

Clonagem e expressão heteróloga de terpeno sintases de citros

Álvaro Missiato¹, Marco A. Takita²

Nº 0900001

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas UNIARARAS, Araras-SP,
✉alvaromissiato@gmail.com
2. Orientador: Pesquisador, Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP

RESUMO

Terpenos constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais. Estes são formados a partir isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), o qual é resultante da isomerização de IPP, produzido por duas vias independentes em plantas. A busca por seqüências relacionadas à síntese de terpenos no CitEST, maior banco de dados de seqüências de DNA de citros do mundo, montado pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira - IAC, mostrou a presença de todos os componentes das vias de síntese de isopentenildi-fosfato em citros bem como de genes que codificam terpeno sintases. O presente trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão de genes de terpeno sintases visando estudos funcionais posteriores.

Para tanto, foram selecionados genes que codificam terpeno sintases dentro do CitEST. Esta seleção baseou-se em análises previamente realizadas com ferramentas de bioinformática como Cap3 e Blast. Quatro clones específicos que provavelmente continham a seqüência do gene desejado foi obtido do estoque de clones do Centro APTA Citros Sylvio Moreira e utilizado para amplificação através de PCR e clonagem em pJET1.2. Fez-se então o seqüenciamento de clones o qual revelou que não havia discrepância entre os clones e a seqüência da montagem. Quatro destes clones foram selecionado e digeridos com *NdeI* e *BamHI*, sendo clonados em pET3a, pET11a e pET28a abertos com as mesmas enzimas.

Clones dos genes obtidos foram usados para indução de proteína com as estirpes de *Escherichiacoli* BL21 e Rosetta para a produção de proteína. Análises de expressão de proteínas em transformantes de BL21 foi feita para um dos genes mas não foi observada indução.

ABSTRACT

Terpenes are the largest and most diverse class of natural products. These are formed from isopentenylidiphosphate (IPP) and dimethylallyldiphosphate (DMAPP), which comes from the isomerization of IPP, produced by two independent pathways in plants. The search for sequences related to the synthesis of terpenes in CitEST, the largest database of DNA sequences of citrus in the world, assembled by the Centro APTA Citrus SylvioMoreira - IAC, showed the presence of all components of the pathways for synthesis of isopentenylidiphosphate in citrus as well as genes encoding terpenesynthases. This work aimed the cloning and expression of genes encoding terpenesynthases for subsequent functional studies. Thus, we selected genes encoding terpenesynthases within CitEST. This selection was based on analysis previously performed with bioinformatic tools such as Blast and Cap3. Four specific clones that probably contained the desired gene sequences were obtained from the stock clones of Center APTA Citrus SylvioMoreira and used for amplification by PCR and cloning in pJET1.2. The sequencing of the clones was performed in which we verified no discrepancy between the clones and the assembled sequences. These clones were selected and digested with NdeI and BamHI, and cloned into pET3a, pET11a and pET28a opened with the same enzymes. Clones of the genes were used for induction of protein with the strains of Escherichia coli BL21 for the production of protein. Unfortunately, analysis of protein expression for one of the proteins showed no induction so far.

INTRODUÇÃO

Terpenos constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais. Os terpenos são classificados pelo número de carbonos que eles contém. Assim, a unidade básica contém cinco carbonos e é chamada isopreno. Os menores terpenos que existem apresentam um único isopreno e são denominados hemiterpenos. Isoprenóides que contém duas unidades de isopreno são chamados de monoterpenos. Os sesquiterpenos são os terpenóides que derivam de três unidades de isopreno e, portanto, contém quinze carbonos. O grupo dos diterpenos contém 20 carbonos e incluem fitol, os hormônios giberélicos, ácidos resínicos de coníferas e leguminosas, fitoalexinas e metabólitos farmacologicamente importantes como taxol e forskolina. Os triterpenos apresentam 30 átomos de carbono e incluem os brassinosteróides. Os terpenos que contém oito unidades de isopreno são chamados tetraterpenos, sendo o

principal deles os carotenóides. Terpenos que apresentam mais de oito unidades de isopreno são denominados politerpenos, onde se encontram polímeros longos como a borracha encontrada no látex.

Citros apresentam importantes óleos essenciais, composto principalmente pelo monoterpenolimoneno, o qual é aproximadamente 90% de todo óleo essencial do fruto de citros (Weiss, 1997). Os sesquiterpenosvalenceno e β -sinensal também apresentam importante função no aroma e sabor de laranja (Maccarone e col., 1998; Vora e col., 1983; Weiss; 1997). O primeiro trabalho mostrando a clonagem de um cDNA que codifica uma terpeno sintase em Rutaceas foi publicado apenas em 2001 (Maruyama e col., 2001). Neste trabalho, foi feita a clonagem de um cDNA de *Citrusjunos* que codifica a enzima (*E*)-b-farnesenosintase. (Lücker e col. 2002) isolaram quatro cDNAs que codificam monoterpenosintases, os quais são responsáveis por 90% do total da composição do óleo essencial de limão. Apenas um outro gene, *Cstps1*, que codifica uma sesquiterpenosíntase foi clonado em citros (Sharon-Asa e col. 2003), o qual é responsável pela síntese de valenceno.

A busca por seqüências relacionados à síntese de terpenos no CitEST - Programa Institutos do Milênio) mostrou a presença de todos os componentes das vias de síntese de IPP e DMAPP em citros (Takita e col., 2007). Além destes, foram identificados genes que codificam terpeno sintases (Dornelas e Mazzafera, 2007).

Uma vez que poucos trabalhos mostram a caracterização dos produtos gerados pelas terpeno sintases de citros, justifica-se um projeto visando o conhecimento de produtos gerados pela atividade das terpeno sintases, conseqüentemente, o conhecimento dos processos que levam à composição dos óleos essenciais de citros. Diante disto, a clonagem de terpeno sintases e sua caracterização é de extrema importância visando o melhoramento de citros.

MATERIAL E MÉTODOS.

Linhagens bacterianas e vetores.

Para este trabalho serão utilizadas duas diferentes linhagens bacterianas, DH5a e BL21(DE3).

Os vetores foram pET3a, pET11a, ou pET28a.

Amplificação das terpeno sintases

Para isolamento destes genes do vetor pSport1, foram desenhados primers específicos. Estes primers foram utilizados para amplificação dos genes em reações de polimerização em cadeia, PCR, utilizando-se as seguintes condições: 1x tampão,

0,2mM de cada dNTP, 1ng de plasmídeo, 250ng de cada primer, 5U de *Taq* DNA polimerase em um volume total de 50μL. As condições de ciclização foram: um passo inicial de 45 seg. a 95°C, 25 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 50°C, 3 minutos a 72°C, e um passo final de incubação a 72°C por 10 min. Os amplicons foram verificados em gel de agarose 0.7%.

Purificação dos Amplicons

As reações positivas foram utilizadas posteriormente para clonagem dos genes nos vetores de expressão. Inicialmente foi feita a purificação dos fragmentos utilizando-se o kit GeneClean (Bio101).

Clonagens

Os fragmentos purificados contendo os genes de terpeno sintases foram clonados em pJET1.2 (Fermentas). Clones foram seqüenciados para verificação de alteração na seqüência. Um clone para cada gene foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI no caso dos genes 108800, 107203 e 100950, ou *Nde*I e *Bgl*II no caso do gene 108028. Os vetores pET3a e pET11a foram clivados com *Nde*I e *Bam*HI, do mesmo modo que os fragmentos.

Para a ligação dos fragmentos ao vetor, foram montadas reações de ligação adicionando-se 200ng de vetor e 500ng de inserto (região codificadora das terpeno sintases), 3U de T4 DNA ligase em 15mL de tampão de ligação 1x. As reações foram incubadas por 16 horas a 16°C.

Células competentes das linhagens bacterianas DH5α foram transformadas com 5μL das ligações. As células foram espalhadas em placas contendo ampicilina (100μg/mL) no caso de pET3a e pET11a e kanamicina (30 μg/mL) no caso de pET28a. As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C.

Os transformantes obtidos foram utilizados para verificação de clonagem por PCR, como acima colocado e posterior minipreparação de plasmídeos. Estes foram transferidos para a linhagem BL21(DE3) de *E. coli*. Os transformantes foram utilizados para indução de síntese protéica.

Indução da expressão de proteína

Para produção de proteína, 1mL de meio LB foi inoculada uma colônia bacteriana, contendo ampicilina ou kanamicina, crescendo-se a 37°C com agitação (250 rpm) por 16 horas. Na manhã seguinte, 50μL da cultura foram inoculados em 1mL de meio LB, incubando-se os tubos nas mesmas condições por 2 horas. Neste momento, 100mL

da suspensão foram alíquotadas e armazenadas no gelo, para controle da indução. Ao restante da cultura foi adicionado 1mM de IPTG, incubando-se a cultura por mais duas horas. Os tubos foram mantidos em gelo, de onde foram retirados 20µL de células (induzidas ou não) aos quais foram adicionados outros 20µL de tampão de amostra (100mM Tris-HCl pH 6,5, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS descontínuo. Os géis foram corados com uma solução de comassiebrilliantblue R-250 (2,5g em 400mL Metanol, 100mL ácido acético glacial e água para 1 litro) e descoloridos com uma solução de metanol:ácido acético (300mL:400mL para 4 litros).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram resgatados do banco de clones 4 clones que continham a sequência de terpeno sintases. Estes plasmídeos foram utilizados para amplificação da região codificante, obtendo-se sucesso para os quatro diferentes genes. Estes amplicons foram isolados do gel de agarose e clonados em pJet1.2. Foram obtidos em média, 30 transformantes. Destes foram avaliados 8 transformantes através de PCR de colônia e/ou PCR de plasmídeos isolados por miniprep. Também foram avaliados por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI/BglII*. Sequências foram obtidas para 12 plasmídeos no total, sendo 3 de cada gene. Este seqüenciamento não mostrou nenhuma variação quando comparado com o gene original, cuja seqüência estava no depositada no banco de dados. Um plasmídeo contendo cada um dos genes foi utilizado para digestão com estas mesmas enzimas, isolando-se o fragmento contendo a região codificante em gel de agarose. Estes fragmentos foram utilizados para ligação em pET3a, pET11a e pET28a. Para nenhum dos genes foi obtida a clonagem em pET28a. Para o gene 100950 foram obtidos mais de 100 transformantes tanto para pET3a quanto para pET11a. Destes, foram avaliados 10 de cada vetor por PCR de colônia, identificando-se a clonagem em todos os transformantes. Para 107203, um pouco menos transformantes foram obtidos, por volta de 40, avaliando-se praticamente o mesmo número de clones com igual eficiência de transformação. Para os genes 108028 e 108800 não foram obtidos transformantes para nenhum dos outros dois vetores. Novas ligações estão sendo feitas.

A expressão de proteínas foi feita com o gene 107203 porém não se obteve indução significativa na expressão.

CONCLUSÃO

Foram clonados em vetor de expressão duas terpeno sintases de citros. A indução de sua síntese em bactéria não resultou em expressão significativa de proteína. Isto não é de todo inesperado uma vez que bactérias não expressam proteínas de plantas muito eficientemente. Os outros genes apresentaram problemas para clonagem e estão sendo avaliados.

BIBLIOGRAFIA

- Dornelas, M. C., Mazzafera, P. 2007. A genomic approach to characterization of the Citrus terpenes synthase gene family. *Genet. Molec. Biol.*, 30 (3) suppl., 832-840.
- Lücker, J., Mazon, K., El Tamer, W. S., Francel, W. A. V., Linus, H. W. van der Plas, Harro, J. B., Harrie, A. V. 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpenes synthases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3160–3171
- Maccarone, E., Campisi, S., Fallico, B., Rapisarda, P., Sgarlata, R. 1998. Flavor component of Italian orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2293-2298.
- MacMillan, J., Beale, M. 1999. Diterpene biosynthesis em *Comprehensive Natural Products Chemistry Isoprenoids: Including Steroids and Carotenoids*, Vol. 2, editado por D. E. Cane. Pergamon, Oxford. 387–390. pp. 217–243.
- Maruyama, T., Ito, M., Honda, G. 2001. Molecular Cloning, Functional Expression and Characterization of (E)- β -Farnesene Synthase from Citrus junos *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1171-1175.
- Sharon-Asa, L., Shalit, M., Frydman, A., Bar, E., Holland, D., Or, E., Lavi, U., Lewinsohn, E., Eyal, Y. 2003. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *Plant J.* 36, 664-674
- Takita, M. A., Berger, I. J., Basílio-Palmieri, A. C., Borges, K. M., Souza, J. M., Targon, M. L. P. N. 2007. Terpene production in the peel of sweet orange fruits. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3) suppl., 841-847.
- Weiss, E.A. 1997. *Essential Oil Crops*, CAB International, Wallingford, UK. R.