



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

SUELEN CARNEIRO DE MEDEIROS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA GLICOSIL HIDROLASE DA FAMÍLIA 18
(CV2736) DE *Chromobacterium violaceum* EM *Pichia pastoris* COM POTENCIAL
ANTIBACTERIANO**

**FORTALEZA
2012**

SUELEN CARNEIRO DE MEDEIROS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA GLICOSIL HIDROLASE DA FAMÍLIA 18
(CV2736) DE *Chromobacterium violaceum* EM *Pichia pastoris* COM POTENCIAL
ANTIBACTERIANO**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica, área de concentração Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa
Grangeiro

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M438e Medeiros, Suelen Carneiro de.
Expressão heteróloga de uma glicosil hidrolase da família 18 (CV2736) de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris* com potencial antibacteriano / Suelen Carneiro de Medeiros – 2012.
120 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. Quitanase. 2. Antimicrobiano. I. Título.

CDD 574.192

SUELEN CARNEIRO DE MEDEIROS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA GLICOSIL HIDROLASE DA FAMÍLIA 18
(CV2736) DE *Chromobacterium violaceum* EM *Pichia pastoris* COM POTENCIAL
ANTIBACTERIANO**

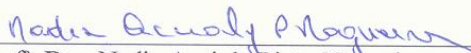
Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica, área de concentração Bioquímica.

Aprovada em: 24. 08. 12

BANCA EXAMINADORA



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



Profª. Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profª. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará - UECE

**As pessoas que mais amo: Igor,
Liduina, Victor e Lucivaldo;
Dedico**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força sem a qual eu não conseguiria continuar caminhando.

Ao meu amado, Igor, pelo apoio incondicional e pela renúncia de seu tempo para me ajudar no que fosse necessário.

À minha família Liduina, Lucivaldo e Victor, pelo carinho, apoio e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela brilhante orientação para a execução deste trabalho, por todos os ensinamentos, sejam com palavras ou com exemplos, sempre com otimismo.

À Professora Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira, por ceder seu laboratório para parte dos experimentos, pelas palavras de incentivo e por aceitar compor a banca desta dissertação.

A professora Dr. Maria Izabel Florindo Guedes, da Universidade Estadual do Ceará (UECE) pelo aceite em compor a banca desta dissertação.

À professora Maria Aparecida Oliveira Alves por seu exemplo de perseverança e humildade.

Pelas palavras de incentivo e todos os ensinamentos ao longo de todos esses anos.

As amigas, Marina, Denise e Patrícia, pelo constante apoio e amizade em todos os momentos, seja dentro ou fora do laboratório.

À família LabMicro, em especial a Andréa Bessa, Larissa, Andressa Hellen e Gleiton pela ajuda constante nos experimentos e pelos bons momentos lá vividos. Tenho muito a agradecer.

Aos amigos do laboratório de genética: Cícero, Juliana, Paloma, Lucas, Marcel, Eder, Beatriz Freire, Thais, Beatriz Adjafre e Raquel, por todo apoio e por todos os momentos de ajuda.

Ao amigo Vladimir, por todo conhecimento compartilhado, pelas conversas nos momentos mais difíceis e por todo apoio, mesmo a distância.

Aos amigos do departamento de bioquímica: Fredy, Pedro, Ednézio, pelos momentos de conversa, que tanto me animavam.

Aos grandes amigos, Kharla, Georgia, Valesca, Juliana Francisco, João Henrique, Carlos Alberto e Thalita Natasha e Sidney pelas palavras de incentivo nos momentos que eu tanto precisei e pelos pensamentos sempre positivos.

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:

Universidade Federal do Ceará (UFC).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Ceará (FUNCAP).

Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar quitina, um polissacarídeo formado por unidades de N-acetil- β -D-glucosamina, que é extremamente abundante na natureza. Após o sequenciamento do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, alguns genes referentes a proteínas com potencial biotecnológico foram encontrados, dentre eles os que codificam para quitinases. Este trabalho teve como objetivos expressar a proteína CV2736 de *C. violaceum* ATCC 12472 de forma recombinante em células de *Pichia pastoris* KM71H e avaliar seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos de importância médica. Para isto, a sequência completa da ORF (CV2736_{PS+}), bem como uma sequência parcial, codificando uma proteína truncada, sem um possível peptídeo sinal N-terminal (CV2736_{PS-}), foram clonadas no vetor de expressão pPICZ α A, para expressão em *P. pastoris* KM71H. A proteína completa (rCV2736_{PS+}) foi detectada em uma fração proteica, contendo as proteínas secretadas para o meio de cultura, por células de *P. pastoris* transformadas com o respectivo cassete de expressão recombinante. A rCV2736_{PS+} apresentou-se de forma heterogênea, quando analisada por SDS-PAGE, exibindo três bandas com massas moleculares aparentes de 41,3, 38,1 e 36,2 kDa, respectivamente, sendo uma delas (41,3 kDa) maior do que se poderia deduzir a partir da sequência de aminoácidos. Após coloração com reagente de Schiff para revelação de glicoproteínas, constatou-se que essa banda (41,3 kDa) correspondia a rCV2736_{PS+} na sua forma N-glicosilada. Além disso, rCV2736_{PS+} teve seus peptídeos identificados por espectrometria de massas, na fração F0/95 do meio de cultura livre de células. A proteína recombinante produzida sem os 22 aminoácidos iniciais (rCV2736_{PS-}) apresentou atividade quitinásica maior que a encontrada para a fração contendo rCV2736_{PS+}, apesar de não ter sido detectada por SDS-PAGE. A fração F0/95 do meio de cultura contendo rCV2736_{PS+} mostrou-se termoestável até 50°C e com pico de atividade quitinolítica em pH 3,0. A mesma fração apresentou maior atividade endoquitinásica e ativa contra os substratos sintéticos 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e 4-nitrofenil N,N',N''-triacetilquitotriose. A modelagem molecular evidenciou o dobramento na forma de barril (β/α)₈ (barril TIM), típico das proteínas da família GH18. Do mesmo modo, a fração F0/95 foi testada contra seis espécies de bactérias, apresentando atividade microbida contra *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e foi capaz de inibir o crescimento de *Salmonella choleraesuis*. A mesma fração foi testada contra a levedura *Candida albicans*, mas não foi detectada inibição do crescimento contra este microrganismo.

no ensaio. Portanto, a proteína recombinante rCV2736 pode, assim, ser considerada uma molécula com potencial antibacteriano.

Palavras-chave: Quitinase; *Pichia pastoris*; antimicrobiano; Expressão heteróloga.

ABSTRACT

Chitinases are enzymes capable of hydrolyzing chitin, a polysaccharide composed of units of N-acetyl-D-glucosamine, which is abundant in nature. The genome sequence of *C. violaceum* ATCC 12472 has revealed some genes encoding proteins with potential applications in agriculture and medicine, such as those encoding chitinases. This study aimed to express the protein CV2736 in *Pichia pastoris* KM71H and to evaluate its antimicrobial potential against microorganism of medical importance. To this purpose, the full ORF (encoding rCV2736_{PS+}) and a partial sequence of it, encoding a truncated protein without its putative signal peptide (rCV2736_{PS-}), were cloned into the vector pPICZαA for expression in *P. pastoris*. The protein rCV2736_{PS+} was detected in the cell-free culture medium of *P. pastoris* cells harboring the corresponding expression cassette. The recombinant CV2736_{PS+} was produced in a heterogeneous manner, and when analyzed by SDS-PAGE, three protein bands with apparent molecular masses of 41.3, 38.1 and 36.2 kDa were detected. The protein band with the highest molecular mass (41.3 kDa) was stained with the Periodic acid-Schiff's reagent, thus showing that this band corresponds to N-glycosylated rCV2736_{PS+}. Furthermore, tryptic peptides identified by mass spectrometry (ESI-MS) confirmed the identity of the expressed protein. The recombinant protein produced without the first 22 amino acids (rCV2736_{PS-}) showed higher chitinase activity than that found for the fraction containing rCV2736_{PS+}, despite not being detected by SDS-PAGE. The recombinant protein CV2736_{PS+}, present in the fraction F0/95 from the culture medium of induced cells, was active after heat treatment at 50 °C and its maximum chitinolytic activity was recorded at pH 3.0. This fraction was also able to degrade the synthetic substrates 4-nitrophenyl N,N'-diacetyl-β-D-chitobioside and 4-nitrophenyl N,N',N''-triacetylchitotrioside, which characterizes an endochitinase activity. *Ab initio* molecular modeling demonstrated that the polypeptide of CV2736 likely folds as a (β/α)₈ barrel (also known as TIM barrel), which is typical of the GH18 family proteins. The fraction F0/95 showed antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and growth inhibition against *Salmonella cholera-suis*. The same fraction were evaluated against the yeast *Candida albicans*, but was not detectable inhibition of this microorganism in the assay. These results suggest that rCV2736 should be further studied as a new anti-bacteria agent.

Keywords: chitinase; *Pichia pastoris*; antimicrobial; heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Mecanismo de ação das quitinases das famílias GH 18 (A), mostrando mecanismo de hidrólise por duplo deslocamento e o íon oxazoliníco formado como intermediário que pode ser hidrolisado, o que leva a retenção da configuração anomérica; e da família GH 19 (B), mostrando o mecanismo de hidrólise por deslocamento único, onde é formado o íon oxocarbênico como intermediário e ocorre a inversão da configuração anomérica. Fonte: (BRAMELD; GODDARD, 1998) com modificações.....	27
FIGURA 2-	Fotomicrografia eletrônica de células de <i>Chromobacterium violaceum</i> . (Fonte: www.cienciahoje.uol.com.br . Foto: Márcia Attias/UFRJ.).....	29
FIGURA 3-	Estrutura molecular da violaceína (Fonte: DURAN <i>et al.</i> , 2007).....	29
FIGURA 4-	Esquema da placa de microdiluição utilizada no experimento para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os microrganismos testados.....	49
FIGURA 5-	Predição de estrutura secundária para a sequência de aminoácidos da proteína CV2736, segundo software <i>PsiPred</i> (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/), evidenciando 8 pares de α -hélices e fitas- β , mostrando que CV2736 é pertencente a família GH 18 pela similaridade com a estrutura em forma de barril TIM $(\beta/\alpha)_8$, característico do grupo.....	51
FIGURA 6-	Análise com o software <i>SignalP</i> 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/) (A) e com o banco de dados Exprot (http://www.laurentian.ca/NR/rdonlyres/878B67F6-AD4B-41D1-9DB7-C7B8D41BF85D/0/Cviolaceum.txt) (B) para CV2736, mostrando que para esta sequência em (A) não há peptídeo sinal predito, de acordo com o escore C (linha continua vertical vermelha) e em (B) evidenciando um possível peptídeo sinal com 22 aminoácidos, clivado pela sinal peptidase I.....	52
FIGURA 7-	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da ORF CV2736 _{PS+} por PCR, a partir de DNA genômico de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472. M: marcador ϕ X174 DNA/ <i>Hae</i> III fragments (Invitrogen); 1. Produtos da reação sem DNA genômico (controle); 2. Produtos da reação contendo DNA genômico.....	54
FIGURA 8-	Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com <i>Eco</i> RI e <i>Xba</i> I. Amostras de DNA plasmidial putativamente recombinante (pPICZaA::CV2736 _{PS+}) foram purificadas de clones (poços 1-6) de <i>E.coli</i> TOP10F' e digeridas com <i>Eco</i> RI e <i>Xba</i> I. M: marcador λ DNA/ <i>Hind</i> III fragments (Invitrogen).....	55
FIGURA 9-	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando DNA genômico de clones <i>P. pastoris</i> KM71H, transformados com o vetor	56

pPICZαA::CV2736_{PS+}. M: marcador *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas); 1. Produtos de PCR usando DNA genômico de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZαA íntegro; 2 a 7: Produtos de PCR de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZαA::CV2736_{PS+}.....

- FIGURA 10- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da ORF CV2736_{PS-} por PCR em diferentes condições, a partir de DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472. As amplificações foram realizadas com uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Phusion Hot Start DNA polymerase*, Finnzymes) variando-se o tipo de tampão fornecido com a enzima e a presença/ausência de DMSO na reação. M: marcador *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas); 1. Produtos da reação com tampão HF; 2. Produtos da reação com tampão HF e DMSO; 3. Produtos da reação com tampão GC; 4. Produtos da reação com tampão GC e DMSO..... 58
- FIGURA 11- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando DNA genômico de clones de *P.pastoris* KM71H, transformados com o vetor pPICZαA::CV2736_{PS-}.M: marcador *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas); 1. Produtos de PCR usando DNA genômico de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZαA íntegro; 2 a 7: Produtos de PCR de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZαA::CV2736_{PS-}..... 59
- FIGURA 12- Densidade ótica a 600 nm de culturas de *P. pastoris* KM71H, obtidas a partir de células transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS+}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução..... 62
- FIGURA 13- Teores de proteínas totais solúveis, secretadas para o meio de cultura, por células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS+}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução..... 63
- FIGURA 14- Atividade quitinásica total, detectada no meio de cultura livre de células, de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS+}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução. A atividade quitinásica foi medida usando quitina coloidal como substrato. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc/mL/h a 37 °C..... 64
- FIGURA 15- Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes 67

(SDS-PAGE) de amostras do meio de cultura livre de células, coletadas de uma cultura de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZαA::CV2736_{PS+}. As amostras foram coletadas com 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6) e 144 h (7) após o início da indução da expressão da proteína recombinante. As bandas foram coradas com corante *SimplyBlue SafeStain* (A) e com o kit *InVision His-tag in-gel stain* (B). M: marcador Low molecular weight marker (GE Healthcare).....

- FIGURA 16- Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de amostras do meio de cultura livre de células, coletadas de uma cultura de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZαA íntegro (controle negativo). As amostras foram coletadas com 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6) e 144 h (7) após o início da indução da expressão da proteína recombinante. As bandas foram coradas com corante *SimplyBlue SafeStain* (A) e com o kit *InVision His-tag in-gel stain* (B). M: marcador *Low molecular weight marker* (GE Healthcare)..... 68
- FIGURA 17- Esquema mostrando a sequencia de aminoácidos e massa molecular predita pela sequencia de aminoácidos, explicando a massa molecular das bandas proteicas de rCV2736_{PS+}, encontradas após eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), evidenciando um possível processamento diferenciado feito por *Pichia pastoris*, quando da produção da proteína recombinante CV2736. (A – rCV2736_{PS+}, tendo corte feito pela protease Kex2, apresentando uma banda com massa molecular de aproximadamente 37 kDa; B – rCV2736_{PS+} mostrando dois possíveis pontes de corte da protease Ste13, apresentando duas massas moleculares distintas, uma com 36,8 kDa e outra com 36,6 kDa)..... 69
- FIGURA 18- Resultado da análise da sequência de aminoácidos de CV2736_{PS+} pelo software NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), evidenciando 3 potenciais sítios de N-glicosilação, representados pelas linhas verticais azuis (*potential*)..... 70
- FIGURA 19- Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da fração F0/95 do meio de cultura livre de células, de *P. pastoris* KM71H transformada com pPICZαA::CV2736_{PS+}. As bandas foram reveladas por coramento com reagente de Schiff (A) e com *Coomassie Brilliant Blue* (B). Poço 1: fração F0/95 contendo rCV2736_{PS+}; Poço 2: Fetuína (25 µg; Sigma-Aldrich); M: marcador de massa molecular *Low molecular weight marker* (GE Healthcare)..... 72
- FIGURA 20- Esquema mostrando a sequencia de aminoácidos e massa molecular predita pela sequencia de aminoácidos, hipotetizando as possíveis massas moleculares das bandas proteicas de rCV2736_{PS+}, encontradas após eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), após possíveis glicosilações feitas por *Pichia pastoris*, quando da produção da proteína recombinante CV2736. A – sequencia de aminoácidos da proteína recombinante rCV2736_{PS+}; B – rCV2736_{PS+} mostrando três possibilidades para as massas moleculares das bandas proteicas evidenciadas por eletroforese, após a adição de um resíduo de açúcar do tipo GlcNAc₂Man₈ (1- rCV2736_{PS+} com clivagem feita pela protease Kex2, 2- rCV2736_{PS+} com clivagem feita pelo primeiro sitio de corte para Ste13 e 3- 73

	rCV2736 _{PS+} com clivagem feita pelo segundo sitio de corte para Ste13).....	
FIGURA 21-	Identificação de CV2736 por espectrometria de massa (ESI/MS) e obtenção dos peptídeos encontrados na sequência de aminoácidos de CV2736, obtidos por digestão com tripsina (partes em amarelo são referentes aos peptídeos encontrados, sublinhados em vermelhos estão os sítios de glicosilação e na caixa retangular os aminoácidos do sítio catalítico).....	74
FIGURA 22-	Densidade ótica a 600 nm de culturas de <i>P. pastoris</i> KM71H, obtidas a partir de células transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736 _{PS-} . Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução.....	77
FIGURA 23-	Teores de proteínas totais solúveis, secretadas para o meio de cultura, por células de <i>P. pastoris</i> KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736 _{PS-} . Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução.....	78
FIGURA 24-	Atividade quitinásica total, detectada no meio de cultura livre de células, de clones de <i>P. pastoris</i> KM71H transformados com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736 _{PS-} . Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução. A atividade quitinásica foi medida usando quitina coloidal como substrato. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc/mL/h a 37 °C.....	79
FIGURA 25-	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de amostras do meio de cultura livre de células, coletadas de uma cultura de <i>P. pastoris</i> KM71H transformada com o vetor pPICZαA::CV2736 _{PS-} . As amostras foram coletadas com 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6) e 144 h (7) após o início da indução da expressão da proteína recombinante. As bandas foram coradas com corante <i>SimplyBlue SafeStain</i> . M: marcador <i>Low molecular weight marker</i> (GE Healthcare).....	80
FIGURA 26-	Análise pelo software online CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) da sequência de CV2736, mostrando similaridade com proteínas da família GH18, dentre elas, uma possível hidrolase específica para a esporulação de <i>Bacillus subtilis</i>	82
FIGURA 27-	Atividade quitinásica relativa detectada em alíquotas da fração F0/95 do	86

	meio de cultura livre de células do clone B de <i>P. pastoris</i> KM71H transformado com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736 _{PS+} , dialisadas contra vários tampões, numa faixa de pH de 2 a 10.....	
FIGURA 28-	Atividade quitinásica relativa detectada em alíquotas da fração F0/95 do meio de cultura livre de células do clone B de <i>P. pastoris</i> KM71H transformado com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736 _{PS+} , incubadas por 30 minutos em temperaturas diferentes, variando de 30°C a 90°C.....	87
FIGURA 29-	Modelo gerado a partir da sequência de aminoácidos de CV2736, mostrando a estrutura em forma de barril TIM, característico das Glicosil hidrolase da família 18 (molde utilizado: PDB 3CZ8).....	89
FIGURA 30-	Modelo gerado a partir da sequência de aminoácidos de CV2736, mostrando os aminoácidos do sítio ativo, onde se pode observar que existe uma troca no resíduo 104 de Aspartato para Serina. Isso pode explicar a baixa atividade quitinolítica da proteína.....	90
FIGURA 31-	Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> . As leituras (A ₄₉₂) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias ± EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.....	94
FIGURA 32-	Ensaio de microdiluição em caldo, mostrando a CIM detectada através da ausência de turvação visível para <i>Staphylococcus aureus</i> . Poços A, B e C, colunas 1 a 3: ausência de crescimento microbiano; colunas 4 a 12: crescimento microbiano; CIM: coluna 3 (25 µg/mL). Poços E, F e G (controle positivo – Amicacina; coluna 1 a 6: ausência de crescimento microbiano; colunas 7 a 12: crescimento microbiano; CIM: coluna 6 (3,75 µg/mL).....	95
FIGURA 33-	Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre <i>Pseudomona aeruginosa</i> . As leituras (A ₄₉₂) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias ± EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.....	96
FIGURA 34-	Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre <i>Escherichia coli</i> . As leituras (A ₄₉₂) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias ± EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.....	97
FIGURA 35-	Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre <i>Enterococcus faecalis</i> . As leituras (A ₄₉₂) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek).	98

Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.....

- FIGURA 36- Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736 sobre *Staphylococcus epidermidis*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo..... 99
- FIGURA 37- Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736 sobre *Salmonella choleraesuis*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo..... 100
- FIGURA 38- Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736 sobre *Candida albicans*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Cetoconazol 2,0mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo..... 101

LISTA DE TABELAS

TABELA 01-	Diferenças entre as glicosil hidrolases das famílias GH18 e GH19 (modificado de KASPRZEWSKA <i>et al</i> , 2003).....	26
TABELA 02-	Atividade quitinolítica da fração F0/95 do meio de cultura livre de células de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736 _{PS+} , na presença e ausência da enzima β -glucuronidase. O ensaio foi realizado usando quitina coloidal como substrato.....	84
TABELA 03-	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima da fração F0/95 do meio de cultura de <i>P. pastoris</i> ::pPICZ α A::CV2736 _{PS+} sobre as cepas testadas.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Hearth Infusion</i>
BMGY	<i>Buffered Complex Glycerol Medium</i>
BMMY	<i>Bufferd Complex Methanol Medium</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CTAB	Brometo de Cetiltriethylamônio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CV2736 _{PS+}	ORF 2736 de <i>Chromobacterium violaceum</i> – sequencia da proteína completa
CV2736 _{PS-}	ORF 2736 de <i>Chromobacterium violaceum</i> – sequencia parcial da proteína
DMAB	p-Dimetilaminobenzaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
GH	Glicosil-hidrolase (s)
GC	Guanina-Citosina
GYT	<i>Glycerol, yeast extract, tryptone</i>
IAA	Iodoacetamida
kV	quilovoltz
LB	<i>Lyogenic Broth</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pNP-GlcNAc	4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo
pNP-GlcNAc ₂	4-Nitrofenil N-N' -diacetil- β -D-quitobiosídeo
pNP-GlcNAc ₃	4-Nitrofenil β -D-N-N'-N'' -tricetilquitotriose
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase

PR	Proteína (s) relacionada (s) à patogênese
pPICZ α A::CV2736 _{PS+}	Plasmídeos recombinante para a sequência completa de CV2736
pPICZ α A::CV2736 _{PS-}	Plasmídeos recombinante para a sequência parcial de CV2736
P _{AOX1} ::CV2736 _{PS+} ::TT _{AOX1}	Cassete de expressão para a sequência completa de CV2736
P _{AOX1} ::CV2736 _{PS-} ::TT _{AOX1}	Cassete de expressão para a sequência parcial de CV2736
rCV2736 _{PS+}	Sequência completa de CV2736
rCV2736 _{PS-}	Sequência parcial de CV2736
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
TBE	Tris-Borato; EDTA
Taq	<i>DNA polimerase Thermus aquáticus</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
T _m	<i>Melting temperature</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate without amino acids</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
YPDS	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol</i>
U	Unidades

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
ABREVIATURAS	16
SUMÁRIO	18
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Quitinases	23
2.2 Glicosil Hidrolases	25
2.3 <i>Chromobacterium violaceum</i>	28
2.4 Sistemas de Expressão Heteróloga	30
2.4.1 Sistemas de Expressão Procarióticos.....	30
2.4.2 Sistemas de Expressão Eucarióticos – <i>Pichia pastoris</i>	31
2.5 Expressão Heteróloga de algumas quitinases produzidas em <i>Pichia pastoris</i>	33
3. PERGUNTAS DE PARTIDA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivos Gerais.....	35
4.2. Objetivos Específicos.....	35
5. MATERIAIS	36
5.1. Plasmídeo e Cepas de bactérias e leveduras	36
5.2. Enzimas e demais reagentes.....	36
6. MÉTODOS	38
6.1 Análises <i>in silico</i> da sequência da proteína CV2736.....	38
6.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	39
6.3 Obtenção dos vetores recombinantes (pPICZαA::CV2736 _{PS+} e pPICZαA::CV2736 _{PS-}) e transformação em <i>E. coli</i> TOP10F.....	39
6.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	41
6.5 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> KM71H com os vetores recombinantes pPICZαA::CV2736 _{PS+} e pPICZαA::CV2736 _{PS-}	41
6.5 Extração de DNA genômico de <i>Pichia pastoris</i>	42
6.7 Indução da expressão de rCV2736 _{PS+} e rCV2736 _{PS-} em <i>Pichia pastoris</i> KM71H e obtenção das frações protéicas.....	43
6.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE).....	43
6.9 Dosagem de proteínas solúveis.....	44
6.10 Ensaio enzimático para determinação de atividade quitinolítica.....	44
6.11 Revelação de glicoproteínas com o reagente de Schiff.....	45

6.12 Atividade enzimática contra substratos sintéticos.....	45
6.13 Influência do pH na atividade quitinolítica da proteína recombinante.....	46
6.14 Influência da temperatura na atividade da proteína recombinante.....	46
6.15 Espectrometria de massas.....	46
6.16 Atividade antimicrobiana.....	47
6.16.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	47
6.16.2 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM).....	48
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
7.1 Análises <i>in silico</i> da sequência da proteína CV2736.....	50
7.2 Clonagem e transformação genética de <i>P. pastoris</i>	53
7.2.1 Obtenção do vetor recombinante pPICZ α A::CV2736 _{PS+} e transformação genética de <i>P. pastoris</i> KM71H.....	53
7.2.2 Obtenção do vetor recombinante pPICZ α A::CV2736 _{PS-} e transformação genética de <i>P. pastoris</i> KM71H.....	57
7.3 Indução da expressão de rCV2736 _{PS+} e rCV2736 _{PS-} em <i>Pichia pastoris</i> KM71H.....	60
7.3.1 Expressão de rCV2736 _{PS+} em <i>P. pastoris</i>	60
7.3.2 Expressão de rCV2736 _{PS-} em <i>P. pastoris</i>	75
7.4 Atividade quitinásica na presença e ausência de β -glucuronidase e contra substratos sintéticos.....	83
7.5 Influência do pH e da temperatura na atividade quitinolítica da proteína recombinante.....	85
7.6 Modelagem molecular <i>ab initio</i> de CV2736.....	88
7.7 Atividade antimicrobiana.....	91
8. CONCLUSÃO.....	102
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

Após o sequenciamento do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, ORFs que codificam para vias alternativas de geração de energia, proteínas relacionadas ao transporte, adaptação a condições de estresse e a mobilidade foram encontradas, bem como regiões que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade, inclusive com provável relação a mamíferos, dentre outras. Em muitos desses produtos, vê-se um grande potencial biotecnológico (VASCONCELOS *et al*, 2003).

Dentro do âmbito biotecnológico, tem-se a preocupação com o melhoramento de culturas importantes para a alimentação humana, e há o desenvolvimento de técnicas e busca por soluções de maneira a não agredir o meio ambiente, aos seres humanos e sendo economicamente viável. Devido à importância de fontes proteicas na alimentação, a busca por culturas onde se tenham altos níveis proteicos é grande.

Além disso, existe uma crescente preocupação pela busca de novas drogas com potencial combate a doenças, dentre elas os antimicrobianos. Esta preocupação se deve ao fato da grande habilidade de alguns microrganismos em adquirir resistência aos antimicrobianos já amplamente utilizados e disseminados. Segundo Azevedo (2008), mais de 4.000 antibióticos são conhecidos, mas ou os custos para a produção do antimicrobiano são muito onerosos ou a droga em questão tem sua toxicidade muito elevada, fatos estes que inviabilizam o seu uso.

Por esse motivo, há a procura por alternativas no combate a pragas que acometem a agricultura e a novos alvos terapêuticos no combate a doenças causadas por microrganismos patogênicos para os seres humanos. Por isso a importância de se conhecer o genoma de vários organismos e entender a funcionalidade de cada produto gênico, sendo estes possíveis alvos biotecnológicos. Com isso, após o sequenciamento do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, alguns genes referentes a proteínas de defesa foram encontrados e são alvos de estudos no que tange o combate a pragas de culturas importantes e potenciais drogas terapêuticas. Dentre esses genes, os que codificam para quitinases são fortes candidatos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quitinases

A quitina é um polissacarídeo formado por unidades de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Esse polissacarídeo é extremamente abundante na natureza por compor carapaças de crustáceos, exoesqueleto de outros artrópodes e estar presente na parede celular de fungos (KOPPARAPU *et al.*, 2011; LI; GREENE, 2010; DAHIYA *et al.*, 2005).

Quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas capazes de hidrolisar as ligações covalentes β -1,4 entre os resíduos de GlcNAc que constituem as cadeias de quitina. Essas enzimas podem ocorrer em vários organismos, desde animais, plantas, insetos até vírus e bactérias. As quitinases estão envolvidas em diversos eventos metabólicos diferentes nesses organismos, como, por exemplo, a remodelagem do arcabouço de quitina, no exoesqueleto de artrópodes, durante período de crescimento e desenvolvimento (ecdise) (DAHIYA *et al.*, 2006; (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). Certos gêneros de bactérias podem utilizar também essas enzimas para transformar quitina insolúvel em metabolitos e fontes de nutrientes, bem como na defesa contra patógenos (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007).

Apesar de a quitina não ter sido detectada em plantas superiores e em vertebrados, existem quitinases em certas plantas que podem ser utilizadas como um mecanismo de defesa, podendo ser consideradas um tipo de proteínas PR (proteínas relacionadas à patogênese), devido a seu amplo estudo no processo de inibição do crescimento de fungos patogênicos (SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008). Em espécies arbóreas, quitinases são expressas como mecanismo de defesa a fatores de estresse como fatores bióticos, abióticos e durante o desenvolvimento da planta. Em plantas, as quitinases estão classificadas como proteínas PR da classe 3 (PR3). Neste grupo de organismos, estudo com transformação de plantas e quitinases como transgenes mostrou que houve aumento da resistência a patógenos (VELUTHAKKAL *et al.*, 2012).

As quitinases hidrolisam quitina em açúcares mais simples, podendo ser divididas em dois grupos maiores: endoquitinases (EC 3.2.1.14), que quebram randomicamente dentro da molécula, gerando multímeros de GlcNAc com baixa massa molecular; e exoquitinases, que quebram a partir das extremidades da molécula de quitina. As exoquitinases podem ser

divididas em duas subcategorias: as quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a liberação de diacetilquitobiose, iniciando do final não redutor das cadeias de quitina, e β -1,4-N-acetil-glucosaminidase ou quitobiasas (EC 3.2.1.30), que clivam diacetilquitobiose e polímeros de quitina (quitotriose e quitotetraose) em monômeros de GlcNac (LI, H.; GREENE, 2010; LI, 2006).

As quitinases tem importância, pois estão relacionadas a vários âmbitos biotecnológicos. Como biopesticidas, no combate ao processo de transmissão de doenças por vetores, tais como mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (vetor de transmissão do vírus da dengue). FILHO e colaboradores (2002) demonstraram a ação de quitinases, em experimentos onde os insetos, alimentados com sangue contendo quitinases exógenas, não conseguiram formar corretamente a matriz peritrófica. Este fato é de suma importância, pois a matriz peritrófica traz proteção contra agentes patogênicos, bem como pode dificultar a invasão de patógenos nesse vetor.

Acredita-se que exista uma correlação entre o potencial quitinolítico e não quitinolítico de algumas quitinases humanas em relação a doenças fúngicas. Uma hipótese seria que a diminuição no potencial dessas enzimas no hospedeiro poderia trazer susceptibilidade a infecções fúngicas, tais como a asma (GOLDMAN; VICENCIO, 2012). Além dos fatos já citados, as quitinases também possuem mais usos na área da saúde, como microbicidas de um modo geral e está presente em algumas soluções oftálmicas (PATIL, 2000).

Utilizam-se também quitinases na produção de quitoligossacarídeos, compostos estes de importância médica. Estes oligossacarídeos podem ser produzidos a partir de quitina ou quitosana, e seus usos na medicina incluem ação antitumoral (existem hipóteses da indução de apoptose em células cancerosas e da prevenção de angiogênese em tecidos), combate processos inflamatórios como o asma, terapia gênica (servem de vetores na entrega de genes), prevenção de malária (como inibidores de quitinases endógenas, reduzindo a infectividade do vetor), efeitos antifúngicos e a não adesão de bactérias às células humanas (AAM *et al.*, 2010).

Como antifúngicos podemos citar, por exemplo, a quitinase de sementes de *Astragalus membranaceus* (KOPPARAPU *et al.*, 2011a) e de *Triticum aestivum* (trigo) (SINGH *et al.*, 2007), que exibiram atividade antifúngica contra várias espécies de fungos fitopatogênicos, podendo ser utilizadas no controle biológicos como ferramenta biotecnológica.

2.2 Glicosil hidrolases

As Glicosil hidrolases (GHs) são enzimas pertencentes ao metabolismo de carboidratos e são amplamente distribuídas pelos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya. As quitinases são enzimas pertencentes às famílias GH18 e GH19, que diferem devido à sequência de aminoácidos correspondentes em seu sítio catalítico. Essas proteínas possuem um resíduo de Asparagina (Asp) e Glutamato (Glu) no sítio catalítico, podendo ser doadores de prótons ou agir como nucleófilos (Tabela 1, Figura 1) (HENRISSAT & BAIROCH, 1993; HENRISSAT, 1991; HENRISSAT, 1999).

As proteínas da família GH18 (quitinases e quitinases-like) apresentam um dobramento peculiar do tipo $(\beta/\alpha)_8$ ou barril TIM (triose fosfato isomerase), com oito hélices-alfa e oito folhas-beta. Nesta família estão incluídas as quitinases de vírus, bactérias, fungos, animais e de plantas (classes III e V) (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). O mecanismo de catálise dessa família se dá por retenção da conformação do carbono anomérico do produto (KASPRZEWSKA *et al*, 2003).

Geralmente, a arquitetura das glicosil hidrolases da família 18 possui: um peptídeo sinal, indicativo de proteína secretada (o que foi uma exceção encontrada em *Serracia marcescens*, onde a proteína foi secretada por uma via não usual e com mecanismo desconhecido), não tendo peptídeo sinal típica; nenhum, um ou muitos domínios ricos em serina/treonina ligados; domínio de ligação a quitina que pode estar ou não presentes na proteína e o domínio catalítico (HUANG *et al*, 2011).

Pode ocorrer um resíduo de glutamato no domínio catalítico da proteína. Quando este resíduo é ausente, a atividade da proteína é diminuída, pois este aminoácido é um doador de prótons requerido na catálise da quitina. O domínio de ligação à quitina é requerido para a ligação em substratos insolúveis. A ausência desse domínio não compromete a atividade frente a substratos solúveis, porém interfere na ligação a substratos insolúveis, o que pode afetar a degradação da quitina insolúvel. O domínio rico em serina/ treonina geralmente vem após o peptídeo sinal, na porção C-terminal da proteína. Acredita-se que estes sejam sítios de glicosilação que podem ajudar a estabilizar a estrutura da proteína na presença de proteases (HUANG *et al*, 2011).

Tabela 1 – diferenças entre as glicosil hidrolases das famílias GH18 e GH19

Família	Classe de quitinases	Mecanismo de catálise	Intermediário	Configuração anomérica do produto	Inibidores
GH18	III e V	Substrato-assistida	Íon oxazolínic	β	Alosamidinas
GH19	I, II, IV, VI e VII	Acídica	Íon oxocarbênico	α	Amidinas e Amidrazonas

Fonte: modificado de KASPRZEWSKA *et al*, 2003

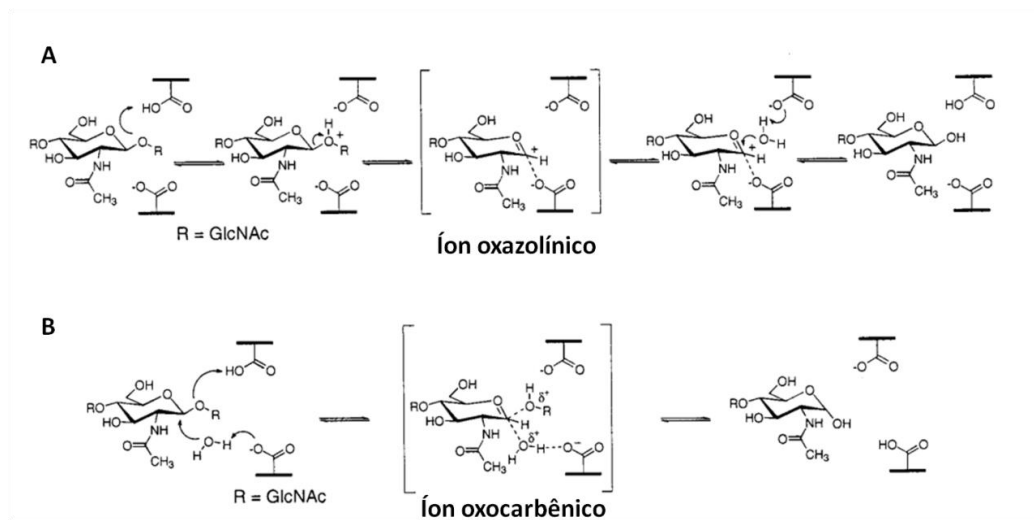


Figura 01 – Mecanismo de ação das quitinases das famílias GH 18 (A), mostrando mecanismo de hidrólise por duplo deslocamento e o íon oxazolinico formado como intermediário que pode ser hidrolisado, o que leva a retenção da configuração anomérica; e da família GH 19 (B), mostrando o mecanismo de hidrólise por deslocamento único, onde é formado o íon oxocarbênico como intermediário e ocorre a inversão da configuração anomérica. Fonte: (BRAMELD; GODDARD, 1998) com modificações.

Segundo Udaya Prakash e colaboradores (2010), as quitinases da família GH19, no grupo das Eubacterias, são restritas as actinobacterias, bactérias verdes não sulfurosas e grupos de bactérias púrpuras, sendo ausentes em Arqueas. Devido à similaridade entre sequencias de quitinases de bactérias e de plantas e a presença de resíduos altamente conservados entre as estruturas tridimensionais de uma quitinase de mamão (*Carica papaya*) e a uma quitinase bacteriana de *Streptomyces griseus*, hipotetizou-se que ambas teriam a mesma origem evolutiva. Acredita-se que, para o gene da quitinase C de *Streptomyces* sp., este tenha sido adquirido através de processos de transferência horizontal entre bactérias do solo e vegetais superiores. As enzimas pertencentes a esse grupo possuem um alto conteúdo de α -hélices e similaridade estrutural com quitosanases e lisozimas (SINGH *et al.*, 2007).

2.3 *Chromobacterium violaceum*

A exploração de novos genes no genoma de microrganismos representa a busca por novas alternativas no desenvolvimento de novos fármacos, bem como no controle de pragas fitopatogênicas. Em alguns organismos o estudo dos produtos gênicos acaba sendo complicado pela baixa quantidade na qual o produto é obtido. Nisso, o processo de expressão heteróloga, onde há a transferência de genes para outros microrganismos ou plantas, auxilia na avaliação da funcionalidade biotecnológica desses produtos gênicos em hospedeiros heterólogos.

A *Chromobacterium violaceum* (Figura 2) é uma bactéria saprófita, Gram-negativo, não patogênica, aeróbica facultativa, de vida livre encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais em vários continentes. No Brasil foi encontrada habitando as águas do Rio Negro, na Amazônia, ocasionalmente, podendo atuar como um patógeno oportunista em animais e homens e levando a septicemia fatal de lesões na pele e o surgimento de abscessos no fígado e pulmão (DURÁN *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 1999).

Uma característica bastante peculiar da *C. violaceum* é a produção de um pigmento de cor violeta, a violaceína (Figura 3), a partir da fusão de duas moléculas de triptofano modificadas, sendo constituída por três subunidades: 5-hidroxiindol 2-oxoindol e 2-pirrolidona (AUGUST *et al.*, 2000; DURÁN *et al.*, 2001). Este pigmento é produzido por bactérias do gênero *Chromobacterium* (DURÁN *et al.*, 2007). A violaceína é utilizada em



Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica de células de *Chromobacterium violaceum*. (Fonte: www.cienciahoje.uol.com.br. Foto: Márcia Attias/UFRJ)

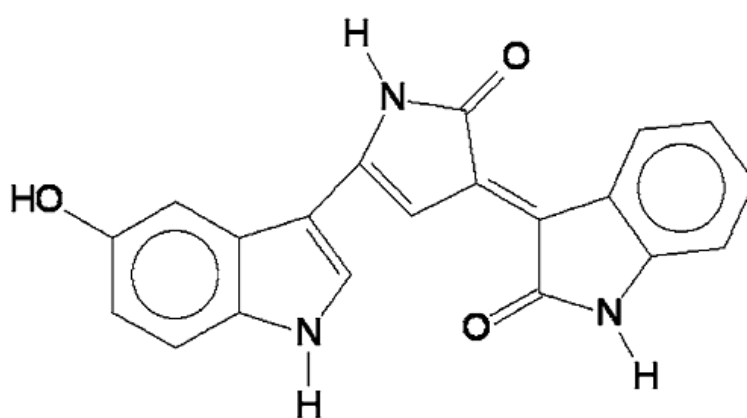


Figura 3 – Estrutura molecular da violaceína (Fonte: DURAN *et al.*, 2007)

estudos para atividade anticâncer, antitumoral, antiparasitária, antiprotozoária, antiviral, antioxidante, antiulcerogênica, imunomoduladora, antinociceptiva e com potencial fotoquimioterapêutico (DURÁN, M. *et al.*, 2012).

O sequenciamento do genoma de *C. violaceum* mostrou sequências para vias alternativas de geração de energia, ORFs (*open reading frame*) relacionadas ao transporte, adaptação ao estresse e a mobilidade. Foram encontradas também regiões que codificam para proteínas relacionadas à patogenicidade, inclusive com provável relação a mamíferos, dentre outras. Em muitos desses produtos, vê-se um grande potencial biotecnológico, no que tange o combate a pragas de culturas importantes e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. (VASCONCELOS *et al*, 2003). Dentre esses genes, os que codificam para quitinases são fortes candidatos.

2.4 Sistemas de Expressão Heteróloga

As ferramentas biotecnológicas, como a tecnologia do DNA recombinante e a expressão de proteínas em sistemas heterólogos vêm sendo uma excelente arma na produção de insumos de maneira prática e com baixo custo processual. As proteínas ativas podem ser produzidas e purificadas a partir do meio de cultura ou por métodos de obtenção de frações celulares. Apesar das vantagens, a escolha do tipo de expressão heteróloga deve ser avaliada, considerando-se as características da proteína que deve ser produzida, da bioprodutividade, dentre outras características (YIN *et al*, 2007; BEZERRA, 2008).

2.4.1 Sistemas de expressão procarióticos

As proteínas recombinantes para serem produzidas, devem ser inseridas num vetor de expressão adequadamente. Dentre vários vetores de expressão, *Bacillus subtilis* (bactéria Gram-Positiva) e *Escherichia coli* (bactéria Gram-Negativa) são os vetores procarióticos mais amplamente utilizados. *E. coli* é sem dúvida o vetor de expressão mais bem caracterizado e utilizado, devido a facilidade de manipulação. Como se sabe, é uma

bactéria já bem conhecida geneticamente, fisiologicamente e bioquimicamente. *Bacillus subtilis* vem a ser uma alternativa a expressão em *E. coli* (YIN *et al*, 2007).

Em *E. coli*, a proteína pode ser secretada para o meio de cultura, através de um etiquetamento da molécula pela presença de um peptídeo sinalizador, o que traz certa vantagem, pois a porção N-terminal da proteína pode não sofrer nenhuma modificação após a clivagem do peptídeo sinal e não sofre a ação de proteases presentes no citoplasma da célula. Normalmente a proteína recombinante é produzida e fica no citoplasma da célula na forma solúvel (CHOI & LEE, 2004).

Apesar de ser um método altamente viável para expressão de proteínas recombinantes, os vetores procarióticos apresentam alguns problemas. Por não realizar modificações pós-traducionais, pode ocorrer o dobramento de forma errada da proteína, o que a torna biologicamente inviável, podendo ocorrer a compartimentalização destas em corpos de inclusão (YIN *et al*, 2007; BANEYX, 1999). Uma solução para este problema vem com protocolos de *refolding* das proteínas dobradas incorretamente (SORENSEN *et al*, 2005).

2.4.2 Sistemas de expressão eucarióticos – *Pichia pastoris*

Uma alternativa para a expressão de proteínas recombinantes são os vetores eucarióticos. Dentre os vetores utilizados, os mais explorados são leveduras como *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*. *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, com sistema muito similar a *Saccharomyces cerevisiae*, que é uma levedura já bastante conhecida e bem caracterizada. Por ser um organismo unicelular, sua cultura é fácil de ser manipulada e as proteínas produzidas são exportadas para o meio de cultura e passam por vários tipos de processamentos pós-traducionais eucarióticos (CREGG *et al*, 2000).

Vários organismos eucariotos são utilizados como ferramenta biotecnológica na produção de proteínas recombinantes. Além do fato de realizarem uma gama de processamentos pós-traducionais, os sistemas que utilizam leveduras (como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) possuem um custo menor, com rápido crescimento e meio de cultivo relativamente simples, características essas que são compartilhadas com sistemas procariotos que utilizam *E. coli* para expressão. Além disso, o sistema de endomembranas dos vetores leveduriformes possibilita a secreção da proteína recombinante para o meio de cultura, o que torna o processo de recuperação da proteína em

questão mais fácil e de forma solúvel, devido a um correto dobramento da proteína. Além das leveduras, fungos filamentosos, células de mamíferos, plantas e animais geneticamente modificados e no sistema baculovirus/inseto são também utilizados no processo de expressão de proteínas recombinantes (YIN *et al.*, 2007).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de metabolizar o metanol em formaldeído, gerando peróxido de hidrogênio, pela enzima álcool oxidase (AOX). Devido à toxicidade do peróxido de hidrogênio, este organismo possui uma organela especializada na conversão deste em subprodutos não tóxicos – os peroxissomos. Pelo fato de a enzima AOX ter baixa afinidade por O₂, a levedura compensa este fato produzindo altas quantidades desta enzima. *P. pastoris* possui dois genes para a enzima AOX: *AOX1* e *AOX2*, sendo o gene *AOX1* o maior responsável pela atividade álcool oxidase da célula. Assim, o gene *AOX* torna-se um excelente promotor para expressão de proteínas heterólogas, podendo ser regulado pela adição ou carência de metanol na cultura. Outro quesito para o devido funcionamento deste gene como promotor é a ausência completa de glicose no meio (POTVIN *et al.*, 2012; CREGG *et al.*, 2000; CEREGHINO & CREGG, 2000; TORRES; MORAES, DE, 2002; DALY & HEARN, 2005).

Outros promotores são utilizados na indução da expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*, como o promotor GAP (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), que usa glicerol ou glicose como substratos. Uma vantagem deste promotor em relação ao sistema AOX é o fato da cultura poder ser mantida por mais de 30 dias. Além destes citados, existem outros promotores alternativos e promotores constitutivos (POTVIN *et al.*, 2012).

Outra característica positiva em relação à expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris* é que este organismo não é um forte fermentador, um fato que poderia trazer malefícios a cultura pela produção de etanol que poderia chegar a níveis tóxicos para a célula (POTVIN *et al.*, 2012; CREGG *et al.*, 2000; CEREGHINO & CREGG, 2000; TORRES; MORAES, DE, 2002).

Este microrganismo é capaz de realizar modificações pós-traducionais, como processamento de sequências sinalizadoras, pontes dissulfeto, o-glicosilações e n-glicosilações (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999). Devido a esta capacidade, a produção de proteínas glicosiladas em *P. pastoris* para fins terapêuticos é algo importante visto que glicosilações podem aumentar a estabilidade de algumas proteínas (CHOI *et al.*, 2012).

2.5 Expressão heteróloga de algumas quitinases produzidas em *Pichia pastoris*

Quitinases de diversos organismos são comumente produzidas em vetores de expressão eucariotos, como na levedura *Pichia pastoris*. Por este ser um vetor eucarioto, ele realiza modificações pós-traducionais, que em muitos casos é benéfica na produção de proteínas recombinantes.

O trabalho de Fan e colaboradores (2007) relata uma quitinase de *Beauveria bassiana* (fungo) produzida em dois sistemas: *E. coli* e *P. pastoris*. A proteína recombinante produzida em *E. coli* teve valores de atividade e rendimento baixos, quando comparado a produção da mesma proteína em *P. pastoris*. Além disso, boa parte da proteína recombinante foi produzida em corpos de inclusão e para obtenção da proteína recombinante foi necessário o desenvolvimento de um protocolo de *refolding*.

Com o sistema de expressão de proteínas em *P. pastoris*, utilizando o modelo de produção de proteínas recombinantes induzidas por metanol ou pelo promotor GAP (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), Goodrick e colaboradores (2001) conseguiram produzir uma quitinase humana com rendimento de 200 a 400mg/L de proteína recombinante.

A quitinase de *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 (Bactéria) foi produzida em *Pichia pastoris* (X33), sendo utilizada a otimização de códons. Esta avaliação é benéfica ao aperfeiçoar a produção da proteína recombinante para uso das culturas recombinantes em biorreatores (LEE *et al*, 2010). Além desta, as quitinases de *C. violaceum* codificadas pelas ORFs CV2935 e CV3316 também foram produzidas por essa levedura (LOBO, 2012; TEIXEIRA, 2011).

Quitinases recombinantes de plantas são comumente relatadas sendo produzidas em *P. pastoris*. Como exemplos, podemos citar a expressão da endoquitinase de *Limonium bicolor*, expressa nas cepas GS115 e KM71H (LIU, Z. H. *et al.*, 2010), quitinase de arroz (*Oryza sativa*) produzida em *E. coli* e *P. pastoris* GS115 (TRUONG *et al.*, 2003), a quitinase de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (LANDIM, 2011), dentre outras.

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

A partir do sequenciamento do genoma de *Chromobacterium violaceum* (ATCC 12472), várias ORFs que codificam proteínas com potencial biotecnológico foram encontradas, dentre elas algumas que codificam quitinases (VASCONCELOS *et al*, 2003). A partir destas informações, as seguintes perguntas motivaram a realização do presente trabalho:

3.1 É possível a produção da quitinase codificada pela ORF CV2736 de *C. violaceum*, de forma recombinante em células de *Pichia pastoris* KM71H, sendo a mesma produzida em sua forma solúvel e biologicamente ativa?

3.2 A quitinase recombinante rCV2736 possui alguma atividade antibiótica contra bactérias patogênicas para os seres humanos?

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

- Expressar em células de *Pichia pastoris* KM71H a proteína CV2736, codificada no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, e avaliar o potencial microbicida da proteína recombinante frente a bactérias de importância médica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar a sequência de DNA codificando a quitinase CV2736 de *C. violaceum*;
- Expressar a proteína recombinante em células de *P. pastoris* KM71H;
- Caracterizar a proteína recombinante bioquimicamente de forma parcial, bem como sua sequência de aminoácidos, em bancos de dados de domínios protéicos e por modelagem computacional;
- Avaliar o efeito da proteína recombinante frente a bactérias de importância médica.

5 MATERIAIS

5.1 Plasmídeo e Cepas de bactérias e leveduras

O vetor para expressão heteróloga em *P. pastoris*, o plasmídeo pPICZαA, foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) (ANEXO A). A bactéria *Escherichia coli* TOP10F' foi utilizada como hospedeiro de clonagem e a levedura *Pichia pastoris* KM71H (Invitrogen) foi usada como hospedeiro de expressão.

As estirpes ATCC 12472 da *Chromobacterium violaceum*; as estirpes de bactérias utilizadas nos ensaios de concentração inibitória mínima: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.; e a levedura utilizada também nos experimentos de atividade biológica *Candida albicans* ATCC 10231 foram adquiridas através da distribuidora Interlabdist da ATCC (American Type Culture Collection).

5.2 Enzimas e demais reagentes

Para a execução dos experimentos de clonagem, foram utilizadas as enzimas *Phusion Hot Start DNA polimerase* (2 U/μL) (Finnzymes, Vantaa, Finlândia), *Go Taq DNA polimerase* (5 U/μL) (Promega, Wisconsin, EUA), *EcoRI* (10 U/μL), *XbaI* (10 U/μL), *BamHI* (10 U/μL), *SacI* (10 U/μL) e T4 DNA ligase (10 U/μL) (Fermentas life science, Canadá) acompanhadas de seus respectivos tampões de reação.

A enzima β-glucuronidase de *Helix pomatia* tipo HP-2, utilizada nos ensaios de atividade quitinásica, foi adquirida da Sigma-Aldrich.

O antibiótico utilizado para seleção dos clones transformados com as construções e para manutenção das culturas durante a indução foi zeocina (100 mg/mL) (Invitrogen) e, como alternativa a este, usou-se também bleocina (10 mg/mL) (Calbiochem, San Diego, CA, EUA).

Oligonucleotídeos sintéticos, usados como iniciadores nas reações de PCR, foram adquiridos da empresa *Integrated DNA Technologies* – IDT (Coralville, Iowa, EUA).

O kit de purificação de DNA “*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” foi adquirido da empresa GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).

Os meios de cultura utilizados para as culturas de *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (EUA).

Os marcadores moleculares usados para eletroforese de DNA em gel de agarose foram: ϕ X174 DNA/*Hae* III *fragments* (Invitrogen), λ DNA/*Hind* III *fragments* e *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas). O conjunto de padrões de massa molecular para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida foi *Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis* (GE Healthcare).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos de empresas locais.

6 MÉTODOS

6.1 Análises *in silico* da sequência da proteína CV2736

A sequência de aminoácidos (número de acesso no GenBank: NP_902406) codificada pela ORF CV2736 foi analisada pelos bancos de dados de sequências de proteínas **Pfam** (*Protein Families Database*) (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) (PUNTA *et al.*, 2011), **SMART** (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (LETUNIC *et al.*, 2011; SCHULTZ *et al.*, 1998) e **CDD** (*Conserved Domains Database*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2011).

A predição da estrutura secundária foi feita usando-se o programa **PsiPred** (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (MCGUFFIN *et al.*, 2000). Já as análises de predição de peptídeo sinal foram feitas pelo programa **SignalP 4.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) (PETERSEN *et al.*, 2011) e pelo banco de dados **Exprot** (<http://www.laurentian.ca/NR/rdonlyres/878B67F6-AD4B-41D1-9DB7-C7B8D41BF85D/0/Cviolaceum.txt>) (URSING *et al.*, 2002). A presença de possíveis sítios de N-glicosilação foi predita pelo programa **NetNGlyc** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (GUPTA *et al.*, 2004). A predição de possíveis sítios de O-glicosilação foi feita pelo programa **NetOGlyc** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

O modelo tridimensional de CV2736 foi feito com auxílio do *software Phyre 2.0* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), a partir da sequência de aminoácidos predita da proteína (KELLEY & STERNBERG, 2009). Este servidor utiliza um banco de dados de estruturas conhecidas de proteínas (SCOP - *Structural Classification of Proteins*), aliado ao banco de dados de estruturas resolvidas (PDB).

Vários modelos foram gerados e dentre eles foi escolhido o que apresentava maior identidade com o molde obtido pelo alinhamento gerado no próprio programa. O modelo foi analisado com o auxílio do programa *Pymol*, e com ele também foram geradas as ilustrações deste trabalho. Além disso, o *software Phyre 2.0* também prediz a estrutura secundária da proteína em questão. As técnicas de predição de estruturas proteicas por *ab initio* fornecem

dados valiosos sobre características das estruturas, que dificilmente se teriam sem a estrutura experimentalmente resolvida (DELANO, 2002).

6.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

A ORF CV2736 possui 945 pb, estando localizada entre as posições 2.972.354 a 2.973.301 do cromossomo único de *C. violaceum* ATCC 12472, cuja sequência está depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), com número de acesso NC_005085 (ANEXO B). Três oligonucleotídeos iniciadores (dois senso e um antissenso) foram projetados de modo a permitir a amplificação de dois fragmentos: um deles correspondendo à sequência completa da ORF CV2736 (942 pb; excluindo o códon inicial para Met1) e outro fragmento, correspondendo a uma sequência parcial (879 pb), que excluía os primeiros 66 nucleotídeos, que codificam o peptídeo sinal N-terminal nativo. Desta forma, a ORF dita completa foi amplificada com os iniciadores 5'-CCGGAATTCGTTCTGGCTTATTATTCCGGC-3' (senso 1) e 5'-CCGTCTAGAACGCGCTGCGCCAGGCCCT-3' (antissenso), enquanto que a ORF parcial foi amplificada com o iniciador 5'-CCGGAATTCCTTCAATGCCGTCGCTGTCGA-3' (senso 2) e o antissenso já descrito. Sítios para endonucleases de restrição foram adicionados nos iniciadores senso (*EcoRI*) e antissenso (*XbaI*), respectivamente, e que estão sublinhados nas sequências anteriormente descritas, de modo a permitir a inserção dos fragmentos amplificados no sítio múltiplo de clonagem do vetor pPICZαA.

As sequências de DNA codificando a proteína com e sem peptídeo sinal nativo foram chamadas de CV2736_{PS+} e CV2736_{PS-}, respectivamente. A mesma denominação também foi usada para se referir às próprias proteínas recombinantes, codificadas pelos respectivos fragmentos.

6.3 Obtenção dos vetores recombinantes (pPICZαA::CV2736_{PS+} e pPICZαA::CV2736_{PS-}) e transformação em *E. coli* TOP10F'

Os fragmentos de DNA CV2736_{PS+} e CV2736_{PS-} foram amplificados a partir de DNA molde de *C. violaceum* ATCC 12472, utilizando os oligonucleotídeos já descritos, por meio de reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Cada reação continha 50 ng de DNA molde, 0,5 μM de cada iniciador, tampão 1X Phusion GC ou HF com 1,5 mM de MgCl₂

(Finnzymes), 200 μ M de cada dNTP, DMSO 0,09% ou não, 0,4 U da enzima de alta fidelidade *Phusion Hot Start* DNA polimerase (Finnzymes), e água ultra-pura estéril (q.s.p. 20 μ L). O processo de amplificação ocorreu em um termociclador PTC 200 (DNA Thermal Cyclers, MJ Research), programado para uma etapa inicial de desnaturação (98 °C por 3 min), seguida de 34 ciclos de 98 °C por 10 s (desnaturação), 65 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 2 min 30 s (extensão). A última etapa consistiu de uma extensão a 72°C por 5 min, após o que uma alíquota do produto final da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os produtos de PCR purificados e o plasmídeo íntegro (pPICZ α A) foram digeridos separadamente com *Eco*RI (20 U) e *Xba*I (20 U), a 37 °C por 6 h. Ao final desse período, as enzimas foram inativadas a 80 °C por 20 min. Os produtos de PCR e o plasmídeo digeridos foram purificados com o kit GFX e ligados pela enzima T4 DNA ligase (12 U). As reações de ligação foram mantidas a 22 °C (para a ligação de CV2736_{PS+}) ou a 4 °C (CV2736_{PS-}) por aproximadamente 16 h. Os produtos da ligação foram introduzidos em *E. coli* TOP10F' por eletroporação.

A reação de ligação (10 μ L) foi misturada a 40 μ L de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F' (ANEXO F) e a mistura foi deixada em repouso por 5 min, em banho de gelo, sendo então transferida para uma cubeta de eletroporação com ranhura de 4 mm. A eletroporação foi realizada em um eletroporador 2510 (Eppendorf, Alemanha), aplicando-se à suspensão de células um pulso de 2,5 kV. Imediatamente após o choque, a suspensão de células foi recuperada da cubeta com 1 mL de meio SOC, pré-aquecido à 37 °C. A suspensão foi transferida para um tubo de 15 mL e incubada a 37 °C por 1 h com agitação orbital. Ao final desse período, alíquotas de 100 μ L das culturas foram plaqueadas em meio LB *low salt* ágar, suplementado com zeocina 25 μ g/mL ou bleocina 5 μ g/mL, e as placas incubadas a 37 °C por 16 h.

Algumas colônias isoladas foram selecionadas ao acaso e inoculadas em 5 mL de caldo LB *low salt* e incubadas a 37 °C por 16 h. Das culturas obtidas, alíquota foram removidas e submetidas a extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para confirmação da presença dos insertos, os plasmídeos foram digeridos (20 U de cada enzima por reação) com *Eco*RI e *Xba*I (pPICZ α A::CV2736_{PS+}) ou com *Bam*HI apenas (pPICZ α A::CV2736_{PS-}). Os produtos das reações de digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

6.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os géis de agarose para migração eletroforética de DNA foram preparados de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). As amostras foram misturadas com ½ do seu volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30% em TE pH 8,0). As eletroforeses foram realizadas a uma voltagem constante de 100 V, com o gel de agarose submerso em tampão de corrida TBE (Tris-Borato 45 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM) em uma cuba horizontal. O gel foi corado, submergindo-o em solução de TBE com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 30 min. As bandas foram visualizadas por exposição a luz UV em transiluminador *Vilber Lourmat* (Marne-la-Vallée, França), e a imagem foi capturada por um sistema de fotodocumentação de mesma marca, acoplado ao equipamento.

6.5 Transformação de *Pichia pastoris* KM71H com os vetores recombinantes pPICZαA::CV2736_{PS+} e pPICZαA::CV2736_{PS-}

Amostras (20 µg) de cada plasmídeo recombinante (pPICZαA::CV2736_{PS+} e pPICZαA::CV2736_{PS-}) foram linearizadas com *SacI fast digest* (40 U), na presença de tampão *fast digest* 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,5; MgCl₂ 10 mM; KCl 0,1 M; BSA 0,1 mg/mL). A reação ocorreu nas seguintes condições: 37 °C por 12 h e 65 °C por 20 min para inativação da enzima. Após a reação de linearização, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 100%. O precipitado foi coletado por centrifugação a 12.000 rpm, por 15 min (miniSpin – Eppendorf) à temperatura ambiente e foi lavado com 200 µL de etanol 80%. Após centrifugação (nas mesmas condições) o pélete foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura estéril. Este mesmo protocolo também foi utilizado para linearização do plasmídeo pPICZαA íntegro.

Os plasmídeos recombinantes (pPICZαA::CV2736_{PS+} e pPICZαA::CV2736_{PS-}) e íntegro (pPICZαA), linearizados com *SacI*, foram introduzidos em células de *P. pastoris* KM71H por eletroporação (ANEXO G). O DNA plasmidial foi misturado a uma suspensão de células eletrocompetentes de *P. pastoris* KM71H, a mistura foi transferida para uma cubeta e a eletroporação foi realizada aplicando-se à suspensão de células um pulso de 2,5 kV, em um eletroporador Eppendorf, modelo 2510. Após a aplicação do pulso, as células foram recuperadas da cubeta em 1 mL de sorbitol 1 M gelado e a suspensão foi transferida para uma

tubo estéril, que foi incubado a 30 °C por 1 h, sem agitação. Uma alíquota de 100 µL dessa cultura foi plaqueada em meio YPDS-ágar, suplementado com zeocina 500 µg/mL ou bleocina 50 µg/mL, para a seleção dos transformantes.

6.6 Extração de DNA genômico de *Pichia pastoris*

Para confirmação da transformação genética e integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris*, seis colônias possivelmente transformadas com cada construção foram selecionadas e submetidas à extração de DNA genômico, seguindo o protocolo de Warner (1996). Para isso, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio YPD, suplementado com zeocina 500 µg/mL ou bleocina 50 µg/mL, e incubada a 30 °C por 18 h, sob agitação orbital (180 rpm).

Da cultura obtida, uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para um microtubo e centrifugada em centrífuga MiniSpin® (Eppendorf) com rotor F45-12-11, a 13.000 x rpm, por 3 min, a 25 °C. O meio de cultura foi decantado e as células foram lavadas com 800 µL de água ultrapura estéril, coletadas por centrifugação (13.000 x rpm, 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 16 h e após esse período, um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionado ao lisado. Após inversão, as fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação a 13.000 x rpm, por 30 min a 25 °C. A fase aquosa (superior) foi transferida para um microtubo e à mesma 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 a 13.000 rpm, por 5 min, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 75 µL de água ultrapura, contendo RNase A (20 µg/mL). A qualidade do material extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (como descrito no item 5) e a concentração de DNA genômico estimada pela medida da absorbância a 260 nm, de acordo com Sambrook et al. (1989).

6.7 Indução da expressão de rCV2736_{PS+} e rCV2736_{PS-} em *Pichia pastoris* KM71H e obtenção das frações proteicas

Para cada construção gênica, seis clones recombinantes de *P. pastoris* KM71H foram selecionados ao acaso e avaliados quanto a sua capacidade em expressar as respectivas proteínas recombinantes. Para tal, uma colônia isolada de cada clone, selecionada em meio YPDS ágar contendo bleocina 50 µg/mL, foi inoculada em meio BMGY, com o mesmo antibiótico, e incubada a 30 °C, sob agitação orbital (200 rpm) até atingir OD₆₀₀ = 10 ou superior. As células foram então coletadas por centrifugação (3.000 x g, 5 min, 4 °C) e ressuspensas em meio BMMY de modo a se obter uma DO₆₀₀ = 1,0. A cultura foi incubada nas mesmas condições anteriormente citadas e metanol P.A. foi adicionado, a cada 24 h, para uma concentração final de 1% (v/v). A indução foi realizada por um período de até 144 h, e alíquotas de 14 mL foram removidas da cultura a cada 24 h, para análises posteriores. As amostras assim coletadas foram centrifugadas (3.000 x g, 5 min, 4 °C) e o meio de cultura livre de células foi dialisado exaustivamente contra água destilada, usando uma membrana de celulose com limite de exclusão de 12,4 kDa. Ao material dialisado foi adicionado sulfato de amônio sólido para 95% de saturação. A mistura ficou em repouso por, no mínimo, 4 h sendo então centrifugada a 12.000 x g, por 20 min, a 4 °C. O precipitado, denominado fração 0/95 (F0/95) foi ressuspendido em um pequeno volume de água destilada ou de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e armazenado a -20 °C até uso posterior.

6.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) foi realizada segundo protocolo de Laemmli (1970), com modificações para montagem dos géis (espessura de 2 mm) entre placas de vidro. O gel de concentração continha acrilamida 3,5% e SDS 1%, e foi montado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, enquanto que o gel de separação possuía acrilamida 15% e SDS 1%, montado em tampão Tris-HCl 3 M pH 8,8. As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,001% (m/v)] e aquecidas a 100 °C por 10 min antes de serem aplicadas ao gel. As corridas foram realizadas

em sistema vertical Dual Gel Caster (Hoefer, Holliston, MA, EUA) sob voltagem constante de 120 V e 40 mA em tampão de corrida [Tris-HCl 0,025M pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (m/v)]. Após a corrida, as bandas proteicas foram visualizadas com o kit *InVision His-tag in-gel stain* (Invitrogen) e com o corante *SimplyBlue SafeStain* (Invitrogen). O processo de descoloração do gel foi feito com solução de isopropanol 12,5% e ácido acético 10% (v/v).

6.9 Dosagem de proteínas solúveis

Para a dosagem de proteínas solúveis foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976), que consiste em adicionar 2,5 mL de reagente de Bradford a 100 µL da amostra a ser analisada. Esta mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 min. Em seguida, as leituras de A_{595nm} foram feitas, em um espectrofotômetro *Genesys 10 UV scanning* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração proteína foi estimada com base em uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

6.10 Ensaio enzimático para determinação de atividade quitinolítica

O ensaio consistiu em incubar as amostras (250 µL) com quitina coloidal 1% (m/v) (250 µL) a 37 °C, por 1 h, com agitação constante. A reação foi interrompida por fervura em banho-maria por 8 min. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 13.000 rpm, por 15 min, a 25°C, e o sobrenadante (300 µL) foi transferido para novo tubo, contendo ou não β -glucuronidase de *Helix pomatia* tipo HP-2 (Sigma-Aldrich) (10 µL). A presença de β -glucuronidase, bem como sua ausência determina a presença de atividade endoquitinásica e exoquitinásica, respectivamente. Na ausência desta enzima, o volume foi substituído por tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,2. Como controle, foi feita uma reação com a fração proteica contendo a quitinase recombinante, sem a adição de substrato. A reação com β -glucuronidase foi incubada a 37 °C por 1 h e então interrompida por fervura em banho-maria por 6 min. Após resfriamento, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 (100 µL) e tetraborato de potássio 0,6 M (190 µL) foram acrescentados à mistura, que foi novamente aquecida por fervura, por exatos 5 min. Após resfriamento em banho de gelo, 1 mL de uma 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. foram adicionados à mistura.

A leitura das absorbâncias foi feita a 585 nm e para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação foi utilizada uma curva padrão construída a partir de diferentes concentrações de GlcNAc, variando de 100 a 1.000 μ M (REISSIG et al., 1955). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc por 1 mL em 1 h, sob as condições acima descritas.

6.11 Revelação de glicoproteínas com o reagente de Schiff

O método descrito por KAPITANY & ZEBROWSKI (1973) foi usado para detecção de glicoproteínas. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE e após a migração eletroforética, o gel foi imerso em solução de TCA 12% (v/v) durante 30 min. O gel foi lavado com água destilada e foi imerso em solução de periodato 1% (m/v) preparado em ácido acético 3%, durante uma hora. O gel de poliacrilamida foi lavado várias vezes com água destilada e posteriormente foi embebido na solução de Schiff (Sigma-Aldrich, EUA), no escuro, durante 50 min. Várias lavagens foram feitas com solução de metabissulfito de potássio 0,5% (m/v) para descoloração e revelação das bandas (de cor rósea ou púrpura), evidenciando a presença de glicoproteínas. Após a coloração com o reagente de Schiff, o mesmo gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

6.12 Atividade enzimática contra substratos sintéticos

A atividade foi realizada utilizando-se três substratos sintéticos: 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo, 4-nitrofenil N-N' -diacetil- β -quitobiosídeo e 4-nitrofenil β -D-N-N'-N'' -triacetilquitotriose (Sigma-Aldrich) dissolvidos em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, e a mistura reacional consistiu de 90 μ L de cada substrato e 10 μ L da fração protéica. Como padrão, foi utilizada solução de carbonato de sódio 0,4 M contendo *p*-nitrofenol 0,05 μ mol/mL. Como controles negativos foram utilizados 100 μ L de cada substrato sintético utilizado, sem a adição da enzima. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min e, posteriormente, a reação foi parada com a adição 200 μ L de carbonato de sódio 0,4 M. Logo em seguida, as absorbâncias a 405 nm foram determinadas

em uma leitora de ELISA BioTek LX 800 (BioTek, Winooski, VT, EUA). A atividade (expressa em U/mL) foi calculada com a equação abaixo:

$$Atividade(U/mL) = \frac{(A_{405 amostra} - A_{405 branco}) \times 0,05 \times 0,3 \times D}{A_{405 pNF} \times tempo \times V_{amostra}}$$

6.13 Influência do pH na atividade quitinolítica da proteína recombinante

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade quitinolítica, 1 mL de fração protéica (1,78 mg/mL) foi dialisado contra diferentes tampões: Glicina-HCl 0,05 M pH 2,0; Glicina-HCl 0,05 M pH 3,0; Acetato de sódio 0,05 M pH 4,0; Acetato de sódio 0,05 M pH 5,0; Fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0; Fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0; Tris-HCl 0,05 M pH 8,0; Glicina-NaOH 0,05 M pH 9,0 e Glicina-NaOH 0,05 M pH 10,0. Após a diálise, a atividade hidrolítica foi determinada, usando quitina coloidal como substrato, como já descrito anteriormente (seção 6.12).

6.14 Influência da temperatura na atividade da proteína recombinante

O efeito da temperatura foi avaliado incubando-se 1 mL de fração F0/95 (1,78 mg/mL) em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C) por 30 min em banho-maria. Após os tratamentos, as amostras foram utilizadas em ensaio enzimáticos como já descrito (seção 6.12).

6.15 Espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas foi realizada pela técnica de ionização por eletropulverização (*electrospray*), em espectrômetro Synapt HDMS ESI-Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA).

Para isto, 20 µL de uma solução de NH₄HCO₃ 50 mM foram adicionados a aproximadamente 90 µg da fração proteica, e esse material foi incubado a 80 °C, por 15 min

Em seguida, 5 µL de ditioneitol (DTT) 100 mM foram adicionados à amostra, e o tubo foi incubado a 60 °C por 30 min. Após resfriamento a temperatura ambiente, 5 µL de iodoacetamida (IAA) 300 mM foram adicionados à mistura, para alquilação das cisteínas. As amostras foram então incubadas no escuro, a temperatura ambiente, por 30 min. Após isso, 1 µg 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 13.000 x *g*, por 30 min, a 6 °C, e o sobrenadante foi transferido para frascos apropriados (Waters Total Recovery vial; Waters).

6.16 Atividade antimicrobiana

6.16.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços, com fundo redondo para o ensaio de microdiluição, segundo a norma M7-A6, vol. 23, nº 2 (CSLI, 2003).

Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231.

As culturas microbianas, mantidas em ágar BHI (*brain heart infusion*) na geladeira, foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35°C, por 16 h. Posteriormente, a densidade das culturas foi ajustada em solução salina 0,9%, de acordo com a escala de McFarland 0,5, para uma suspensão de aproximadamente 10⁸ UFC/mL. Essa suspensão de células foi diluída 100 vezes e 80 µL dessa diluição foram transferidos para cada poço da placa. Os poços referentes ao experimento continham 100 µL de meio BHI, 20 µL da F0/95 contendo rCV2736_{SP+} nas concentrações que variavam de 100 µg/mL até 0,049 µg/mL e 80 µL da suspensão microbiana.

Como controle positivo do experimento foram utilizados 20 µL do antibiótico Amicacina nas concentrações de 120 µg/mL a 0,06 µg/mL, para as cepas de bactérias testadas. Para o ensaio com *Candida albicans*, foi utilizado Cetoconazol 200 µg/mL a 0,098 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado o diluente da amostra, no caso água estéril. As placas foram incubadas por 24 h a 35°C e a inibição do crescimento microbiano foi avaliada a

olho nu bem como pela determinação da absorbância a 492 nm ou 620 nm, em leitor de Elisa BioTek. Considerou-se como concentração inibitória mínima aquela em que, a olho nu, foi capaz de inibir completamente o crescimento microbiano. A disposição da placa de microdiluição foi estabelecida conforme a figura 4.

A população microbiana do inóculo inicial foi determinada por contagem em placa, pelo método de *pour-plate*, após 24 h de incubação a 35 °C.

6.16.2 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)

A concentração letal mínima (CLM) é a menor concentração da amostra testada capaz de matar 99,9% dos microrganismos avaliados. Para tal, a placa de microdiluição usada para determinação da CIM foi inspecionada a olho nu e, dos poços nos quais não se observou turvação do meio de cultura, alíquotas de 15 µL foram removidas e inoculadas em Agar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h, e após esse período, as colônias crescidas na placa foram contadas em cada espaço referente à gota inoculada (MILES & MIRSA, 1938; BARON *et al*, 1994).

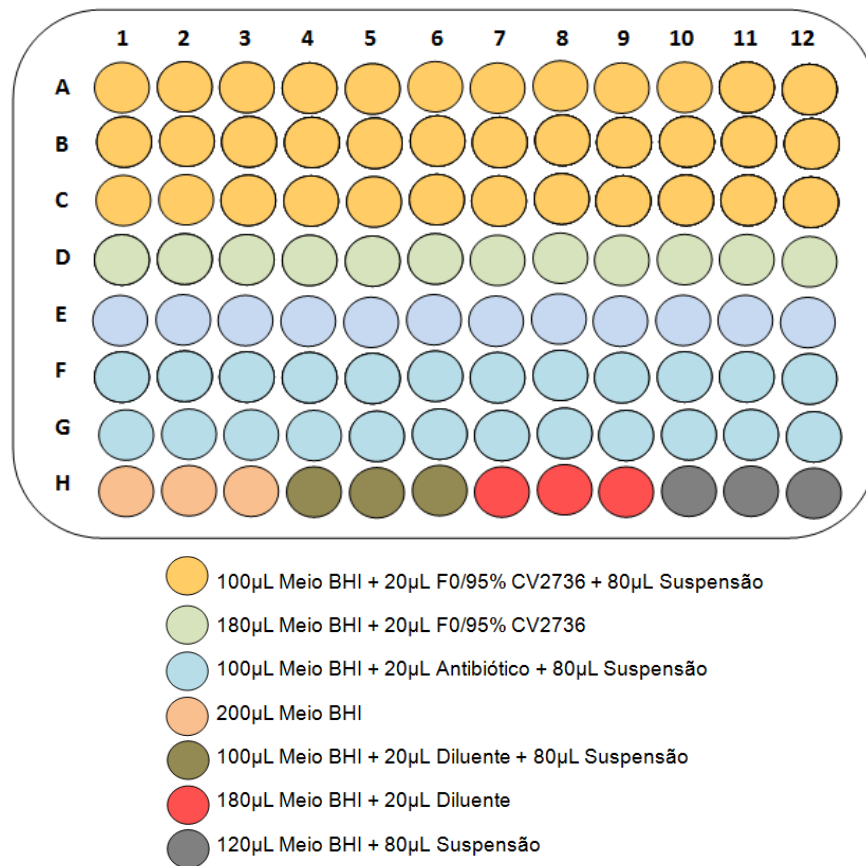


Figura 4 – Esquema da placa de microdiluição utilizada no experimento para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os microrganismos testados (A. Bessa (2012) / UFC).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Análises *in silico* da sequência da proteína CV2736

CV2736 é uma *Chitinase-like*, da família 18 das glicosil hidrolases (GH18), que apresenta 315 aminoácidos codificados por uma ORF (*open reading frame*) de 915 pb do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472. Esta quitinase possui um único domínio catalítico (resíduos de 16 a 305) em sua estrutura primária, não possuindo qualquer outro domínio acessório, como domínio de ligação à quitina, segundo análises *in silico*, por comparação da sua sequência de aminoácidos com os bancos de dados de domínios *Pfam*, *CDD* e *SMART*. A mesma apresenta massa molecular e pI teórico, calculados com base na sequência de aminoácidos, de 33.743,6 Da e 5,32, respectivamente.

A predição de estrutura secundária com o software *PsiPred* (Figura 5) revelou que a proteína CV2736 deve possuir 8 pares de α -hélices e fitas- β , evidenciando uma estrutura chamada barril TIM (de triose fosfato isomerase), que é o dobramento característico das proteínas da família GH18 (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007).

De acordo com o software *SignalP* 4.0, a sequência de aminoácidos de CV2736 não possui nenhum peptídeo sinal N- terminal. Entretanto, uma análise feita a partir do banco de dados *Exprot* evidenciou a presença de um possível peptídeo sinal N-terminal com 22 resíduos de aminoácidos, e um sítio de clivagem para *peptidase sinal I* foi predito entre os resíduos Ser²² e Fen²³ (Figura 6).

Pelas análises com os programas, hipotetizou-se que, se há um suposto peptídeo sinal intrínseco da proteína, juntamente com o fator α de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, presente no plasmídeo de expressão pPICZ α A, estes poderiam atrapalhar a secreção da proteína recombinante pela levedura hospedeira. Inclusive atrapalhar a produção da proteína recombinante em sua forma mais ativa. Desse modo, foi realizada a clonagem e expressão da proteína recombinante em sua sequência completa e parcial (sem o peptídeo sinal intrínseco da proteína).

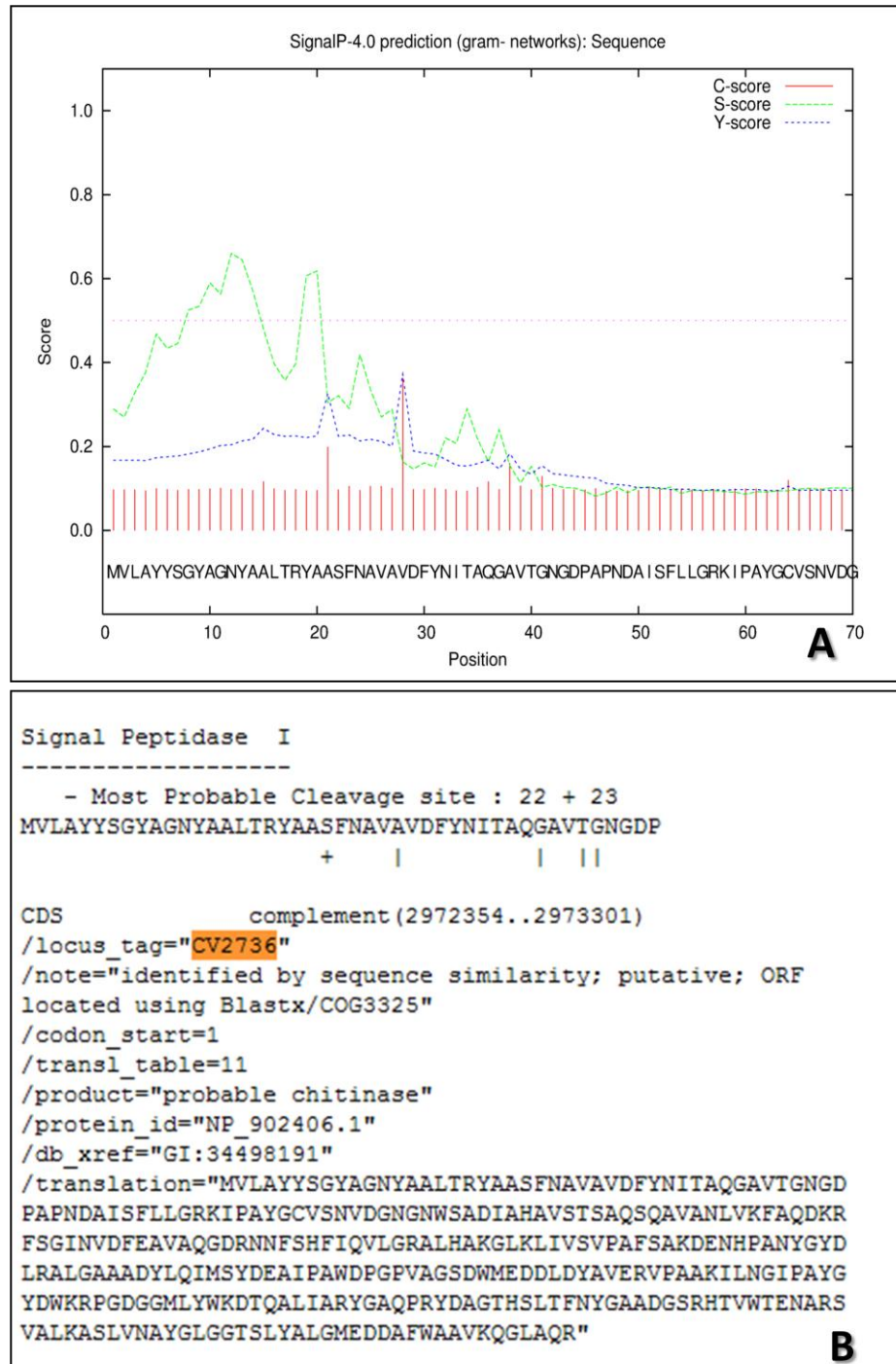


Figura 6 – Análise com o software *SignalP* 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) (A) e com o banco de dados Exprot (<http://www.laurentian.ca/NR/rdonlyres/878B67F6-AD4B-41D1-9DB7-C7B8D41BF85D/0/Cviolaceum.txt>) (B) para CV2736, mostrando que para esta sequência em (A) não há peptídeo sinal predito, de acordo com o escore C (linha contínua vertical vermelha) e em (B) evidenciando um possível peptídeo sinal com 22 aminoácidos, clivado pela sinal peptidase I.

7.2 Clonagem e transformação genética de *P. pastoris*

7.2.1 Obtenção do vetor recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS+} e transformação genética de *P. pastoris* KM71H

A amplificação *in vitro* da ORF CV2736_{PS+} foi realizada por PCR, com oligonucleotídeos iniciadores específicos e uma DNA polimerase de alta fidelidade. Como resultado, uma única banda de DNA de aproximadamente 940 pb foi obtida, como revelado por eletroforese em gel de agarose (Figura 7), o que está de acordo com o tamanho (945 pb) da referida ORF. Os produtos amplificados foram purificados, digeridos com *Eco*RI e *Xba*I, e ligados no vetor pPICZ α A. Os produtos da ligação foram inseridos em *E. coli* TOP10F' e os transformantes foram selecionados em meio com zeocina. Seis clones resistentes a zeocina foram selecionados ao acaso e amostras de DNA plasmidial foram obtidas de cada um. Digestão dessas amostras com *Eco*RI e *Xba*I e análise por eletroforese em gel de agarose revelou que cinco desses seis clones continham o plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS+}, como sugerido pela presença de duas bandas de DNA, uma banda maior correspondendo ao vetor (cerca de 3.600 pb) e outra menor, correspondendo ao inserto (Figura 8, poços 1, 2, 3, 5 e 6).

O plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS+} foi então linearizado com *Sac*I, introduzido em *P. pastoris* KM71H por eletroporação e os transformantes selecionados em meio contendo zeocina 500 μ g/mL. Seis clones de *P. pastoris* KM71H resistentes a zeocina foram selecionados ao acaso e amostras de DNA genômico foram purificadas dos mesmos, para confirmação por PCR da presença do cassete de expressão contendo o fragmento de DNA CV2736_{SP+}. A análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para o fragmento CV2736_{PS+}, revelou uma banda de DNA com cerca de 900 pb nas reações contendo amostras de DNA genômico dos seis clones resistentes a zeocina. Por outro lado, nenhuma banda foi obtida na reação de PCR contendo DNA genômico de um clone transformado com o plasmídeo íntegro, usado como controle negativo (Figura 9).

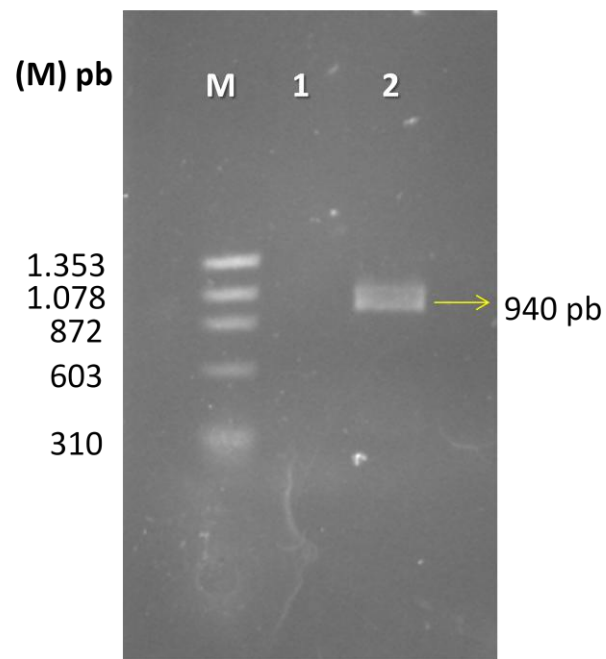


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da ORF CV2736_{PS+} por PCR, a partir de DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472. M: marcador ϕ X174 DNA/*Hae*III fragments (Invitrogen); 1. Produtos da reação sem DNA genômico (controle); 2. Produtos da reação contendo DNA genômico.

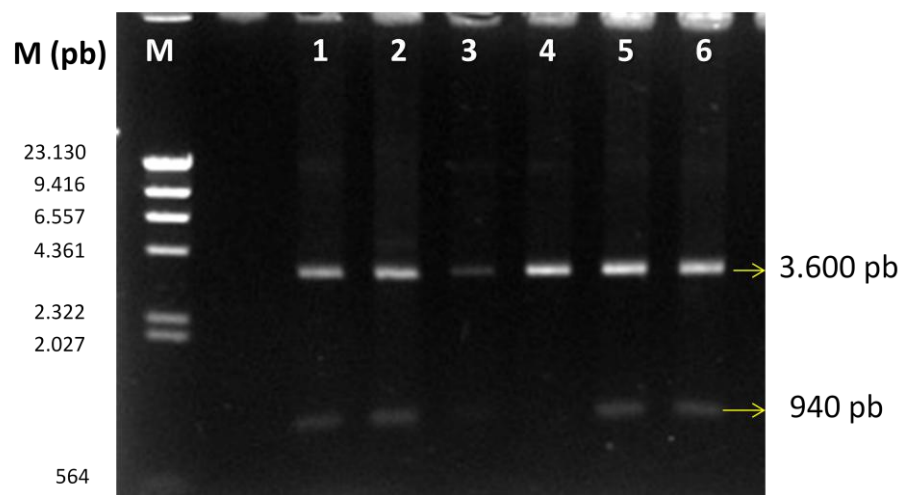


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com *EcoRI* e *XbaI*. Amostras de DNA plasmidial putativamente recombinante (pPICZ α A::CV2736_{PS+}) foram purificadas de clones (poços 1-6) de *E.coli* TOP10F' e digeridas com *EcoRI* e *XbaI*. M: marcador λ DNA/*Hind* III fragments (Invitrogen).

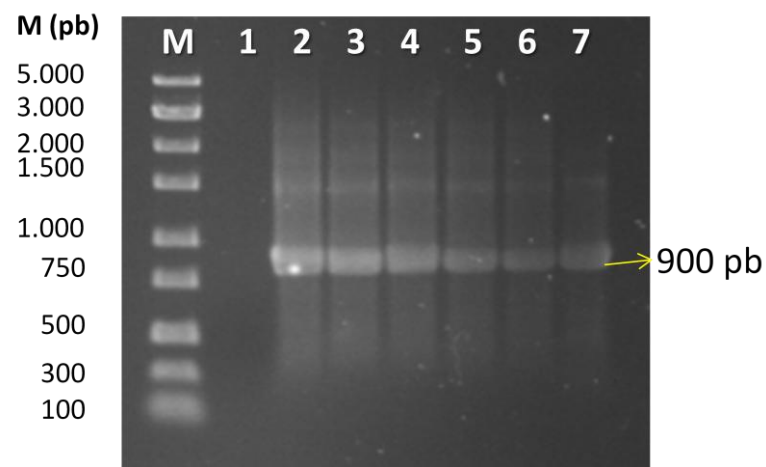


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando DNA genômico de clones *P. pastoris* KM71H, transformados com o vetor pPICZαA::CV2736_{PS+}. M: marcador *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas); 1. Produtos de PCR usando DNA genômico de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZαA íntegro; 2 a 7: Produtos de PCR de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZαA::CV2736_{PS+}.

7.2.2 Obtenção do vetor recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS-} e transformação genética de *P. pastoris* KM71H

A ORF CV2736 parcial (CV2736_{PS-}), codificando uma proteína truncada, sem o peptídeo sinal N-terminal nativo, também foi amplificada *in vitro* por PCR, com *primers* específicos e DNA polimerase de alta fidelidade. A reação com tampão GC sem DMSO resultou na amplificação de uma única banda de DNA com cerca de 880 pb (Figura 10), tamanho próximo ao calculado para o fragmento CV2736_{PS-} (879 pb). Os produtos amplificados nessa condição foram purificados, digeridos com *EcoRI* e *XbaI*, e ligados no vetor pPICZ α A. Os produtos da ligação foram inseridos em *E. coli* TOP10F' e os transformantes foram selecionados em meio com zeocina. Amostras de DNA plasmidial foram purificadas de quatro clones obtidos pela seleção com zeocina, e a presença do inserto nessas amostras foi verificada por digestão com *BamHI* e eletroforese em gel de agarose 0,8%. A presença do plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS-} foi confirmada em um dos quatro clones analisados. Após digestão com *BamHI*, o DNA plasmidial desse clone apresentou duas bandas: uma com aproximadamente 3.193 pb e outra com 1.282 pb (dados não mostrados).

O plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS-} foi linearizado com *SacI*, introduzido em células de *P. pastoris* KM71H por eletroporação e os transformantes foram selecionados em meio contendo bleocina 50 μ g/mL. Seis clones resistentes a bleocina foram selecionados ao acaso e amostras de DNA genômico foram purificadas dos mesmos. Quando submetidas a reações de PCR com iniciadores específicos para o fragmento CV2736_{PS-}, uma banda com cerca de 880 pb foi obtida a partir de todas as amostras (Figura 11), sugerindo que os seis clones selecionados continham o cassete de expressão recombinante integrado em seu genoma.

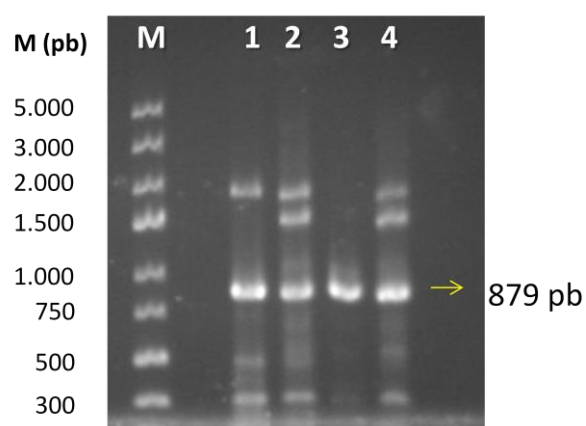


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da ORF CV2736_{ps-} por PCR em diferentes condições, a partir de DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472. As amplificações foram realizadas com uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Phusion Hot Start DNA polymerase*, Finnzymes) variando-se o tipo de tampão fornecido com a enzima e a presença/ausência de DMSO na reação. M: marcador *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas); 1. Produtos da reação com tampão HF; 2. Produtos da reação com tampão HF e DMSO; 3. Produtos da reação com tampão GC; 4. Produtos da reação com tampão GC e DMSO.

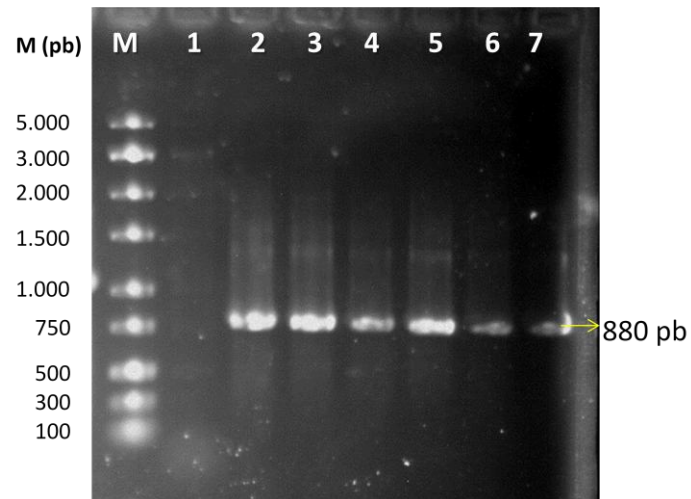


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando DNA genômico de clones de *P.pastoris* KM71H, transformados com o vetor pPICZ α A::CV2736_{PS-}. M: marcador *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas); 1. Produtos de PCR usando DNA genômico de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ α A íntegro; 2 a 7: Produtos de PCR de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZ α A::CV2736_{PS-}.

7.3 Indução da expressão de rCV2736_{PS+} e rCV2736_{PS-} em *Pichia pastoris* KM71H

7.3.1 Expressão de rCV2736_{PS+} em *P. pastoris*

Os seis clones de *P. pastoris* KM71H recombinantes, contendo o cassete de expressão recombinante ($P_{AOX1}::CV2736_{PS+}::TT_{AOX1}$), foram avaliados quanto a sua capacidade em expressar a proteína recombinante. As células dos seis clones foram cultivadas na presença de metanol, e o crescimento das culturas foi monitorado pela medida da DO₆₀₀ (Figura 12). As culturas de todos os clones apresentaram um crescimento contínuo, desde o início da indução até 120-144 h de cultivo na presença de metanol. A cultura do clone E apresentou o menor crescimento enquanto que a cultura do clone B foi a que apresentou o maior crescimento, com uma DO₆₀₀ máxima de 14,71 após 120 h do início da indução.

Alíquotas das seis culturas foram amostradas a cada 24 h após o início da indução, centrifugadas e o meio de cultura livre de células foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio (95% de saturação). Nas frações assim obtidas, os seguintes parâmetros foram determinados: teor de proteínas solúveis totais (Figura 13) e atividade quitinásica total (Figura 14). Como controle negativo, uma cultura proveniente de células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o vetor íntegro pPICZαA, foi utilizada.

O teor de proteínas solúveis totais secretadas aumentou continuamente em todas as culturas, a partir de 48 h após o início da adição de metanol, atingindo valores máximos no tempo de 120 h, e então decrescendo em 144 h. Nas culturas dos clones recombinantes, os teores máximos de proteínas totais secretadas, registrados no tempo de 120 h, variaram de 22,7 (clone E) a 29,4 mg (clone C). No tempo de 96 h de indução, o clone B apresentou o maior valor de proteínas totais secretadas (25,4 mg) e esse valor se manteve praticamente inalterado até 120 h (25,5 mg). A cultura controle apresentou um teor máximo de proteínas totais secretadas de 13,7 mg, registrado após 120 h de indução. De fato, no período de 72-144 h do início da indução, os teores de proteínas totais secretadas nas culturas dos clones recombinantes foram sempre maiores do que aqueles observados na cultura controle. Essa diferença pode ser atribuída, possivelmente, à presença da proteína recombinante, que estava ausente no meio livre de células da cultura controle.

Já com relação à atividade quitinolítica total detectada no meio de cultura livre de células, uma grande variação foi observada entre as culturas dos diferentes clones, sem qualquer regularidade ou padrão aparente. Entretanto, o clone B apresentou dentre os clones recombinantes a maior atividade quitinásica total (70,3 U), 96 h após o início da indução.

tendo seu aumento iniciado a partir de 48 h de indução, quando bruscamente essa atividade foi diminuída a partir de 120 h de indução. Esse decréscimo nos valores de atividade após 120 h pode ser devido à ação de enzimas proteolíticas presentes no meio que possivelmente foram secretadas pela levedura (LANDIM, 2011).

Os valores encontrados para atividade quitinásica na presença de quitina coloidal foram considerados baixos, quando comparados ao controle e à mesma atividade para outras quitinases, como a quitinase de *Bombyx mori*, produzida com sua sequência completa (Bmchi) e sem a região C-terminal (o equivalente ao domínio de ligação à quitina para essa proteína - Bmchi Δ C). Nesse trabalho, o autor relata uma atividade próxima à 600 U para Bmchi e uma redução para próximo de 400 U para Bmchi Δ C (FAN *et al.*, 2010). Comparando os valores encontrados pelos autores com os valores de atividade encontrados para rCV2736_{PS+}, é notável uma baixa atividade quitinolítica, que pode ser explicado pelo fato de CV2736 não apresentar domínio de ligação à quitina. No mesmo trabalho analisado, os autores observaram que a quitinase de *Bombyx mori* sem a região C-terminal tinha sua habilidade em degradar substratos insolúveis diminuída, bem como sua estabilidade em ensaios com diferentes pHs e temperaturas, as quais a proteína foi testada. Para os autores, esta região foi considerada importante para o correto funcionamento da enzima. Já Itoi e colaboradores (2012) estudando a quitinase A de *Vibrio proteolyticus* sob duas formas, uma codificada pela sequência de aminoácidos completa e outra com o C-terminal truncado, descreveu que o domínio de ligação à quitina não é de fundamental importância para a atividade quitinolítica da proteína em questão, mas pode interferir na degradação de macromoléculas insolúveis (α -cristais de quitina e quitina insolúvel). Segundo os autores, para quitina coloidal, não seria um empecilho à falta deste domínio com relação à atividade quitinolítica, e a diferença entre os valores encontrados para a atividade específica de ambas as construções pode ser dada pelas condições e tempo de indução do organismo transformante. Mesmo com essa contradição, acreditamos que o domínio de ligação à quitina possa servir como um fator que direcionaria mais facilmente a ligação da enzima ao seu substrato, o que poderia vir a interferir em sua atividade quitinolítica.

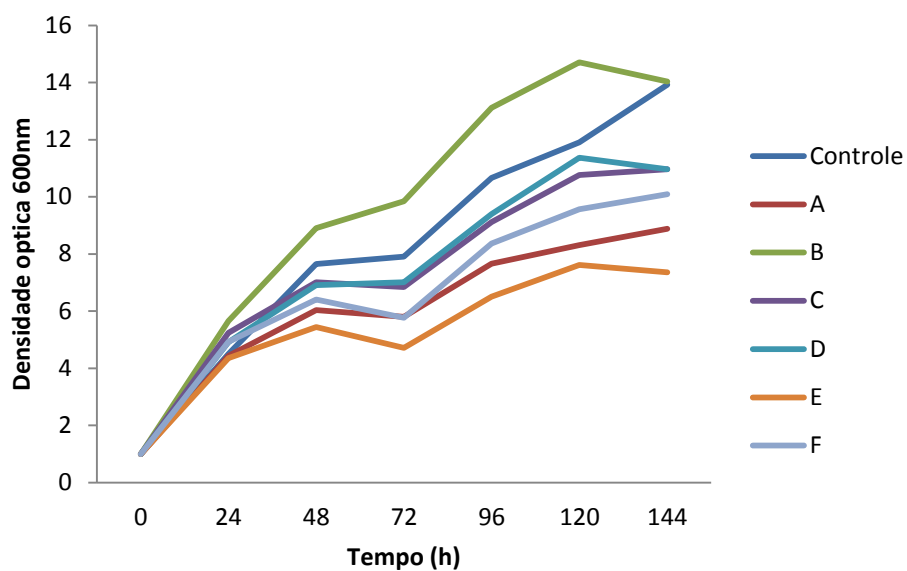


Figura 12 – Densidade ótica a 600 nm de culturas de *P. pastoris* KM71H, obtidas a partir de células transformadas com o plasmídeo recombinante pPZ α A::CV2736_{PS}+. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução.

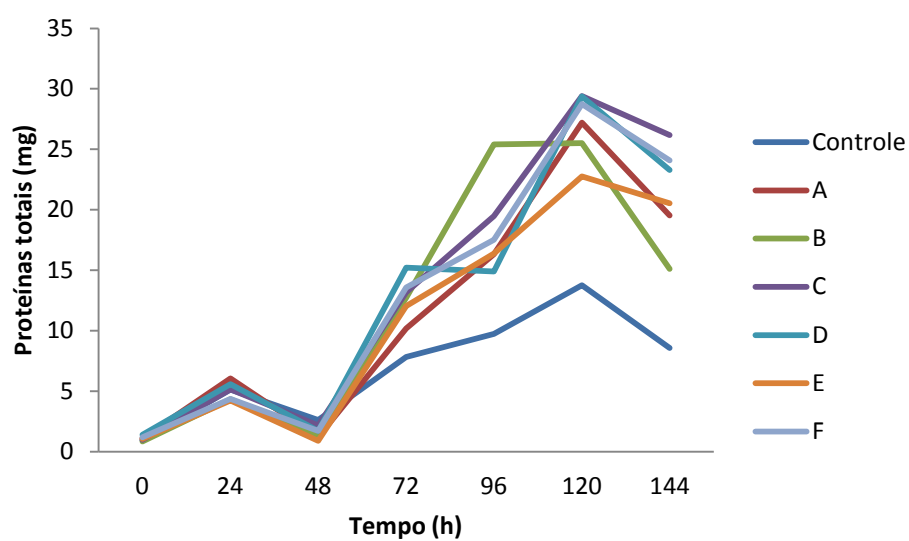


Figura 13 – Teores de proteínas totais solúveis, secretadas para o meio de cultura, por células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS+}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução.

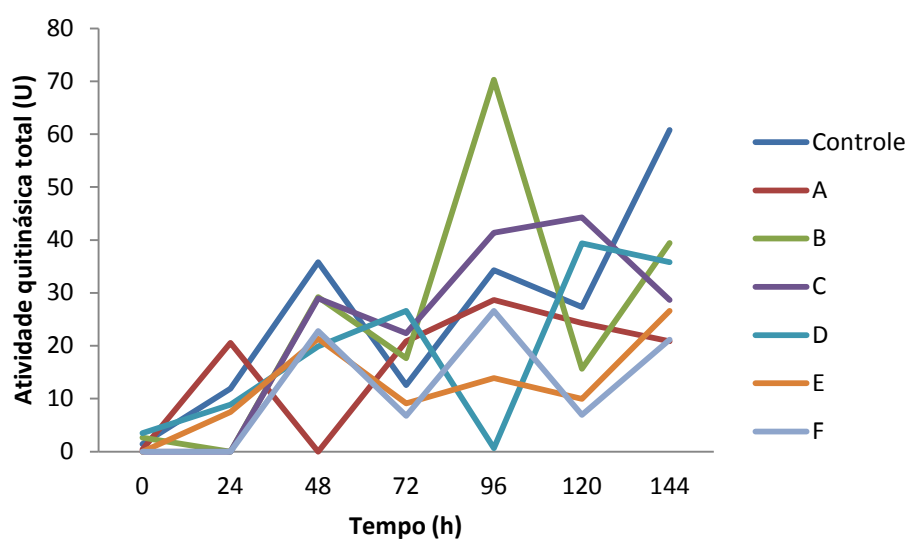


Figura 14 – Atividade quitinásica total, detectada no meio de cultura livre de células, de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS+}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução. A atividade quitinásica foi medida usando quitina coloidal como substrato. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc/mL/h a 37 °C.

As amostras (F0/95) do meio de cultura livre de células, obtidas ao longo da indução do clone recombinante B (Figura 15), bem como do clone transformado com o plasmídeo pPICZαA íntegro (controle) (Figura 16), foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). As bandas de proteínas foram reveladas por coramento com *SimplyBlue SafeStain* (a base de *Coomassie Brilliant Blue G-250*) e com o kit *InVision His-tag in-gel stain*, que cora especificamente proteínas recombinantes com cauda de histidina. Na análise eletroforética das amostras obtidas da cultura do clone recombinante B (Figura 15), uma banda com massa molecular aparente de aproximadamente 41,3 kDa foi inicialmente detectada 72 h após o início da indução, com ambos os corantes (Figura 15, poços 4A e 4B). Essa mesma banda foi também detectada nas amostras coletadas posteriormente, sendo visível até 144 h. A partir de 96 h de indução, outras duas bandas com massas moleculares aparentes de 38,1 e 36,2 kDa, respectivamente, também foram detectadas (Figura 15, poços 5A e 5B), juntamente com a banda de 41,3 kDa. Essas bandas de menor tamanho eram visíveis até 144 h, principalmente por coramento com *SimplyBlue SafeStain*. No coramento com *InVision His-tag in-gel stain*, as bandas de 38,1 e 36,2 kDa foram melhor evidenciadas no tempo de 96 h de indução, que coincidentemente foi o momento em que se observou a maior atividade quitinolítica no meio de cultura livre de células, obtido a partir da cultura do clone B (Figura 14).

Considerando então os valores de crescimento da cultura, teor de proteínas totais secretadas, atividade quitinásica total após 96 h de indução, e os resultados da análise por SDS-PAGE, o clone recombinante B foi escolhido para preparação de frações proteicas contendo rCV2736_{PS+}, objetivando uma melhor caracterização dessa amostra.

A massa molecular (valor monoisotópico) de CV2736_{PS+}, calculada a partir da sua sequência de aminoácidos, é de 33.743,6 Da (i.e., ~33,7 kDa). Entretanto, a massa molecular esperada para a rCV2736_{PS+} produzida em *P. pastoris* e secretada para o meio de cultura seria, *a priori*, de 36.994,14 Da (~37 kDa). Esse valor leva em conta a ausência do resíduo Met1 e a presença de resíduos de aminoácidos extras, nas extremidades N-terminal (EAEAEF) e C-terminal (VLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) da proteína recombinante. Na sequência N-terminal EAEAEF, os primeiros quatro resíduos são codificados pelo vetor (EAEA) e os dois resíduos seguintes (EF) são codificados no sítio para *EcoRI*, adicionado ao *primer* senso usado durante a amplificação da ORF. A sequência N-terminal EAEA estaria presente na proteína recombinante secretada, assumindo-se um correto processamento do fator α de secreção pela protease Kex2 de *P. pastoris* e ausência de clivagem pela protease Ste13. A sequência adicional na extremidade C-terminal inclui: dois resíduos (VL)

codificados pelo sítio de restrição para *XbaI* presente no *primer* reverso (usado para amplificar a ORF) e os *tags* codificados no vetor pPICZαA, o epítipo *c-myc* (EQKLISEEDL) e a cauda com seis resíduos consecutivos de histidina (HHHHHH), separados por um *linker* (NSAVD). Entretanto, a eficiência de clivagem por Ste13 depende da proteína heteróloga que está sendo expressa (BRAKE *et al.*, 1984). Desta forma, tem sido observado que os dois dipeptídeos Glu-Ala (EAEA) são removidos em certos casos e em outros não (GUISEZ *et al.*, 1991). Assim, pode-se especular que seriam possíveis mais duas isoformas para rCV2736_{PS+} secretada, com massas moleculares menores do que 37 kDa, as quais seriam resultado da remoção de apenas um ou dos dois dipeptídeos EA da extremidade N-terminal. Essas moléculas teriam então massas moleculares de 36.794,06 Da (~36,8 kDa; N-terminal EAEF) e 36.593,98 Da (~36,6 kDa; N-terminal EF), respectivamente. Considerando então essas predições, pode-se considerar que as duas bandas com massas moleculares aparentes de 38,1 e 36,2 kDa, detectadas a partir de 96 h de indução na cultura do clone B, correspondem possivelmente a duas isoformas de rCV2736_{PS+} que apresentam na extremidade N-terminal as sequências EAEAEF (massa calculada ~37 kDa) e EF (massa calculada ~36,6 kDa), respectivamente (Figura 17).

Por outro lado, para explicar a massa molecular aparente da banda mais proeminente, com cerca de 41,3 kDa, especulou-se a hipótese da mesma ser uma forma glicosilada de rCV2736_{PS+}. Para tentar esclarecer isso, uma análise *in silico* foi realizada com os softwares *NetNGlyc* e *NetOGlyc*, para verificar se a sequência de aminoácidos de CV2736 possuía possíveis sítios de N-glicosilação e/ou O-glicosilação (Figura 18). De acordo com essas análises, a sequência de aminoácidos de CV2736 possui três sítios de N-glicosilação em potencial: ³²NITA³⁵, ⁷³NWSA⁷⁶ e ¹²⁰NFSH¹²³ (os resíduos de Asn que poderiam ser N-glicosilados estão sublinhados em cada segmento de sequência; a numeração tem como referência o resíduo Met1). Nenhum sítio potencial de O-glicosilação foi predito. Assim, é possível de fato que a banda com massa molecular aparente de 41,3 kDa corresponda a uma isoforma de rCV2736_{PS+} na qual pelo menos um desses sítios potenciais de N-glicosilação foram modificados pela adição covalente de um oligossacarídeo do tipo *high mannose*..

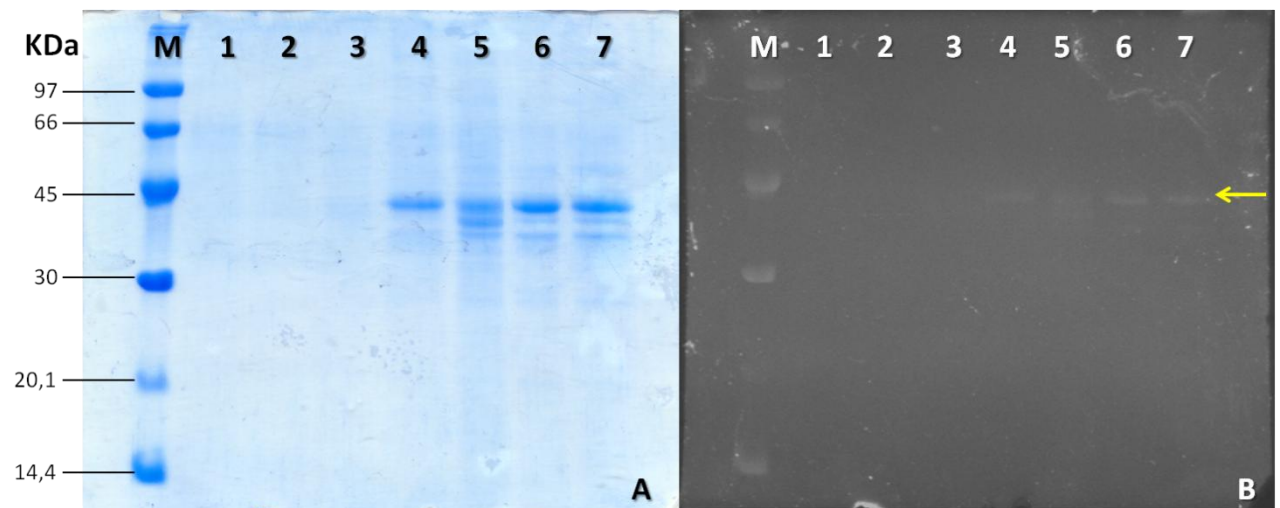


Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de amostras do meio de cultura livre de células, coletadas de uma cultura de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZαA::CV2736_{PS+}. As amostras foram coletadas com 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6) e 144 h (7) após o início da indução da expressão da proteína recombinante. As bandas foram coradas com corante *SimplyBlue SafeStain* (A) e com o kit *InVision His-tag in-gel stain* (B). M: marcador Low molecular weight marker (GE Healthcare).

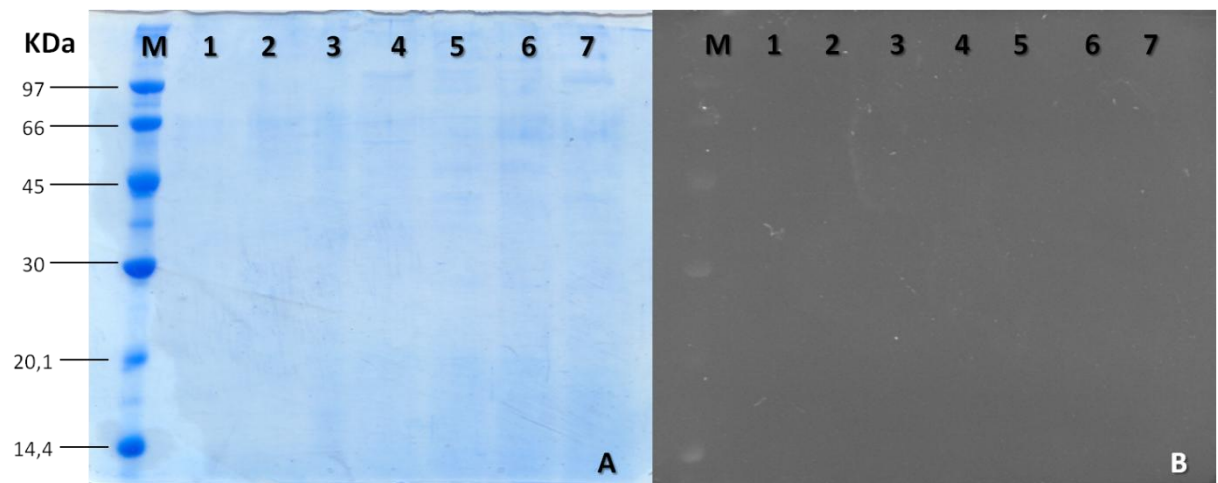


Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de amostras do meio de cultura livre de células, coletadas de uma cultura de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZαA íntegro (controle negativo). As amostras foram coletadas com 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6) e 144 h (7) após o início da indução da expressão da proteína recombinante. As bandas foram coradas com corante *SimplyBlue SafeStain* (A) e com o kit *InVision His-tag in-gel stain* (B). M: marcador *Low molecular weight marker* (GE Healthcare).

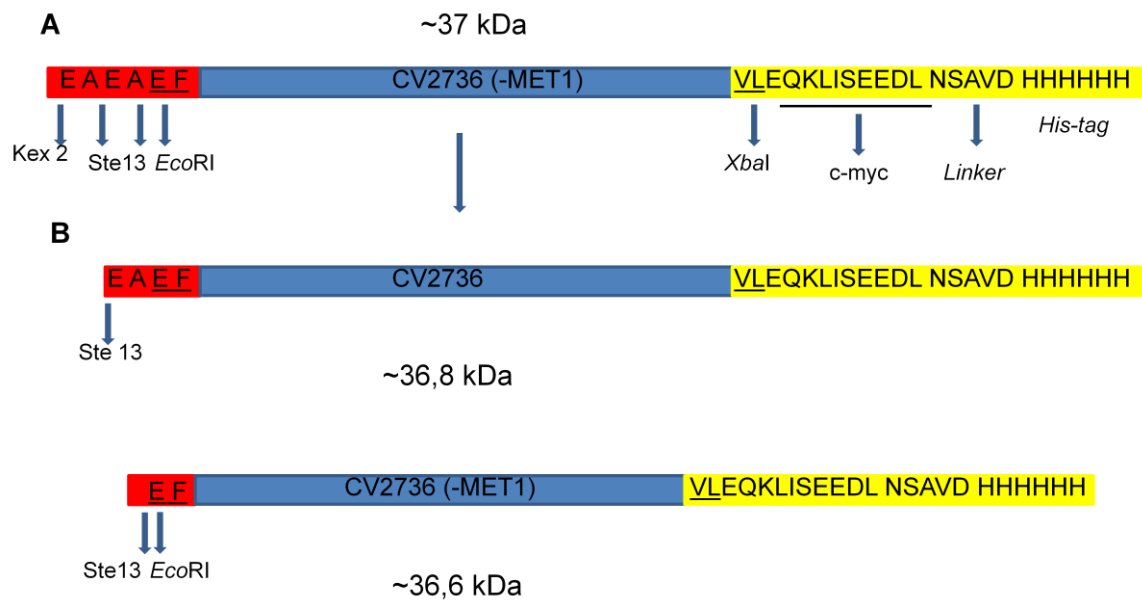


Figura 17 – Esquema mostrando a sequência de aminoácidos e massa molecular predita pela sequência de aminoácidos, explicando a massa molecular das bandas proteicas de rCV2736_{PS+}, encontradas após eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), evidenciando um possível processamento diferenciado feito por *Pichia pastoris*, quando da produção da proteína recombinante CV2736. (A – rCV2736_{PS+}, tendo corte feito pela protease Kex2, apresentando uma banda com massa molecular de aproximadamente 37 kDa; B – rCV2736_{PS+} mostrando dois possíveis pontos de corte da protease Ste13, apresentando duas massas moleculares distintas, uma com 36,8 kDa e outra com 36,6 kDa).

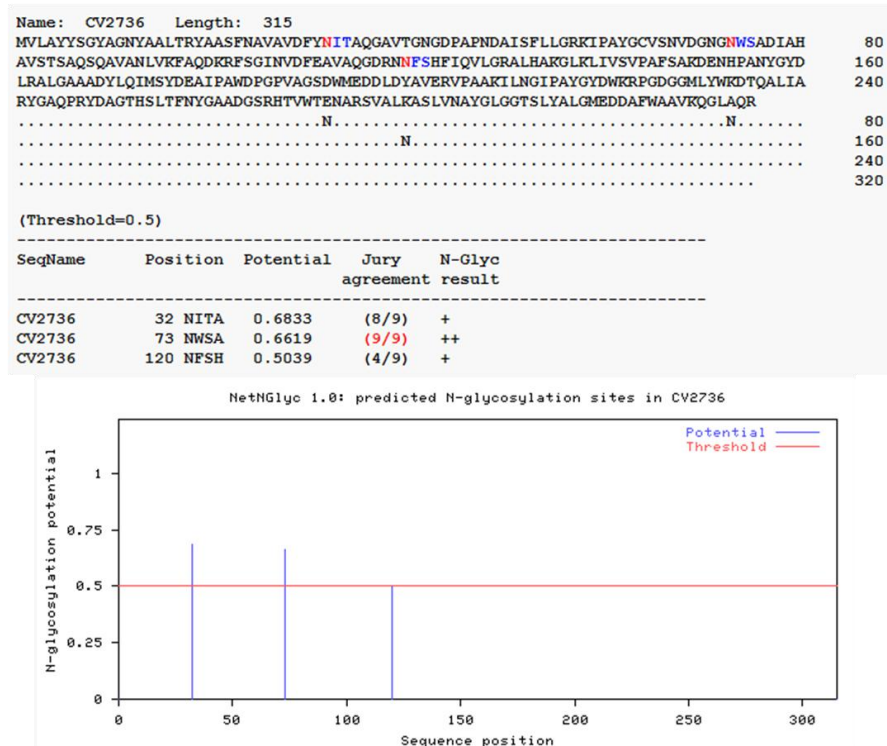


Figura 18 – Resultado da análise da sequência de aminoácidos de CV2736_{PS+} pelo software NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), evidenciando 3 potenciais sítios de N-glicosilação, representados pelas linhas verticais azuis (*potential*).

Dando suporte a essas especulações, a coloração com o reagente de Schiff evidenciou de fato que a banda proteica referida (com 41,3 kDa) estava glicosilada (Figura 19). Se levarmos em conta que i) a massa molecular de um oligossacarídeo *high mannose* do tipo GlcNAc₂Man₈ é de, aproximadamente, 1.720,59 Da, ii) e assumindo também que os três sítios potenciais de N-glicosilação estejam modificados, cada um deles com um oligossacarídeo desse tipo, iii) e considerando ainda que as três diferentes formas da proteína recombinante, que diferem entre si na sequência da extremidade N-terminal, como já discutido, possam ser igualmente glicosiladas, então as massas moleculares preditas das isoformas glicosiladas seriam de, aproximadamente, 42.155,91 Da (~42,1 kDa; N-terminal EAEAEF), 41.955,83 Da (~41,9 kDa; N-terminal EAEF) e 41.755,75 Da (~41,7 kDa; N-terminal EF). Desta forma, os valores assim estimados estão de acordo com a massa molecular aparente, calculada a partir da migração no gel de poliacrilamida, para a banda com 41,3 kDa (Figura 20).

Leveduras adicionam açúcares nos resíduos do aminoácido asparagina, presentes nos motivos Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, e também ainda que ocasionalmente, no motivo Asn-X-Cys (X representando qualquer aminoácido). Organismos eucariotos são capazes de realizar modificações pós-traducionais, tais como glicosilações, fosforilações, metilações etc. A levedura *Pichia pastoris*, por ser eucarioto também é capaz de realizar modificações, como glicosilações, que podem ou não influenciar na atividade da proteína recombinante produzida (TORRES & MORAES, 2000). Para produção de glicoproteínas com interesse terapêutico este fato é de extrema importância (CHOI *et al.*, 2012), apesar de estas N-glicosilações, do modo como são processadas em *Pichia pastoris*, terem a possibilidade dar a proteína uma meia-vida curta, o que comprometeria o seu uso como medicamento (WILDT & GERNGROSS, 2005).

A fração F0/95, contendo rCV2736_{PS+} foi analisada tratada com tripsina e os produtos da digestão submetidos a por espectrometria de massa (ESI-MS). A maioria dos peptídeos encontrados foram identificados como sendo parte da quitinase de *C. violaceum* ATCC 12472, como mostrado na Figura 21. Além disso, nenhuma diferença foi encontrada entre os peptídeos obtidos e a sequência da proteína, deduzida da sequência de nucleotídeos. Isto sugere que não houve nenhuma modificação realizada eventualmente pelo processo de tradução no vetor de expressão eucarioto, tampouco pela enzima DNA polimerase utilizada no processo de amplificação, nem por possíveis mutações que pudessem ter ocorrido no decorrer do processo de clonagem (ANEXO D).

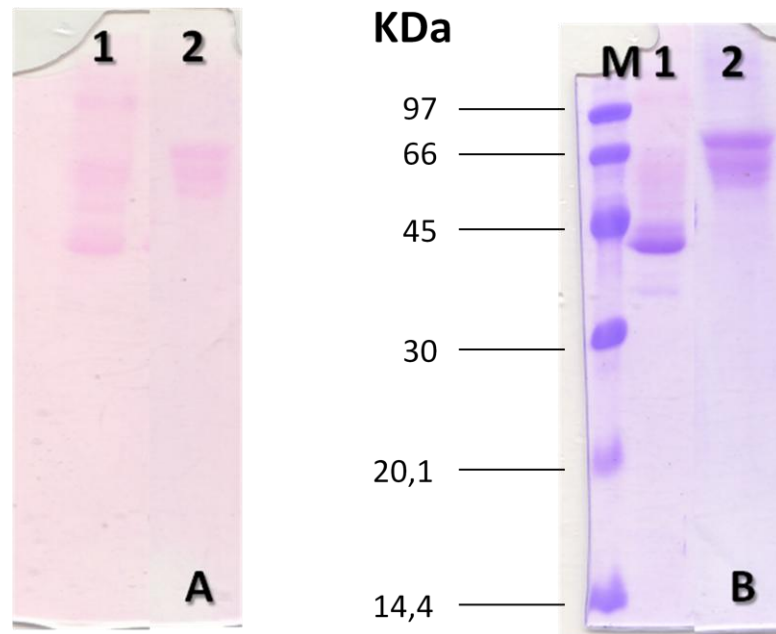


Figura 19 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da fração F0/95 do meio de cultura livre de células, de *P. pastoris* KM71H transformada com pPICZαA::CV2736_{PS+}. As bandas foram reveladas por coramento com reagente de Schiff (A) e com *Coomassie Brilliant Blue* (B). Poço 1: fração F0/95 contendo rCV2736_{PS+}; Poço 2: Fetuína (25 µg; Sigma-Aldrich); M: marcador de massa molecular *Low molecular weight marker* (GE Healthcare).

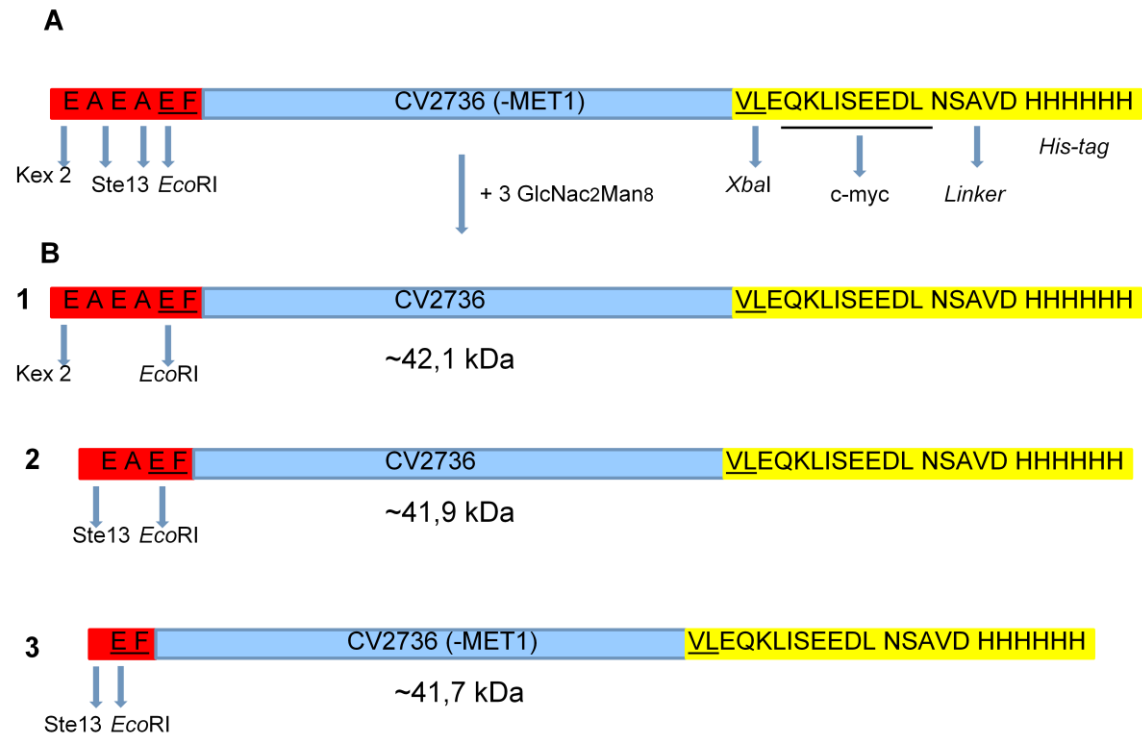


Figura 20 – Esquema mostrando a sequência de aminoácidos e massa molecular predita pela sequência de aminoácidos, hipotetizando as possíveis massas moleculares das bandas proteicas de rCV2736_{PS+}, encontradas após eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), após possíveis glicosilações feitas por *Pichia pastoris*, quando da produção da proteína recombinante CV2736. A – sequência de aminoácidos da proteína recombinante rCV2736_{PS+}; B – rCV2736_{PS+} mostrando três possibilidades para as massas moleculares das bandas proteicas evidenciadas por eletroforese, após a adição de um resíduo de açúcar do tipo GlcNac₂Man₈ (1- rCV2736_{PS+} com clivagem feita pela protease Kex2, 2- rCV2736_{PS+} com clivagem feita pelo primeiro sítio de corte para Ste13 e 3- rCV2736_{PS+} com clivagem feita pelo segundo sítio de corte para Ste13).

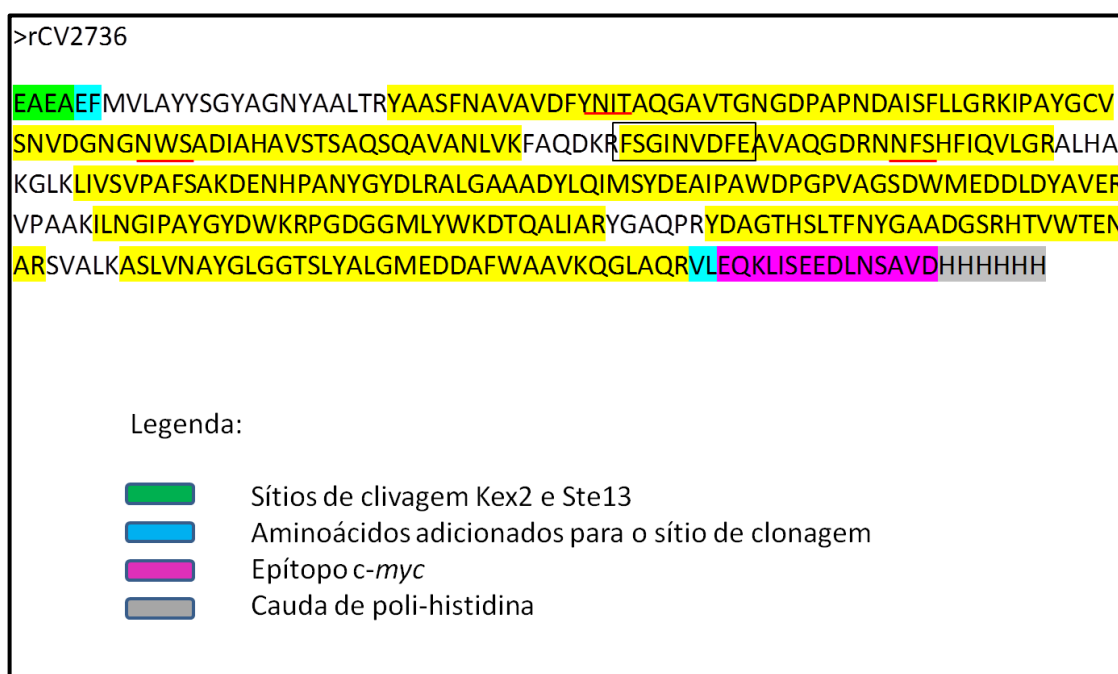


Figura 21 – Identificação de CV2736 por espectrometria de massa (ESI/MS) e obtenção dos peptídeos encontrados na sequência de aminoácidos de CV2736, obtidos por digestão com tripsina (partes em amarelo são referentes aos peptídeos encontrados, sublinhados em vermelhos estão os sítios de glicosilação e na caixa retangular os aminoácidos do sítio catalítico).

7.3.2 Expressão de rCV2736_{PS-} em *P. pastoris*

Os seis clones de *P. pastoris* contendo o cassete de expressão P_{AOXI}::CV2736_{PS-}::TT_{AOXI} foram cultivados na presença de metanol, e o crescimento das culturas foi monitorado pela medida da DO₆₀₀ (Figura 22). Os mesmos foram também avaliados com relação ao teor de proteínas totais secretadas e atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, fracionado à 95% de saturação com sulfato de amônio (Figuras 23 e 24, respectivamente).

Todas as culturas dos clones recombinantes apresentaram valores de DO₆₀₀, ao longo da indução, bastante similares entre si. Além disso, quando comparadas ao controle, observa-se que o crescimento das mesmas, a partir de 72 h do início da indução, se manteve estável e sempre menor (Figura 22). A cultura controle teve sua DO₆₀₀ variando de 4,5 a 13,9, no decorrer da indução, enquanto que as culturas dos clones recombinantes mantiveram um crescimento aumentado até 48 h de indução e a partir desse momento, a curva de crescimento assume a forma de um platô e as culturas mantiveram-se com valores de DO₆₀₀ de aproximadamente 8,0 para todos os clones, até o último dia de cultivo (144 h).

Os teores de proteínas solúveis totais (Figura 23) secretadas foram menores, quando comparados aos obtidos durante a indução feita com os clones transformados com a construção P_{AOXI}::CV2736_{PS+}::TT_{AOXI}. Os maiores valores foram encontrados em 96 h de indução, para os clones B (11,13 mg), D (9,3 mg) e E (10,5 mg) (Figura 19). Esses valores foram próximos aos determinados na cultura controle (9,7 mg), nesse mesmo momento (96 h de indução).

Já em relação à atividade quitinásica total, todos os clones transformados com a construção P_{AOXI}::CV2736_{PS-}::TT_{AOXI} apresentaram valores maiores do que aqueles observados para os clones portando a construção P_{AOXI}::CV2736_{PS+}::TT_{AOXI}. Assim, os maiores valores de atividade quitinolítica total foram registrados nas culturas dos clones A (281,3 U em 48 h), B (262,1 U em 120 h) e E (230,4 U em 96 h) (Figura 24). Na cultura controle, o valor máximo de atividade quitinásica total foi de 23,9 U, observado em 48 h de indução. Aleatoriamente, dentre os clones que apresentaram maior atividade quitinásica total, o clone E foi escolhido para dar prosseguimento as análises.

Analisando o perfil eletroforético (SDS-PAGE) das amostras do meio de cultura livre de células, coletadas durante a indução do clone E (Figura 25), pode-se perceber que, no

decorrer de todo o período de cultivo na presença de metanol, de 0 até 144 h, nenhuma banda com massa molecular aparente na faixa de 34,3-34,8 kDa, que poderia estar relacionada à produção da proteína recombinante (rCV2736_{PS-}) na sua forma não glicosilada, foi evidenciada com clareza. Além disso, bandas com massa molecular aparente de aproximadamente 40 kDa, que poderia corresponder à rCV2736_{PS-} na sua forma N-glicosilada, também não foram evidenciadas no gel de poliacrilamida corado com *SimplyBlue SafeStain*. Esse achado está condizente com os teores de proteínas solúveis totais, secretadas para o meio de cultura (Figura 23), que tanto para o clone E como para os demais clones recombinantes, foram semelhantes aos observados na cultura controle. Entretanto, pelo fato de uma alta atividade quitinolítica total ter sido observada no meio de cultura livre de células, ao longo da indução dos clones recombinantes (em média, 10 vezes maior do que aquela registrada na cultura controle), isso sugere que a proteína recombinante (rCV2736_{PS-}) deve ter sido produzida e secretada, de forma ativa porém em níveis muito baixos, que não permitiram a sua detecção no gel de poliacrilamida corado com *SimplyBlue SafeStain*.

Pelo fato do crescimento das culturas dos clones recombinantes ter sido menor em relação ao controle e a curva de crescimento ter assumido a forma de um platô a partir de 48 h, hipotetizamos que a proteína recombinante rCV2736_{PS-} produzida na levedura *P. pastoris* e secretada para o meio de cultura, de alguma forma, causou algum efeito adverso sobre as células, diminuindo a densidade da cultura. Além disso, como os valores de atividade quitinásica total foram maiores quando comparados aos valores obtidos durante a expressão da construção codificando a proteína em sua forma completa (CV2736_{PS+}), sugere-se que a quitinase recombinante rCV2736_{PS-} apresenta-se mais ativa enzimaticamente, ao ser secretada para o meio de cultura, o que pode explicar a suposta toxicidade sobre o próprio organismo hospedeiro, impedindo o crescimento da cultura.

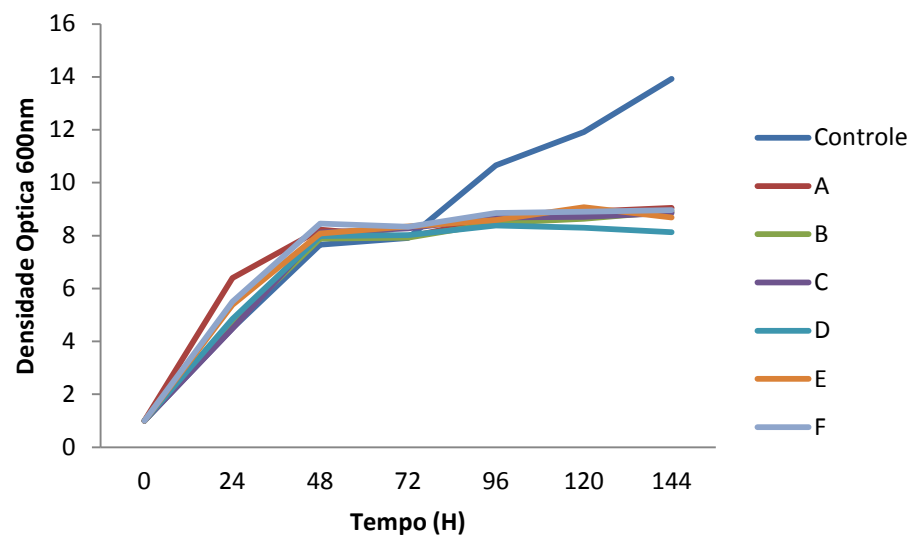


Figura 22 – Densidade ótica a 600 nm de culturas de *P. pastoris* KM71H, obtidas a partir de células transformadas com o plasmídeo recombinante pPIZ α A::CV2736_{PS}-. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução.

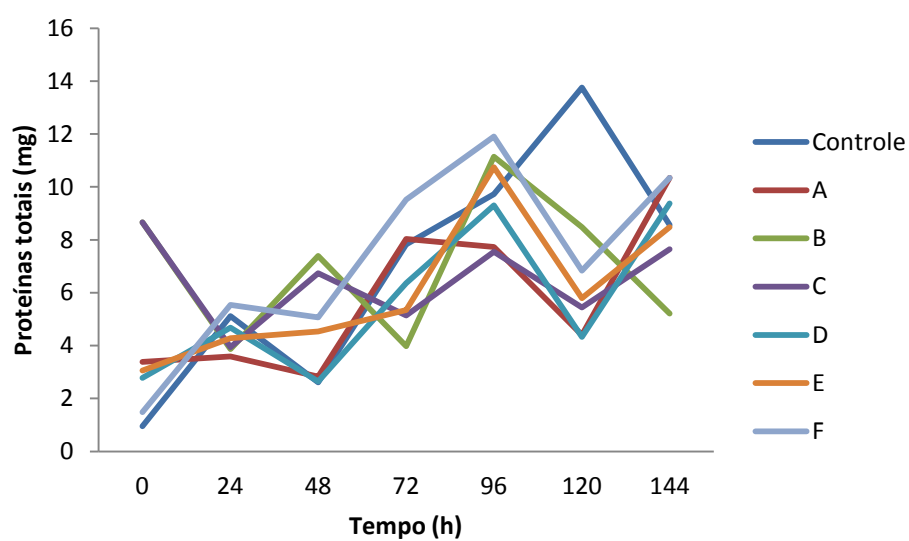


Figura 23 - Teores de proteínas totais solúveis, secretadas para o meio de cultura, por células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS-}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução.

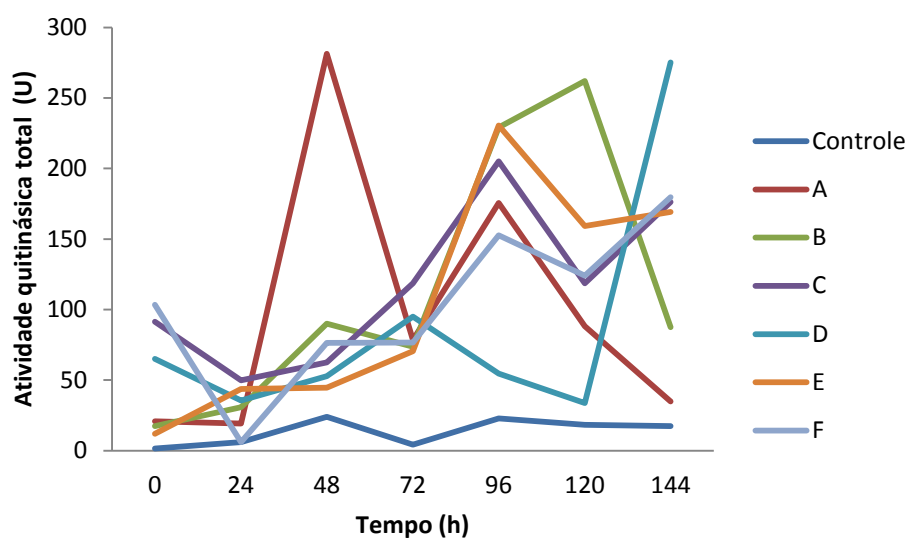


Figura 24 – Atividade quitinásica total, detectada no meio de cultura livre de células, de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS-}. Seis clones recombinantes (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v), para indução da expressão da proteína recombinante. Células transformadas com o plasmídeo íntegro foram usadas como controle. O tempo de 0 h se refere ao início da indução. A atividade quitinásica foi medida usando quitina coloidal como substrato. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc/mL/h a 37 °C.

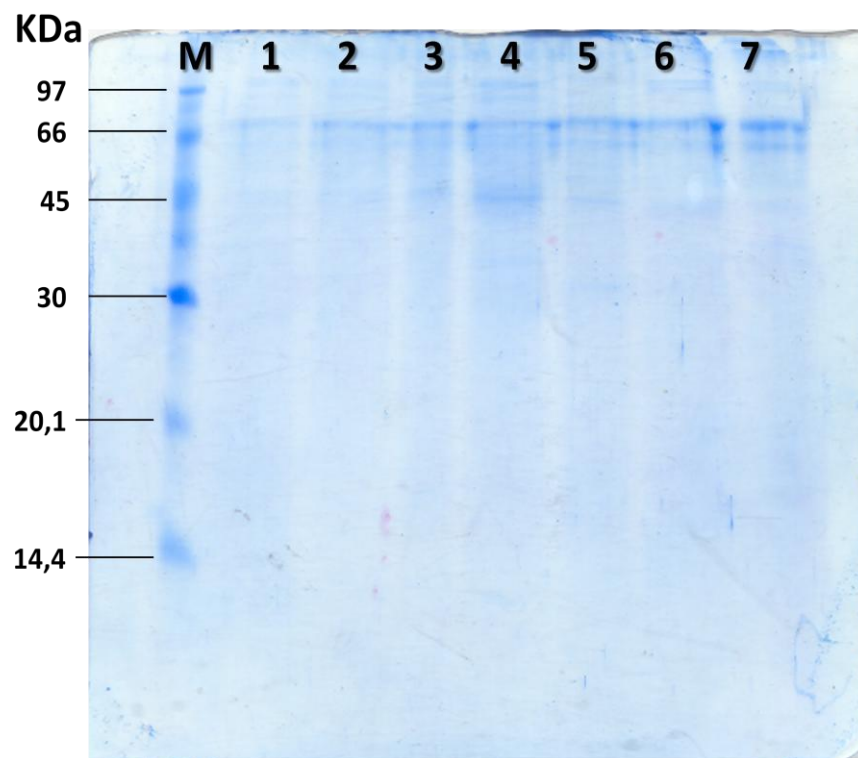


Figura 25 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de amostras do meio de cultura livre de células, coletadas de uma cultura de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZαA::CV2736_{PS-}. As amostras foram coletadas com 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6) e 144 h (7) após o início da indução da expressão da proteína recombinante. As bandas foram coradas com corante *SimplyBlue SafeStain*. M: marcador *Low molecular weight marker* (GE Healthcare).

A comparação da sequência de aminoácidos de CV2736 com o banco de dados CDD, revelou que a mesma apresenta similaridade significativa com proteínas classificadas na sub-família *CFLE* (*Cortical fragment-lytic enzyme*) da super-família *Chitinase-like* (Figura 26), incluindo por exemplo uma hidrolase de *Bacillus cereus*, relacionada ao processo de esporulação. Esse tipo de proteína é produzida na forma de uma pré-proteína inativa, que sofre a perda de um fragmento e se torna ativa, agindo sobre os peptidoglicanos da parede do esporo, auxiliando em sua germinação (KODAMA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2000).

As proteínas com esta função estão relacionadas, além da germinação de esporos, ao processo de divisão celular, no crescimento celular, no processo de autólise, dentre outros (VOLLMER *et al.*, 2008). Algumas contem motivos que se ligam a parede celular bacteriana, como as proteínas XkdP, XlyA, XlyB, YocH, YojL, YdhD, YhdD, YkuD, YkvP, dentre outras. Esses motivos provavelmente tem a função de localizar estas proteínas ao redor dos esporos (KODAMA *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2000). Proteínas deste grupo também foram encontradas em *Bacillus anthracis*, chamadas SleL (YaaH). Esta proteína possui três domínios conservados: dois domínios N-terminais LysM e um domínio GH18. Proteínas que não continham o domínio LysM tiveram sua atividade diminuída em degradar o peptidoglicano da parede dos esporos, sendo portanto esta região da proteína importante no reconhecimento e na ligação ao substrato (LAMBERT *et al.*, 2012).

Todos estes fatores levam a crer que a sequência de aminoácidos retirada, equivalente ao possível peptídeo sinal já mencionado, não influenciou na secreção da proteína recombinante, porém a retirada desta sequência sinal acabou tornando a proteína recombinante mais ativa no meio, mesmo não tendo levado a um aumento na concentração desta no meio de cultura. Como *C. violaceum* não produz esporos e por possuir um gene (CV2736) com similaridade a essas hidrolases de *Bacillus*, este gene pode estar relacionado à defesa ou a manutenção do crescimento populacional da cultura.

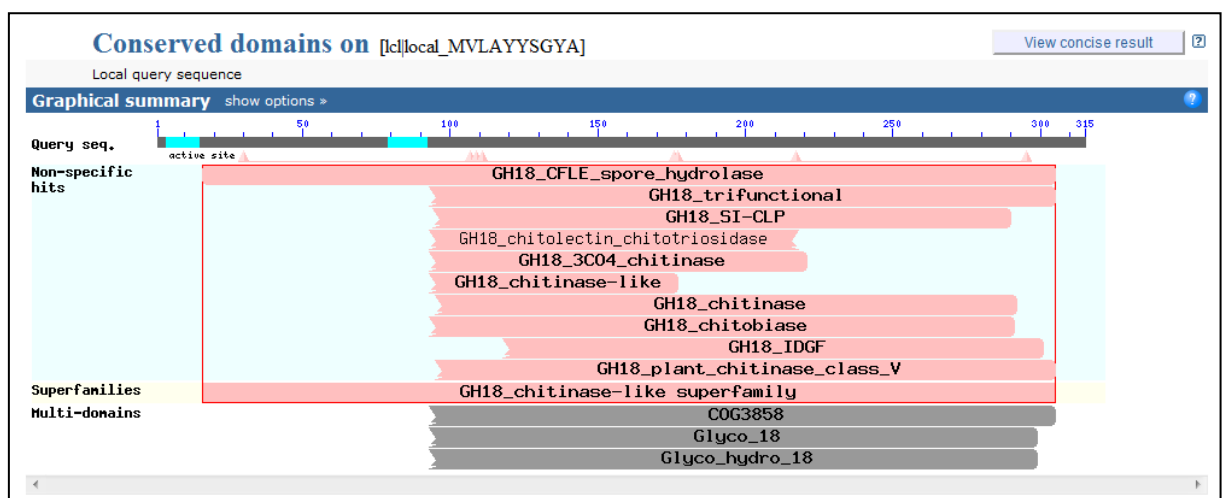


Figura 26 – Análise pelo software online CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) da sequência de CV2736, mostrando similaridade com proteínas da família GH18, dentre elas, uma possível hidrolase específica para a esporulação de *Bacillus subtilis*.

7.4 Atividade quitinásica na presença e ausência de β -glucuronidase e contra substratos sintéticos

Endoquitinases são enzimas capazes de clivar cadeias de quitina em pontos internos, enquanto que Exoquitinases são enzimas que clivam a partir da extremidade final não-redutora da cadeia de quitina. A fração F0/95 do meio de cultura do clone B de *P. pastoris*, contendo rCV2736_{PS+}, foi utilizada para o ensaio de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, na presença ou ausência de β -glucuronidase, para caracterização de atividade endoquitinásica (ensaio na presença de β -glucuronidase) ou exoquitinásica (ensaio na ausência de β -glucuronidase). A fração apresentou maior atividade na presença de β -glucuronidase, possuindo assim atividade endoquitinásica em maior escala, quando comparada à atividade sem a enzima (exoquitinásica), de acordo com a Tabela 2. A atividade específica na presença da enzima foi aproximadamente 1,8 vezes maior que a atividade sem a referida enzima.

A quitinase de classe III de *Bambusa oldhamii* foi considerada uma endoquitinase por clivar um trimero de quitina (GlcNAc₃) em monômeros e dímeros, e clivou tetrâmeros e hexâmeros (GlcNAc₄₋₆) em monômeros, dímeros e trimeros (KUO et al, 2008).

No ensaio realizado com substratos sintéticos, a fração F0/95 do meio de cultura contendo a proteína recombinante em questão foi testada, apresentando-se ativa contra o 4-nitrofenil N-N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo (análogo de um trissacarídeo) (303 U/mL) e bem mais ativa contra o 4-nitrofenil N-N'-N''-triacetilquitotriose (análogo de um tetrassacarídeo) (690 U/mL). Resultados semelhantes foram encontrados para duas quitinases recombinantes de *C. violaceum* ATCC 12472 codificadas pelas ORFs CV2935 e CV3316, pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases (LOBO, 2012; TEIXEIRA, 2011). Diferentemente, uma quitinase de feijão-de-corda descrita por Landin (2011) não apresentou atividade contra os mesmos substratos testados, sendo a mesma pertencente à família 19 das glicosil hidrolases. Portanto, a quitinase recombinante rCV2736_{PS+}, presente na fração proteica testada pode ser considerada tendo atividade endoquitinásica, por ser mais ativa contra análogos de di e trissacarídeos e contra quitina coloidal na presença da enzima β -glucuronidase.

Tabela 2 – Atividade quitinolítica da fração F0/95 do meio de cultura livre de células de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736_{PS+}, na presença e ausência da enzima β -glucuronidase. O ensaio foi realizado usando quitina coloidal como substrato.

Presença de β-glucuronidase no ensaio enzimático	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)
β-glucuronidase (+)	157,2	88,3
β-glucuronidase (-)	87,9	49,4

*para valores de atividade total, 1U é equivalente a 1nmol de GlcNAc/hora.

**para valores de atividade específica, 1U é equivalente a 1nmol de GlcNAc/mg/hora.

7.5 Influência do pH e da temperatura na atividade quitinolítica da proteína recombinante

Alíquotas da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H, transformada com o plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS+} foram dialisadas contra tampões com diferentes valores de pH, variando de 2 a 10. A atividade enzimática foi detectada no intervalo de pH entre 3,0 e 9,0, com a atividade máxima observada em pH 3,0. Em pH 5,0, a amostra ainda apresentou 74,1% de sua atividade máxima e em pH 6,0 houve um decréscimo significativo, de tal forma que a enzima exibiu somente 22,8% de sua atividade máxima. A partir de pH 6,0, a fração apresentou elevada redução na atividade, o que persistiu até pH 9,0. Em pH 2,0, a amostra apresentou um aspecto leitoso e com um grau de precipitação bastante elevado, revelando uma provável desnaturação das proteínas e consequentemente, nenhuma atividade quitinolítica foi detectada nesse pH (Figura 27).

Portanto, a fração contendo a proteína recombinante foi mais ativa em pH ácido, tendo sua atividade reduzida a partir de pH 6,0. O fato de rCV2736_{PS+} ser capaz de degradar quitina em pH ácido, faz com que se levante a hipótese de a bactéria *Chromobacterium violaceum* ser um organismo que possui certa resistência em ambientes adversos, tais como ambientes ácidos. Diferentemente, a endoquitinase de *Limonium bicolor*, produzida em *Pichia pastoris*, que teve sua atividade quitinásica mantida estável de pH 3,0 a pH 10,0 (LIU, Z. H. *et al.*, 2010). Já a quitinase de *Chaetomium cupreum*, produzida também em *P. pastoris*, teve seu máximo de atividade em pH 5,8 (WANG, Y. J.; YANG, Q., 2009). Já as isoformas da quitinase da classe III de *Bambusa oldhamii* tiveram sua atividade quitinásica estável em pH 3,0 e 4,0 (KUO *et al.*, 2008).

Alíquotas da mesma fração foram analisadas frente a variações de temperatura (de 30 a 90 °C). Quando tratada a 50°C por 30 min, a enzima ainda exibiu 62,7% de sua atividade máxima, registrada a 30 °C. Entretanto, nenhuma atividade quitinolítica foi detectada quando a preparação foi exposta a 60 °C ou a temperaturas superiores (Figura 28). Lee e colaboradores (2010), estudando uma endoquitinase de *Sanguibacter antarcticus* expressa em *P. pastoris*, identificaram que a mesma apresentou temperatura ótima de atividade em 37°C, concluindo que a enzima consegue degradar quitina à temperatura ambiente, bem como rCV2736_{PS+} presente no extrato.

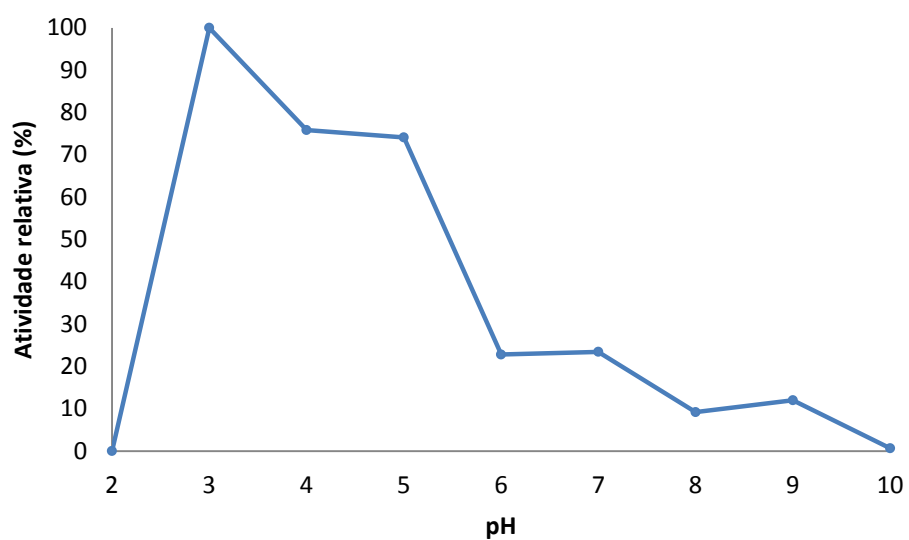


Figura 27 – Atividade quitinásica relativa detectada em alíquotas da fração F0/95 do meio de cultura livre de células do clone B de *P. pastoris* KM71H transformado com o plasmídeo recombinante pPICZαA::CV2736_{PS+}, dialisadas contra vários tampões, numa faixa de pH de 2 a 10.

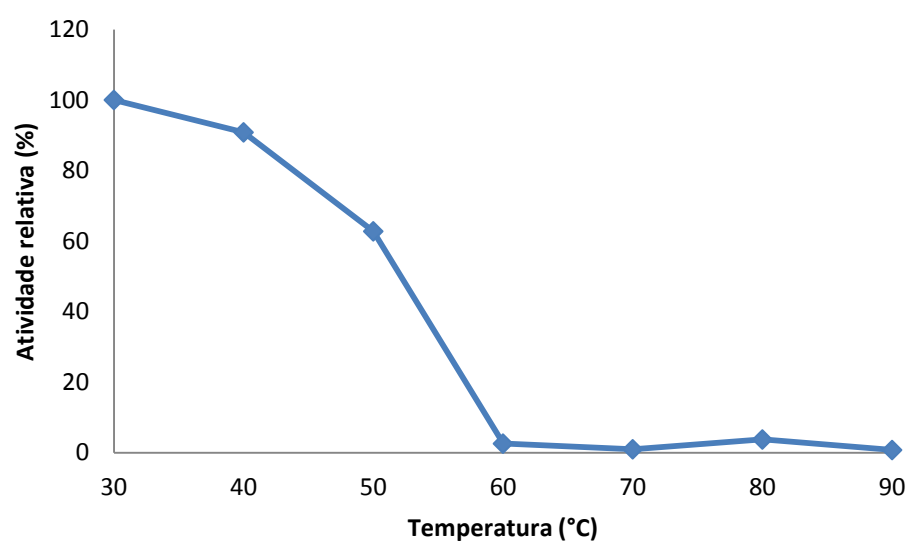


Figura 28 – Atividade quitinásica relativa detectada em alíquotas da fração F0/95 do meio de cultura livre de células do clone B de *P. pastoris* KM71H transformado com o plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736_{PS+}, incubadas por 30 minutos em temperaturas diferentes, variando de 30°C a 90°C.

7.6 Modelagem molecular *ab initio* de CV2736

A partir da sequência de aminoácidos (ANEXO C), a quitinase CV2736 foi modelada (*ab initio*), utilizando o programa *Phyre* 2.0. O programa gerou vários de modelos tridimensionais a partir de diferentes moldes. O molde que possuiu maior identidade com CV2736 (27%) foi uma proteína lítica de *Bacillus subtilis* relacionada à esporulação [*Cortical fragment-lytic enzyme* (CFLE)], já citada neste trabalho, sendo o modelo gerado a partir deste molde o utilizado no processo de modelagem (Figura 29).

O modelo gerado e escolhido para CV2736 mostra o formato do tipo barril TIM (triose fosfato isomerase), típico das proteínas da família GH18. As proteínas da família das Glicosil hidrolase 18 possuem em seu sítio ativo um motivo padrão do tipo [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-x-E, onde os resíduos pertencentes ao motivo [DN]-x-E são de extrema importância para a atividade catalítica, bem como os outros dois resíduos de aspartato ou asparagina [DN], em negrito, do motivo **[DN]**-G-[LIVMF]-**[DN]** são importante para a catálise por estabilizar o resíduo de asparagina do motivo [DN]-x-E (ARONSON et al, 2003).

Na molécula de CV2736, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo estão representados pela sequência ¹⁰³FSGINVDFE¹¹¹, iniciando no resíduo de aminoácido fenilalanina (Phe ¹⁰³) e terminando no glutamato (Glu ¹¹¹) (Figura 30). Observando esta região, nota-se que no resíduo 104 houve uma mutação de aspartato para serina, de acordo com o padrão para o sítio ativo. Esta mudança pode estar relacionada à baixa atividade quitinolítica da enzima, pois este resíduo serve como estabilizador da Asp ¹⁰⁷, que é importante para a atividade dos dois carboxilatos catalíticos: Asp ¹⁰⁹ e Glu ¹¹¹. Além disso, outra mudança encontrada foi no resíduo de aminoácido 107 de ácido aspártico (Asp) para asparagina (Asn), que é um resíduo pouco comum no sítio ativo das glicosil hidrolases da família 18.

O efeito destas mudanças observadas no sítio catalítico de CV2736 pode ser elucidado através de técnicas de mutagênese sítio – específica, onde se modificariam os aminoácidos para a combinação mais conservada entre as quitinases da família GH18, identificando se haverá um possível aumento na atividade quitinolítica da proteína recombinante. Suzukawa e colaboradores (2003) trabalharam com análise mutacional de uma glicosil hidrolase da família 18, identificando quais os resíduos do sítio catalíticos eram de fundamental importância para a atividade quitinolítica da proteína recombinante.

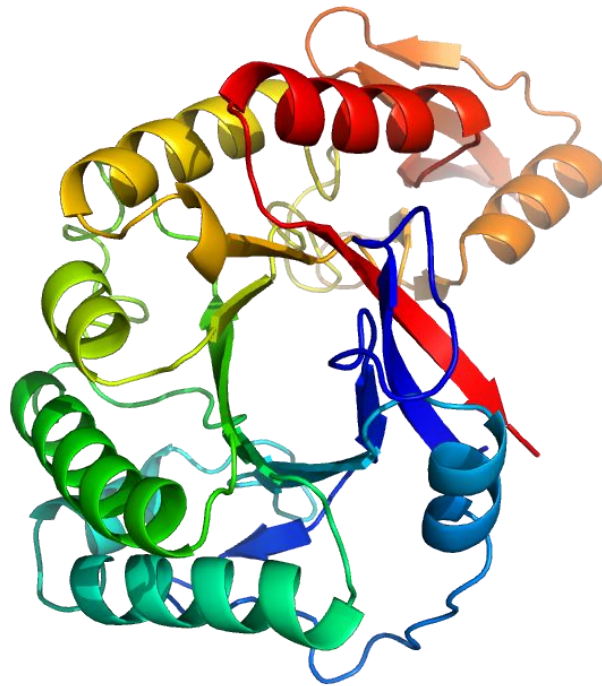


Figura 29 – Modelo gerado a partir da sequência de aminoácidos de CV2736, mostrando a estrutura em forma de barril TIM, característico das Glicosil hidrolase da família 18 (molde utilizado: PDB 3CZ8).

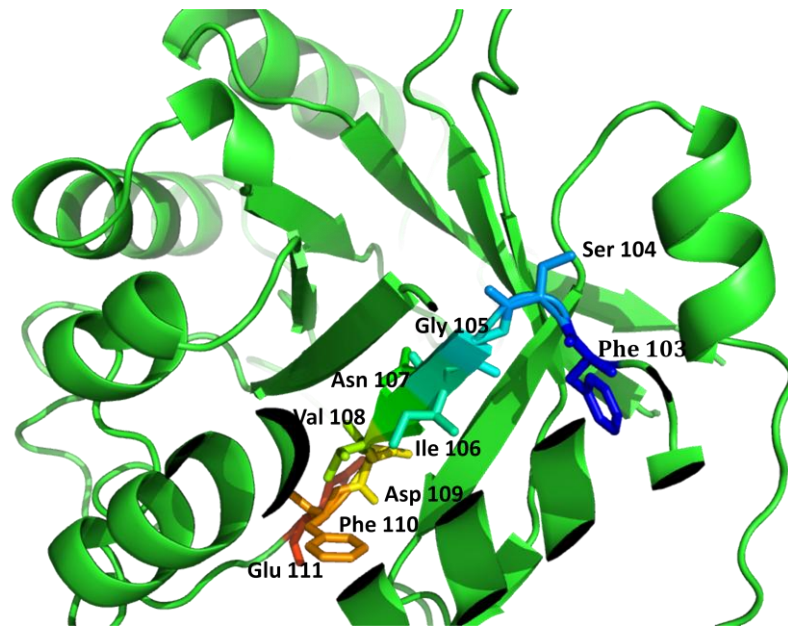


Figura 30 - Modelo gerado a partir da sequência de aminoácidos de CV2736, mostrando os aminoácidos do sítio ativo, onde se pode observar que existe uma troca no resíduo 104 de Aspartato para Serina. Isso pode explicar a baixa atividade quitinolítica da proteína.

7.7 Atividade antimicrobiana

Devido à similaridade da sequência de aminoácidos de CV2736 com uma proteína lítica de *Bacillus subtilis* relacionada à esporulação [*Cortical fragment-lytic enzyme* (CFLE)], ensaios de atividade biológica foram realizados a fim de se avaliar uma possível ação microbiostática/microbicida de rCV2736_{PS+} produzida em *P. pastoris*. Esse efeito poderia ser devido à uma ação lítica da proteína sobre os peptidioglicanos presentes na parede celular bacteriana, como já demonstrado para a proteína YaaH (SleL) de *B. anthracis* ((LAMBERT *et al.*, 2012).

Para isto, o efeito da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris*::pPICZαA::CV2736_{PS+} foi avaliado sobre o crescimento de seis espécies de bactérias, três Gram-Negativos (*Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*) e três Gram-Positivos (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), e uma espécie de levedura (*Candida albicans*).

Como resumido na Tabela 03, a fração contendo rCV2736_{PS+} causou redução do crescimento e/ou letalidade em quatro das espécies de bactérias testadas, a saber: *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*. Os valores da CIM variaram de 25 µg/mL para *S. aureus* a 100 µg/mL para *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. A CLM, por sua vez, variou de 50 µg/mL para *S. aureus* a 100 µg/mL para *P. aeruginosa* e *E. coli*. De todos os microrganismos que tiveram seu crescimento inibido, apenas para *S. choleraesuis* não foi possível determinar o valor da CLM neste experimento, sendo esta maior que 100 µg/mL (Figuras 31 a 38).

Assim, a fração contendo rCV2736_{PS+} exerceu um maior efeito antimicrobiano sobre *S. aureus* (CIM = 25 µg/mL e CLM = 50 µg/mL) (Figuras 31 e 32). Esta bactéria é comumente associada a diversas patologias e infecções hospitalares. Além disso, existem relatos na literatura de plasmídios que conferem resistência de *S. aureus* a várias drogas, tais como penicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, dentre outras (AZEVEDO, 2008). Portanto, os dados obtidos de CIM e CLM para esta cepa padrão frente ao extrato proteico contendo CV2736 são importantes por mostrarem que esta proteína é um possível potencial no tratamento de enfermidades ocasionadas por esta bactéria.

Das bactérias Gram-negativas testadas, os valores de CIM e CLM para *P. aeruginosa* foram os mesmos (100 µg/mL) (Figuras 33). Isto é bastante promissor quando se comparam com drogas nas quais a concentração letal é muito maior que a inibitória, sendo

este fator um empecilho, visto que muitas substâncias utilizadas em doses bactericidas muito elevadas podem ser tóxicas.

O efeito da fração contendo rCV2736_{PS+} também foi avaliado sobre a levedura *Candida albicans*, porém nenhuma inibição de crescimento foi observada (Figura 38). Isto pode ser explicado pela baixa atividade quitinásica da proteína recombinante presente em maior parcela no extrato, o que seria necessário para a degradação da parede celular deste fungo, a qual contém quitina (BISHOP, 1960).

Algumas GH18 não exibem atividade quitinolítica, mas apresentam outras atividades, tais como inibidores de xilanases (VASCONCELOS et al., 2011), lisozimas, lectinas, hevaminas e narboninas (DAVIES et al, 2012). Em alguns casos encontramos enzimas que possuem uma bifuncionalidade. Por exemplo, Ghasemi e colaboradores (2011) relataram uma quitinase/lisozima de *Bacillus pumilus*. Por possuir atividade quitinolítica, a mesma foi capaz de degradar a parede celular de alguns fungos. Do mesmo modo, foi capaz de degradar peptidioglicanos que compõem a parede celular de muitas bactérias, por meio de sua atividade de lisozima. Há também o relato de uma glicosil hidrolase da família 18 de *Hevea brasiliensis*, denominada de hevamina, que possui atividade quitinolítica e atividade lítica frente a peptidioglicanos da parede celular de bactérias. A Hevamina, apesar de não ser classificada como uma lisozima, é capaz de clivar peptidioglicanos (BOKMA et al., 1997). Já Vasconcelos e colaboradores (2011) produziram em *P. pastoris* uma GH18 que possuía baixa atividade quitinolítica, mas a mesma apresentou atividade como inibidor de xilanase e foi capaz de inibir a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos.

A possibilidade de novos ensaios avaliando o potencial da proteína em sua forma purificada e estudos com cepas multirresistentes são necessários para uma avaliação completa do potencial de rCV2736_{PS+} como um agente antimicrobiano.

Tabela 03 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris*::pPICZαA::CV2736_{PS+} sobre as cepas testadas

Cepa - padrão	F0/95 contendo rCV2736 _{PS+}		Controle positivo	
	CIM	CLM	CIM	CLM
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100	100	3,75	>3,75
<i>E. coli</i> ATCC 10536	50	100	7,5	7,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 4083	>100	>100	120	120
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	25	50	3,75	3,75
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	>100	>100	7,5	30
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	100	>100	7,5	30
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>100	>100	0,391	0,391

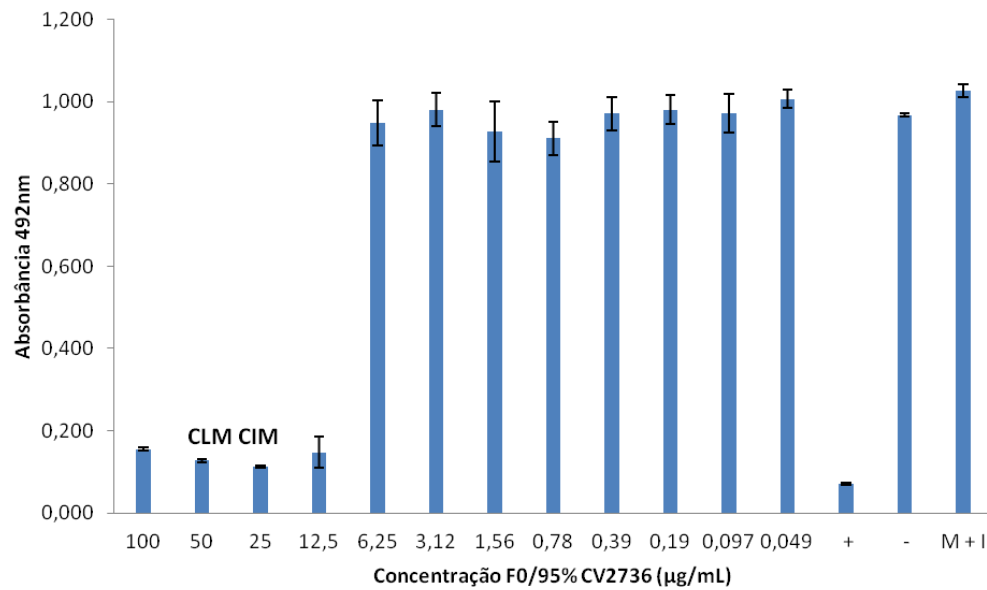


Figura 31 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Staphylococcus aureus*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2 mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.

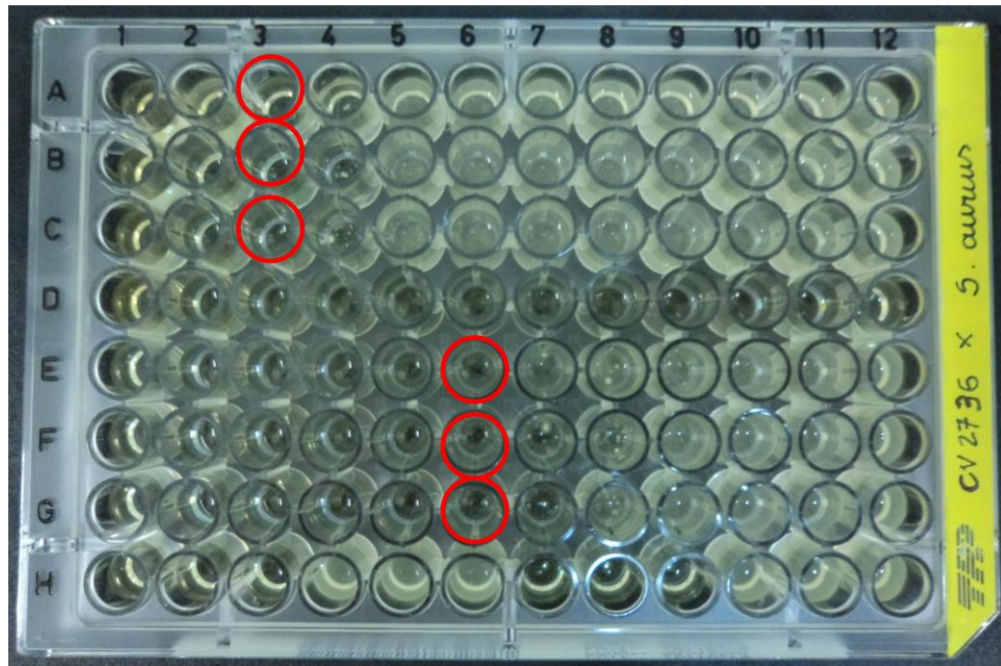


Figura 32 – Ensaio de microdiluição em caldo, mostrando a CIM detectada através da ausência de turvação visível para *Staphylococcus aureus*. Poços A, B e C, colunas 1 a 3: ausência de crescimento microbiano; colunas 4 a 12: crescimento microbiano; CIM: coluna 3 (25 µg/mL). Poços E, F e G (controle positivo – Amicacina; coluna 1 a 6: ausência de crescimento microbiano; colunas 7 a 12: crescimento microbiano; CIM: coluna 6 (3,75 µg/mL).

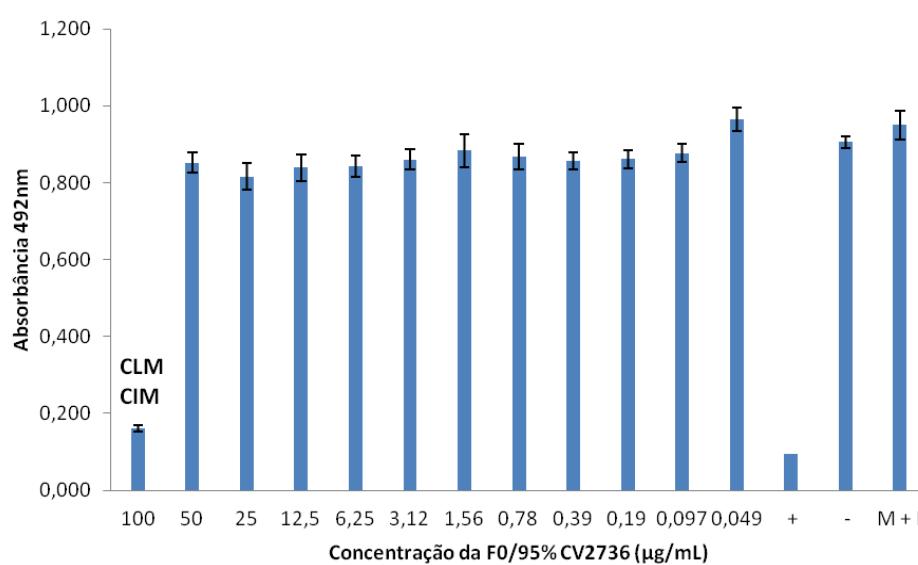


Figura 33 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Pseudomona aeruginosa*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.

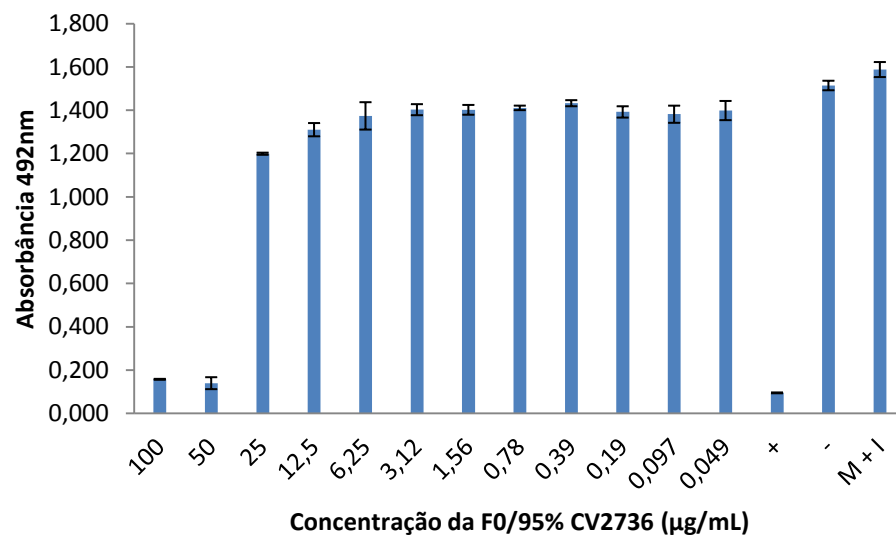


Figura 34 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Escherichia coli*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inóculo.

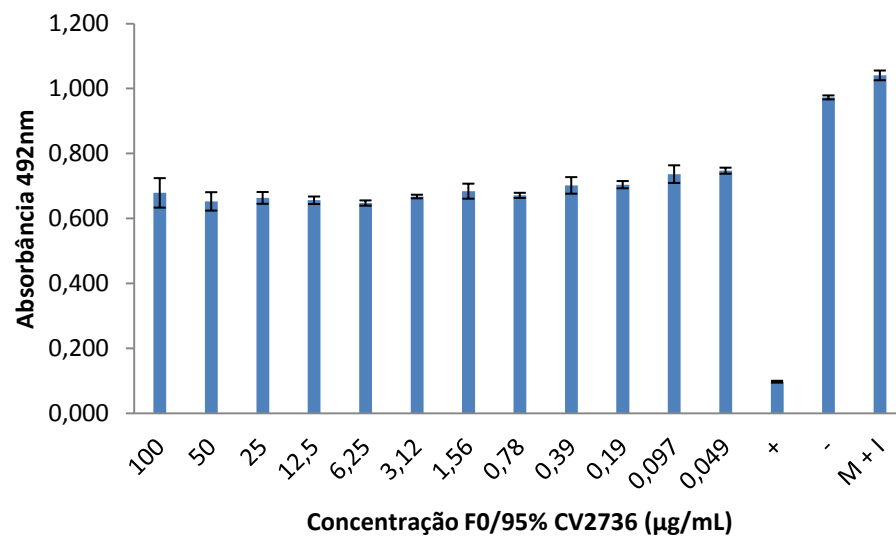


Figura 35 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Enterococcus faecalis*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.

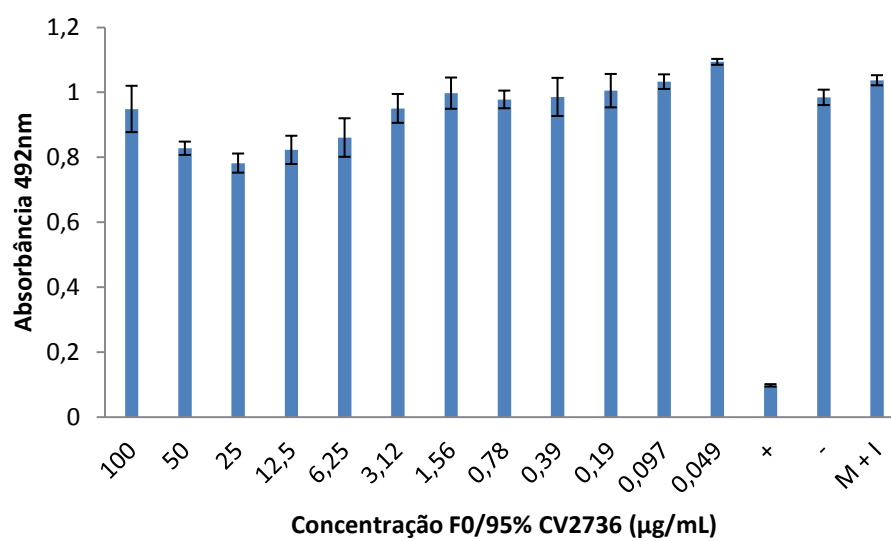


Figura 36 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Staphylococcus epidermidis*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.

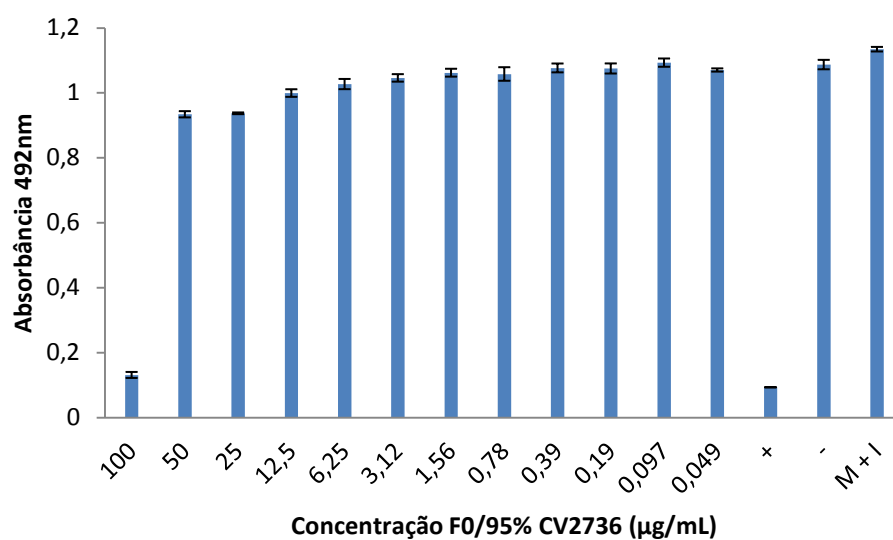


Figura 37 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Salmonella choleraesuis*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Amicacina 1,2mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.

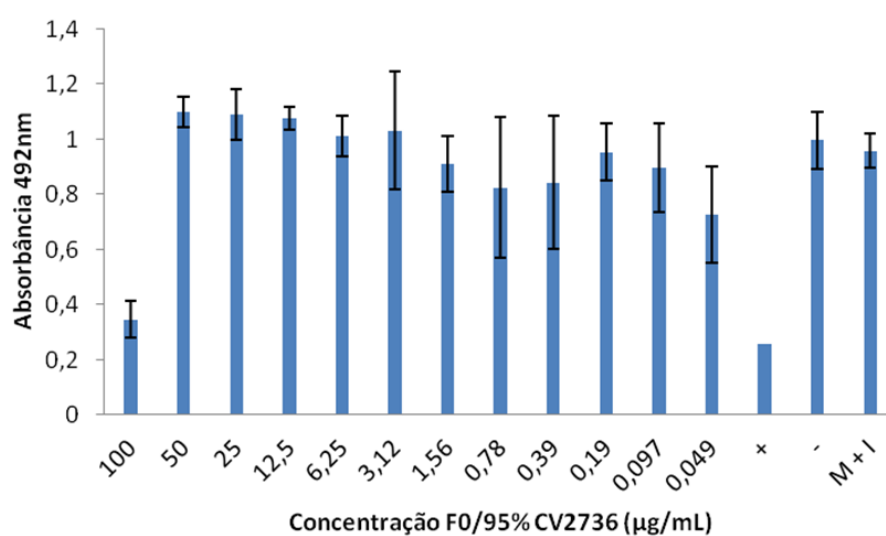


Figura 38 – Efeito sobre o crescimento microbiano com uso da fração F0/95 do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736 sobre *Candida albicans*. As leituras (A_{492}) foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias $\pm$ EPM de três repetições. (+): Cetoconazol 2,0mg/mL; (-): água estéril; (M + I): meio + inoculo.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho, uma proteína (CV2736) da família GH18 codificada no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, foi produzida em *P. pastoris* com sucesso, sendo secretada para o meio de cultura de forma solúvel e com atividade hidrolítica contra quitina coloidal e substratos sintéticos. Uma fração enriquecida com essa proteína exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivos e Gram-negativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B. B.; HEGGSET, E. B.; NORBERG, A. L. *et al.* Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1482-1517, 2010.

ARONSON, N. N.; HALLORAN, B. A.; ALEXYEV, M. F. *et al.* Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. **Biochemical Journal**, v. 376, n. Pt 1, p. 87-95, 2003.

AUGUST, P. R.; GROSSMAN, T. H.; MINOR, C. *et al.* Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 513-519, 2000.

AZEVEDO, J. L. de. **Genética de microrganismos**. 2 ed. Editora UFG, 536p. Goiânia, 2008.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. V.10, p. 411-421, 1999.

BARON, E. J., PETERSON, L. R. e FINEGOLD, S. M. **Methods for testing antimicrobial effectiveness**. St. Louis: Mosby, p. 168-188, 1994.

BEZERRA, Walderly Melgaço. **Expressão de uma proteína YD de *Chromobacterium violaceum* em sistemas heterólogos: potencial no controle de pragas e fungos**. 2008. 104 f. : Dissertação (mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2008.

BOKMA, E.; KONINGSVELD, G. A. VAN; JERONIMUS-STRATINGH, M.; BEINTEMA, J. J. Hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme. **FEBS Letters**, v. 411, n. 2-3, p. 161-163, 1997.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1,3 glucanase. In: GURR, S. J.; MCPHERSON, M. J.; BOWLES, D. J. **Molecular plant pathology: a practical approach**, Oxford University Press, New York, v.II, p. 23-30, 1992.

BOLLER, T. Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. In: KEY, J. L.; KOSUGE, T. **Cellular and molecular biology of plant stress**. New York: Alan R. Liss, 1985.

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

BRAKE, A. J.; MERRYWEATHER, J. P.; COIT, D. G. *et al.* Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 15, p. 4642, 1984.

BRAMELD, K. A.; GODDARD, W. A. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4276, 1998.

BISHOP, C. T.; BLANK, F.; GARDNER, P. E. THE CELL WALL POLYSACCHARIDES OF *CANDIDA ALBICANS*: GLUCAN, MANNAN, AND CHITIN. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 869-881, 1960.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329–332, 2002.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHEN, Y.; FUKUOKA, S.; MAKINO, S. A novel spore peptidoglycan hydrolase of *Bacillus cereus*: biochemical characterization and nucleotide sequence of the corresponding gene, *sleL*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 6, p. 1499–1506, 2000.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625-635, 2004.

CHOI, B.-K.; WARBURTON, S.; LIN, H. *et al.* Improvement of N-glycan site occupancy of therapeutic glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 671-682, 2012.

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.; TIWARI, R. P.; SINGH HOONDAL, G. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 14–25, 2005.

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

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005.

DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. 2002. <http://www.pymol.org>.

DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; FERREIRA, C. V. *et al.* Violacein: properties and biological activities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 127, 2007.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical reviews in microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001.

DURÁN, M.; PONEZI, A.; FALJONI-ALARIO, A. *et al.* Potential applications of violacein: a microbial pigment. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 7, p. 1524-1532, 2012.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345-360, 2006.

FAN, Y.; GUO, SHUJUN; PEI, X. *et al.* Effects of chitin binding domain on enzymatic properties and insecticidal activity of Bombyx mori chitinase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 1551-1558, 2010.

FAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, X. *et al.* Expression of a Beauveria bassiana chitinase (Bbchit1) in Escherichia coli and Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 1, p. 93-99, 2007.

FILHO, B. P. D.; LEMOS, F. J. A.; SECUNDINO, N. F. C. *et al.* Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the Aedes aegypti: a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1723-1729, 2002.

FUNKHOUSER, J.; ARONSON, N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 96, 2007.

GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; SADEGHI, M. *et al.* First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by Bacillus pumilus SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 225-231, 2011.

GOLDMAN, D. L.; VICENCIO, A. G. The Chitin Connection. **mBio**, v. 3, n. 2, 2, 2012.

GOODRICK, J. C.; XU, M.; FINNEGAN, R. *et al.* 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.

GUISEZ, Y.; TISON, B.; VANDEKERCKHOVE, J. *et al.* Production and purification of recombinant human interleukin-6 secreted by the yeast Saccharomyces cerevisiae. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 1, p. 217–222, 1991.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.** In preparation, 2004.

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

HENRISSAT, B. Classification of chitinases modules. **Exs**, v. 87, p. 137-156, 1999.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. 3, p. 781, 1993.

HUANG, Q. S.; XIE, X. L.; LIANG, G. *et al.* The GH18 family of chitinases: Their domain architectures, functions and evolutions. **Glycobiology**, v. 22, n. 1, p. 23–34, 2012.

ITOI, S.; KANOMATA, Y.; UCHIDA, S. *et al.* Effect of the C-terminal domain of *Vibrio proteolyticus* chitinase A on the chitinolytic activity in association with pH changes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 441-446, 2012.

KAPITANY, R. A.; ZEBROWSKI, E. J. A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 361-369, 1973.

KASPRZEWSKA, A.; OTHERS. Plant chitinases-regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, n. 3, p. 809–824, 2003.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 363-371, 2009.

KODAMA, T.; TAKAMATSU, H.; ASAI, K. *et al.* Synthesis and characterization of the spore proteins of *Bacillus subtilis* YdhD, YkuD, and YkvP, which carry a motif conserved among cell wall binding proteins. **Journal of biochemistry**, v. 128, n. 4, p. 655–663, 2000.

KOPPARAPU, N. K.; LIU, Z.; YAN, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, S. A novel thermostable chitinase (PJC) from pomegranate (*Punica granatum*) juice. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1569-1575, 2011.

KOPPARAPU, N. K.; LIU, Z.; FEI, F.; YAN, Q.; JIANG, Z. Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1370-1374, 2011a.

KUO, C. J.; LIAO, 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, p. 11507-11514, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.22, p. 680-685, 1970.

LANDIM, Patricia Gadelha de Castro,. **Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica**, 2011. 164 f. : Tese (doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

LEE, J.; KIM, J. S.; NAHM, C. H. *et al.* Two Cases of *Chromobacterium violaceum* Infection after Injury in a Subtropical Region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 2068-2070, 1999.

LEE, S. G.; KOH, H. Y.; HAN, S. J. *et al.* Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. **Protein expression and purification**, v. 71, n. 1, p. 108–114, 2010.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D302-D305, 2011.

LI, H. & GREENE, L. H. Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. **PLoS ONE** v. 5, nº 1, 2010.

LOBO, M.D.P. **Caracterização bioquímica, biológica e estrutural de uma quitinase recombinante de *Chromobacterium violaceum***. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 156p. Fortaleza, Ceará, 2012.

LIU, Z. H.; YANG, C. P.; QI, X. T.; XIU, L. L.; WANG, Y. C. Cloning, Heterologous Expression, and Functional Characterization of a Chitinase Gene, Lbchi32, from *Limonium bicolor*. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 7-8, p. 669-679, 2010.

LIU, Z. H.; YANG, C. P.; QI, X. T.; XIU, L. L.; WANG, Y. C. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of a chitinase gene, Lbchi32, from *Limonium bicolor*. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 7-8, p. 669-679, 2010.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B. *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database issue, p. D225-229, 2011.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 16, n. 4, p. 404-405, 2000.

MILES, A.A.; MIRSA, S.S. **The estimation of the bacterial power of the blood**. Journal of hygiene. Cambridge, v.38, p 732-749, 1938.

MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 648-656, 1977.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. DE. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Bioteecnolog Cienc Desenvolv**, v. 29, p. 20–22, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility testes for Bacteria that Grow Aerobically**. 6° ed. Approved Standard: M7-A6. CLSI, 2003

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

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. VON; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-786, 2011.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, n. 0, p. 91-105, 2012.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D290-D301, 2011.

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

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

SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, PEER; PONTING, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 5857-5864, 1998.

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

SINGH, A.; ISAAC KIRUBAKARAN, S.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 1, p. 100-109, 2007.

SMITH, T. J.; BLACKMAN, S. A.; FOSTER, S. J. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. **Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 249–262, 2000.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SUZUKAWA, K.; YAMAGAMI, T.; OHNUMA, T. *et al.* Mutational analysis of amino acid residues involved in catalytic activity of a family 18 chitinase from tulip bulbs. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 341-346, 2003.

TEIXEIRA, C. S. **Expressão de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris*: purificação e caracterização parcial da proteína recombinante**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 110p. Fortaleza, Ceará, 2011.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. DE. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotechnolog Cienc Desenvolv**, v. 29, p. 20–22, 2002.

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

UDAYA PRAKASH, N. A.; JAYANTHI, M.; SABARINATHAN, R. *et al.* 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.

URSING, B. M.; ENCKEVORT, F. H. J. VAN; LEUNISSEN, J. A. M.; SIEZEN, R. J. EXProt: a database for proteins with an experimentally verified function. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 50-51, 2002.

VASCONCELOS, A. T. R. DE; ALMEIDA, D. F. DE; HUNGRIA, M. *et al.* The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 11660–11665, 2003.

VASCONCELOS, E. A. R.; SANTANA, C. G.; GODOY, C. V. *et al.* A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 14, 2011.

VELUTHAKKAL, R.; SUNDARI, B. K. R.; DASGUPTA, M. G. Tree chitinases – stress- and developmental-driven gene regulation. **Forest Pathology**, p. no–no, 2012.

VOLLMER, W.; JORIS, B.; CHARLIER, P.; FOSTER, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 259–286, 2008.

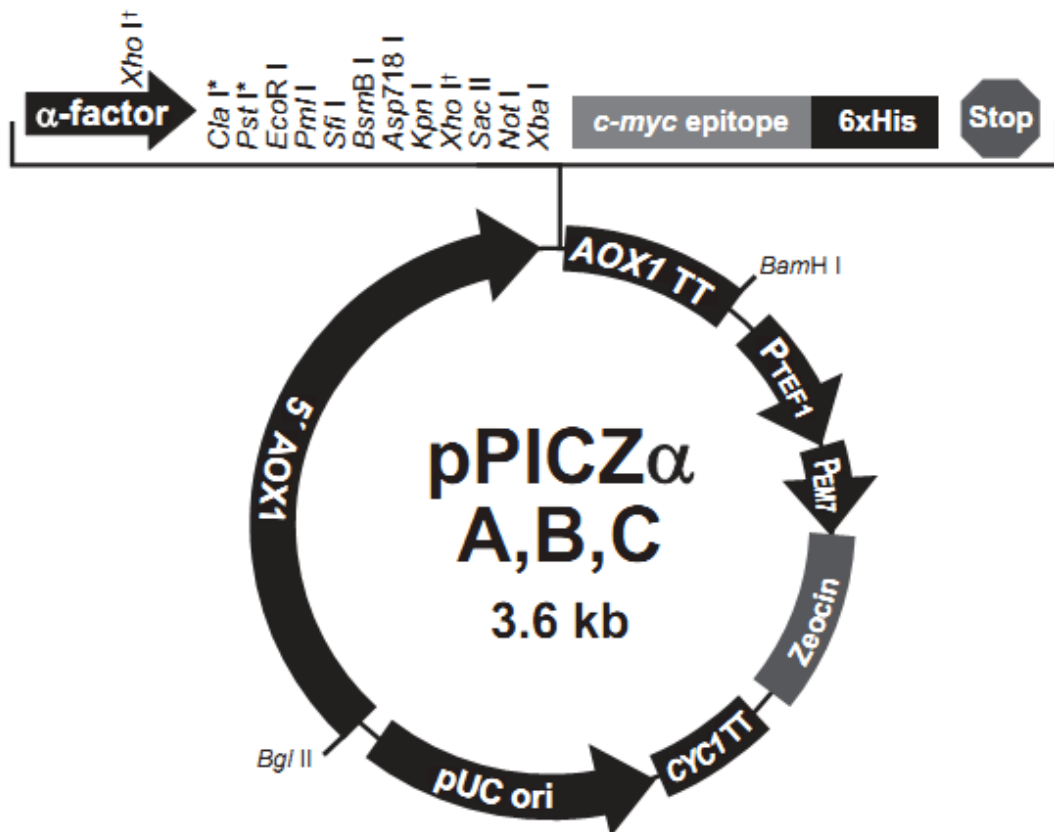
WANG, Y.-J.; YANG, Q. Cloning and Expression of a Novel Chitinase chi58 from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. **Biochemical Genetics**, v. 47, n. 7-8, p. 547-558, 9 jun 2009.

WILDT, S.; GERNGROSS, T. U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 119–128, 2005.

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

ANEXOS

ANEXO A – Mapa de restrição do plasmídeo de clonagem e expressão pPICZ α A, mostrando o sito múltiplo de clonagem



ANEXO B – Sequencia de nucleotídeos da ORF CV2736 que codifica para uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* (em destaque a sequencia de 22 nucleotídeos iniciais retirados para construção da ORF sem o peptídio sinal)

CTAGCGCTGCGCCAGGCCCTGTTTCACCGCCGCCCAGAACGCGTCATCCTCCATC
CCCAGCGCGTACAAGGATGTGCCGCCAGGCCGTAGGCGTTCACCAGGCTGGCCT
TCAGCGCCACGCTGCGCGCGTTTTTCGGTCCACACCGTGTGGCGGCTGCCATCGGC
CGCGCCGTAGTTGAAAGTCAGGGAATGGGTGCCGGCGTCGTAGCGCGGCTGCGC
GCCGTAGCGGGCGATCAAGGCCTGCGTATCCTTCCAGTACAGCATGCCGCCGTCTG
CCAGGCCGCTTCCAATCGTAGCCGTAGGCTGGAATGCCGTTCAGTATCTTGGCCG
CCGGCACCCGCTCCACCGCATAGTCCAGGTCATCCTCCATCCAGTCCGAGCCGGC
CACCGGCCCCGGATCCCAGGCCGGAATCGCCTCGTCGTAGCTCATGATCTGCAGG
TAGTCGGCCGCCGCGCCCAAGGCGCGCAGATCGTAGCCGTAATTGGCCGGATGGT
TTTCGTCTTTGGCGGAAAAGGCCGGCACGCTGACGATCAGCTTCAGGCCCTTGGC
GTGCAATGCCCCGGCCCAGAACCTGGATGAAGTGGCTGAAGTTGTTGCGGTCGCCC
TGCGCCACCGCCTCGAAATCCACGTTGATGCCGGAGAAGCGCTTGTCCTGGGCGA
ACTTCACCAGGTTGGCCACCGCCTGGCTCTGCGCCGAGGTCGATACCGCGTGGGC
GATGTGCGGCGCTCCAATTGCCGTTGCCGTCGACATTCGACACGCAGCCGTAGGCG
GGAATCTTCCTGCCGAGCAGGAAAGAGATGGCGTCGTTTCGGCGCCGGATCGCCGT
TGCCCGTCACCGCGCCCTGGGCGGTGATGTTGTAAAAGTCGACAGCGACGGCATT
GAAGCTGGCGGCGTACCGGGTCAGCGCGGCGTAATTGCCGGCATAGCCGGAATA
ATAAGCCAGAACCAT

ANEXO C – Sequencia de aminoácidos da quitinase CV2736 de *Chromobacterium violaceum*, evidenciando os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico

MVLAYYSYGYAGNYAALTRYAASFNAVAVDFYNITAQGAVTGNGDPAPNDAISFLLG
RKIPAYGCVSNVDGNGNWSADIAHAVSTSAQSQAVANLVKFAQDKRFSGINVDFEA
VAQGDRNNFSHFQVLGRALHAKGLKLIVSVPAFSAKDENHPANYGYDLRALGAAA
DYLQIMSYDEAIPAWDPGPVAGSDWMEDDLDYAVERVPAAKILNGIPAYGYDWKRP
GDGGMLYWKDTQALIARYGAQPRYDAGTHSLTFNYGAADGSRHTVWTENARSVAL
KASLVNAYGLGGTSLYALGMEDDAFWAAVKQGLAQR

ANEXO D – Peptídeos da proteína rCV2736_{PS+} de *Chromobacterium violaceum* identificados por Espectrometria de massa a partir da fração 0/95% de *P.pastoris* KM71H::pPICZαA::CV2736

Nº	Precursor MH+ (Da)	z	Peptide MH+ (Da)	MH+ Error (Da)	Sequence	Modifications
1	2990,4631	2,74	2990,4604	0,0028	(K)ASLVNAYGLGGT SLYALGMEDDAFWA AVK(Q)	
2	1131,6783	1,93	1131,6772	0,0012	(K)LIVSVPAFSAK(D)	
3	1563,6927	2,33	1563,6823	0,0105	(K)DENHPANYGYDL R(A)	
4	887,4933	1,69	887,4945	-0,0012	(K)DTQALIAR(Y)	
5	1509,7712	1,96	1509,7736	-0,0024	(K)ILNGIPAYGYDWK (R)	
6	1431,7511	2,43	1431,7491	0,0019	(R)NNFSHFIQVLGR(A)	
7	2002,8965	2,6	2002,8890	0,0075	(R)YDAGTHSLTFNY GAADGSR(H)	
8	1113,5452	2	1113,5436	0,0016	(R)HTVWTENAR(S)	
9	1279,6292	2,1	1279,6252	0,004	(K)RPGDGGMLYWK(D)	
10	2676,3257	3,56	2676,3416	-0,0158	(K)LIVSVPAFSAKDE NHPANYGYDLR(A)	
11	3006,4612	2,78	3006,4553	0,0058	(K)ASLVNAYGLGGT SLYALGMEDDAFWA AVK(Q)	Oxidation M (19)
12	3999,9495	3,65	3999,9620	-0,0123	(R)KIPAYGCVSNVDG NGNWSADIAHAVST SAQSQAVANLVK(F)	Carbamidomethyl C (7)
13	1724,8257	1,98	1724,8239	0,0019	(R)FSGINVDFEAVAQ GDR(N)	
14	3987,9785	3	3987,9512	0,0272	(R)YAASFNAVAVDF YNITAQGAVTGNGD PAPNDAISFLLGR(K)	
15	3871,8723	3,25	3871,8667	0,0056	(K)IPAYGCVSNVDGN GNWSADIAHAVSTS AQSQAVANLVK(F)	Carbamidomethyl C (6)
16	1295,6259	2,18	1295,6201	0,0058	(K)RPGDGGMLYWK(D)	Oxidation M (7)
17	672,3548	1	672,3787	-0,0239	(K)QGLAQR(-)	
18	4603,0273	3,37	4603,0590	-0,0319	(R)ALGAAADYLQIM SYDEAIPAWDPGPVA GSDWMEDDLDYAVE R(V)	Oxidation M (32)
19	1414,7230	3	1414,7227	4,00E-04	(R)NNFSHFIQVLGR(A)	

20	1203,6647	2	1203,6633	0,0014	(N)FSHFIQVLGR(A)	
21	444,2971	1	444,2929	0,0042	(Q)VLGR(A)	
22	413,2785	1	413,2758	0,0027	(K)LIVS(V)	
23	512,3492	1	512,3443	0,0049	(K)LIVSV(P)	
24	1018,5887	2	1018,5932	-0,0045	(L)IVSVPAFSAK(D)	
25	905,5146	1,21	905,5091	0,0055	(I)VSVPAFSAK(D)	
26	620,3456	1	620,3402	0,0054	(V)PAFSAK(D)	
27	941,3771	2	941,3748	0,0023	(K)DENHPANY(G)	
28	998,4014	1,89	998,3962	0,0052	(K)DENHPANYG(Y)	
29	1546,6663	3	1546,6556	0,0105	(K)DENHPANYGYDL R(A)	
30	511,3295	1	511,3239	0,0056	(K)ILNGI(P)	
31	999,4685	1	999,4571	0,0114	(I)PAYGYDWK(R)	
32	483,2369	1	483,2310	0,0059	(K)RPGDG(G)	
33	540,2560	1	540,2525	0,0035	(K)RPGDGG(M)	
34	740,3823	2	740,3800	0,0023	(G)MLYWK(D)	
35	756,3772	1	756,3749	0,0023	(G)MLYWK(D)	Oxidation M (1)
36	529,2673	1	529,2617	0,0056	(K)DTQAL(I)	
37	1985,8695	3	1985,8624	0,0071	(R)YDAGTHSLTFNY GAADGSR(H)	
38	1095,5333	2,16	1095,5330	3,00E- 04	(R)HTVWTENAR(S)	
39	1087,5370	2	1087,5320	0,005	(R)NNFSHFIQV(L)	

ANEXO E – Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos**1. 2xYT:**

triptona 1,6%
extrato de levedura 1%
NaCl 0,5%
pH 7,0

2. GYT:

glicerol 10%
extrato de levedura 0,125%
triptona 0,25%
pH 7,0

3. SOC:

triptona 2%
extrato de levedura 0,5%
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
MgCl₂ 10 mM
glucose 20 mM
pH 7,0

4. LB *low salt* ágar:

triptona 1%
NaCl 0,5%
extrato de levedura 0,5%
ágar 2%
pH 7,0

5. YPD:

extrato de levedura 1%
peptona 2%
glucose 2%

6. YPDS-ágar:

extrato de levedura 1%
peptona 2%
sorbitol 18,2%
glucose 2%
ágar 2%

7. BMGY:

extrato de levedura 1%

peptona 2%

YNB 1,34%

glicerol 1%

biotina 0,00004%

8. BMMY:

extrato de levedura 1%

peptona 2%

YNB 1,34%

metanol 0,5%

biotina 0,00004%

ANEXO F - Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F'

Células eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o protocolo fornecido pelo prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro – UNESP/Jaboticabal. Uma colônia de *E. coli* TOP10F' foi inoculada em 10 mL de meio 2xYT contendo estreptomicina 30 µg/mL e incubada à 37°C por 16 h sob agitação orbital constante de 180 rpm. Da cultura obtida, uma alíquota de 5 mL foi inoculada em 500 mL de meio 2xYT estéril, e novamente incubada nas condições anteriormente descritas, até que a densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) da mesma atingisse um valor entre 0,4 - 0,6. A cultura foi mantida em banho de gelo por 30 min e posteriormente centrifugada a 3.200 *g*, 4°C, por 15 min em uma centrífuga de bancada Eppendorf 5810R. As células foram lavadas duas vezes com glicerol 10% gelado e estéril e então ressuspensas em meio GYT. Alíquotas de 50 µL foram distribuídas em microtubos estéreis que foram armazenados a -80°C para uso posterior.

ANEXO G - Preparação de células eletrocompetentes de *Pichia pastoris* para transformação

Uma alíquota de uma cultura-estoque de *Pichia pastoris* KM71H, mantida a -80°C , foi inoculada em meio YPD ágar e incubada a 30°C por 4-5 dias. Uma colônia isolada foi então selecionada e inoculada em 5 mL de meio YPD e a mesma incubada a 30°C com agitação orbital (180 rpm) por 18 h. Uma alíquota (0,5 mL) da cultura obtida foi transferida para 50 mL de meio YPD fresco, e incubada a 30°C , 200 rpm, até que uma DO_{600} de 1,3 – 1,5 fosse atingida. Nesse instante, a cultura foi centrifugada a $2.000 \times g$, por 5 min, a 4°C , o meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 12 mL de meio YPD com HEPES (10 mL de YPD, 2 mL de tampão HEPES 1 M, pH 8,0, DTT 0,02 M). As células foram lavadas duas vezes com água milliQ estéril e uma vez com sorbitol 1 M gelado. As células foram coletadas por centrifugação ($2.000 \times g$, por 5 min, a 4°C) e o pélite ressuspensado em 1 mL de sorbitol 1 M gelado. Alíquotas de 80 μL dessa suspensão foram armazenadas a -80°C para uso posterior.