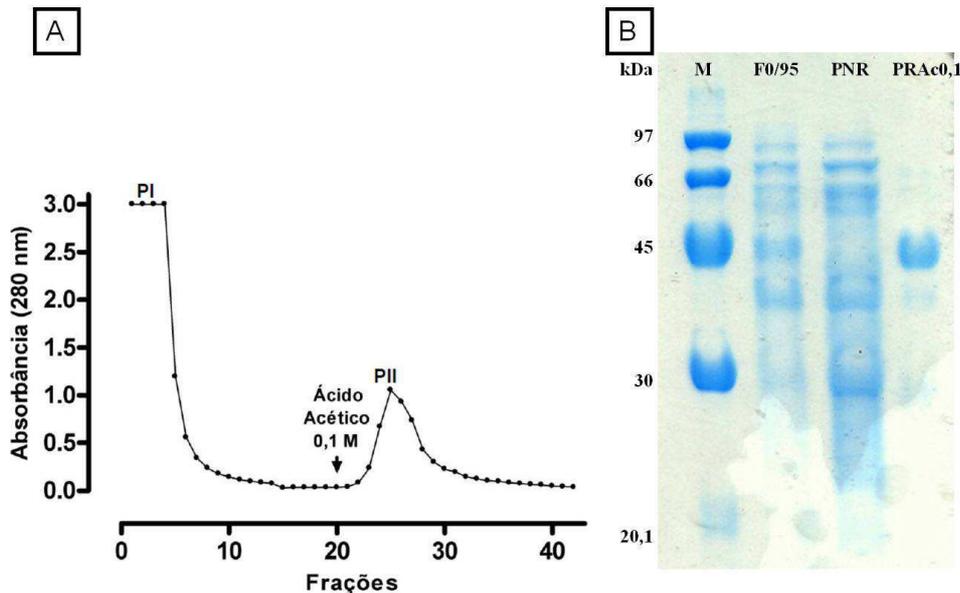
Uma possível explicação para isso é que, devido ao envelhecimento assumido pela proteína, a cauda de histidina, ligeiramente hidrofóbica, localizada na porção C-terminal da proteína, se inseriu em uma parte mais interna, também hidrofóbica, da proteína, ficando,

conseqüentemente, pouco exposta para interagir com a matriz. Assim, mesmo após várias tentativas, a cromatografia de afinidade em níquel imobilizado foi descartada como método de purificação da quitinase recombinante, produzida em ambos os sistemas.

Tendo em vista o insucesso da purificação da quitinase recombinante por meio de cromatografia em níquel imobilizado a estratégia seguinte foi utilizar uma matriz de quitina para obter amostra pura da proteína em estudo. A fração 0/95, solubilizada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, contendo NaCl 1 M, foi aplicada na coluna de quitina.

O pico não retido (PI), eluído com o tampão de equilíbrio (acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo NaCl 1M), foi recuperado em alíquotas de 10 mL a um fluxo constante de 1 mL/minuto. Já o pico retido (PII) na coluna de quitina, eluído com ácido acético 0,1 M, foi recuperado em alíquotas de 1,5 mL a 1 mL/minuto. Todas as alíquotas foram analisadas através da medida da absorbância a 280nm (A_{280}) ao longo de todo processo cromatográfico, como representado na Figura 17-A.

Figura 17 - Purificação da quitinase recombinante de *C. violaceum* produzida em *E. coli*



(A) Perfil cromatográfico do processo de purificação da rCV2935. (B) Análise por SDS-PAGE das etapas de purificação. No poço M, marcador de peso molecular *Low Molecular Weight* (GE Healthcare). Nos poços seguintes, a fração F0/95 do meio livre de células; o pico não retido em matriz de quitina (PNR ou PI) e fração eluída ácido acético 0,1 M (PRAc0,1 ou PII).

Alíquotas do pico retido, eluído com ácido acético 0,1 M, que apresentaram as maiores leituras em A_{280} foram reunidas, e dialisadas exaustivamente contra água. Essa amostra foi então concentrada por ultrafiltração, em concentradores Vivaspín com limite de exclusão (*cutoff*) de 30 kDA (GE Healthcare) e submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (com SDS) e redutoras (na presença de β -

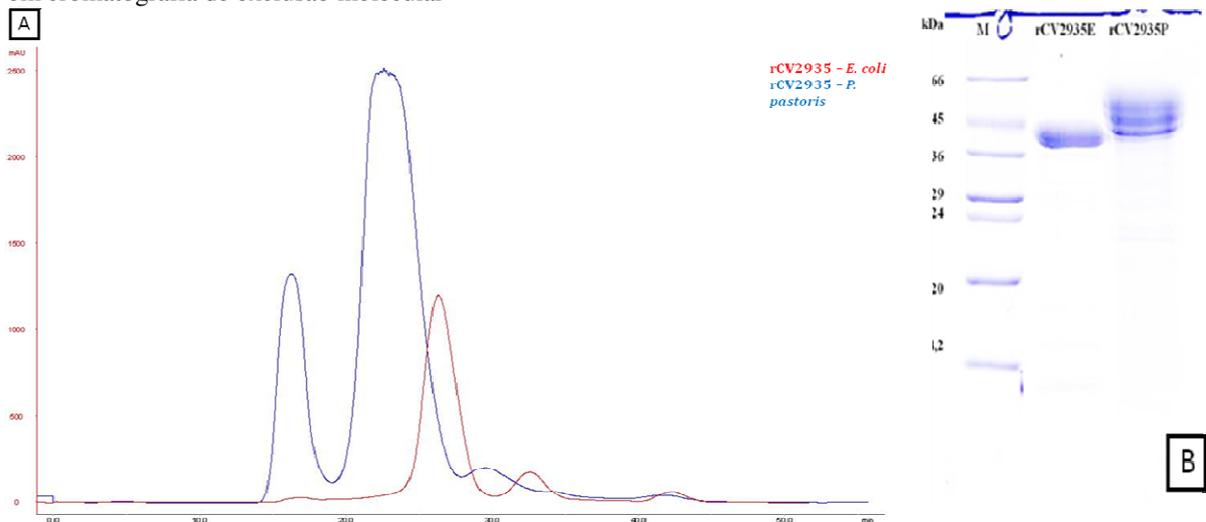
mercaptoetanol), como mostrado na Figura 17-B.

A presença de alguns poucos contaminantes pode ser explicada pelo tempo em que o extrato aplicado fica em contato com a matriz de quitina antes do início do processo cromatográfico, o que propicia que interações iônicas e hidrofóbicas entre outras proteínas presentes na amostra e a matriz se estabeleçam.

A fim de obter amostra da quitinase recombinante livre de quaisquer contaminantes, uma matriz de *Superdex75* foi utilizada. Amostra da proteína recombinante, obtida por meio da cromatografia em matriz de quitina, foi dialisada contra tampão acetato de sódio 50 mM contendo NaCl 0,15 M e aplicada na coluna de exclusão molecular previamente equilibrada com o mesmo tampão.

Mais uma vez, todo processo cromatográfico foi acompanhado por meio da medida da absorbância a 280nm (A_{280}), como representado na Figura 18-A.

Figura 18 – Purificação da quitinase recombinante de *C. violaceum* produzida em ambos os sistemas heterólogos em cromatografia de exclusão molecular



(A) Perfil cromatográfico do processo de purificação da rCV2935 em coluna de Superdex75. (B) Análise por SDS-PAGE das amostras resultantes da cromatografia de exclusão molecular. No poço M, marcador de peso molecular *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

Um pequeno retardo no tempo de eluição da proteína recombinante produzida em *E. coli* foi percebido, quando comparado a proteína produzida em *P. pastoris*. Isso se deve ao fato da rCV2935 expressa na levedura apresentar massa molecular maior, já que possui alguns resíduos a mais, codificados no vetor de expressão, bem como glicanos adicionados, um possível resultado de *N*-glicosilação.

Alíquotas dos tubos contendo as proteínas recombinantes foram reunidas e dialisadas exaustivamente contra água, para, em seguida, serem concentradas por

ultrafiltração, em concentradores Vivaspin com limite de exclusão (cutoff) de 30 kDa (GE Healthcare) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (com SDS) e redutoras (na presença de β -mercaptoetanol), como mostrado na Figura 18-B. Foi possível a observação de uma banda protéica de alta intensidade, de aproximadamente 43 kDa, correspondente a rCV2935 produzida por *E. coli*, e 3 bandas bem próximas, de aproximadamente 45 kDa, que correspondem a rCV2935 produzida por *P. pastoris*, possivelmente com diferentes estados de glicosilação.

Os rendimentos da rCV2935 pura, produzida por *E. coli* e *P. pastoris*, foram 2,6 e 44 mg por litro de cultura, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Vale destacar que esses valores de rendimento foram calculados considerando a purificação em matriz de quitina como etapa final, visto que há perda significativa de proteína recombinante após a cromatografia de exclusão molecular.

Tabela 2 - Purificação da quitinase recombinante CV2935 de *C. violaceum*, expressa em *E. coli*¹

	<i>Proteína Total (mg)</i>	<i>Atividade Total (U*)</i>	<i>Atividade Específica (U**/mgP)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Purificação (fold)</i>
Meio livre de células	37,4	14.900,5	398,5	100	1
F0/95	13,79	14.394,2	1.043,6	36,8	2,61
PRAc0,1**	1,33	1.616,6	1.208	3,5	3,03

¹: dados obtidos a partir de 500 ml de cultura (induzida com IPTG 0,5 mM a 37 °C por 21 horas)

* 1 U = 1 nmol GlcNac/hora

**Pico da cromatografia de afinidade em matriz de quitina, eluído com ácido acético 0,1 M

Tabela 3 - Purificação da quitinase recombinante CV2935 de *C. violaceum*, expressa em *P. pastoris*¹

	<i>Proteína Total (mg)</i>	<i>Atividade Total (U*)</i>	<i>Atividade Específica (U*/mgP)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Purificação (fold)</i>
Meio livre de células	75,1	18.010,8	239,8	100	1
F0/95	20,6	19.385,1	937	27,4	3,90
PRAc0,1**	11,2	11.889,7	1059,4	14,9	4,4

¹: dados obtidos a partir de 250 ml de cultura (induzida com metanol a 17 °C por 96 horas)

* 1 U = 1 nmol GlcNac/hora

**Pico da cromatografia de afinidade em matriz de quitina, eluído com ácido acético 0,1 M

Um estudo comparativo com uma quitinase do fungo *Beauveria bassiana* (Bbchit1) que é uma importante enzima envolvida na patôgenese de fungos contra insetos, foi realizado por Fan e colaboradores (2007). A fim de obter essa enzima em grandes quantidades e na sua forma ativa, para estudos *in vitro*, o gene *Bbchit1* foi expresso em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. A produção em alto nível de Bbchit1 recombinante foi detectada em *E. coli*, porém, principalmente localizada em corpos de inclusão. Já em *P. pastoris*, Bbchit1 foi secretada para o meio de cultura sob a indução com metanol. A quitinase recombinante Bbchit1 foi purificada com um grau de pureza de cerca de 90% por meio de cromatografia de dessalinização e cromatografia de troca aniônica. O rendimento de Bbchit1 produzida por *P. pastoris* foi de 153 mg/L, significativamente maior do que a Bbchit1 produzida por *E. coli* e obtida após técnicas de renovelamento (50 mg/L).

7.9 Caracterização bioquímica e estrutural da quitinase recombinante

7.9.1 Ensaio enzimático na presença e ausência de β -glucuronidase

No ensaio enzimático, utilizando quitina coloidal como substrato, quando realizado na ausência de β -glucuronidase, não foi possível detectar nenhuma atividade quitinásica, o que demonstra que a rCV2935 é uma endoquitinase e cliva o polímero de quitina de forma randômica em seu interior, produzindo quitoooligômeros.

Além disso, quando comparados os valores de atividade quitinásica da rCV2935, produzida por *E. coli*, e de uma quitinase obtida comercialmente, de *Streptomyces griseus*, observa-se que ambas as quitinases possuem atividades quitinolíticas similares, embora uma pequena atividade exoquitinolítica seja detectada para a quitinase de *S. griseus* (Tabela 4).

7.9.2 Ensaio enzimático com substratos sintéticos

O ensaio enzimático com substrato sintético baseia-se na hidrólise de substratos sintéticos por quitinases. O resultado encontrado, representado também na Tabela 4, mostra que a quitinase recombinante CV2935, produzida em *E. coli*, é capaz de hidrolisar o 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e o 4-nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose, análogos ao tri e tetrassacarídeo (Figura 19), respectivamente, não sendo possível detectar

atividade contra o 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo. Esse resultado corrobora com obtido anteriormente, quando utilizou-se quitina coloidal como substrato, comprovando a atividade endoquitinásica da enzima em estudo.

Além disso, observa-se que a atividade quitinolítica da enzima comercial, de *Streptomyces griseus*, frente aos substratos sintéticos, foi 3 vezes menor que a da rCV2935. Tendo em vista que já foram identificadas quitinases das famílias GH18 e GH19 de *S. griseus*, o fabricante não informa a qual família pertence a quitinase comercialmente disponível.

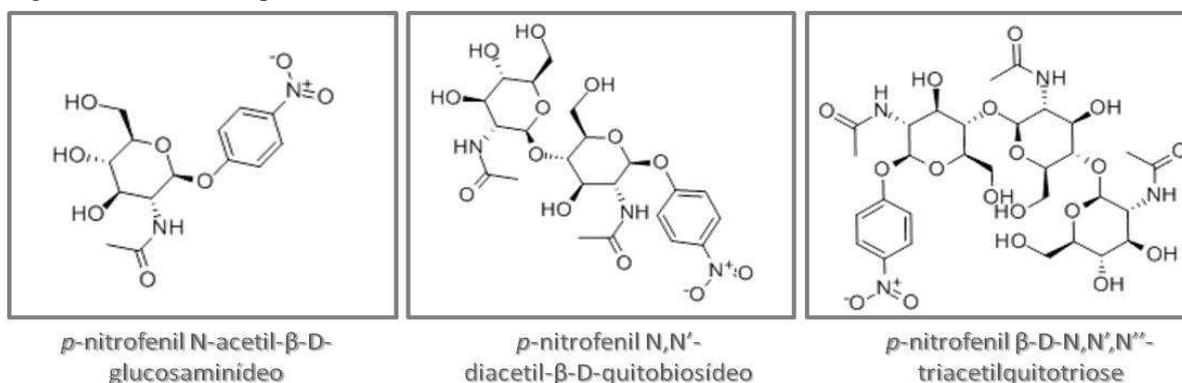
Tabela 4 – Análise da especificidade de substrato da quitinase recombinante rCV2935, de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 expressa em *Escherichia coli*. A atividade específica da enzima (U/mg proteína) foi mensurada utilizando quitina coloidal e substratos sintéticos. Uma quitinase de *Streptomyces griseus* foi utilizada para comparação

Substrato	rCV2935	Quitinase de <i>Streptomyces griseus</i>
Quitina coloidal*		
(+) β -glucuronidase	22.260,47	20.367,98
(-) β -glucuronidase	0	1.520,16
4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo**	0	0
4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo	32.320	10.370
4-nitrofenil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose	31.560	9.120

* Para ensaios utilizando quitina coloidal, uma unidade foi definida como 1 nmol de GlcNAc/mgP/hora, a 37 °C.

** Para ensaios utilizando os substratos sintéticos, uma unidade foi definida como a liberação de 1 nmol de *p*-nitrofenol/mgP/hora, pH 4,8 a 37 °C.

Figura 19 – Estruturas químicas dos substratos sintéticos utilizados nos ensaios enzimáticos



O p -nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo, p -nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e p -nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose, análogos ao di, tri e tetrassacarídeo, respectivamente.

É descrito na literatura que quitinases da família GH18 possuem atividade extremamente alta para substratos cristalinos, enquanto que quitinases da família GH19 são principalmente ativas para substratos solúveis (KAWASE et al., 2006). Surpreendentemente, a quitinase recombinante rCV2935, que pertence a família GH18, mostrou-se bastante ativa para ambos os tipos de substratos.

Vale ressaltar que um ensaio, sob as mesmas condições, foi realizado utilizando a rCV2935 produzida em *P. pastoris*, na mesma concentração, e valores idênticos foram encontrados, o que demonstra que a quitinase recombinante possui processividade semelhante frente a substratos sintéticos mesmo quando produzida em dois sistemas heterólogos diferentes.

De forma semelhante, uma quitinase recombinante de *Bacillus cereus*, produzida em *E. coli*, mostrou uma sensibilidade ao 4-nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose 128 vezes maior do que ao análogo ao dissacarídeo, o que caracteriza uma atividade endoquitinásica (CHEN et al., 2009).

O mesmo perfil foi encontrado por uma endoquitinase recombinante de *Salmonella*. A enzima, produzida em *E. coli*, mostrou-se ativa contra 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e o 4-nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose, com valores de atividades similares para ambos os substratos sintéticos (LARSEN et al., 2011).

7.9.3 Ensaio quitinásico com diferentes substratos

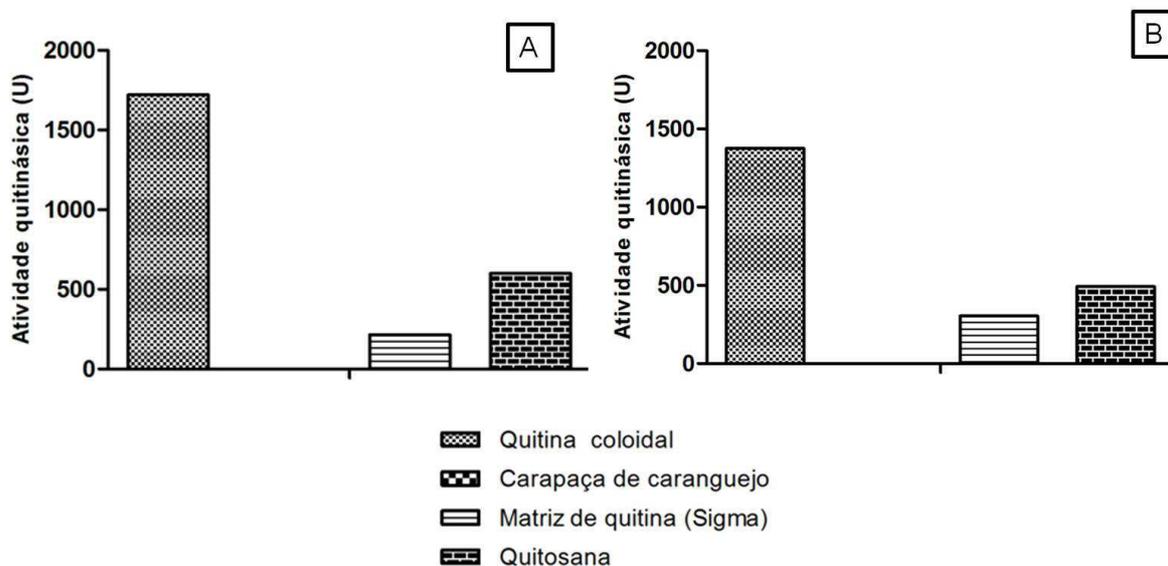
A capacidade de hidrolisar diferentes substratos é um critério importante a ser observado quando se discute a “potência” de uma quitinase. Visando avaliar a atividade enzimática da quitinase recombinante produzidas frente a diferentes substratos, foi realizado um ensaio enzimático utilizando quitina coloidal, carapaça bruta de caranguejo moída, matriz de carapaça de caranguejo tratada (obtida comercialmente – Sigma Aldrich) e quitosana.

O resultado, ilustrado na Figura 20, mostra que o maior valor de atividade quitinásica encontrado dentre os substratos testados foi para a quitina coloidal. Para a rCV2935 produzida por *E. coli* foi encontrado um valor de 1.720,5 nmol/mL/hora, e para a rCV2935 produzida por *P. pastoris*, foi de 1.375, 3 nmol/mL/hora.

Uma pequena atividade quitosanáica foi detectada para a rCV2935 (de 600,8 nmol/mL/hora para rCV2935 – *E. coli* e de 492,8 nmol/mL/hora para a rCV2935 – *P. pastoris*). Essa atividade observada pode ser explicada devida ao fato de a quitosana ser a

quitina deacetilada, e, portanto, não se sabe ao certo o grau de acetilação da quitosana utilizada no ensaio, bem como o grau de heterogeneidade do substrato utilizado.

Figura 20 – Atividade quitinásica da rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, frente a diversos substratos



(A) Atividade quitinásica da enzima recombinante produzida em *E. coli*. (B) Atividade quitinásica da enzima recombinante produzida em *P. pastoris*. Uma unidade (U) foi definida como 1 nmol de GlcNAc/mL/hora, a 37 °C.

Atividade quitinásica, embora baixa, foi detectada quando a enzima foi colocada em contato com a matriz de carapaça de caranguejo tratada. Essa carapaça, obtida comercialmente (Sigma), caracteriza-se por ser uma malha de quitina α -cristalina, e, embora tratada com reagentes químicos que “afrouxem” essa malha, talvez a quitina se apresente de uma forma não usual para a quitinase em estudo e, por esse motivo, valores baixos de atividade quitinásica foram encontrados.

Não foi detectada nenhuma atividade quitinásica quando a carapaça de caranguejo bruta foi utilizada como substrato. Fato esse, que pode ser explicado por esse substrato caracterizar-se como uma intrincada rede de agregados de proteínas e outras moléculas que constituem a carapaça bruta, e que, possivelmente dificultaram o acesso da enzima aos polímeros de quitina ali presentes.

Kudan e Pichyangkura (2008) isolaram do meio de cultura de *Bacillus licheniformis* uma quitinase capaz de hidrolisar quitina coloidal, quitina regenerada, quitina parcialmente (50%) N-acetilada, quitosana 80% acetilada, matriz de quitina e quitina em flocos, mas não hidrolisa quitobiose nem *p*-nitrofenil-N-acetilglucosamina, o que sugere que ela não possua atividade de N-acetilglucosaminidase. A atividade relativa, expressa em

percentuais, da enzima em quitina parcialmente (50%) N-acetilada, quitosana 80% acetilada, quitina regenerada, matriz de quitina e quitina em flocos foram 394%, 150%, 74%, 4%, e 2%, respectivamente, normalizada para a atividade enzimática com quitina coloidal.

Um resultado semelhante ao da rCV2935 foi encontrado por Chen e colaboradores (2009), para uma quitinase recombinante de *Bacillus cereus*. O maior valor de atividade quitinásica encontrado foi contra quitina coloidal e cerca de 45% de atividade foi detectada utilizando quitosana como substrato e 17% quando testou-se matriz de quitina obtida comercialmente.

Testes de especificidade a diferentes substratos realizados por Daí e colaboradores (2011) com uma quitinase purificada a partir do meio de cultura de *Bacillus* sp. Hu1 indicaram que quitina coloidal foi o melhor substrato entre diferentes substratos testados (quitina coloidal, matriz de quitina comercial e quitosana 80% deacetilada) onde foi detectada atividade quitinásica. Quando foram utilizados quitosana 95% deacetilada, carboximetil celulose, celulose e amido solúvel, não foi detectada nenhuma atividade quitinolítica. Os autores concluíram que a quitinase em estudo têm alta especificidade, capaz de hidrolisar apenas ligações glicosídicas entre GlcNAc-GlcNAc.

7.9.4 Ensaio de atividade quitinásica em gel

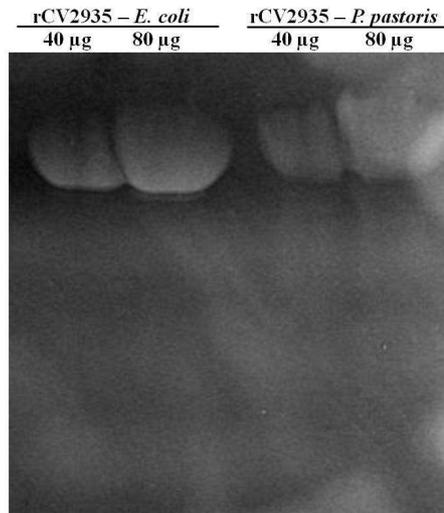
A quitinase recombinante, produzidas nos dois sistemas heterólogos, foi facilmente solubilizada após liofilização, e mostrou-se ativa contra o substrato glicol quitina, um derivado solúvel da quitina, como verificado pela detecção da atividade quitinolítica em gel, ilustrada pela Figura 21.

Uma exoquitinase de *Serratia* sp. de aproximadamente 57 kDa, isolada do suco de *kimch*, apresentou atividade quitinásica em uma gama de pH (5 a 10), termoestabilidade com uma temperatura ótima de 40 °C, e também mostrou-se ativa contra glicol quitina presente em gel SDS-PAGE (KIM et al., 2007).

Uma quitinase A (Chia), produzida por *Bacillus thuringiensis* foi expressa em *Escherichia coli* XL-Blue. A Chia, purificada usando *Sephadex* G-200, apresentou massa molecular estimada de 36 kDa por SDS-PAGE. A detecção de atividade quitinásica em SDS-PAGE após renaturação da proteína indicou que a banda referente a proteína que apresentou atividade tinha uma massa molecular de aproximadamente 72 kDa. Os autores justificaram esse resultado, de certa forma inesperado, afirmando que ChiA assume uma forma dimérica

quando glicol quitina é usada como substrato, possivelmente para facilitar a hidrólise do substrato (LIU et al., 2010).

Figura 21 – Detecção de atividade quitinolítica em gel (zimograma) das quitinases recombinantes, produzida em *E. coli* e *P. pastoris*, em diferentes concentrações.



7.9.5 Determinação da seqüência de aminoácidos N-terminal

O seqüenciamento de aminoácidos NH₂-terminal, por meio da técnica de degradação de Edman, foi realizado para a quitinase recombinante de *C. violaceum*, produzida em *E. coli*.

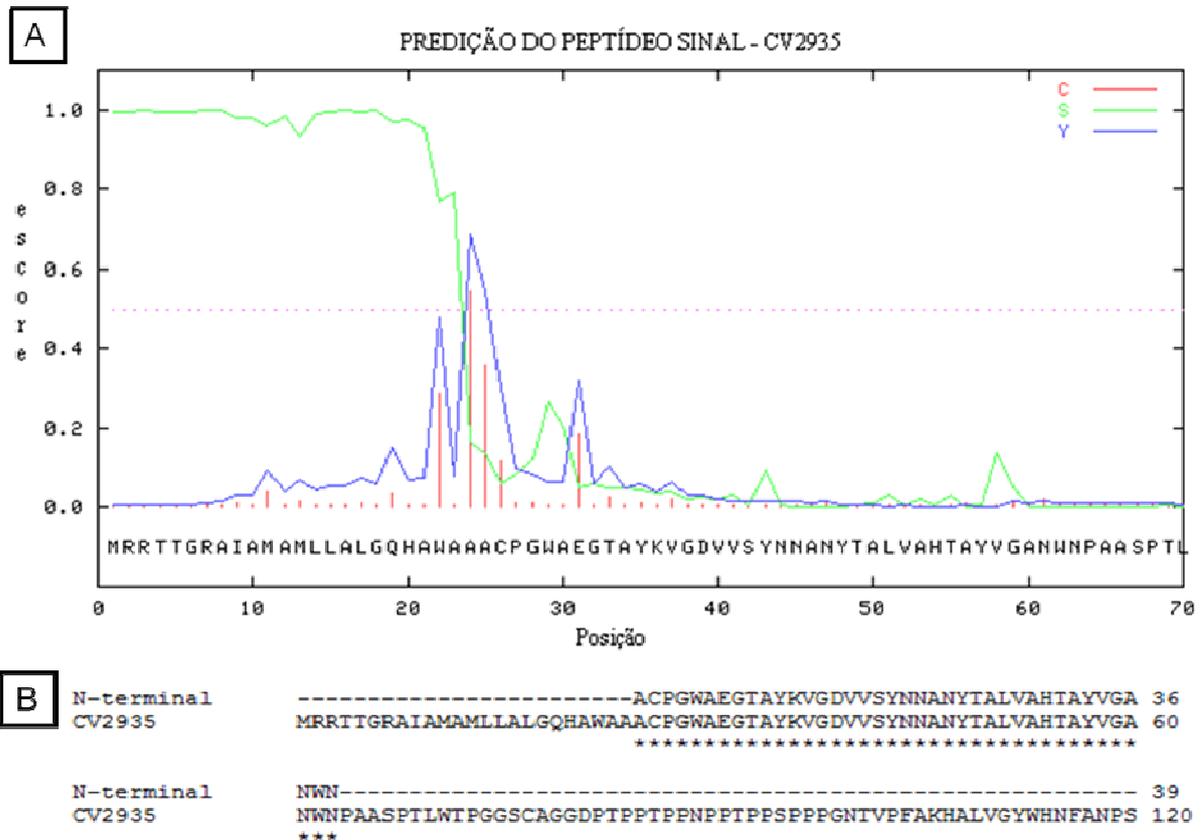
Uma seqüência de 39 resíduos foi identificada com sucesso e obteve-se 100% de identidade com a seqüência de aminoácidos deduzida a partir da ORF CV2935, como ilustrado na Figura 22.

O resultado encontrado corrobora com a hipótese do reconhecimento do peptídeo sinal intrínseco da proteína, e da clivagem do mesmo, pela célula hospedeira. A proteína recombinante, expressa em *E. coli*, começa, portanto, no aminoácido alanina, que é o 25º aminoácido da seqüência deduzida completa.

7.9.6 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da rCV2935

Através deste ensaio foi possível analisar a atividade quitinásica relativa da proteína purificada, obtida nos dois sistemas de expressão, utilizando quitina coloidal como substrato, quando incubada a diferentes temperaturas (30 a 100 °C, com intervalos de

Figura 22 – Alinhamento da sequência N-terminal obtida, por meio da técnica de degradação de Edman, com a sequência de aminoácidos deduzida da quitinase CV2935 de *Chromobacterium violaceum*



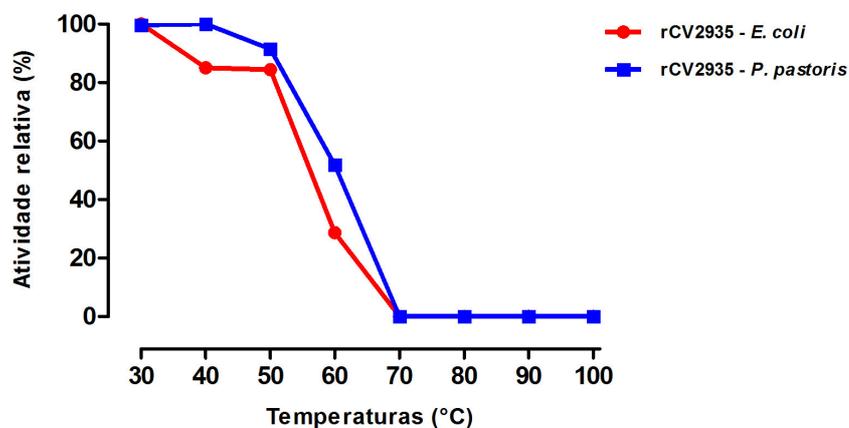
(A) Saída gráfica da análise da sequência de aminoácidos deduzida de CV2935, utilizando a ferramenta *SignalP*. O escore C é a pontuação para o sítio de clivagem, o escore S indica que o aminoácido correspondente faz parte de um peptídeo sinal e o escore Y é um derivado do escore C combinado com o escore S, resultando em uma melhor previsão do local de clivagem. Observa-se o local de clivagem entre os aminoácidos 23 (A) e 24 (A), indicado pelo escore C (em vermelho) mais elevado. (B) Alinhamento das sequências, a partir do 25º resíduo, que é uma alanina.

10 °C) durante 30 min em banho-maria. O gráfico representado na Figura 23 ilustra o resultado obtido.

A quitinase recombinante produzida, tanto em *E. coli* como em *P. pastoris*, mostrou-se ativa quanto tratada com temperaturas de até 60 °C. Tratamentos por um tempo mínimo de 30 min em temperaturas superiores a 60 °C foram suficientes para inativação da enzima, provavelmente por causar desnaturação da proteína, levando a um estado conformacional que impossibilita a atividade enzimática.

Resultado semelhante ao da rCV2935 foi encontrado por Wang e colaboradores (2009). Os pesquisado avaliaram a estabilidade térmica de uma quitinase isolada de *Bacillus cereus* TKU006 deixando uma solução de enzima em tampão fosfato 50 mM (pH 7) em repouso por 60 min a diferentes temperaturas, e depois medindo a atividade quitinásica

Figura 23 – Atividade relativa das quitinasas recombinantes de *C. violaceum*, produzidas em *E. coli* e *P. pastoris*, após incubação em diferentes temperaturas (30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C) durante 30 min em banho-maria



A atividade quitinásica foi mensurada com as amostras após incubação, utilizando quitina coloidal como substrato, sob condições padrão de ensaio.

residual sob condições padrão de ensaio, utilizando quitina coloidal como substrato. Foi observado que a quitinase manteve sua atividade inicial mesmo quando tratada de 25 °C a 55 °C, restando 50% de sua atividade a 60 °C, e sendo completamente inativada a 80 °C.

Cho e colaboradores (2010) avaliaram a estabilidade de uma quitinase recombinante de *Bacillus atrophaeus* SC081 (SCChi-1). Como resultado, a enzima apresentou atividade ótima em 50 °C e foi termicamente estável, restando mais de 80% de sua atividade inicial entre 40 °C e 60 °C durante 1 hora, diferentemente do encontrado para a rCV2935, que reteve 80% de atividade somente até 50 °C. Estabilidade de quitinasas bacterianas tem sido relatado para *B. cereus* TKU006 e *Pseudomonas* sp. PE2. Em *B. cereus* TKU006, a quitinase é estável em pH de 3 a 11 e 50% de sua atividade inicial é mantida a 60 °C por 1 hora. Já a quitinase de *Pseudomonas* sp. PE2 mostrou estabilidade semelhante a SCChi-1, quando incubada em pH de 3 a 10 a 40-55 °C ou em pH 5,5-9 em 20-40 °C por 30 min, respectivamente.

Comparando a termoestabilidade da quitinase recombinante produzida, é possível observar que a rCV2935 expressa em *P. pastoris* é ligeiramente mais termoestável, restando cerca de 50% de atividade quitinásica após incubação a 60 °C, enquanto que a rCV2935 expressa em *E. coli* retém apenas cerca de 28% após incubação nessa mesma temperatura por 30 min. Essa diferença se explica possivelmente devido a glicosilação presente na quitinase produzida por *P. pastoris*, uma vez que cadeias de oligossacarídeos influenciam em aspectos como solubilidade da proteína e estabilidade térmica. Além disso, a proteína produzida em *P. pastoris* apresenta uma ponte dissulfeto entre duas cisteínas presentes na molécula, o que favorece uma maior estabilidade à molécula.

Guerrero-Olazara N e colaboradores (2010) expressaram uma fitase, enzima que catalisa a liberação de fosfato do fitato, de *Bacillus subtilis* em *Pichia pastoris* e observaram que a enzima recombinante foi *N*-glicosilada pela levedura. Nos ensaios de termoestabilidade, os autores encontraram que a estabilidade térmica da proteína recombinante, e glicosilada, foi maior que a encontrada para a enzima nativa, o que a torna mais adequada para aplicações industriais. Os autores propõem que como a *N*-glicosilação afeta propriedades bioquímicas como massa molecular, ponto isoelétrico, pH ótimos e altera a distribuição de cargas na superfície da glicoproteína, isso explicaria esse resultado.

Um resultado semelhante também foi encontrado por Öberg e colaboradores (2011), que expressaram uma aquaporina humana em *Pichia pastoris*, e a proteína recombinante foi também glicosilada e teve sua estabilidade térmica aumentada em 3-6 °C quando comparada a proteína nativa e não-glicosilada.

7.9.7 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV2935

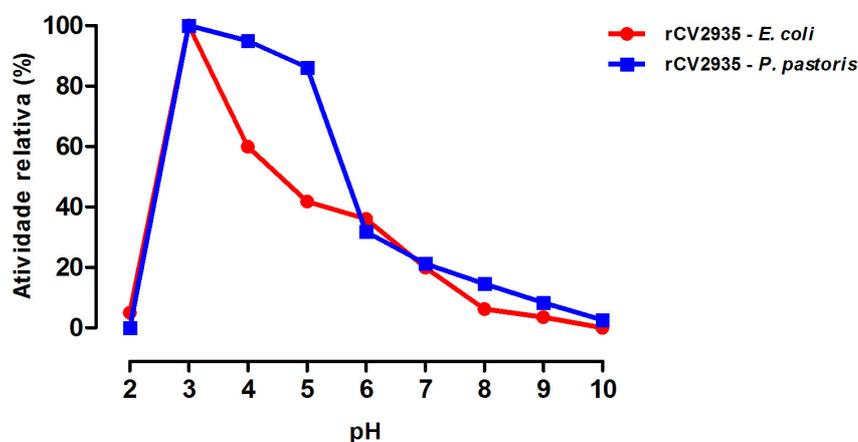
Por este ensaio, foi possível avaliar a atividade quitinásica das proteínas recombinantes em diferentes pH, que variaram de 2 a 10. Como pode ser observado na Figura 24, as rCV2935 apresentaram-se ativas na faixa de pH de 3 a 7. Os maiores valores de atividade quitinásica encontrados foram no pH 3 (6.051,1 nmol/mL/hora para a quitinase recombinante produzida em *E. coli* e 4.493,5 nmol/mL/hora para a quitinase recombinante produzida em *P. pastoris*).

È possível perceber também que a quitinase recombinante produzida em *P. pastoris* apresentou atividade quitinásica semelhante na faixa de pH de 3 a 5, diferentemente da rCV2935 produzida em *E. coli*, que teve sua atividade reduzida quase a metade em pH 5.

Em valores de pH superiores a 8 não foi detectada atividade quitinásica para nenhuma das quitinases recombinantes, o que pode ser explicado pelo fato de que os resíduos de ácido glutâmico, presentes no domínio catalítico da proteína e essenciais para a ação de hidrólise, devem estar parcialmente protonados para que sejam doadores de prótons eficientes. Em pH básicos, esses resíduos ficam completamente desprotonados, ficando impossibilitados de doar prótons e, conseqüentemente, realizar a catálise.

Muitos trabalhos na literatura relatam resultados diferentes do encontrado para rCV2935, que teve atividade ótima em pH 3. È comum encontrar quitinases bacterianas funcionais em amplas faixas de pH (4,0-8,0), mas com atividade ótima em pH 4.0 para

Figura 24 – Efeito do pH na atividade enzimática relativa das quitinases recombinantes de *C. violaceum*, produzidas em *E. coli* e *P. pastoris*.



No experimento, amostras das proteínas purificadas, na concentração de 1 mg/mL foram diluídas em tampões de diferentes pH (2 a 10) e incubadas a temperatura ambiente. Os tampões utilizados foram: Glicina-HCl 50 mM pH 2; Glicina-HCl 50 mM pH 3; Acetato de sódio 50 mM pH 4; Acetato de sódio 50 mM pH 5; Fosfato de sódio 50 mM pH 6; Fosfato de sódio 50 mM pH 7; Tris-HCl 50 mM pH 8; Glicina-NaOH 50 mM pH 9 e Glicina-NaOH 50 mM pH 10. Após decorrido o tempo de uma hora, as amostras foram utilizadas em ensaio enzimático utilizando quitina coloidal como substrato.

Aeromonas sp. 10S-24 (UEDA et al., 1995), pH 5,5 para *Bacillus* sp. WY22 (WOO; PARK, 2003), e pH 6,0 por *Enterobacter* sp.G-1 (PARK et al., 1997), por exemplo.

Da mesma forma, uma quitinase recombinante de *Serratia proteamaculans*, expressa em *E. coli*, mostrou-se ativa em uma ampla faixa de pH (4,5 - 9) com máximo de atividade em 5,5 (MEHMOOD et al., 2009).

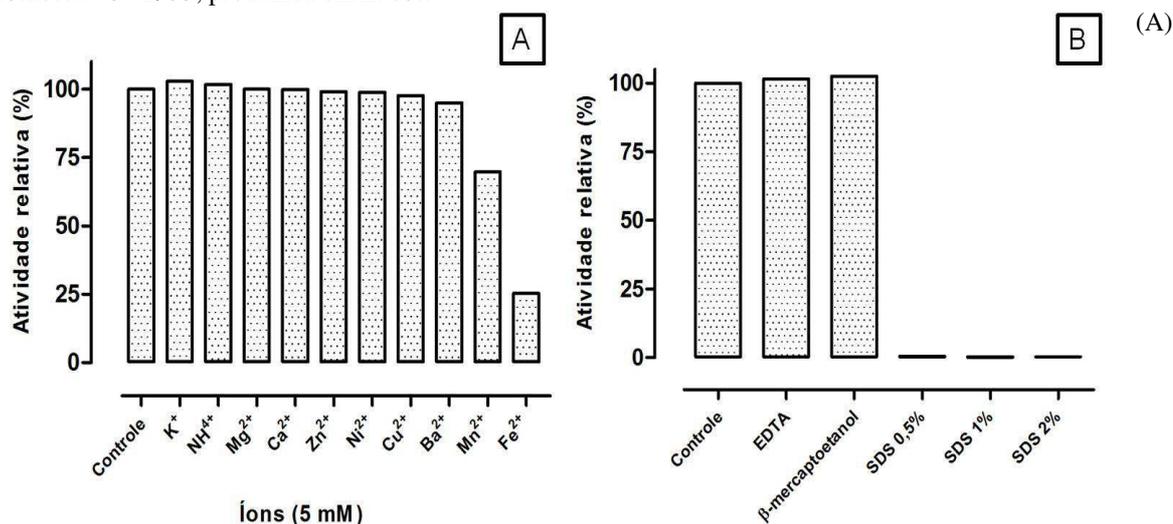
Dois quitinases de *Bacillus pumilus* SG2 expressas em *Escherichia coli* M15, purificadas por meio de cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, apresentaram atividade quitinásica no intervalo de pH de 4,5 e 6,5, mas o pH ótimo das enzimas recombinantes foi de 6 e 6,5, utilizando quitina coloidal como substrato. A análise da atividade enzimática dessas duas quitinases em diferentes condições de pH e temperatura indicou um comportamento enzimático bastante interessante. A distribuição bimodal de atividade no intervalo de pH testado faz com que essas enzimas sejam pouco comuns, pois normalmente há apenas um pH ótimo de atividade. Os resultados sugerem que pode haver dois arranjos conformacionais da molécula, que se comportam diferentemente em diferentes pH e isso pode ser devido a natureza haloenzima dessas enzimas que são halofílicas e foram evoluindo durante muito tempo para se adaptar às condições de alta salinidade em seu ambiente de crescimento (GHASEMI et al., 2011).

7.9.8 Efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática da rCV2935

O efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática da quitinase recombinante produzida por *E. coli* foi investigado realizando ensaio com o substrato sintético 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo, na concentração de 0,2 mg/mL, seguindo o protocolo descrito no item 6.14.2.

O resultado, ilustrado na Figura 25-A, mostra que os íons NH_4 e K^+ estimularam sutilmente a atividade quitinásica da proteína recombinante, enquanto os íons Mn^{2+} e Fe^{2+} foram capazes de reduzir em 31% e 75%, respectivamente, a atividade quitinásica da proteína em estudo, em relação ao controle.

Figura 25 – Efeito da presença de íons metálicos e agentes químicos na atividade da quitinase recombinante de *C. violaceum* CV2935, produzida em *E. coli*



Atividade quitinásica relativa na presença de diferentes íons na concentração final 5 mM. (B) Atividade quitinásica relativa na presença de diferentes agentes químicos. Todos os ensaios foram realizados utilizando o substrato sintético 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo, na concentração de 0,2 mg/mL.

Um perfil similar da rCV2935 foi encontrado para uma quitinase isolada de *Bacillus cereus*, que teve sua atividade quitinásica completamente inibida na presença de Mn^{2+} e Fe^{2+} , também na concentração de 5 mM (WANG et al., 2009).

Uma quitinase isolada de *Streptomyces roseolus*, purificada a partir do meio de cultura, teve sua atividade estimulada por Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} , enquanto que teve sua atividade inibida por Cu^{2+} , Co^{2+} e também por Mn^{2+} , assim como para a rCV2935 (XIAYUN et al., 2010).

Chen e colaboradores (2009) expressaram em *E. coli* uma quitinase de *Bacillus cereus* e observaram que a atividade quitinásica da enzima recombinante foi fortemente por Fe^{3+} e Cu^{2+} e moderadamente inibida por Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , bem como por EDTA. Enquanto Mn^{2+} estimulou a atividade enzimática, diferentemente dos resultados encontrados para rCV2935.

Quanto aos agentes químicos, é possível observar na Figura 25-B, que tanto na presença do agente quelante EDTA, como na presença de β -mercaptoetanol, a atividade quitinásica da rCV2935 foi sutilmente estimulada. Porém, na presença de SDS, a atividade quitinolítica foi completamente inibida em todas as concentrações testadas.

Diferente do resultado encontrado para a rCV2935, Liu e colaboradores (2009) isolaram, em uma amostra de solo do Taiwan, duas endoquitinases, de *Aeromonas schubertii*, resistentes a SDS na concentração de 5%. Os autores sugerem que essas quitinases tenham uma estrutura bastante rígida, o que confere essa resistência a concentrações relativamente altas de SDS.

7.9.9 Verificação de N-glicosilação na quitinase recombinante produzida por *Pichia pastoris* KM71H

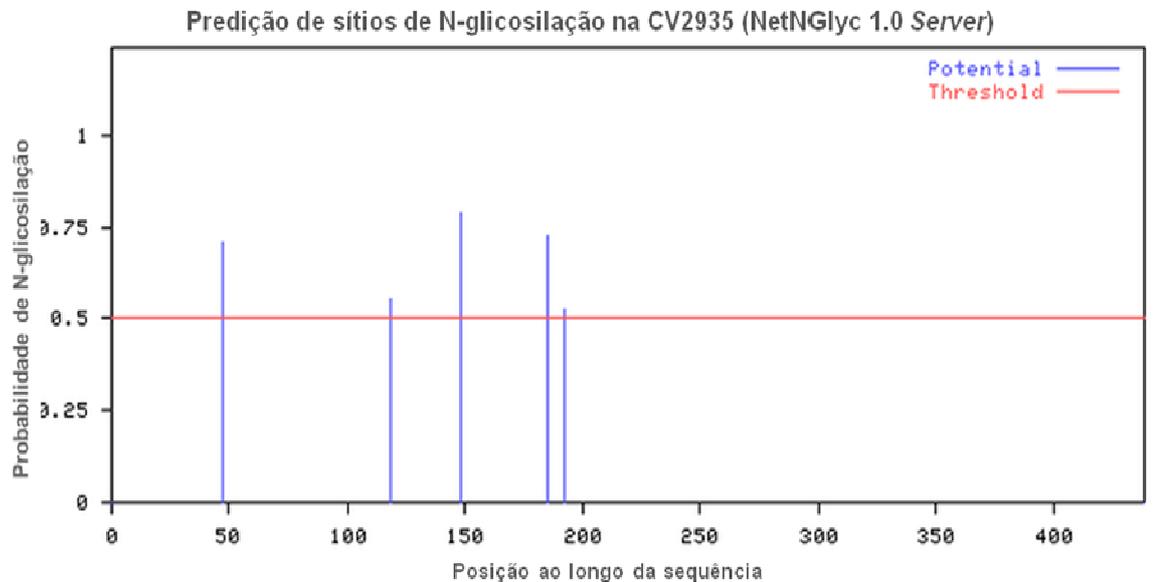
Uma característica importante da produção de proteína recombinante em *Pichia pastoris* é a sua eficiente capacidade de secretar as proteínas heterólogas. Logo, a passagem de proteínas através da via secretora permite que importantes eventos pós-traducionais aconteçam, tais como processamento de seqüências sinalizadoras, formação de ponte de dissulfeto, fosforilação e glicosilação. Glicanos podem ser covalentemente ligados ao nitrogênio do grupamento amida de resíduos de Asn (N-glicosilação), ao oxigênio do grupamento hidroxila de, tipicamente, resíduos de Ser ou Thr (O-glicosilação), e, em casos raros, ao carbono C2 do grupamento indol de Trp através de uma ligação C-C (C-manosilação). Os tipos de açúcares que compõem os oligossacarídeos, juntamente com a extensão e a estrutura desses polímeros, podem afetar a capacidade de dobramento de uma proteína, a sua atividade, e o seu comportamento imunogênico. Por essas características serem fundamentais para a utilização das proteínas heterólogas produzidas, a N-glicosilação em *P. pastoris* ainda é bastante estudada (MONTESINO et al., 1998; NOTHAFT; SZYMANSKI, 2010).

A seqüência deduzida de aminoácidos da quitinase CV2935 (*GenBank*, número de acesso AAQ60603), foi analisada com o uso da ferramenta *NetNGlyc 1.0 Server* (GUPTA;

JUNG; BRUNAK, 2004) para realização de uma busca por sítios putativos para *N*-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr) e, ocasionalmente, N-X-C (Asn-X-Cys).

Como observado na Figura 26, 5 sítios para *N*-glicosilação foram encontrados (⁴⁷Asn-Y-Thr⁴⁹, ¹¹⁸Asn-P-Ser¹²⁰, ¹⁴⁸Asn-V-Ser¹⁵⁰, ¹⁸⁵Asn-G-Ser¹⁸⁷ e ¹⁹²Asn-A-Thr¹⁹⁴; assumindo que o 1º resíduo da proteína é a metionina inicial, presente no peptídeo sinal da proteína nativa), e 3 deles, com valores altos de probabilidade de ocorrerem. Dos 3 mais prováveis, um sítio localiza-se no domínio de ligação a quitina e 2 sítios estão localizados no domínio catalítico da rCV2935.

Figura 26 – Saída gráfica da análise da sequência de aminoácidos deduzida de CV2935, utilizando a ferramenta *NetNGlyc*



EAEAEFACPGWAEGTAYKVGDVVSYNNAN**Y**TALVAHTAYVGANWNPAASPTLWTPGG
 SCAGGDPTPPTPPNPPTPPSPPPGNTVPFAKHALVGYWHNFAN**PS**GSAFPLSQVSAD
 WDVIVVAFADDAGNG**NVS**FTLDPAAAGSAAQFIQDIRAQQAKGKKVVLSLGGQ**NGS**VTL
 NN**AT**QVQNFVNSLYGILTQYGFIDLDLESGSGIVVGAPVVSNLVSAVKQLKAKIGPNF
 YLSMAPEHPYVQGGFVAYGGN WGAYLPIIDGLRDDLSVIHVQYYNNGGLYTPYSTGVL
 AEGSADMLVGGSKMLIEGFPIANGASGSFKGLRPDQVAFGVPSGRSSANS GFVTADTV
 AKALTCLTTLQCGSVKPAQAYPAFRGVM TWSINWDRRDGYTF SRPVAASLRQQPVAA
 QAGKKKAARATRTAWEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

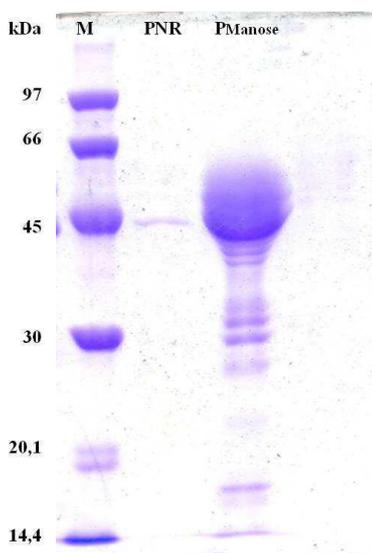
Na sequência deduzida de aminoácidos da CV2935 apresentada abaixo da saída gráfica, os possíveis sítios de glicosilação estão destacados em vermelho, o domínio de ligação a quitina da proteína sombreado em amarelo e o domínio catalítico sombreado em azul. As sequências sublinhadas representam os resíduos adicionados codificados no vetor de expressão utilizado (pPICZαA).

Assim sendo, foram realizados testes que comprovassem que esses sítios foram reconhecidos pela levedura e que, portanto, a *N*-glicosilação de fato ocorreu.

O experimento inicial foi uma cromatografia em matriz de ConA *Sepharose*, utilizando uma amostra do pico retido na matriz de quitina, eluído com ácido acético 0,1 M. A amostra, previamente dialisada contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,45, contendo NaCl 0,5 M, foi aplicada a uma coluna de ConA *Sepharose* 4B, previamente equilibrada com o mesmo tampão.

Na Figura 27, é possível verificar que a proteína recombinante foi eluída com D-manose 0,2 M, o que comprova que houve a interação da proteína com a matriz, devido à glicosilação presente na quitinase recombinante, produzida por *P. pastoris*.

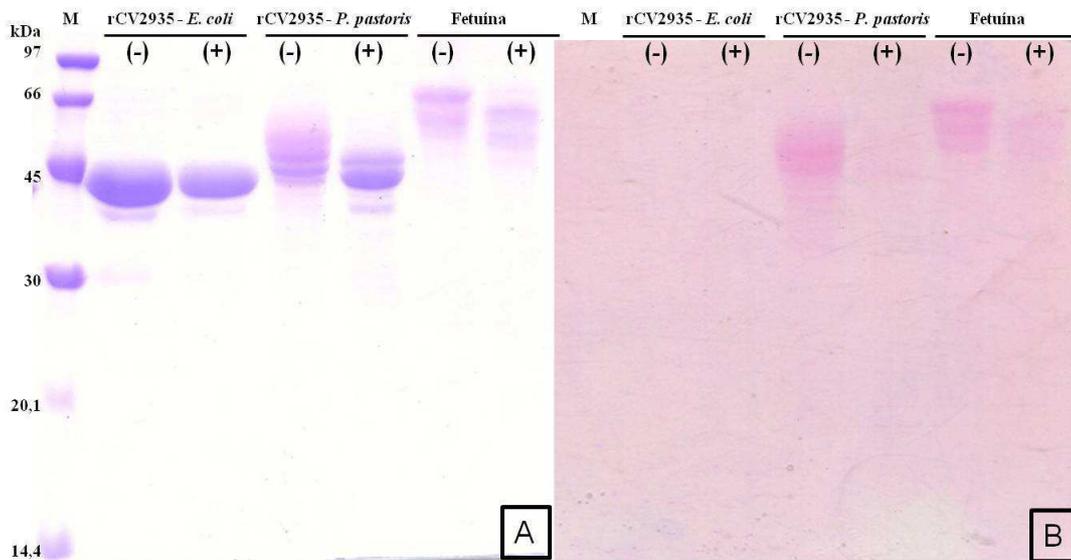
Figura 27 – Eletroforese em gel de acrilamida 15%, em condições desnaturantes e na presença de β -mercaptoetanol, dos picos obtidos na cromatografia em coluna ConA *Sepharose* 4B



Foi usado o Marcador (M) *Low Molecular Weight* (GE Healthcare). Legenda: PNR – pico não retido na coluna, eluído com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,45, contendo NaCl 0,5 M; Pmanose: pico retido eluído com manose 0,2 M.

Posteriormente, foi realizada uma reação de deglicosilação com a enzima *N*-glicosidase F recombinante de *Chryseobacterium meningosepticum* e a revelação do gel das amostras digeridas pelo método de Schiff. O resultado desse experimento está ilustrado na Figura 28, onde é possível observar que a amostra da rCV2935 produzida por *P. pastoris* não digerida reage com o Schiff e a amostra após digestão reage fracamente. O mesmo perfil foi encontrado para o controle positivo, a fetuína. Além disso, o mesmo gel, após revelação com reagente de Schiff, corado com *Comassie Brilliant Blue*, mostra que houve uma diminuição da massa da proteína glicosilada após digestão com a enzima *N*-glicosidase F, devido à retirada dos oligossacarídeos. A leve coloração rosa das bandas, mesmo após digestão com *N*-glicosidase, pode ser explicada pela possibilidade de haver *O*-glicosilação nas amostras.

Figura 28 – Detecção de N-glicosilação nas amostras das quitinases recombinantes, produzidas por *E. coli* e *P. pastoris*

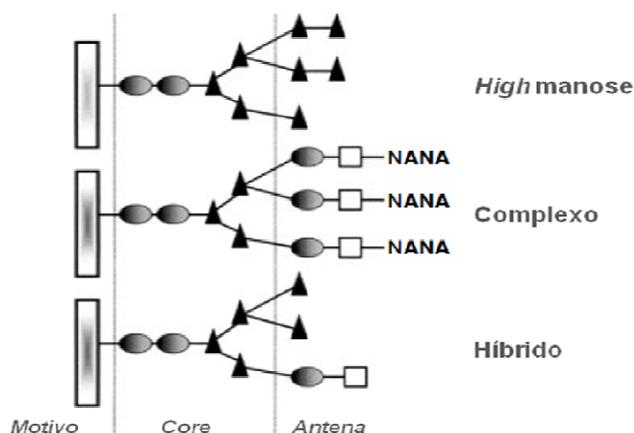


(A) Coramento do mesmo gel com *Coomassie Brilliant Blue*, evidenciando a diferença nas massas das proteínas após digestão com N-glicosidase. (B) Revelação de glicoproteínas pelo método de Schiff com os produtos da reação com a N-glicosidase. Na linha M – *Low molecular weight marker* - GE Healthcare. Os sinais (+) e (-) indicam as reações na presença e na ausência, respectivamente, da enzima N-glicosidase F recombinante de *Chryseobacterium meningosepticum*.

Assim sendo, analisando os resultados obtidos, conclui-se que, no processamento pós-traducional da rCV2935 produzida pro *P. pastoris*, a proteína foi glicosilada, e, por outro lado, observou-se que a quitinase recombinante, expressa em *E. coli*, não foi glicosilada.

A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais comuns realizadas por *P. pastoris*, e normalmente as cadeias de açúcar adicionadas são mais curtas que as de *S. cerevisiae*, tornando *P. pastoris* uma hospedeira muito mais atraente para a expressão de proteínas recombinantes. A N-glicosilação, em eucariotos, começa no lado citoplasmático do retículo endoplasmático (RE), com a geração de uma ramificação intermediária (heptassacarídeo). Este é translocado através do RE, iniciando a segunda fase do processo de síntese. Existem três classes de N-glicanos que são sintetizados pela adição co-traducional de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à cadeia polipeptídica, pela oligossacaril transferase; estes são compostos de $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$ (*high manose*), uma mistura de vários açúcares diferentes (complexo) ou uma combinação de ambos (híbrido), como ilustrado na Figura 29. Reações de adição e redução, enquanto a estrutura do carboidrato passa através do sistema RE e complexo de Golgi, resulta na estrutura do glicano final, que irá se encaixar em uma das três classes de N-glicanos descritas acima. No entanto, em fungos e leveduras, tais como *Pichia*, a cadeia oligossacarídica de proteínas secretadas é em grande parte inalterada e consiste em $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (MACAULEY-PATRICK, et al., 2005).

Figura 29 – As três classes de N-glicanos que são sintetizados pela adição co-traducional de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à cadeia polipeptídica, pela oligossacaril transferase, em *P. pastoris*.



Estes são: compostos de $\text{Man}_{5,6}\text{GlcNAc}_2$ (*high manose*), uma mistura de vários açúcares diferentes (complexo) ou uma combinação de ambos (híbrido).

A glicosilação de proteínas foi demonstrada pela primeira vez no final dos anos 1930 e muito tempo se pensou existir apenas em eucariotos. Hoje, ainda é uma questão um tanto negligenciada, mas já se sabe que ambos os tipos *N* e *O*-glicosilação ocorrem em *Archaea* e *Bacteria*. Nos últimos anos, é possível perceber progressos substanciais na descrição de enzimas envolvidas na vias de glicosilação de bactérias e archaea. Está se tornando claro que um melhor conhecimento das enzimas bacterianas responsáveis pela glicosilação, tais como algumas glicosiltransferases já identificadas, pode ter valor terapêutico, enquanto que a capacidade demonstrada para introduzir genes envolvidos nesse tipo de modificação pós-traducional em *E. coli* representa um grande passo na “glicoengenharia”. Já foi identificada *N*-glicosilação em *Campylobacter jejuni* (bactéria) e *Halobacterium salinarum* (archaea) e *O*-glicosilação em *Pseudomonas aeruginosa* 1244 (ABU-QARN; EICHLER; SHARON, 2008; NOTHAFT; SZYMANSKI, 2010).

7.9.10 Espectro de Dicroísmo Circular (CD)

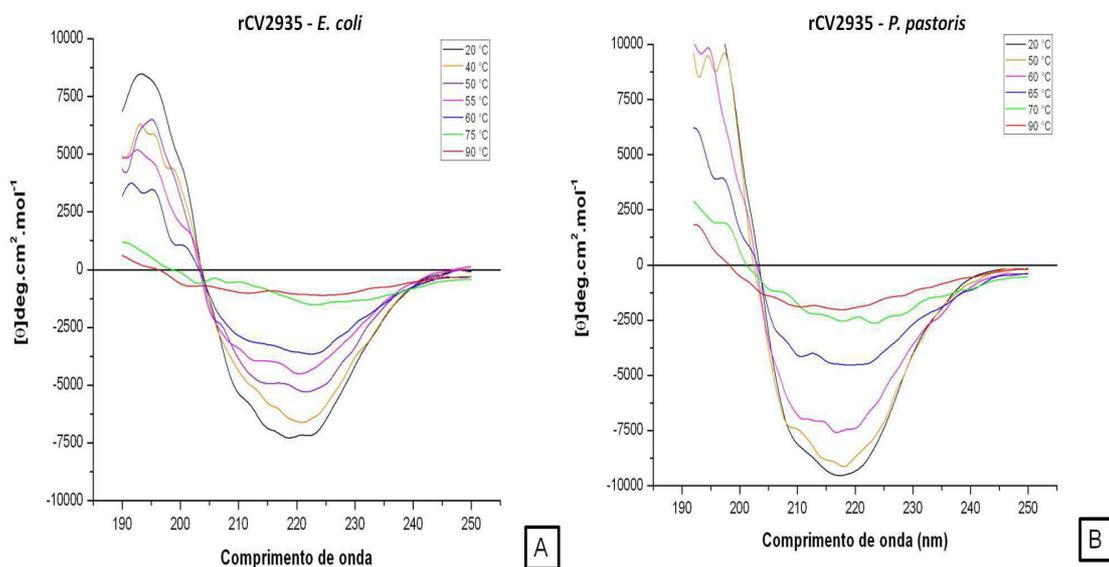
A técnica de dicroísmo circular (CD) baseia-se na absorção diferenciada da luz circular polarizada à esquerda e à direita por cromóforos que ou possuem quiralidade intrínseca ou são colocados em ambientes quirais. Proteínas possuem uma série de cromóforos que podem dar origem a sinais de CD característicos, com pequenas alterações exclusivas de cada proteína em estudo. Na região do extremo ultravioleta (240-180 nm), que

corresponde à absorção da ligação peptídica, o espectro de CD pode ser analisado para dar o conteúdo de estruturas secundárias, como conteúdo de α -hélice e folhas β , de determinada proteína (KELLY; PRICE, 2000).

A forma da curva do espectro, bem como os comprimentos de onda máximo e mínimo de emissão, fornecem informações estruturais da proteína. Assim, por exemplo, os picos presentes na faixa de comprimento de onda de 200-250 (UV-distante) são geralmente característicos de um espectro em forma de “W”, com picos em torno de 222 e 208 nm, sendo indicativo da presença de estruturas em α -hélice. Já um espectro em forma de “V”, com pico em torno de 217-220 nm, indica a presença de estruturas em folha β . Varreduras no intervalo de comprimento de onda de 250 a 300 nm podem fornecer informações sobre a estrutura terciária (RANJBAR; GILL, 2009).

Além de fornecer dados sobre estrutura secundária, a espectroscopia de dicroísmo circular é bastante utilizada para acompanhar a estabilidade de uma proteína quando submetida a diferentes temperaturas, pois os espectros da proteína enovelada e em sua conformação desnaturada são bem diferentes. Na Figura 30 pode-se observar a transição para a desnaturação das rCV2935, onde as proteínas foram incubadas por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 e 90 °C, com intervalos de 5 °C. A desnaturação da rCV2935 expressa em *E. coli* foi observada em temperaturas a partir de 60 °C e a desnaturação da rCV2935 expressa em *P. pastoris* foi observada em temperaturas acima de 65 °C, quando o espectro tende a zero.

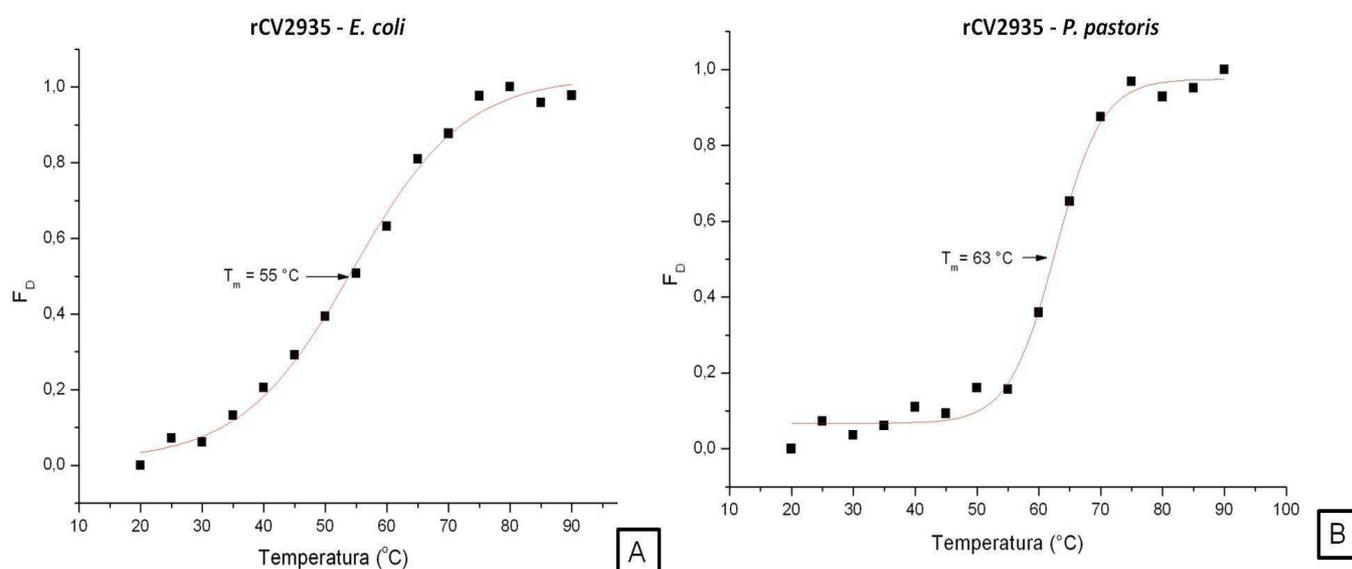
Figura 30 – Efeito da temperatura na estrutura secundária de rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, medido por dicroísmo circular



Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. Amostras das proteínas purificadas, em água, na concentração de 0,2 mg/mL, foram submetidas, por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 e 90 °C, com intervalos de 5 ° C. (A) rCV2935 produzida em *Escherichia coli*. (B) rCV2935 produzida em *Pichia pastoris*.

Pelos gráficos de desnaturação térmica, ilustrados na Figura 31, observa-se que a partir de 55 °C já ocorre a desnaturação de 50% das moléculas da rCV2935 produzida em *E. coli*, alterando sua conformação. Já para a rCV2935 produzida em *P. pastoris*, observa-se que a partir de 63 °C é que metade das moléculas de proteína ali presentes estão desnaturadas. Esse resultado encontrado está de acordo com o efeito da temperatura analisado por meio da atividade enzimática, utilizando quitina coloidal como substrato, das rCV2935, onde amostras da rCV2935-Ecoli tratadas com temperaturas a partir de 60 °C retiveram 28% de sua atividade enquanto que as amostras de rCV2935-Pichia, submetidas as mesmas condições, retiveram mais de 50%.

Figura 31 – Curvas de desnaturação térmica das rCV2935, produzidas nos diferentes sistemas heterólogos, obtidas com os dados de dicroísmo circular

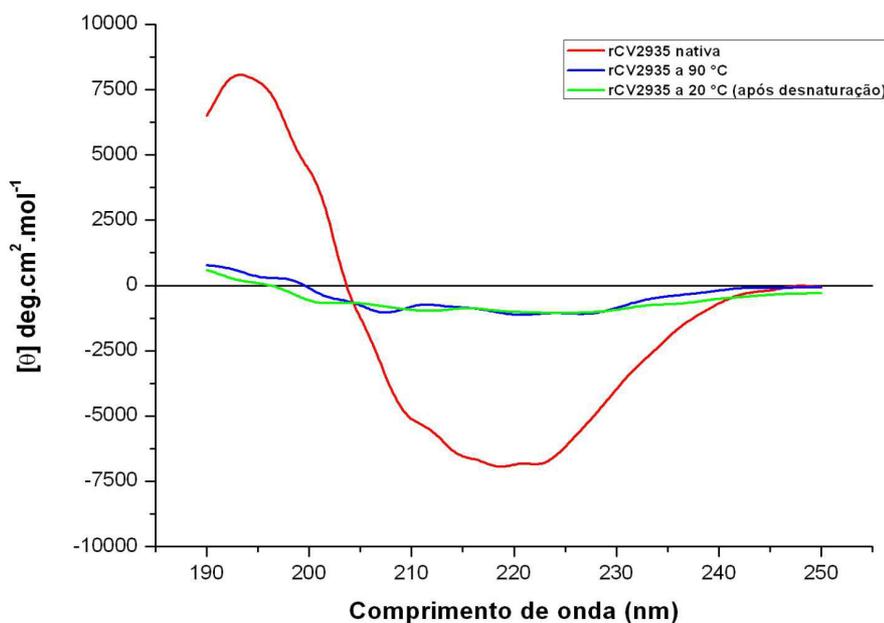


Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. Amostras das proteínas purificadas, em água, na concentração de 0,2 mg/mL, foram submetidas, por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 e 90 °C, com intervalos de 5 ° C. (A) rCV2935 produzida em *Escherichia coli*. (B) rCV2935 produzida em *Pichia pastoris*. F_D : fração de proteína desnaturada.

A fim de analisar se esse processo de desnaturação térmica era reversível, após o aquecimento das amostras até 90 °C, as amostras voltaram à temperatura inicial de 20 °C e novamente foram realizadas as medidas de CD. Como observado na Figura 32, a rCV2935

manteve uma conformação aleatória, o que comprova que a desnaturação térmica para a proteína recombinante em estudo não é reversível.

Figura 32 – Espectro de dicroísmo circular para avaliação da reversibilidade da desnaturação térmica

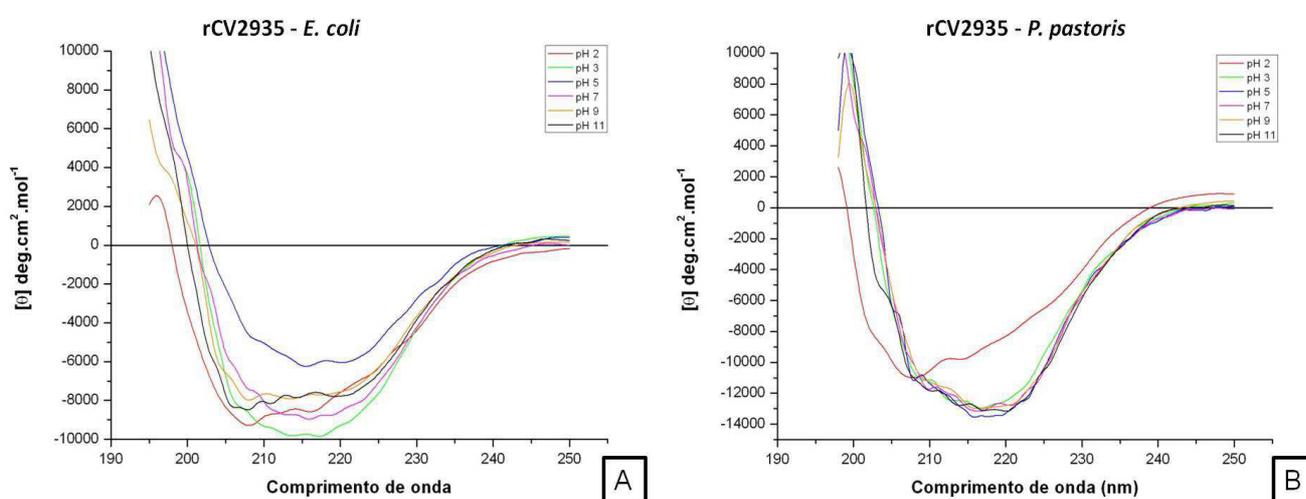


Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. Amostras da proteína, expressa em *E.coli*, purificada, em água, na concentração de 0,2 mg/mL, foi submetida, por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 e 90 °C, com intervalos de 5 ° C. Após a última incubação, retomou-se a temperatura inicial de 20 °C e foi realizada a medida de CD.

A bactéria psicrófila marinha *Moritella marina*, isolada de uma amostra levantada a partir de uma profundidade de 1200 m no norte do Oceano Pacífico, secreta várias quitinases em resposta a indução com quitina. Um gene que codifica para uma dessas enzimas quitinolíticas extracelulares foi clonado e a proteína expressa, de forma heteróloga, em *E. coli*. A endoquitinase recombinante, que pertence à família GH18, apresentou uma massa molecular de 60 kDa, e pH e temperatura ótimos de 5 e 28 °C, respectivamente. O mais interessante foi que, por meio de estudos calorimétricos, revelou-se que a proteína se desdobra de forma reversível a 65 °C. Essa reversibilidade da desnaturação térmica torna essa enzima adaptada ao frio e ideal para aplicações que visem alta atividade enzimática em baixas temperaturas (STEFANIDI; VORGIAS, 2008).

Os dados de CD das amostras das quitinases recombinantes em diferentes condições pH revelaram que a rCV2935, produzida por *E. coli*, preserva um enovelamento próximo ao nativo com conformações ligeiramente diferentes quando em pH extremos (2 e 11), onde é possível perceber um singelo deslocamento dos mínimos de emissão para comprimento de ondas menores (Figura 33). O aumento da elipticidade molar observada na amostra em pH 5 provavelmente indica uma desestruturação da molécula com uma leve alteração na estrutura secundária.

Figura 33 - Efeito do pH na estrutura secundária de rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, medido por dicroísmo circular



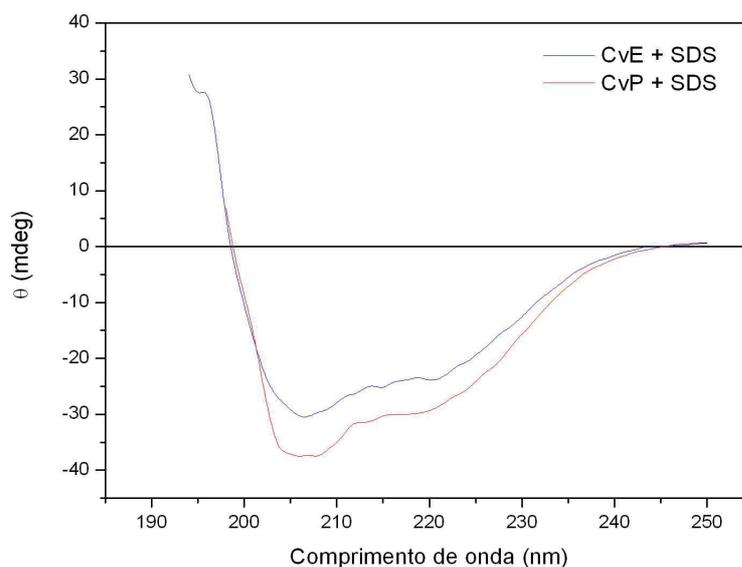
Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho óptico. Soluções concentradas das proteínas recombinantes foram diluídas, também para concentração de 0,2 mg/mL, nos seguintes tampões Glicina HCl pH 2 e pH 3, Acetato de sódio pH 5, Fosfato de sódio pH 7, Glicina NaOH pH 9 e Fosfato NaOH pH 11, todos na concentração de 50 mM, e incubadas por 30 min antes das medidas. (A) rCV2935 produzida em *Escherichia coli*. (B) rCV2935 produzida em *Pichia pastoris*.

Já para a rCV2935 produzida por *P. pastoris*, percebe-se que a amostra preservou sua estrutura secundária de forma semelhante para todos os pH testados, com exceção do pH 2, onde houve um deslocamento do mínimo de emissão, também para comprimento de ondas menores.

Quanto às medidas de CD na presença de SDS, em uma concentração final de 1%, observa-se na Figura 34, que os espectros foram muito semelhantes aos espectros nativos. Como já foi apresentado anteriormente, não foi detectada nenhuma atividade quitinásica na presença de SDS, para concentrações finais de 0,5, 1 e 2%, logo, esperava-se que os espectros obtidos na presença de SDS seriam característicos de desnaturação protéica. Portanto, conclui-se que a ausência de atividade endoquitinásica na presença do SDS não pode ser

justificada pela desnaturação da proteína, mas por uma interação do SDS com o domínio de ligação a quitina, rico em resíduos hidrofóbicos, e até mesmo com o restante da proteína, cobrindo-a como em uma micela, o que possivelmente impede a ligação do substrato no domínio de ligação e, conseqüentemente, a interação do substrato com o domínio catalítico da rCV2935.

Figura 34 - Efeito do SDS na estrutura secundária de rCV2935, produzida nos diferentes sistemas heterólogos, medido por dicroísmo circular



Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. Amostras purificadas das proteínas foram incubadas com SDS, para uma concentração final de 1%, por 30 min e submetidas às medidas de CD. CvE representa CV2935 produzida em *E. coli* e CvP representa CV2935 produzida em *P. pastoris*.

Lin e colaboradores (2009), a fim de explorar a significância funcional e estrutural da região C-terminal de uma quitinase de *Aeromonas caviae* D1 (AcD1ChiA), realizaram estudos comparativos entre uma AcD1ChiA nativa e uma mutante com a região C-terminal truncada por meio de mutagênese. Para isso, as técnicas de dicroísmo circular e fluorescência foram utilizadas. Os autores observaram que os espectros de fluorescência foram muito semelhantes, com pico máximo de emissão em 333 nm, e que a forma do espectro de CD foi similar, sendo percebido apenas um pequeno decréscimo da intensidade a 215-230 nm para a enzima mutada, sugerindo que a remoção dos 259 resíduos de aminoácidos da porção C-terminal não afetou nem a estrutura nem a atividade da enzima.

7.9.11 Espectro de Fluorescência

Por meio da espectroscopia de fluorescência é possível analisar a estrutura terciária de uma proteína em solução, graças à fluorescência intrínseca dessas biomoléculas. Existem 3 aminoácidos que absorvem luz UV-visível e que podem apresentar fluorescência: a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. Fenilalanina exibe os menores comprimentos de onda tanto de absorção como de emissão (282 nm). A emissão de tirosina em água ocorre em 303 nm e é relativamente insensível a polaridade do solvente. Já o máximo de emissão de triptofano em água ocorre próximo dos 350 nm e é altamente dependente da polaridade do ambiente local (LAKOWICZ, 2006).

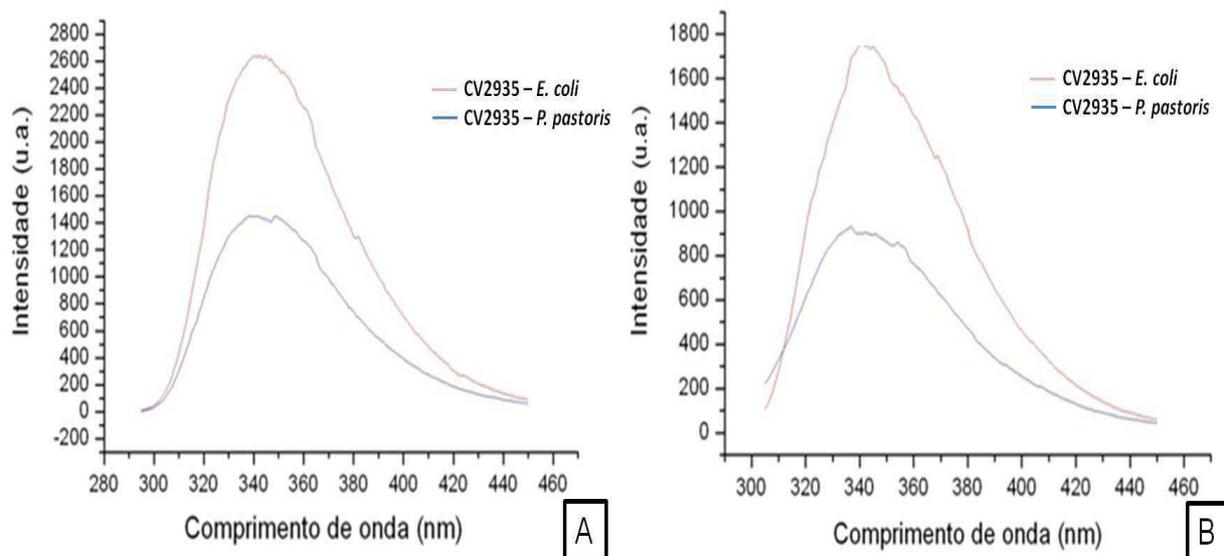
O triptofano, em particular, tem se mostrado bastante conveniente nesse tipo de estudo, dada a dependência entre suas propriedades fluorescentes e o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de sua vizinhança. Mudanças nos espectros de emissão do triptofano muitas vezes ocorrem em resposta a transições conformacionais, ligação a substrato, ou desnaturação. Por exemplo, quando a proteína está desnaturada, os seus resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão expostos, e se caracteriza por emitir um pico de fluorescência em torno de 355-360 nm, que é referente ao máximo de emissão de fluorescência do triptofano em solução (LAKOWICZ, 2006).

Os resultados obtidos para as amostras de rCV2935, produzida nos dois sistemas, no estado nativo, indicaram que as proteínas recombinantes foram produzidas em suas conformações enoveladas, uma vez que o espectro de fluorescência obtido após excitação a 280 nm (Figura 35-A), com varredura de 295 a 445 nm, apresentou um máximo de emissão em 342 nm, enquanto o espectro obtido com excitação a 295 nm (Figura 35-B) com varredura de 305 a 445 nm, revelou um máximo de emissão a 340 nm.

Esses valores máximos de emissão encontrados são um indicativo que tanto a rCV2935-Ecoli como a rCV2935-Pichia estão em sua conformação nativa, mostrando que os nove resíduos de triptofano estão interiorizados ou parcialmente expostos na superfície da proteína, não estando completamente expostos à solução aquosa.

É possível observar que, embora ambas as proteínas tenham apresentado os mesmos picos máximos de emissão, a intensidade da emissão da rCV2935-Ecoli é maior que a da rCV2935-Pichia, possivelmente devido a glicosilação da quitinase expressa na levedura. Os oligossacarídeos presentes na superfície da proteína atuaram como *quencher*s, diminuindo a intensidade da emissão.

Figura 35 - Espectros de fluorescência nativos das rCV2935



Os espectros foram obtidos em fluorímetro ISSK2, utilizando-se cubeta de 0,5 mL, com caminho ótico de 1 cm. As proteínas recombinantes foram aplicada em uma concentração de 0,2 mg/mL, dissolvidas tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo NaCl 100 mM. (A) Excitação a 280 nm; (B) Excitação a 295 nm.

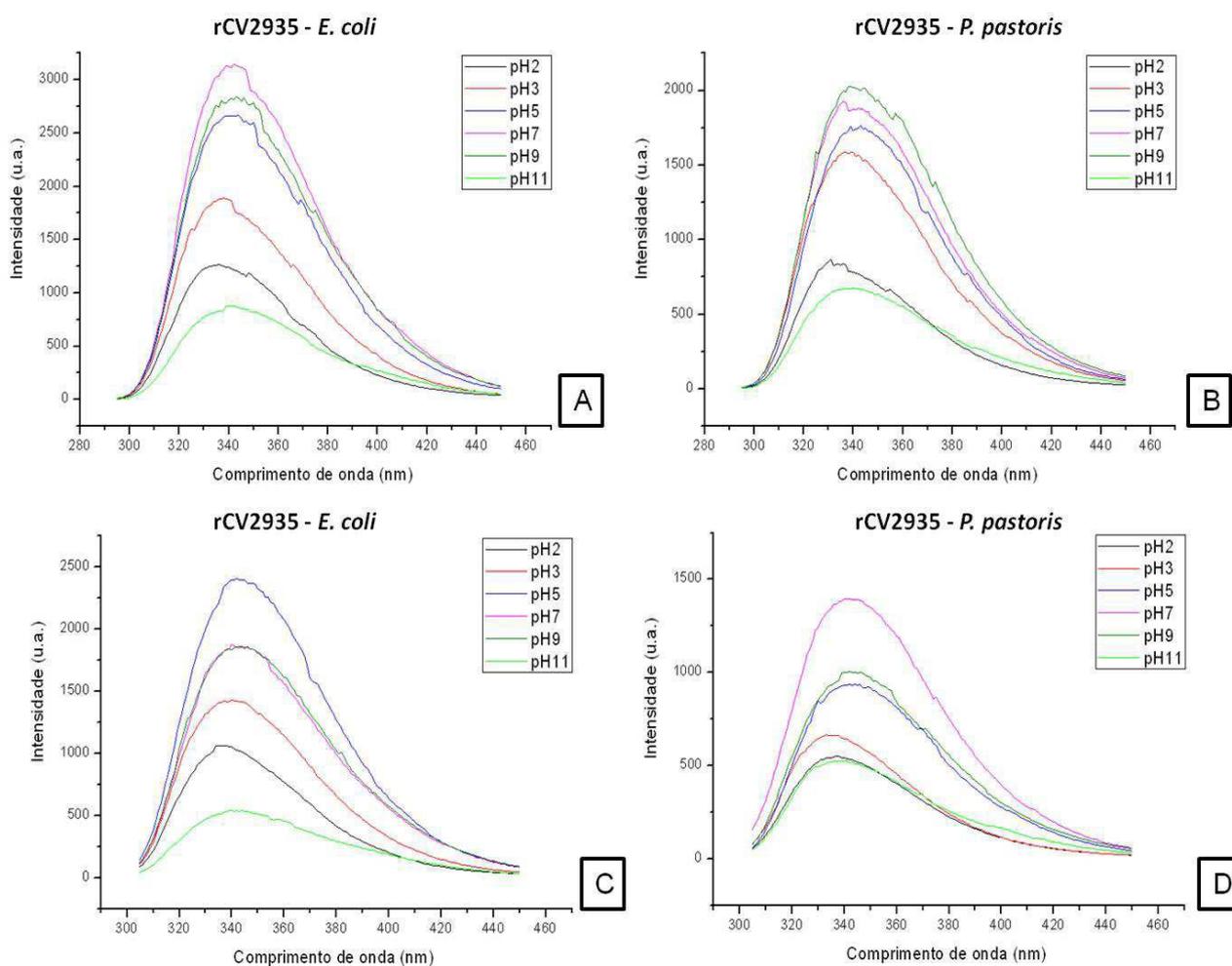
Os *quenchers* são uma grande variedade de moléculas ou íons que podem atuar como “ladrões” da fluorescência, diminuindo a intensidade da emissão. Essas substâncias incluem, por exemplo, o iodeto, o oxigênio e a acrilamida (LAKOWICZ, 2006).

A variabilidade na intensidade de emissão de determinada proteína tem sido uma questão confusa por muitas décadas. As razões para essas variações agora que começam a ser compreendidas, mas ainda não existe um único fator que explique todas as características apresentadas em um espectro. O que se sabe até o momento são alguns fatores que determinam a emissão dos resíduos de triptofano: *quenching* por transferência de prótons de grupos amino carregados localizados próximos ao resíduo de triptofano; *quenching* por aceptores de elétrons tais como grupos carboxil protonados; *quenching* por transferência de elétrons por amidas e pontes dissulfeto; *quenching* por transferência de elétrons por ligações peptídicas e transferência de energia por ressonância entre os resíduos de triptofano. Vale ressaltar que resíduos de lisina e histidina podem atuar com *quenchers* (LAKOWICZ, 2006).

A análise dos espectros de fluorescência das quitinases recombinantes em tampões com diferentes valores de pH, ilustrada na Figura 36, mostra que há diferenças significativas na intensidade de emissão e um sutil deslocamento do máximo de emissão para comprimento de ondas menores em pH extremos (como pH 2 e 11).

Experimentos de fluorescência em diferentes pH realizados com uma osmotina isolada do látex de *Calotropis procera* mostraram um perfil semelhante ao encontrado nos

Figura 36 - Espectros de fluorescência das rCV2935 em diferentes pHs.



Os espectros foram obtidos em fluorímetro ISSK2, utilizando-se cubeta de 0,5 mL, com caminho ótico de 1 cm. As proteínas recombinantes foram aplicada em uma concentração de 0,2 mg/mL, dissolvidas em tampões com diferentes pH. (A) e (B) Excitação a 280 nm; (C) e (D) Excitação a 295 nm.

espectros das rCV2935, produzidas por *E. coli* e *P. pastoris*. Foi observado que a osmotina CpOsm, dissolvida em diferentes condições de pH, deu origem a espectros idênticos em termos de emissão máxima, revelando a estabilidade estrutural da proteína. Porém diferenças nas intensidades dos picos foram percebidas, e os autores atribuíram essas diferenças a diferentes estados de protonação da cadeia lateral de alguns resíduos de aminoácidos ou o efeito de *collisional quenching* (FREITAS et al., 2011).

De fato, a intensidade do sinal de emissão da tirosina e do triptofano podem ser afetados pelo estado de ionização dos grupamentos amino e carboxil nesses aminoácidos (LAKOWICZ, 2006).

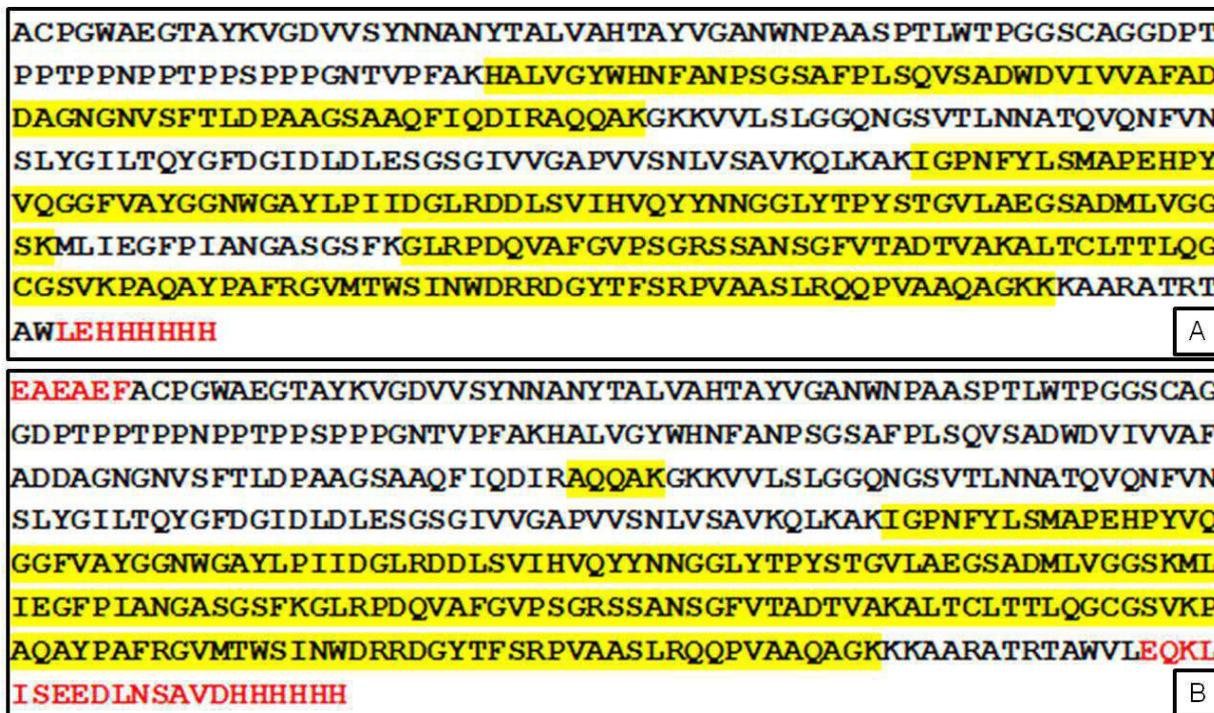
7.9.12 Espectrometria de massa

A fim de avaliar se houve alguma modificação na sequência de aminoácidos, amostras purificadas da quitinase recombinante produzida em *E. coli* e em *P. pastoris*, foram digeridas e submetidas a análise por espectrometria de massa.

Ambas as proteínas foram identificadas como “*Probable chitinase A of Chromobacterium violaceum* GN CV 2935”, como esperado. O resultado, ilustrado na Figura 37, demonstra que 55 e 42% da sequência da quitinase recombinante produzida por *E. coli* e por *P. pastoris*, respectivamente, foi identificada por espectrometria de massa.

Não foi observada nenhuma diferença entre os resíduos identificados e a sequência deduzida das proteínas recombinantes, o que sugere que não houve nenhuma modificação na sequência de DNA produzida pela DNA polimerase, ou até mesmo mutações eventuais, durante as etapas de clonagem. Além disso, confirma também a eficiência da maquinaria de tradução de ambos os sistemas heterólogos utilizados.

Figura 37 – Resíduos identificados por espectrometria de massa das amostras de rCV2935, produzida em *E. coli* e *P. pastoris*, digeridas com tripsina



(A) Sequência deduzida da CV2935 produzida em *E. coli*. (B) Sequência deduzida da CV2935 produzida em *P. pastoris*. Os resíduos sombreados em amarelo foram identificados por espectrometria de massa, utilizando o espectrômetro *Synapt HDMS* ESI-Q-TOF (Waters). Em vermelho, resíduos codificados nos vetores de expressão utilizados.

7.9.13 Cristalização e Resolução da estrutura da rCV2935

Na triagem na qual foram testadas diversas condições, apareceram cristais, apenas da rCV2935 produzida em *P. pastoris*, e na concentração de 20 mg/mL, na condição de 0,1 M de Tris-HCl pH 8,5 e 0,7 M de citrato de sódio dihidratado (kit SaltRX) (Figura 38).

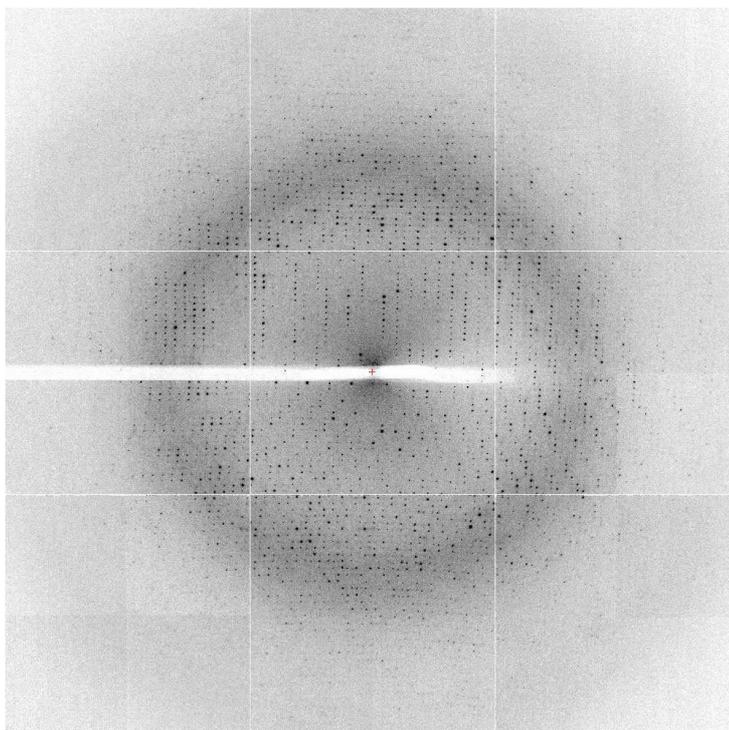
Figura 38 – Cristais da rCV2935, produzida em *P. pastoris*, crescidos na condição de 0,1 M de Tris-HCl pH 8,5 e 0,7 M de citrato de sódio dihidratado.



Todos os cristais foram testados em temperatura criogênica (100 K), crioprotetidos com adição de etilenoglicol 20% (v/v) da solução de cristalização a qual o cristal foi obtido. Os melhores cristais foram escolhidos e submetidos à difração de raios-x na linha I04 do *UK's National Synchrotron* (Diamond, DLS, Oxfordshire, UK).

O conjunto de dados foi coletado a um comprimento de onda de 0.97950 Å. A Figura 39 ilustra o padrão de difração dos cristais da rCV2935-*Pichia*.

Figura 39 – Padrão de difração de raios X dos cristais obtidos de rCV2935, produzida em *P. pastoris*.



A estrutura tridimensional da quitinase recombinante foi determinada a uma resolução de 2.1 Å. A proteína cristalizou no grupo espacial $P4_32_12$ e apresentou 8 moléculas por cela unitária.

Para a estrutura da rCV2935-*Pichia*, observou-se 97,57% nas regiões preferidas e nenhum resíduo em regiões não permitidas do diagrama de Ramachandram. A completude obtida foi de 96,9% e redundância de 4.9. A Tabela 5 mostra todos os parâmetros referentes às estatísticas de coleta e processamento dos dados da difração de raios X da quitinase recombinante rCV2935 produzida em *Pichia pastoris*.

A cada ciclo de refinamento o R_{factor} e R_{free} apresentaram valores cada vez mais baixos, e aproximados, e com a adição de 330 moléculas de água, resultou em valores finais de R_{factor} e R_{free} de 16,66% e 18,79%, respectivamente. O R_{factor} é uma medida de similaridade entre o modelo cristalográfico usado e os dados experimentais obtidos com a difração de raios-X. Em outras palavras, é uma medida de quão bem a estrutura refinada prevê os dados observados. Como R_{factor} pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios-X, uma pequena porcentagem das reflexões é excluída do refinamento e utilizada como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator chamado R_{free} que é isento de minimização artificial. Logo, todas as etapas de refinamento são monitoradas a fim de se obter valores compatíveis para estruturas de qualidade estrutural: R_{factor} abaixo de 20% e R_{free} o mais próximo de R_{factor} (ESTEVEZ, 2010).

A completude e o R_{symm} são parâmetros de medida da qualidade dos dados coletados. A completude representa a porcentagem do número de reflexões observadas em relação ao número de reflexões possíveis para uma determinada resolução, que está limitada pela qualidade do cristal. Uma completude de 100% é o resultado desejável, com a maioria das reflexões medidas várias vezes. Na realidade, todas as medidas de um mesmo ponto não apresentam a mesma intensidade, dependendo da orientação do cristal. R_{symm} por sua vez, é um parâmetro que relaciona as medidas de intensidade de reflexões simetricamente relacionadas de imagens ou conjunto de dados diferentes (McREE; 1993).

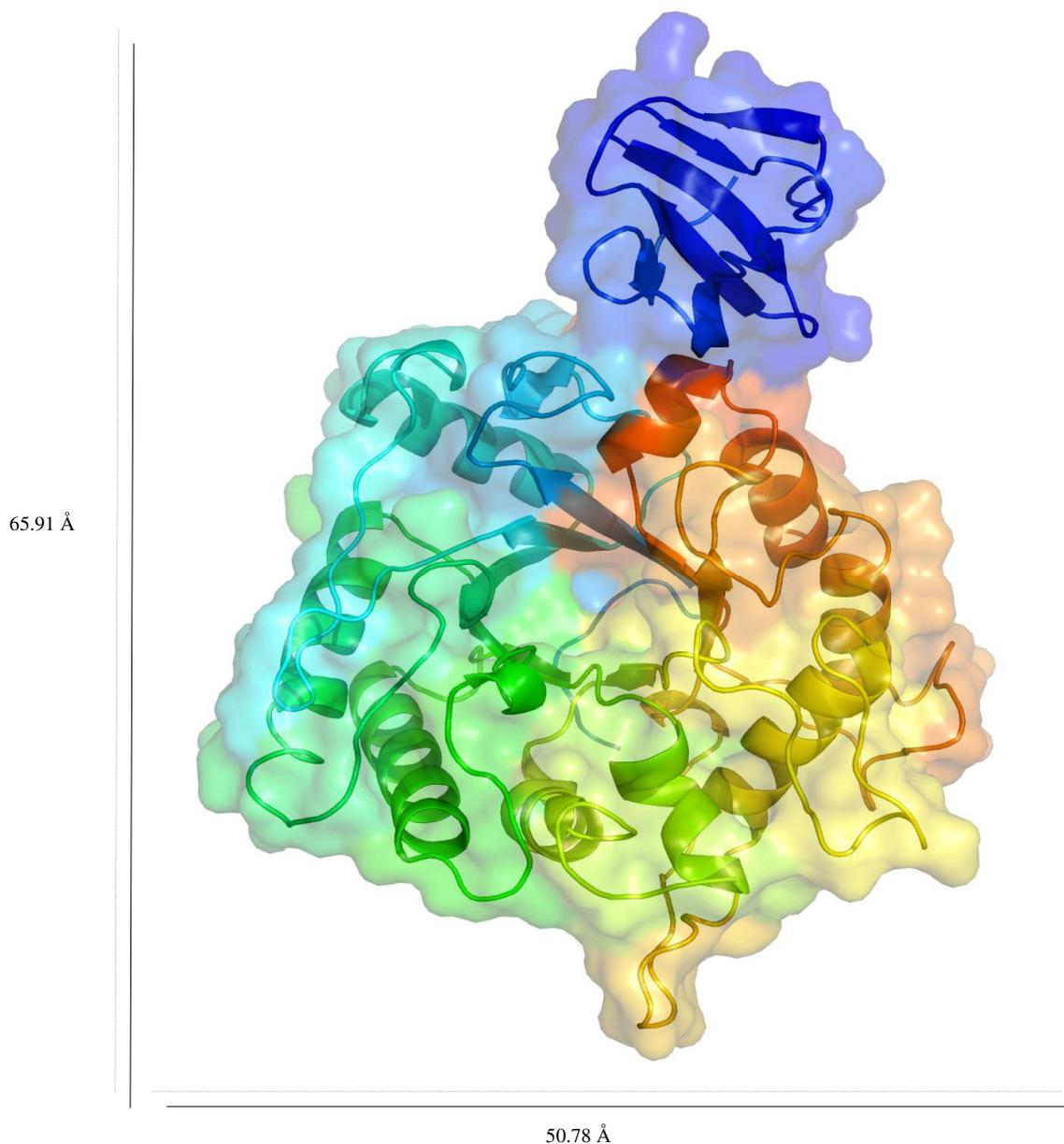
Tabela 5 - Estatísticas da Coleta de dados e Refinamento

Coleta de dados	
Grupo especial	P4 ₃ 2 ₁ 2
Dimensões de cela unitária (Å) <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> .	120.488; 120.48; 106.41
Detector	ADSC QUANTUM 315
Fonte de raios-X	DIAMOND I04
Comprimento de onda (Å)	0.97950
Intervalo de Resolução (Å)	53.88 – 2.17 (2.23 – 2.17)
Redundância	4.9 (5.0)
<i>R</i> _{meas} (%)	9.0 (74.0)
<i>R</i> _{symm} (%)	4.0 (32.5)
Completeza (%)	96.9 (98.4)
Número de reflexões totais	200193 (14946)
Número de reflexões únicas	40464 (3011)
I / σ (I)	14.7 (2.3)
Parâmetros de refinamento	
Reflexões utilizadas para refinamento	40433
<i>R</i> _{factor} (%)	16.66
<i>R</i> _{Free} (%)	18.79
Número de átomos na proteína	2772
Número de moléculas de água	330
Número de átomos de ligantes	15
Ramachandran Plot	
Regiões favorecidas (%)	97.57
Resíduos em regiões desfavorecidas (%)	0
RMSD para geometria ideal	
Distância de ligação (Å)	0.007
Ângulo de ligação (°)	1.117

7.9.14. Análise da estrutura tridimensional da CV2935

O modelo final da estrutura da quitinase recombinante de *C. violaceum*, produzida em *P. pastoris*, com domínio de ligação à quitina e o domínio catalítico resolvidos, a uma resolução de 2.1 Å, compreende os resíduos 25 a 396, e está ilustrado na Figura 40.

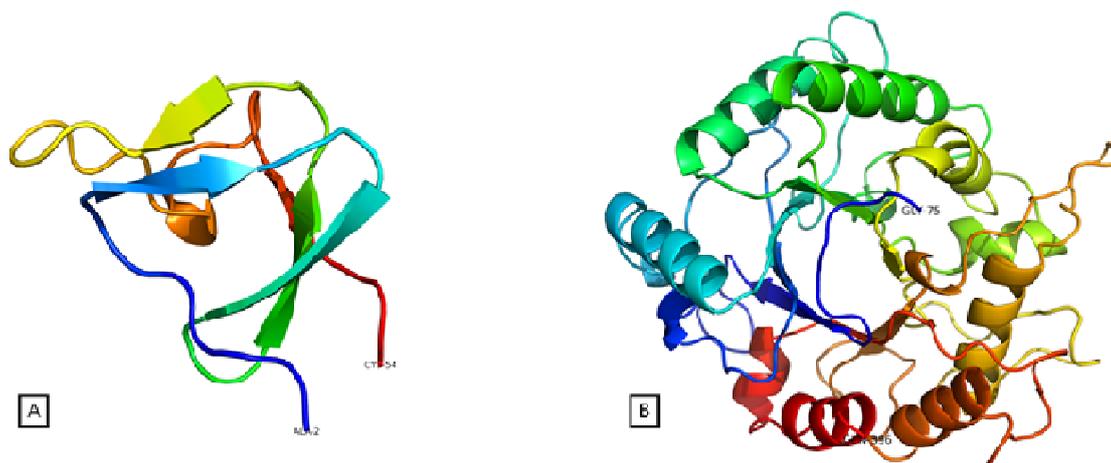
Figura 40 – Estrutura tridimensional da rCV2935



Como ilustrado na figura 41-B, o domínio catalítico das quitinases GH18, como é o caso da rCV2935, tipicamente adotam um barril TIM (triose-fosfato isomerase) (β/α)₈ e usam o mecanismo de hidrólise do tipo substrato-assistido com duplo-deslocamento, levando a retenção da configuração do carbono anomérico (TEWS et al., 1997; SYNSTAD et al.,

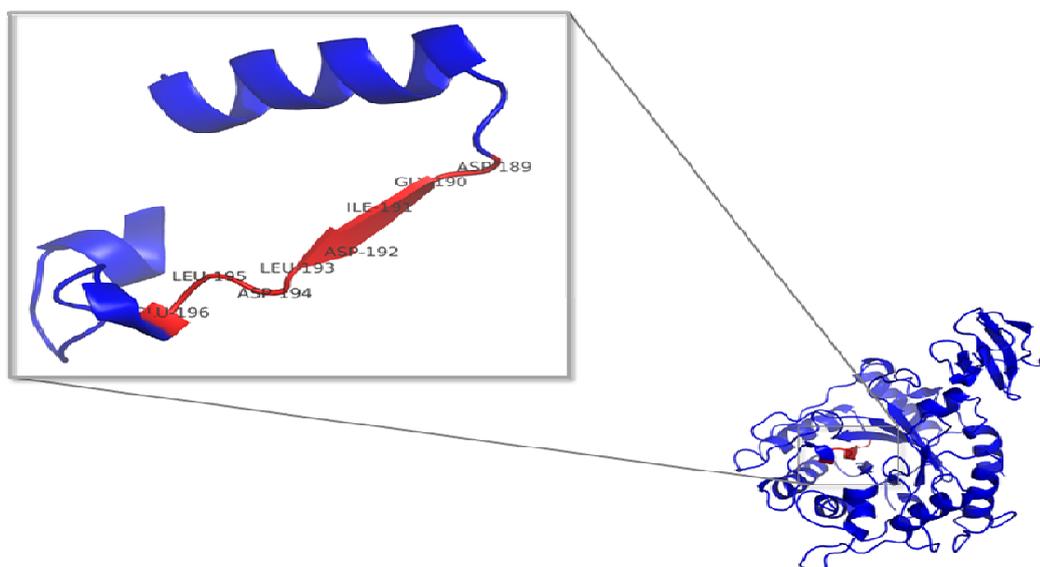
2004). O segmento DxxDxDxE forma a fita $\beta 4$ do barril (β/α)₈ e constitui o *core* do domínio catalítico, no qual o resíduo de ácido glutâmico (Glu²²⁰ na estrutura primária de CvChi45) é o doador de prótons essencial para a catálise (Figura 42) (VAN AALTEN et al, 2000; SYNSTAD et al., 2004).

Figura 41 – Estrutura tridimensional dos domínios presentes na molécula da quitinase rCV2935



(A) Domínio de ligação à quitina de tipo 3 - ChBD_{CvChi45} (B) Domínio catalítico - CatD_{CvChi45}.

Figura 42 – Ilustração evidenciando a seqüência consenso (DXXDXDXE), comum às quitinases da família GH18



No sítio ativo do domínio catalítico da rCV2935, esse motivo é absolutamente conservado (DGIDLLE), como observado em vermelho.

Para algumas quitinases, tais como ChiA1 de *B. circulans* WL-12, também tem sido demonstrado que um ChBD não-catalítico é importante para a interação da enzima com quitina insolúvel e é crucial para a hidrólise eficiente das fibras de quitina pelo domínio catalítico de ChiA1 (WATANABE et al., 1994; HASHIMOTO et al., 2000). Tem sido demonstrado, em outras quitinases bacterianas, que esses ChBDs auxiliares potencializam a capacidade da enzima de adsorção e atividade hidrolítica contra quitina insolúvel (WU et al., 2001). Portanto, é provável que, em CvChi45, o ChBD N-terminal exerça um efeito semelhante.

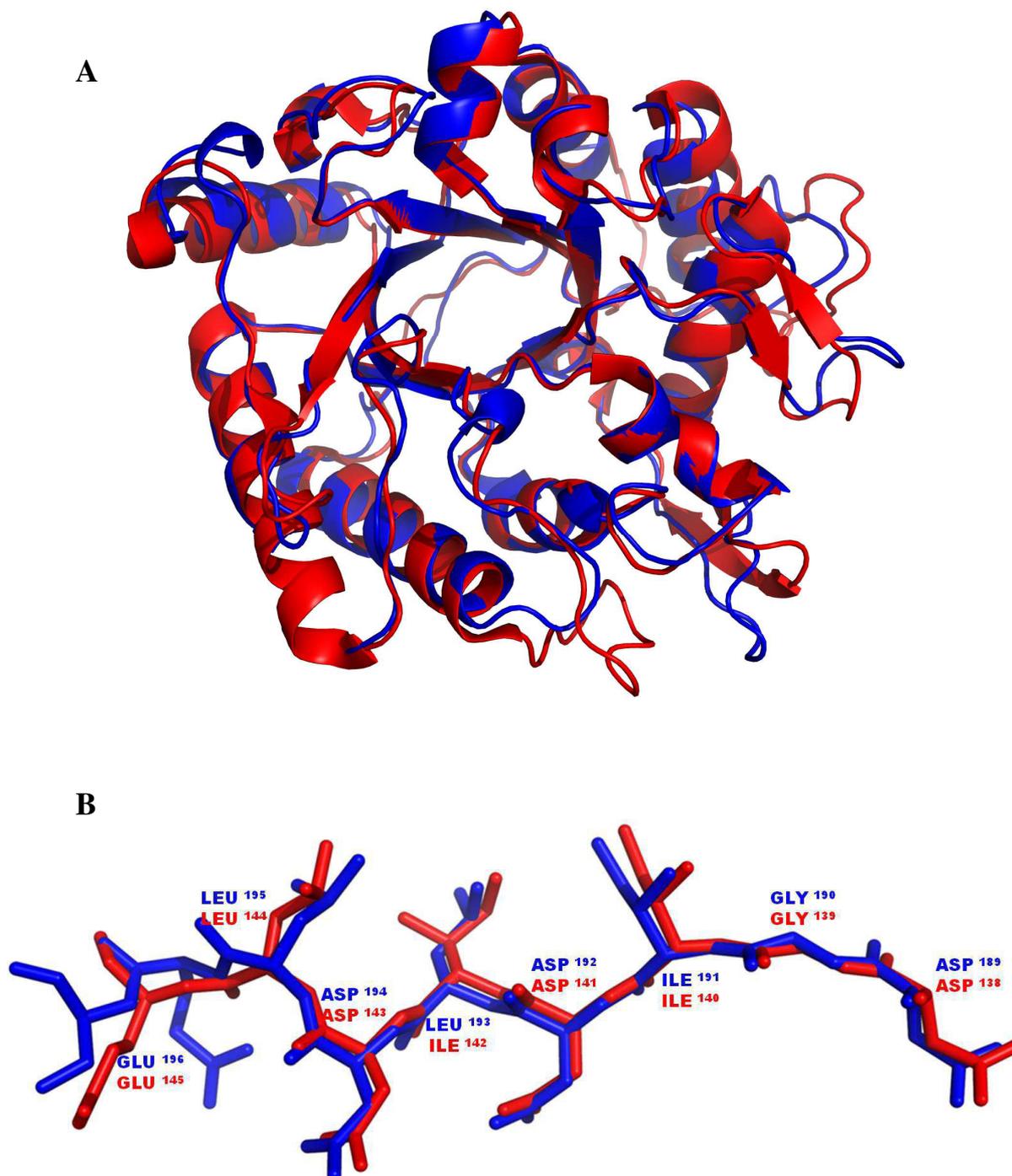
Evidências experimentais sugerem que os peptídeos *linkers*, que se localizam entre os domínios, formam “dobradiças” estendidas, e flexíveis, as quais determinam a orientação relativa dos domínios de ligação e catalítico, otimizando assim a interação com substrato e catálise eficiente da enzima sobre substratos insolúveis (SHEN et al., 1991; KEZUKA et al., 2006). Portanto, não foi possível resolver a estrutura do *linker* entre o domínio de ligação e o domínio catalítico da rCV2935 provavelmente devido à essa flexibilidade característica do mesmo, do qual não foi possível sequer obter mapa de densidade eletrônica.

Uma semelhança significativa (41,2% de identidade na sequência) foi encontrada entre o CatD de CvChi45 e o domínio catalítico da quitinase de *B. cereus* NCTU2 (ChiNCTU2), a qual compreende um único domínio catalítico sem domínios acessórios, e cuja estrutura tridimensional foi recentemente resolvida (HSIEH et al., 2010) e, então, utilizada como molde para substituição molecular e resolução da rCV2935.

A Figura 43-A ilustra a sobreposição do domínio catalítico da quitinase recombinante de *C. violaceum* com o domínio catalítico da quitinase de *Bacillus cereus* Nctu2, que apresenta um R.m.s.d. (*Root mean square deviation*) de 0.862 Å, demonstrando uma alta similaridade estrutural entre as quitinases, bem como uma sobreposição do padrão de “assinatura” das quitinases da família GH18 de ambas as enzimas, que diferem em apenas um resíduo de aminoácido (Figura 43-B).

Além disso, as estruturas 3D da ChiNCTU2 do tipo selvagem e mutante, complexada com N-acetil quitina-oligossacarídeos têm permitido a identificação de outros resíduos “chaves” no sítio ativo da molécula. Estes resíduos de ChiNCTU2 desempenham papéis cruciais na ligação ao substrato e catálise também são conservados na sequência do CatD_{CvChi45} (Asn¹¹⁸, Gln¹⁸⁴, Asp²¹⁸, Glu²²⁰, Glu²⁵⁷, Gln²⁹², Tyr²⁹⁴, Asn²⁹⁵, Ala³⁵⁶, Trp³⁹⁷ e Trp⁴⁰¹).

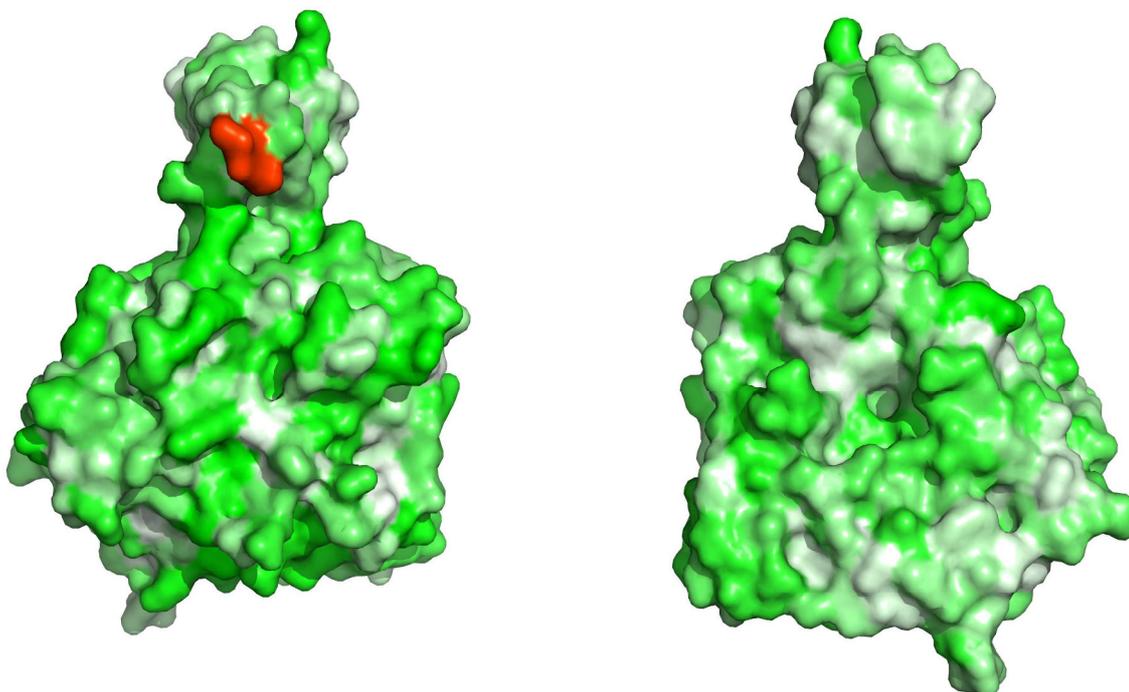
Figura 43 – Sobreposição da rCV2935 com a estrutura da quitinase de *Bacillus cereus* Nctu2



(A) Sobreposição dos domínios catalíticos. Em azul, a estrutura da rCV2935 e, em vermelho, a estrutura da quitinase de *Bacillus cereus* Nctu2, disponível no banco de dados, sob código de acesso 3N17. (B) Sobreposição do padrão de assinatura (DXXDXDXE), comum às quitinases da família GH18, de ambas as enzimas.

Na estrutura da rCV2935-*Pichia* foi encontrado um glicano no resíduo de Asp⁴⁷ localizado no domínio de ligação a quitina, resultado da glicosilação realizada pela levedura, fácil de ser visualizado quando o modelo é apresentado com sua superfície de hidrofobicidade (Figura 44). Regiões mais esbranquiçadas representam as regiões mais hidrofóbicas da proteína, enquanto que as esverdeadas são regiões onde predominam aminoácidos polares.

Figura 44 – Perfil de hidrofobicidade da rCV2935



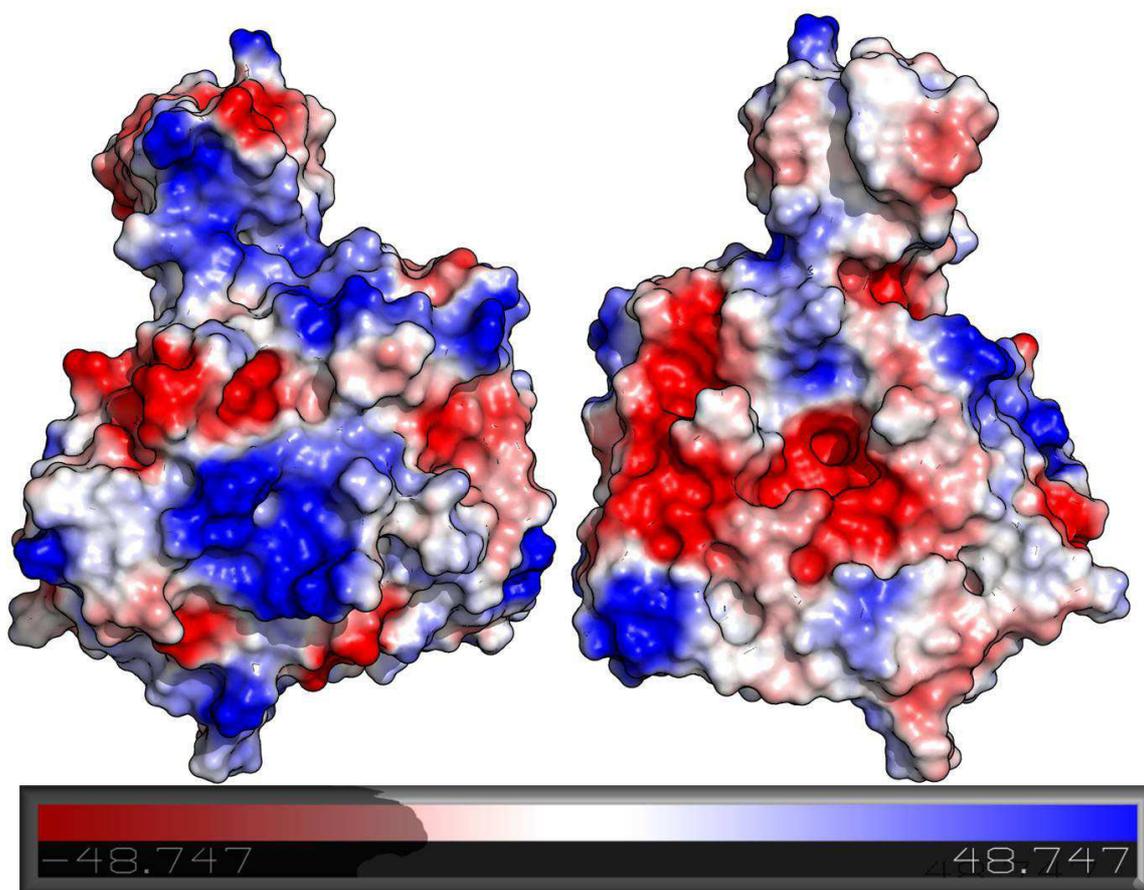
Em rosa, o glucano adicionado pela levedura *P. pastoris* à quitinase recombinante de *Chromobacterium violaceum*. As figuras representam a molécula “frente e verso” e regiões mais esbranquiçadas representam as regiões mais hidrofóbicas da proteína, enquanto que as esverdeadas são regiões onde predominam aminoácidos polares.

Em cristalização de proteínas, modificações pós-traducionais são muitas vezes consideradas um aborrecimento. Espera-se que elas introduzam microheterogeneidade na proteína e, além disso, no caso das modificações químicas maiores, tais como glicosilação, aumentem a entropia de superfície. Por um lado, esses fenômenos parecem ser ruins para o crescimento de cristal. Por outro, muitas dessas modificações são vitais para o correto dobramento e funcionamento adequado das proteínas. Porém, pesquisas no banco de dados de proteínas (PDB RSCB) revelam que muitas centenas de estruturas carregando modificações, tais como carboidratos, já foram depositadas. Inclusive, o número de estruturas de proteínas

glicosiladas cristalizadas com sucesso, obtidas por expressão heteróloga ou diretamente isoladas de sua fonte natural, ultrapassa claramente os casos em que cristais foram obtidos somente após completa deglicosilação. Tem sido demonstrado que a glicosilação é importante para a integridade estrutural e, além disso, pode contribuir bastante para a formação (crítica) das interações intermoleculares e, conseqüentemente, a formação do cristal. Assim sendo, claro, o limite de difração e a qualidade da difração podem, ocasionalmente, sofrer redução. Mas, se uma glicoproteína não cristalizar, outros aspectos, além dos carboidratos, podem ser os culpados (MESTERS; HILGENFELD, 2007).

A Figura 45 ilustra o potencial eletrostático na superfície da quitinase recombinante, o que representa a distribuição de cargas na proteína. A superfície eletrostática da proteína é colorida de acordo com o potencial eletrostático: em vermelho encontram-se regiões de potencial negativo, em azul, potenciais positivos e, em branco, regiões neutras.

Figura 45 – Potencial eletrostático na superfície da rCV2935



Até o momento, estão disponíveis, no PDB, 68 estruturas de quitinases bacterianas: *Serratia marcescens* (29), *Vibrio harveyi* (20), *Bacillus cereus* (7), *Streptomyces griseus* (4), *Bacillus circulans* (3), *Yersinia* sp. MH-1 (2), *Streptomyces coelicolor* (1) e outras (2). Com exceção de 3, todas as outras foram resolvidas por difração de raios X.

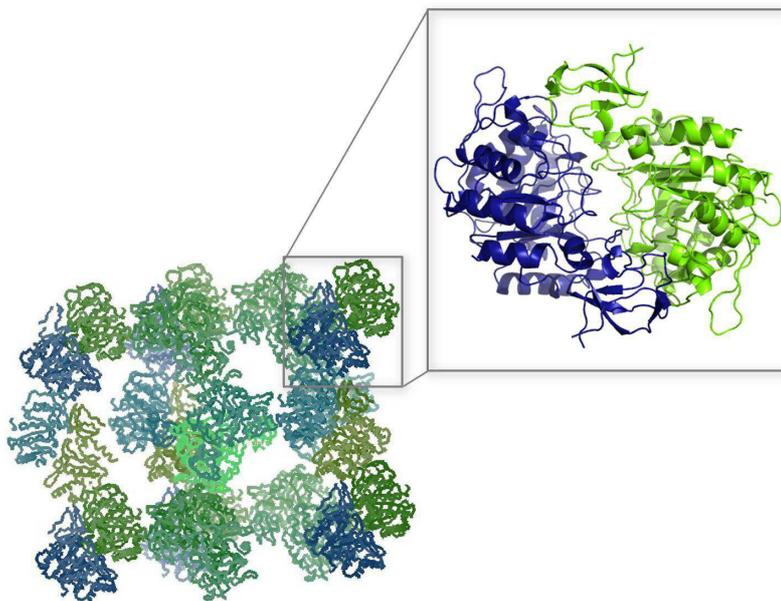
Perrakis e colaboradores (1994) resolveram a primeira estrutura de uma quitinase bacteriana, com uma resolução de 2,3 Å. A exoquitinase (ChiA) de *Serratia marcescens*, expressa em *E. coli*, também teve seu peptídeo sinal intrínseco reconhecido e clivado pela célula hospedeira e a proteína recombinante foi secretada para o meio de cultura. A enzima pertence à família GH18 e sua estrutura apresentou 3 domínios: um domínio N-terminal, consistindo apenas de folhas β , que se conecta ao domínio barril α/β , e o terceiro domínio, que tem voltas $\alpha+\beta$, é formado por uma inserção no motivo barril.

Essa quitinase A (Chia) de *Serratia marcescens* é uma enzima mesófila com alta atividade catalítica e alta estabilidade. Como já foi dito, a estrutura cristalina de Chia revelou um barril TIM no domínio catalítico, uma inserção ($\alpha + \beta$) entre a folha β B7 e a α -hélice A7 do barril TIM e um domínio fibronectina (FnIII) no N-terminal da molécula, com um *linker* conectando o último domínio ao domínio catalítico. Assim sendo, Zees, Pырpassopoulos e Vorgias (2009), estudaram o papel do domínio ($\alpha + \beta$) sobre a estabilidade, a atividade catalítica e especificidade da enzima por deleção desse domínio. Os dados obtidos por medidas de dicroísmo circular com a enzima truncada mostraram claramente que, removendo o domínio ($\alpha + \beta$), a estabilidade térmica da enzima é substancialmente reduzida, com um T_m de $42,0 \pm 1,0$ ° C, em comparação com o T_m de $58,1 \pm 1,0$ ° C da Chia em pH 9.0. Além disso, a atividade específica de ChiA truncada foi substancialmente reduzida, o pH ótimo foi deslocado de 6,5 para 5,0 e as especificidades de substrato e produto foram alteradas.

Sabe-se que em diversos estudos estruturais são observados modelos quaternários (formação de oligômeros) a partir do empacotamento molecular cristalográfico (GRONENBORN, 2009; YIN, et al., 2009; SHETTY et al., 2011). Em outras palavras, muitos estados oligoméricos são determinados unicamente por meio de observações das operações de simetria criadas a partir de cada cristal.

A partir das operações de simetria geradas utilizando as coordenadas espaciais da rCV2935 (P4₃2₁2) pode-se verificar que, além das repetições periódicas comumente encontradas para este determinado grupamento espacial, há, entretanto, uma tendência de interação entre dois monômeros da quitinase recombinante (Figura 46).

Figura 46 – Ilustração da tendência de interação entre dois monômeros de rCV2935, produzida por *P. pastoris*.



Esse modelo foi gerado partir das operações de simetria geradas utilizando as coordenadas espaciais da quitinase recombinante ($P4_32_12$).

Essa observação sugere que o arranjo dimérico da quitinase pode funcionar como uma alternativa para auto-regulação da atividade enzimática, sob determinadas condições de pH, sal ou até mesmo concentração da proteína. Para testar e confirmar essa hipótese, experimentos de filtração em gel, realizada nas condições de cristalização, e/ou espalhamento de raios-X à baixo ângulo (*Small Angle X-Ray Scattering* - SAXS) deverão ser feitos.

Na realidade, proteínas multiméricas são prevalentes em todo o organismo, e a oligomerização protéica é acreditada ser favorecida ao longo da evolução, uma vez que multímeros são dotados de vantagens estruturais e funcionais, como maior estabilidade e melhor controle sobre a acessibilidade e especificidade do sítio ativo (GRONENBORN, 2009).

Uma endoquitinase extracelular secretada por *Bacillus brevis* foi purificada à cromatografia de interação hidrofóbica seguida de cromatografia de troca aniônica. O perfil eletroforético da enzima em gel SDS-PAGE mostrou que a enzima purificada apresentou uma massa de 85 kDa, mesmo na presença de β -mercaptoetanol, mas mudou para 48 kDa quando aquecida em água fervente ou tratada com uréia 8 M a 50 °C por 10 min, o que sugere que pontes dissulfeto não estão envolvidas na formação de dímeros da quitinase, sendo razoável concluir que o dímero da quitinase é, provavelmente, formado por interações hidrofóbicas. A despolimerização das subunidades foi acompanhada pela perda de atividade quitinásica, e a

eliminação dos fatores de desnaturação por diálise restaurou a estrutura do dímero e também a atividade enzimática (SHENG et al., 2002).

7.10 Atividades Biológicas

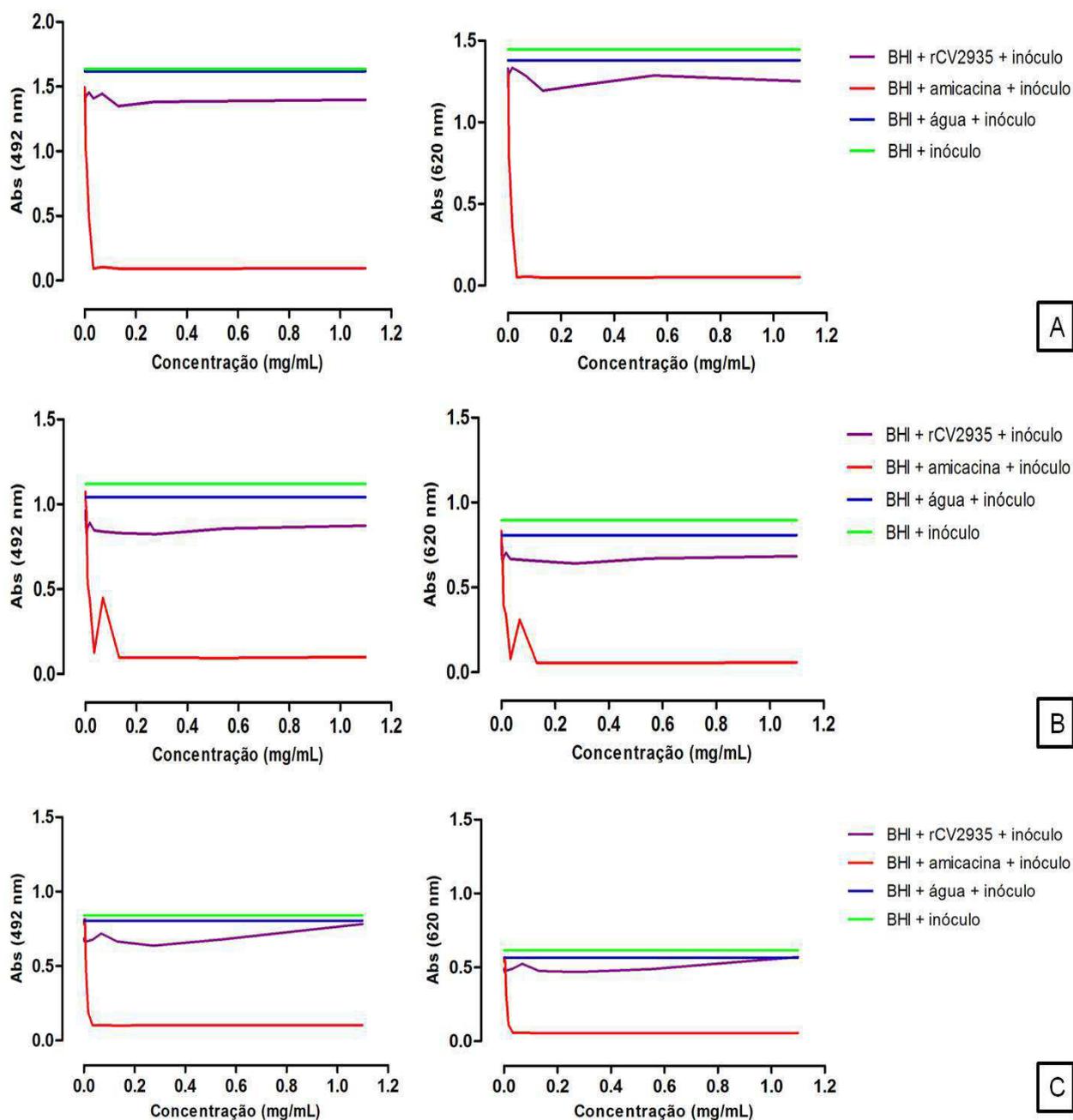
7.10.1 Atividade antibacteriana

O potencial antimicrobiano da rCV2935, produzida em *Escherichia coli*, foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo. Nesse ensaio foram testadas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 10536 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Após incubação das placas a 35 °C por 24 horas foram realizadas as leituras das absorbâncias a 492 e 620 nm.

Os gráficos representados na Figura 47 demonstram que a quitinase recombinante, desde a concentração inicial de 110 µg/mL, não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos microrganismos testados. Esse fato é facilmente observado comparando-se as leituras obtidas nos poços controle, nos quais concentrações mínimas do antibiótico amicacina aplicadas foram capazes de inibir completamente o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, o que é caracterizado por baixos valores de absorbância.

Esse resultado pode ser explicado pela rCV2935 caracterizar-se por ser uma enzima com atividade apenas quitinásica, não possuindo atividade de lisozima. E tendo em vista que as paredes celulares bacterianas constituem-se de peptidoglicanos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos, não possuindo quitina na sua composição, a quitinase recombinante em estudo não teve nenhuma ação que causasse alterações à integridade da célula.

Wang e Chang (1997) identificaram, pela primeira vez, duas quitinases bifuncionais de um organismo procaríoto. Com atividade quitinase/lisozima, as enzimas foram secretadas por *Pseudomonas aeruginosa* K-187, crescida em meio com quitina, e isoladas. As enzimas nativas purificadas apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* CCRC 14689, *Bacillus subtilis* CCRC 10029, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CCRC 11501, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CCRC 11498, *Bacillus bassiana* CCRC 31767, *Enterobacter faecalis* CCRC 10789, *Escherichia coli* CCRC 51445, *Lactobacillus bavaricus* CCRC 12933, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791, *M. lysodeikticus* CCRC 11034, *Staphylococcus aureus* CCRC 10451 e *S. aureus* CCRC 10777. Só não foi observada inibição do crescimento de *P. aeruginosa* M-1001 e *P. aeruginosa* K-187.

Figura 47 - Efeito da rCV2935, produzida em *E. coli*, sobre o crescimento de bactérias(A) *Escherichia coli* ATCC 10536; (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e (C) *Pseudomonas aeruginosa*.

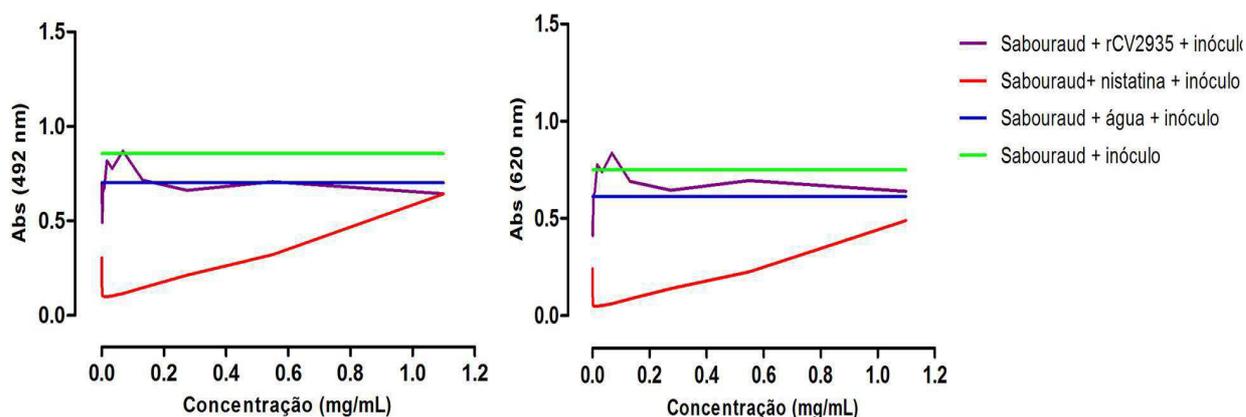
Ghasemi e colaboradores (2011) identificaram uma quitinase/lisozima, de *Bacillus pumilus* SG2, capaz de degradar a quitina componente da parede celular de fungos e peptidoglicanos componente das paredes celulares de muitos tipos de bactérias (*Xanthomonas translucens* pv. hordei, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, *Bacillus licheniformis*, *E. coli* C600, *E. coli* TOP10, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida*). Além disso, foi encontrada homologia entre as estruturas tridimensionais dessa quitinase/lisozima e uma quitinase/lisozima de *Bacillus circulans* WL-12.

7.10.2 Atividade antifúngica (levedura)

A fim de avaliar o efeito da rCV2935 sobre um fungo unicelular patogênico, *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizado em ensaio, também pelo método de microdiluição em caldo.

O resultado, ilustrado pela Figura 48, mostra que a quitinase recombinante não foi capaz de inibir, nem interferir, o desenvolvimento do fungo. Vale ressaltar que, as leituras crescentes observadas nos poços contendo concentrações, também crescentes, da nistatina, deve-se ao fato de a solução do antifúngico ter sua turbidez aumentada, concomitantemente com o aumento da concentração do mesmo. Assim sendo, a ausência de crescimento na presença da nistatina foi então confirmada por olho nu.

Figura 48 - Efeito da rCV2935, produzida em *E. coli*, sobre o crescimento de *Candida albicans*.

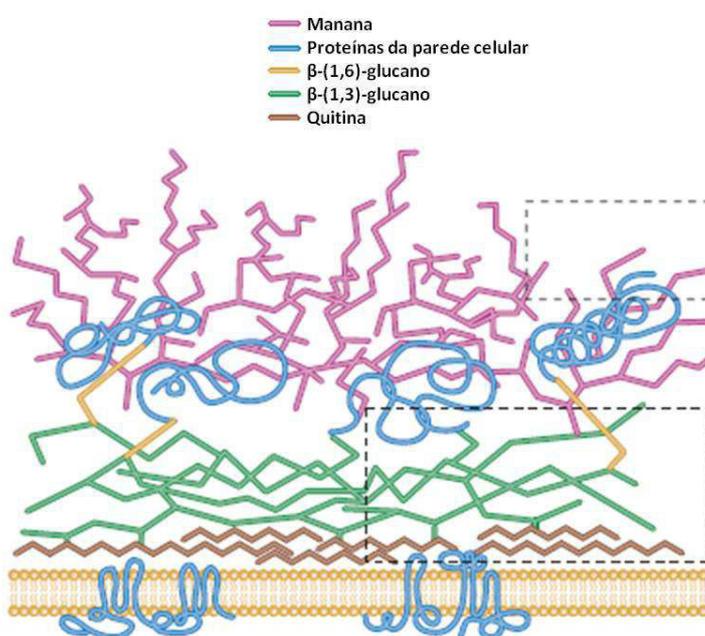


Cerca de 80 a 90% da parede celular de *C. albicans* é carboidratos. Três constituintes básicos representam os principais polissacarídeos da parede celular: (i) polímeros de glicose ramificados contendo ligações β -1,3 e β -1,6 (β -glucanos), (ii) polímeros ramificados de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) contendo ligações β -1,4 (quitina) e (iii) polímeros de manose (manana) covalentemente associados com proteínas. Além disso, as paredes celulares contêm proteínas (6-25%) e pequenas quantidades de lipídios (1-7%). Os polímeros de microfibrilas (β -glucanos e quitina) representam os componentes estruturais da parede, formando um esqueleto rígido para a célula. A partir de um ponto de vista quantitativo, β -glucanos são o principal constituinte, responsável por 47-60% da parede celular. Já a quitina é um componente menor (0,6-9%), mas importante para a parede celular de *C. albicans*, particularmente para os septos entre compartimentos independentes da célula,

cicatrizes de brotamento e ao redor do anel de constrição entre célula-mãe e broto (CHAFFIN et al., 1998).

É válido ressaltar que a quitina presente na parede celular de *C. albicans* está disposta de maneira antiparalela e na porção mais basal da parede, como ilustrado na Figura 49. Assim sendo, percebe-se que o acesso da rCV2935 à quitina pode ser dificultado pela presença de manana e glucanos presentes em grande quantidade na porção mais externa da célula (NETEA et al., 2008).

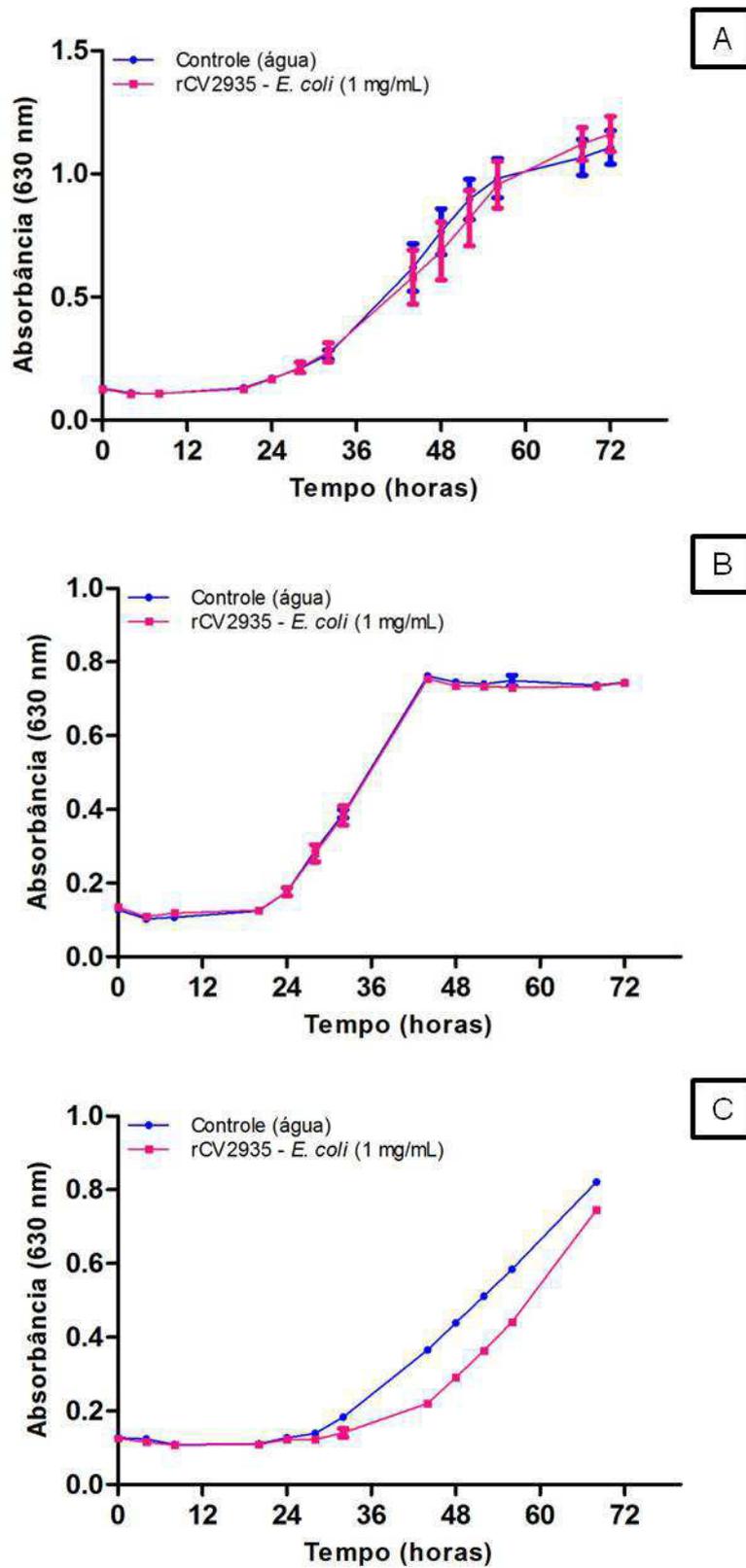
Figura 49– Esquema que ilustra a composição da parede celular de *C. albicans*.



7.10.3 Atividade antifúngica (fungos filamentosos)

Esse ensaio teve como objetivo avaliar o efeito da rCV2935, produzida por *E. coli*, sobre a germinação dos conídios e desenvolvimento micelial dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Penicillium herquei* e *Rhizoctonia solani*. De acordo com os resultados ilustrados na Figura 50 a quitinase recombinante de *C. violaceum*, na dose de 100 µg, foi capaz de inibir a germinação dos conídios de *R. solani* nas 36 horas iniciais de ensaio, bem como retardou o crescimento do fungo em aproximadamente 35%, com cerca de 46 horas de desenvolvimento. A rCV2935 não apresentou efeito sobre o crescimento micelial dos demais fungos testados.

Figura 50 - Efeito de rCV2935, produzida em *E. coli*, sobre o crescimento fúngico.



(A) *Colletotrichum lindemuthianum*; (B) *Penicillium herquei*; (C) *Rhizoctonia solani*

Park e colaboradores (2005) relataram que a estirpe C-61 de *Chromobacterium* sp., uma bactéria quitinolítica, apresentou elevada atividade antagonista contra o fungo *Rhizoctonia solani*. Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram a atividade como biocontrole bem como características enzimáticas de diferentes mutantes com a capacidade quitinolítica diminuída e concluíram que as quitinases extracelulares produzidas por essa estirpe, principalmente uma de 54 kDa e pI de 8,5, estão envolvidas com essa atividade antifúngica.

Uma bactéria, do solo costeiro na Coreia, com elevada atividade quitinolítica, foi isolada e identificada como *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. Por meio de gel SDS-PAGE contendo glicol-quitina, foram encontradas três bandas principais com atividade quitinolítica, com peso molecular aproximado de 63, 54 e 38 kDa, em amostras do meio de cultura, acrescido de quitina. Os pesquisadores então fizeram uma co-cultura dessa bactéria com *Rhizoctonia solani* KJA-424, e foi observado um inchaço anormal e deformação nas hifas do fungo, além da liberação de N-acetil-D-glucosamina. Com esses resultados em mãos, resolveram colocar uma da cultura de *P. illinoisensis* em plantas de pepino infectadas com *R. solani* e percebeu-se que a bactéria foi capaz de suprimir o desenvolvimento dos sintomas causados pelo fungo fitopatogênico, em experimentos em casa de vegetação (JUNG et al., 2003).

Uma bactéria quitinolítica foi isolada de solos costeiros da Coreia e identificada, por observações morfológicas e análises do rRNA 16S, como *Enterobacter* sp. Essa bactéria, quando crescida em meio suplementado com quitina coloidal, produziu uma quitinase de 46 kDa. Ensaio *in vitro* revelaram que a quitinase foi capaz de inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani* e os produtos de hidrólise foram analisados por HPLC e identificaram-se oligossacarídeos, que incluiu monômeros (GlcNAc), dímeros (GlcNAc₂), e trímeros (GlcNAc₃) (VELUSAMY; KIM, 2011).

Bacillus thuringiensis var *israelensis* foi usada para produzir uma quitinase em meio de cultura contendo quitina durante 120 horas, a 30 °C, sob agitação contínua. A enzima foi purificada e atividade antifúngica sobre fungos fitopatogênicos foi investigada em culturas crescidas e em sementes de soja infestadas com *Sclerotium rolfsii*. Inibição fúngica de 100% foi encontrada para *S. rolfsii*, 55% a 82% para *A. terreus*, *A. flavus*, *Nigrospora* sp, *Rhizopus* sp, *A. niger*, *Fusarium* sp, *A. candidus*, *Absidia* sp, e *Helminthosporium* sp; 45% para *Curvularia* sp; e 10% para *A. fumigatus*. Os autores concluíram que a quitinase de *B. thuringiensis* pode contribuir para o controle biológico de *S. rolfsii* e outros fungos fitopatogênicos em sementes de soja por meio de programas de manejo integrado de pragas (REYES-RAMÍREZ et al., 2004).

Ghasemi e colaboradores (2011) relataram a clonagem e expressão de duas quitinases de *Bacillus pumilus* SG2 em *Escherichia coli* M15. As enzimas recombinantes purificadas mostraram atividade antifúngica também contra *Rhizoctonia solani*, além de *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris* sp. por meio de atividades em placas de BDA.

Zhang e Yuen (2000) mostraram o importante papel da produção de quitinase pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* C3 no controle biológico da doença que gera manchas marrons na gramínea *Festuca arundinacea* causada pelo fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana*. Recentemente, Jankiewicz e colaboradores (2012), isolaram uma quitinase, da família GH18, do meio de cultura dessa mesma bactéria. A quitinase foi purificada inicialmente por um fracionamento com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de afinidade. A massa molecular da enzima purificada determinada por SDS-PAGE foi de aproximadamente 52 kDa. A enzima mostrou maior atividade a 45 °C, pH 6,8 e inibiu o crescimento de fungos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Alternaria*.

Yan e colaboradores (2008) estudaram como uma mesma quitinase apresenta diferentes atividades quitinásicas e, conseqüentemente, potencial antifúngico diferente, sobre fungos fitopatogênicos diferentes. Para isso, uma quitinase recombinante de arroz, expressa em *Pichia pastoris*, foi purificada e investigou-se sua atividade antifúngica contra 4 fungos: *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis squamosa*, *Pythium aphanidermatum* e *Aspergillus niger*. Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foram empregados para analisar a microestrutura de superfície e a proporção de quitina na parede celular dos 4 fungos, respectivamente. A quitinase recombinante apresentou diferentes atividades antifúngicas contras os fungos testados, e os autores demonstraram que a atividade inibitória da quitinase contra fungos patogênicos está diretamente correlacionada tanto com a extensão de exposição como com a proporção de quitina na parede celular dos mesmos. Essa conclusão pode ajudar a entender porque a rCV2935 apresentou atividade inibitória sobre somente um fungo (*R. solani*) dentre os 3 que foram testados.

Em teoria, a quitinase pode facilmente entrar em contato com a quitina da parede celular do fungo se as microfibrilas estiverem dispostas na superfície, porém, quando a quitina está na porção mais basal da haverá um impedimento espacial entre a enzima e o substrato. Quanto mais fácil a quitinase entrar em contato com a quitina presente na parede celular do fungo, maior a velocidade de hidrólise e, conseqüentemente, maior a inibição do crescimento do fungo. Além disso, a diferença proporcional do conteúdo de quitina constituindo a parede

celular de determinado fungo implicará na susceptibilidade ou não da célula, ou seja, quanto mais quitina, maior a susceptibilidade ao ataque por quitinases (YAN et al., 2008).

Como a quitina funciona como um elemento fortalecedor da fibra constituinte da parede celular fúngica, através de fortes pontes de hidrogênio entre os polímeros adjacentes, proporcionando rigidez. Polissacarídeos, e assim, suas ligações glicosídicas, são elementos chaves para a integridade da parede celular. A destruição da ligação glicosídica é prejudicial para a morfologia celular dos fungos, enfraquecendo a parede celular e, eventualmente, causando perdas do conteúdo da célula. Enzimas bacterianas tais como glucanases, quitinases e quitosanases, individualmente ou em combinação, hidrolisam efetivamente a parede celular de fungos fitopatogênicos. Logo, a aplicação de enzimas hidrolíticas na parede celular de fungos é, portanto, uma promessa para o controle eficiente de doenças de plantas como uma alternativa aos fungicidas químicos sintéticos (NEERAJA et al., 2010).

7.10.4 Atividade inseticida

O efeito da quitinase recombinante CV2935, expressa em *Escherichia coli*, sobre o crescimento e desenvolvimento do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) foi avaliado em bioensaios, utilizando-se sementes artificiais montadas com cápsulas de gelatina. O bioensaio, que requer uma quantidade significativa de proteína (cerca de 1 g), foi realizado com a fração F0/95 contendo a rCV2935 (F0/95_{+CV2935}), devido ao rendimento de proteína pura produzida por *E. coli* ser de aproximadamente 3 mg/L, o que tornaria inviável a realização do experimento com a rCV2935 purificada.

Desta forma, a F0/95_{+CV2935} liofilizada foi incorporada nas sementes artificiais em diferentes concentrações, contendo farinha de feijão-de-corda como veículo. Dois controles foram usados. Um controle consistia de F0/95 sem rCV2935, F0/95_{-CV2935} (obtido a partir do meio de cultura livre de células de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo de expressão íntegro, sem a região codificadora da CV2935. O segundo controle consistia de sementes artificiais contendo apenas farinha de feijão.

Durante o bioensaio, os seguintes parâmetros foram analisados: total de adultos emergidos, percentual de emergência de adultos, total de ovos eclodidos, tempo médio de desenvolvimento (de ovo a adulto) e peso médio dos adultos recém-emergidos. Todos os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando 5% de significância.

Com resultados obtidos, ilustrados na Tabela 6, observa-se uma diminuição do número total de adultos emergidos nos tratamentos contendo a proteína recombinante nas maiores concentrações em relação ao controle contendo apenas farinha de feijão. Porém, todos os tratamentos encontram-se relativamente parecidos com o número total de insetos adultos emergidos do segundo controle, que contém apenas o vetor de expressão íntegro.

Tabela 6 - Avaliação da atividade da fração secretada por células de *Escherichia coli* BL21(DE3), contendo o plasmídeo pET-Cv2935, sobre o caruncho *C. maculatus*.

	TOEc ¹	TAE ²	%E ³	TMD ⁴	PM ⁵
Controle	60 ± 9,5a	37,6 ± 1,1a	63,5 ± 7,5a	35,8 ± 0,8a	4,45 ± 0,09a
pET-íntegro	49 ± 10a	28,6 ± 7,2a	58,6 ± 8,3a	36,3 ± 0,4a	4,20 ± 0,05ab
rCV2935 0,5%	62,6 ± 7,2a	36,6 ± 14,3a	57,3 ± 15,4a	35,5 ± 0,3a	4,09 ± 0,33ab
rCV2935 1%	53,6 ± 8,5a	28,6 ± 6,3a	53,8 ± 11a	35,7 ± 0,4a	4,03 ± 0,20ab
rCV2935 2%	49 ± 6,5a	30,3 ± 8,5a	61,1 ± 1a	35,3 ± 1 a	3,82 ± 0,30b

Letras iguais no sentido vertical representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

¹ Número total de ovos eclodidos

² Número total de adultos emergidos

³ Percentual de emergência

⁴ Tempo médio de desenvolvimento (em dias)

⁵ Peso médio dos adultos emergidos (em mg)

Em relação à taxa de eclosão dos ovos, não se observou nenhuma diferença entre os tratamentos, resultado esse já esperado, pois este está inteiramente relacionado com a viabilidade dos ovos das fêmeas utilizadas para o bioensaio.

Para a análise em nível de significância de 5% os parâmetros: totais de adultos emergidos, percentual de emergência de adultos, total de ovos eclodidos e tempo médio de desenvolvimento não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e os controles (Tabela 6). Já o peso médio dos adultos apresentou diferença significativa com o controle que continha apenas farinha de feijão, entretanto não apresentou diferença significativa para o que foi considerado como um segundo controle do bioensaio, a F0/95 de células contendo apenas o pET íntegro, sem a região codificadora da proteína.

É possível observar uma diminuição no peso médio dos adultos emergidos em todos os tratamentos, inclusive do controle contendo a F0/95 do pET íntegro, sugerindo que produtos resultantes do metabolismo da *E. coli* durante a indução da expressão da proteína de interesse exercem efeitos no desenvolvimento da larva e, conseqüentemente, no peso final dos insetos adultos emergidos. Contudo, observou-se também que concentrações crescentes da F0/95 contendo a rCV2935 diminuíram o peso dos adultos emergidos de forma proporcional, o que caracterizaria um efeito dose-dependente.

Terra e Ferreira (1981) propuseram que a presença da membrana peritrófica, composta por quitina e proteínas, existente no trato digestivo dos insetos, levaria a uma economia de enzimas digestivas, que seriam excretadas em menor quantidade. Assim, a membrana peritrófica pode ser um importante alvo para o controle de insetos.

Segundo Sales et al. (1996) a utilização de vicilinas contra *Callosobruchus maculatus* é capaz de afetar o desenvolvimento das larvas e que a ligação da proteína com as estruturas quitinosas da membrana pode levar a perturbações nos processos de digestão e absorção de nutrientes, os quais resultam em diminuição do crescimento.

Em 2000, Tellam e Eiseman descrevem trabalhos da literatura aonde proteínas como polioxina D e quitinases foram capazes de causar alterações na membrana peritrófica de *Lucilia cuprina*.

Estudos demonstram que quitinases hidrolisam a quitina na membrana peritrófica do inseto, formando poros que facilitam o contato entre as δ -endotoxinas e seus receptores no epitélio intestinal, aumentando a toxicidade de *B. thuringiensis*. Dessa forma, quitinases têm sido usadas com sucesso em combinação com δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* para formação de cristais, a fim de melhorar a sua atividade inseticida. Assim, Driss e colaboradores (2011) produziram uma proteína de fusão (CDF), constituída da quitinase Chi255 e a metade carboxi-terminal da Cry1Ac, ambas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. A construção foi inserida em um vetor, que posteriormente foi transferido para células de *B. thuringiensis* BNS3 cristalíferas e não cristalíferas. A funcionalidade da quitinase quimérica foi demonstrada pelo aumento da atividade quitinolítica relativa em 2,5 vezes, avaliada em ensaios com larvas de *Ephesia kuehniella* (lepidóptero). Análises por *western blot* mostraram que, apesar da instabilidade da CDF quando expressa na cepa não cristalífera, a metade C-terminal da Cry1Ac conseguiu permitir com sucesso a integração da quitinase quimérica no cristal de BNS3.

Halder e colaboradores (2011) isolaram uma quitinase de *Aeromonas hydrophila* SBK1, uma potente bactéria quitinolítica, cultivada em meio contendo quitina, e realizaram testes com larvas de *Culex quinquefasciatus*, no 2º instar. Os resultados do bioensaio demonstraram que a atividade larvicida foi dependente da dose e tempo de exposição. Além disso, temperatura e pH mostraram-se determinantes cruciais para atividade enzimática como agente inseticida. A enzima estudada mostrou eficiência larvicida significativa em amplos intervalos de pH (6.0 a 8.0) e temperaturas (30-35 °C). Os autores sugerem que o ataque enzimático nos órgãos internos do mosquito (exceto no exoesqueleto) gera um

comprometimento do potencial transmembrana seguido por lise osmótica, o que explicaria a atividade inseticida encontrada.

Dessa forma, os resultados sugerem que a quitinase codificada pelo gene CV2935 da *C. violaceum* não é tóxica para o *C. maculatus*, mas pode interferir com a sua alimentação, dificultando-a provavelmente devido a interação da quitinase com a membrana peritrófica do inseto.

8. RESUMO DOS RESULTADOS

A clonagem da seqüência codificadora completa da quitinase de *Chromobacterium violaceum*, para expressão em *Escherichia coli*, foi realizada obtendo-se 5 clones de *E. coli* TOP10F', contendo o vetor pET303/CT-His::CV2935. Já da seqüência sem a região codificadora do peptídeo sinal, para expressão em *Pichia pastoris*, foi realizada obtendo-se 4 clones de *E. coli* TOP10F', portando o vetor pPICZ α A::CV2935 SP. As eletroforeses em gel de agarose para confirmação da transformação dos produtos de amplificação e digestão, utilizando os plasmídios recombinantes como molde, mostraram bandas de 1.320 e 1.245 pb referente às sequencias completa e sem peptídeo sinal, respectivamente.

Na etapa seguinte, a expressão da quitinase, em *E. coli*, se deu pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,5 mM, a 37 °C, por 21 horas. A enzima recombinante foi detectada no meio extracelular, e o seqüenciamento de aminoácidos NH₂-terminal, por meio da técnica de degradação de Edman, foi realizado. O resultado foi uma seqüência de aminoácidos que se iniciava a partir do 24º resíduo da seqüência deduzida, o que comprova que o peptídeo sinal intrínseco da proteína foi reconhecido e clivado pela célula hospedeira, demonstrando uma secreção eficiente da proteína na sua forma solúvel e biologicamente ativa.

Após a transformação de células de *P. pastoris* KM71H com o vetor pPICZ α A::CV2935 SP, apenas 1 clone recombinante foi obtido. A expressão da rCV2935 foi observada logo nas primeiras 24 horas de indução com metanol, para uma concentração final de 1%, a 17 °C. A proteína foi detectada com o kit *Invision His-tag-in-gel Stain*, que revela especificamente cauda de histidina. O tempo ótimo de expressa da rCV2935 foi observado em 96 horas, caracterizado pelo valor máximo de atividade quitinolítica específica.

Ambas as proteínas, expressas em *E. coli* e *P. pastoris*, mostraram-se incapazes de interagir com a matriz de níquel imobilizado. Portanto, a purificação das mesmas se deu por cromatografia de afinidade em matriz de quitina seguida de cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superdex75. As ambas as amostras purificadas, de aproximadamente 43 e 45 kDa foram concentradas utilizando-se ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 30 kDa. O rendimento obtido foi de 2,6 mg/L de cultura, para a rCV2935 produzida em *E. coli* e 44 mg/L de cultura para a rCV2935 produzida em *P. pastoris*.

A rCV2935 apresentou atividade exclusivamente endoquitinásica contra quitina coloidal, foi capaz de hidrolisar os substratos sintéticos solúveis 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -

D-quitobiosídeo e o 4-nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose, análogos ao tri e tetrassacarídeo, bem como glicol-quitina. A enzima mostrou-se ativa também contra matriz de carapaça de caranguejo obtida comercialmente, e uma pequena atividade quitosanásica.

A quitinase recombinante, produzida nos dois sistemas heterólogos testados, mostrou-se ativa quando tratada com temperaturas de até 60 °C por 30 min e apresentou atividade quitinásica no intervalo de pH de 3-7, e os maiores valores de atividade quitinásica encontrados foram no pH 3. Em valores de pH superiores a 8 não foi detectada atividade quitinásica.

No ensaio quitinásico na presença de íons metálicos, ficou evidente que os íons NH_4 e K^+ estimularam sutilmente a atividade quitinásica da proteína recombinante, enquanto os íons Mn^{2+} e Fe^{2+} foram capazes de reduzir em 69% e 25%, respectivamente, a atividade quitinásica da proteína em estudo, em relação ao controle. Quanto aos agentes químicos, foi observado que, tanto na presença do agente quelante EDTA, como na presença de β -mercaptoetanol, a atividade quitinásica da rCV2935 foi sutilmente estimulada. Porém, na presença de SDS, a atividade quitinolítica foi completamente inibida em todas as concentrações testadas (0,5; 1 e 2%).

A seqüência deduzida de aminoácidos da quitinase CV2935 foi analisada com o uso da ferramenta *NetNGlyc 1.0 Server* para realização de uma busca por sítios putativos para N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr) e, ocasionalmente, N-X-C (Asn-X-Cys). Foram encontrados 5 sítios para N-glicosilação foram encontrados (⁴⁷Asn-Y-Thr⁴⁹, ¹¹⁸Asn-P-Ser¹²⁰, ¹⁴⁸Asn-V-Ser¹⁵⁰, ¹⁸⁵Asn-G-Ser¹⁸⁷ e ¹⁹²Asn-A-Thr¹⁹⁴) e a glicosilação foi confirmada por cromatografia em matriz de ConA *sepharose*, na qual a proteína interagiu com a matriz, sendo eluída com D-manose 0,2 M, e por reação com a enzima N-glicosidase F, com posterior revelação de glicoproteínas com reagente de Schiff.

A partir dos dados de dicróismo circular para as proteínas recombinantes nativas, foi possível verificar que na estrutura secundária da rCV2935, expressa em *E. coli*, predominam arranjos em folhas- β (30,3%), possuindo também 19,1% do seu conteúdo de α -hélice e 30% de estrutura desordenada. Já para a rCV2935, expressa em *P. pastoris*, predominam arranjos em α -hélice (34,3%), possuindo também 20,1% do seu conteúdo de folhas- β e 28% de estrutura desordenada. Essa diferença encontrada pode ser explicada pelos resíduos de aminoácidos que diferem entre essas proteínas e que são codificados pelos vetores utilizados para a expressão.

Pelos gráficos de desnaturação térmica conclui-se que a partir de 55 °C já ocorre a desnaturação de 50% das moléculas da rCV2935 produzida em *E. coli*, alterando sua

conformação. Já para a rCV2935 produzida em *P. pastoris*, observa-se que a partir de 63 °C é que metade das moléculas de proteína ali presentes estão desnaturadas. Além disso, foi observado, por meio de medidas de dicroísmo circular, que a desnaturação térmica da rCV2935 não é reversível.

A análise dos espectros de fluorescência das amostras de rCV2935, produzida nos dois sistemas, no estado nativo, indicaram que as proteínas recombinantes foram produzidas em suas conformações enoveladas, não havendo resíduos de triptofano expostos.

Ambas as proteínas foram identificadas como “*Probable chitinase A OS Chromobacterium violaceum GN CV 2935 PE 3 SV 1*”, por espectrometria de massa. Os peptídeos identificados cobriram 55 e 42% da sequência da quitinase recombinante produzida por *E. coli* e por *P. pastoris*, respectivamente, e foram 100% idênticos à sequência deduzida.

A estrutura tridimensional da quitinase recombinante foi determinada a uma resolução de 2.1 Å. A proteína cristalizou no grupo espacial P4₃2₁2 e apresentou 8 moléculas por cela unitária. Seu domínio catalítico apresentou um dobramento do tipo barril (β/α)₈ (barril TIM) e resíduos essenciais para catálise conservados, características essas, comuns às proteínas da mesma família. O conteúdo de estrutura secundária do domínio de ligação à quitina consiste apenas de folhas β (5 unidades) e não foi possível resolver a estrutura do peptídeo que liga o domínio de ligação ao domínio catalítico provavelmente devido à flexibilidade do mesmo, o qual não foi possível sequer obter mapa de densidade eletrônica.

Nos ensaios de atividade antimicrobiana, a quitinase recombinante, desde a concentração inicial de 1,1 mg/mL, não foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Já em ensaios com fungos fitopatogênicos, a rCV2935 apresentou efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, retardando-o em aproximadamente 35%, com cerca de 46 horas de desenvolvimento.

Em bioensaios com o carunho *Callosobruchus maculatus*, os resultados sugerem que a quitinase codificada pelo gene CV2935 da *C. violaceum* não é tóxica para o *C. maculatus*, mas pode interferir com a sua alimentação, dificultando-a provavelmente devido a interação da quitinase com a membrana peritrófica do inseto

9. CONCLUSÕES

Uma endoquitinase de *Chromobacterium violaceum*, pertencente à família 18 das glicosil-hidrolases, foi expressa de maneira funcional em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. A enzima mostrou-se ativa contra substratos solúveis e insolúveis, em ampla faixa de pH e temperatura, além de retardar o desenvolvimento do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*. A enzima teve sua estrutura cristalográfica resolvida a uma resolução de 2.1Å e seu domínio catalítico apresentou um dobramento do tipo barril (β/α)₈ (barril TIM) e resíduos essenciais para catálise conservados, características essas, comuns às proteínas da mesma família.

Os estudos bioquímicos, biológicos e estruturais apresentados nesse trabalho caracterizam uma quitinase recombinante de *Chromobacterium violaceum* e poderão ser úteis para aplicação biotecnológica dessa enzima.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.N.; SØRLIE, M.; VÅRUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1482-1517, 2010.
- ALAM, M.M.; NIKAIDO, N.; TANAKA, H.; WATANABE, T. Cloning and sequencing of *chiC* gene of *Bacillus circulans* WL-12 and relationship of its product to some other chitinases and chitinase-like proteins. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 454-461, 1995.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Ed. Universidade Federal de Viçosa (UFV), 199 p., 1998.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARANDA, S.; MONTES-BORREGO, M.; LANDA, B.B. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. **FEMS Microbiology Ecology**, doi:10.1007/s00248-011-9840-9, 2011.
- ARRIAGA, S.; ACOSTA-MUNGUÍA, J.A.; PÉREZ-MARTÍNEZ, A.S.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.D.; BARBA DE LA ROSA, A.P. Coupling aerobic biodegradation of methanol vapors with heterologous protein expression of endochitinase Ech42 from *Trichoderma atroviride* in *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9661-9965, 2010.
- BAGOS, P.G.; NIKOLAOU, E.P.; LIAKOPOULOS, T.D.; TSIRIGOS, K.D. Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with Hidden Markov Models. **Bioinformatics**, v. 26, n. 22, p. 2811-2817, 2010.
- BANNER, D. W., BLOOMER, A. C., PETSKO, G. A., PHILLIPS, D. C., POGSON, C. I., WILSON, I. A., CORRAN, P. H., FURTH, A. J., MILMAN, J. D., O'ORD, R. E., PRIDDLE, J. D., WALEY, S. G. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. **Nature**, v. 255, p. 609-614, 1975.
- BARBOZA-CORONA, J.E.; REYES-RIOS, D.M.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BIDESHI, D.K. Molecular and Biochemical Characterization of an Endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73. **Molecular Biotechnology**, v. 39, p. 29-37, 2008.
- BARON, E.J., PETERSON, L.R., FINEGOLD, S.M. **Diagnostic Microbiology**. 9.ed. Mosby, St. Louis: Bailey & Scott's, 1994.
- BARRETO, E. S.; TORRES, A.R.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, A.T.R.; ASTOLFI-FILHO, S.; HUNGRIA, M. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal Ind Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 783-790, 2008.

BARTHELEMY I, GONZALEZ DE BUITRAGO G, CARREIRO C, RONCAL F, PEREZ-ARANDA A, MARQUEZ G, BARBERO JL. Production and secretion of human interleukin 6 into the periplasm of *Escherichia coli*: efficient processing of N-terminal variants of hIL6 by the *E. coli* signal peptidase. **Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 307-316, 1993.

BEIER, S. **Bacterial degradation and use of chitin in aquatic habitats**. Dissertação. Acta Universitatis Upsaliensis, 48p., Uppsala, 2010.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, p.783-795, 2004.

BERGONZINI, C. Um nuevo bacterio colorato, **Annals Soc. Natural. Modena. Ser.**, v. 2, n. 14, p. 149–158, 1881.

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

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, 1985.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1,3-glucanases, in: S.J. Gurr, M.J. McPherson, D.J. Bowles (Eds.), **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**, Oxford University Press, New York, v. II, p. 23-30, 1992.

BOWEN, D. J. **Characterization of a high molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens***. M.S. thesis. University of Wisconsin, Madison. 1995.

BOWEN, D.; ROCHELEAU, T. A.; BLACKBURN, M.; ANDREEV, O.; GLOBEVA, E.; BHARTIA, R.; EFRENCH-CONSTANT, R. H. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science**, v. 28, p. 2129-2134, 1998.

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**, n. 72, p. 248-254, 1976.

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

BRUN, E.; MORIAUD, F.; GANS, P.M.; BLACKLEDGE, J.; BARRAS, F.; MARION, D. Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. **Biochemistry**, v. 36, p. 16074–16086, 1997.

BURBERG, M.B.; EIKSINK, V.G.H.; HAANDRIKMAN, A.J.; VENEMA, G.; NESL, I.F. Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing. **Microbiology**, n. 141, p. 123-131, 1995.

CANDIANO, G.; BRUSH, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very

sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233-238, 2009.

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**, n.13, p. 329–332, 2002.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans* : Identification, Function, and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 130-180, 1998.

CHEN, W.M.; CHEN, G.H.; CHEN, C.S.; JIANG, S.T. Cloning, expression and purification of *Bacillus cereus* endochitinase in the *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1172-1174, 2009.

CHERNIN, L.S.; WINSON, M.K.; THOMPSON, J.M.; HARAN, S.; BYCROFT, B.W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STEWART, G.S.A.B. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4435-4441, 1998.

CHO, E.K.; CHOI, I.S.; CHOI, Y.J. Overexpression and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus atrophaeus* SC081 in *Escherichia coli*. **BMB reports**, v. 44, n. 3, p. 193-198, 2011.

CHOI, J.H.; JEONG, K.J.; KIM, S.C.; LEE, S.Y. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 640-645, 2000.

CHOI, J.H.; LEE, S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 625–635, 2004.

CHUANG, H.H.; LIN, H.Y.; LIN, F.P. Biochemical characteristics of C-terminal region of recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis* – implication of necessity for enzyme properties. **FEBS Journal**, v. 275, p. 2240-2254, 2008.

CLINICAL AND A LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 6th ed. Approved Standard: M7-A6. CLSI, 2003.

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

COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2553-2557, 1999.

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

CREGG, J.M.; CEREGHINO, J.L.; SHI, J.; HIGGINS, D.R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p.23-52, 2000.

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

DAI, D.H.; HU, W.L.; HUANG, G.R.; LI, W. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2476-2485, 2011.

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.

DEBOY, R.T.; MONGODIN, E.F.; FOUTS, D.E.; TAILFORD, L.E.; KHOURI, H.; EMERSON, J.B.; MOHAMOUD, Y.; WATKINS, K.; HENRISSAT, B.; GILBERT, H.J.; NELSON, K.E. Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicas*. **Journal of Bacteriology** v. 190, p. 5455-5463, 2008.

DRISS, F.; ROUIS, S.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Integration of a Recombinant Chitinase into *Bacillus thuringiensis* *Parasporal* Insecticidal Crystal. **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 281-288, 2011.

DURÁN, N.; ERAZO, S; CAMPOS, V. Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 55, p. 231-234, 1983.

DURÁN, N., ANTONIO, R.V., HAUN, M. AND PILLI, R.A. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 10, p. 686-690, 1994.

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

DURÁN, M; FALJONI-ALARIO, A.; DURÁN, N. *Chromobacterium violaceum* and Its Important Metabolites – review. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 6, p. 535-547, 2010.

DURAND, A.; HUGHES, R.; ROUSSEL, A.; FLATMAN, R.; HENRISSAT, B.; JUGE, N. Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 7, p.1745-1755, 2005

EDMAN, G.M.; WANG, J.L. Preparation of phenyl thiohydantoin from some natural amino acids. **Acta Chemica Scandinavica**, v.4, p. 277-282. 1950.

ESTEVEZ, G.T. **Resolução da estrutura tridimensional do inibidor tríplico e quimotríptico de *Vigna unguiculata* em complexos binário e ternário**. 2010. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Pós-graduação em Biologia Molecular, Instituto de

Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

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. 93–99, 2007.

FERRANDON, S.; STERZENBACH, T.; MERSHA, F.B.; XU, M.Q. A single surface tryptophan in the chitin-binding domain from *Bacillus circulans* chitinase A1 plays a pivotal role in binding chitin and can be modified to create an elutable affinity tag. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 31-40, 2003.

FREITAS, C.D.T.; LOPES, J.L.S.; BELTRAMINI, L.M.; OLIVEIRA, R.S.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; RAMOS, M.V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2501–2507, 2011.

FUNKHOUSER, J.D.; ARONSON JR, N.N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 97, p. 1-16, 2007.

FOLDERS, J.; ALGRA, J.; ROELOFS, M.S.; VAN LOON, L.C; TOMMASSEN, J.; BITTER, W. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a Gradually Secreted Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 24, p. 7044-7052, 2001

FUKAMIZO, T. Chitinolytic Enzymes Catalysis, Substrate Binding, and their Application. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 1, p. 105-124, 2000.

GHASEMI, S.; AHMADIANA, G.; SADEGHIA, M.; ZEIGLERB, D.R.; RAHIMIANC, H.; GHANDILIA, S.; NAGHIBZADEHA, N.; DEHESTANI, A. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 225-231, 2011.

GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILBURN, D.G.; MILLER, R.C.; WARREN, R.A. J. Domains in microbial / β -1,4-glycanases: Sequence conservation, function and enzyme families. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 301-315 1991.

GLEAVE, A.P.; TAYLOR, R.K.; MORRIS, B.A.; GREENWOOD, D.R. Cloning and sequencing of a gene encoding the 69-kDa extracellular chitinase of *Janthinobacterium lividum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 279-288, 1995.

GOMES DE OLIVEIRA, C.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. *Chromobacterium violaceum* ATCC12472: Multi-drug and ethidium bromide resistant. **Nature Precedings**, hdl:10101/npre.2009.3366.1, 2009.

GOODRICK, J.C.; XU, M.; FINNEGAN, R.; SCHILLING, B.M.; SCHIAVI, S.; HOPPE, H.; WAN, N.C. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 492-497, 2001.

GRANGEIRO, T.B.; JORGE, D.M.M.; BEZERRA, W.M.; VASCONCELOS, A.T.R.; SIMPSON, A.J.G. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genetics**

and **Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 117-133, 2004

GUERRERO-OLAZARÁN, M.; RODRIGUEZ-BLANCO, L.; CARREON-TREVINO, J.G.; GALLEGOS-LOPEZ, J.A.; VIADER-SALVADO, J.M. Expression of a *Bacillus* Phytase C Gene in *Pichia pastoris* and Properties of the Recombinant Enzyme. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 76, n. 16, p. 5601-5608, 2010.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **NetNGlyc; Prediction of N-glycosylation sites in human proteins**. Em preparação, 2004. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>. Acesso em agosto de 2011.

HAKVÅG, S.; FJAERVIK, E.; KLINKENBERG, G.; BORGOS, S.E.; JOSEFSEN, K.D.; ELLINGSEN, T.E.; ZOTCHEV, S.B. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. **Marine Drugs**, v. 7, p. 576–588, 2009.

HALDER, S.K.; MAITY, C.; JANA, A.; PATI, B.R.; MONDAL, K.C. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. **Biocontrol**, doi 10.1007/s10526-011-9405-3, 2011.

HARDT, M.; LAINE, R.A. Mutation of active site residues in the chitin-binding domain ChBDChiA1 from chitinase A1 of *Bacillus circulans* alters substrate specificity: use of a green fluorescent protein binding assay. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 286-297, 2004.

HASHIMOTO, M.; HONDA, Y.; NIKAIDOU, N.; FUKAMIZO, T.; WATANABE, T. Site-directed mutagenesis of Asp280 suggests substrate-assisted catalysis of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 100–102, 2000.

HASSAN, F.; MEENS, J.; JACOBSEN, H.; KIESECKER, H. A family 19 chitinase (Chit30) from *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238 expressed in transgenic pea affects the development of *T. harzianum* in vitro. **Journal of Biotechnology**, v.143, p. 302-308, 2009.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.

HENNIG, M.; JANSONIUNS, J.N.; VAN SCHELTINGA, A.C.T., DIJKSTRA, B.W.; SCHLESIER, B.; Crystal structure of Concanavalin B at 1.65 Å resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 254, n. 2, p. 237-246, 1995.

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

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HENRISSAT B.; DAVIES, G.J. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 637-644, 1997.

HENRISSAT, B. Glycosidase families. **Biochemical Society Transactions**, v. 26, p. 153-156, 1998.

HENRISSAT, B. Classification of chitinases modules. **Exs**, v. 87, p. 137-157, 1999.

HIMMEL, M. E., KARPLUS, P. A., SAKON, J., ADNEY, W. S., BAKER, J. O., AND THOMAS, S. R. Polysaccharide hydrolase folds diversity of structure and convergence of function. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, n. 65, p. 315-325, 1997.

HOLM, L.; ROSENSTRÖM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 545-549, 2010.

HOSHINO, T. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1463–1475, 2011.

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M.F.; GUIMARÃES, C.T.; JARDIM, S.N.; GOMES, E.A.G.; VASCONCELOS, A.T.R. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 102-116, 2004.

IKEGAMI, T.; OKADA, T.; HASHIMOTO, M.; SEINO, S.; WATANABE, T.; SHIRAKAWA, M. Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 13654-13661, 2000.

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.

JANKIEWICZ, U.; BRZEZINSKA, M.S.; SAKS, E. Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 1, p. 30-35, 2012.

JAQUES, A.K.; FUKAMIZO, T.; HALL, D.; BARTON, R.C.; ESCOTT, G.M.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C.A.; ADAMS, D.J. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**, v. 149, n.10, p. 2931-2939, 2003.

JIANG, P.X.; WANG, H.S.; ZHANG, C.; LOU, K.; XING, X.H. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1077–1088, 2010.

JUNG, W.J.; AN, K.N.; JIN, Y.L.; PARK, R.D.; LIM, K.T.; KIM, K.Y.; KIM, T.H. Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35 p. 1261–1264, 2003.

- 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. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.71, n.11, p. 2848-2851, 2007.
- 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. 988-998, 2006.
- KEZUKA, Y.; OHISHI, M.; ITOH, Y.; WATANABE, J.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T.; NONAKA, T. Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. **Journal of Molecular Biology**, v. 358, n. 2, p. 472-84, 2006.
- KEYHANI, N.O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1473, p.108-122, 1999.
- KIM, H.S.; TIMMIS, K.N.; GOLYSH, P.N. Characterization of a chitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1275-1283, 2007.
- KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisted. **Marine Drugs**, n. 8, p. 1988-2012, 2010.
- KLEIN, B.K.; POLAZZI, J.O.; DEVINE, C.S.; RANGWALA, S.H.; OLINS, P.O. Effects of signal peptide changes on the secretion of bovine somatotropin (bST) from *Escherichia coli*. **Protein Engineering**, v. 5, p. 511-517, 1992.
- KUDAN, S.; PICHYANGKURA, R. Purification and Characterization of Thermostable Chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 23-35, 2009.
- KUO, C.J.; LIAO, Y.C.; YANG, J.H.; HUANG, L.C.; CHANG, C.T.; SUNG, H.Y. Cloning and Characterization of an Antifungal Class III Chitinase from Suspension-Cultured Bamboo (*Bambusa oldhamii*) Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.23, p. 11507-11514, 2008.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3 ed. Sigapura: Springer, 2006, 960p.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 22, p. 680-685, 1970.
- LAN, X.; ZHANG, X.; HU, J.; SHIMOSAKA, M. Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.70, n.10, p. 2437-2442, 2006.
- LARSEN, T.; PETERSEN, B.O., STORGAARD, B.G.; DUUS, J.O.; MPALCIC, M.M.; LEISNER, J.J. Characterization of a novel *Salmonella* Typhimurium chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetyllactosamine conjugate.

Glycobiology, v. 21, n. 4, p. 426-436, 2011.

LEHANE, M.J.; WU, D.; LEHANE, S.M. Midgut specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. **PNAS**, v. 94, p. 11502-11507, 1997.

LEE, Y.S.; PARK, I.H.; YOO, J.S.; CHUNG, S.Y.; LEE, Y.C.; CHO, Y.S.; AHN, A.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.

LEE, S.G.; KOH, H.Y.; HAN, S.J.; PARK, H.; NA, D.C.; KIM, I.L.; LEE, H.K.; YIM, J.H. Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. **Protein Expression and Purification**, v. 71, p. 108-114, 2010.

LEITE, Y.F.; SILVA, L.M.; AMORIM, R.C.; FREIRE, E.A.; DE MELO JORGE, D.M.; GRANGEIRO, T.B.; BENEVIDES, N.M. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, n.1-2, p. 137-145. 2005.

LEON, L.L.; MIRANDA, C.C.; SOUZA, A.O. DE; DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 48, p. 449-450, 2001.

LICHSTEIN, H.C.; VAN DE SAND, V.F. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Infectious Diseases**, n. 76, p. 47-51, 1945.

LIN, F.P.; CHUANG, H.H.; LIU, Y.H.; HSIEH, C.Y.; LIN, P.W.; LIN, H.Y. Effects of C-terminal amino acids truncation on enzyme properties of *Aeromonas caviae* D1 chitinase. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 265-273, 2009.

LIU, C.L.; SHEN, C.R.; HSU, F.F.; CHEN, J.K.; WU, P.T.; GUO, S.H.; LEE, W.C.; YU, F.W.; MACKAY, Z.B.; TURK, J.; GROSS, M.L. Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 1, p. 124-131, 2009.

LIU, D.; CAIA, J.; XIE, C.C.; LIU, C.; CHEN, Y.H. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 46, p.252-256, 2010.

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, n. 5, p. 2447-2453, 2010.

LOBO, M.D.P. **Purificação parcial de uma quitinase funcional de *Chromobacterium violaceum* produzida em *Escherichia coli***. Monografia (Graduação). Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 65p. Fortaleza, Ceará, 2009.

LOPES, S.C.P.; BLANCO, Y.C.; JUSTO, G.Z.; NOGUEIRA, P.A.; RODRIGUES, F.L.S.; GOELNITZ, U.; WUNDERLICH, G.; FACCHINI, G.; BROCCHI, M.; DURAN, N.; COSTA,

F.T.M. Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits Plasmodium Growth *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n.5, p. 2149–2152, 2009.

LUCIC MR, FORBES BE, GROSVENOR SE, CARR JM, WALLACE JC, FORSBERG G. Secretion in Escherichia coli and phage-dis-play of recombinant insulin-like growth factor binding protein- 2. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 95-108, 1998.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249–270., 2005.

McREE, D.E. **Practical protein crystallography**. 2 ed. San Diego, California. 1993.

MARTINEZ, R.; VELLUDO, M.A.SL.; DOS SANTOS, V.R.; DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum*: INFECTION IN BRAZIL. A CASE REPORT. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.2, p. 111-113, 2000.

MEHMOOD, M.A.; XIAO, X.; HAFEEZ, F.Y.; GAI, Y.; WANG, F. Purification and characterization of a chitinase from *Serratia proteamaculans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1955-1961, 2009.

MELO, A.M.Y.; MAIA, L.C.; MORGADO, L.B. Fungos micorrízicos arbusculares em bananeira cultivados no vale do submédio São Francisco. **Acta Botanica Brasílica**, v. 11, p. 115-121, 1997.

MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, n. 36, p. 539–543, 2000.

MERGULHÃO, F.J.M.; SUMMERS, D.K.; MONTEIRO, G.A. Recombinant protein secretion in Escherichia coli. **Biotechnology Advances** v. 23, p. 177–202, 2005.

MESTERS, J.R.; HILGENFELD, R. Protein Glycosylation, Sweet to Crystal Growth? **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 11, p. 2251-2253, 2007.

MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E.A. Rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 648-656, 1977.

MONTESINO, R.; GARCIA, R.; QUINTERO, O.; CREMATA, J.A. Variation in N-Linked Oligosaccharide Structures on Heterologous Proteins Secreted by the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 14, p. 197–207, 1998.

NAUMOFF, D.G. Hierarchical Classification of Glycoside Hydrolases. **Biochemistry**, v. 76, n. 6, p. 622- 635, 2011.

NAZARI, B.; SAITO, A.; KOBAYASHI, M.; MIYASHITA, K.; WANG, Y.; FUJI, T. High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, p. 623-635, 2011.

- NEEREJA, C.; ANIL, K.; PURUSHOTHAM, P.; SUMA, K.; SARMA, P.; 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.
- NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J.; GOW, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 67-78, 2008.
- NGUYEN, H.A.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, T.T.; PETERBAUER, C.K.; MATHIESEN, G.; HALTRICH, D. Chitinase from *Bacillus licheniformis* DSM13: Expression in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and biochemical characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 81, p. 166-174, 2012.
- NISHIYAMA, Y.; NOISHIKI, Y.; WADA, M. X-ray Structure of Anhydrous β -Chitin at 1 Å Resolution. **Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 950–957, 2011.
- NOTHAFT, H.; SZYMANSKI, C.M. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 8, p. 765-778, 2010.
- NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, p. 205-217, 2000.
- ÖBERG, F.; SJOHAMN, J.; FISCHER, G.; MOBERG, A.; PEDERSEN, A.; NEUTZE, R.; HEDFALK, K. Glycosylation Increases the Thermostability of Human Aquaporin 10 Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31915–31923, 2011.
- OKAY, S.; TEFON, B.E.; OZKAN, M.; OZCENGIZ, G. Expression of chitinase A (*chiA*) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 161-170, 2008.
- OLIVEIRA, G.M. **Efeito de frações protéicas de *Chromobacterium violaceum* sobre fungos fitopatogênicos**. Fortaleza, 2008. Monografia (Graduação). Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 50 p.
- OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; MIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5065-5070, 1996.
- PANTANELLA, F.; BERLUTTI, F.; PASSARIELLO, C.; SARLI, S.; MOREA, C.; SCHIPPA, S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p. 992–999, 2007.
- PARK, J.K.; MORITA, K.; FUKUMOTO, I.; YAMASAKI, Y.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; MATSUDA, H. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 684-689, 1997.
- 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 conserve dor

nonconserved residues on its catalytic activity. **Biotechnologically relevant enzymes and proteins**, v. 74, p. 791-804, 2007.

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

PAYAN, F.; FLATMAN, R.; PORCIERO, S.; WILLIAMSON, G.; JUGE, N.; ROUSSE, A. Structural analysis of XIP-I, a xylanase protein inhibitor from wheat. **Biochemical Journal**, v. 372, p. 399-405, 2003.

PERRAKIS, A.; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIM, A.B.; CHET, I.; WILSON, K.S.; VORGISA, C.E. Crystal structures of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. **Structure** 2, p. 1169-1180, 1994.

PUGSLEY, A.P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 57, p. 50–108, 1993.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, p. 101-120, 2009.

RABINOVICH, M.L.; MELNIK, M.S.; BOLOBOVA, A.V. Microbial cellulases (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**. V. 38, n. 4, p. 305-32, 2002.

REISSIG, J.L.; STORMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, n. 2, p. 959-966, 1955.

REYES-RAMÍREZ, A.; ESCUDERO-ABARCA, B.I.; AGUILAR-USCANGA, G.; HAYWARD-JONES, P.M.; BARBOZA-CORONA, J.E. Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. 131-134, 2004.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 11, p. 317–338, 1993.

SAKKA, K.; KUSAK, R.; KAWANO, A.; KARITA, S.; SUKHUMAVASI, J.; KIMURA, T.; OHMIYA, K. Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Chitinase ChiA from *Xanthomonas* sp. Strain AK and Some Properties of ChiA. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 6, p. 527-533. 1998.

SALES, M.P.; GOMES, V.M.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER, J. Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguicula.ta*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 319-326, 1996.

SAKKA, K.; KUSAKA, R.; KAWANO, A.; KARITA, S.; SUKHUMAVASI, J.; KIMURA, T.; OHMIYA, K. Cloning and sequencing of the gene encoding chitinase ChiA from *Xanthomonas* sp. strain AK and some properties of ChiA. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, p. 527-533, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SANDKVIST, M.; BAGDASARIAN, M. Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 505-511, 1996.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

SHEN, S.H.; BASTIEN, L.; POSNER, B.I.; AND CHRETIEN, P. A proteintyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyroine kinases. **Nature**, v. 352, p. 736-739, 1991.

SHENG, L.; ZHI-AN, Z.; MING, L.; ZHEN-RONG, G.; CHEN, B.; WEI-DA, H. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from *Bacillus brevis*. **CTA Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 690-696, 2002.

SHETTY, K.N.; BHAT, G.G.; INAMDAR, S.R.; SWAMY, B.M.; SUGUNA, K. Crystal structure of a β -prism II lectin from *Remusatia vivipara*. **Glycobiology**, doi:10.1093/glycob/cwr100, 2011.

SHIBUI, T.; UCHIDA-KAMIZONO, M.; OKAZAKI, H.; KONDO, J.; MURAYAMA, S.; MORIMOTO, Y.; NAGAHARI, K.; TERANISHI, Y. High-level secretion of human apolipoprotein E produced in *Escherichia coli*: use of a secretion plasmid containing tandemly polymerized ompF-hybrid gene. **Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 109-120, 1991.

SHIRO, M.; UEDA, M.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. Cloning of a cluster of chitinases genes from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 1305, p. 44-48, 1996.

SIKORSKI, P.; HORI, R.; WADA, M. Revisit of a-chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1100-1105, 2009.

SIQUEIRA, I.C.; DIAS, J.; RUF, H. *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1443-1445, 2005.

SMITH, T.J.; HILL, K.K.; FOLEY, B.T.; DETTER, J.C.; MUNK, A.C.; BRUCE, D.C.; DOGGETT, N.A.; SMITH, L.A.; MARKS, J.D.; XIE, G.; BRETTIN, T.S. Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids. **PLoS one**, v. 2 p. 1271, 2007.

SNEATH, P.H.A. Genus *Chromobacterium* Bergonzini 1881, 153AL. In NH Krieg, JG Holt eds., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 580-582, 1984.

SNEATH, P.H.A.; WHELAN, J.P.F.; SINGH, R.B.; EDWARDS, D. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*, **The Lancet**, v. 265, p. 276-277, 1953.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, 2005.

SOUZA, A.O.DE; AILY, D.C.G.; SATO, D.N.; DURÁN, N. Atividade da violaceína *in vitro*

sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n. 58, p. 59-62, 1999.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical biochemistry**, v. 287, p. 252-260, 2000.

STRONG, F.M Isolation of violacein, **Science**, v. 100, n. 28, 1944.

STEFANIDI, E.; VORGIAS, C.E. Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. **Extremophiles**, v. 12, p. 541-552, 2008.

STEPHENS, C. Microbial Genomics: Tropical Treasure? **Current Biology**, v.14, p.65-66, 2004.

STREICHSBIER, F. Utilization of chitin as sole carbon and nitrogen source by *Chromobacterium violaceum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 19, p. 129-132, 1983.

SYNSTAD, B.; GÅSEIDNES, S.; VAN AALTEN, D.M.; VRIEND, G.; NIELSEN, J.E.; EIJSINK, V.G. 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.

TAKAHARAS, M. HIBLERQ, D.W.; BARRY, P.J.; GERLTQ, J.A.; INOUYEG, M. The ompA Signal Peptide Directed Secretion of Staphylococcal Nuclease A by Escherichia coli. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 260, p. 2670-2674, 1985.

TANABE, T.; KAWASE, T.; WATANABE. T; UCHIDA, Y.; MITSUTOM, M. Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 29-32, 2000.

TELLAM, R.L.; EISEMANN, C.H. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, v. 30, p. 1189-1201, 2000.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara americana*. **Journal of Insect Physiology**, v. 27, p. 325-331, 1981.

TEWS, I.; TERWISSCHA, VAN SCHELTINGA A.C.; PERRAKIS, A.; WILSON, K.S.; DIJKSTRA, B.W. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 7954-7959, 1997.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 178, p. 362-366, 1989.

TRUONG, N.H.; PARK, S.M.; NISHIZAWA, Y.; WATANABE, T.; SASAKI, T.; ITOH, Y. Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1063-1070, 2003.

UDAYA PRAKASH, N.A.; JAYANTHI, M.; SABARINATHAN, R.; KANGUEANE, P.; LAZAR MATHEW; SEKAR, K. Evolution, Homology Conservation, and Identification of Unique Sequence Signatures in GH19 Family Chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 70, n. 5, p. 466-478, 2010.

UEDA, H.; NAKAJIMA, H.; HORI, Y.; GOTO, T.; OKUHARA, M. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, n. 58, p. 1579–1583, 1994.

UEDA, M.; FUJIWARA, A.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. 10S-24. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 2162-2164, 1995.

VAAJE-KOLSTAD G, VASELLA A, PETER MG, NETTER C, HOUSTON DR, WESTERENG B, SYNSTAD B, EIJSINK VG, VAN AALTEN DMF. Interactions of a family 18 chitinase with HM508, a designed inhibitor. **Journal of Biological Chemistry** v. 279, p. 3612–3619, 2004.

VAN AALTEN D.M.; SYNSTAD, B.; BRURBERG, M.B.; HOUGH, E.; RIISE, B.W.; EIJSINK, V.G.; WIERENGA, R.K. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. **PNAS**, v. 97, p. 5842-5847, 2000.

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., MARANHAO 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. **PNAS**, v. 100, n. 20, p.11660-11665, 2003.

VLASUK, G. P.; INOUE, S.; ITO, H.; ITAKURA, K.; INOUE, M. Effects of the complete removal of basic amino acid residues from the signal peptide on secretion of lipoprotein in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 5, p 7141-7148, 1983.

VELUSAMY, P.; KIM, K.Y. Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. **International Research Journal of Microbiology (IRJM)**, v. 2, n. 6, p. 206-214, 2011.

VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Research**, v. 14, p. 4683-4690, 1986.

XIAYUN, J.; DAOCHUN, C.; SHENLE, H.; WEIFEN, W.; SHUNSHEN, C.; SHUMING, Z. Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. **Carbohydrate Polymers** (2010), doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.008.

WANG, S.L.; CHANG, W.T. Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 380-386, 1997.

WANG, Y.J.; YANG, Q. Cloning and expression of a novel chitinase chi58 from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. **Biochemical Genetics**, v. 47, n.7-8, p. 547-558, 2009.

WANG, S.L.; SHIH, I.L.; LIANG, T.W.; WANG, C.H. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2241–2248, 2002.

WANG, S.L.; CHAO, C.H.; LIANG, T.W.; CHEN, C.C. Purification and Characterization of Protease and Chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of Marine Wastes by These Enzymes. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 334-344, 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 & Sons Ltd. West Sussex: England. p. 51-73, 1996.

WATANABE, T.; KOBORI, K.; MIYASHITA, K.; FUJII, T.; SAKAI, H.; USCHIDA, 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**, n. 268, p. 18567-18572, 1993.

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

WOOLEY, P.G. *Bacillus violaceus manilae* (a pathogenic organism), Bull. **Johns Hopkins Hospital**, v. 16, p. 89–90, 1905.

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.

WU, M.L.; CHUANG, Y.C.; CHEN, J.P. Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5100–5106, 2001.

YADA, S.; WANG, Y.; ZOU, Y.; NAGASAKI, K.; OSAKA, I.; ARAKAWA, R.; ENOMOTO, K. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. **Marine Biotechnology**, v. 10, p.128–132, 2008.

YAN, R.; HOU, J.; DING, D.; GUAN, W.; WANG, C.; WU, Z.; LI, M. In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. **Journal of Basic Microbiology** v. 48, p. 293–301, 2008.

YANG, L.H.; XIONG, H.; LEE, O.O.; QI, S.H.; QIAN, P.Y. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 625–630, 2007.

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.

YANG, C.H.; LI, Y.H.. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, p. 435–441, 2011.

YIN, Q.; LIN, S.C.; LAMOTHE, B.; LU, M.; LO, Y.C.; HURA, G.; ZHENG, L.; RICH, R.L.; CAMPOS, A.D.; MYSZKA, D.G.; LENARDO, M.J.; DARNAY, B.G.; WU, H. E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, p. 658–666, 2009.

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.

ZAHEER-UL-HAQ; DALAL, P.; ARONSON JR, N.N.; MADURA, J.D. Family 18 Chitolectins: Comparison of MGP40 and HUMGP39. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, n. 2, p. 221–226, 2007.

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 90, p.384–389, 2000.

ZEES, A.C.; PYRPASSOPOULOS, S.; VORGIAS, C. E. Insights into the role of the (α + β) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the

enzymatic activity of Chitinase A from *Serratia marcescens*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 23–31, 2009.

ZOU, X.; NONOGAKI, K.; WELBAUM, G.E. A Gel Diffusion Assay for Visualization and Quantification of Chitinase Activity. **Molecular Biotechnology**, v. 2, p. 19-23, 2002.

11. ANEXOS

Anexo I. Seqüência de nucleotídeos completa da ORF CV2935

Seqüência de nucleotídeos completa da ORF CV2935 (1.320 pb) que codifica para uma quitinase A de *Chromobacterium violaceum*, disponível no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sob o número de acesso AE016825.1

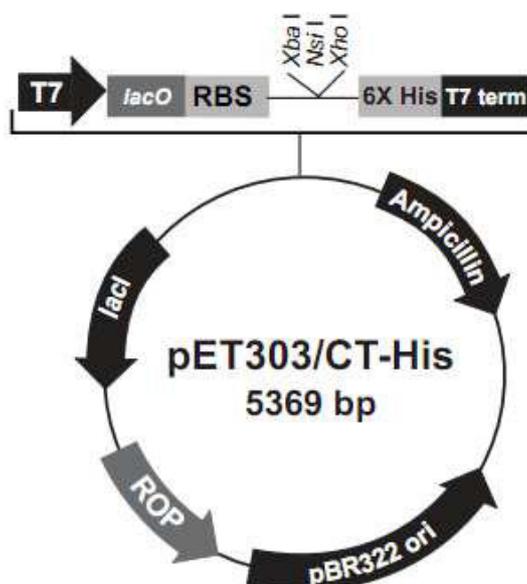
```
ATGCGCAGAACGACAGGCAGGGCGATTGCAATGGCTATGCTGCTGGCCCTGGGCCAGCACGCATGGGCGG
CGGCTTGCCCGGGCTGGGCCGAGGGAACGGCCTACAAGGTCGGCGACGTGGTCAGCTACAACAATGCCAA
CTATAACCGCGCTGGTGGCGCACACGGCTTATGTCGGCGCCAACCTGGAACCCGGCCGCCTCGCCGACGCTG
TGGACGCCCGGGCGGCAGCTGCGCCGGCGGGGATCCCACTCCGCCGACGCCGCCGAATCCACCGACCCCGC
CCAGCCC GCCCGGGCAATACCGTGCCTTTCGCCAAGCATGCGCTGGTAGGCTATTGGCACAATTTGCGC
CAATCCGAGCGGCAGCGCCTTCCCGCTGTCCAGGTCAGCGCCGACTGGGATGTGATCGTGGTGGCCTTC
GCCGACGACGCCGCAACGGCAACGTCAGCTTACGCTGGATCCGGCCGCGGGCAGCGCGGCAGTTCA
TCCAGGACATCCGCGCGCAGCAAGCCAAGGGCAAGAAGGTGGTGTGTCGCTGGGCGGCCAGAACGGTTC
GGTGACGCTGAACAACGCCACGCAGGTGCAGAACTTCGTCAACAGTCTGTACGGCATCCTCACCCAGTAC
GGCTTCGACGGCATAAGACCTGGATCTGGAGAGCGGCAGCGGCATCGTCTGTCGGCGCGCCGGTGGTCAGTA
ATCTGGTCAGCGCGGTCAAGCAGCTGAAGGCCAAGATCGGGCCCAATTTCTACCTGTCGATGGCGCCGGA
GCATCCGTATGTGCAGGGCGGCTTCGTGCGCTACGGCGGCAACTGGGGCGCCTATCTGCCCATCATCGAC
GGCCTGCGCGACGATTTGTGCGGTGATCCATGTCCAGTACTACAACAACGGCGGACTATAACCCCTTATT
CCACCGCGTGCTGGCCGAGGGATCGGCCGACATGCTTGTGCGCGGCAGCAAGATGCTGATCGAGGGCTT
CCCGATCGCCAACGGCGCGTCCGGGCAGCTTCAAGGGCCTGAGGCCGGACCAGGTGGCCTTCGGCGTGCCG
TCCGGCCGCGAGTTCCGGCCAATTCGGGCTTCGTACCCGCGGACACGGTGGCCAAGGCGCTGACCTGCCTGA
CCACGCTGCAAGGCTGCGGCTCGGTCAAGCCGGCGCAGGCTTATCCGGCCTTCGCGGCGTGATGACGTTG
GTCGATCAACTGGGACCGCCGCGACGGCTACACCTTCTCCCGCCGGTGGCCGCCAGCCTGCGCCAGCAG
CCTGTCGCCGCGCAGGCGGGCAAGAAAAAGGCCGCCGCGCGACGCGGACGGCCTGGTGA
```

Anexo II. Sequência de nucleotídeos, sem a região codificadora do peptídeo sinal, da ORF CV2935

Sequência de nucleotídeos, sem a região codificadora do peptídeo sinal, da ORF CV2935 (1.248 pb)

```
TGCCCGGGCTGGGCCGAGGGAACGGCTACAAGTCGGCGACGTGGTCAGCTACAACAATGCCAACTATA
CCGCGCTGGTGGCGCACACGGCTTATGTCGGCGCCAAC TGAACCCGGCCGCCTCGCCGACGCTGTGGAC
GCCGGGCGGCAGCTGCGCCGGCGGCGATCCCACTCCGCCGACGCCGCCGAATCCACCGACCCCGCCAGC
CCGCCGCCGGCAATACCGTGCCTTTCGCCAAGCATGCGCTGGTAGGCTATTGGCACAATTTGCCAATC
CGAGCGGCAGCGCCTTCCCGCTGTCCAGGTCAGCGCCGACTGGGATGTGATCGTGGTGGCCTTCGCCGA
CGACGCCGGCAACGGCAACGTCAGCTTACGCTGGATCCGGCCGCGGGCAGCGCGGCGCAGTTCATCCAG
GACATCCGCGCGCAGCAAGCCAAGGGCAAGAAGGTGGTGCTGTCGCTGGGCGGCCAGAACGGTTCGGTGA
CGCTGAACAACGCCACGCAGGTGCAGAACTTCGTCAACAGTCTGTACGGCATCCTCACCCAGTACGGCTT
CGACGGCATAGACCTGGATCTGGAGAGCGGCAGCGGCATCGTCGTCGGCGCGCCGGTGGTCAGTAATCTG
GTCAGCGCGGTCAAGCAGCTGAAGGCCAAGATCGGGCCCAATTTCTACCTGTCGATGGCGCCGGAGCATC
CGTATGTGCAGGGCGGCTTCGTCGCCCTACGGCGGCAACTGGGGCGCCTATCTGCCCATCATCGACGGCCT
GCGCGACGATTTGTCGGTGATCCATGTCCAGTACTACAACAACGGCGGACTATACACCCCTTATTCCACC
GGCGTGCTGGCCGAGGGATCGGCCGACATGCTTGTGCGCGGCAGCAAGATGCTGATCGAGGGCTTCCCGA
TCGCCAACGGCGCGTCGGGCAGCTTCAAGGGCCTGAGGCCGACCAGGTGGCCTTCGGCGTGCCGTCCGG
CCGCAGTTCGGCCAATTCGGGCTTCGTCACCGCGGACACGGTGGCCAAGGCGCTGACCTGCCTGACCACG
CTGCAAGGCTGCGGCTCGGTCAAGCCGGCGCAGGCTTATCCGGCCTTCCGCGGCGTGATGACGTGGTCGA
TCAACTGGGACCGCCGCGACGGCTACACCTTCTCCCGGCCGGTGGCCGCCAGCCTGCGCCAGCAGCCTGT
CGCCGCGCAGGCGGGCAAGAAAAAGGCCGCCCGCGCGACGCGGACGGCCTGGTGA
```

Anexo III. Vetor de expressão em *Escherichia coli*



Comments for pET303 CT-His 5369 nucleotides

T7 promoter: bases 20-36
 T7 promoter priming site: bases 20-39
 lac operator (*lacO*): bases 39-63
 Ribosome binding site (RBS): bases 95-100
 6X His Tag: bases 119-136
 T7 reverse priming site: bases 186-206
 T7 transcription termination region: bases 147-277
 F1 origin: bases 287-742
bla promoter: bases 775-879
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 874-1734
 pBR322 origin: bases 1945-2678 (c)
 ROP ORF: bases 2920-3011 (c)
lacI ORF: bases 3914-5032 (c)

(c) = complementary strand

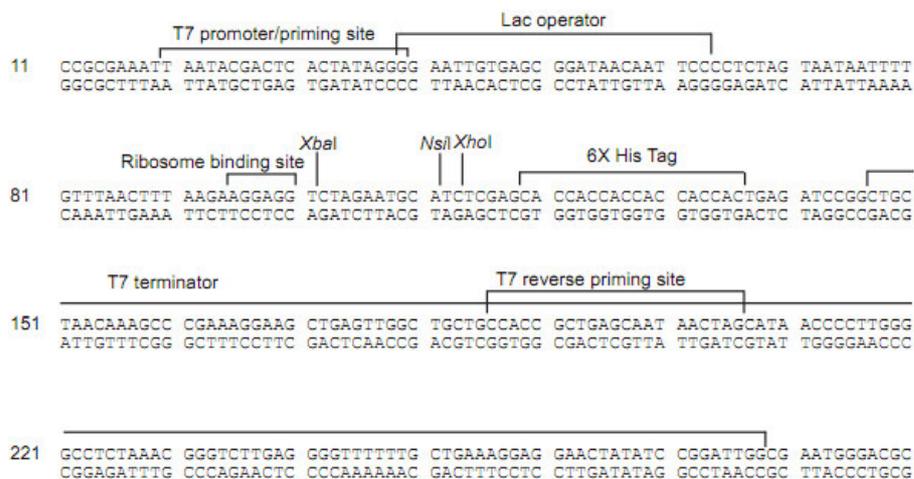


Diagrama do vetor de expressão pET303/CT-His, com indicação das posições dos sítios de restrição e detalhamento do sítio múltiplo de clonagem.

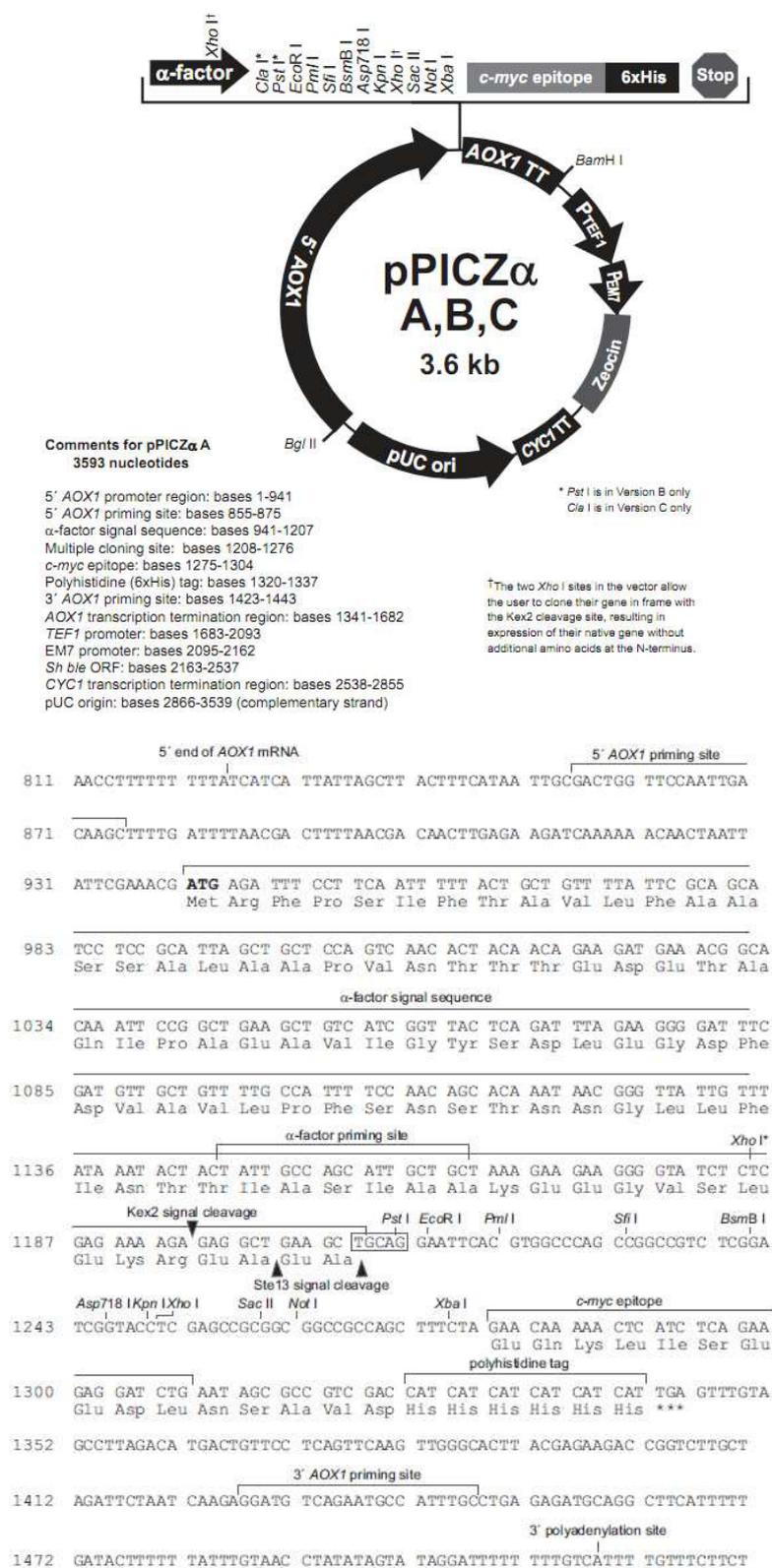
Anexo IV. Vetor de expressão em *Pichia pastoris*

Diagrama do vetor de expressão pPICZαA, com indicação das posições dos sítios de restrição e detalhamento do sítio múltiplo de clonagem.

Anexo V.

Seqüência aminoácidos deduzida da rCV2935, produzida em *E. coli* (A) e em *P.pastoris* (B)

MRRTTGRAIAMAMLLALGQHAWAAA**CPGWAEGTAYKVGDVVSYNNANYTALVAHTAYVGAN**
WNPAASPTLWTPGGSCAGGDPTPPTPPNPPTPPSPPPGNTVPFAKHALVGYWHNFANP**SGS**
 AFPLSQVSADWDVI VVAFADDAGNGNVSFTLDPAAGSAAQFIQDIRAQQAKGKKVLSLGG
 QNGSVTLNNATQVQNFVNSLYGILTQYGFDDLDLESGSGIVVGAPVVSNLVSAVKQLKA
 KIGPNFYLSMAPEHPYVQGGFVAYGGNNGAYLPIIDGLRDDLSVIHVQYYNNGGLYTPYST
 GVLAEGSADMLVGGSKMLIEGFP IANGASGSFKGLRPDQVAFGVP SGRSSANS GFVTADTV
 AKALTCLTTLQCGSVKPAQAYPAFRGVMTWSINWDRRDGYTFSRPVAASLRQQPVAAQAG
 KKKAARATRTAW**LEHHHHH**

A

EAEAEFACPGWAEGTAYKVGDVVSYNNANYTALVAHTAYVGAN**WNPAASPTLWTPGGSCAG**
GDPTPPTPPNPPTPPSPPPGNTVPFAKHALVGYWHNFANP**SGSAFPLSQVSADWDVI VVAF**
ADDAGNGNVSFTLDPAAGSAAQFIQDIRAQQAKGKKVLSLGGQNGSVTLNNATQVQNFV
SLYGILTQYGFDDLDLESGSGIVVGAPVVSNLVSAVKQLKAKI GPNFYLSMAPEHPYVQ
GGFVAYGGNNGAYLPIIDGLRDDLSVIHVQYYNNGGLYTPYSTGVLAEGSADMLVGGSKML
IEGFP IANGASGSFKGLRPDQVAFGVP SGRSSANS GFVTADTVAKALTCLTTLQCGSVK**P**
AQAYPAFRGVMTWSINWDRRDGYTFSRPVAASLRQQPVAAQAGKKKAARATRTAWVLEQKL
ISEEDLNSAVDHHHHH

B

Sublinhado em (A) representa o peptídeo sinal nativo, que é reconhecido e clivado pela célula hospedeira. Em azul está representado o domínio de ligação a quitina e, em verde, o domínio catalítico, segundo análise da seqüência pela ferramenta SMART (em [www. http://smart.embl-heidelberg.de/](http://smart.embl-heidelberg.de/)). Em vermelho, resíduos codificados nos vetores de expressão utilizados.