

CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE DE TERPENO SINTASE VISANDO PRODUÇÃO EM SISTEMAS HETERÓLOGOS.

GABRIELA M. BARREIROS¹; MARCO A. TAKITA²

Nº 11159

RESUMO

O Instituto Agronômico de Campinas foi responsável pela formação do maior banco de seqüências de citros do mundo através do Programa Institutos do Milênio, do Ministério de Ciência e Tecnologia/ CNPq. Ainda assim, é de extrema importância ampliar essa base de informações, como por exemplo, a caracterização da parte dos genes expressos de citros, que dará uma visão do genoma desse gênero. Já foram caracterizadas funcionalmente algumas destas proteínas: duas d-limoneno sintases, duas γ -terpineno sintases e uma β -pineno sintase de *C. unshiu* (Shimada e col., 2004 e 2005, Suzuki e col., 2008), uma valenceno sintase de *C. sinensis* (Sharon-Asa e col., 2003), duas d-limoneno sintases, uma β -pineno sintase e uma γ -terpineno sintase de *C. limon* (Lücker e col., 2002), uma β -farneseno sintase de *C. junos* (Maruyama e col., 2001), e uma sabineno sintase de *C. jambhiri* (Kohzaki e col., 2009). Isto representa apenas seis proteínas, o que é pouco diante do existente.

Assim, este trabalho teve como objetivo a construção de vetores visando a caracterização de outras terpenos sintases, para estudos de suas atividades em sistemas heterólogos e a análise de seus produtos.

ABSTRACT

The Agronomy Institute of Campinas was responsible for the formation of the largest Citrus DNA sequence database of the world through the Millennium Institutes Program of the Ministry of Science and Technology/CNPq. Still, it is extremely important to expand this information knowledge base, for example, the characterization of the genes expressed in citrus, which gives an insight into the genome of this genus. Some of these proteins have been functionally

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras - SP, gabi_massaro@hotmail.com

² Orientador: Pesquisador, IAC/Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis - SP.

characterized, two d-limonene synthases, two- γ terpinenene synthases, a β -pinene synthase of *C. unshiu* (Shimada et al., 2004 and 2005, Suzuki et al., 2008), a valenceno synthase of *C. sinensis* (Sharon-Asa et al., 2003), two d-limonene synthase, a β -pinene synthase and a γ -terpinene synthase from *C. limon* (Luck et al., 2002), a β -farnesene synthase of *C. junos* (Maruyama et al., 2001), and a sabinene synthase from *C. jambhiri* (Kohzaki et al., 2009). This represents only six proteins, which is little compared to the existing one.

Thus, this study aimed the construction of vectors to characterize other terpene synthases for studies of their activities in heterologous systems and analysis of their products.

INTRODUÇÃO

Terpenos são um grupo muito grande e estruturalmente diverso de metabólitos secundários que são abundantes em muitos óleos essenciais, resinas e aromas florais. Eles têm diversas aplicações na indústria alimentícia e de cosméticos na produção de aromas e fragrâncias (Croteau et al, 2000;. Phillips et al, 2006;. Tholl, 2006).

Os terpenos ou terpenóides podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que constituem: hemiterpenóides, monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, tetraterpenóides e politerpenóides (OLIVEIRA et al., 2003).

Os hemiterpenóides (C5) são o menor grupo dos terpenos, sendo que o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al., 2000).

Os monoterpenóides (C10) são compostos por duas unidades de isopreno. Devido a sua baixa massa molecular, estes costumam ser voláteis, sendo os constituintes das essências voláteis e óleos essenciais, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenóides (C15) são encontrados nos óleos essenciais e em hormônios vegetais, constituindo a maior classe de terpenóides (OLIVEIRA et al., 2003). Os diterpenóides (C20) compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Os triterpenóides (C30) formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Os tetraterpenóides

(C40) são carotenóides, pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Os politerpenóides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU *et al.*, 2000 OLIVEIRA *et al.*, 2003)

Em citros, esses terpenos tem interesse econômico especial pois são os principais componentes dos óleos essenciais e alguns deles são os responsáveis por dar ao seu suco uma cor especial. Porém há uma carência de estudos sobre sua produção com relação à regulação fisiológica, bioquímica e principalmente, molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o início do trabalho, foram recuperadas as linhagens 108800 (CS00-C3-705-025), 108800 (CS00-C3-705-046), 100950 (CS00-C1-100-077), 100950 (CS00-C3-704-071), 108028 (CS00-C3-701-002), 107203 (CS00-C3-703-032), que codificam terpeno sintases já identificada no transcriptoma de Citrus. O clone 108800 codifica uma d-limoneno sintase, 100950 e 107203 uma (-)-germacrene D sintase, e 108028 uma γ -terpineno sintase.

Os clones foram inoculados em meio LB líquido (Tryptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 10g/L) com o antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) e crescidos overnight. Foram feitas culturas permanentes armazenados a -80°C.

Foi feita uma minipreparação alcalina para a extração dos plasmídeos dessas colônias inoculadas. Foram adicionados 100 μ L da solução I, contendo glicose, Tris-HCl e EDTA, 200 μ L da solução II, solução ativa na lise alcalina, contendo NaOH e detergente SDS. Adicionou-se então 150 μ L da solução III, (acetato de potássio 3M) ao sobrenadante, precipitando o DNA bacteriano com 3 volumes de etanol absoluto. Este, então, foi lavado utilizando etanol 80%. Um gel de agarose 1% foi feito para analisar as minipreparações. Duas das minipreparações que apresentaram banda (032 e 077) foram amplificadas, antes sendo diluídas 10X. Outras duas (002 e 071) e a amostra 032 foram submetidas a um tratamento com RNase A, adicionando 0,5 μ L da enzima e deixando a 37°C por 30 minutos. Um gel de agarose 1% foi feito para analisar os resultados da PCR e do tratamento.

Com construções feitas em projetos anteriores, denominadas de 113 com o esqueleto do vetor pET28a, foram feitas transformações em DH10B. Então foram feitas minipreparações desses transformantes, 12 no total, utilizando os mesmos procedimentos acima descritos. Os plasmídeos obtidos foram então submetidos a digestões com as enzimas de restrição *PvuII* e *DraI* (FERMENTAS), utilizando os procedimentos descritos pelo fabricante. As digestões foram analisadas em um gel de agarose 1%. Foram selecionadas três amostras, 113 1, 113 8 e 113 9, com as quais foram feitas culturas permanentes e armazenadas a -80°C. Posteriormente, estes foram recuperados em meio LB com antibiótico kanamicina (30µg/mL). Foram feitos inóculos dessas colônias recuperadas para a realização de minipreparações e amplificação através da cadeia de reação polimerase, utilizando as condições de ciclicização: fase inicial de 5 minutos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C e 1min30seg a 72°C, finalizando com uma etapa de 10 minutos a 72°C. Um gel de agarose a 1% com brometo de etídio foi feito para a análise das minipreparações e amplificações.

No trabalho foram utilizadas também outras construções de trabalhos anteriores, com os gene 107 (107203). Eles foram recuperados em placas de meio LB com o antibiótico ampicilina. Foram feitos inóculos para realização de minipreparações alcalinas e posteriores amplificações com o programa de ciclicização acima descrito. Os plasmídeos obtidos foram utilizados para transformação de células competentes da linhagem DH10B. Foram selecionados 3 transformantes e inoculados para minipreparações alcalinas. Uma das minipreparações foi selecionada para digestões. A primeira digestão foi feita com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII* (FERMENTAS), conjuntamente, utilizando um tampão comum às duas (Buffer 10x O) e *BamH1* (Buffer 10x *BamH1*) e *NdeI* (Buffer 10x O), separadamente, utilizando os protocolos estabelecidos pelo fabricante. Um gel de agarose 1% foi feito para a análise das digestões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Minipreparações de plasmídeos das colônias inicialmente recuperadas apresentaram padrões de bandas diferentes, com tamanho acima de 5000 pb.

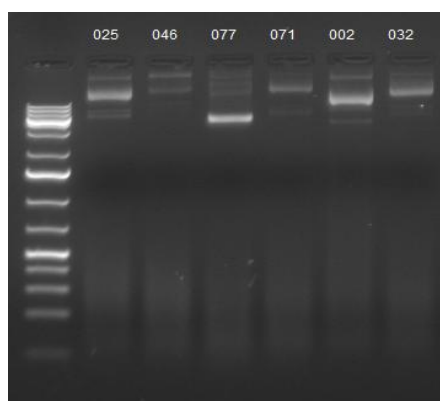


Figura 1: Minipreparações dos clones repurificados inicialmente.

Os DNAs obtidos nas minipreparações acima foram submetidos a um tratamento com RNase A, para eliminação de contaminação de RNA. Em seguida, foi tentada a amplificação do insertos clonados porém, as reações acabaram não sendo eficientes e, portanto, não mostraram amplicons, como exemplificado na Figura 2.

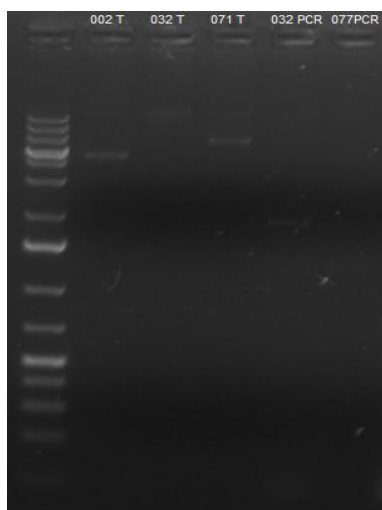
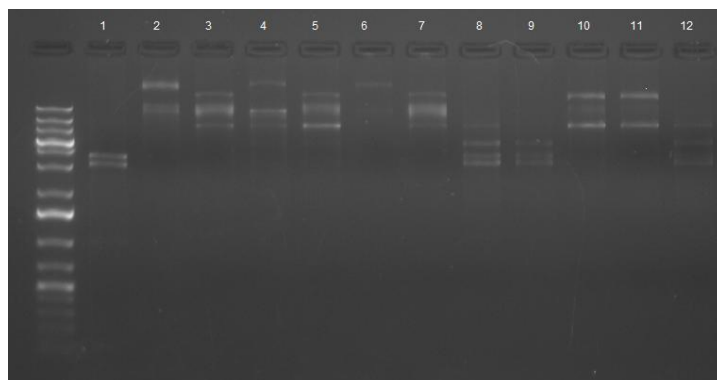


Figura 2: Gel de agarose 1% das amostras 002, 032, 071 tratadas com RNase A e PCR das amostras 032 e 077.

Com as construções obtidas de trabalhos anteriores (113), foram feitas digestões com as enzimas de restrição *PvuII* e *DraI*. Estas digestões seriam importantes para caracterização do padrão de digestão, que confirmariam a construção. Interessantemente, poucas digestões resultaram no padrão esperado, apenas 3 digestões, com os plasmídeos 1, 8 e 9. Entretanto, a digestão com *DraI*

mostrou que vários plasmídeos apresentam o padrão esperado, as exceções foram os de número 3, 6 e 7.

A



B

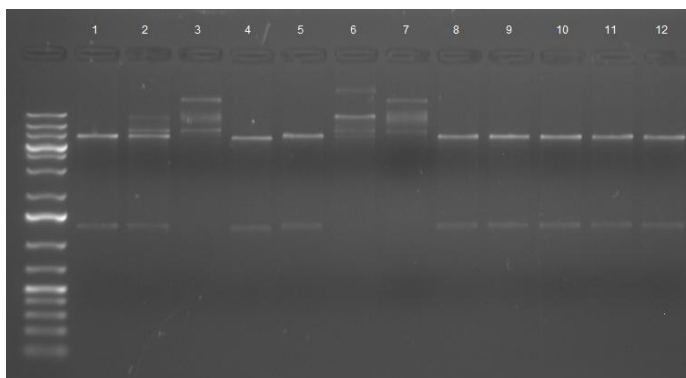


Figura 3: Digestão das minipreparações (1 a 12 - 113) com as enzimas de restrição (A) *PvuII* (FERMENTAS) e (B) *DraI* (FERMENTAS).

Ainda assim, selecionamos apenas os plasmídeos que apresentaram o padrão esperado em ambas as digestões. Novas minipreparações de plasmídeos foram feitas (Fig. 4) para utilizarmos para transformação de linhagens bacterianas capazes de expressar a proteína. Estas minipreparações foram também utilizadas para amplificação, apenas para confirmação do inserto, mesmo que o próprio padrão de digestão já nos mostrou que a construção estava correta.

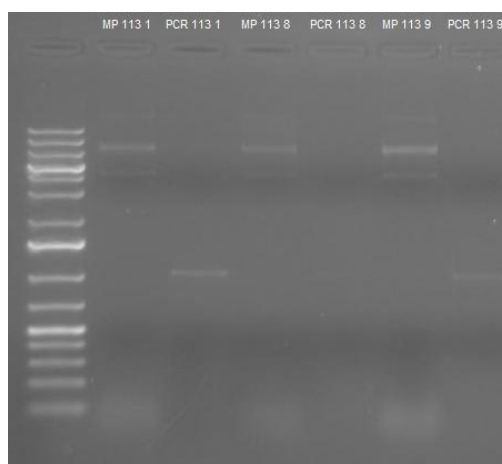


Figura 4: Minipreparações e amplificações da construção 113.

Em relação aos trabalhos realizados com os clones 107, o amplicon foi clonado em pGEM-T (Promega), segundo especificações do fabricante. Foram obtidos 3 transformantes selecionados em placa de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL além de IPTG e X-Gal para seleção por cor. Foram obtidos 3 transformantes com a linhagem DH10B. Estes transformantes foram crescidos em meio líquido e utilizados para preparação de DNA. As minipreparações foram visualizadas em gel de agarose e apenas uma apresentou quantidades razoáveis, sendo esta selecionada para realizar digestões. Estas foram feitas com pares específicos de enzimas, *NdeI* e *BamHI*, e *NdeI* e *BglII* (Fig. 5).

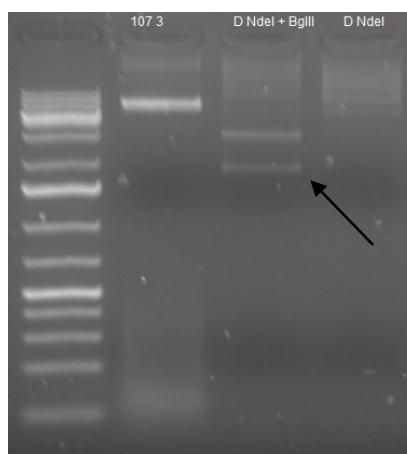


Figura 5: Digestão do transformante 107 3 com as enzimas de restrição

CONCLUSÃO

Foi obtida a clonagem do gene que codifica uma terpeno sintase de citros no vetor pGEM-T. Esta está sendo utilizada para clonagem em pET28a.

Linhagens de *Escherichia coli* otimizadas para produção de proteínas foram obtidas e estão também sendo induzidas no intuito de produzir a outra terpeno sintase de citros proposta no projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIT, pela bolsa concedida.

Ao IAC – Centro de Citricultura, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CROTEAU R, KUTCHAN TM AND LEWIS NG (2000) NATURAL PRODUCTS IN: BUCHANAN B, GRUISSEM W AND JONES R (EDS) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiology, New York, pp 1250-1318.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. Natural Products (SecondaryMetabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. Biochemistry &Molecular Biology of Plants. Americam Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318, 2000.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. Plantas tóxicas:conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos,2003. 64p.

PHILLIPS DR, Rasbery JR, Bartel B and Matsuda SPT (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. Curr Opin Plant Biol 9:305-314.

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. Famacognosia efarmacobiotechnologia. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

THOLL D (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. Curr Opin Plant Biol 9:297-304.