

ANDRÉA DE OLIVEIRA BARROS RIBON

ORGANIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM
POLIGALACTURONASES EM *Penicillium griseoroseum*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

ANDRÉA DE OLIVEIRA BARROS RIBON

ORGANIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE GENES
QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES EM
Penicillium griseoroseum

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de "*Doctor
Scientiae*"

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

ANDRÉA DE OLIVEIRA BARROS RIBON

ORGANIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE GENES
QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES
EM *Penicillium griseoroseum*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título
de "Doctor Scientiae"

APROVADA: 06 de setembro de 2001

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
Vieira de Queiroz
(Conselheiro)
(Conselheira)

Prof^a. Marisa

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
Suely Lopes Gomes

Prof^a.

Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

Dedico este trabalho

ao Rômulo,

a meus pais, Nairam e Maura

e ao meu irmão, Nairam

Filho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao departamento de Microbiologia pela oportunidade e pela infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

A Deus, que se fez presente em todos os momentos, nos mais felizes, nos mais difíceis. Tantas vezes pedi que Sua mão se apoiasse sobre a minha, para transmitir-me a segurança necessária para vencer os obstáculos e alcançar meus objetivos.

A meus pais e a meu irmão. Ninguém e nada crescem sozinhos. Sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.

Ao Rômulo, que por estar sempre presente, nunca me deixou desanimar nos momentos em que as coisas no laboratório desandavam. E foram muitos... . O seu apoio e o seu amor me fazem ter certeza de que estou no caminho certo. Obrigada também por ter compreendido as ausências nos finais de semana e nos muitos feriados.

À Prof^a. Elza, pela orientação, pela amizade e pelo estímulo constante, fundamental para que este momento chegasse. Todo o meu reconhecimento por sua dedicação e pelas tantas vezes que abdicou de sua vida familiar e de suas horas de descanso em favor de seu laboratório.

À Prof^a. Marisa e ao Prof. Everaldo, que não somente contribuíram com idéias, mas dedicaram tempo e experiência para que minha formação fosse também um aprendizado de vida.

À Prof^a. Célia, pela participação na banca de defesa da tese e pelo interesse constante pelo nosso trabalho.

À Prof^a. Suely, que tão prontamente aceitou vir a Viçosa para participar como membro da banca de defesa e dar sua valiosa contribuição.

Aos colegas, mais antigos e mais recentes, do laboratório de Genética pela convivência e pela amizade, por dividirmos alegrias e dificuldades. Nem sempre compartilhávamos das mesmas idéias, mas tudo foi feito buscando um "laboratório mais feliz".

Aos amigos, meus e do Rômulo, e aos nossos familiares, que mesmo de longe torciam para que tudo desse certo.

Aos funcionários da Microbiologia, em especial ao Evandro e ao Danilo, que sempre me ajudaram em tudo que precisei.

A Júlio Cezar F. de Oliveira, pelo interesse e pelas valiosas dicas durante a condução dos ensaios de retardamento em gel.

Agradeço também a todos que, de alguma forma, apoiaram-me e incentivaram-me durante a execução deste trabalho, compartilhando comigo os bons momentos vividos nestes quatro anos.

BIOGRAFIA

ANDRÉA DE OLIVEIRA BARROS RIBON, filha de Nairam Félix de Barros e Maura de Oliveira Barros, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 04 de agosto de 1971.

Em agosto de 1993, graduou-se em Biologia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG.

Em março de 1994, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em agosto de 1997.

Em agosto de 1998, iniciou o curso de doutorado, defendendo tese em setembro de 2001.

ÍNDICE

Página

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
INTRODUÇÃO.....	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	

CAPÍTULO 1

ORGANIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES EM *Penicillium griseoroseu*

1. INTRODUÇÃO.....	
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	
2.1. Microrganismo e produção de inóculo.....	
2.2. Isolamento de genes de poligalacturonases em <i>Penicillium griseoroseum</i>	
2.3. Extração de DNA total e análise por hibridização.....	
2.4. Determinação do número de cópias dos genes <i>pgg1</i> e <i>pgg2</i>	
2.5. Números de acesso de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos.....	
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES DE *Penicillium g* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

1. INTRODUÇÃO.....	
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	
2.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	
2.2. Isolamento de RNA total e análise por hibridização.....	
2.3. RT-PCR e síntese de cDNA.....	
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE CIS-ELEMENTOS QUE CONTROLAM A EXPRESSÃO DE GENES DE POLIGALACT *griseoroseum*

1. INTRODUÇÃO.....
2. MATERIAL E MÉTODOS.....
2.1. Microrganismo e condições de cultivo.....
2.2. Sequenciamento das regiões 5' terminais dos genes <i>pgg1</i> e <i>pgg2</i>
.....
2.3. Isolamento de núcleo e obtenção de extratos nucleares brutos.....
.....
2.4. Preparação de fragmentos de DNA para os ensaios de ligação.....
.....
2.5. Ensaios de ligação.....
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....
3.1. Caracterização da região promotora dos genes <i>pgg1</i> e <i>pgg2</i>
3.2. Identificação de cis-elementos na região promotora do gene <i>pgg2</i>
3.3 Identificação de cis-elementos na região promotora do gene <i>pgg1</i>
.....
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....
RESUMO E CONCLUSÕES.....

RESUMO

RIBON, Andréa de Oliveira Barros, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2001. **Organização e regulação de genes que codificam poligalacturonases em *Penicillium griseoroseum*.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Everaldo Gonçalves de Barros.

Os genes *pgg1* e *pgg2*, que codificam poligalacturonases em *Penicillium griseoroseum*, foram clonados e caracterizados. A região codificadora do gene *pgg1* possui 1251 pares de bases (pb) e é interrompida por íntrons de 55 e 67 pb, posicionados por comparação com a seqüência do cDNA correspondente. Uma proteína de 376 aminoácidos (aas) foi obtida da tradução deste gene e apresenta um potencial sítio de glicosilação (Asn³⁰⁷), com massa molecular e pI estimados em 38,4 KDa e 5,31, respectivamente. O gene *pgg2*, de 1165 pb, também é interrompido

por dois íntrons de 58 pb. Os íntrons de *pgg1* e *pgg2* apresentam posições conservadas, embora o mesmo não tenha sido verificado com as suas seqüências. A proteína deduzida de *pgg2* possui 369 aas, massa molecular 38,3 KDa, pI 8,31 e dois possíveis sítios de glicosilação (Asn³⁰⁰ e Asn³³⁸). A identidade entre as proteínas PGG1 e PGG2 foi de 57,5%.

Análise por hibridização do DNA total de *P. griseoroseum* mostrou que os genes *pgg1* e *pgg2* estão presentes em cópias únicas no genoma do fungo. Diferentes espécies de fungos do gênero *Penicillium* foram investigadas quanto à presença de genes de PG em seu genoma. Os resultados revelaram que a essas espécies contêm PGs codificadas por poucos genes, ao contrário do observado em *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea*, que possuem famílias de genes de PG constituídas por no mínimo cinco membros.

A expressão dos genes *pgg1* e *pgg2* foi analisada por hibridização do RNA total e pela técnica de RT-PCR. Ambos os genes são transcricionalmente regulados, porém com expressão diferenciada entre si. A expressão do gene *pgg1* foi verificada apenas em 76 horas de cultivo do micélio em meio com pectina suplementado com extrato de levedura, enquanto o transcrito do gene *pgg2* foi detectado em todos os tempos de cultivo. A expressão de ambos os genes também foi analisada em outras fontes de carbono, como sacarose e glicose, suplementadas ou não com extrato de levedura. Transcritos de *pgg1* foram detectados apenas na presença de pectina, independente da adição de extrato de levedura. Contudo, a expressão do gene *pgg2* foi reprimida somente em meio contendo glicose. A adição de extrato de levedura ao meio de cultivo contendo glicose teve um efeito positivo sobre a expressão de *pgg2*, embora um nível maior de expressão tenha sido verificado na presença de sacarose e pectina.

As regiões 5' terminais dos genes *pgg1* e *pgg2* foram sequenciadas para caracterizar cis-elementos e analisar a interação com proteínas reguladoras. Ensaio de migração retardada em gel foram realizados para comprovar a funcionalidade de alguns cis-elementos. Extratos protéicos

nucleares foram preparados de micélio crescido em meio com diferentes fontes de carbono. A formação de complexos DNA-proteína foi visualizada quando fragmentos de DNA da região reguladora do gene *pgg2* contendo os cis-elementos CCAAT e TATAATTAA foram utilizados. Um possível elemento de resposta ao cAMP foi localizado na posição -757. A região reguladora do gene *pgg1* possui um potencial sítio de ligação para o regulador geral CREA sobreposto ao TATA "box", o que pode ser uma explicação para a ausência de expressão deste gene na presença de glicose.

ABSTRACT

RIBON, Andréa de Oliveira Barros, D.S., Universidade Federal de Viçosa, september, 2001. **Structural organization and regulation of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz and Everaldo Gonçalves de Barros.

The polygalacturonase-encoding genes *pgg1* and *pgg2* from *Penicillium griseoroseum* were cloned and characterized. The 1251-bp coding region of the *pgg1* gene is interrupted by two introns of 55 and 67 bp deduced by comparison with the cDNA sequence. A polypeptide with 376 amino acids residues with a potential glycosilation site at Asn³⁰⁷ was predicted from the nucleotide sequence of *pgg1*. The protein estimated molecular mass was 38.4 KDa and with a pI of 5.31. The *pgg2* gene consists of 1165 bp and is also interrupted by two 58-bp introns. The positions of the introns were conserved in both genes however no conservation was seen in their sequences. The *pgg2* encodes a protein of 369 residues with estimated mass and pI of 38.3 KDa and 8.31, respectively. Two putative glycosilation sites were identified at Asn³⁰⁰ and Asn³³⁸. Based on the deduced amino acid sequence, PGG1 shows 57.5% identity with PGG2.

The *pgg1* and *pgg2* genes exist as single copies in the genome of *P. griseoroseum* as revealed by total DNA blot analysis. The presence of corresponding PG genes in other

Penicillium species was investigated and the results show that these enzymes are encoded by few genes. A different pattern is reported for *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* where the PG gene family consists of at least five members.

RT-PCR was employed to investigate the expression of *pgg1* and *pgg2* genes. Both genes are regulated at the transcription level, although some differences in their expression were seen. The *pgg1* gene was expressed after 76 hours of cultivation in pectin medium supplemented with yeast extract, while *pgg2* transcript was detected in all time points analyzed. Total RNA was extracted from mycelia grown on sucrose or glucose, with or without yeast extract. Pectin was the only condition tested that induced the expression of *pgg1*, even in the absence of yeast extract. The *pgg2* gene was expressed under almost all conditions studied. However, no *pgg2*-specific mRNA could be observed on glucose-containing medium while the addition of yeast extract abolished this repressive effect.

The 5' regions of the *pgg1* and *pgg2* genes were sequenced in order to characterize *cis*-acting elements and their interaction with regulatory proteins was investigated by means of electrophoresis mobility shift assays. Crude nuclear extracts were prepared from mycelia grown on different carbon sources. DNA-protein complexes were visualized when DNA fragments containing CCAAT and TATAATTAA were used. A putative cAMP response element was detected at -766 from the translation initiation site. The 5' upstream sequence of the *pgg1* gene has a potential binding site for the global repressor CREA which overlaps the TATA box. This could explain the repressive effect of glucose on *pgg1* expression. Only few *cis*-acting elements are shared by the *pgg1* and *pgg2* promoters and this could justify the differential expression of the polygalacturonase-encoding genes from *P. griseoroseum*.

INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos são bons modelos para investigar os processos biológicos fundamentais. Sua diversidade de vias metabólicas permite que diferentes substratos sejam utilizados como fontes de carbono e nitrogênio, facilitando assim o seu cultivo em laboratório. O avanço da genética microbiana permitiu o estudo de processos celulares em nível molecular, por meio do isolamento de mutantes. Segundo Gurr et al. (1987), o fato dos fungos apresentarem cromossomos lineares semelhantes a eucariotos superiores, torna-os referência para o estudo de aspectos da organização e estrutura de genoma.

A grande importância atribuída aos fungos filamentosos deve-se ao seu potencial industrial, o que faz com que eles sejam utilizados na produção de alimentos fermentados,

metabólitos primários e secundários e enzimas hidrolíticas extracelulares (Gwynne, 1992; Martin, 1992; Sakaguchi et al., 1992). Outra importante característica dos fungos é que eles são eficientes hospedeiros para a secreção de proteínas heterólogas, sendo capazes de produzir altos níveis da proteína de interesse durante processos fermentativos (Gouka et al., 1997).

Os fungos são capazes de utilizar substratos complexos encontrados na natureza, como a pectina, constituinte da matriz da parede celular primária e lamela média de plantas. As pectinas são heteropolissacarídeos formados por um esqueleto de ácido D-galacturônico, em ligações do tipo α -1,4, parcialmente esterificado com grupos metil. As unidades dessa homogalacturana podem ocasionalmente ser interrompidas por resíduos de L-ramnose, onde se formam cadeias laterais compostas por açúcares neutros, como xilose, arabinose e galactose (Sakai et al., 1993). As pectinas também têm regiões conhecidas por ramnogalacturonas, onde unidades de ácido D-galacturônico se alternam com resíduos de L-ramnose, quase sempre ligados a complexas cadeias laterais constituídas por arabinose e galactose (Hoor-Suykerbuyk, 1997). As pectinas presentes na parede celular vegetal normalmente estão ligadas a microfibrilas de celulose, conferindo rigidez à parede celular. Assim, durante o amadurecimento de frutos, alterações na estrutura da pectina, como quebra das cadeias laterais ou de regiões da cadeia principal, devem ocorrer (Kashyap et al., 2001).

As enzimas pectinolíticas são enzimas extracelulares secretadas por inúmeros microrganismos e são responsáveis pela degradação das substâncias pécnicas. Além de serem muito estudadas devido à sua participação no processo fitopatogênico, já que permitem a colonização e a penetração do tecido hospedeiro, as pectinases são enzimas de grande importância na indústria de alimentos. Neste setor, elas são utilizadas na clarificação de sucos e vinhos, na maceração de frutos, no processamento de conservas de frutas, extração de óleos, fermentação de café, entre outros (Manachini et al.,

1988; Grassin e Fauquembergue, 1996 Kashyap et al., 2001). Segundo Sharma (1987) e Gurucharanam e Deshpande (1986), as pectinases também podem ser empregadas na indústria têxtil para a desengomagem de fibras vegetais como a juta e o rami, com a grande vantagem de levar a uma redução do consumo de produtos químicos, normalmente usados no processo de preparação das fibras.

Devido à complexa estrutura das substâncias pécticas, a sua completa degradação requer a participação de um conjunto de enzimas constituído por protopectinases, pectinesterases e despolimerases (liases ou hidrolases) que têm por substrato a homogalacturona (Sakai et al., 1993). As protopectinases solubilizam a protopectina, liberando pectina altamente metilada, enquanto as pectinesterases (PE), retiram os grupamentos metila da pectina para a formação do ácido péctico.

As enzimas despolimerizantes diferenciam-se pelo mecanismo de reação, pois quebram as ligações glicosídicas α -1,4 entre os monômeros de ácido galacturônico por hidrólise ou por β -eliminação, e por isso são denominadas hidrolases ou liases, respectivamente.

As pectina liases (PL) atuam ao acaso sobre a pectina de alto grau de metilação [endopectina liase (EC 4.2.2.3.)] ou a partir da extremidade da molécula de pectina [exopectina liase (EC 4.2.2.10)] (Zetelaki-Horváth, 1982).

As poligalacturonases (PG) são hidrolases que atuam sobre o ácido poligalacturônico e pectina de baixo teor de metilação (Sakai et al., 1993). Elas são classificadas em endo ou exopoligalacturonase, de acordo com os mecanismos de ação (Eskin et al., 1971; Rexová-Benková e Markovic, 1976). A endoPG [poli(1,4- α -D-galacturonato)glicanohidrolase, EC 3.2.1.15], cliva, ao acaso, o ácido péctico, gerando os ácidos mono-, di-, e trigalacturônico. A exoPG [poli(1,4- α -D-galacturonato)galactohidrolase, EC 3.2.1.67], atua nas extremidades da cadeia de pectato, gerando resíduos de galacturonato (Rombouts e Pilnik, 1980).

As poligalacturonases desempenham um importante papel no processo de infecção da planta e por isso elas são muito estudadas em fungos fitopatogênicos, como *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* (Lang e Dörnenburg, 2000). Em *S. sclerotiorum*, nove isoenzimas foram secretadas em diferentes tempos de cultivo do micélio em ácido poligalacturônico sendo as PG detectadas no início do cultivo diferentes das presentes no meio após maior período de incubação (Martel et al., 1998).

As poligalacturonases também são produzidas por fungos saprófitas que as utilizam na degradação de tecido vegetal morto. Siessere et al. (1992) descreveram a purificação de duas PGs em *Penicillium frequentans*. Sete isoenzimas com diferentes características bioquímicas são produzidas por *A. niger*, aspecto que faz dessa espécie modelo de estudo do sistema pectinolítico (Lang e Dörnenburg, 2000).

A maioria dos fungos citados acima possui em seu genoma famílias de genes que codificam endopoligalacturonases. Wubben et al. (1999) caracterizaram seis genes de endoPGs em *Botrytis cinerea*, que apresentaram tamanhos entre 1149 e 1392 pb, com íntrons variando de 46 a 60 pb. A maior identidade, 72%, foi observada entre as proteínas BcPG1 e BcPG2. Análises por hibridização do DNA total de outras espécies de *Botrytis* com os genes *bcpG* de *B. cinerea* confirmaram que nesses fungos as PG são também sintetizadas por uma família multigênica. Sete genes que codificam PG foram identificados em *A. niger*, porém somente seis foram caracterizados (Bussink et al., 1991b; Parenicová et al., 2000). Até o momento, dois genes foram caracterizados em *A. flavus* (*pecA* e *pecB*), *Colletotrichum lindemuthianum* (*Clpg1* e *Clpg2*), *P. olsonii* (*pg1* e *pg2*) e apenas um em *P. janthinellum* e *P. digitatum* (Whitehead et al., 1995; Centis et al., 1996; Centis et al., 1997; Ishida et al., 1997; Wagner et al., 2000). Por outro lado, Caprari et al. (1993a) demonstraram que as quatro isoformas de PG secretadas em *F. moniliforme* são produtos de uma única seqüência gênica de 1331 pb, geradas da glicosilação diferencial desse polipeptídeo.

A organização de genes que codificam endopoligalacturonases em fungos filamentosos está resumida na Tabela 1. Embora haja variação nas massas das proteínas e no número de íntrons dos genes que as codificam, alguns resíduos de aminoácidos se mantêm conservados quando as seqüências aminoacídicas são comparadas (Figura 1). Esses resíduos são conservados mesmo quando a seqüência de aminoácidos de PG de fungos é comparada com as proteínas produzidas por plantas e bactérias. Por mutagênese sítio direcionada, van Santen et al. (1999) comprovaram a importância dos resíduos Asp¹⁸⁰, Asp²⁰¹, Asp²⁰², His²²³, Arg²⁵⁶ e Lys²⁵⁸ na atividade catalítica de PgaII de *A. niger*. A substituição da His²²³ por Ala, levou a uma redução de 99,5% na atividade enzimática, sem contudo alterar o seu Km. Porém, uma diminuição de 10 vezes no Km foi observada quando Arg²⁵⁶ e Lys²⁵⁸ foram mutadas, comprovando o envolvimento destes resíduos na ligação ao substrato.

Até o momento não se tem conhecimento do arranjo dos genes de poligalacturonases nos cromossomos. De todos os genes já caracterizados em fungos filamentosos, sabe-se que alguns se organizam em "clusters", como por exemplo, os genes *cbh* de *Phanerochaete chrysosporium*, *nia* de *P. chrysogenum* e genes do regulon *alc* em *A. nidulans* (Aharonowitz et al., 1992; Covert et al., 1992; Filinger e Felenbok, 1996). Fraissinet-Tachet et al. (1995) demonstraram por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado que os genes de poligalacturonase de *S. sclerotiorum* estão localizados em dois cromossomos, embora nada possa ser concluído a respeito de seus posicionamentos.

Dois genes que codificam exopoligalacturonases foram caracterizados em *A. tubigenis* e *Cochliobolus carbonum*, sendo que algumas proteínas já foram purificadas (Hara et al., 1984; Kester et al., 1996; Patiño et al., 1997; Scott-Craig et al., 1998). A seqüência codificadora do gene de *A. tubigenis* mostrou-se interrompida por sete íntrons, podendo ser traduzida em uma proteína de 435 aminoácidos (aas), com apenas 13% de identidade com endoPG de *A. niger*. A proteína de *C. carbonum* possui 446 aas e 61% de homologia com o respectivo gene de *A. tubigenis*.

Alguns autores sugerem que a produção de múltiplas isoenzimas de PG confere uma vantagem adaptativa ao fungo, possibilitando-o secretar uma determinada enzima em resposta a uma condição específica do ambiente (Martel et al., 1998; Wubben et al., 1999). Isso poderia justificar as diferenças observadas nas propriedades físico-químicas dentro de uma mesma família. A regulação da expressão dos genes de PG também se mostra diferenciada em função do tempo e substrato de crescimento do micélio fúngico.

Bussink et al. (1992) foram os primeiros a relatar o controle transcricional do gene *pgaII* de *A. niger*, cuja expressão foi reprimida em presença de glicose. Os genes *clpg1* e *clpg2* de *C. lindemuthianum* tiveram uma expressão temporal quando o fungo foi cultivado em meio com pectina (Centis et al., 1997). Transcritos de *clpg1* foram detectados após três e cinco dias, enquanto o gene *clpg2* expressou-se apenas com 12 horas de cultivo. Uma expressão diferencial também foi observada em *B. cinerea* (Wubben et al., 1999). Dos seis genes analisados, três expressaram-se em glicose e ácido poligalacturônico, dois em glicose e um foi induzido somente em poligalacturonato.

Acredita-se que a expressão "in natura" dos genes de endopoligalacturonases de fungos filamentosos ocorra de forma coordenada e seqüencial, sendo os produtos resultantes da quebra da molécula de pectina indutores para a expressão de genes tardios. Muitos estudos têm sido realizados no intuito de elucidar o mecanismo de regulação dos genes do sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*. Acredita-se que os indutores do sistema seriam pequenas moléculas liberadas da quebra da celulose (Ilmén et al., 1997). Para tal, seria necessária uma expressão constitutiva de genes que codificam celulasas, promovendo deste modo o ataque inicial da celulose em qualquer condição de crescimento do fungo. A natureza química do indutor ainda não foi elucidada, embora já se saiba que a sofrose seria um potencial candidato.

Embora a região reguladora de muitos genes que codificam endopoligalacturonases tenha sido sequenciada revelando possíveis cis-elementos, ainda não foi determinada uma

seqüência de nucleotídeos que funcionaria como sítio de ligação para uma proteína responsável pela expressão em pectina. A seqüência CCCTGA tem sido verificada em muitos genes que codificam pectinases, porém a sua funcionalidade ainda não foi comprovada. A seqüência consenso GGCTAA, presente no promotor

Tabela 1 - Genes que codificam endopoligalacturonases em fungos filamentosos e suas respectivas proteínas.

Organismo	Gene	Seqüência codificadora#	N-glicosilação	Prote
<i>Aspergillus niger</i>	<i>pgaI</i>	1330 pb (62,52)	Asn ^{246, 299}	368 aas/38,
	<i>pgaII</i>	1141 pb (62,52)	Asn ²⁴⁶	362 aas/38
	<i>pgaA</i>	1167 pb (57)		370 aas/38,
	<i>pgaB</i>	1234 pb		362 aas/37,
	<i>pgaC</i>	1336 pb (74, 56, 53)	Asn ²⁶⁰	383 aas/40
	<i>pgaE</i>	1293 pb (50, 50, 59)	Asn ²⁵⁸	378 aas/35,
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>bcpG1</i>	1149 pb		382 aas/37,
	<i>bcpG2</i>	1282 pb (58, 50, 49)		374 aas/37,
	<i>bcpG3</i>	1392 pb (87)		514 aas/43,
	<i>bcpG4</i>	1311 pb(58, 59)		397 aas/40,
	<i>bcpG5</i>	1370 pb (56, 51, 52, 68)		380 aas/38,
	<i>bcpG6</i>	1215 pb (46, 53)		371 aas/ 38
<i>Collethotrichum lindemuthianum</i>	<i>clpG1</i>	1152 pb (70)	Asn ²⁹⁴	363 aas/36,
	<i>clpG2</i>	1151 pb (53)	Asn ²⁹⁴	366 aas/37,
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	1331 pb (50,52,53,54)	Asn ^{94, 280, 290}	373 aas/38, 41,5, 5,8
<i>Penicillium digitatum</i>	-	1107 pb (57, 64)		367 aas/37,
<i>Penicillium janthinellum</i>	-	1266 pb (88,62)	Asn ^{249, 302}	372 aas/38,
<i>Penicillium olsonii</i>	<i>pg1</i>	1113 pb (50)	Asn ^{248 301}	370 aas/38,
	<i>pg2</i>	1143 pb (58, 52, 54)	Asn ^{278,311}	380 aas/38,
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>pg1</i>	1143 pb	Asn ³⁶¹	380 aas/37,
	<i>pg2</i>	1143 pb	Asn ³⁶¹	380 aas/37,
	<i>pg3</i>	1143 pb	Asn ³⁶¹	380 aas/37,

(íntrons, representados em parênteses); * (número de aminoácidos, massa molecular e pI deduzidos).

	271	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360	
<i>Polsonii</i>	SNSDNGIRIKTIYKA	KGEVADVIFSNIELS	NIAKYGVIEQDYEN	GSPTGKPTTGVPITG	LIVKQVIGSVKSSGT	DVYLQSGSGCSQDWT	346	
<i>Pjanthirellum</i>	TDSANGVRIKIVYDA	TGSVSDVIFSDITIVS	GITDYGIVIEQDYEN	GSPTGHPISGVPTID	LIVKGIIGSVESDAV	EVYLQGLDACSQDWT	347	
<i>Aparasiticus</i>	VNSQNGVRIKIVAGA	TGIVSNMGPEDITLS	GITKYGIVIEQDYEN	GSPTGHPINGITVSG	ITFEKIVIGVESDAT	DVYLQSGSGCSQDWT	339	
<i>Qparasitica</i>	INSQNGVRIKIVYDA	TGSVSDVITYSGITLS	GITNKGIVIEQDYEN	GSPTGHPITGVPITG	LIVSKVIGSVASSAT	DVYLQSGSGCSQDWT	345	
<i>Clindemthianum</i>	INSQNGVRIKIVAGA	TGIVSDITVYSGITLS	NIAKYGVIEQDYEN	GSPTGKPTSGVPIG	LITLKTIGSVSSSAT	PVYLQAS--CINMK	337	
<i>Cearborum</i>	ANSQNGVRIKIVYDA	TGSVSDITVYSGITLS	NIAKYGVIEQDYEN	GSPTGKPTTGVPITG	VILKNVAGSVIGSGT	EIVYLQSGSGCSQDWT	340	
<i>Sclerotiorum</i>	KNSQNGVRIKIVLGA	TGSVSGVTKDITLS	GITSYGVIEQDYEN	GSPTGKPTSGVPTIG	VILSNVHIVSSSAT	NVYLQAK--CSQWT	357	
<i>Aniger</i>	KSSQNGVRIKITYGD	TGSVSEVTKKDTLS	DIIDYGVIEQDMD	TSES--PIDGITIED	FVLLNVQGSVSSGT	NIYVIGSDSCDWT	354	
	* * * * *	* *	* * * * *	* * * *	* * *	* * *	* * *	
	361	375 376	390					
<i>Polsonii</i>	WSGNKVGSGKTSK	KNVPSGASC--	370					
<i>Pjanthirellum</i>	WSGVDITSGQTSSK	ENVPSGASC--	371					
<i>Aparasiticus</i>	WSGSITGGKTSK	ENVPTGASC--	363					
<i>Qparasitica</i>	WSGNSVITGGKSSC	KNVPSGASC--	369					
<i>Clindemthianum</i>	WSGNSVITGGKSSC	TGIFSGSAPC	363					
<i>Cearborum</i>	WSGSITGGKSSC	LNVPSCASC--	364					
<i>Sclerotiorum</i>	WIDNVITGGKTSK	AGLPSGAK--	380					
<i>Aniger</i>	WIDNVITGGKTSK	ENVEDDISC-	378					
	* * * * *	* * * *	*					

Figura 1 - Seqüência de aminoácidos de endopoligalacturonases de fungos filamentosos. Resíduos conservados estão identificados por asteriscos.

de vários genes xilanolíticos de *Aspergillus* e *P. chrysogenum*, é responsável pela indução da expressão gênica em presença de xilana (de Graaff et al., 1994; van Peij et al., 1998b). Recentemente, demonstrou-se que essa indução é devida à ligação da proteína ativadora XlnR, que além de controlar a expressão de sete genes xilanolíticos, ativa a transcrição de dois genes da via de degradação da celulose (van Peij et al., 1998a).

A proteína CREA reconhece e se liga à seqüência consenso SYGGRG presente em promotores de genes de *A. nidulans*, ocasionando a repressão da expressão desses genes quando o fungo é cultivado em meio contendo glicose (Scazzocchio et al., 1995). A participação deste repressor na regulação de genes de *A. niger*, *T. reesei* e *Neurospora crassa* também já foi comprovada (Hata et al., 1992; Ilmén et al., 1992; MacKenzie et al., 1993). Reymond-Cotton et al. (1996) demonstraram que CREA está envolvida na regulação da expressão do gene *pg1*, que codifica poligalacturonase de *S. sclerotiorum*. Fragmentos de DNA do promotor de *pg1*, contendo a seqüência GTGGGG, foram utilizados em ensaios de ligação com proteínas presentes em extrato nuclear bruto, preparado a partir de células crescidas em glicose. Resultado semelhante foi obtido quando a proteína de fusão GST-CREA foi utilizada nos experimentos, comprovando-

se que expressão de *pg1* é controlada por proteínas homólogas a CREA.

As regiões reguladoras dos genes *pgaI*, *pgaII* e *pgaC* de *A. niger* possuem uma seqüência que apresenta alta similaridade com o elemento UAS2, localizado no promotor do gene *CYC1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Bussink et al., 1992). Este elemento possui a seqüência CCAAT onde proteínas do complexo HAP (HAP2a/3a/5a) se ligam para ativar a transcrição de genes responsáveis pelo crescimento em fontes de carbono não fermentáveis. CCAAT "boxes" têm sido observados em promotores de vários genes de fungos filamentosos e proteínas ativadoras que se ligam a esse sítio já foram relatadas (van Heeswijck e Hynes, 1991; Litzka et al., 1996; Kato et al., 1997). O ativador AnCF de *A. nidulans* é uma proteína heteromérica análoga ao complexo HAP de *S. cerevisiae* (Kato et al., 1998). Recentemente, Narendja et al. (1999) sugeriram que AnCF promove o remodelamento da cromatina mediante sua ligação ao CCAAT "box". Porém, não se sabe se essa ligação ocorre apenas em resposta a um sinal fisiológico ou se é um evento constitutivo que regula ao mesmo tempo a expressão de vários genes dentro da célula.

Este trabalho teve por objetivos a análise da estrutura e do controle da expressão de genes que codificam poligalacturonases em *P. griseoroseum*. Inicialmente, os genes *pgg1* e *pgg2*, foram caracterizados e estudados quanto à organização no genoma de *P. griseoroseum* ao mesmo tempo em que genes que codificam PG em oito espécies de *Penicillium* foram comparados quanto à estrutura da região codificadora (Capítulo 1). No Capítulo 2, analisou-se a expressão de *pgg1* e *pgg2*, em resposta a diferentes condições de cultivo do fungo. Posteriormente, a região reguladora destes dois genes foi estudada no intuito de se identificarem cis-elementos responsáveis por sua expressão (Capítulo 3).

Os resultados do Capítulo 1 foram subdivididos nos artigos **Cloning and characterization of a gene encoding the polygalacturonase of *Penicillium griseoroseum* (Biotechnol. Lett. 21: 365-399, 1999)** e **Structural organization of**

polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*, submetido para publicação na revista **Fungal Genetics and Biology**, em agosto de 2001.

Os resultados do Capítulo 2 foram submetidos para publicação na revista **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, na forma do manuscrito **Differential expression of polygalacturonase genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources**, em agosto de 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aharonowitz, Y., Cihen, G., Martin, J.F. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organisation, regulation, and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 461-495, 1992.
- Bussink, H.J.D., Buxton, F.P., Visser, J. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenensis* genes encoding polygalacturonase II. **Cur. Genet.**, v.19, p.467-474, 1991a.
- Bussink, H.J.D., Brouwer, K.B., de Graaff, L.H., Kester, H.C.M., Visser, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. **Cur. Genet.**, v.20, p.301-307, 1991b.
- Bussink, H.J.D., Buxton, F.P., Fraaye, B.A., de Graaff, L., Visser, J. The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. **Eur. J. Biochem.**, v.208, p.83-90, 1992.
- Caprari, C., Bergamann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F., de Lorenzo, G., *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 43, p. 453-462, 1993a.
- Caprari, C., Richter, A., Bergamann, C., lo Cicero, S., Salvi, G, Cervone, F., de Lorenzo G. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. **Mycol. Res.**, v. 97, p. 497-505, 1993b.
- Centis, S., Dumas, B., Fournier, J., Marolda, M., Esquerré-Tugayé, M.T. Isolation and sequence analysis of *Cplg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Gene**, v. 170, p. 125-129, 1996.
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N., Esquerré-Tugayé, M. T., Dumas, B. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of *Clpg2* and comparison of its expression to that of *Clpg1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 10, p. 769-775, 1997.

- Covert, S., Vanden Wymelenberg, A., Cullen, D. Structure, organization and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2168-2175, 1992.
- de Graaff, van den Broeck, H.C., van Ooijen, A.J.J., Visser, J. Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigensis*. **Mol. Microbiol.**, v. 12, p. 479-490, 1994.
- Eskin, M.A.M., Henderson, H.M., Townsend, R.J. **Biochemistry of foods**. New York: Academic Press, 1971. p.240.
- Filinger, S., Felenbok, B. A newly identified gene cluster in *Aspergillus nidulans* comprises five novel genes localized in the *alc* region that are controlled both by the specific transactivator AlcR and the general carbon-catabolite repressor CreA. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 475-488, 1996.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., Fèvre, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 96-99, 1995.
- Gouka, R.J., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 1-11, 1997.
- Grassin C., Fauquembergue, P. Fruit juices. In: GODFREY, T., WEST, S. (Eds.). **Industrial Enzymology**. Macmillan Press, 1996. p. 225-264.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E., Kinghorn, J.R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: KINGHORN, J. R. (Ed.) **Gene structure in eukaryotic microbes**. Oxford: IRL Press, 1987. p.93-139.
- Gurucharanam, K., Deshpande, K.S. Polyssacharides of *Curbularia lunata*: use in degumming of ramie fibers. **Ind. J. Phytopathol.**, v. 39, p. 385-389, 1986.
- Gwynne, D.I. Foreign proteins. In: KINGHORN, J.R., TURNER, G. (Eds.) **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. Blackie Academic and Professional, 1992. p. 132-151.
- Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G. Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase. **Curr. Genet.**, v. 22, p. 85-91, 1992.

- Hara, T., Lim, J.Y., Ueda, S. Purification and some properties of exopolygalacturonase from *Aspergillus niger* cultured in the medium containing satsuma mandarin peel. **J. Jpn. Soc. Food-Sci. Technol.**, v. 31, p. 581-586, 1984.
- Hoor-Suykerbuyk, M. Molecular analysis of endorhamnogalacturonan hydrolases in *Aspergillus*. PhD thesis, Netherlands, 1997. 147 p.
- Ilmén, M., Onnela, M.L., Saloheimo, A., Penttilä, M. Regulation of expression of cellobiohydrolase I gene in *Trichoderma reesei*. In: **Proceedings of the first european conference on fungal genetics**, Nottingham, 1992. Abstract P2/65.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M.L., Penttilä, M.E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 1298-1306, 1997.
- Ishida, Y., Kakibuchi, K., Hirao, Y., Izumori, K. Cloning and characterization of a polygalacturonase-encoding gene from *Penicillium janthinellum*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 84, p. 257-260, 1997.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 77, p. 215-227, 2001.
- Kato M., Aoyama, A., Naruse, F., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of taka-amylase A gene expression, binds to the CCAAT-containing *taaG2*, *amdS*, and *gata* promoters. **Mol. Gen. Genet.**, v. 254, p. 119-126, 1997.
- Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Tateyama, Y., Hayashi, K., Miyazaki, M., Papagiannopolulos, P., Davis, M.A., Hynes, M.J., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 257, p. 404-411, 1998.
- Kester, H.C.M., Kusters-van Someren, M., Müller, Y., Visser, J. Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubigensis*. **Eur. J. Biochem.**, v. 240, p. 738-746, 1996.
- Lang, C., Dörnenburg, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 366-375, 2000.

- Litzka, O., Then Bergh, K., Brakhage, A.A. The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. **Eur. J. Biochem.**, v. 238, p. 675-682, 1996.
- MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belshaw, H.J., Archer, D.B. regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2295-2307, 1993.
- Manachini, P.L. Parini, C., Fortina, M.G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 10, p. 682-685, 1988.
- Martel, M.B., Létoublon, R., Fèvre, M. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 158, p. 133-138, 1998.
- Martin, J.F. Secondary metabolites. In: KINGHORN, J.R., TURNER, G. (Eds.) **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. Blackie Academic and Professional, 1992. p. 214-252.
- Narendja, F.M., Davis, M.A., Hynes, M.J. AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, is essential for the formation of a Dnase I-hypersensitive site in the 5' region of the *amdS* gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 6523-6531, 1999.
- Parenicová, L. Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., Visser, J. *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 72-80, 1998.
- Parenicová, L., Benen, J.A., Kester, H.C., Visser, J. *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Biochem. J.**, v. 1, p. 637-644, 2000.
- Patiño, B., Posada, M.L., González-Jaén, M.T., del Pozo, A.M., Vásquez C. Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 1084-1090, 1997.
- Rexová-Benková, L., Markovic. O. Pectic Enzymes. In: TIPSON, R. S., NORTON, D. (Eds.). **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. New York: Academic Press, 1976. p.323-385.
- Reymond, P., Deléage, G., Rasclé, C., and Fèvre, M. Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Gene**, v. 146, p. 233-237, 1994.

- Reymond-Cotton, P., Fraissinet-Tachet, L., Fèvre, M. Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase *pg1* gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. **Curr. Genet.**, v. 30, p. 240-245, 1996.
- Rombouts, F.M., Plinik, W. Pectic enzymes. In: **Economic Microbiology**: microbial enzymes and bioconversions. London: Academic Press, 1980. v.5, p. 227-282, 1980.
- Sakaguchi, K., Gomi, K., Takagi, M., Horiuchi, H. Fungal enzymes used in oriental food and beverage industries. In: KINGHORN, J.R., TURNER, G. (Eds.) **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. Blackie Academic and Professional, 1992. p. 54-99.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. et al. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.39, p.213-294, 1993.
- Scazzocchio, C., Gavrias, V., Cubero, B., Panozzo, C., Mathieu, M. Felenbok, B. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: a review. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. S160-S166, 1995.
- Scott-Craig, J.S., Cheng, Y.Q., Cervone, F., de Lorenzo, G., Pitkin, J.W., Walton, J.D. Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 1497-1503, 1998.
- Siessere, V., Fonseca, M.J.V., Said, S. Extracellular polygalacturonases from *Penicillium frequentans*: separation and regulatory aspects. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 1801-1805, 1992.
- Sharma, H.S.S. Screening of polysaccharide-degrading enzymes for retting flax stem. **Int. Biodeterioration**, v.23, p.181-186, 1987.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., van Kan, J.A.L. The endopolygalacturonase gene *bcpgl* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Mol. Plant Microbe Interact** v., 11, p. 1009-1016, 1998.
- van Heeswijck, R., Hynes, M.J. The *amdR* product and a CCAAT-binding factor bind to adjacent, possibly overlapping DNA sequences in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *amdS* gene. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p.2655-2660, 1991.
- van Peij, N.N.M.E., Gielkens, M.M.C., de Vries, R.P., Visser, J., de Graaff, L.H. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and

endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3615-3619, 1998a.

van Peij, N.N.M.E., Visser, J., de Graaff, L. Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 131-142, 1998b.

van Santen, Y., Benen, J.A.E., Schröter, K.H., Kalk, K.H., Armand, S., Visser, J., Dijkstra, B. 1.68-A crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 30474-30480, 1999.

Wagner, F., Kusserow, H., Schäfer, W. Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 186, p. 293-299, 2000.

Whitehead, M.P., Shieh, M.T., Cleveland, T.E., Cary, J.W., Dean, R.A. Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.3316-3322, 1995.

Wubben, J.P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J.A.L. Visser, J. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1596-1602, 1999.

Zetelaki-Horváth, K. Factors affecting pectin lyase activity. **Acta Alimentaria**, v. 11, p. 21-29, 1982.

CAPÍTULO 1

ORGANIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES EM *Penicillium griseoroseum*

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Penicillium* possui reconhecida importância na produção de metabólitos secundários e enzimas extracelulares de valor comercial. Dentre elas destacam-se as pectinases, muito utilizadas na indústria de sucos de frutas durante a etapa de maceração da polpa vegetal (Grassin e Fauquembergue, 1996). As enzimas que compõem o sistema pectinolítico encontram-se divididas em dois grupos principais: pectina esterases, que hidrolisam pectina em ácido péctico e metanol e despolimerases, que quebram as ligações glicosídicas por reação de hidrólise ou β -eliminação (Sakai et al., 1993). As poligalacturonases (PGs) são despolimerases que atuam em pectina com baixo nível de esterificação.

As informações geradas a partir da caracterização de genes são importantes quando se deseja a obtenção de linhagens com maior produção de uma proteína de interesse. Genes que codificam PGs em fungos do gênero *Penicillium* têm sido clonados e caracterizados devido a participação desta enzima

no tratamento biológico de resíduos e pela sua participação no processo de infecção de plantas (Ishida et al., 1997; Wagner et al., 2000). Uma característica observada em endoPGs de fungos é a presença de aminoácidos conservados, alguns dos quais são responsáveis pela atividade catalítica da enzima (van Santen et al., 1999).

Os objetivos deste trabalho foram estudar a organização de genes que codificam PG no genoma de *P. griseoroseum*, comparando-a com a organização observada em fungos do mesmo gênero. A unidade estrutural dos genes de PG clonados até o momento em *Penicillium* foi comparada, comprovando que as características presentes em genes de *Aspergillus* e *Neurospora* são observadas também no gênero *Penicillium*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e produção de inóculo

As linhagens *P. charlesii* (CCT 4752), *P. chrysogenum* (CCT 2006), *P. citrinum* (CCT 3281), *P. griseoroseum* (CCT 6421), *P. janthinellum* (CCT 3162) e *P. purpurogenum* (CCT 2008) foram obtidas da Fundação André Tosello, Campinas, Brasil e utilizadas neste estudo. *P. expansum* e *P. italicum* foram isolados pelo Departamento de Microbiologia/UFV. As culturas estoques foram mantidas em glicerol a 4°C. Para a produção de inóculo, 10⁵ conídeos foram semeados em placas de Petri contendo meio mínimo (Pontecorvo et al, 1953), cobertas por papel celofane e mantidas a 28°C por três dias. O micélio foi então recolhido e utilizado para a extração de DNA total.

2.2. Isolamento de genes de PGs em *Penicillium griseoroseum*

O gene *pgg1* foi isolado do banco genômico de *P. griseoroseum* conforme descrito por Barros (1997). Para tal, o DNA total de *P. griseoroseum* foi extraído e clivado parcialmente com a enzima de restrição *Sau3A* e fragmentos de DNA entre 15 e 20 Kb foram ligados ao vetor λ EMBL3. Um fragmento de DNA de 420 pb, obtido da amplificação do DNA total de *Aspergillus niger* com oligonucleotídeos descritos por Cary et al., (1995), foi utilizado como sonda para o isolamento do gene *pgg1*. Este fragmento corresponde a uma região extremamente conservada em vários genes que codificam poligalacturonases de fungos filamentosos. O isolamento do gene *pgg2* foi realizado seguindo-se esta mesma metodologia. Para o sequenciamento dos clones genômicos de *pgg1* e *pgg2* contidos nos plasmídeos pPCR e pPG4.3, respectivamente, foi empregado o kit "BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction" (Applied Biosystems) juntamente com oligonucleotídeos universais (Promega) ou específicos desenhados com base nas seqüências parciais dos genes.

2.3. Extração de DNA total e análise por hibridização

A metodologia descrita por Specht et al. (1982) foi empregada para a extração de DNA total das diferentes espécies de *Penicillium*, que foi posteriormente clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SacI*, *SalI*. As reações de clivagem foram analisadas em gel de agarose 0,8% e transferidas para membranas Duralon (Stratagene), conforme descrito por Sambrook et al (1989). Um fragmento de DNA de *P. griseoroseum*, gerado por amplificação do DNA total com os oligonucleotídeos descritos por Cary et al. (1995), foi marcado com [α -³²P]d-ATP, empregando-se o "Random Prime IT Labeling Kit" (Stratagene) e utilizado como sonda nas hibridizações, que procederam a 60°C, por 12 horas. Este fragmento possui uma região conservada de 420 pb também observada em endoPGs de outros fungos e bactérias. As membranas foram lavadas duas vezes em SSC 2x, SDS 0,1%, a 60°C, por 20 min e uma vez em SSC 1x, SDS 0,1%, por 10 min. A membrana foi colocada em contato com o filme XOMAT K (Kodak), por cinco dias a -80°C.

2.4. Determinação do número de cópias dos genes *pgg1* e *pgg2*

A determinação do número de cópias dos genes *pgg1* e *pgg2* foi feita pelo método de reconstrução genômica, onde 1 a 5 x 10⁷ cópias do genoma do fungo foram clivadas com *XbaI*, e transferidas para membrana de náilon, após eletroforese em gel de agarose. O mesmo procedimento foi feito utilizando os plasmídeos pPG21 e pPG15, que contêm a região codificadora dos genes *pgg1* e *pgg2*. As membranas foram hibridizadas a 65°C, com os fragmentos de DNA radioativos desses plasmídeos. As lavagens foram efetuadas a 65°C, em SSC 1x, SDS 0,1%, por 20 min, seguida de SSC 0,1 X, SDS 0,1%. O filme XOMAT K (Kodak) foi utilizado para as auto-radiografias e permaneceram em contato com as membranas por 10 dias, a -80°C.

2.5. Números de acesso de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos

As seqüências relativas a genes que codificam PGs de *P. digitatum* (ABI15286), *P. expansum* (AFO47713), *P. janthinellum* (D79980) e *P. olsonii* (AJ243521, AJ243522) foram obtidas junto ao GenBank e utilizadas para o estudo comparativo realizado neste trabalho. A seqüência de nucleotídeos dos genes *pgg1* e *pgg2* foi depositada neste banco de dados com os números de acesso AF085238 e AF195113, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes *pgg1* e *pgg2*, que codificam poligalacturonases de *P. griseoroseum*, foram caracterizados. As regiões codificadoras de *pgg1* e *pgg2* possuem, respectivamente, 1251 e 1165 pares de bases (pb) e ambas são interrompidas por dois íntrons, posicionados por comparação com a seqüência de cDNA (Figuras 1 e 2). À semelhança de outros genes de fungos filamentosos, todos os íntrons possuem as seqüências consenso GTANGT e C/TAG, envolvidas na sua excisão (Gurr et al., 1987). A seqüência interna NPuCTPuAC também foi detectada e o tamanho dos íntrons coincide com o descrito para fungos filamentosos (Rambosek e Leach, 1987).

Um polipeptídeo de 376 aminoácidos (aas) foi deduzido a partir da seqüência do gene *pgg1*, com um possível sítio de glicosilação (Asn³⁰⁷) e massa molecular predita de 38,4 KDa. A proteína deduzida de *pgg2* possui 369 aas, 38,3 KDa e dois potenciais sítios de glicosilação (Asn³⁰⁰ e Asn³³⁸). Esses possíveis sítios foram definidos com base na seqüência consenso Asn-X-Thr/Ser. A identidade entre as proteínas PGG1 e PGG2 foi de 57,5%. Acredita-se que os dois genes clonados codifiquem endoPGs devido ao nível de identidade encontrado com as respectivas proteínas de outros fungos (Tabela 1).

TCCAGITTCGTTTCAGGATGAACCGTAGAGGTAATATAAGACTCCCCCTCGICTGCTCTTTGC -73

TTGAAAATCATAAACAACCATCACACTCTTTTAAAACCCACATTCATTTCTATTTTCAT -13

AATTTICTTTATCAATGGCCCTCCAGTICCAAACITGGCTTGATTGCCCTACTCGGIGCGACT 48

atggcctccagtctcaaacttggcttgattgccctactcggtgogact

M A S S L K L G L I A L L G A T 16

GCTGTCAACGCAGCTCCCGCGCTGAGCCCGTTCTTGGAACTCTCTCCTTACTTCTCGT 108
gctgtcaacgcagctcccgcgctgagcccggttcttggaaacctctctccttacttctcgt
A V N A A P A A E P V L G T S L L T S R 36

GCTTCTTGTTACCTTCTCCGGCTCCAGCGGTGCTGCGGAAGCCATCAAGAGCAAGACCTCT 168
gcttcttgttaccttctccggctccagcgggtgctgcggaagccatcaagagcaagacctct
A S C T F S G S S G A A E A I K S K T S 56

TGCTCAACCATTACCCCTGAGCAACGTCGAAGTCCCGCGCGAAGTACTCTTGGACCTGACA 228
tgctcaaccattaccctgagcaacgtcgaagtcccgcgcggaactactcggacctgaca
C S T I T L S N V E V P A G T T L D L T 76

GGACTCAAGTCCGGTACCACGtaagctcatcacgatctccaacctcaaatctccacta 288
ggactcaagtccgggtaccac-----ínton 1-----
G L K S G T T 83

aaccttatctcgcatagCGTCATCTTCGAAGGAACCACCACCTTCGGTTACAAGGAATGG 348
-----cgtcatcttcgaaggaaccaccaccttcgggttacaaggaatgg
V I F E G T T T F G Y K E W 97

GAAGGTCCCTCTGGTCTCCGGTCCCGAACCTCCATCACCGTCCAGGGTGCCTCAGGGCGG 408
gaaggtcctctggtctccggtctccggaaacctccatcacggtccaggggtgctcaggcgcg
E G P L V S V S G T S I T V Q G A S G A 117

CAGCTCAACGGTATGGTGCCTGGTGGGACGGCAAGGGAACCAACGGCGGCAAGACC 468
cagctcaacggtgatggtgcccgctggtgggacggcaagggaaaccaacggcggcaagacc
Q L N G D G A R W W D G K G T N G G K T 137

AAGCCCAAGTTCCTTCTACGCTCACAGCTTGACCAACTCCAAGATCGAGAACATCTACATC 528
aagcccaagttcttctacgctcacagcttgaccaactccaagatcgagaacatctacatc
K P K F F Y A H S L T N S K I E N I Y I 157

AAGAACTCCCCGTCAGGTCCTTACGATCAACGGCGCCAAGGAGCTGACTCTTAGCGGA 588
aagaaactccccgctcaggtcttcagcatcaacggcgccaagagctgactcttagcgga
K N S P V Q V F S I N G A K E L T L S G 177

ATCACCGTTCGACACCGCTGACGGCGATAGCAACGGCGGCCACAACACCGACGCTTTTCGAC 648
atcaccgctcgcacacgctgacggcgatagcaacggcggccacaacacggacgcttttcgac
I T V D T A D G D S N G G H N T D A F D 197

GTCGGCTCCAGCAACGGTGTCTACATCACAGCCCTATCGTCCACAACCCAGGATGACTGC 708
gtcggctccagcaacgggtgtctacatcacagccctatcgtccacaacccaggatgactgc
gtcggctccagcaacgggtgtctacatcaccagccctatcgtccacaacccaggatgactgc

Figura 1 - Seqüência de nucleotídeos do gene *pgg1* que codifica endopoligalacturonase de *Penicillium griseoroseum*. Os códons de início e término da tradução estão em negrito. Um possível TATA "box" encontra-se grifado. A seqüência de nucleotídeos do cDNA está representada por letras minúsculas, onde os traços correspondem à posição ocupada por íntrons (em azul). A seqüência de aminoácidos deduzida encontra-se abaixo do cDNA. Um possível sítio de glicosilação está identificado por asterisco.


```

A S A P V T D L V E R G S S S C T F T S      40

GCCGCTGCCGCCAAGGCTGGCAAGTCTCTGCTCCACCATTGIGCTGGACAACATCAAG 180
gccgctgccgccaaaggctggcaagtctcctgctccaccattgtgctggacaacatcaag
A A A A K A G K S S C S T I V L D N I K      60

GTCCCGCCGGGAGACCCCTCGACCTTTCCAAGCTGAAGAGCGGCACTAAGgtagattat 240
gtccccgcggcgagaccctcgacctttccaagctgaagagcggcactaag-----
V P A G E T L D L S K L K S G T K          77

tccgttattcaagcgccaagaatcaaagttctaatagctactgtatagGTCATCTTCAA 300
-----intron 1-----gtcatcttcaa
V I F K          81

GGCGAAACCACCTTTGGGATACAAGGAGTGGACCGGTCGCCCTCATCCGGTTCTCTGGAGA 360
ggcgaaaccactttgggatacaaggagtggaccggtcccctcatccggttctctggaga
G E T T L G Y K E W T G P L I R F S G D      101

TAACATTAACGTCCTCCGGTGCATCCGGCCATGTCGTCAACGGTGGCGGCCCCAGCTGGTG 420
taacattaacgtctccggtgcatccggccatgtcgtcaacggtggcggccccagctggtg
N I N V S G A S G H V V N G G G P S W W      121

GGACGGAAGGGAACCAACGGCGGAAAGAAGCCCAAGTTCTTCTACGCCACGGCTT 480
ggacggaaagggaaccaacggcggaaagaagaagcccaagttcttctacgccacggctt
D G K G T N G G K K K P K F F Y A H G L      141

GGACAACCTCGAACATCTCCGGCCTTAACGTCAGAACACCCCGTCCAGGGTTTCAGTGT 540
ggacaactcgaacatctccggccttaacgtcaagaacaccccggtccagggtttcagtg
D N S N I S G L N V K N T P V Q G F S V      161

CCAGGCCGACCACCTGGTCTCGACCACATCACCATCGACAACAGCGAGGGTIGACTCCAA 600
ccagggcggaccacctggtcctcgaccacatcaccatcgacaacagcgggtgactccaa
Q A D H L V L D H I T I D N S E G D S K      181

```

Figura 2 - Seqüência de nucleotídeos do gene *pgg2* que codifica endopoligalacturonase de *Penicillium griseoroseum*. Os códons de início e término da tradução estão em negrito. A seqüência de nucleotídeos do cDNA está representada por letras minúsculas, onde os traços correspondem à posição ocupada por íntrons (em azul). A seqüência de aminoácidos deduzida encontra-se abaixo do cDNA. Possíveis sítios de glicosilação estão identificados por asteriscos.

```

GGGIGGCCACCACACCGATGCCTTCGATGTTGGCTCCAGTACCTACATCACCATCAGCAA 660
gggtggccaccacaccgatgccttcgatgttggctccagtacctacatcaccatcagcaa
G G H H T D A F D V G S S T Y I T I S N      201

CGCCAACATCAAGAACCAGGACGACTGCCTGGCTATCAACICTGGCGAGgtaagtcaaag 720
cgccaacatcaagaaccaggacgactgcctggctatcaactctggcgag-----
A N I K N Q D D C L A I N S G E          217

acactcctattaaaaatatttggcattaactaaccttgtcctccagCACATCACCTTCA 780
-----intron 2-----cacatcaccttca

```


H I T F T 222

CCGGTGGCACCTGCTCCGGTGGCCACGGTATCTCCATCGGTTCCGGTTGGTGTGCGGACA 840
ccggtggcacctgctccggtggccacggtatctccatcggttccggttggtgtgcgcgaca
G G T C S G G H G I S I G S V G V R D N 242

ACAACATCGTGAAGGATGTCACCATCTCTGACTCCAGTGTGTCACACTCCGACAACGGTIG 900
acaacatcgtgaaggatgtcaccatctctgactccagtggtgtcgaactccgacaacggtg
N I V K D V T I S D S S V V N S D N G V 262

TCCGCGTCAAGACCATCTACAAAGGCTACCGGTGCCGTCCTCCGACGTCACCTTCTCCAAACA 960
tccgcgtaagaccatctacaaggctaccggtgccgtctccgacgtcactttctccaaca
R V K T I Y K A T G A V S D V T F S N I 282

TCAAGCTGTCCAACATCGCCAAAGTACCGTATCGTTCATCGAGCAGGATTACCAGAACGGCA 1020
tcaagctgtccaacatcgccaagtaacggtatcgtcatcgagcaggattaccagaacggca
K L S N I A K Y G I V I E Q D Y Q N G S 302

*

GCCCTACCGGCAAGCCACCACCGGTGTCCCATTAATGCGCTCAAGGTTGAGAAGGTTA 1080
gccctaccggcaagccaccacoggtgtcccatctactggcctcaaggttgagaaggtta
P T G K P T T G V P I T G L K V E K V T 322

CCGTACCGTTAAGAGCAGCGGTACTGACGCTACATCTCTGCGGTAACGGTAGCTGCA 1140
ccgtaccgttaagagcagcggtactgacgtctacattctctcggtaacggtagctgca
G T V K S S G T D V Y I L C G N G S C K 342

*

AGAACTGGACCTGGACTGGAAACTCCGTCACCTGGTGGTAAGAAGAGCAGCAAGTGTCTTG 1200
agaactggacctggactggaaactccgtcactggtggttaagaagagcagcaagtgtctg
N W T W T G N S V T G G K K S S K C S G 362

GTTGCCCTCCGGCGCTTCTGCTAGATTGGCCAGCGATCAAATGGTGTCAATAAACAGC 1260
gttgccctccggcgcttctgctagattggccagcgatcaaatgggtgtcaataaacagc
V P S G A S C

369

ATGACACCAGCAGGGCAGAGACTGGGTTATCTTCAAGAAAAGATTTGACTGGATGACCTA 1320
AGGAATAGCCAGGTGAAATAGATGCTAGTCGCATTGTTATTTTCAACATAAATTGTACTTA 1380
TATATAGCCGCTATAGATGGATTTAAAA

Figura 2 (continuação)

Tabela 1 - Comparação da percentagem de identidade entre endopoligalacturonases de fungos filamentosos.

PERCENTAGEM DE IDENTIDADE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
PERCENTAGEM DE DISSIMILARIDADE	1		56,2	61,2	55,6	54,2	56,2	64,5	62,8	55,3	55,0	56,1	1 <i>S.sclerotiorum (pg1)</i>
	2	55,3		60,6	62,3	54,3	64,7	62,0	60,1	63,4	65,8	57,9	2 <i>A.parasiticus (pecA)</i>
	3	46,3	46,3		62,0	51,2	61,4	59,2	60,9	61,4	60,1	51,2	3 <i>C.lidemuthianum (clpg1)</i>
	4	54,4	48,3	46,6		48,8	78,2	56,9	57,8	84,2	62,9	52,6	4 <i>P.digitatum</i>
	5	61,7	56,3	67,6	67,4		51,9	54,0	53,7	49,1	50,9	49,7	5 <i>P.expansum (pepg1)</i>
	6	54,4	43,3	46,1	23,5	62,3		60,0	59,2	81,3	67,6	52,7	6 <i>P.olsonii (pg1)</i>
	7	39,8	50,5	49,9	57,9	58,9	53,9		69,9	56,9	60,6	66,4	7 <i>P.olsonii (pg2)</i>
	8	42,1	52,2	48,2	56,6	59,3	53,1	34,5		57,5	62,8	59,0	8 <i>P.griseoroseum (pgg1)</i>
	9	56,2	46,2	47,8	15,7	66,2	18,4	58,0	57,8		64,5	50,1	9 <i>P.griseoroseum (pgg2)</i>
	10	55,2	42,0	47,6	46,9	63,8	39,4	50,0	49,3	47,0		58,5	10 <i>P.janthinellum</i>
	11	55,4	54,1	67,6	67,4	69,0	62,3	39,7	55,0	67,5	52,4		11 <i>A.niger (pgall)</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

Um dendrograma foi construído a partir do alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de 44 endoPGs produzidas por fungos filamentosos (Figura 3). À semelhança do observado por Wubben et al. (1999), as endoPGs foram posicionadas em diferentes grupos. Considerando o gênero *Penicillium*, dois grupos distintos foram formados. No primeiro, observou-se uma alta similaridade (78 a 84%) entre os genes de *P. griseoroseum (pgg2)*, *P. olsonii (pg1)* e *P. digitatum*. O outro grupo é composto pelos genes de *P. griseoroseum (pgg1)*, *P. olsonii (pg2)* e *P. expansum*. Em uma análise filogenética realizada por Kester et al. (1996), 24 PGs de fungos, bactérias e plantas foram posicionadas em três classes distintas. Apenas oito resíduos mostraram-se conservados em todas as proteínas. Experimentos de cristalografia de raio-X revelaram a existência de uma fenda na estrutura da PgaII de *A. niger*, onde esses resíduos estão localizados (van Santen et al., 1999). Mutagênese sítio direcionada no gene *pgaII* mostrou o envolvimento dos resíduos Asp¹⁸⁰, Asp²⁰¹, Asp²⁰² e His²²³ na catálise enzimática e

a importância dos resíduos Arg²⁵⁶ e Lys²⁵⁸ para ligação ao substrato.

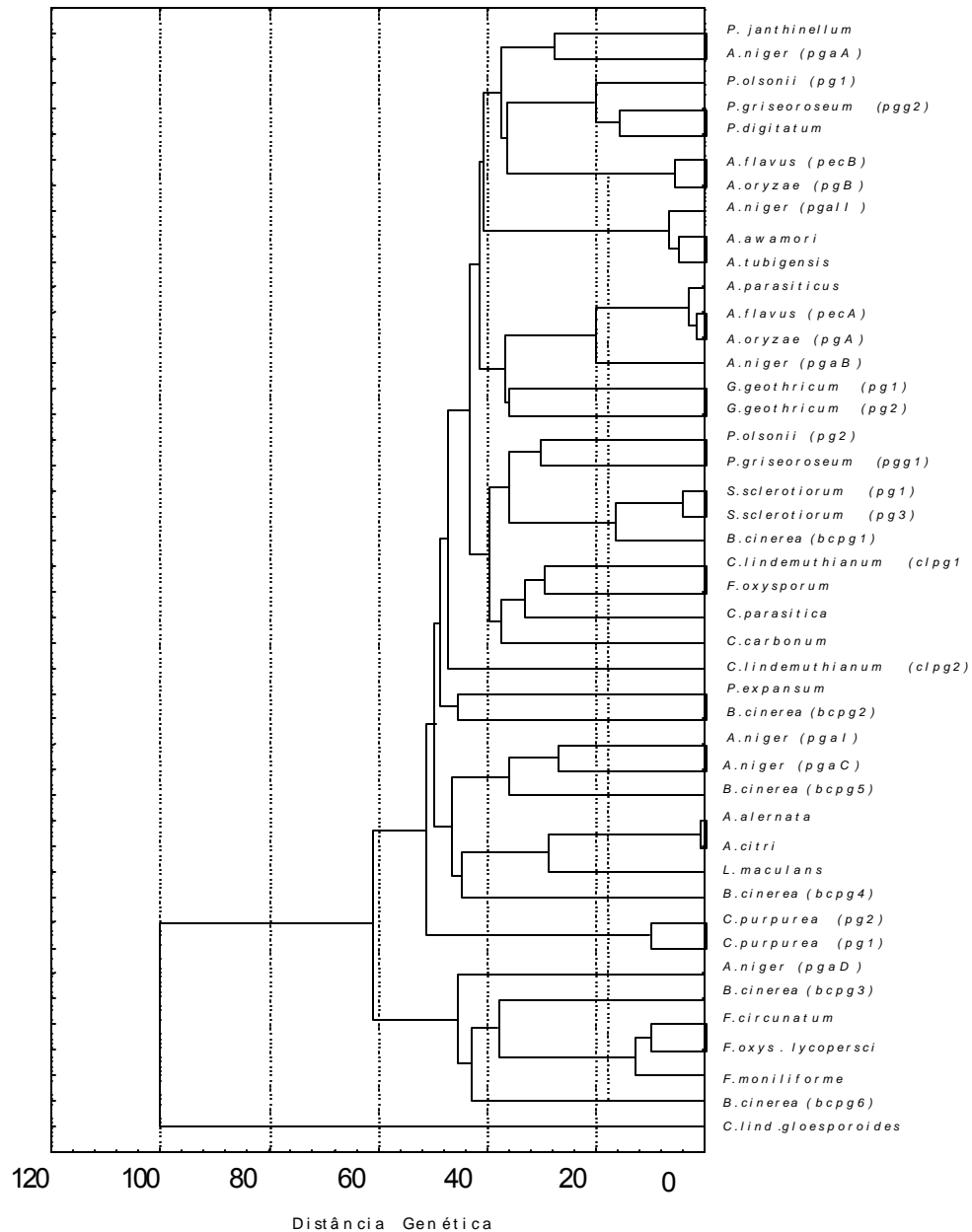


Figura 3 - Agrupamento de 44 endopoligalacturonases de fungos filamentosos baseado no método UPGMA. O dendrograma foi baseado na percentagem de dissimilaridade entre as proteínas.

O sequenciamento do plasmídeo pPG4.3 revelou que este clone contém uma seqüência que apresenta alto grau de homologia com o gene que codifica 2-fosfo-D-glicerato (enolase) de vários organismos, sugerindo que este gene e o gene *pgg2* estão adjacentes no genoma de *P. griseoroseum*. Porém, não foi possível estabelecer a correta distância de pares de base entre eles.

A organização dos genes de poligalacturonases no genoma de *P. griseoroseum* foi analisada por hibridização do DNA total. Verificou-se que poucas bandas hibridizaram com a sonda utilizada mesmo sob condições de baixo rigor (Figura 4). As bandas visualizadas corresponderam àquelas detectadas quando as membranas foram re-hibridizadas, a 65°C, com os genes *pgg1* e *pgg2*, separadamente, sugerindo assim a existência de apenas dois genes de endoPGs em *P. griseoroseum*.

Experimentos conduzidos por D'Ângelo (1998) sugerem que *P. griseoroseum* secreta três isoformas de poligalacturonase. Dois picos de atividade foram eluídos de coluna CM Sephadex C-50, caracterizando a eluição de duas PGs de caráter básico (PG1 e PG2). Apenas um pico com atividade de PG (PG3) foi eluído de coluna DEAE Sephadex A-50. Com base nas seqüências gênicas, os pontos isoelétricos calculados das proteínas PGG1 e PGG2 são, respectivamente, 5,31 e 8,31. Sugere-se assim, que PGG1 corresponda à PG3 eluída, enquanto que PGG2 representa PG1 ou PG2. Os dados da Figura 2 revelam a existência de apenas dois genes de PG no genoma de *P. griseoroseum*. Portanto, acredita-se que a terceira isoforma purificada por D'Ângelo seja na verdade uma exoPG.

Análises de hibridização mostraram que os genes *pgg1* e *pgg2* estão presentes em cópias únicas no genoma de *P. griseoroseum* (Figura 5). O mesmo foi reportado para os genes *clpg1* e *clpg2*, de *Colletotrichum lindemuthianum*, *pg1* e *pg2*, de *P. olsonii* e *bcp1*, de *Botrytis cinerea* (Centis et al., 1996; Centis et al., 1997; ten Have et al., 1998; Wagner et al., 2000).

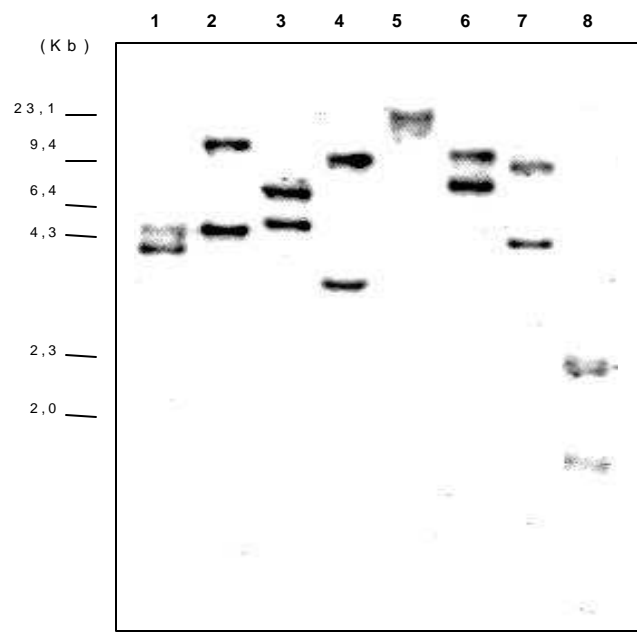


Figura 4 - Hibridização do DNA total de *Penicillium griseoroseum* com o fragmento de 420 pb amplificado de seu genoma. O DNA total foi extraído, clivado com *Bam*HI (1), *Cla*I (2), *Eco*RI (3), *Eco*RV (4), *Hind*III (5), *Sac*I(6), *Sal*I(7), *Xba*I (8) e hibridizado, a 60°C.

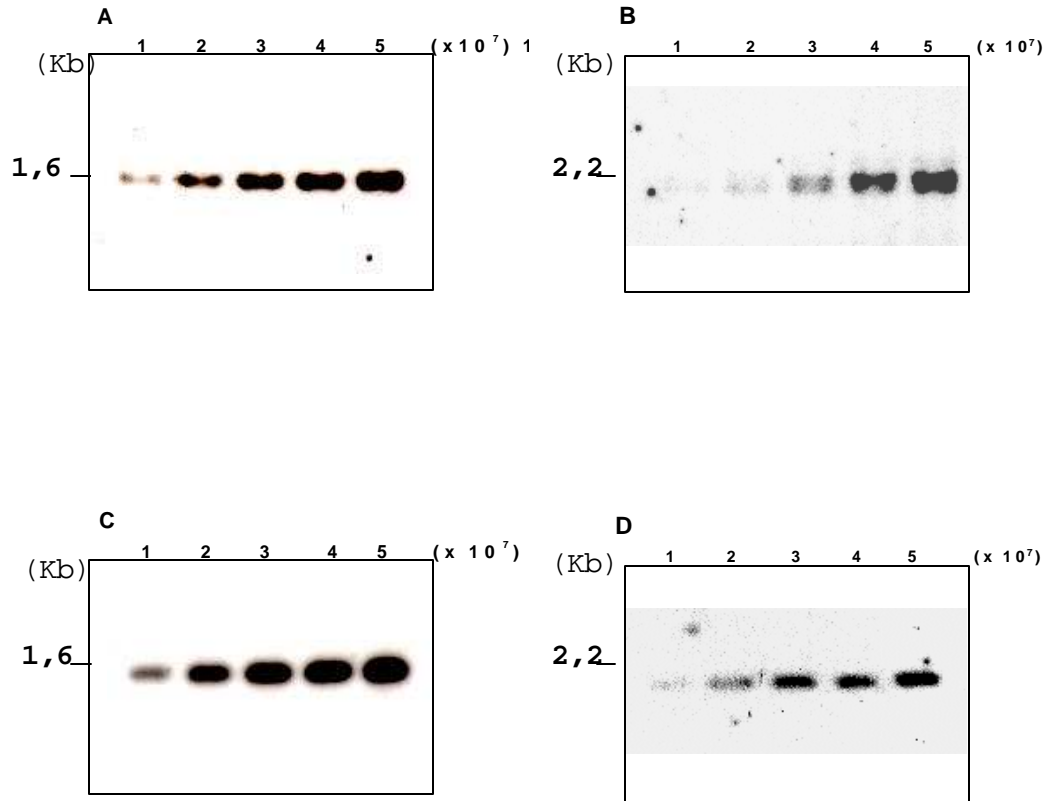


Figura 5 - Determinação do número de cópias dos genes que codificam endopoligalacturonases em *Penicillium griseoroseum*. O DNA total do fungo foi extraído e o correspondente a 1, 2, 3, 4 e 5 x 10⁷ cópias do genoma haplóide foi clivado com *Xba*I, transferido para membranas de náilon e hibridizado com o gene *pgg1* (A e C) ou *pgg2* (B e D). Adotou-se o mesmo procedimento com os plasmídeos pPG21 (C) e pPG15 (D), que contêm os genes *pgg1* e *pgg2*, respectivamente.

A presença de homólogos a genes de endopoligalacturonases no genoma de diferentes fungos do gênero *Penicillium* foi analisada por hibridização do DNA total, sob condições de baixo rigor (Figura 6). Todas as espécies analisadas apresentam pelo menos um gene de endoPG, embora nada possa ser afirmado a respeito de sua funcionalidade. Padrões similares

foram observados em *P. griseoroseum*, *P. expansum*, *P. italicum* e *P. purpurogenum* o que sugere uma organização estrutural semelhante nessas espécies. Em *A. niger*, *B. cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* já foi demonstrado a existência de famílias de genes de endoPGs que são constituídas por no mínimo seis membros (Fraissinet-Tachet et al., 1995; Parenicová et al., 1998; Wubben et al., 1999).

De todos as seqüências de genes disponibilizadas nos bancos internacionais, 53 codificam endopoligalacturonases de fungos filamentosos e destas, apenas sete são de *Penicillium* (Figura 7). As seqüências de nucleotídeos destes genes e suas respectivas seqüências aminoacídicas foram comparadas quanto à organização, número, tamanho e localização de íntrons, sítios de processamento de íntrons, seqüências consenso de início e fim de tradução e utilização de códons preferenciais.

O códon de início de tradução foi representado por **AUG** em todas as poligalacturonases de *Penicillium*. A comparação de poucos genes dificultou a definição de uma seqüência consenso na região próxima a esse códon. Existe uma preferência por purinas antes do códon **ATG** ($Pu_{5,7}Pu_{100}Pu_{7,1}ATG$), sendo **A** sempre observada a posição -3. Porém, **ATG** não foi sucedido por **GC**, como descrito para outros genes de fungos filamentosos. Ballance (1986) definiu a seqüência TCACA**ATG**GC como a mais provável de ser encontrada nessa região. Edelman e Staben (1994) descreveram a seqüência CAM**ATG**GCT (M= C/A) como consenso a partir da comparação de 88 genes de *Neurospora*. Contudo, CCACC**ATG**GC foi descrita por Kozak (1981), onde a posição -3 é sempre ocupada por uma purina, normalmente **A**. Todos os códons de término da tradução foram utilizados pelo menos uma vez.

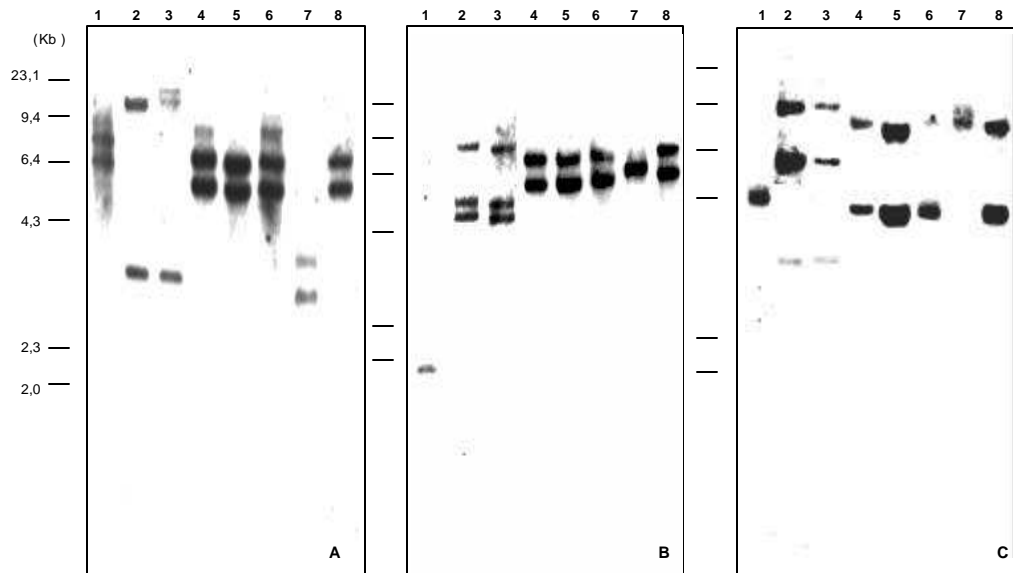


Figura 6 - Hibridização do DNA total de espécies do gênero *Penicillium* com o fragmento de DNA de 420 pb, amplificado do genoma de *P. griseoroseum*. O DNA total de *Penicillium chrysogenum* (1), *P. charlesii* (2), *P. citrinum* (3), *P. expansum* (4), *P. griseoroseum* (5), *P. italicum* (6), *P. janthinellum* (7) e *P. purpurogenum* (8) foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* (A), *SacI* (B) e *SalI* (C) e hibridizado a 60°C.

Os genes de poligalacturonases de *Penicillium* possuem íntrons conservados quanto a localização, embora apresentem variação de seqüência (Figura 7). Os genes *pepg1* de *P. expansum* e *pg2* de *P. olsonii* possuem um íntron a mais, que, coincidentemente, estão na mesma posição. O gene *pg1* de *P. olsonii* possui apenas um íntron, localizado na região do segundo íntron dos demais genes. A conservação na posição de íntrons entre genes correspondentes de fungos filamentosos é bastante comum, porém poucos conservam a mesma seqüência (Gurr et al., 1987; Unkles, 1992). Os genes

pga I, *pga II*, *pgaC* e *pgaE* de *A. niger* apresentam respectivamente 2, 1, 3 e 3 íntrons de seqüências variadas, embora as posições sejam idênticas (Benen et al., 1996).

Todos os íntrons presentes nos genes de poligalacturonases de *Penicillium* apresentam a região 5' terminal, GTANRN, semelhante à descrita para demais íntrons de fungos filamentosos, GTRNGY (Unkles, 1992), porém com uma preferência por T na sexta posição. Todos eles, sem exceção, terminaram em PyAG. A seqüência interna CTRACT/G foi a que mais se aproximou da consenso NNCTRAY, descrita por Parenocová et al., (1998) como necessária para um correto processamento. Os maiores íntrons foram observados em *P. expansum* (77 pb) e *P. janthinellum* (88 pb), enquanto o menor foi observado no gene *pg1* de *P. olsonii* (50 pb).

Gurr et al. (1987) descreveram que, em fungos filamentosos, muito genes mostram uma preferência de códons. O mesmo foi observado nesta análise, onde alguns códons não foram encontrados nas seqüências de nucleotídeos comparadas que codificam as PGs (Tabela 2). De modo geral, o padrão de utilização de códons em PGs de *Penicillium* foi muito semelhante ao relatado por Bussink et al. (1991), que fizeram uma comparação entre *pgaI* e *pgaII* de *A. niger*. Os códons preferenciais também foram os mesmos observados na comparação dos genes *glaA* de *A. niger*, *A. shirousami* e *A. oryzae* (Unkles, 1992). Acredita-se que a

		1	15 16	30 31	45 46
60 61	75 76	90			
1 <i>Pdigitatum</i>	-----TCAACACTCT	TTTGTTTTTACGTGT	CTGTTGATCGGACA-		
TCTACTTC-AAAATG	CGCACATCTTTC---	GTTACCATGCTG-GC	79		
2 <i>pgg2</i>	-----	-----	-----	-----	-----A-
CCTACTT-AAAATG	CGTACTTCTTTC---	GTTACCATGCTG-GC	40		
3 <i>pg1</i>	-----	-----	-----	-----	-----A-
TCTACTTC-AAAATG	CGTACCTCCATT---	CTGTCTATGCTC-GC	41		
4 <i>pgg1</i>	-----	-----	-----	-----	-----
CTTT-ATCATG	GCCTCCAGTCTCAA	CTTGGCTTGATT-GC	39		
5 <i>Pjanthinellum</i>	-----	-----	-----	-----	-----AACAGAACAAATCT-
ACTGCTTGCAATG	CCTTCCATCTC---	CGGAATTTGGTCTGG	55		
6 <i>pg2</i>	-----	-----	-----	-----	-----AGTACTGC-
ACGTCATCAACATG	ATTGCAGGCTCGAAA	CTTCTCATGCTC-GG	52		
7 <i>Pexpansum</i>	TCCAGTATCTTCATC	ACCAGTTTTATTCA	ATTCAAAGTATTTAG		
TCTCCGTCGAATG	ATCTTGACACGC---	AGTGTGTTCTG-GG	86		
		91	105 106	120 121	135 136
150 151	165 166	180			
1 <i>Pdigitatum</i>	CCT---CGGCGCCG	CGCC---GTGTCCGC	TGCCCC---AGCT--	----	
GCTCCTGTT-A	CTG-ATCTCGTTGAG	---CGCG-GCTCG-	146		
2 <i>pgg2</i>	CCT---CGGCGCCG	CGCT---GTGTCCGC	TGCCCC---GGCTT-	--	
CCGCCCCCGTT-A	CCG-ATCTCGTTGAG	---CGCG-GCTCCT	111		
3 <i>pg1</i>	CCT---CGGCGCTG	TGCC---GTCTCCGC	CGCCCTGCGGCTG-	--	
CCGCTGCTCCT-G	CTG-AGCTCGTTGAG	---CGCG-GTTCTT	115		
4 <i>pgg1</i>	CCTACTCGGTGCGAC	TGCT---GTCAACGC	AGCTCCCGCCGCTGA		
GCCCGTTCTTGGGA-A	CCT-CTCTCCTTACT	TCT-CGTG-CCTTCT	122		
5 <i>Pjanthinellum</i>	GCTACCCTG-GCTGC	CGGCCTGGTGTCTGC	GGCTCCCACCCTT-	----	
-CGCGTGT-T	CGG-ATCTGACCAAG	A---AGTC-G-TCCT	131		
6 <i>pg2</i>	TCTCTTCGGAGCCTT	GGCA---GTACACGC	ACTCCAGAGCCAGC		
CAAGGCTCAGGTT-A	CGGCAGCTCCGAAAC	TCAAGAGAGAGCGA	138		
7 <i>Pexpansum</i>	ATTTCTGGGCTCAGC	GTCTTGCCCTCGC	CTCTCC---GGTTG-	--	
CCGAACTGGCTGA	AGGGAGCAGACTCAC	CCCTCGTG-GATCTG	169		
		181	195 196	210 211	225 226
240 241	255 256	270			
1 <i>Pdigitatum</i>	-----AGTGCACCT	TCACCACCCTGAAG	CGG---CCAAGGCTG		
GCAAGGG-----AT-	CTTGCTCCACCATTG	TGCTGGACAACATCA	222		
2 <i>pgg2</i>	C---CAGCTGTACCT	TCACCTCGGCCGCTG	CCG---CCAAGGCTG		
GCAAGTC-----CT-	CCTGCTCCACCATTG	TGCTGGACAACATCA	189		
3 <i>pg1</i>	C-----CTGCACCT	TCACCTCCGCTTCTG	CTG---CTAAGGCCG		
GCAAGAA-----GT-	CTTGCTCCAGCATCG	TCCTTGACAACATCA	190		
4 <i>pgg1</i>	G---TACCTTCTCCG	GCTCCAGCGGTGCTG	CGGAAGCCATCAAGA		
GCAAGAC-----CT-	CTTGCTCAACCATTA	CCCTGAGCAACGTCG	203		
5 <i>Pjanthinellum</i>	C---CACCTGCACCT	TCTCCTCGGCTGCTA	GTG---CCAGCGCCA		
GCAAGTC-----CT-	CCTGCTCCACGATTG	TTCTGAGTAACATG	209		
6 <i>pg2</i>	C---CAGCTGCACCT	TCTCCGGGTCTGCTG	GTGCTCTGTCAGCGA		
GCAAGTCGAAGACTG	CTTGTCACCATTG	TACTGTCCGAGTGG	225		
7 <i>Pexpansum</i>	CATGCAGCTATTCGG	GAACCAGTGGTGCAG	CAGCAGCGATAGCTG		
GAAAGGC-----AG	GTTGCTCCAGTATTA	CTCTCAACAACGTTG	253		
		271	285 286	300 301	315 316
330 331	345 346	360			
1 <i>Pdigitatum</i>	AGGTCCCTGCCGGTG	AGACCCTCGACCTTA	CCAAGCTGAAGTCCG		
GTACTCAGGTA-----	GGTTGCTC-	TGTTATGCAAGC---	298		
2 <i>pgg2</i>	AGGTCCCCGCCGGCG	AGACCCTCGACCTTT	CCAAGCTGAAGAGCG		
GCACTAAGGTA-----	GATTATTC-	CGTTATTCAGC---	265		
3 <i>pg1</i>	AGGTCCCCGCTGGTG	AGACTCTTGATCTGT	CCAACCTCAAGAGCG		
GCAC-----	-----CAAG---	-----	243		
4 <i>pgg1</i>	AAGTCCCCGCCGGAA	CTACTCTGGACCTGA	CAGGACTCAAGTCCG		
GTACCACC	-----AGCTCATCA	CGATCTCCAACC---	280		
5 <i>Pjanthinellum</i>	AGGTGCTGCGGGTA	AAACTCGATCTGA	CGGACCTGAAGGACG		
GAACCAAG	GTACGGC	GCCGAGGGCCAACCC	CGAACCAATCCCC	299	
6 <i>pg2</i>	CTGTGCCATCTGGCA	CGACCTTGATTTGA	CTGGTCTGAATGATG		
GGACAAGTGTAC---	-----ATGAAACGT	TGATCCACTATCGTG	306		
7 <i>Pexpansum</i>	TAGTGCCTGCCGGGA	CTACGCTGGATTTGA	CTGGTCTGGCCTCGG		
GTACCAAGGTA-----	-----AAAAC	C---CCTCCAACCCG	328		

Figura 6 - Comparação da seqüência da região codificadora dos genes que codificam endopoligalacturonases de *Penicillium digitatum* (1), *pgg2* de *P. griseoroseum* (2), *pg1* de *P. olsonii* (3), *pgg1* de *P. griseoroseum* (4), *P. janthinellum* (5), *pg2* de *P. olsonii* (6), *P. expansum* (7). Os códons de início e término da tradução estão sublinhados. Os íntrons estão destacados em negrito.

```

420 421          435 436          361          375 376          390 391          405 406
1 Pdigitatum      GTCACCCCC-CACAT ATCT-----AACC  ---GCTACT-GTGT  ---
AGGTCGCTTTC AAGGGCGAAACCTCT TTCGGATACAAGGAG 371
2 pgg2           GCCAAGAAATCAAAG TTCT-----AATA  ---GCTACT-GTAT  ---
AGGTCATCTTC AAGGGCGAAACCACT TTGGGATACAAGGAG 339
3 Pg1           -----
--GTCACCTTC AAGGGTGAGACCACC TTCGGTTACAAGGAG 282
4 Pgg1         -TCAAATCTCATA- --CT-----AACC  ---TTATCTCGCAT  ---
AGGTCATCTTC GAAGGAACCACCACC TTCGGTTACAAGGAA 351
5 Pjanthinellum GACAGCTCATCAAAT CCCGGGTGTGAATC  CATTCTAATGGTGT
CAACAGGTCATCTTC GAAGGCACCACTACG TTCGGTTACAAGGAG 389
6 Pg2         CGCATCT-TGCTGAT ACCT-----  ---CTCCCTCCCT  ---
AGGTGATATTT GAAGGTGAAACCACA TTTGGTTACAAGAG 375
7 Pexpansum    TGACTCTCTTGCTCT ACCGACA-GCGAATT TAATGAAAATTTTGT  ---
AGGTGATTTTT GAGGGAACCACTACT TTCGGCTATAAGCAG 413

510 511          525 526          540          465 466          480 481          495 496
1 Pdigitatum      TGGACTGGCCCCCTC GTCAGCTTCTCCGGA  AGCAACATTCACGTC
TCCGGCGCTGCCGGC CATGTCATCAACGGT GCGGTCCCAGCTGG 461
2 pgg2           TGGACCGGTCCCCTC ATCCGGTCTCTGGA  GATAACATTAACGTC
TCCGGTGCATCCGGC CATGTCGTCACGGT GCGGCCCCAGCTGG 429
3 pg1           TGAAGGGTCCCCTC ATCCGCTTCTCCGGT  AAGAACATCGAGGTG
AACGGTGCCTCCGGC CATGTCATCAACGGT GCGGTGCCAGCTGG 372
4 pgg1           TGGGAAGTCCCTCTG GTCTCCGTCTCCGGA  ACCTCCATCACGTC
CAGGGTGCCTCAGGC GCGCAGCTCAACGGT GATGGTCCCCGCTGG 441
5 Pjanthinellum TGGAGCGGTCTCTCT ATCAAGATCTCTGGA  TCCGATATCACGTC
GAGGCTGCCGATGGC GCTGTAATTAACGCT GACGGTCCCCTTGG 479
6 pg2           TGGT CAGGGCCTTTG GTCTCGGTCTCCGGC  ACCGACATCACGTC
AAAGGTGCCTCTGGC GCAACACTCAACGGT GACGGAAGCCGTTGG 465
7 Pexpansum    TGGGCTGGCCCTCTG ATCTCCATCTCTGGA  ACCAACATCCAAGTT
TCTGGAGCTTCCGGT CACCTCATCGATGGC CAAGGTTCCCCTGG 503

600 601          615 616          630          555 556          570 571          585 586
1 Pdigitatum      TGGGACGGCAAGGGA ACCAACGGCGG---A  AAGAAGAAGCCCAAG
TTCTTCTACGCCAC CACTT---GGACGAC TCGACCATCAGCGGT 545
2 pgg2           TGGGACGGAAAGGGA ACCAACGGCGG---A  AAGAAGAAGCCCAAG
TTCTTCTACGCCAC GGCTT---GGACAAC TCGAACATCTCCGGC 513
3 pg1           TGGGACGGCAAGGGA ACCAACGGCGG---C  AAGACCAAGCCTAAG
TTCTTCTACGCCAC TCTCT---GGACGAC TCGACCATCACCGGT 456
4 pgg1           TGGGACGGCAAGGGA ACCAACGGCGG---C  AAGACCAAGCCCAAG
TTCTTCTACGCTCAC AGCTT---GACCAAC TCCAAGATCGAGAAC 525
5 Pjanthinellum TGGGATGGAGAGGGC ACCAATGGAGG---C  AAGACCAAGCCCAAG
TTCTTCTATGCCAC TCGTT---GGACGAC TCGACCATCTCGGGC 563
6 pg2           TGGGACGGCAAGGGC TCGAATGGCGG---G  AAGACCAAACCGAAG
TTCTTCTATGCGCAC AAAAT---GTTTTCC TCCACCATCAGTGAC 549
7 Pexpansum    TGGGATGGAGAGGGT TCCAACAGCAAGACC  AACATCAAGCCTAAG
TTCTTCTTCGCCAC AGTCTCAAGGGATCC TCCACTATCACCGGG 593

```

690	691	705	706	631	645	646	660	661	675	676
	1	<i>Pdigitatum</i>		720						
GACCGC	---	CTGACC	CTCGACCACATCACC	ATCGACAACAGCGAG	632					
	2	<i>pgg2</i>		CTTAACGTCAAGAAC	ACCCCGTCCAGGGT					
GACCAC	---	CTGGTC	CTCGACCACATCACC	ATCGACAACAGCGAG	600					
	3	<i>pg1</i>		CTCAACGTCAAGAAC	ACCCCGTCCAGGGC					
GACAAC	---	CTGGTC	CTCGACCACATCACC	ATCGACAACACCGAC	543					
	4	<i>pgg1</i>		ATCTACATCAAGAAC	TCCCCGTGCAGGTC					
GCCAAGGAGCTGACT			CTTAGCGGAATCACC	GTCGACACCCGCTGAC	615					
	5	<i>Pjanthinellum</i>		CTCAATATCAAGAAC	ACCCCGTGCAGGCT					
GACAAT	---	CTTATC	ATTGATGGAGTTACT	ATTGACAATTCGGAC	650					
	6	<i>pg2</i>		ATCCACATCGTGAAC	TCTCCCGTTCAGGTT					
GCAACAGACCTCAGC			CTCAGTGGCATCACT	GTAGACAACCCGCGAT	639					
	7	<i>Pexpansum</i>		TTGAACATCAAGGAT	TCTCCCGTTCAGGTC					
TCGTCCGGTCTCACA			ATCAGTGGTGTCAACA	ATTGACAACAAGAAT	683					

780	781	795	796	721	735	736	750	751	765	766
	1	<i>Pdigitatum</i>		810						
GGCTCCAGTACCTTC			ATCACCATCTCCAAC	GCCAACATCAAGAAC	719					
	2	<i>pgg2</i>		GGTGACT	---	CCAAG	GGTGGCCACCACACC			
GGCTCCAGTACCTAC			ATCACCATCAGCAAC	GCCAACATCAAGAAC	687					
	3	<i>pg1</i>		GGTGACAAGACCAAT	GGTGGCCACAACACC					
GGCGAGTCCACCTAC			ATCACCATCAGCAAC	GCCAACATCAAGAAC	633					

Figura 6 (continuação)

	4	<i>pgg1</i>		GGCGATA	---	GCAAC	GGCGGCCACAACACC			
GGCTCCAGCAACGGT			GTCTACATCACCAGC	CCTATCGTCCACAAC	702					
	5	<i>Pjanthinellum</i>		GGTGACG	---	AAAAT	GGCGGCCACAACACC			
AGCGAGTCCACAGGC			GTTACTATCAGGAAC	GCGGTTGTCAAGAAC	737					
	6	<i>pg2</i>		GGCGACACCCGACGAG	GGAGGCCACAACACC					
GGATCAAGCAGCGGA			ATTACCATTACCGGT	GCGACGGTCTACAAC	729					
	7	<i>Pexpansum</i>		GGTGATACGAACTCT	CTTGGTCAACAATACC					
GGCGACAGTGATAGC			ATTACCATCACTGGT	GCTACGGTTTATAAC	773					

870	871	885	886	811	825	826	840	841	855	856
	1	<i>Pdigitatum</i>		900						
AAAAACACCTCTACC			AGCAAATCAT	---	CA AA	---	TCAA	-----		
	2	<i>pgg2</i>		CAGGACGACTGCCTG	GCTATCAACTCTGGC					
AAAGACACTCCTATT			AAAAATATTT	---	GG CA	---	TTAA	-----		
	3	<i>pg1</i>		CAGGATGACTGCCTG	GCCATCAACTCTGGC					
-CTTTTCCAATA			CGCCCCCTTG	---	TG AA	---	TCATT	-----		
	4	<i>pgg1</i>		CAGGATGACTGCCTG	GCTGTCAACTCCGGC					
CGACAAATTGGGACT			TATCTTTATTTTCATGG	AAC	---	TTTAA	-----			
	5	<i>Pjanthinellum</i>		CAGGATGACTGCATT	GCAATCAACTCCGGC					
AATCAAGTCTCGATG			TATGCAACGAGG	-AT	AAG	---	ATTGC	-----		
	6	<i>pg2</i>		CAAGATGACTGTCTC	GCAGTCAACTCTGGA					
ACATGACCCCG			TGGGCTTTGTACCAT	AAA	---	CTAAG	-----			
	7	<i>Pexpansum</i>		CAAGACGACTGCCTT	GCTATCAATCTGGA					
CGAAGATTGTCGCCC			TGCTTAGCTGCAGGG	AATGATTACCACGGT	860					

960	961	975	976	901	915	916	930	931	945	946
	1	<i>Pdigitatum</i>		990						
CACCTGCTCCGCGG			CCACGGTATCTCCAT	CGGTTCCGTTGGCTT	881					
	2	<i>pgg2</i>		---	CTAACC	---	T	TGTCCTCCAGCACAT		
CACCTGCTCCGGTGG			CCACGGTATCTCCAT	CGGTTCCGTTGGTGT	843					
	3	<i>pg1</i>		---	CTGACA	---	T	---	ACATTAGAACAT	
TACCTGCTCCGGTGG			CCACGGTCTCTCCAT	CGGCTCCGTCGGTGG	781					
	4	<i>pgg1</i>		---	CTAACC	---	GAT	ATTCC	---	CAGAACGT
TCAGTGCACTGGCGG			CCACGGTATCTCCAT	CGGCTCCGTCGGTGG	867					
	5	<i>Pjanthinellum</i>		---	TTGACGAAGT					
TACCTGCTCTGGCGG			CCATGGTCTCTCGAT	TGGCTCCGTCGGTGG	897					
	6	<i>pg2</i>		---	AGACG	---	GT	AT	---	TAGGACAT
TCTTTGCTCTGGTGG			ACATGGCTTGTCCAT	CGGCTCCGTCGGCGG	879					
	7	<i>Pexpansum</i>		TCTTGCTGACCA	---	TT	AATAC	---	CCAGAACAT	
TTACTGCTCTGGTGG			GCACGGATTGTCTAT	CGGCTCAGTCGGTGG	948					

1050	1051	1065	1066	991	1005	1006	1020	1021	1035	1036
				1080						

1	<i>Pdigitatum</i>	GCGCGACAACAACAT	CGTGAAGGATGTCAC	CATCTCTGACTCTAC
		-----GAC--	942	
2	<i>pgg2</i>	GCGCGACAACAACAT	CGTGAAGGATGTCAC	CATCTCTGACTCCAG
		-----GAC--	904	
3	<i>pg1</i>	ACGTGACGACAACAC	CGTCAAGAACGTGAC	CATCTCCGACTCCAC
		-----GAC--	842	
4	<i>pgg1</i>	ACGCTCCGACAACAC	CGTTGACGGTGTGAC	CGTCGAGAGCTGCAC
		-----GAC--	928	
5	<i>Pjanthinellum</i>	TCGTGATGATAACAC	CGTGAAGAACGTGAC	GATCACAGATTCCAC
		-----GCC--	958	
6	<i>pg2</i>	ACGCAGCAACAACGA	TGTTGCCAACGTCAT	CATCGAGAACTCGCA
			967	
7	<i>Pexpansum</i>	CCGTTCCAATAATGT	GGTAGAGACCGTCCA	TATCAGCAGCACCCA
		GAATG GTAAGCCCGA	GCCGCATAATGACTA	1038

		1081	1095 1096	1110 1111	1125 1126
1140 1141		1155 1156	1170		
1	<i>Pdigitatum</i>	A-----	---AC-----		---GGTGTCCGCGT
		CAAGACCATCTACCA	GGCCACCGGTGCTGT	CTCCGGCGTCACTTT	1001
2	<i>pgg2</i>	A-----	---AC-----		---GGTGTCCGCGT
		CAAGACCATCTACAA	GGCTACCGGTGCCGT	CTCCGACGTCACCTT	963
3	<i>pg1</i>	A-----	---AC-----		---GGTATCCGCAT
		CAAGACCATCTACAA	GGCCAAGGGTGAGGT	CGCCGACGTCACCTT	901
4	<i>pgg1</i>	A-----	---AC-----		---GGCGTCCGCAT
		CAAGACCGTCTACGG	CGCCACCGGTACAGT	CCAAGGCGTCACCTA	987
5	<i>Pjanthinellum</i>	A-----	---AC-----		---GGAGTTCGCAT
		CAAGACCGTTTTACGA	TGCTACTGGCTCTGT	TAGCGACGTGACTTT	1017
6	<i>pg2</i>		ATTGTCTGTTTGGTA	TGACTTGTGGTAC-	---AGGCGTGC GGAT
		CAAGACCGTTTTACGA	GGCCACTGGCTCTGT	CAAAAATGTCACCTA	1053
7	<i>Pexpansum</i>		AGTTTCCCGTTTCT	TGAACTGATATTCT	GTCAGGTGTCCGTGT
		CAAGGTGTCTCTGG	TGCCACCGGTACTAT	CAAAGGCGTGACTTT	1128

Figura 6 (continuação)

		1171	1185 1186	1200 1201	1215 1216
1230 1231		1245 1246	1260		
1	<i>Pdigitatum</i>		CTCCAACATCAAGCT	GTCCAACATCGCCAA	GTACGGTATCGTCAT
			CGAGCAGGATTACGA	GAACGGCAGCCCTAC	CGGCAAGCCCACCAA
				1091	
2	<i>pgg2</i>		CTCCAACATCAAGCT	GTCCAACATCGCCAA	GTACGGTATCGTCAT
			CGAGCAGGATTACCA	GAACGGCAGCCCTAC	CGGCAAGCCCACCAC
				1053	
3	<i>pg1</i>		CTCCAACATCGAGCT	CTCCAACATCGCCAA	GTACGGTATCGTCAT
			CGAGCAGGACTACGA	GAACGGCAGCCCCAC	CGGCAAGCCCACCAC
				991	
4	<i>pgg1</i>		CAAGGACATCACTCT	TTCCGGAATTGCCAA	GTACGGTATCGTCAT
			CGAGCAGGATTACGA	GAACGGTAGCCCTAC	CGGAACCCCACCAG
				1077	
5	<i>Pjanthinellum</i>		TTCCGACATCACGGT	CTCTGGTATTACCGA	CTATGGCATTGTGAT
			TGAGCAGGACTACGA	GAACGGTTCTCCGAC	CGGCACCTCCTACCAG
				1107	
6	<i>pg2</i>		CAAGGACATCACGCT	TTCGGGAATCACCAA	ATATGGGATTGTGAT
			CGAACAAGACTACGA	GAATGGCAGTCCCAC	TGGCACACCGACCGA
				1143	
7	<i>Pexpansum</i>		CCAGGATATTACCCT	CTCCGGCATTACGAG	CCAGGGTATCACCAT
			CCGCCAAGAATACAC	CAACTCTGGCTACAC	TGGAAGCCCCACGAC
				1218	

		1261	1275 1276	1290 1291	1305 1306
1320 1321		1335 1336	1350		
1	<i>Pdigitatum</i>		CGGTGTCCCCATCTC	TGAGCTCACCATTGA	GAACGTTACCGGTAC
			CCTCAAGAGCAGCGC	TACTGAAGTTTACAT	TCTCTGCGG---TAA
				1178	
2	<i>pgg2</i>		CGGTGTCCCCATTAC	TGGCCTCAAGGTTGA	GAAGGTTACCGGTAC
			CGTTAAGAGCAGCGG	TACTGACGTCTACAT	TCTCTGCGG---TAA
				1140	

3	<i>pg1</i>	CGGTGTCCCCATCAC	TGGCCTCACTGTCTGA	GAAGGTC	ACTGGTAG				
		CGTCAAGTCCAGCGG	TACCGATGTCTACAT	CCTTTGCGG---	TTC	1078			
4	<i>pgg1</i>	CGGTGTCCCCATTAC	CGACTTGACCCTCGA	CAACGTCC	ACGGAAC				
		TGTCGCCAGCAGTGG	TGTCGATACCTACAT	CCTGTGTGC---	TTC	1164			
5	<i>Pjanthinellum</i>	CGGTGTTCCGATCAC	AGATTTGACTGTCAA	GGGCATCA	CTGGCTC				
		AGTGAATCCGATGC	AGTTGAAGTGTATAT	CCTGTGTGG---	TGA	1194			
6	<i>pg2</i>	CGGTGTACCAATCAC	CGACCTCACCTTGG	CGGGGTCA	AGGGAAC				
		AGTTGCGAGTAGCGG	AACGAATGTGTACAT	CCTTTGCGC---	CGA	1230			
7	<i>Pexpansum</i>	CGGGGTTCCAATCAC	TGGTCTCACCTTGAA	CAATGTGC	ACGGCAC				
		GGTCACATCCAAGGG	TACCGATATCACCAT	CGAGTGTG	GGAAGTTC	1308			
			1351	1365	1366		1380	1381	1395
1410	1411	1425	1426	1440					
1	<i>Pdigitatum</i>	CGGTAGCTGCAAGAA	CTGGAAATGGGCTGG	AAACTCTCTCTCTGG					
		TGGTAAGAAGAGTGG	CAAGTGC	CGGTAACGT	GCCTGCCGGTGCCTC	1268			
2	<i>pgg2</i>	CGGTAGCTGCAAGAA	CTGGACCTGGACTGG	AAACTCCGTC	ACTGG				
		TGGTAAGAAGAGCAG	CAAGTGCTCTGGTGT	GCCTTCCGGCGCTTC		1230			
3	<i>pg1</i>	CGGCTCTTGCTCCGA	CTGGACCTGGTCTGG	CAACAAGGTCTCCGG					
		CGGTAAGACCAGCAG	CAAGTGCAAGAACGT	GCCCTCCGGTGCCTC		1168			
4	<i>pgg1</i>	TGGTGTCTTGCTCCGA	CTGGTCTTGAGCGG	CGTTAGCATCACCGG					
		TGGTCAGACTAGCAA	GAAGTGCAAGGGTAT	TCCCAGCGGTGCTAG		1254			
5	<i>Pjanthinellum</i>	CGATGCCTGCAGCGA	CTGGACCTGGAGCGG	CGTGGACATCACCAG					
		TGGACAGACCAGCAG	CAAATGCGAGAATGT	CCCTCTGGCGCGTC		1284			
6	<i>pg2</i>	AGGGGCTTGCTCCGA	TTGGACTTGGGATGG	TGTCAGCGTCAGTGG					
		TGGCAAGACGAGCAG	CGCTTGTGAGAATGT	GCCGAGTAGGCCAG		1320			
7	<i>Pexpansum</i>	TGCCAGTTGCTCAGG	CTGGACTTGGACTAA	GGTTGCAGTGTCTGG					
		CGGTAAGGCG-GATG	T--GTGCAAGAATGC	ACCTTCCGGCACT--		1393			
			1441	1455	1456		1470	1471	1485
1500	1501	1515	1516	1530					
	1	<i>Pdigitatum</i>	TTGCTAG----	1275					
	2	<i>pgg2</i>	TTGCTAG----	1237					
	3	<i>pg1</i>	TTGCTAAAATG-	1178					
	4	<i>pgg1</i>	CTGCTAAATT-	1264					
	5	<i>Pjanthinellum</i>	GTGCTGAACAA	1295					
	6	<i>pg2</i>	CTGCTGAGTTA	1331					
	7	<i>Pexpansum</i>	-TGTAAAGCG-	1402					

Figura 6 (continuação)

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES EM *Penicillium griseoroseum* CULTIVADO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

1. INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas produzidas por vários microrganismos e que atuam na degradação de substâncias pécticas encontradas na parede celular primária e lamela média de plantas. As poligalacturonases (PGs) secretadas por fungos fitopatogênicos têm um papel importante durante a invasão e colonização do tecido hospedeiro, ao passo que os produtos gerados pela ação enzimática agem como sinais de indução para uma resposta de defesa em plantas (Fraissinet-Tachet et al., 1995; Cervone et al., 1996). Recentemente, as PGs têm sido associadas à maturação de frutos, modificação da parede celular, além da queda de flores e folhas (Kalaitzis et al., 1997; Hadfield e Bennet, 1998). Contudo, a grande importância atribuída às pectinases se justifica pelo seu valor biotecnológico, sendo elas largamente empregadas na indústria de alimentos para o processamento de polpa de frutas e produção de sucos e vinhos (McLellan et al., 1985; Grassin e Fauquembergue, 1996).

Vários genes que codificam poligalacturonases têm sido clonados em fungos filamentosos, o que revelou a existência de famílias multigênicas no genoma de algumas espécies (Fernández et al., 1993; Reymond et al., 1994; Fraissinet-Tachet et al., 1995; Parenicová et al., 1998). Contudo, as quatro isoformas de PG secretadas por *Fusarium moniliforme* têm origem na glicosilação diferencial de um único polipeptídeo (Caprari et al., 1993). Porém, até o momento não se sabe a razão para a diversidade de isoenzimas de PG e seu significado para os fungos que as produzem.

O sistema pectinolítico de *Penicillium griseoroseum* tem sido estudado quanto aos aspectos fisiológicos que influenciam a produção de suas enzimas. Vários estudos foram realizados com o objetivo de investigar o efeito de diferentes indutores na atividade enzimática (Baracat-Pereira et al., 1997; Minussi et al., 1997; Baracat-Pereira et al., 1999). Fontes de carbono alternativas, como caldo de cana de açúcar, têm sido testadas visando reduzir os custos de produção de pectinases (Minussi et al., 1998). Dois genes que codificam endoPGs em *P. griseoroseum* foram isolados e caracterizados. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes fontes de carbono na expressão desses genes, de modo a fornecer a base experimental para um programa de melhoramento genético que visa a obtenção de linhagens com maior produção de PGs. Essas linhagens poderiam ser empregadas na indústria têxtil para a desengomagem de fibras vegetais, como alternativa para o processo químico normalmente usado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e condições de cultivo

Penicillium griseoroseum foi isolado de sementes florestais e encontra-se depositado na Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Campinas, Brasil, com o código de acesso CCT 6421. A manutenção da cultura e produção de inóculo foi realizada conforme descrito por Brumano et al. (1993). Conídios de cinco dias foram inoculados em frascos Erlenmeyer com 100 mL de meio mínimo [6,8 g/L de K_2HPO_4 , 3,4 g/L de KH_2PO_4 , 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, pH 6,3] e suplementado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 11% e extrato de levedura 6%, quando mencionado. Pectina (Sigma P9135), glicose ou sacarose foi adicionada como fonte de carbono na concentração final de 0,3%. Os frascos foram incubados a 25°C, 150 RPM, até a coleta do micélio.

2.2. Isolamento de RNA total e análise por hibridização

RNA total de *P. griseoroseum* foi isolado segundo Sambrook et al. (1989), após 24, 48, 72, 76, 85 e 96 horas de crescimento do micélio em meio mínimo contendo pectina como fonte de carbono. Em seguida, 15 µg de RNA total foram aplicados em gel de agarose 1,2% e transferidos para membrana de náilon (Stratagene) como descrito por Fourney et al. (1988). Os plasmídeos pPG21 e pPG15, que contém os clones genômicos de *pgg1* e *pgg2*, respectivamente (Capítulo 1), foram marcados com $[\alpha\text{-}^{32}P]dATP$, segundo recomendações do kit "Random Prime It Labeling System" (Stratagene), e usados como sondas nos experimentos de hibridização. As membranas foram hibridizadas a 63°C, durante 16 horas e lavadas duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1%, por 20 minutos e

uma vez em SSC 1X, SDS 0,1%. O filme XOMAT K (Kodak) foi colocado em contato com as membranas, com o auxílio de intensificador, por três dias.

Para analisar o efeito de diferentes fontes de carbono na expressão dos genes *pgg1* e *pgg2*, RNA total foi extraído de micélio cultivado por 24 e 76 horas em pectina, glicose ou sacarose, suplementado ou não com extrato de levedura. O RNA foi quantificado espectrofotometricamente e 20 µg foram tratados com DNase I livre de RNase (Promega). Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, RNA total foi extraído a partir de micélio de três experimentos diferentes e então utilizado na técnica de RT-PCR.

2.3. RT-PCR e síntese de cDNA

As reações de transcrição reversa foram feitas empregando-se o kit "Reverse Transcription System" (Promega), juntamente com oligo (dT) e 1,5 µg de RNA total e incubando-se a 42°C, por 1 h e 15 min. Os seguintes oligonucleotídeos foram sintetizados e utilizados na etapa de amplificação: 5'-TTTCATATTTTCTTTATC-3', 5'-AAAATTTCGAGAATTTAGCAGCTA-3' para verificar a presença do transcrito de *pgg1* (PIPG1 and PFPGL, respectivamente), e 5'-GATCGGACACCTACTTAAAA-3', 5'-CTGTTTATTGATCACCATTTGATC-3' para o estudo da expressão de *pgg2* (PIPG2 e PFPG2, respectivamente). Cinco µL da reação de RT foram utilizados na reação de amplificação, juntamente com 10 pmol de PIPG1 e PFPGL ou PIPG1 e PFPG2, num volume total de 25 µL. A amplificação foi feita em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Quarenta ciclos foram empregados, cada ciclo consistindo de um passo a 94°C por 1 min, um passo a 55°C, por 1 min e um passo a 72°C, por 1 min e 30. Ao final de 40 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C, por 7 min. Os oligonucleotídeos 5'-ACACCTTCTACAACGAGCTG-3' e 5'-GGAAGCTCGTAGGACTTCTC-3', desenhados com base em uma região conservada do gene da γ -actina de fungos filamentosos, foram empregados em cada reação para testar a integridade do RNA. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução 2%. DNA total de *P.*

griseoroseum foi amplificado nas mesmas condições e analisado no mesmo gel para a confirmação de que os fragmentos de DNA gerados não correspondiam à contaminação do RNA com DNA total. Os fragmentos de DNA gerados pela amplificação com os oligonucleotídeos da γ -actina foram eluídos do gel de agarose, clonados em vetor pGEM-T Easy (Promega) e sequenciados segundo recomendação do kit "BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems) para confirmar a identidade dos produtos.

As reações de transcrição reversa foram também utilizadas para obtenção do cDNA correspondente a *pgg1* e *pgg2*. Os produtos do RT-PCR foram clonados em vetor pGEM-T Easy e sequenciados. As seqüências de nucleotídeos dos cDNAs encontram-se no Capítulo 1 e estão disponibilizadas no GenBank sob os números de acesso AF195791 (*pgg1*) e AF195790 (*pgg2*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão dos genes *pgg1* e *pgg2* foi estudada por hibridização do RNA total. A expressão do gene *pgg2* manteve-se constante com o tempo, porém transcritos do gene *pgg1* foram detectados somente com 72, 76 e 80 horas de cultivo em pectina e extrato de levedura (Figuras 1 e 2). Soares-Ramos (1997) verificou, nessas condições, um pico de atividade de PG com 96 horas de cultivo de *P. griseoroseum*, o que pode ser explicado pelo acúmulo de mRNA de *pgg1* entre 76 e 80 horas.

A técnica de RT-PCR foi utilizada para confirmar os resultados observados na análise de hibridização do RNA total e comprovou que ambos os genes são transcricionalmente regulados. A expressão do gene *pgg1* foi detectada em 76 horas enquanto que *pgg2* foi expresso em todos os tempos de cultivo estudados (Figura 3). Por este motivo, os tempos 76 e 24 horas foram escolhidos para se estudar a expressão desses genes em diferentes fontes de carbono, com ou sem extrato de levedura. Transcritos de *pgg1* foram detectados apenas na presença de pectina, independente da adição de extrato de levedura (Figura 4A). A presença de mRNA de *pgg2* foi observada quando pectina ou sacarose foi utilizada como fonte de carbono (Figura 4B). Contudo, sua expressão foi reprimida por glicose. A adição de extrato de levedura ao meio de cultivo resultou em uma pequena expressão deste gene.

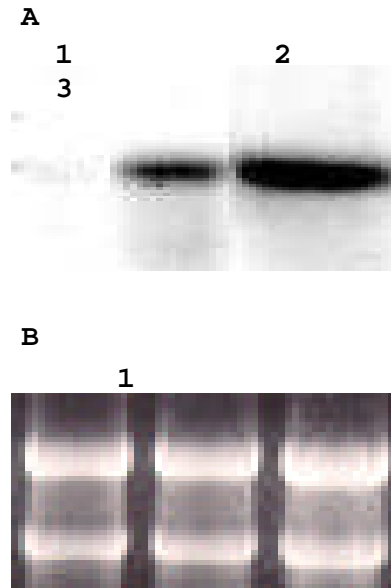


Figura 1 - Acúmulo de mRNA de *pgg1* em diferentes tempos de crescimento de *Penicillium griseoroseum* em meio contendo pectina suplementado com extrato de levedura. RNA total foi extraído de micélio crescido por 72 (1), 76 (2) e 80 horas (3), analisado por eletroforese em gel de agarose e transferido para membrana de náilon. O gene *pgg1* marcado radioativamente foi utilizado como sonda. Auto-radiografia da hibridização de RNA total (A). Análise do RNA total (15 μ g/canaleta) por eletroforese em gel de agarose (B).

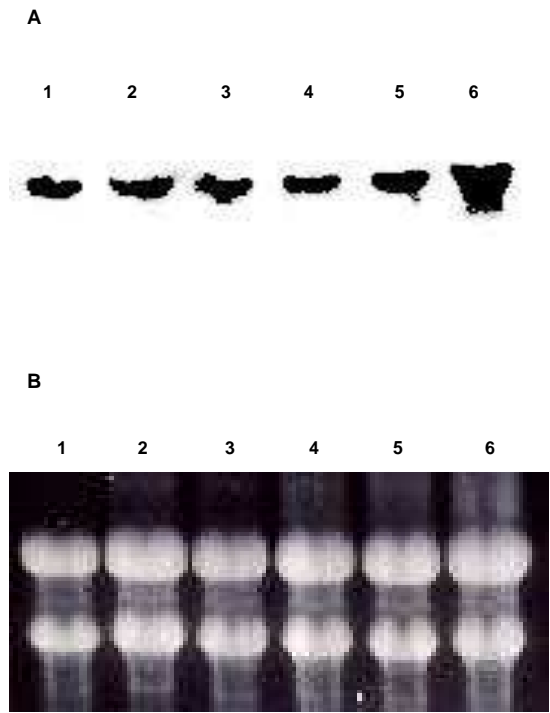


Figura 2 - Acúmulo de mRNA de *pggII* em diferentes tempos de crescimento de *Penicillium griseoroseum* em meio contendo pectina. RNA total foi extraído de micélio crescido por 24 (1), 48 (2), 72 (3), 76 (4), 84 (5) e 96 (6) horas, analisado por eletroforese em gel de agarose e transferido para membrana de náilon. O gene *pgg1* marcado radioativamente foi utilizado como sonda. Auto-radiografia da hibridização de RNA total (A). Análise do RNA total (15µg/canaleta) por eletroforese em gel de agarose (B).

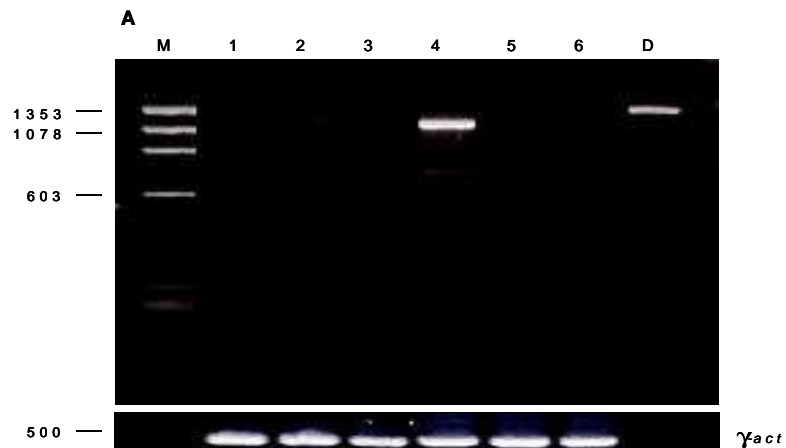


Figura 3 - Expressão temporal dos genes *pgg1* (A) e *pgg2* (B) que codificam endopoligalacturonases em *Penicillium griseoroseum* em meio contendo pectina. RNA total do fungo foi extraído de micélio crescido por 24 (1), 48 (2), 72 (3), 76 (4), 85 (5) e 96 horas (6). DNA total de *P. griseoroseum* amplificado nas mesmas condições (D). O gene da γ -actina (γ -act) foi utilizado como controle qualitativo e quantitativo. DNA do fago ϕ X clivado com *Hae*III, em pares de base (M).

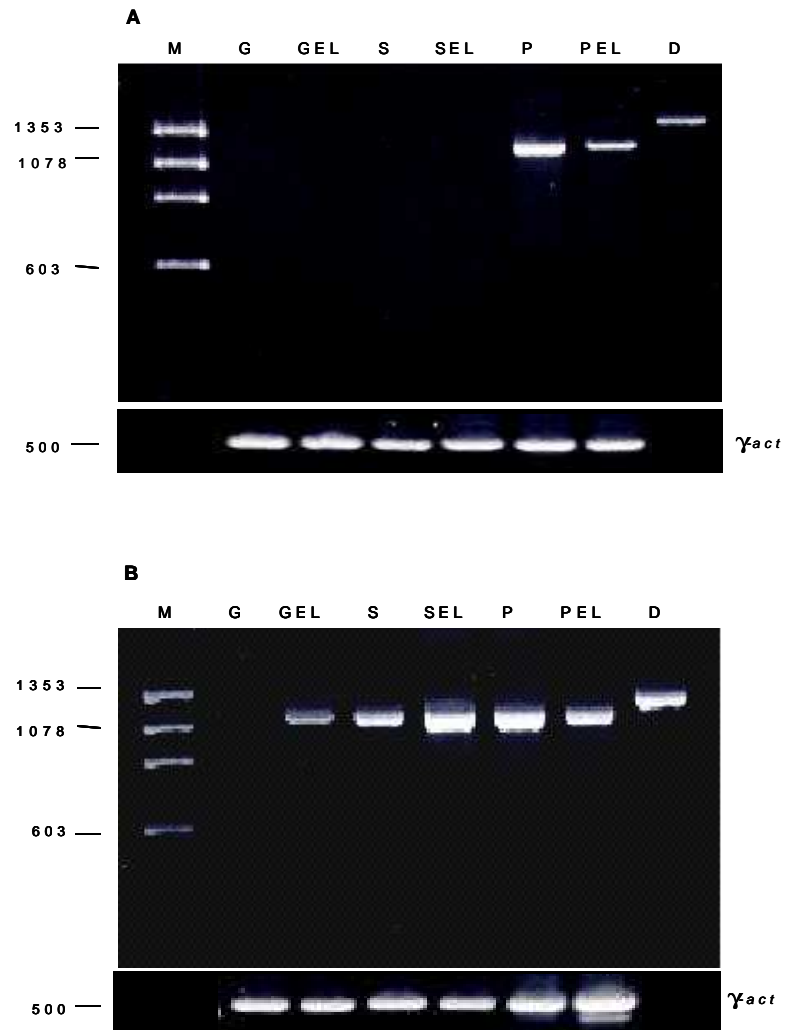


Figura 4 - Expressão diferencial dos genes *pgg1* e *pgg2* de *Penicillium griseoroseum* em diferentes fontes de carbono. RNA total do fungo foi extraído com 76 (A) e 24 horas (B) de cultivo do fungo em meio contendo glicose (G), sacarose (S) e pectina (P), suplementado ou não com extrato de levedura (EL). DNA total de *P. griseoroseum* amplificado nas mesmas condições (D). O gene da γ -actina (γ -act) foi utilizado como controle qualitativo e quantitativo. DNA do fago ϕ X clivado com *HaeIII*, em pares de base (M).

Baracat-Pereira et al. (1999) investigaram o efeito do extrato de levedura na produção de pectina liase por *P. griseoroseum*. Observou-se que uma substância orgânica de baixo peso molecular, solúvel na fração de nucleotídeos durante a extração do extrato de levedura, induziu a síntese de pectina liase quando o fungo foi cultivado em sacarose. Os dados indicaram que esta substância influenciaria na manutenção de um alto nível intracelular de cAMP, ocasionando a síntese da enzima. Ruijter e Visser (1997) sugeriram que o cAMP estimularia a transcrição por meio da fosforilação de fatores de transcrição, que então se ligariam aos cis-elementos para ativar a expressão gênica. Um possível elemento de resposta ao cAMP, como descrito por Fox et al. (2000), foi encontrado no promotor do gene *pgg2* e sua funcionalidade será testada em ensaios de retardamento em gel utilizando-se extrato nuclear protéico de *P. griseoroseum* preparado em presença e ausência de extrato de levedura.

Os dois genes de PGs caracterizados em *P. griseoroseum* têm sua expressão controlada por diferentes mecanismos. A expressão do gene *pgg1* poderia ser desencadeada por um ativador transcricional, enquanto *pgg2* poderia ser regulado por diferentes fatores. Os mecanismos moleculares que controlam a expressão de genes que codificam PGs de outros fungos filamentosos ainda estão sendo investigados. Contudo, muitos têm sua expressão alterada em resposta à fonte de carbono presente no meio. O gene *pecA* de *Aspergillus parasiticus* foi expresso durante diferentes tempos de crescimento em pectina e glicose (Cary et al., 1995). *Botrytis cinerea* tem uma família de genes que codificam endoPGs cujos

membros são expressos em ácido poligalacturônico e glicose, porém com algumas diferenças (Wubben et al., 1999). Bussink et al. (1991) descreveram que a expressão dos genes *pgaII* de *A. niger* e *A. tubigensis* são fortemente regulados pela fonte de carbono.

Os promotores dos genes *pgg1* e *pgg2* devem ser estudados no intuito de se identificar seqüências reguladoras que justifiquem a expressão diferencial observada (Capítulo 3). Um sistema de transformação baseado em eletroporação de conídios germinados está sendo otimizado para que, futuramente, vetores contendo os genes isolados sejam utilizados para transformar a linhagem selvagem (P.G. Cardoso, com. pessoal). Espera-se que as informações geradas a partir do estudo do sistema pectinolítico de *P. griseoroseum* contribuam para a compreensão do controle da expressão gênica em fungos filamentosos e para a obtenção de linhagens melhoradas de fungos com possível aplicação na indústria têxtil.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baracat-Pereira, M.C., Minussi, R.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. Tea extract as an inexpensive inducer of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 308-311, 1997
- Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Minussi, R.C., Chaves-Alves, V.M., Brandão, R.L., Silva, D.O. Cyclic AMP and low molecular weight effector(s) present in yeast extract are involved in pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 76, p. 129-141, 1999.
- Brumano, M.H.N., Coelho, J.L.C., Araújo, E.F., Silva, D.O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.9, p. 225-228, 1993.
- Bussink, H.J.D., Brouwer, K.B., de Graaff, L.H., Kester, H.C.M., Visser J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. **Curr. Genet.**, v. 20, p. 301-307, 1991.
- Caprari, C., Bergamann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F., de Lorenzo, G., *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 43, p. 453-462, 1993.
- Cary, J.W., Brown, R., Cleveland, T.E., Whitehead, M., Dean, R.A. Cloning and characterization of a novel polygalacturonase-encoding gene from *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, v. 153, p.129-133, 1995.
- Cervone, F., de Lorenzo, G., Aracri, B., Bellincampi, D., Caprari, C., Clark, A.J., Desiderio, A., Devoto, A., Leckie, F., Mattei, B., Nuss, L., Salvi, G. The role of polygalacturonase, PGIP and pectin oligomers in fungal infection. In: VISSER J., VORAGEN A.G.J. (eds). **Pectins and**

pectinases. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 1996, p. 191-205.

Fernández, N., Patiño, B., Vázquez, C. Pectin degrading enzymes secreted by six isolates of *Fusarium oxysporum*. **Mycol. Res.**, v 97, p. 461-466, 1993.

Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day III, R.S., Paterson, M.C. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. p. 5-7, 1988

Fox, M.E., Yamada, T., Ohta, K., Smith, G.R. A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*. **Genetics**, v.156, p. 59-68, 2000.

Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., Fèvre, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 96-99, 1995.

Grassin, C., Fauquembergue, P. Fruit juices. In: GODFREY T., WEST S. (eds.). **Industrial Enzymology**. Macmillan Press, New York, 1996. p. 225-260.

Hadfield, K.A., Bennet, A.B. Polygalacturonases: many genes in search of a function. **Plant Physiol**, v. 117, p. 337-343, 1998.

Kalaitzis P., Solomos, T., Tucker, M. Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. **Plant Physiol.**, v. 113, p. 1303-1308, 1997.

McLellan, M.R., Kime, R.W., Lind, L.R. Apple juice clarification with the use of honey and pectinase. **J. Food Sci.**, v. 50, p. 206-208, 1985.

Minussi, R.C., Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. Methylxantines as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultures on sucrose. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 369-372, 1997.

Minussi, R.C., Soares-Ramos, J.R.L, Coelho, J.L.C., Silva, D.O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 246-250, 1998.

Parenicová, L., Benen, J.Á.E., Kester, H.C.M., Visser, J. *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 72-80, 1998.

Reymond, P., Deléage, G., Rasclé, C., Fèvre, M. Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from

the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Gene**, v. 146, p. 233-237, 1994.

Ruijter, G.J.G., Visser, J. Carbon repression in *Aspergilli*. FEMS **Microbiol. Lett.**, v. 151, p. 103-114, 1997.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Soares-Ramos, J.R.L. Atividade de poligalacturonase produzida por *Penicillium griseoroseum*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1996. 39p.

Wubben J.P., Mulder W., ten Have, A., van Kan J.A.L., Visser J. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1596-1602, 1999.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE CIS-ELEMENTOS QUE CONTROLAM A EXPRESSÃO DE GENES DE POLIGALACTURONASES EM *Penicillium griseoroseum*

1. INTRODUÇÃO

A potencial aplicação industrial de proteínas e metabólitos produzidos por fungos filamentosos faz desses organismos referência em estudos genéticos. Nos últimos anos, diversos genes que codificam proteínas de interesse em fungos filamentosos foram caracterizados e os mecanismos que controlam sua expressão, investigados (Klich et al., 1997; de Vries et al., 1998; MacCabe et al., 1998).

MacKenzie et al. (1993) descreveram que, em fungos filamentosos, o nível de expressão de um gene é resultado da interação entre os controles global e via específica. Muitas proteínas envolvidas nesses controles já foram descritas, bem como as seqüências por elas reconhecidas (Filinger e Felenbok, 1996; Shroff et al., 1996; Marzluf, 1997; van Peij et al., 1998; Saloheimo et al., 2000). Proteínas reguladoras de uma determinada espécie são capazes de reconhecer cis-elementos nos promotores de genes de outras espécies, aspecto que pode ser explorado visando a produção de proteínas heterólogas e a construção de vetores de expressão (van Gemeren et al., 1996; Deane et al., 1999).

Os sistemas enzimáticos de fungos filamentosos podem servir de modelos para investigar a regulação da biossíntese de enzimas extracelulares. O sistema pectinolítico é constituído por várias enzimas, muitas das quais são codificadas por famílias multigênicas em fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Botrytis* e *Sclerotinia* (Fraissinet-Tachet et al., 1995; Parenicová et al., 1998; Wubben et al., 1999). Esses genes são regulados transcricionalmente, o que sugere uma integração entre mecanismos de ativação e repressão, que juntos permitem uma expressão gênica sequencial e diferenciada (Reymond-Cotton et al., 1996; Wubben et al., 1999). Porém, poucas seqüências foram caracterizadas como possíveis sítios de ligação de proteínas reguladoras.

Este trabalho teve por objetivos seqüenciar as regiões 5' terminais dos genes *pgg1* e *pgg2*, que codificam poligalacturonases (PGs) em *P. griseoroseum*, caracterizar cis-elementos e analisar a sua interação com possíveis proteínas reguladoras responsáveis pelo controle da expressão gênica. Por ensaios de retardamento em gel, demonstrou-se a interação de proteínas reguladoras com diferentes seqüências de DNA dos promotores dos genes *pgg1* e *pgg2*. Poucos cis-elementos são comuns aos dois promotores, o que justificaria a expressão gênica diferencial desses genes observada em estudos anteriores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e condições de cultivo

A linhagem selvagem de *Penicillium griseoroseum* foi utilizada neste estudo. Foram inoculados 10^8 conídios/mL em frascos Erlenmeyers contendo meio mineral composto por 6,8 g/L de K_2HPO_4 , 3,4 g/L de KH_2PO_4 , 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, pH 6,3, suplementado com 6% de extrato de levedura (p/v) e 11% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Pectina cítrica (Sigma P9135), glicose ou sacarose 3% foi utilizada como fonte de carbono. Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 RPM, a 25°C, por 76 ou 24 horas, para a obtenção de extratos para o estudo da expressão dos genes *pgg1* ou *pgg2*, respectivamente.

2.2. Seqüenciamento das regiões 5' terminais dos genes *pgg1* e *pgg2*

Os plasmídeos pPGR e pPG4.3, que contêm os clones genômicos de *pgg1* e *pgg2*, respectivamente, foram utilizados na obtenção das seqüências das respectivas regiões promotoras. Além dos oligonucleotídeos universais pUC/M13 "reverse" e pUC/M13 "forward" (Promega), oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) foram desenhados e empregados em reações de seqüenciamento, realizadas com o kit "BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems). As seqüências foram analisadas com auxílio dos programas BLAST, CAP e Clustal W 1.6.

2.3. Isolamento de núcleo e obtenção de extratos nucleares brutos

A metodologia empregada para a preparação de extrato nuclear foi a descrita por Nagata et al. (1993), com algumas modificações. Para tal, *P. griseoroseum* foi cultivado como descrito acima e o micélio foi coletado por filtração em peneira 400 mesh, lavado em água destilada e seco em gaze. Após ser triturado em N_2 líquido, o material foi ressuspenso em tampão A (glicerol 25% p/v, PIPES-KOH 10 mM pH 7,0, $MgCl_2$ 10 mM, β -

mercaptoetanol 10mM, Triton X-100 0,5%), para uma concentração final de 20 g/100 mL. A preparação foi homogeneizada manualmente em homogeneizador Potter (15 mL) e centrifugada por 10 min, a 1000 g, 4°C, em centrífuga Sorvall RC-5C (DuPont). O sobrenadante foi recolhido e 20 mL de tampão A foram adicionados ao precipitado. O material foi novamente centrifugado, após homogeneização em homogeneizador Potter. Os sobrenadantes foram misturados e centrifugados a 5000 g, por 10 min, a 4°C. O precipitado foi lavado em tampão B (tampão A sem Triton X-100). A fração nuclear foi cuidadosamente ressuspensa em 1 mL de tampão B e colocada sobre 12 mL de um gradiente constituído por 40% de percol, preparado em tampão C (sacarose 20%, MgCl₂ 5 mM, PIPES-KOH 5 mM pH 7,0). A centrifugação foi feita em rotor SS34 (DuPont), a 3500 g, por 30 min, a 4°C. O gradiente de percol foi descartado e o precipitado foi cuidadosamente ressuspensa em 2 mL de tampão B e novamente centrifugado. A fração nuclear foi lavada com tampão B e ressuspensa em 300 uL de tampão de extração nuclear (glicerol 10% p/v, Hepes-KOH 15 mM, pH 7,9, KCl 0,5 M, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM e aprotinina, leupeptina, pepstatina, 10 ug/mL cada). A preparação foi colocada em banho de gelo por 30 min, para então ser centrifugada por 10 min, 12000 RPM, em microcentrífuga Eppendorf. O extrato nuclear foi dialisado por 2 horas a 4°C, em tampão D (glicerol 15% p/v, HEPES-KOH 15 mM, pH 7,9, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,5mM, DTT 2 mM). Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min, a 10000 g. A determinação da quantidade de proteína nuclear foi feita segundo Bradford (1976). Aliquotas contendo 10 µg de proteína foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C.

2.4. Preparação dos fragmentos de DNA para os ensaios de ligação

Diferentes fragmentos de DNA das regiões 5' terminais dos genes *pgg1* e *pgg2* foram obtidos por amplificação dos plasmídeos pPGR e pPG4.3, com oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). Os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados e, em seguida, marcados com [γ -³²P]dATP, empregando-se a enzima polinucleotídeo cinase (Promega), conforme recomendação do fabricante. Alguns

fragmentos de DNA foram clivados com enzimas de restrição originando-se fragmentos menores que foram purificados do gel de agarose e marcados radioativamente. Todos os fragmentos amplificados foram sub-clonados em vetor pGEM T Easy (Promega) e seqüenciados.

2.5. Ensaios de ligação

A mistura de ligação consistiu de 4 µL de tampão de ligação 5X (KCl 200 mM, EDTA 5 mM, HEPES-KOH 125 mM, pH 7,9, glicerol 50% p/v), 2 µg de Poli(dIdC), 1 a 5 ng do fragmento de DNA radioativo (10^4 CPM), 5 a 10 µg de extrato nuclear bruto e H₂O milli-Q para um volume final de 20 µL. Inicialmente, a reação foi mantida a temperatura ambiente por 10 min, e então incubada nas mesmas condições na presença do fragmento de DNA marcado. Um gel não desnaturante de poliacrilamida 4%, (acrilamida/bisacrilamida, 19:1), foi preparado e pré-corrido por 30 min, a 90V, em TEB 0,5X. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese por 4-5 horas a 100V, em temperatura ambiente. O gel foi transferido para papel Whatmann 3MM, protegido por filme PVC, e exposto ao filme auto-radiográfico BIOMAX MR (Kodak), por 20 horas, a -80°C, com auxílio de dois intensificadores.

Ensaios de ligação também foram realizados com oligonucleotídeos dupla-fita (Tabela 1). Para tal, oligonucleotídeos complementares foram desenhados com base na seqüência desejada, hibridizados por 5 minutos, a 40°C e marcados radioativamente como descrito acima.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento das regiões promotoras dos genes *pgg1* e *pgg2* e para a obtenção dos fragmentos de DNA utilizados nos ensaios de retardamento em gel.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Posição	
		5'	3'
PG1.1 ^{S, E}	5' TTG TTT ATG ATT TTC AAG CAA A	-55	-79
PG2.4 ^{S, E}	5' ATG CTC CAT TGG ATT AAT	-412	-393
PG2.5 ^E	5' TGA GGA ATG AAT GAA TGA ATG	-80	-100
PG2.6 ^{S, E}	5' ATA GGG CTC CAC ATG GTT TGC	-562	-542
PG2.7 ^E	5' GCC CAT TCT AGA CTA GGT GG	-311	-329
PG2.8 ^E	5' GGT ACC TTT GAT CCT TTG TAG	-843	-823

PG2.9 ^E	5' GGC GTT AAC CCC TGT TCT TAG	-238	-258
CAATPG2A ^C	5' TGA TTT TCC AAT GAG GGG TCC	-281	-261
CAATPG2B ^{S, C}	5' GGA CCC CTC ATT GGA AAA TCA	-261	-281
CAATmutPG2A ^C	5' GAT TTT CGT AGG AGG GGT CT	-280	-260
CAATmutPG2B ^C	5' AGA CCC CTC CTA TGA AAA TC	-260	-280
TATAPG2A ^C	5' GAG GTA TAA TAT AGT CTT CAG	-534	-514
TATAPG2B ^{S, C}	5' CTG AAG ACT ATA TTA TAC CTC	-514	-534

^S: Oligonucleotídeos utilizados em reações de sequenciamento

^E: Oligonucleotídeos utilizados para obter fragmentos de DNA para ensaios de ligação

^C: Oligonucleotídeos complementares.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das regiões promotoras dos genes *pgg1* e *pgg2*

A seqüência de nucleotídeos que precede o códon de início da tradução dos genes *pgg1* e *pgg2* foi determinada (Figura 1). Um cis-elemento TATATAA foi identificado no promotor do gene *pgg1* na posição -96. Essa seqüência é seguida por uma região rica em pirimidinas que se estende até o ponto +1 da tradução. Foram identificadas quatro seqüências homólogas à seqüência consenso SYGGRG (A/CC/TGGA/GG) de *Aspergillus nidulans*, descrita como domínio de ligação para a proteína CREA, responsável pela repressão da expressão gênica em glicose (Cubero e Scazzocchio, 1994). Uma dessas seqüências, GAGGTA, sobrepõe-se ao elemento TATATAA.

Ao contrário do observado em *pgg1*, a região 5' terminal do gene *pgg2* possui vários possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição (Figura 1). A seqüência CCCTGA foi encontrada no promotor do gene *pgg2* na posição -217. Essa seqüência é encontrada em promotores de vários genes que codificam poligalacturonases e pectina liases em *A. niger*, porém até o momento não se demonstrou sua funcionalidade como sítio de reconhecimento de proteínas reguladoras (Benen et al., 1996).

Também no gene *pgg2*, a -270 pb do códon ATG inicial, observou-se um possível CCAAT "box", coincidentemente localizado a mesma posição

-----AGCCGGAAAAAAGAGAGGAGGGCGGTCCAGGGAAAAATTTACCCGCCCCCAAGATTTACGGGGAGGTAAGTGGG -1012

-----GGTGTACTTTGAAAAATAGCAAGGGTGGTCTGGCAATGATTTATTCCTGATTTATCTGCCAATTTATTTGGGTACCTTAAGGG -929

```

GTAGGGTAAACCCACCCACCATGTCGGTGGATAACCTTTTCCAATGTAGTACCTCCCAATAGTTACGGCTTCTCTCCGPAATGTA -846

----GGTAGCTTAAO33GAATGAAGCTTATATATATGGCCCATTTCTCCGAGTTGCCGCAAAAGAACGGATGGTACTTGGCCG -762
GGTACCCTTGTATCCCTTTTGTAGCTCCCTAAATATGATTTATCAGCACAGAAAATAGTTCGGCAACATAACTAACCGGCCTTGTCT -763
PG2.8
CGTAGCTTTCTGACTTCTTTTGAAGTCTTTTGAATGCTTTAGATGCTTTTGTAGATGACTTTTGTGGTTAATTTAAAAAA -679
ACAGTGTATTTCTTGCCTCGTGCCTGAATATCTAGACAGGGCACCAATCAAAACAAAAGACATGGTAAATAAAAGGGTGCATTTGT -680

ATTTTCCAGATATTTTCACTTCCATGCCCTTTTTCAGGTTGGTATAGTCGGCAGAAAAAGGGCCAAAGCCITAACTTCIGAAA -596
TTCAGCGCCACAGAATCTTTTGGAGGGGCTCTTTCACATAAGGAGTATTTTGGTGGAAACAGCCCTACATCGGTAATTTCT -597

CTGGGTCCAGGCCCGGGGGTACTTTCAGGATATCTTATTCCTCGCTTGTGGAGTGCATCTCAGTCTCTCTCTACACATGG -513
TCAAATCAAGTCTTTGGCGTGAACACAAAGCTCGATAGGGCTCCACATGGTTTTCGATAGTGGAGTATAATATAATTTTCAG -514
PG2.6
GGTTTAGGGTGTATAACCATTTATGCTATTTATTCGGTGGACITCCCGGCTTTCACAGTCAAAGTGGTCAATACAGGCCATCG -430
GCATCAATGCCATGTTCTTATTTGGATAATAACTAGATATGCTCGGCTTTTAAACCCGAGATATTCGGGATTTAATTTATGCC -431

GCTCAACCTCGTTTAAATGCCATTTACATAGTGGATCCCACTAGAAATCCGAATGCTTTATATTCGAAACAGCCATCTGAAG -347
AGCAATGGTCCATTTTACCGGATCTCTAGCTTGGTGGATTTAAATGTTTTCGGAGAGTTGCCAGTTCGGGTTAGCTGAACAT -348
PG2.7
TCACAATGAGCTTGACTTATTTCTACACCCCTTGGCGGATTTGCTTCCATCGCCGCTTTTGAACCTGAACGAGCCCGCC -264
GTAGCTGGCCCTAGTATTTAATCCATGCGCATCTAACAATTTATCCATGCAATCCCTGGATCTTATGATTTTCCAATGAGGG -265
PG2.4
AGGACGGATAAACCCACAAGCTCAGGATCACATTTGGAGGAAAAATTCATCGGTGCCGTGTTCTCGGAAAGATACAAACCTTCAA -181
GTCCAAATAAGCAACAGGGTAAACCGCATGACAGATGGCGGTAGTCCCGTTTCATAGAGATACTAGCGTAGGATCTATTAAGGA -182
PG2.9
AGGAAAATCTGGTTCCTCTCAATCTAATTTCCGGCTCTAGTCTCAGATTCAGATTCGGTTCAGGATGAACCGTACAGGTATAT -98
GGATGCTTGGCGCAACAGCATTTAATACCAAGCCAAAGCTCGGTGGAATAGCTTGTTCAAAATCAATTCATTCATTCATTC -99
PG2.1
AAGACTCCCTCGTCTGCTTTGCTTGAATAATCAAAACAAACCAATCACACTCTTTTAAAACCCACATTCATTTCTATTTTC -15
TTTCATTCATTCATTCCTCAATTTCTTATACACTCAGGTGGCTAGTTCGGCAACATCTACACTCTCTTTAATGTTCTGTGATC -16
PG2.5
ATATTTTCTTTTATCTG-----+3
GCACACCTACTTAAATG-----+3

```

Figura 1 - Sequência de nucleotídeos das regiões 5' terminais dos genes que codificam endopoligalacturonases em *Penicillium griseoroseum*. Representado em azul, a região promotora do gene *pgg1* e em preto, a região promotora do gene *pgg2*. O códon de início da tradução está representado em negrito. Possíveis cis-elementos encontram-se sublinhados e os oligonucleotídeos utilizados para a obtenção dos fragmentos de DNA empregados nas reações de sequenciamento e nos ensaios de retardamento em gel estão duplamente sublinhados. As setas representam o sentido de pareamento dos oligonucleotídeos.

no promotor do gene que codifica poligalacturonase em *P. digitatum*. A presença de CCAAT "boxes" já foi descrita em vários promotores de genes de fungos filamentosos e sua funcionalidade foi comprovada em muitos casos (Nagata et al., 1993; Litzka et al., 1996; Mizote et al., 1996; Tanaka et al., 2000).

Outro possível cis-elemento, TATAATTATA, foi encontrado à posição -522. Sequências TAT^A/_TA^A/_T foram descritas para promotores de genes de leveduras, geralmente posicionadas a grandes distâncias do ponto inicial da transcrição, porém seqüências similares ainda não foram reportadas em fungos filamentosos (Ballance, 1991).

Segundo Gurr et al. (1987), genes de fungos filamentosos geralmente apresentam a seqüência consenso TATAAA localizada entre -30 e -60 pb do ponto +1 da transcrição. Embora o início do transcrito não tenha sido determinado, a seqüência TATAA foi encontrada a uma distância de 80 pb do possível CCAAT "box". Nove repetições CATT estão posicionadas após o TATAA. Essa característica deve ter algum significado funcional, embora nada semelhante tenha sido relatado na literatura.

Como observado no promotor do gene *pgg1*, possíveis sítios de ligação da proteína CREA (-315, -529, -634) foram encontrados, sendo um sobreposto ao cis-elemento TATAATATA.

Um possível elemento de resposta ao cAMP foi detectado a -757 pb, semelhante a seqüência descrita em *Schizosaccharomyces pombe* por Fox et al. (2000). Em mamíferos, muitos genes são regulados via cAMP e fatores de transcrição que interagem com esses sítios já foram relatados (Montminy et al., 1986; Jones et al., 1989). Ainda não existem comprovações da participação desta molécula na sinalização intracelular em fungos filamentosos. Estudos realizados com *P. griseoroseum* mostraram que adição de extrato de levedura ao meio de cultivo provocou um aumento na concentração intracelular de cAMP, coincidindo com maior atividade de pectina liase (Baracat-Pereira et al., 1999). Segundo Ruijter e Visser (1997), altos níveis de cAMP podem levar à fosforilação de fatores de transcrição, e por conseguinte, a ativação da expressão gênica.

A Figura 2 mostra uma representação esquemática dos fragmentos de DNA dos promotores de *pgg1* e *pgg2* analisados nos ensaios de retardamento em gel descritos abaixo.

3.2. Identificação de cis-elementos na região promotora do gene *p_{gg2}*

O gene *p_{gg2}* de *P. griseoroseum* e o gene que codifica poligalacturonase em *P. digitatum* possuem uma seqüência CCAAT na mesma posição. Para verificar a funcionalidade deste cis-elemento em *P. griseoroseum*, um fragmento de DNA de 335 pb, resultante da amplificação do plasmídeo pPG4.3 com os oligonucleotídeos PG2.5 e PG2.7, foi utilizado em ensaios de ligação com extrato nuclear bruto, preparado de micélio crescido em pectina e extrato de levedura (P+EL), durante 24 horas (Figura 3). Um complexo de interação DNA-proteína foi visualizado, o que comprova a existência de sítios de ligação para fatores "trans" neste fragmento. Resultado similar foi obtido quando extrato nuclear preparado a partir de micélio crescido em sacarose e extrato de levedura (S+EL), glicose (G) ou sacarose (S) foi utilizado, embora os complexos visualizados nessas duas últimas condições não apresentassem boa resolução no gel de poliacrilamida. O fragmento de DNA de 335 pb usado nesses ensaios possui, além do elemento CCAAT, um potencial sítio de ligação da proteína repressora CREA, localizado à posição -315. Deste modo, a migração diferenciada dos complexos DNA-proteína observados na presença de P+EL/SEL e G/S poderia ser devida à ligação de diferentes proteínas ao cis-elemento CCAAT ou ATGGAG. Um padrão de migração semelhante foi descrito por Zeilinger et al. (1996), quando um fragmento de DNA do promotor do gene que codifica xilanase (*xyn1*) de *Trichoderma reesei* foi utilizado em ensaios de retardamento em gel, juntamente

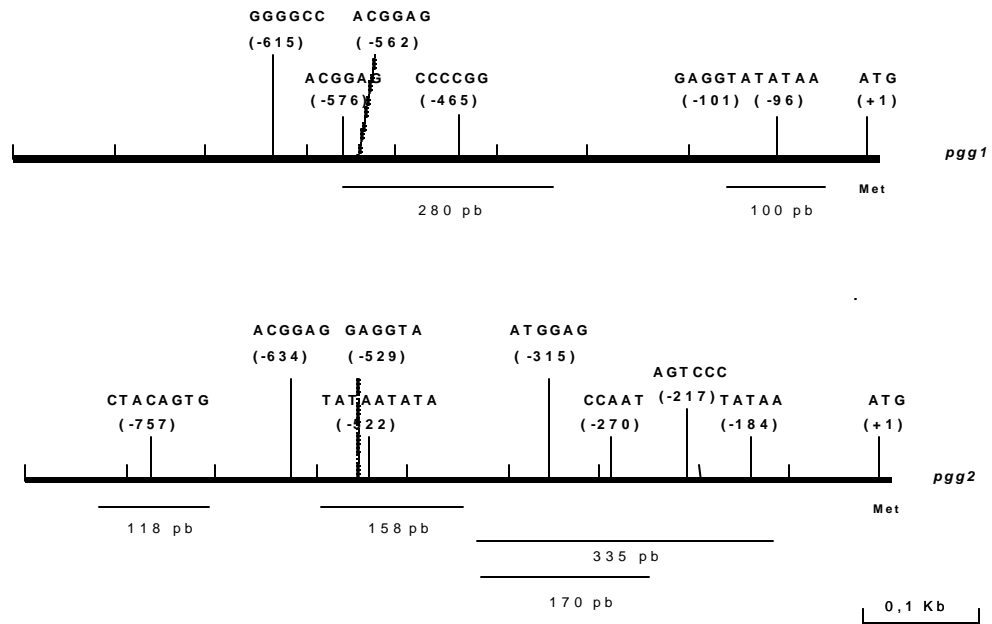


Figura 2 - Representação dos cis-elementos presentes nas regiões reguladoras dos genes que codificam endopoligalacturonases em *Penicillium griseoroseum*. As barras horizontais representam os fragmentos de DNA analisados em ensaios de retardamento em gel de poliacrilamida.

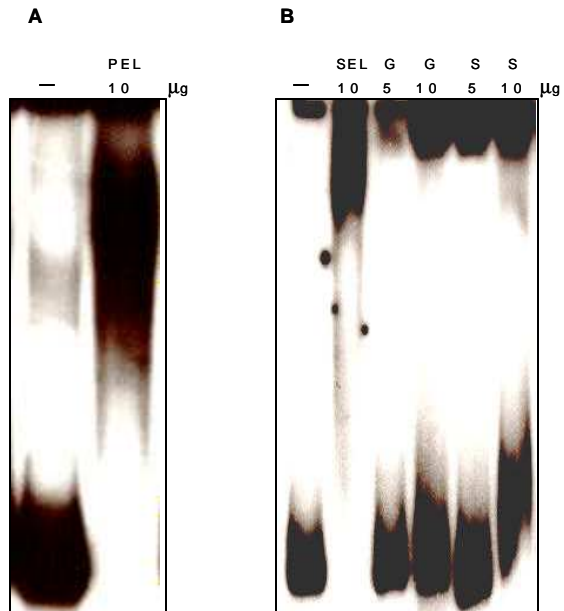


Figura 3 - Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares brutos de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de DNA de 335 pb da região promotora do gene *p_{gg2}*. Este fragmento contém o cis-elemento CCAAT e foi incubado na ausência e na presença de 10 μ g de proteínas do extrato nuclear preparado de micélio crescido em pectina e extrato de levedura, por 24 horas (A). O fragmento de 335 pb foi também incubado com 10 μ g de extrato nuclear preparado em micélio crescido em sacarose e extrato de levedura, 5 μ g ou 10 μ g de micélio crescido em glicose e 5 μ g ou 10 μ g, de micélio crescido em sacarose (B). O fragmento de DNA de 335 pb está representado esquematicamente na Figura 2

com extrato celular bruto preparado sob condições de indução (xilana) ou repressão (glicose). Os autores sugeriram um modelo de regulação do gene *xln1*, no qual uma proteína ativadora se ligaria ao elemento CCAAT sempre que xilana estivesse presente, enquanto que na presença de glicose, essa ligação seria impedida pelo o repressor Cre1, com um sítio de ligação localizado a 31 pb do CCAAT.

Para melhor delimitar um domínio de interação, o fragmento de DNA de 335 pb foi clivado com *HpaI* e *DraI*, resultando em um fragmento de 170 pb, que foi utilizado em ensaios de ligação. Novamente, um complexo foi observado, mesmo quando diferentes concentrações de extrato nuclear P+EL foram utilizadas (Figura 4).

A confirmação de que CCAAT é o sítio de ligação para fatores "trans" foi conseguida com a utilização de dois oligonucleotídeos complementares nos ensaios de ligação (Figura 5). A alteração da seqüência CCAAT por CGTAGG aboliu a formação do complexo, o que claramente demonstra a funcionalidade desta seqüência em *P. griseoroseum*.

A expressão de vários genes de fungos filamentosos é controlada pela interação de proteínas nucleares com a seqüência CCAAT, normalmente posicionada entre 50 e 200 pb do ponto +1 da transcrição, sendo esse sítio absolutamente necessário para a ligação de fatores de transcrição em eucariotos (Bucher, 1990; Mantovani, 1998). Kato et al. (1997) mostraram que a substituição de CCAAT por CGTAA impediu a ligação do fator nuclear AnCP, resultando em um decréscimo de 70% na expressão do gene que codifica takaamilase A em *Aspergillus nidulans*. Além de AnCP, algumas proteínas reguladoras têm sido descritas como fatores que reconhecem CCAAT "boxes", como AnCF e PENR1, que controlam a expressão do gene *amdS* (acetamidase) e dos genes da via biossintética de penicilina em *Aspergillus nidulans* e AAB, que regula o gene *am* (glutamato desidrogenase) em *Neurospora crassa* (Litzka et al., 1996; Papagiannopoulos et al., 1996; Then Bergh et al., 1996). Essas proteínas são na verdade compostas por três subunidades,

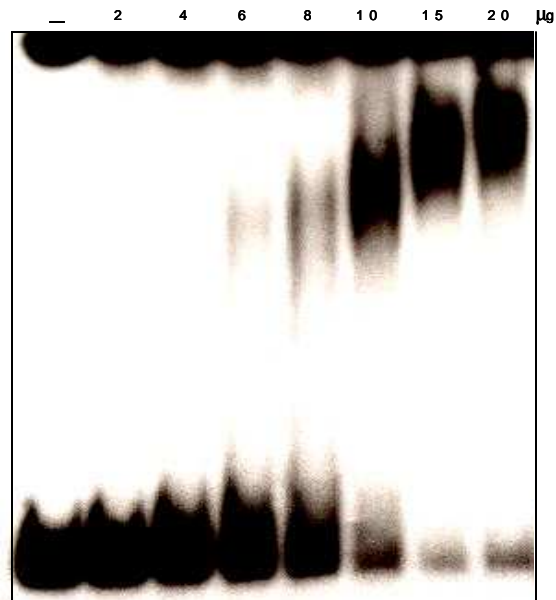


Figura 4 - Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares brutos de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de DNA de 170 pb da região promotora do gene *p_{gg2}*, que contém o cis-elemento CCAAT. Este fragmento foi incubado na ausência e na presença de 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg, 15 µg ou 20 µg de proteínas do extrato nuclear preparado de micélio crescido em pectina e extrato de levedura, por 24 hora. O fragmento de DNA de 170 pb está representado esquematicamente na Figura 2.

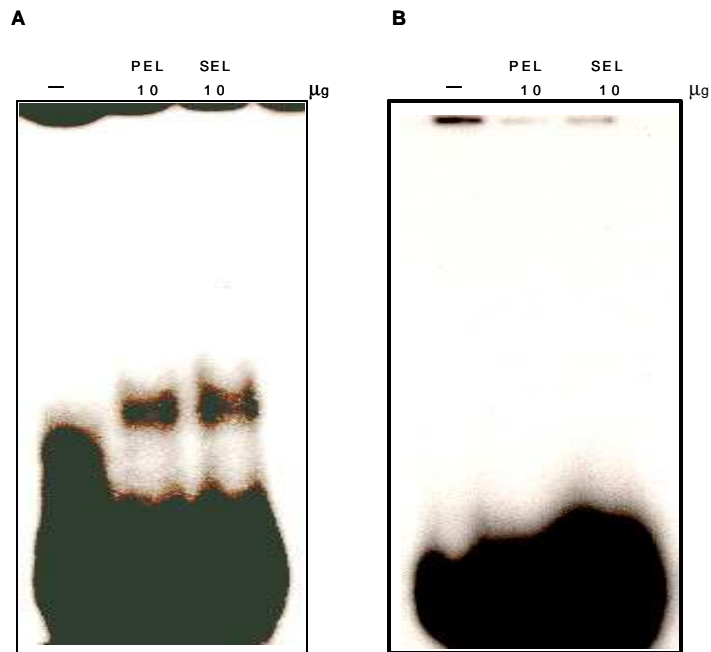


Figura 5- - Ensaio de retardamento em gel da interação ^{DNA} proteína entre extratos nucleares brutos de *Penicillium griseoroseum* e oligonucleotídeos dupla-fita, que contém o cis-elemento CCAAT. Este oligonucleotídeo foi incubado na ausência e na presença de 10 µg proteínas do extrato nuclear preparado de micélio crescido em pectina e extrato de levedura ou sacarose e extrato de levedura, por 24 horas (A). Um oligonucleotídeo com a seqüência CCAAT mutada foi sintetizado e utilizado nos ensaios (B), sob as mesmas condições utilizadas em A.

à semelhança do complexo HAP descrito em *Saccharomyces cerevisiae* e, segundo Brakhage et al. (1999), são necessárias para expressão de genes de importância biotecnológica. Em *A. nidulans*, o modelo proposto para a montagem do complexo Hap se inicia com a formação de um dímero entre HapC e HapE que, em seguida, interage com HapB para finalmente se ligar ao CCAAT "box".

Um fragmento de DNA de 251 pb foi amplificado com os oligonucleotídeos PG2.4 e PG2.6 e clivado com XbaI, o que gerou fragmentos de 93 e 158 pb. A seqüência TATAATATA está contida neste último fragmento, que foi marcado

radioativamente e incubado com extrato nuclear preparado em P+EL (Figura 6). Para a confirmação que este elemento é reconhecido por fatores "trans", oligonucleotídeos complementares foram sintetizados e testados nos ensaios de ligação.

A seqüência (G/T/C)TGACGTA/CAC foi descrita por Fox et al. (2000) como elemento de resposta ao cAMP. Uma seqüência semelhante, CTACAGTG, foi localizada à posição -757 na região reguladora do gene *p_{gg2}*. Para investigar o significado deste elemento no controle da expressão de *p_{gg2}*, o produto de amplificação gerado com os oligonucleotídeos PG2.8 e PG2.4 foi clivado com *HhaI* e um fragmento de 179 pb foi empregado nos ensaios de ligação (Figura 7). Complexos de diferentes mobilidades foram formados, sugerindo que esta região é reconhecida por diferentes fatores que estão presentes nos extratos P+EL, S+EL e G+EL. O fragmento de DNA de 179 pb será testado em novos experimentos onde extratos preparados na presença de glicose serão utilizados, com o objetivo de comprovar a importância da seqüência CTACAGTG e a possível participação do cAMP no controle da expressão de *p_{gg2}*.

3.3. Identificação de cis-elementos na região promotora do gene *p_{gg1}*

Alguns fragmentos de DNA do promotor do gene *p_{gg1}* (Figura 2)

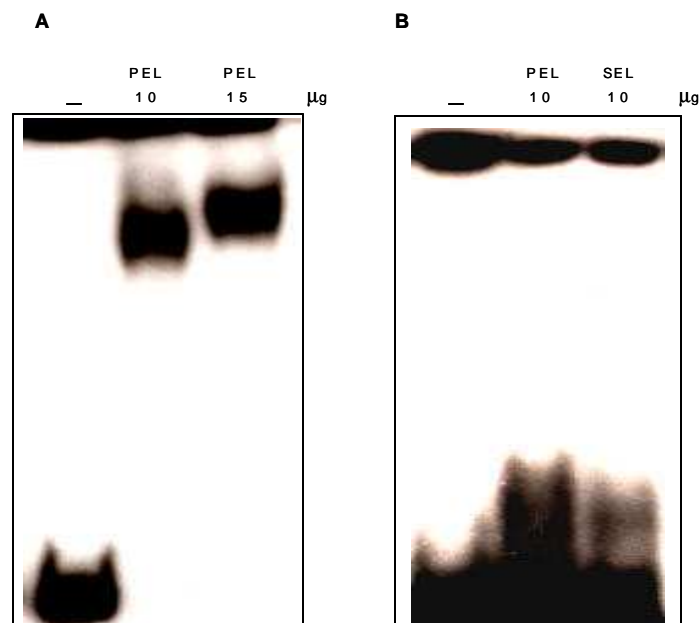


Figura 6 - Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares brutos de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de 158 pb da região promotora do gene *p_{gg2}*, que contém o cis-elemento TATAATATA. Este fragmento foi incubado na ausência ou na presença de 10 µg ou 15 µg de proteínas de extrato nuclear preparado de micélio crescido em pectina e extrato de levedura, por 24 horas (A). Um oligonucleotídeo dupla-fita contendo a seqüência TATAATATA foi sintetizado e utilizado nos ensaios, com 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado em pectina e sacarose suplementado com extrato de levedura (B). O fragmento de DNA de 158 pb está representado esquematicamente na Figura 2.

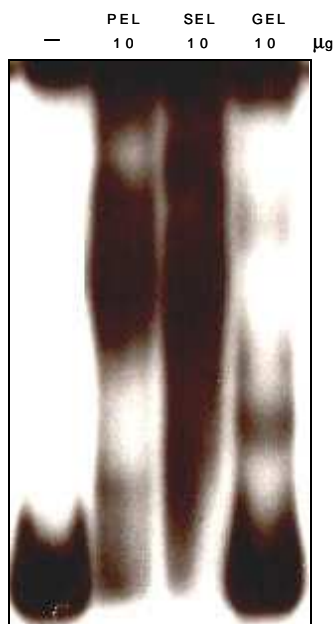


Figura 7 - Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares brutos de *Penicillium griseoroseum* e fragmento de DNA de 118 pb da região promotora do gene *p_{gg2}*, que contém o cis-elemento CTACAGTG. Este fragmento foi incubado na ausência ou na presença de 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado de micélio crescido em pectina, sacarose ou glicose, suplementados com extrato de levedura, por 24 horas. O fragmento de DNA de 118 pb está representado esquematicamente na Figura 2.

foram utilizados em ensaios de ligação com extratos nucleares preparados de micélio crescido em P+EL e S+EL, por 76 horas. Porém, os resultados obtidos não foram reprodutíveis, provavelmente devido à má qualidade dos extratos ou à proteólise durante os ensaios de ligação. Contudo, um fragmento de DNA de 100 pb, contendo uma seqüência TATATAA, foi analisado juntamente com extratos nucleares preparados para o estudo do promotor do gene *p_{gg2}*. Embora um complexo não tenha ficado evidente quando o extrato S+EL foi utilizado, a interação DNA-proteína foi seguramente comprovada na presença de P+EL (Figura 8). Este resultado mostra que o sítio de ligação presente nesse fragmento é reconhecido por fatores de transcrição que estão presentes no núcleo independente do tempo de crescimento do fungo. Um possível envolvimento do elemento TATATAA na formação destes complexos terá de ser posteriormente comprovada.

Embora existam muitas informações a respeito da expressão de genes de poligalacturonases em diferentes condições de cultivo, os mecanismos moleculares que controlam essa expressão não estão elucidados. Somente em *Sclerotinia sclerotiorum* foi sugerida a participação de uma proteína homóloga ao fator de regulação global CREA no controle do gene *p_{gl}*, após análises por ensaios de retardamento em gel (Reymond-Cotton et al., 1996). Os experimentos realizados neste trabalho mostraram a formação de complexos a partir da interação de proteínas reguladoras com diferentes cis-elementos presentes nos genes que codificam poligalacturonases em *P. griseoroseum*. Acredita-se que

algumas dessas proteínas sejam fatores de transcrição basais por terem sido encontradas nos extratos nucleares obtidos a partir de células crescidas em diferentes fontes de carbono. Experimentos serão realizados com o intuito de determinar se os mesmos fatores fazem parte dos diferentes complexos aqui visualizados.

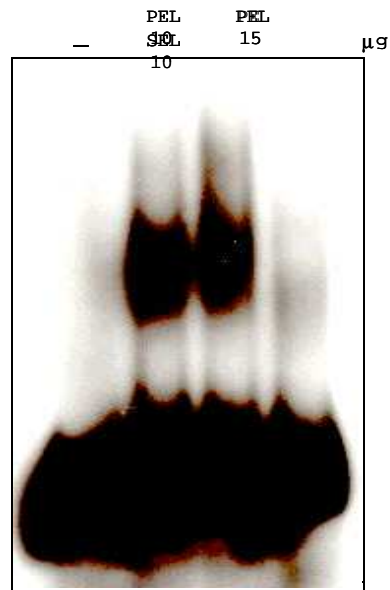


Figura 8 - Análise por ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares brutos de *Penicillium griseoroseum* e fragmento de DNA de 118 pb da região promotora do gene *p_{ggl}*, que contém o cis-elemento TATATAA do gene *p_{ggl}*. Este fragmento foi incubado na ausência ou na presença de 10 µg, 15 µg ou 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado de micélio crescido em pectina e sacarose, suplementados com extrato de levedura, por 24 horas. O fragmento de DNA de 118 pb está representado esquematicamente na Figura 2.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballance, D.J. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. **Yeast**, v. 2, p. 229-236, 1986.
- Brakhage, A.A., Andrianopolous, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M.A., Tsukagoshi, N., Hynes, M.J. HAP-like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. **Fungal Genet. Biol.**, v. 27, p. 243-252, 1999.
- Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Minussi, R.C., Chaves-Alves, V.M., Brandão, R.L., Silva, D.O. Cyclic AMP and low molecular weight effector(s) present in yeast extract are involved in pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 76, p. 129-141, 1999.
- Benen, J., Parenicová, L., Kusters-van Someren, M., Kester, H., Visser, J. Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. In: VISSER, J., VORAGEN, A.G.J. (Eds.). **Pectins and pectinases**. 1996. pp. 331-348.
- Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-252, 1976.
- Bucher, P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. **J. Mol. Biol.**, v. 212, p. 563-578, 1990.
- Cubero, B., Scazzocchio, C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **EMBO J.**, v. 13, p. 407-416, 1994.
- Deane, E.E., Whipps, J.M., Lynch, J.M., Pederby, J.F. Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase gene. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, p. 419-424, 1999.
- de Vries, R.P., Poulson, C.H., Madrid, S., Visser, J. *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from

- Aspergillus tubigensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 243-349. 1998.
- Filinger, S., Felenbok, B. A newly identified gene cluster in *Aspergillus nidulans* comprises five novel genes localized in the *alc* region that are controlled both by the specific transactivator AlcR and the general carbon-catabolite repressor CreA. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 475-488, 1996.
- Fox, M.E., Yamada, T., Ohta, K., Smith, G.R. A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*. **Genetics**, v.156, p. 59-68, 2000.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., Fèvre, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 96-99, 1995.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E., Kinghorn, J.R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: KINGHORN, J. R. (Ed.) **Gene structure in eukaryotic microbes**. Oxford: IRL Press, 1987. p.93-139.
- Jones, R.H., Jones, N.C. Mammalian cAMP-responsive element can activate transcription in yeast and binds a yeast factor(s) that resembles the mammalian transcription factor ATF. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2176-2180, 1989.
- Kato M., Aoyama, A., Naruse, F., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of taka-amylase A gene expression, binds to the CCAAT-containing *taag2*, *amdS*, and *gatA* promoters. **Mol. Gen. Genet.**, v. 254, p. 119-126, 1997.
- Klich, M.A., Montalbano, B., Ehrlich, K. Northern analysis of aflatoxin biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus sojae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 246-249, 1997.
- Litzka, O., Then Bergh, K., Brakhage, A.A. The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. **Eur. J. Biochem.**, v. 238, p. 675-682, 1996.
- MacCabe, A.P., Orejas, M., Pérez-González, J.A., Ramón, D. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1331-1333, 1998.
- MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belshaw, N.J., Archer, D.B. Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2295-2307, 1993.

- Mantovani, R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. **Nucleic Acids. Res.**, v. 26, p. 1135-1143, 1998.
- Marzluf, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 17-32, 1997.
- Mizote, T., Bibbins, M., Sheffield, P.J., Connerton, I.F. Gel mobility shift scanning of the acetate-inducible promoters from *Neurospora crassa* reveals a common co-inducible DNA-binding protein. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 421-427, 1996.
- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., Goodman, R.H. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 6682-6686, 1986.
- Nagata, O., Takashima, T., Tanaka, M., Tsukagoshi, N. *Aspergillus* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. **Mol. Gen. Genet.**, v. 237, p. 251-260, 1993.
- Papagiannopoulos, P., Andrianopoulos, A., Sharp, J.A., Davis, M.A., Hynes, M.J. The *hapC* gene of *Aspergillus nidulans* is involved in the expression of CCAAT-containing promoters. **Mol. Gen. Genet.**, v. 251, p. 412-421, 1996.
- Parenicová, L., Benen, J.Á.E., Kester, H.C.M., Visser, J. *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 72-80, 1998.
- Reymond-Cotton, P., Fraissinet-Tachet, L., Fèvre, M. Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase *pgl* gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. **Curr. Genet.**, v. 30, p. 240-245, 1996.
- Ruijter, G.J.G. and Visser, J. Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 151, p. 103-114, 1997.
- Saloheimo, A., Aro, N., Ilmén, M., Penttilä, M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 5817-5825, 2000.
- Shroff, R.A., Lockington, R.A., Kelly, J.M. Analysis of mutations in the *creA* gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 42, p. 950-959, 1996.
- Tanaka, A., Kato, M., Hashimoto, H., Kamei, K-i, Naruse, F., Papagiannopoulos, P., Davis, M.A., Hynes, M.J., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. An *Aspergillus oryzae* CCAAT-binding

protein, AoCP, is involved in the high-level expression of the taka-amylase A gene. **Curr. Genet.**, v. 37, p. 380-387, 2000.

Then Bergh, K., Litzka, O., Brakhage, A.A. Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 3908-3916, 1996.

van Gemeren, L.A., Beijersbergen, A., Musters, W., Gouka, R.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Verrips, C.T. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 755-763, 1996.

van Peij, N.N.M.E., Visser, J., de Graaff, L. Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 131-142, 1998.

Wubben J.P., Mulder W., ten Have, A., van Kan J.A.L., Visser J. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1596-1602, 1999.

Zeilinger S., Mach, R.L., Schindler, M., Herzog, P., Kubicek, C.P. Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 25624-25629, 1996.

RESUMO E CONCLUSÕES

As pectinases são enzimas que degradam substâncias pécticas encontradas na parede celular vegetal. Elas são secretadas por diferentes microrganismos e são muito estudadas devido à sua aplicação na indústria de alimentos e ao seu importante papel em processos que permitem a invasão e colonização de tecido vegetal por fungos patogênicos.

A organização e a regulação da expressão de genes que codificam poligalacturonases (PGs) de *Penicillium griseoroseum* foram investigadas. Os genes *pgg1* e *pgg2* foram sequenciados e codificam duas endopoligalacturonases que possuem identidade de 57,5% entre si. Ambos os genes estão presentes em cópias únicas no genoma de *P. griseoroseum* e são interrompidos por dois íntrons que se conservam nas mesmas posições. Análise por hibridização do DNA total revelou que a organização estrutural dos genes de PG é muito semelhante em *P. griseoroseum*, *P. expansum*, *P. italicum* e *P. purpurogenum*. Verificou-se também a existência de um pequeno número desses genes no genoma de diferentes espécies de *Penicillium*, ao contrário do observado em *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*, cujas proteínas são codificadas por famílias multigênicas.

Os genes *pgg1* e *pgg2* possuem uma expressão diferencial em função do tempo e da fonte de carbono presente no meio de cultivo do micélio. Transcritos de *pgg1* foram observados somente com 76 horas de crescimento do fungo, enquanto que transcritos de *pgg2* foram detectados de 24 a 96 horas. O meio contendo pectina, suplementado ou não com extrato de levedura, foi a única condição onde a transcrição de *pgg1* foi detectada. O gene *pgg2* foi expresso em meios contendo sacarose e pectina, suplementados ou não, mas foi reprimido por glicose. Essa repressão não foi observada quando extrato de levedura foi

adicionado ao meio. Estudos têm demonstrado um efeito positivo desse componente na produção de pectinases, onde a sua presença estimularia o aumento de cAMP intracelular resultando na ativação da transcrição gênica. Um elemento de resposta ao cAMP foi encontrado na região 5' terminal do gene *pgg2*. Um complexo DNA-proteína foi visualizado quando um fragmento contendo este elemento foi utilizado em ensaios de retardamento em gel, o que também comprovou que os cis-elementos CCAAT e TATAATATA são sítios de ligação para proteínas reguladoras. A região reguladora do gene *pgg1* possui vários possíveis sítios para ligação de uma proteína homóloga ao repressor CREA de *Aspergillus nidulans*. A sobreposição de um desses sítios ao cis-elemento TATATAA poderia explicar a repressão da expressão de *pgg1* que ocorre quando o fungo é cultivado em glicose.

O sistema pectinolítico representa um bom modelo de estudo, pois dele fazem parte diferentes enzimas que são codificadas por vários genes. Existem poucas informações a respeito do controle da expressão de genes de poligalacturonases em fungos filamentosos, embora vários genes tenham sido caracterizados. Esses genes são regulados na etapa de transcrição e se expressam diferencialmente em resposta a fontes de carbono presentes no meio. A disponibilidade de sistemas de transformação em fungos aliada à obtenção de mutantes deficientes na produção de pectinases e o estudo de regiões reguladoras irão gerar informações que poderão ser usadas para se definirem estratégias para a obtenção de linhagens superprodutoras de pectinases ou para a construção de vetores para expressão de proteínas heterólogas.

preferência de códons seja mais evidente em genes que possuem um alto nível de expressão (Gurr et al., 1987).

Tabela 2 - Análise de códons preferenciais presentes em genes que codificam endopoligalacturonases no gênero *Penicillium*.

UUU	Phe	9	UCU	Ser	53	UAU	Tyr	9	UGU	Cys	9
UUC	Phe	59	UCC	Ser	114	UAC	Tyr	42	UGC	Cys	48
UUA	Leu	0	UCA	Ser	9	UAA	Parada	3	UGA	Parada	2
										a	
UUG	Leu	22	UCG	Ser	26	UAG	Parada	2	UGG	Trp	36
CCU	Leu	17	CCU	Pro	23	CAU	His	6	CGU	Arg	10
CUC	Leu	54	CCC	Pro	36	CAC	His	34	CGC	Arg	19
CUA	Leu	1	CCA	Pro	6	CAA	His	8	CGA	Arg	0
CUG	Leu	40	CCG	Pro	9	CAG	His	36	CGG	Arg	3
AAU	Ile	34	ACU	Thr	60	AAU	Asn	23	AGU	Ser	26
AUC	Ile	143	ACC	Thr	172	AAC	Asn	129	AGC	Ser	80
AUA	Ile	2	ACA	Thr	18	AAA	Lys	12	AGA	Arg	2
AUG	Met	9	ACG	Thr	23	AAG	Lys	141	AGG	Arg	1
GUU	Val	47	GCU	Ala	67	GAU	Asp	57	GGU	Gly	140
GUC	Val	113	GCC	Ala	81	GAC	Asp	99	GGC	Gly	138
GUA	Val	7	GCA	Ala	19	GAA	Asp	21	GGA	Gly	57
GUG	Val	39	GCG	Ala	17	GAG	Asp	54	GGG	Gly	14

As pectinases são enzimas comercialmente usadas na indústria de alimentos. Genes que codificam poligalacturonases e suas respectivas enzimas são mais bem caracterizados em *Aspergillus*, considerado modelo de estudos em fungos filamentosos. Porém, a importância do gênero *Penicillium* e a potencial utilização de suas proteínas e metabólitos secundários nas indústrias alimentícia e farmacêutica, torna-o uma boa alternativa para estudos genéticos, onde aspectos da organização e regulação gênica precisam ser investigados. Estudos de organização estrutural de genes revelam características interessantes que podem ser empregadas em análises filogenéticas ou para a construção de sistemas eficientes de expressão. Além disso, é o primeiro passo para elucidar os mecanismos que coordenam a expressão de genes, aspecto de grande importância quando se deseja produzir altos níveis de proteínas de interesse.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballance, D.J. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. **Yeast**, v. 2, p. 229-236, 1986.
- Barros, A.O. Clonagem de gene que codifica a enzima poligalacturonase em *Penicillium griseoroseum*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1997. 62 p.
- Benen, J., Parenicová, L., Kusters-van Someren, M., Kester, H., Visser, J. Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. In: VISSER, J., VORAGEN, A.G.J. (Eds.). **Pectins and pectinases**. 1996. p. 331-348.
- Bussink, H.J.D., Brouwer, K.B., de Graaff, L.H., Kester, H.C.M., Visser, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. **Cur. Genet.**, v.20, p.301-307, 1991.
- Cary, J.W., Brown, R., Cleveland, T.E., Whitehead, M., and Dean, R.A. Cloning and characterization of a novel polygalacturonase-encoding gene from *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, v. 153, p. 129-133, 1995.
- Centis, S., Dumas, B., Fournier, J., Marolda, M., Esquerré-Tugayé, M.T. Isolation and sequence analysis of *Cplg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Gene**, v. 170, p. 125-129, 1996.
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N., Esquerré-Tugayé, M. T., Dumas, B. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of *Clpg2* and comparison of its expression to that of *Clpg1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 10, p. 769-775, 1997.
- D'Ângelo, M.A.C. Purificação parcial e caracterização poligalacturonases de *Penicillium griseoroseum*. Universidade Federal de Viçosa, 1998. Monografia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 53p.
- Edelmann, S. E., Staben, C. A statistical analysis of sequence features within genes from *Neurospora crassa*. **Experim. Mycol.**, v. 18, p. 70-81, 1994.

- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., Fèvre, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 96-99, 1995.
- Grassin C., Fauquembergue, P. Fruit juices. In: GODFREY, T., WEST, S. (Eds.). **Industrial Enzymology**. Macmillan Press, 1996. p. 225-264.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E., Kinghorn, J.R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: KINGHORN, J. R. (Ed.) **Gene structure in eukaryotic microbes**. Oxford: IRL Press, 1987. p.93-139.
- Kozak, M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 9, p. 5233-5256. 1981.
- Ishida, Y., Kakibuchi, K, Hirao, Y, Izumori, K. Cloning and characterization of a polygalacturonase-encoding gene from *Penicillium janthinellum*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 84, p. 257-260, 1997.
- Parenicová, L. Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., Visser, J. *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 72-80, 1998.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.J., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- Rambosek, J. Leach, J. Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. **CRC Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 6, p. 357-393. 1987.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. et al. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.39, p.213-294, 1993.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.A. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- Specht, C.A., Dirrusso, C.C., Novotny, C.P., Ullrich, R.C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic-acid from fungi. **Anal. Biochem.**, v. 119, p. 158-163, 1982.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., van Kan, J.A.L. The endopolygalacturonase gene *bcpgl* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Mol. Plant Microbe Interact** v., 11, p. 1009-1016, 1998.

- Unkles, S.E. Gene organization in industrial filamentous fungi. In: KINGHORN, J.R., TURNER, G. (Eds.) **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. Blackie Academic and Professional, 1992. p. 28-53.
- van Santen, Y., Benen, J.A.E., Schröter, K.H., Kalk, K.H., Armand, S., Visser, J., Dijkstra, B. 1.68-A crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 30474-30480, 1999.
- Wagner, F., Kusserow, H., Schäfer, W. Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 186, p. 293-299, 2000.
- Wubben, J.P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J.A.L. Visser, J. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1596-1602, 1999.

