



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA TERPENÓ SINTASE DE CITROS

Isabella Penteadó Picirillo **Voso**¹; Ana Carolina Piva de **Oliveira**², Roselaine **Facanali**³, Márcia Ortiz Mayo **Marques**⁴, Marco Aurélio **Takita**⁵

Nº 14119

RESUMO - Terpenos formam o maior grupo de produtos naturais existentes. Um grande número de terpenos ou seus derivados apresentam importância econômica, incluindo aromas e corantes, além de outros compostos com propriedades farmacológicas importantes. Além disso, podem ser considerados alternativa como combustíveis. Com o genoma de citros sendo sequenciado (Xu e col., 2013; Wu e col., 2014), cria-se a possibilidade de identificar-se genes de interesse e desenvolver trabalhos funcionais, o que falta para a efetiva caracterização de terpeno sintases de citros. Assim, este trabalho visou a clonagem, expressão *in vitro* e caracterização funcional de uma terpeno sintase identificada no genoma de *Citrus*.

Palavras-chaves: biotecnologia, enzima, cromatografia gasosa

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP; belinha_picirilo@hotmail.com

2 Colaborador, Bolsista CNPq (PIBITI): Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP

3 Colaboradora, Pós Doutorado: Centro de Recursos Genéticos Vegetais – IAC, Campinas-SP

4 Colaboradora, Pesquisadora, Centro de Recursos Genéticos Vegetais – IAC, Campinas-SP

5 Orientador: Pesquisador, Centro de Citricultura- IAC, Cordeirópolis- SP, takita@centrodecitricultura.br.



ABSTRACT - Terpenes are the largest group of existing natural products. A number of terpenes and their derivatives have economic importance, including flavorings and colorings, and other compounds with valuable pharmacological properties. Furthermore, they can be considered as alternative fuels. With the citrus genome being sequenced (Xu et al, 2013; Wu et al., 2014), it creates the possibility of identifying genes of interest and developing functional works, which is missing for the effective characterization of terpene synthases of citrus. Thus this work aimed the cloning, in vitro expression and functional characterization of a terpene synthase identified in the Citrus genome.

Key-words: biotechnology, enzyme, gas chromatography

1 INTRODUÇÃO

Terpenos constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais. Apesar de alguns terpenos estarem envolvidos no metabolismo primário de plantas, como os hormônios giberilina (Hedden e Kamiya, 1997) e ácido abscísico (Schwartz e col., 1997), a vasta maioria são classificados como metabólitos secundários. Apresentam funções ecológicas (Langenheim, 1994; Bouwmeester e col., 1999), mas também são muito utilizados como agentes de sabores e fragrâncias adicionados a alimentos, bebidas, perfumes, sabões, pasta de dente e outros produtos (Verlet, 1993), além de apresentarem importância farmacológica (Crowell e col., 1992; Van Geldre e col., 1997).

Os terpenos são classificados pelo número de carbonos que eles contêm. 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 contêm duas unidades de isopreno são chamados de monoterpenos, os quais são componentes de essências voláteis de flores e temperos. Sesquiterpenos sendo os terpenóides, e ainda existe o grupo dos diterpenos com 20 carbonos e os triterpenos que contêm 30 átomos de carbono. Os terpenos que contêm 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.

Com o genoma de *Citrus clementina* e *Citrus sinensis* sequenciados (Xu e col., 2013; Wu e



col., 2014), permitiu-se criar uma base enorme de dados para genômica de citros, ainda mais somada ao CitEST (Targon e col., 2007), do próprio Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, compondo assim um panorama grandioso para estudos funcionais. Dentro deste contexto, para plantas do gênero *Citrus*, foram caracterizadas funcionalmente algumas terpeno sintases, sendo estas, 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). Assim, apenas seis proteínas foram funcionalmente caracterizadas para este gênero, o que é pouco diante do universo existente. As outras baseiam-se apenas em análise de similaridade, o que é passível de erros. Como somente com o conhecimento das proteínas, com suas atividades e produtos gerados possibilita o que se conhece hoje como engenharia metabólica "preditiva" (Dixon, 2005), o valor desta caracterização é muito grande, pois possibilita tanto o melhoramento genético direcionado de citros como também a obtenção de novos produtos através de processos biotecnológicos. Logo, o presente trabalho visou a clonagem, expressão e caracterização funcional de uma terpeno sintase putativa de *Citrus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plasmídeo e primers

Neste trabalho foram utilizados o clone CR05-C3-700-129-G08 e os seguintes primers:

5' TCGATCGCCATGGAAGTTTCAGCCTCTTCTGC 3' SEQ10-C-FOR

5' AGTTTAAAC TGCTGATATCGGCACAGGATT 3' SEQ10-C-REV

Linhagem bacteriana

A linhagem bacteriana usada no trabalho foi a DH5 α [Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1].

Extração de plasmídeos

Para realizar a extração utilizou-se células bacterianas contendo plasmídeos, que foram inoculadas em 1mL de meio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, pH 7,0) e crescidas durante a noite. Foram feitas minipreparações para extração dos plasmídeos. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 100 μ L de Solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, pH 8,0). Adicionou-se 200 μ L de solução II (0,2 N



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

NaOH, 1% SDS) e inverteu-se os tubos por pelo menos 10 vezes, obtendo-se uma solução viscosa na qual foram colocados 150 μ L de solução III (60 mL de 5 M Acetato de Potássio, 11,5 mL de Ácido Acético Glacial, 28,5 mL de água Milli-Q), invertendo-se novamente os tubos por 10 vezes. Os tubos foram mantidos em gelo por 10 minutos e centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm, transferindo-se o sobrenadante com o DNA para novo tubo, sendo este purificado com o kit GeneClean.

Transformação bacteriana

O gene estava clonado no vetor pSport1 (Invitrogen). A reação de PCR foi feita com a enzima de alta fidelidade *Pfu* DNA polimerase (Fermentas). As amplificações foram otimizadas a partir da reação básica indicada pelo fabricante, 1x tampão, 0,2mM de cada dNTP, 1ng de plasmídeo, 250ng de cada primer, 2,5U de enzima em um volume total de 100 μ L. As condições de ciclização foram: um passo inicial de 1 a 3 minutos à 95°C, 25 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 50-58°C, 2 minutos/Kb à 72°C, e um passo final de incubação à 72°C por 10 minutos. A amplificação foi verificada em gel de agarose 0.7%.

Para verificação de clonagem, foi realizada amplificação com o TopTaq Master Mix (Qiagen). Para tanto, foram usados 12,5 μ L do mix, 0,2 μ L 0,1 μ L de DNA de miniprep, e água para 25 μ L. O programa usado foi 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, seguido de um período de extensão de 10 minutos a 72 °C.

Clonagem

Para clonagem, foi utilizado o Flexi System (Promega), com o vetor pF1K T7, segundo as instruções do fabricante. Neste sistema, vetor e fragmentos são cortados com as enzimas de restrição *SgfI* e *PmeI*, possibilitando clonagem direcional do fragmento, no caso, a região codificadora dos genes de terpeno sintase. Neste caso, foram feitas as seguintes digestões, 4 μ L do tampão de digestão, 500 ng do fragmento amplificado ou 200 ng de vetor, 4 μ L do composto de enzimas (*SgfI* e *PmeI*) ou 2 μ L no caso da digestão do vetor, e água para 20 μ L. As reações foram incubadas por 30 minutos a 37 °C, aquecendo-se a reação do vetor a 65 °C por 20 minutos para inativar as enzimas de restrição. Os produtos de PCR foram purificados com o Wizard SV Gel e Clean-Up System (Promega), segundo orientação do fabricante.

A reação de ligação foi feita com 10 μ L de tampão de ligação, 50 ng do vetor digerido, 100 ng do amplicon, 20 U de T4 DNA ligase, em um volume de 20 μ L. Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, o DNA foi utilizado para transformação de *Escherichia coli*.



Transformação bacteriana

Células competentes das linhagens bacterianas foram preparadas com 50mM cloreto de cálcio e armazenadas a -80°C . Cinco microlitros das ligações foram usados para transformação misturando-se a 50 μL de suspensão de células da linhagem DH5 α . O tubo foi incubado em gelo por 30 minutos e dado um choque térmico a 42°C por 45 segundos. As células voltaram para o gelo por 2 minutos, quando foi adicionado 1mL de meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl; 10mM MgCl_2 , 20mM glicose adicionados após autoclavação) pré-aquecido. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora e 30 minutos com agitação (250 rpm) e 100 μL de células foram plaqueados em uma placa com meio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, pH 7,0, 2% ágar) contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. O restante das células foi concentrado por centrifugação e também plaqueado. As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C .

Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos genes de terpeno sintase foi feito com BigDye 3.1 (Applied Biosystems), com protocolo otimizado para uso de tampão save money (2,5 μL MgCl_2 2M, 200 μL Tris-HCl pH 9,0 1M em 1 mL), em um volume final de 10 μL . As corridas foram feitas em um sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram avaliadas no software Seqman do Lasergene 99 (DNASTAR Inc.).

Produção *in vitro*

Para síntese *in vitro*, foi utilizado o kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega). Assim, foram usados por reação 40 μL de TNT Master Mix, 1 μL de 1 mM Metionina, 1 μg de plasmídeo, em um volume final de 50 μL . A reação foi incubada a 30°C por 4 horas.

Teste de atividade

Para testarmos a atividade, foram feitas reações contendo 10 μg de substrato (farnesil difosfato, geranil difosfato ou geranilgeranil difosfato). As reações foram realizadas com tampão 25mM fosfato de potássio (pH 6,8, contendo 1mM 1,4-ditiotreitol e 10 mM MgCl_2). Foram ainda utilizados 10 μL de proteína produzida *in vitro*, em um volume final de 500 μL . As reações foram cobertas com 500 μL de éter de etila e mantidas a 24°C por 16 horas. Os voláteis foram extraídos vortexando-se os tubos e coletando-se o éter de etila, que foi usado para injeção no cromatógrafo a gás. As análises foram conduzidas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30m x 0,25mm x 0,25 μm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de



elétrons (70eV.), hélio com gás de arraste (1,0 mL/min.), injetor a 240°C, detector a 230°C, modo de injeção splitless, volume de injeção 1µl e o seguinte programa de temperatura: 40°C (5 min.) – 280°C, 10°C/min., 280°C (10 min.). A identificação foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e literatura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias sequências codificando terpeno sintases putativas foram identificadas nos genomas tanto de *C. sinensis* quanto no de *C. clementina*. Uma destas sequências foi utilizada para amplificação por PCR (Figura 1), obtendo-se um amplicon de aproximadamente 1,5 Kb.

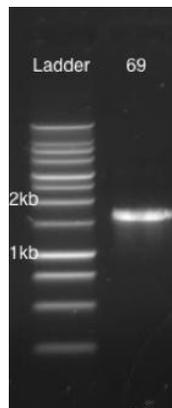


Figura 1. Amplificação de gene codificando terpeno sintase de citros. O amplicon obtido encontra-se entre as bandas de 1 e 2 Kb.

O amplicon foi usado para clonagem em pF1K T7, vetor usado para expressão das proteínas, sendo feita a confirmação através de reações de PCR (Figura 2).

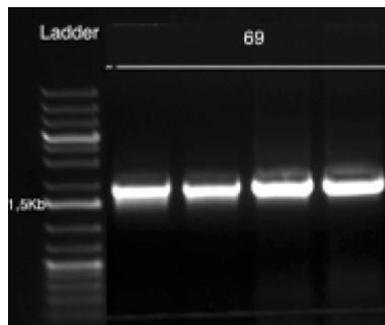


Figura 2: Confirmação de clonagem. Foram feitas reações de PCR com quatro clones obtidos na transformação de DH5α, com o mesmo par de primers usado na obtenção do amplicon.

Os quatro plasmídeos foram sequenciados não observando-se variações que alterassem a proteína. Um destes clones foi então utilizado para síntese de proteína *in vitro*, usando o kit de



transcrição e tradução TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) e, com a proteína obtida, foi feita a análise de atividade para caracterização funcional. Assim, uma análise de cromatografia gasosa com a amostra obtida da possível reação enzimática com o substrato geranil difosfato mostrou um pico diferencial em relação ao controle sem substrato e também com outros substratos (geranilgeranil difosfato e farnesil difosfato) como mostrado na Figura 3.

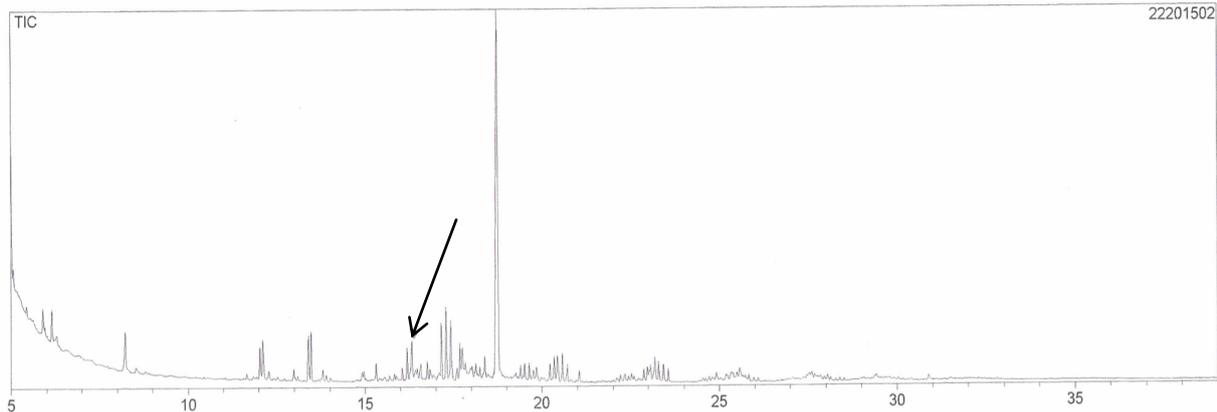


Figura 3: Cromatografia gasosa. Perfil obtido com a amostra 69-6, após injeção do éter de etila usado para extração dos terpenos na reação enzimática.

A análise mais fina deste pico pelo Adams pelo índice calculado mostrou-se geraniol a substância produzida.

4 CONCLUSÃO

O projeto possibilitou a identificação de atividade de uma terpeno sintase de citros codificadas no genoma de citros. Esta proteína estava anotada como uma germacrene D sintase através de análise por similaridade, mas isto se mostrou errado pela análise funcional pois trata-se de uma geraniol sintase.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao IAC, pela oportunidade de estágio.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bouwmeester, H. J., Verstappen, F. W., Posthumus, M. A., Dicke, M. 1999. Spider mite-induced (3S)-(ε)-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiol.* 121, 173-180.
- Crowell, P., Lin, S., Vedejs, E., Gould, M. N. 1992. Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer & Chemother. Pharmacol.* 31, 205-212.
- Dixon, R. A. 2005. Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 329-336.
- Hedden, P., Kamiya, Y. 1997. Giberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48, 431-460.
- Kirby, J., Keasling, J. D. 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu Rev Plant Biol.* 60: 335-355.
- Langenheim, J. H. (1994) Higher Plant Terpenoids: A Phytocentric Overview of Their Ecological Roles. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.
- Lücker, J., Mazen, 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 monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3160–3171
- Kohzaki, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Ozawa, R., Takabayashi, J., Akimitsu, K. 2009. Characterization of a sabinene synthase gene from rough lemon (*Citrus jambhiri*). *J. Plant Phys.*, no prelo.
- 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.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A., McCarty, D. R. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276, 1872-1874.
- Suzuki, Y., Sakai, H., Shimada, T., Omura, M., Kumazawa, S., Nakayama, T. 2008. Characterization of γ-terpinene synthase from *Citrus unshiu* (Satsuma mandarin). *Biofactors* 21: 79-82.
- Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., Amaral, A. M., Souza, A. A., Locali-Fabris, E. C., Dorta, S. O., Borges, K. M., Souza, J. M., Rodrigues, C. M., Lucheta, A. R.; Freitas-Astúa, J., Machado, M. A. 2007. CitEST libraries. *Genet. Mol. Biol.*, 30 (3) suppl., 1019-1023.
- Verlet, N. 1993. Commercial aspects em Volatile Oil Crops: Their Biology Biochemistry and Production. Longman Scientific and Technical, Essex. UK. pp.137-174.
- Van Geldre, E., Vergauwe, A., Van den Eeckhout, E. 1997. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol Biol.* 33,199-209.
- Xu, Q., Chen, L.-L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W.B., Hao, B.-H., Lyon, M.P., Chen, J., Gao, S., e col., 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics* 45, 59–66.
- Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Terol, J., Takita, M. A., e col. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat Biotech*, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2906>