



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

CLONAGEM DE GENES DE TERPENOS SINTASES DE CITROS

Ana Carolina Piva de **Oliveira**¹; Isabella Penteado Picirillo **Voso**²; Kléber Martins **Borges**³;

Marco Aurélio **Takita**⁴

Nº 14141

RESUMO -Terpenos formam o maior grupo de produtos naturais existentes. Um grande número de terpenos ou seus derivados apresentam importância econômica, incluindo-se aí aromas e corantes, além de outros compostos com propriedades farmacológicas importantes. Além disso, podem ser considerados alternativa como combustíveis. O Laboratório de Biotecnologia de Citros do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" do Instituto Agrônomo de Campinas coordena projetos de sequenciamento de Citros através de programas como o CitEST - Programa Institutos do Milênio, e o INCT-Citros (CNPq/FAPESP), ainda em curso, onde hoje formam o maior banco de sequências de Citros do mundo. Esta base de dados apresenta um panorama muito completo da biologia do grupo, pela identificação dos genes e seu perfil de expressão. No entanto, a caracterização dos genes é fundamental para a exploração de todo o potencial biotecnológico. Neste contexto, procurando ampliar o conhecimento sobre estes genes, esta proposta PIBITI/CNPq/IAC foi uma extensão coordenada de projetos PIBIC anteriores, visando uma aplicação prática dos conhecimentos obtidos. Com um objetivo final maior de utilizar cianobactérias como uma plataforma robusta para expressão de terpeno sintases e consequente produção de terpenos, este trabalho visou a clonagem de diversos genes de terpeno sintases de citros, como passo inicial da construção de vetores para transformação de cianobactérias.

Palavras-chaves: Biotecnologia, vetores, produtos naturais.

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBITI): Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras- SP, carol_534@yahoo.com.br

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

3 Colaborador: Colaborador, Centro de Citricultura- IAC, Cordeirópolis- SP

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



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

ABSTRACT -Terpenes are the largest group of existing natural products. A large number of terpenes and their derivatives have economic importance, including colorants and fragrances, and other valuable pharmacological properties compounds. Furthermore, they can be considered as alternative fuels. The Biotechnology Laboratory of the Centro APTA Citrus "Sylvio Moreira" of Agronomic Institute of Campinas coordinates Citrus sequencing projects through programs such as CitEST - Millennium Institutes Program, and the INCT-Citrus (CNPq / FAPESP), still in course, which form the world's largest citrus sequence database. This database presents a very complete picture of this group's biology, the identification of genes and their expression profile. However, the characterization of genes is crucial for exploiting all their biotechnological potential. In this context, seeking to broaden the knowledge about these genes, this PIBITI/CNPq/IAC proposal is an extension of previous PIBIC coordinated extension projects, aiming a practical application of the knowledge obtained. With the final major goal of using cyanobacterium as a robust platform for terpene synthases expression and consequent terpene production, this work aimed the cloning of several citrus terpene synthase genes, as an initial step towards the construction of vectors for transformation of cyanobacteria.

Keywords: Biotechnology, vectors, natural products.

1 INTRODUÇÃO

Terpenos constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais. Apesar de alguns terpenos estarem envolvidos no metabolismo primário de plantas, como os hormônios giberelina (Hedden e Kamiya, 1997) e ácido abscísico (Schwartz e col., 1997), a vasta maioria são classificados como metabólitos secundários. Apresentam funções ecológicas (Langenheim, 1994; Dicke, 1994; Bouwmeester e col., 1999, Pichersky e Gershenzon, 2002) mas também são muito utilizados como agentes de sabores e fragrâncias adicionados a alimentos, bebidas, perfumes, sabões, pasta de dente e outros produtos (Verlet, 1993), além de apresentarem importância farmacológica (Crowell e col., 1992; Van Geldre e col., 1997). Os terpenos são formados a partir do isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), o qual é resultante da isomerização de IPP (Ramos-Valdivia e col., 1997; Ogura e Koyama, 1998; Koyama, 1999).



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

O Laboratório de Biotecnologia de Citros do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" do Instituto Agrônomo de Campinas coordenou projetos de sequenciamento de Citros através de programas como o Instituto do Milênio, onde formatou-se o CitEST, maior banco de dados de sequências de ESTs de citros do mundo, e o INCT-Citros (CNPq/FAPESP), sendo este último responsável por parte do sequenciamento de genomas de citros, recentemente publicado (Wu e col., 2014).

No CitEST, a busca por sequências relacionados à síntese de terpenos mostrou a presença de todos os componentes das vias de síntese de IPP e DMAPP em citros (Takita e col., 2007). Foram encontrados 49 possíveis sequências codificando terpeno sintases em Citros e gêneros correlatos (Dornelas e Mazzafera, 2007). Buscas nos genomas completos sequenciados, de *Citrus clementina* e *Citrus sinensis*, permitiram a identificação de um número maior de possíveis terpeno sintases neste grupo, 120 no total, distribuídos entre as duas espécies.

Como a caracterização funcional da maioria destas terpeno sintases ainda não foi realizada e, portanto, seus produtos ainda são desconhecidos, é fundamental que antes de se utilizar estes genes para fins biotecnológicos, seus produtos sejam caracterizados funcionalmente. Esta caracterização funcional passa necessariamente pela expressão em sistemas heterólogos, como tem sido feito nos últimos anos (Fischer e col., 2013, Melillo e col., 2013, pôster 14119). Estes terpenos caracterizados poderiam então ser produzidos em grande quantidade através de processos biotecnológicos. Para tanto, o primeiro passo é a clonagem destes genes visando sua caracterização *in vitro*, objetivo deste trabalho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amplificação de terpeno sintases

Os genes estavam clonados no vetor pSport1 (Invitrogen). Para isolamento destes genes do vetor foram realizadas reações de polimerização em cadeia usando-se os primers desenhados. As reações de PCR foram feitas com a enzima de alta fidelidade *Pfu* DNA polimerase (Fermentas). As amplificações foram otimizadas a partir da reação básica indicada pelo fabricante, 1x tampão, 0,2mM de cada dNTP, 1ng de plasmídeo, 250ng de cada primer, 2,5U de enzima em um volume total de 100µL. As condições de ciclagem foram: um passo inicial de 1 a 3 minutos à 95°C, 25 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 50-58°C, 2 minutos/Kb à 72°C, e um passo final de incubação à 72°C por 10 minutos. A amplificação foi verificada em gel de agarose 0.7%.



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

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

Purificação dos amplicons

Para purificação dos amplicons utilizou-se o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Foram então adicionados 3 volumes de tampão de captura ao DNA (volume x peso), seguido de incubação do tubo por 15 minutos a 60°C. A solução resultante foi então adicionada a uma coluna de purificação e incubada por 1 minuto e em seguida centrifugada a 16000g. O resíduo foi descartado e a coluna de purificação foi lavada com 500µL de solução de lavagem e centrifugada como anteriormente. O DNA foi eluído da resina da coluna de purificação através de incubação com 50 µL de tampão de eluição por 1 minuto e centrifugado novamente.

Clonagem

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

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

Transformação

Células competentes das linhagens bacterianas foram preparadas com 50mM cloreto de cálcio e armazenadas a -80°C. Cinco microlitros das ligações foram usados para transformação misturando-se a 50µL de suspensão de células da linhagem DH5α. O tubo foi incubado em gelo por 30 minutos e dado um choque térmico a 42°C por 45 segundos. As células voltaram para o gelo



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

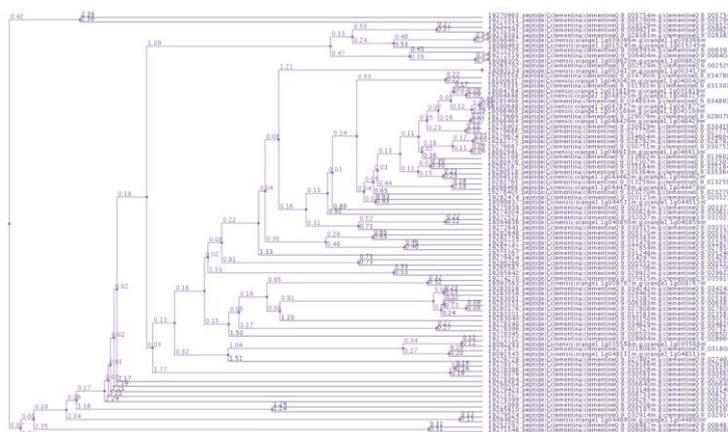
por 2 minutos, quando foi adicionado 1mL de meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl; 10mM MgCl₂, 20mM glicose adicionados após autoclavação) pré-aquecido. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora com agitação (250 rpm) e 200 µL de células foram plaqueados em uma placa com meio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, pH 7,0, 2% ágar) contendo 50 µg/mL de kanamicina. O restante das células foi concentrado por centrifugação e também plaqueado. As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C.

Mini-preparações de plasmídeos

Os transformantes foram inoculados em 1mL de meio LB e crescidos durante a noite. A extração dos plasmídeos foram feitas por mini-preparações alcalinas. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 100µL de Solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0). Foram adicionados 200µL de Solução II (0.2N NaOH, 1% SDS), invertendo-se o tubo várias vezes. Neste foram colocados 150µL de Solução III (60mL de 5M acetato de potássio, 11,5mL de ácido acético glacial, em um volume total de 100mL), misturando-se delicadamente. Os restos celulares foram retirados por centrifugação, mantendo-se o sobrenadante com o DNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram feitas buscas por sequências que codificam terpeno sintases no site do Phytozome (phytozome.org), tanto para os genomas de *C. sinensis* quanto de *C. clementina*. Esta busca foi feita através de palavras chave e resultou na identificação de 123 sequências no total, que foram usadas para buscas por similaridade com a base de dados não redundantes de proteína do NCBI, para confirmação de que codificavam de fato terpeno sintases. Algumas sequências foram eliminadas nesta análise, resultando em um total de 113 sequências conforme Figura 1.





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

Figura 1. Filograma das sequências de terpeno sintases de citros. As sequências de nucleotídeos obtidas tanto no genoma de *C. clementina* quanto no de *C. sinensis* foram alinhadas com o programa t-coffee e a árvore montada com no JalView, usando distância média. Os valores de distância estão mostrados para cada divisão.

Após esta análise, foram eliminadas sequências que codificavam proteínas muito curtas ou redundantes. Com isto, obteve-se 55 diferentes terpeno sintases de citros que foram usadas para desenho dos primers com o programa PrimerSelect do LASERGENE99, obtendo-se 50 primers forward e 55 primers reverso, que foram sintetizados. Posteriormente, foram feitas buscas de similaridade para sequências existentes no banco de clones do CitEST, para obter-se genes que são de fato expressos nestes organismos, uma vez que a base do CitEST são ESTs, facilitando o trabalho de amplificação destes genes. Assim sendo, foram identificados 18 sequências expressas de terpeno sintases passíveis de amplificação utilizando-se os clones do CitEST, com os primers 5, 50, 10, 17, 15, 19, 21, 25, 29, 33, 34, 36, 40, 41, 43, 52, 56 e 30. Foram feitas amplificações com *Pfu* DNA polimerase, como mostrado na Figura 2.

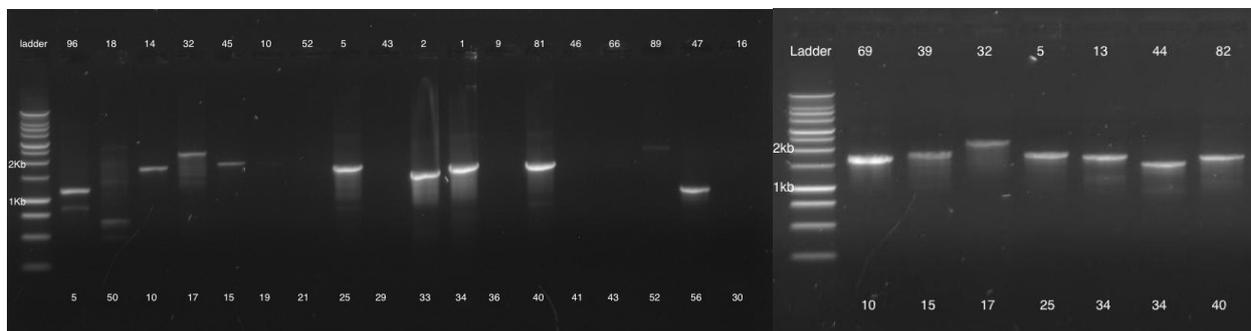


Figura 2. Amplificação de genes codificando terpeno sintases de citros. Clones isolados no CitEST foram utilizados para obtenção de plasmídeos e posterior amplificação com *Pfu* DNA polimerase. Na parte superior do gel estão identificados os clones utilizados e, na parte inferior, a identificação dos primers.

Assim, estes amplicons foram utilizados para clonagem no vetor pF1K T7 após digestão com as enzimas *SgfI* e *PmeI*. Após a ligação, os DNAs foram usados para transformação da linhagem DH5 α , obtendo-se um número variável de clones para cada amplicon utilizado. Os transformantes foram avaliados através de PCR de colônia, verificando-se a presença ou não do inserto (Figura 3).



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

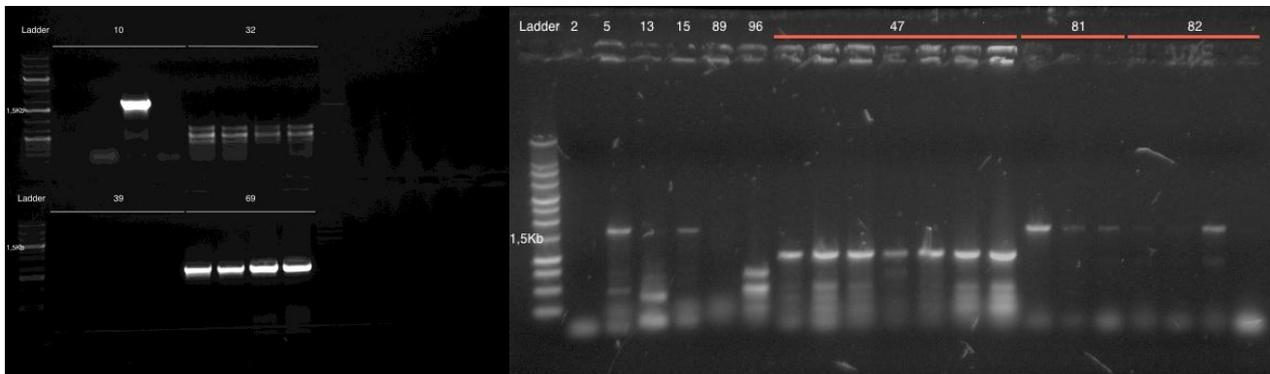


Figura 3. Verificação de clonagem. Colônias de transformantes obtidos de pF1K T7 contendo insertos provenientes dos clones 10, 32, 39, 69, 2, 5, 13, 15, 89, 96, 47, 81 e 82 foram utilizados para amplificação com *Taq* DNA polimerase de modo a identificar-se aqueles que apresentam inserto.

A confirmação da clonagem destes genes possibilita trabalhos posteriores no intuito de desenvolver-se trabalhos funcionais com foco na utilização de cianobactérias como uma plataforma robusta para expressão de terpeno sintases.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho foi de grande importância para os trabalhos com terpeno sintases de citros, uma vez que permitirá a caracterização funcional de ao menos seis diferentes terpeno sintases de citros.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUWMEESTER, H. J., VERSTAPPEN, F. W., POSTHUMUS, M. A., DICKE, M. 1999. Spider miteinduced (3S)-(ϵ) nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiol.* 121, 173-180.

CROWELL, P., LIN, S., VEDEJS, E., GOULD, M. N. 1992. Identification of metabolites of the antitumor agent d limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer & Chemother. Pharmacol.* 31, 205-212.

DICKE, M. 1999. Specificity of Herbivore-Induced Plant Defences. *Novartis Found Symp* 223:43-54.

Dixon, R. A. 2005. Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8,329-336.



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

- DORNELAS, M. C., MAZZAFERA, P. 2007. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3) suppl., 832-840.
- FISCHER, M., MEYER, S., OSWALD, M., CLAUDEL, P., KARST, F. 2013. Metabolic Engineering of Monoterpenoid Production in Yeast em Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms, editado por Bach, T. J. E Rohmer, M. Springer, Nova York ,pp 65-71.
- HEDDEN, P., KAMIYA, Y. 1997. Giberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48, 431-460.
- KIRBY, J., KEASLING, J. D. 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu Rev Plant Biol.* 60: 335-355.
- KOYAMA, T. 1999. Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1671-1676.
- KUCHMENT, A. 2103. No More OJ? An Invasive Insect Threatens the Citrus Industry. *Sci. American.* Mar (<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=no-more-orange-juiceinvasive-insect-threatens-citrus-industry>).
- LANGENHEIM, J. H. (1994) Higher Plant Terpenoids: A Phytocentric Overview of Their Ecological Roles. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.
- MELILLO, E., SETROIKROMO, R., QUAX, W. J., KAYSER, O. 2013. Production of α -cuprenene in *Xanthophyllomyces dendrorhous*: a step closer to a potent terpene biofactory. *Microbial Cell Factories* 12, 13.
- OGURA, K., KOYAMA, T. 1998. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem Rev.*98, 1263-1276.
- PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 237-243
- RAMOS-VALDIVIA, A. C., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1997. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat. Prod. Rep.* 14, 591-603.
- SCHWARTZ, S. H., TAN, B. C., GAGE, D. A., ZEEVAART, J. A., MCCARTY, D. R. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276, 1872-1874.
- TAKITA, M. A., BERGER, I. J., BASÍLIO-PALMIERI, A. C., BORGES, K. M., SOUZA, J. M., TARGON, M. L. P. N. 2007. Terpene production in the peel of sweet orange fruits. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3) suppl., 841-847.
- VAN GELDRE, E., VERGAUWE, A., VAN DEN EECKHOUT, E. 1997. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol Biol.* 33, 199-209.
- VERLET, N. 1993. Commercial aspects em Volatile Oil Crops: Their Biology Biochemistry and Production. Longman Scientific and Technical, Essex. UK. pp. 137-174.
- WU, G. A., PROCHNIK, S., JENKINS, J., SALSE, J., HELLSTEN, U., MURAT, F., PERRIER, X., RUIZ, M., SCALABRIN, S., TEROL, J., TAKITA, M. A., e col. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat Biotech.* <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2906>.