

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão
papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas

Sabrina Garcia Broetto

Tese de obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão
papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Sabrina Garcia Broetto

Tese de obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Broetto, Sabrina Garcia
B865c Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas / Sabrina Garcia Broetto. -- São Paulo, 2013.
117p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador : Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Frutas tropicais : Ciência dos alimentos 2. Biologia molecular : Botânica 3. Expressão gênica 4. Mamão : Ciência dos alimentos I. T. II. Nascimento, João Roberto Oliveira do orientador.

641.346 CDD

Sabrina Garcia Broetto

Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão
papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Orientador/ presidente

Titulares

Dr. João Paulo Fabi
Profa. Dra. Marília Gaspar
Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi
Prof. Dr. Carlos A. Labate

Suplentes

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
Profa. Dra. Beatriz R. Cordenunsi
Profa. Dra. Maria Angela M. de Carvalho
Prof. Dr. Ricardo A. Kluge

São Paulo, maio de 2013

Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas Graças a Deus, não somos o que éramos.

(Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

Dedico e agradeço a Deus, Senhor de toda minha vida, da minha fé e Fortaleza dos meus dias;

Aos meus pais, Izanete e Mauricio, que me ensinaram a lutar pelas coisas com muita dignidade, simplicidade e paciência. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão Filiph pelo companheirismo e incentivo;

Aos meus familiares pelo apoio e pelo carinho;

Aos meus maiores e melhores amigos e professores, pelo apoio e pelos ensinamentos;

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, meu orientador, por acreditar em mim, pela paciência, por todos os seus ensinamentos e sua amizade. Obrigada por tudo.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por me darem condições para desenvolver o meu trabalho da melhor maneira possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, seus professores e funcionários, pela dedicação, pelos ensinamentos e por toda a prestatividade durante esses anos;

Ao Dr. João Paulo Fabi, pelo apoio técnico dispensado;

À Dra. Amanda Francine Asega pela ajuda com os experimentos de indução;

Ao Prof. Dr. John Marcus Labavitch da Universidade da Califórnia, EUA e ao Dr. Gerardo Gutierrez-Sanchez, do Complex Carbohydrate Research Center da Universidade da Geórgia, EUA pela gentileza do envio das alíquotas de anticorpos para os testes de expressão heteróloga;

Ao Sr. José Maria Herzog por generosamente disponibilizar as plantas e frutos para a realização deste trabalho;

Às técnicas do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, pelos ensinamentos, prestatividade e pela valiosa colaboração;

Ao Núcleo de Estudos da Fotossíntese, da Universidade Federal do Espírito Santo por permitir o uso do laboratório para processamento e acondicionamento imediato de parte das amostras do experimento;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos na fase inicial deste trabalho (Processo: 142616/2009-5 de 08/2009 a 01/2010);

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2009/53329-4 de 02/2010 a 05/2013).

Por fim, a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

BROETTO, S.G. **Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas.** 2013. 117 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) presentes na parede celular são capazes de limitar o potencial destrutivo da poligalacturonase (PG) fúngica e, assim, constituem um tipo importante dentre os diversos sistemas de defesa do tecido vegetal frente à infecção fúngica. No mamão, o ataque fitopatogênico é o principal causador de danos pós-colheita, e sua alta susceptibilidade pode estar relacionada com a baixa eficácia ou pouca abundância dos meios de defesa anti-fitopatogênica. Uma vez que isso pode estar relacionado com as PGIPs e nada se conhece sobre o papel dessas proteínas nesse fruto, o objetivo do trabalho foi clonar os genes das PGIPs de mamoeiro e definir seu padrão de expressão em diferentes órgãos e tecidos e ao longo do amadurecimento. Para tanto, foram identificadas no genoma do mamoeiro, a partir de critérios que definem a identidade de uma PGIP, duas prováveis sequências dentre 13 candidatas iniciais. Ambas foram clonadas a partir das sequências genômicas e de cDNA, sequenciadas e sua identidade confirmada, sendo denominadas *Cppgip4* e *Cppgip6*. As análises de expressão relativa em diversos tecidos e idades fisiológicas do mamoeiro demonstraram que os dois genes apresentaram diminuição da expressão com o desenvolvimento dos frutos, sendo que com a polpa apresentou redução dos níveis de expressão relativa de *Cppgip4* em até 18 vezes dos 30 dias pós-antese (DPA) ao 9 dias pós-colheita (DPC). Na casca também houve redução significativa da expressão com o desenvolvimento. Para a expressão absoluta, nos frutos, sementes, caules, raízes e folhas, o número de cópias de ambos os transcritos decresceu com o desenvolvimento, sendo cerca de cem mil vezes mais abundante para *Cppgip6* que para *Cppgip4*. As tentativas de expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris* não geraram resultado positivo, provavelmente em virtude das condições ideais de indução ainda não terem sido estabelecidas corretamente para o ensaio. A atividade de PGIPs extraídas diretamente do tecido foi medida por análise de difusão em ágar empregando pectinase de *Aspergillus niger* e revelou uma tendência à diminuição da porcentagem de inibição à medida que os frutos se desenvolveram, em concordância com os resultados da análise por qPCR. O conjunto de resultados sugere que a expressão varia com o estágio de desenvolvimento do fruto e é tecido-específica, possivelmente em resposta à diferente susceptibilidade dos tecidos ao ataque fitopatogênico, indicando que menores níveis de transcritos e atividade no amadurecimento, período de maior susceptibilidade, poderiam sinalizar para a regulação do processo degradativo marcando o início da senescência.

Palavras-chave: PGIP, clonagem, expressão gênica, fitopatógenos, difusão em ágar.

ABSTRACT

BROETTO, S.G. **Cloning and expression analysis of papaya genes encoding proteins with inhibitory activity against fungal polygalacturonases.** 2013. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) present in plant cell walls are able to inhibit the destructive action of fungal polygalacturonase (PG). In this way, they constitute an important type of plant defense system against fungal infections. In papaya fruit, the pathogenic attack is the main cause of post harvesting loss, and its high susceptibility may be related to the low efficiency or low abundance of anti-phytopathogenic defense. Since this fact could be related to PGIPs expression and little is known about the response of these proteins in the fruit, the aim of the present work was to clone the genes of PGIPs papaya fruit and set their expression pattern in different organs and tissues throughout fruit ripening. Thus, two probable PGIP sequences among 13 initial candidates were identified in the papaya genome by using specific criteria. Both sequences were cloned from cDNA and genomic samples, sequenced and confirmed its identity, and then being named *Cppgip4* and *Cppgip6*. Analysis of relative expression in various tissues at different physiological stages demonstrated that both genes were down regulated during fruit development. The relative expression levels of *Cppgip4* in papaya pulp was reduced by 18 times from the 30 days post-anthesis (DPA) to the 9 days post-harvest (DPH). Similarly, gene expression in papaya peel was significant down regulated during fruit development. Absolute expression analysis revealed gene expressions in the fruit pulp, seed, stem, root and leaf were also down regulated within development. Moreover, *Cppgip6* gene expression was a hundred thousand times more abundant than *Cppgip4*. The recombinant protein expression in *Pichia pastoris* did not result positive, probably because of the ideal conditions of induction have not been properly established the yet. The activity of PGIPs extracted directly from the tissue was measured by the agar diffusion assay using pectinase from *Aspergillus niger* and showed decrease of inhibition during fruit developed in accordance with the results of the qPCR analysis. Based on the results it is possible to suggest the expression of these genes varies temporally with the developmental stage of the fruit and is tissue-specific, possibly in response to the different susceptibility of tissues to pathogenic attack. In addition, the lowest levels of PGIP expression were achieved at the fruit ripening, when the susceptibility to fungal infection is high and could signal for regulating the degradation process characterized by the onset of senescence.

Keywords: PGIP, cloning, gene expression, phytopathogens, agar diffusion assay

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Plantas e frutos do mamoeiro analisados em duas amostragens biológicas distintas. Foram coletadas amostras de plantas em duas idades diferentes (3 e 6 meses após a semeadura). Frutos imaturos (30, 60, 90 e 110 DPA) e maduros (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 DPC).....31
- Figura 2.** Mapa do vetor de expressão pPICZalfaB (3593 pb - Invitrogen).....45
- Figura 3.** Parâmetros físico-químicos de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) das amostragens durante o amadurecimento. (A) Etileno produzido pelos frutos, medido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (etileno $\mu\text{L Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$); (B) CO_2 produzido pelos frutos, medido por cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica ($\text{CO}_2 \text{ mL Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$); (C) Firmeza da polpa, medida com penetrômetro, e expressa como força necessária para a penetração da ponteira do equipamento no tecido vegetal (N). As barras verticais representam o erro padrão (n= 4).....53
- Figura 4.** Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos dois fragmentos de prováveis genes de PGIPs de mamoeiro (*Cppgip4* e *Cppgip6*). Os números à direita indicam o total de nucleotídeos apresentados em cada linha. Os asteriscos indicam nucleotídeos idênticos nas duas sequências. A seta indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal. Os nucleotídeos sublinhados indicam as sequências dos iniciadores senso e antisense utilizados para amplificação e clonagem.....57
- Figura 5.** Alinhamento múltiplo entre as sequências deduzidas de aminoácidos de algumas das sequências de PGIPs utilizadas para prospecção do genoma do mamoeiro e as sequências de *Cppgip4* e *Cppgip6*, seguidas de seus respectivos códigos no GenBank, com o software CLUSTALW. Os asteriscos indicam resíduos idênticos em todas as sequências, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica substituições semiconservadas. Os números à direita indicam o total de resíduos de aminoácidos apresentados em cada linha. As linhas horizontais indicam as posições das LRRs. As setas verticais cinza exemplificam algumas diferenças entre aminoácidos de *Cppgip4* e *Cppgip6* que afetam a especificidade da proteína.....59
- Figura 6.** Representação esquemática do modelo tridimensional de *Cppgip4* (A) e *Cppgip6* (B) preditos a partir da estrutura de PGIP de *Phaseolus vulgaris* (PvPGIP2) presente no banco de dados utilizando o servidor SWISS-MODEL.....61
- Figura 7.** Representação gráfica da detecção do peptídeo sinal de CpPGIP4 (A) e CpPGIP6 (B) preditos pelo software SignalP a partir da sequência de aminoácidos que codificam os referidos polipeptídeos.....62
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total extraídos das polpas de mamões amostrados durante o desenvolvimento, aos 30, 60, 90 e 110 dias pós-antese (DPA) (A); durante os 9 dias pós-colheita (DPC) (B); e das raízes (1 e 2), caule (3 e 4), folhas (5 e 6) de plantas de mamoeiro amostradas ao 3 meses (1, 3 e 5) e aos 6 meses de idade (2, 4 e 6) e também de sementes de frutos amostrados durante o desenvolvimento aos 90 DPA (7), e na fase de pós-colheita aos 2 DPC (8) (C), revelados com coloração com 'SYBR Safe DNA Gel Stain' da Invitrogen na diluição 1:10.000 (v/v) e visualizados sob luz ultravioleta. Ao lado direito estão indicadas as posições das bandas dos RNA ribossomais.....64
- Figura 9.** Eletroforeses em gel de agarose dos produtos da PCR aos 60 e 90 DPA e do 1 DPC ao 9 DPC para *Cppgip4* – (A) e *Cppgip6* – (B). Os fragmentos obtidos foram visualizados por coloração com 'SYBR Safe'. Os números da esquerda referem-se aos

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

