

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**TRANSCRIPTOMA DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI  
1063: ANÁLISE DOS GENES DE LACASE, CLONAGEM E EXPRESSÃO  
HETERÓLOGA**

**IGOR VINICIUS RAMOS OTERO**

**Junho - 2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
RIO CLARO



**TRANSCRIPTOMA DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI  
1063: ANÁLISE DOS GENES DE LACASE, CLONAGEM E EXPRESSÃO  
HETERÓLOGA**

**IGOR VINICIUS RAMOS OTERO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette  
Coorientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

**Junho - 2016**

576  
O87t

Otero, Igor Vinicius Ramos

Transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 : análise dos genes de lacase, clonagem e expressão heteróloga / Igor Vinicius Ramos Otero. - Rio Claro, 2016

61 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientadora: Lara Durães Sette

Coorientador: Henrique Ferreira

1. Microorganismos. 2. Biotecnologia. 3. Enzimas. 4. Fungos. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TRANSCRIPTOMA DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI 1063: ANÁLISE DOS GENES DE LACASE, CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

**AUTOR: IGOR VINICIUS RAMOS OTERO**

**ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR  
CEIS / IB Rio Claro



Profa. Dra. PAULA MARIA MOREIRA MARTINS  
Centro de Citricultura Sylvio Moreira / Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Rio Claro, 29 de junho de 2016

*Aos meus pais Elizabete e*

*Carlos Arturo.*

*Pelo total apoio a todos os meus objetivos.*

*Pela fé no meu sucesso.*

*Pelo amor incondicional.*

*Com amor,*

*dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Lara Durães Sette e Prof. Dr. Henrique Ferreira, que me aceitaram em seus respectivos grupos de pesquisa, e dentro de cada especialidade, me auxiliaram na condução dos experimentos, na revisão dos manuscritos, e mostraram-se sempre disponíveis e solícitos durante os dois anos de mestrado. Verdadeiros mestres, apaixonados pelo ensinar e que se tornaram fonte de inspiração para o jovem biólogo autor deste trabalho.

A Dra. Milene Ferro, pela colaboração com as análises de bioinformática do transcriptoma, e pela paciência e preocupação ao explicar todos os métodos e processos das análises realizadas.

Ao Me. Pedro Henrique Mainardi, pela amizade e auxílio com o cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Ao Dr. Giordanni C. Dantas e a Me. Lilian A. Lacerda, pela amizade e pelo constante auxílio na montagem dos experimentos realizados no Laboratório de Genética de Bactérias.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial, pela amizade e pelo auxílio com os experimentos realizados naquele laboratório.

Ao Prof Dr. Maurício Bacci e a Dra. Paula Maria M. Martins pelas correções e contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos meus pais Elizabete e Carlos Arturo, pela motivação, pelo apoio financeiro, e por absolutamente tudo.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, por terem me recebido de braços abertos e por terem contribuído diariamente para o meu bem-estar durante as jornadas de trabalho.

Aos amigos da Nemelés, que me auxiliaram na adaptação à Rio Claro e transformaram a república no meu novo lar.

Aos amigos de Campo Grande/MS, pelo apoio e pelas constantes tentativas de se fazerem presentes na minha vida, de uma forma ou de outra.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida (Processo 159488/2014-1); e à Fapesp pelo apoio financeiro ao Projeto 2013/19486-0, ao qual o presente trabalho está vinculado.

## RESUMO

As lacases pertencem ao grupo das multicobre oxidases e o interesse biotecnológico por essas enzimas se deve ao fato delas catalisarem reações envolvendo diferentes compostos fenólicos e amínicos. A utilização diversificada dessas enzimas na indústria estimula a busca por lacases capazes de se adaptar aos diferentes processos industriais visando encontrar a relação de ótimo custo-benefício. O basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, já demonstrou capacidade de secretar quantidades significativas de lacase sob condições otimizadas (salinas) para produção da enzima. As lacases desse organismo podem apresentar características diferenciadas devido a origem marinha do basidiomiceto. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção das sequências de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 através da análise do transcriptoma, afim de realizar a caracterização *in silico* dessas sequências, análises filogenéticas, clonagem e expressão heteróloga. Foram obtidas 13 isoformas de lacase correspondente a 8 genes putativos para a enzima, das 13 isoformas, 11 foram referentes a lacases extracelulares e 2 intracelulares. Todas as isoformas apresentaram-se ricas em conteúdo GC (> 52 %) sendo os aminoácidos Valina, Leucina, Serina, Ácido aspártico e Treonina os mais representativos na composição polipeptídica. A massa das lacases variou entre 53,5 e 64,6 kDa. Nove isoformas apresentaram o aminoácido Leucina e 4 isoformas apresentaram o aminoácido Fenilalanina na posição variável ligado ao cobre tipo 1 que possui atividade regulatória sobre a enzima. Nenhuma das isoformas apresentou similaridade maior a 57% em relação à outras sequências de lacases depositadas no NCBI e, portanto, demonstraram ser potencialmente diferentes das lacases originárias de outros basidiomicetos marinhos e terrestres. A clonagem de um fragmento codificante de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 possibilitou a montagem de sistemas de expressão baseado em 3 linhagens diferentes de *Escherichia coli*. Os resultados de expressão da enzima recombinante não foram conclusivos, contudo, o presente trabalho traz contribuições significativas ao estudo das lacases produzidas pelo fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, demonstrando a capacidade desse organismo de produzir diferentes lacases com potencial para aplicação biotecnológica.

## ABSTRACT

Laccases belong to the group of multicobalt oxidases and the biotechnological interest in these enzymes is due to the fact that they catalyze reactions involving different phenolic and amine compounds. The diverse use of these enzymes in the industry stimulates the search for laccases able to adapt to different industrial processes seeking to find the optimum cost-benefit ratio. The marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063, has demonstrated ability to secrete significant amounts of laccase under optimized conditions (salt) for the enzyme production. Laccases from this organism could present different characteristics due to its marine origin. The present study aimed to obtain the laccase sequences from the fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 by transcriptome analysis in order to perform characterization of these sequences *in silico*, phylogenetic analysis, cloning and heterologous expression. A total of 13 laccase isoforms were obtained corresponding to eight putative genes for the enzyme. Among the 13 isoforms, eleven were related to extracellular laccases and two to intracellular. All isoforms showed abundance in GC content (> 52 %) with the amino acid Valine, Leucine, Serine, Threonine Aspartic Acid as the most representative in the polypeptide composition. The mass of laccases varied between 53.5 and 64.6 kDa. Nine isoforms showed the amino acid Leucine and four isoforms showed the amino acid Phenylalanine in the variable position on the copper type 1 which has regulatory activity on the enzyme. None of the isoforms showed a similarity over to 57% compared to other laccases sequences deposited in the NCBI and therefore shown to be potentially different from laccases from other marine and terrestrial basidiomycetes. The cloning of a DNA fragment that encodes laccase from *Peniophora* sp. 1063 CBMAI allowed the assembly of expression systems based on three different strains of *Escherichia coli*. The results of recombinant enzyme expression were inconclusive. However, this study brings significant contributions to the study of laccases produced by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063, demonstrating the ability of this organism to produce different laccases with potential for biotechnological application.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Demonstração dos 3 domínios <i>cupredoxin</i> em lacase do fungo <i>Trametes versicolor</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do sítio ativo de lacases.....	8
<b>Figura 3.</b> Gráfico gerado pelo programa FASTQC mostrando a qualidade <i>Phred</i> por base.....	24
<b>Figura 4.</b> Gráfico gerado pelo programa FASTQC mostrando a qualidade <i>Phred</i> por sequência.....	25
<b>Figura 5.</b> Gráfico gerado pelo programa FASTQC após <i>trimming</i> no Trimmomatic, mostrando a qualidade <i>Phred</i> por base nas sequências.....	25
<b>Figura 6.</b> E-value referente ao BLAST na base de dados NR do NCBI.....	27
<b>Figura 7.</b> Resultados de BLAST com a porcentagem de homologia do transcriptoma do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 com outros basidiomicetos.....	27
<b>Figura 8.</b> Distribuição dos termos de GO 2.....	29
<b>Figura 9.</b> Distribuição dos unigenes com <i>Commission Enzyme</i> (E.C) atribuído. A) Principais grupos enzimáticos. B) Distribuição das oxidoredutases.....	30
<b>Figura 10.</b> Alinhamento dos transcritos com outras lacases fúngicas recuperadas do GenBank: demonstração das regiões conservadas.....	32
<b>Figura 11.</b> Divisão dos transcritos de lacase, baseado no aminoácido variável que flanqueia o cobre T1.....	33
<b>Figura 12.</b> Distribuição percentual de aminoácidos pelas sequências de transcritos de lacase.....	34
<b>Figura 13.</b> Árvore filogenética agrupando os transcritos do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 a lacases de outros basidiomicetos.....	39
<b>Figura 14.</b> Ensaio de <i>single colony</i> demonstrando a confirmação para presença do gene no vetor.....	42
<b>Figura 15.</b> A) Clonagem <i>in silico</i> demonstrando o tamanho dos fragmentos esperados utilizando as enzimas de restrição <i>DraIII</i> , <i>XhoI</i> e <i>EcoRI</i> . B) Gel de agarose 0,7% demonstrando ensaio de restrição enzimática confirmando o padrão de bandas esperado para o transcrito Lac15071B.....	43
<b>Figura 16.</b> Gel de agarose 0,7% demonstrando a amplificação do fragmento Lac15071B para correção utilizando diferentes polimerases.....	44
<b>Figura 17.</b> Gel de agarose 0,7% demonstrando a restrição enzimática do vetor pJET 1.2 utilizando as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> .....	45
<b>Figura 18.</b> Ensaio qualitativo para presença de lacase em placa ágar-guaiacol. A) linhagem Rosetta_L3. B) linhagem L21(DE3).....	47

**Figura 19.** Gel de SDS-poliacrilamida com as proteínas totais expressas pelas três linhagens transformadas.....48

**Figura 20.** Gel de SDS-poliacrilamida com as proteínas totais das linhagens Rosetta e BL21(DE3), transformadas e não transformadas.....49

### LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Amostras enviadas para sequenciamento na MACROGEN com suas respectivas concentrações de RNA.....23

**Tabela 2.** Quantidade de cisteínas por lacase, em sequências recuperadas do GeneBank relativas a diferentes basidiomicetos.....35

**Tabela 3.** Característica dos transcritos de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.....36

### LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

ASW: Artificial Sea Water

CBMAI: Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e Indústria

FDA: Food and Drugs Administration

GRAS: Generally Recognized As Safe

HTS: High Troughput Screening

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial

LB: Luria Bertani

OGM: Organismo geneticamente modificado

ORF: Open Reading Frame

pb: pares de bases

h: hora

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	4
2.1 Multicobre oxidases.....	4
2.2 Lacases.....	5
2.2.1 Isoformas de lacases e suas famílias gênicas.....	6
2.2.2 Estrutura das lacases.....	7
2.2.3 Interesse biotecnológico e aplicação das lacases.....	8
2.3 Fungos derivados do ambiente marinho.....	10
2.3.1 <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	11
2.4 Expressão heteróloga de lacases.....	12
2.5 Sequenciamento de transcriptomas.....	13
<b>3. Objetivos</b> .....	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
<b>4. Material e métodos</b> .....	16
4.1 Condições de cultivo e extração de RNA do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	16
4.2 Quantificação e verificação da integridade do RNA.....	16
4.3 Sequenciamento.....	16
4.4 Pré-processamento dos <i>reads</i> .....	16
4.5 Montagem dos <i>contigs</i> e anotação.....	17
4.6 Obtenção dos transcritos de lacase, análises e seleção da sequência para clonagem.....	17
4.7 Desenho dos <i>primers</i> para obtenção do transcrito selecionado.....	18
4.8 Amplificação, isolamento e purificação do cDNA codificante para lacase.....	18
4.9 Clonagem, preservação e confirmação.....	18
4.10 Sequenciamento dos vetores de clonagem.....	19
4.11 Correção e adequação do cDNA clonado.....	20
4.12 Montagem do sistema de expressão em <i>Escherichia coli</i> .....	21
4.13 Análise da expressão da lacase recombinante através de ensaio de SDS-PAGE.....	21
4.14 Avaliação qualitativa de atividade enzimática da lacase recombinante.....	22
<b>5. Resultados e discussão</b> .....	23
5.1 Extração de RNA e sequenciamento do transcriptoma do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	23

5.2 Anotação do transcriptoma.....	26
5.3 Análise e caracterização dos transcritos de lacase.....	31
5.4 Seleção do transcrito para clonagem e expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> ....	41
5.5 Clonagem do fragmento Lac15071B, transformação em <i>E. coli</i> DH10B do transcrito e correção.....	42
5.6 Ensaio de atividade enzimática da lacase recombinante.....	46
5.7 Ensaio de expressão da lacase recombinante em três linhagens de <i>E. coli</i> .....	47
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>51</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Anexo 1 - Sequências dos <i>primers</i> desenhados.....</b>	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As lacases (Benzenediol: oxigênio oxi-redutase) [EC 1.10.3.2], são enzimas de estrutura glicoproteica amplamente distribuídas na natureza. Tendo sido relatada sua presença em plantas, bactérias, insetos, mas principalmente em fungos, e expressamente nos denominados fungos de decomposição branca (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013). Essas enzimas estão relacionadas a diferentes funções fisiológicas nos grupos de organismos onde podem ser encontradas, como por exemplo, na formação de estruturas de resistência bacteriana, no caso de esporos do gênero *Bacillus* (ENGUITA *et al.*, 2003); no metabolismo da lignina em plantas; no enrijecimento da cutícula em insetos, e na deslignificação promovida por fungos da decomposição branca (MAYER; STAPLES, 2002).

Capazes de catalisar reações envolvendo um vasto número de compostos fenólicos e amínicos (alifáticos e aromáticos), as lacases promovem a oxidação do substrato, utilizando o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, reduzindo-o a água ao final do processo (CLAUS, 2004). Essas características fizeram das lacases, um alvo de intensa investigação biotecnológica pela chamada “Química Verde” (RIVA, 2006), essa área da química busca a obtenção de produtos e/ou processos que minimizem a produção de resíduos e reduzam o impacto ambiental causado pela utilização de substâncias químicas na indústria (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Como reflexo do seu potencial, estas enzimas tem sido amplamente utilizadas na indústria (KUNAMNENI *et al.*, 2008), mais comumente na indústria de papel e celulose para o tratamento de polpa Kraft (KIRK *et al.* 2002) e na indústria têxtil para a biorremediação de corantes (RODRIGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015). Apesar das lacases não serem reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), essas enzimas já foram relatadas para utilização na indústria alimentícia, em processos de clarificação de bebidas e retirada de compostos fenólicos que possam provocar sabor indesejado (OSMA *et al.* 2010).

Diferentes aplicações demandam enzimas com características específicas que se adequem a cada situação e finalidade (NOVOZYMES, 2013). A busca por enzimas com características singulares estimula a prospecção de micro-organismos capazes de produzir tais enzimas almejando um ótimo custo-benefício. Nesse sentido, justifica-se o interesse por micro-organismos derivados de diferentes ambientes, bem como a utilização da

engenharia genética e mutação sítio dirigida visando suprir as necessidades de demanda de mercado (KIRK *et al.*, 2002; JONES; PANG, 2012).

A exploração da biotecnologia marinha, através da prospecção de micro-organismos derivados desse ambiente, mostra-se promissora (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015). Segundo os autores dessa revisão, enzimas produzidas por micro-organismos de origem marinha, demonstram características distintas daquelas produzidas por correlatos terrestres, devido a condições intrínsecas ao ambiente, como: salinidade, pressão, temperatura e luminosidade.

Como resultado dos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara Durães Sette, o fungo basidiomiceto derivado de ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, foi isolado da esponja *Amphimedon viridis* (coletado na cidade de São Sebastião na costa norte do estado de São Paulo, Brasil, MENEZES *et al.*, 2010), e demonstrou a habilidade de produzir lacase sob condições salinas e não salinas (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010).

A condição salina relacionada ao cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 refere-se à presença de água do mar preparada artificialmente (*Artificial Sea Water* - ASW). Mas, tendo em vista que o preparo de ASW envolve ao menos nove sais sob diferentes concentrações, e que o pico de produção da enzima se dá após cinco dias de cultivo, a obtenção de lacases recombinantes seria uma forma eficiente de tornar a produção independente dessa condição, bem como possibilitar a obtenção de lacases em menor tempo de cultivo e com características diferenciadas que favoreçam, por exemplo, sua purificação, ou que tenham expressão controlada por ação de um forte regulador gênico.

O primeiro micro-organismo utilizado como hospedeiro para produção industrial de proteína recombinante foi a bactéria *Escherichia coli* em 1977, e desde então permanece como o sistema procarioto para expressão heteróloga de proteínas mais utilizado (RAI; PADH, 2001). Considerando que essa bactéria foi amplamente estudada, hoje existem diferentes linhagens disponíveis para serem utilizadas na expressão heteróloga, cada uma apresentando características singulares e permitindo a adequação do sistema a diferentes condições e necessidades (CHEN, 2012).

Estudos de estrutura, caracterização e atividade enzimática de lacases bacterianas já foram realizadas utilizando *E. coli* como hospedeiro (BENTO *et al.*, 2005; BRISSOS

*et al.*, 2009). Lacases fúngicas também já foram expressas utilizando esse mesmo sistema. Salony *et al.* (2008), em trabalho pioneiro expressaram uma lacase do basidiomiceto *Cyathus bulleri*, com relativo sucesso. Contudo devido a problemas na sequência clonada a enzima recombinante apresentou aminoácidos adicionais e massa diferente da lacase nativa.

O amplo conhecimento sobre o sistema de expressão, associado à facilidade de manipulação, e a possibilidade de otimização da produção de lacases recombinantes, reduzindo tempo e os custos, incentivam a utilização da bactéria *Escherichia coli*, para a expressão dessas enzimas (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012). Contudo, a obtenção de lacases fúngicas expressas nesse sistema, e que ainda mantenham boa atividade enzimática, permanece como uma barreira que necessita ser superada.

É vasto o número de trabalhos com clonagem e expressão heteróloga de lacases utilizando *primers* inespecíficos, desenhados a partir da análise de diferentes sequências dessa enzima. Esses *primers* baseiam-se em 4 regiões conservadas presentes no sítio ativo das lacases e que estão diretamente relacionadas aos íons de cobre presentes nessa enzima (ENGUIITA *et al.*, 2003; CLAUS, 2004; RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013).

Contudo, a utilização de *primers* inespecíficos para clonagem e expressão heteróloga podem resultar em proteínas recombinantes que não correspondem àquelas esperadas (ver SALONY *et al.*, 2008). Nesse sentido, o emprego de novas tecnologias, como o sequenciamento de genomas e transcriptomas possibilitam a obtenção de genes e transcritos de um organismo fornecendo sequências completas que podem ser utilizadas para exploração biotecnológica (MOREIRA, 2013).

Biblioteca de transcritos, ou transcriptoma, representam uma grande fonte de informações a respeito de um organismo, permitindo reconhecer por exemplo, quais genes estão sendo ativamente expressos num dado momento (RODOVALHO, 2011). A análise dessas bibliotecas possibilita ainda, a elucidação de processos biológicos de um organismo; relativos ao conteúdo gênico, aos níveis de expressão sob uma determinada condição de cultivo, e a análise diferencial de expressão gênica (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010; WANG *et al.*, 2015).

Atualmente, com o advento dos sequenciamentos de nova geração (NGS), e aprimoramento da bioinformática, com o desenvolvimento de novos softwares (MANFRED *et al.*, 2013), tornou-se possível a montagem de bibliotecas de transcritos

sem a necessidade de um genoma como referência (técnica chamada de *de Novo assembly*) (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010; LI *et al.*, 2014). Essa nova técnica tem expandido a possibilidade de análise dessas bibliotecas para organismos menos estudados ou recém descobertos (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo a análise do transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, visando fornecer informações a respeito da expressão gênica desse organismo sob condição otimizada para produção de lacase, bem como identificar e caracterizar os transcritos desta enzima para ao final, realizar a clonagem e expressão heteróloga de uma lacase recombinante em *Escherichia coli*.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Multicobre oxidases**

As multicobre oxidases (MCOs) representam um pequeno grupo de enzimas, cuja a principal característica é a presença de quatro íons de cobre em seu sítio ativo (SAKURAI; KATAOKA, 2007). Esses íons, classificados quanto a espectrometria e a EPR (*Eletron Paramagnétic Resonance*), são divididos em três tipos (MOSHKOV *et al.*, 2014):

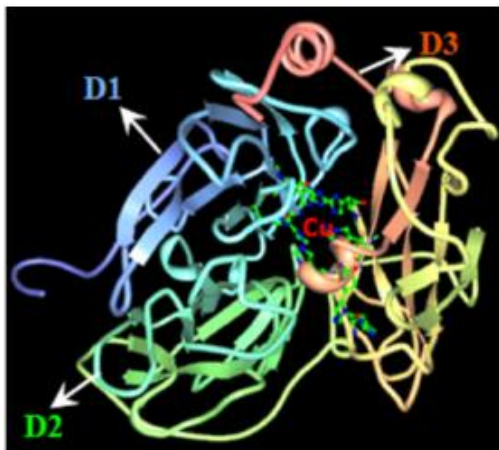
- Cobre tipo 1 (ou T1), paramagnético com absorbância a 660nm (ox.), confere coloração azul às multicobre oxidases devido ao alto potencial redox, promovido pela ligação a uma cisteína.
- Cobre tipo 2 (ou T2), paramagnético com absorbância a 730nm (ox.).
- Cobres tipo 3 (ou T3), diamagnéticos com absorbância a 330nm (ox.).

Nas MCOs esses íons estão distribuídos de modo a favorecer a transferência de elétrons proveniente do substrato enzimático (MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990). O cobre T2, juntamente aos dois cobres T3 formam um cluster trinucleado, encarregado de receber os elétrons do substrato e atuar como sítio de redução, enquanto o cobre T1 fica isolado do cluster e devido ao seu alto potencial redox, apresenta-se como o sítio de ligação do substrato (CLAUS, 2004).

As principais enzimas representantes das multicobre oxidases são lacases, L-ascorbases, bilirrubina oxidases e a ceruloplasmina oxidases. A estrutura terciária dessas enzimas apresenta, em geral, três domínios conservados relacionados aos sítios de ligação

ao cobre (apenas ceruloplasmina oxidase apresenta 6 domínios), e por isso são denominados *cupredoxin domains* (DWIVEDI *et al.*, 2011). A figura 1 ilustra os três domínios de uma lacase fúngica.

**Figura 1** - Demonstração dos 3 domínios *cupredoxin* em lacase do fungo *Trametes versicolor*. Imagem adaptada de Dwivedi *et al.*, 2011. D1 - domínio 1; D2 - domínio 2; D3 - domínio 3



## 2.2 Lacases

Lacases, benzenediol oxigênio óxido redutase (E.C 1.10.3.2), são enzimas com estrutura monomérica ou homodimérica capazes de catalisar reações envolvendo uma série de compostos, dentre eles, fenóis, aminas aromáticas e tióis. As lacases promovem a oxidação desses compostos reduzindo oxigênio molecular à água (MADHAVI; LELE, 2009), numa reação que envolve ao total, a oxidação de quatro substratos e a liberação de duas águas (RIVA, 2006).

O pH ótimo para atividade dessas enzimas varia de acordo com o organismo e o tipo de substrato enzimático (DWIVEDI *et al.*, 2011). Lacases fúngicas costumam apresentar pH ótimo para oxidação de fenóis entre 3,5 e 5,0 enquanto lacases de plantas podem variar esse pH ótimo até 9,0 dependendo da função desempenhada. A atividade sob baixo pH de lacases fúngicas está relacionada ao fato desses organismos apresentarem bom crescimento em meio ácido. Enquanto que as lacases de plantas, por serem enzimas intracelulares possuem atuação atrelada ao pH fisiológico (DWIVEDI *et al.*, 2011; MADHAVI; LELE, 2009).

Outra variável que interfere na atividade dessas enzimas é a temperatura. Em média, lacases apresentam atividade ótima entre 50 e 70 °C, mas algumas podem

apresentar melhor atividade abaixo de 25 C° como no caso da lacase de *Agaricus blazei* (ULLRICH *et al.*, 2005), ou acima de 70 °C no caso de *Thermus thermophilus* (KIM *et al.*, 2015).

O tamanho das lacases pode variar de acordo com o organismo, mas em média fungos e plantas apresentam essas enzimas com massas entre 50 e 100 kDa. Em contrapartida, lacases bacterianas podem ser bem menores, tendo sido relatado recentemente a presença de uma lacase com 27 kDa para a bactéria extremófila *Thermus thermophilus* (KIM *et al.*, 2015).

Em geral, essas enzimas apresentam-se como glicoproteínas, com taxas de glicosilação entre 10 e 45% em relação a sua massa (CLAUS, 2004; DWIVEDI *et al.*, 2011). A manose é o carboidrato mais abundante associado a lacases, e juntamente com outros açúcares formam a porção glicídica da enzima. Segundo alguns trabalhos, essa porção glicídica oferece maior estabilidade à enzima, diminui a susceptibilidade a proteases, sinaliza enzimas com atividade extracelular (MADHAVI; LELE, 2009; GIARDINA *et al.*, 2010; DWIVEDI *et al.*, 2011) e pode atuar diretamente na atividade enzimática (VITE-VALLEJO *et al.*, 2009). Mutações direcionadas a um único sítio de N-glicosilação em *Lentinus* sp. reduziram entre 50 e 96 % da atividade da lacase modificada (MAESTRE-REYNA *et al.*, 2015).

### **2.2.1 Isoformas de lacase e suas famílias gênicas**

A presença de isoformas de lacase num mesmo organismo é bastante comum. Nos fungos essa característica fica evidenciada, sendo grande o número de trabalhos publicados (ver revisões MADHAVI; LELE, 2009; DWIVEDI *et al.*, 2011). O ascomiceto *Podospora anserina*, por exemplo, apresenta três isoformas da enzima (DURRENS, 1981), já os basidiomicetos *Trametes versicolor*, *Ganoderma lacidum* e *Trametes multicolor* apresentam duas, três e cinco isoformas respectivamente (KO *et al.*, 2001; LEITNER *et al.*, 2002; MOLDES *et al.*, 2004).

Essas isoenzimas podem apresentar diferenças no tamanho, pH ótimo, temperatura e afinidade por substrato. Segundo Madhavi e Lele (2009), esse fato levanta a hipótese dessas isoenzimas desempenharem diferentes atividades fisiológicas sob diferentes condições de cultivo. A expressão dessas isoformas podem decorrer de um único gene ou de genes distintos (ARCHIBALD *et al.*, 1997).

Segundo Giardina e colaboradores (2010) diferentes famílias gênicas de lacase já foram descritas para fungos terrestres, e essa característica parece ocorrer também em basidiomicetos derivados do ambiente marinho (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010). A quantidade de genes pode variar muito dependendo do organismo, os fungos *Agaricus bisporus* e *Trametes villosa* apresentam dois e cinco genes para a enzima, respectivamente (GIARDINA *et al.*, 2010). Enquanto *Laccaria bicolor* apresenta nove (COURTY *et al.*, 2009) e *Coprinopsis cinerea* 17 genes de lacase (KILARU *et al.*, 2006).

Esses genes podem ser alélicos ou não, variar na composição de aminoácidos nas regiões codificantes e não codificantes (introns e exons), e estarem sujeitos a diferentes promotores (KILARU *et al.*, 2006). Contudo, pouco se sabe sobre as condições que regulam a expressão desses genes. Estágio de desenvolvimento, localização no organismo e presença de indutores no meio podem ser variáveis envolvidas na regulação desses genes (WANG *et al.*, 2015), mas novos estudos precisam ser realizados visando a elucidação desses mecanismos.

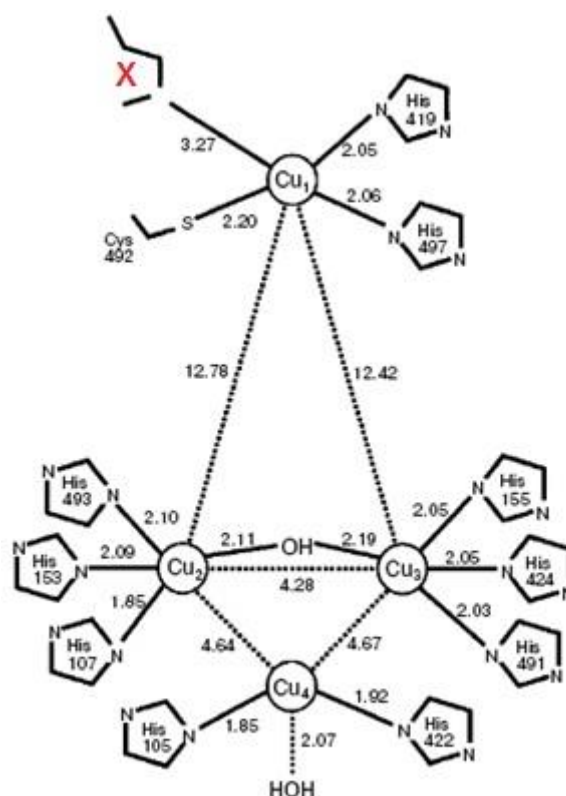
### 2.2.2 Estrutura das lacases

O estudo e caracterização dos genes de lacase baseia-se na cadeia de aminoácidos que constituem essas enzimas, mais precisamente, em quatro regiões conservadas responsáveis pela ligação dos quatro íons de cobres à enzima (GIARDINA *et al.*, 2010). Denominadas L1, L2, L3 e L4, essas regiões são formadas por sequências de 8 a 23 aminoácidos, sequenciais e ininterruptas onde estão presentes os 12 aminoácidos que ancoram o cobre T1, T2 e a dupla de cobres T3 (KUMAR *et al.*, 2003).

Em geral, lacases apresentam o cobre T1 flanqueado por dois resíduos de histidina, um resíduo de cisteína e um resíduo variável, que pode ser metionina no caso de lacases bacterianas, leucina ou fenilalanina, no caso de lacases fúngicas (DWIVEDI *et al.*, 2011). Já o cluster trinucleado apresenta apenas resíduos de histidina como ligantes. A figura 2 demonstra a representação do sítio ativo de lacases.

Como dito anteriormente, o resíduo de cisteína ligado ao cobre T1 confere a ele maior potencial oxidativo em relação ao cluster trinucleado e, além disso, esse resíduo atua como transportador de elétrons provenientes do substrato, direcionando-os ao cluster trinucleado, onde ocorre a redução de oxigênio molecular à água (MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990).

**Figura 2** - Representação esquemática do sítio ativo de lacases. Figura adaptada de Claus (2004). X - aminoácido variável; Cu1 - cobre T1; Cu4 - cobre T2; Cu 2 e 3 - par de cobres T3



### 2.2.3 Interesse biotecnológico e aplicação das lacases

O amplo espectro de substratos enzimáticos, associado ao fato de produzirem água como único subproduto, faz das lacases alvos de constante investigação biotecnológica para aplicação em processos industriais dentro da chamada química verde (ver RIVA, 2009). Nesse sentido, os fungos da decomposição branca despontam como os principais produtores dessas enzimas (BALDRIAN, 2006).

Lacases pertencem ao grupo das enzimas ligninolíticas presentes no conjunto enzimático secretado pelos fungos da decomposição branca, e, juntamente com a manganês-peroxidase e a lignino-peroxidase, promovem a degradação da lignina (LEONOWICZ *et al.*, 2001). Baseado nessa característica, uma das principais aplicações para as lacases ocorre na indústria de papel e celulose, para o pré-tratamento da lignina, e nos processos de branqueamento da polpa Kraft (RODRIGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006).

Outra aplicação para essas enzimas, se dá na indústria têxtil para a descoloração de corantes e no tratamento de tecidos (KUNAMNENI *et al.*, 2007). Devido à natureza sintética e a variedade na composição química, muitos corantes derivados da indústria têxtil permanecem como substâncias recalcitrantes que poluem cursos d'água, gerando toxicidade e prejudicando ecossistemas (O'NEILL *et al.*, 1999; HOU *et al.*, 2004). A utilização de lacases para degradação e detoxificação desses corantes aparenta ser um procedimento eficiente (ABADULLA *et al.*, 2000; HOU *et al.*, 2004; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2016)(ABADULLA *et al.*, 2000; HOU *et al.*, 2004). Além disso, a utilização dessas enzimas para o tratamento de tecidos como o denim vem crescendo, e atualmente dois produtos comerciais baseados em sistemas de lacases estão disponíveis no mercado, DeniLite® (Novozyme) e Zylite® (Zytex) (COUTO; TOCA-HERRERA, 2006).

Devido à presença de polifenóis em sucos, cervejas e vinhos, lacases também podem ser utilizadas na indústria de bebidas (KIRK *et al.*, 2002). E apesar de não serem consideradas GRAS (*Generally Reconized As Safe*), as lacases têm sido utilizadas na forma imobilizada, de maneira satisfatória propiciando inclusive a reutilização dessas enzimas (BRENNA; BIANCHI, 1994).

Envolvidas em processos de estabilização e descoloração, as lacases podem ainda atuar como biosensores, indicando a contaminação de uvas destinadas à produção de vinhos (MINUSSI *et al.*, 2002). Além disso, a utilização de lacases parece auxiliar na preservação, retirada de odores e melhora no sabor de alimentos como molhos, óleos e chocolates (OSMA *et al.*, 2010).

Outras aplicações das lacases incluem síntese orgânica, produção de fármacos e utilização na nanotecnologia (KUNAMNENI *et al.*, 2008). Contudo, apesar do amplo potencial de utilização dessas enzimas, a busca por lacases capazes de se adaptar a diferentes processos, aliada a uma produção em larga escala e custos reduzidos, permanece uma constante (MINUSSI *et al.*, 2002; OSMA *et al.*, 2010). Isso estimula a prospecção de micro-organismos em diferentes ambientes, bem como a construção organismos geneticamente modificados, capazes de produzir lacases sob a condição ótima de custo/benefício.

### 2.3 Fungos derivados do ambiente marinho

Fungos derivados do ambiente marinho são todos aqueles isolados de substratos ou águas marinhas, incluindo os marinhos obrigatórios e facultativos (SINGH *et al.*, 2012).

Dentre os substratos utilizados para o isolamento desses organismos, destacam-se os materiais vegetais ricos em material lignocelulósico, tais como madeira, folhas e frutos (SRIDHAR *et al.*, 2012). Não obstante, tem sido relatada a produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos derivados do ambiente marinho, dentre elas lacasses, celulases e hemicelulases (BUCHER *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria dos isolados de fungos derivados do ambiente marinho são obtidos a partir de esponjas (GAO *et al.*, 2008).

As esponjas marinhas são invertebrados que constituem comunidades bentônicas ao redor do mundo e apresentam-se como microhabitats ricos em diversidade de micro-organismos, e como fonte de recursos biotecnológicos (MENEZES *et al.*, 2010). Segundo Rateb e Ebel (2011), 19% dos compostos com importância tecnológica, produzidos por fungos derivados do ambiente marinho, foram obtidos a partir de esponjas.

De acordo com Bonugli-Santos e colaboradores (2015), enzimas microbianas derivadas do ambiente marinho podem apresentar características diferentes daquelas encontradas em enzimas correlatas produzidas por micro-organismos terrestres. De fato, características intrínsecas ao ambiente conferem diferentes propriedades fisiológicas a essas enzimas, como alta tolerância a salinidade, termoestabilidade e baroestabilidade (RAGHUKUMAR, 2008). Dados moleculares recentes reafirmam essa diferença; em análise feita por Passarini e colaboradores (2015), demonstrou-se que os genes de lacase originados de fungos derivados do ambiente marinho agruparam apenas com sequências de outros fungos também derivados desse ambiente, formando um grupo separado dos genes de lacases de fungos terrestres.

Baseado nessas características, a aplicação biotecnológica dessas enzimas pode se destinar a ambientes ou processos salinos, como por exemplo no tratamento de efluentes da indústria têxtil. Raghukumar e colaboradores (1999) demonstraram a eficiência do basidiomiceto de origem marinha *Flavodon flavus* na degradação dos corantes Poly-B, Poly-R, Congo Red, Remazol Brilliant Blue R e Azure. Além disso, Passarini e colaboradores (2011) demonstraram a habilidade de oito fungos isolados a partir de

cnidários da costa marinha brasileira na descoloração do corante Remazol Brilliant Blue R, e na degradação de HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos).

Magrini (2012) estudou a produção de enzimas ligninolíticas (incluindo lacases) por basidiomicetos marinhos e sua relação com a degradação de HPAs. Enquanto estudos conduzidos por Vasconcelos (2015) demonstraram a relação da produção de lacases por ascomicetos derivados do ambiente marinho, com a descoloração de corantes têxteis e degradação de HPAs. Recentemente, o trabalho realizado por Bonugli-Santos e colaboradores (2016) demonstrou a habilidade do basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em descolorir o corante têxtil preto reativo 5, sem gerar subprodutos tóxicos durante a descoloração. Desse modo, fica destacado o potencial biotecnológico de lacases produzidas por fungos derivados do ambiente marinho.

### **2.3.1 *Peniophora* sp. CBMAI 1063**

O fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi isolado da esponja *Amphimedon viridis* (coletado na cidade de São Sebastião na costa norte do estado de São Paulo, Brasil, MENEZES *et al.*, 2010) e demonstrou a habilidade de produzir lacase sob condições salinas e não salinas; o fungo basidiomiceto apresentou produção de 709 U/L sob condições salinas em escala de erlenmeyer (50 mL), após 21 dias de cultivo (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010). Uma lacase produzida por esse fungo e posteriormente purificada, apresentou massa de 67 kDa com melhor atividade sob pH 3,0 e temperatura de 60 °C (dados não publicados).

O potencial de aplicação tecnológica para a lacase produzida pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 estimulou o desenvolvimento de planejamento experimental que resultou num processo de otimização das condições de cultivo para produção da enzima. O processo otimizado de produção da enzima foi depositado pela Profa. Dra. Lara D. Sette (UNESP), Dra. Rafaella C. Bonugli-Santos (UNICAMP) e colaboradores junto ao INPI visando a obtenção de patente (Número de registro: BR10201400850, data de depósito: 09/04/2014, título: “Processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho, enzima lacase e uso da mesma”)

Os estudos realizados por Mainardi (2015), demonstraram a habilidade do fungo *Peniophora* sp CBMAI 1063 para produzir lacases em biorreator de bancada (3,5 L) em quantidades superiores aos cultivos em frascos (50 mL) sob agitação. Em adição, os estudos de Mainardi (2015) sugerem que o fungo em questão corresponde a uma linhagem

adaptada ao ambiente marinho, tendo em vista a necessidade da condição salina para obtenção de biomassa representativa e produção significativa de lacases, além da necessidade de suplementação do meio com sulfato de cobre.

Dados recentes apontam a presença de mais uma isoforma de lacase para esse basidiomiceto. A nova enzima purificada a partir de cultivo em biorreator de bancada, apresentou massa de 55 kDa (dados não publicados). Além disso, análises prévias de obtenção e caracterização gênica demonstram a presença de dois genes putativos de lacase para o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (BONUGLI-SANTOS, 2010).

#### **2.4 Expressão heteróloga de lacases**

Apesar da constante prospecção de micro-organismos para produção de lacases, poucos exemplos práticos de aplicação industrial são relatados, e isso se deve principalmente a incompatibilidade dos isolados com as escalas de fermentação elevadas (PISCITELLI *et al.*, 2010). Tendo em vista o amplo campo de atuação para as lacases e a demanda cada vez maior desta enzima, se faz necessária a utilização de alternativas, como a expressão heteróloga, para a obtenção dessas enzimas em larga escala (MINUSSI *et al.*, 2002; OSMA *et al.*, 2010).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos já foram relatados como hospedeiros para a expressão heteróloga de lacases (LARRONDO *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2015). Dentre as bactérias, o sistema mais utilizado se baseia em *E. coli*, tendo sido descritas mais de 10 lacases diferentes expressas utilizando esse sistema (PISCITELLI *et al.*, 2010).

A expressão da lacase de *Aeromonas hydrophila* em *E. coli*, mostrou-se eficiente, com a obtenção da enzima recombinante na sua forma ativa, presente em grandes quantidades no citoplasma da célula hospedeira (WU *et al.*, 2010). Estudos de caracterização da lacase CotA de *Bacillus subtilis* foram igualmente realizadas utilizando *E. coli* como hospedeiro para expressão da enzima recombinante e permitiram identificar a atuação da enzima sobre a formação do endósporo em *B. subtilis* (MARTINS *et al.*, 2002).

Sistemas de fermentação baseados em *E. coli* geralmente produzem proteínas recombinantes através de processos mais rápidos e econômicos que aqueles baseados em fungos (ROSANO; CECARELLI, 2014). Contudo, quando se trata da expressão de

enzimas eucarióticas, a utilização de leveduras e fungos filamentosos como sistema de expressão parece ser o mais indicado.

Dentre os sistemas eucarióticos, as leveduras apresentam facilidades semelhantes aos sistemas bacterianos, como rápido crescimento e a facilidade na manipulação gênica. Aliado a isso, são capazes de realizar modificações pós-traducionais na proteína recombinante de modo semelhante ao que ocorre na proteína nativa (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991). As leveduras *Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* despontam como os principais sistemas utilizados para expressão de lacases recombinantes (PISCITELLI *et al.*, 2010). Entretanto sistemas baseados em leveduras não convencionais como *Yarrowia lipolytica* também demonstraram a capacidade de produzir grandes quantidades dessa enzima (JOLIVALT *et al.*, 2005).

Apesar do aparente sucesso na produção de lacases recombinantes por leveduras, por hora, os fungos filamentosos despontam como modelos para o escalonamento industrial, tendo em vista a atual comercialização de produtos baseados nesse sistema. A primeira lacase comercial, por exemplo, deriva do ascomiceto *Myceliophthora thermophila* expressa em *Aspergillus oryzae*. O produto comercializado destina-se ao tratamento de tecidos (PISCITELLI *et al.*, 2010).

## 2.5 Sequenciamento de transcriptomas

O sequenciamento é a técnica utilizada para identificação sequencial de nucleotídeos de uma dada molécula de DNA. No final dos anos 1970 dois métodos foram desenvolvidos, sendo importante ressaltar o método estabelecido por Sanger e colaboradores (1977), que permitiu o sequenciamento completo do genoma viral do bacteriófago  $\phi$ x174 com cerca de 5375 pares de bases. Inicialmente o método era capaz de sequenciar entre 200 e 300 pb por corrida, mas após a otimização, com a substituição dos géis por capilares e a aplicação das amostras por eletroinjeção, tornou-se possível o sequenciamento simultâneo de até 384 amostras por corrida com a identificação de pelo menos 700 pb com boa qualidade (FIETTO; MACIEL, 2015).

Com o passar do tempo, novos métodos foram desenvolvidos e atualmente, com os sequenciamentos de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*), diferentes plataformas possibilitam o sequenciamento de DNA em larga escala. A primeira plataforma NGS desenvolvida foi denominada 454, devido ao nome do sequenciador da Roche (454 GS20), e possibilitou o sequenciamento do genoma completo da bactéria

*Mycoplasma genitalium* com pouco mais de 508.000 pb numa única corrida de 4 horas (MARGULIES *et al.*, 2005). Outras plataformas NGS existentes hoje são a SOLID e a Illumina.

As plataformas 454 e SOLID realizam o sequenciamento baseado no mesmo mecanismo de amplificação dos fragmentos, no caso, a PCR em emulsão; já a plataforma Illumina, realiza a PCR em placas de vidro (*flowcell*), promovendo a chamada amplificação por ponte. Nesse método a amostra é fragmentada e ligada a adaptadores, esses adaptadores se ligam à oligonucleotídeos presentes na *flowcell*, e após 35 ciclos de amplificação, cada fragmento gera um cluster com até 1 milhão de cópias. O processo de sequenciamento se dá por síntese de fita complementar utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluoróforos, a cada ddNTP adicionado pela polimerase, libera-se luz que é absorvida por um sensor e interpretada por um software que determina a identidade da base. Cada cópia gera um *read*, ao final do processo, milhões de *reads* são gerados, garantindo uma excelente qualidade/base de cada fragmento da amostra (FIETTO; MACIEL, 2015).

O sequenciamento de genomas permite a obtenção de informações a respeito do conjunto total de genes de um determinado organismo, possibilitando, dentre outros, o reconhecimento da estrutura, diversidade e função desses genes. Contudo, o sequenciamento genômico não possibilita estudos de fisiologia gênica, como a obtenção de dados sobre a expressão e regulação dos genes sequenciados. Para essa abordagem, é necessário realizar o sequenciamento do transcriptoma, que é o conjunto de transcritos expressos numa determinada condição (MOREIRA, 2013).

Devido à instabilidade das moléculas de RNA, o sequenciamento direto desse ácido nucleico mostra-se como um processo inviável. Contudo a conversão de RNA em cDNA através da enzima transcriptase reversa possibilita o sequenciamento indireto dos transcritos (FIETO; LUMEGO, 2015). Devido ao baixo custo e à agilidade, o sequenciamento de transcriptomas é realizado utilizando sequenciadores NGS (MUTZ *et al.*, 2013) e, dentre as três plataformas apresentadas anteriormente, o método Illumina possibilita o sequenciamento *de novo*, que permite a montagem da biblioteca de transcritos sem a necessidade de comparação com um genoma de referência.

Essa abordagem possibilita a descoberta de novos genes em organismos pouco estudados ou recém descobertos (MOROZOVA *et al.*, 2009). Além disso, permite a

análise diferencial da expressão gênica, identificação de mecanismos de processamento gênico como *splincing* alternativo, análises de polimorfismo, entre outros (MUTZ *et al.*, 2013). Análises *de novo* do transcriptoma de fungos têm sido utilizadas para a elucidação de relações patógeno/planta, no caso de fungos fitopatogênicos (ARAGONA *et al.*, 2014; HO *et al.*, 2016), mas também para descoberta de novos genes funcionais, no caso do fungo medicinal *Phellinus linteus* (HUANG *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que trabalhos com sequenciamento de transcriptomas de organismos derivados de ambiente marinho são escassos, e que até o presente momento nenhum basidiomiceto marinho ou derivado desse ambiente foi sequenciado.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho está associado ao projeto Fapesp 2013/19486-0 “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações”, sob a coordenação da Prof. Dra. Lara Durães Sette. O objetivo principal deste estudo foi a análise do transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, expresso em condições otimizadas para produção de lacase, visando obter os transcritos dessa enzima para caracterização *in silico*, clonagem e expressão heteróloga.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Montagem e anotação do transcriptoma do basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063
- Análise e caracterização *in silico* dos transcritos de lacase
- Seleção de um transcrito e clonagem em *Escherichia coli*
- Montagem de sistema de expressão da lacase recombinante em *Escherichia coli*
- Avaliação da expressão da lacase recombinante
- Análise qualitativa de atividade enzimática da lacase recombinante

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultivo do fungo e extração de RNA

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado em erlenmeyer durante 7 dias sob condições otimizadas para a expressão de lacases. O meio de cultivo foi constituído de extrato de levedura 0,2 %, peptona bacteriológica de caseína 0,27 %, extrato de malte 0,14 % e glicose 0,27 %, em água do mar artificial (ASW) adaptado de KESTER *et al.*, 1967, com MgCl<sub>2</sub> 0,704 %, CaCl<sub>2</sub> 0,098 %, SrCl<sub>2</sub> 0,001 %, NaCl 1,555 %, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,261 %, KCL 0,044 %, NaHCO<sub>3</sub> 0,013 %, KBr 0,006 % e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,002 % e suplementado com 2 mM de CuSO<sub>4</sub>.

O RNA total do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi extraído utilizando o método de “Fenol quente” (KOHNER; DOMDEY, 1991) modificado, e o kit *RNeasyPlant Mini Kit* QUIAGEN (de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante).

### 4.2 Quantificação e verificação da integridade do RNA

A quantificação das extrações foi feita utilizando o espectrofotômetro para ácidos nucleicos *Thermo Scientific NanoDrop* 2000. Já a visualização da integridade e presença de DNA nas amostras foi feita utilizando gel de agarose a 0,7 % em cuba de eletroforese pequena para oito poços. Após a corrida sob 80 v por 1 h, o gel de agarose passou por banho em gel Red (Biotium) por 30 min para coloração das bandas.

### 4.3 Sequenciamento

As amostras com concentração e qualidade de RNA adequadas foram enviadas à empresa Macrogen (Coreia do Sul), para sequenciamento utilizando a plataforma *IlluminaHiSeq* 2000. O sequenciamento *paired-end* foi realizado em um terço de *lane* do sequenciador.

### 4.4 Pré-processamento dos reads

Os arquivos recebidos da Macrogen no formato FASTQ foram baixados e verificados utilizando a chave MD5SUM. As sequências (*reads*) foram inicialmente passadas por um controle de qualidade utilizando-se o programa *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Esse programa gera gráficos que mostram a qualidade *Phred* por base da sequência, tamanho, presença de Ns, e sequências super-representadas que indicam presença de adaptadores utilizados na etapa de preparação da biblioteca para sequenciamento. Posteriormente os *reads* foram passados no programa *Trimmomatic* (BOLGER *et al.*, 2014) onde foram excluídas as sequências com bases com baixa qualidade.

#### 4.5 Montagem dos *contigs* e anotação

A montagem de transcritos (*contigs*) foi processada pelo programa Trinity (GRABHERR *et al.*, 2013) e após a formação dos *contigs* foram obtidas as sequências codificadoras que passaram então pela anotação no programa Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005). Para as análises com os transcritos de lacase foram utilizados todos os *contigs* obtidos para essa enzima, mas para as demais análises foram selecionados apenas os *contigs* sem redundância, que passaram a ser chamados de unigenes. Inicialmente foi realizado o BLASTX de todos os unigenes na base de dados NR (*Non-redundant protein*), posterior a isso foi realizada a atribuição dos termos de GO (*Gene ontology*), bem como a atribuição de EC (*Enzyme Commission*), e a verificação de domínios conservados no InterProScan.

#### 4.6 Obtenção dos transcritos de lacase, análises e seleção da sequência para clonagem

Após a conclusão da etapa de anotação e obtenção das isoformas de lacase, foi realizada a triagem de todas as sequências buscando aquelas que apresentavam todas as quatro regiões conservadas (L1, L2, L3 e L4). A partir dessas sequências foram realizados o alinhamento e as análises de similaridade utilizando o software BioEdit (versão 7.0). Foram também realizadas análises de composição peptídica utilizando o software GeneRunner (Versão 5.0.66) e a predição do sítio de clivagem peptídica utilizando o software SignalP 4.1 (online).

Dez sequências foram recuperadas do GeneBank para as análises de similaridade e observação das regiões conservadas. Essas sequências foram selecionadas baseadas nos resultados de BLASTX dos transcritos.

A montagem da árvore filogenética foi realizada utilizando o software MEGA 6, baseado nas sequências de aminoácidos entre as regiões L1 e L2 (aproximadamente 150 aa), utilizando o método *Neighbor-joining* com *Bootstrap* de 1000 repetições. As sequências recuperadas do GenBank e utilizadas para montagem da árvore foram selecionadas baseadas nos trabalhos de Bonugli-Santos *et al.*, (2010) e Passarini *et al.*, (2015).

Para seleção da sequência que a ser clonada, buscou-se aquela que apresentava o maior número de *reads* para formação do *contig* baseado no fator FPKM, o qual calcula

o número de *reads* dividido pelo tamanho do fragmento sequenciado (Trinity), possibilitando a determinação da lacase mais expressa na condição otimizada. O segundo critério analisado foi a presença de ORF (Open Reading Frame) completa. Análises de similaridade entre as isoformas permitiram selecionar aquela que melhor se adequava aos critérios estabelecidos.

#### **4.7 Desenho dos *primers* para obtenção do transcrito selecionado**

Os *primers* para obtenção do gene selecionado foram desenhados utilizando o programa GeneRunner (Versão 5.0.66), observando-se a possível formação de grampos e híbridos, bem como a temperatura ótima de anelamento (TM).

Esses primeiros *primers* foram nomeados Lac15071F e Lac15071RB e a sequência dos respectivos oligonucleotídeos encontram-se no Anexo 1.

#### **4.8 Amplificação, isolamento e purificação do fragmento de cDNA codificante para lacase**

Parte do RNA obtido na extração foi convertido em cDNA por RT-PCR, utilizando um único primer, o reverse oligodT. O cDNA obtido foi então utilizado como *template* para a reação de PCR *touchdown* com a Pfu Phusion polimerase (ThermoFisher) e os *primers* Lac15071F e Lac15071RB. A visualização dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita em gel de agarose 0,7 %, e seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.2.

As bandas que apresentaram o tamanho esperado para o fragment foram retiradas do gel com auxílio de um bisturi e purificadas utilizando o *GeneJET gel Extraction Kit* (ThermoFisher). A concentração das amostras foi medida utilizando espectrofotômetro para ácidos nucleicos *Thermo Scientific NanoDrop 2000* e para confirmação da extração e visualização da integridade do fragmento, uma alíquota foi novamente aplicada em gel de agarose 0,7 % nas mesmas condições acima descritas.

#### **4.9 Clonagem, preservação e confirmação**

Para a clonagem do fragmento foi utilizado o vetor TOPO TA (Invitrogen - ThermoFisher), e a transformação se deu em bactérias *E. coli* DH10B quimicamente competentes, que posteriormente foram plaqueadas em LB suplementadas com Canamicina (marca de seleção do vetor) e X-gal.

A ligação do fragmento no vetor TOPO se dá pelo sítio múltiplo de clonagem que está inserido dentro do gene *lacZ*, esse codifica a enzima beta-galactosidase que degrada lactose em glicose e galactose. X-gal é um análogo sintético de lactose associado a um cromóforo que quando degradado libera o composto do grupo indol de coloração azul. Esse mecanismo é também chamado de *alpha*-complementação.

Considerando o mecanismo do vetor, a seleção dos clones positivos (para a presença do fragmento) foi possível de ser realizada por observação visual. Desta forma, colônias com coloração branca foram consideradas positivas e colônias com coloração azul foram consideradas negativas.

A confirmação para presença do fragmento nos clones considerados positivos foi realizada através da técnica de *single colony*. Essa técnica permite a visualização de todo conteúdo gênico presente nas colônias isoladas, através de lise celular por SDS e posterior corrida das amostras em gel de agarose.

As colônias confirmadas como positivas foram então preservadas em meio LB + glicerol 40 % à - 80 °C. Três transformantes foram selecionados para o ensaio de restrição enzimática visando confirmar a natureza do fragmento presente nos vetores de clonagem.

O ensaio de restrição foi realizado utilizando os vetores de clonagem como *template*. Esses foram extraídos de cada uma das três colônias transformadas pelo GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher). Uma clonagem *in silico* utilizando o programa Clone Manager 6.0 foi realizada previamente para guiar o ensaio de restrição. O ensaio procedeu utilizando as enzimas *DraIII*, *XhoI* e *EcoRI* (ThermoFisher), seguindo os protocolos de cada enzima (fabricante) e permitiram a observação de diferentes padrões de banda. Os produtos de reação foram visualizados em gel de agarose 0,7 %, seguindo as mesmas condições descritas no item 4.2.

#### **4.10 Sequenciamento dos vetores de clonagem**

Os vetores de 10 colônias confirmadas como positivas foram enviados à MacroGen para sequenciamento, utilizando primeiramente dois *primers* universais para o vetor TOPO TA (M13F e M13R). Após obtidas as sequências, um novo sequenciamento foi solicitado utilizando *primers* internos, esses foram desenhados utilizando por base o resultado do primeiro sequenciamento. Isso foi necessário pois o método de Sanger possui

limitações relacionadas à qualidade/base quando as sequências são maiores do que 1000 pb.

Os *primers* utilizados no segundo sequenciamento foram desenhados utilizando o programa GeneRunner (Versão 5.0.66), observando-se a possível formação de grampos e híbridos, bem como a temperatura ótima de anelamento (TM).

Esses *primers* foram nomeados *Forward* e *Reverse* e a sequência dos respectivos oligonucleotídeos encontram-se no Anexo1.

As sequências do primeiro e segundo sequenciamento foram então analisadas em conjunto e comparadas com a sequência molde fornecida pela análise do transcriptoma do fungo *Peniophora sp.* CBMAI 1063, utilizando o programa Sequencher 4.6 (demo version).

#### **4.11 Correção e adequação do fragmento de cDNA clonado**

Devido à necessidade de reparo na sequência clonada e de inserção de sítios para ligação no vetor de expressão, foi realizado o reparo e adequação do fragmento utilizando dois novos *primers*.

Esses *primers* foram nomeados Lac35B\_pLacF e Lac35B\_pLacR, e a sequência dos respectivos oligonucleotídeos encontram-se no Anexo1. Além da função de correção, os *primers* tiveram a função de adicionar os sítios de restrição *HindIII* e *EcoRI*, nas porções 5' e 3' do fragmento, respectivamente.

Foram realizadas reações de PCR utilizando três polimerases diferentes, Taq (Promega), Pfu Phusion e Pfu Platinum (ambas ThermoFisher). As reações utilizaram o fragmento clonado no vetor TOPO como *template* e o par de *primers* acima descritos. Os produtos de reação foram aplicados em gel de eletroforese seguindo as mesmas condições descritas no item 4.2.

Os fragmentos com o tamanho esperado foram isolados do gel, purificados em coluna por Kit (ThermoFisher) e então novamente clonados em pJET 1.2 Blunt (ThermoFisher). Procedeu-se então aos ensaios de seleção, verificação e sequenciamento seguindo os protocolos e técnicas descritos nos itens 4.8 e 4.9.

#### 4.12 Montagem do sistema de expressão em *Escherichia coli*

Para montagem do sistema de expressão, foi selecionado o vetor pLAC2a, construído por Lacerda e Ferreira (dados não publicados), e que deriva do sistema pBAD. Esses vetores apresentam a região *para*, promotor regulado por arabinose, e o gene de resistência a gentamicina como fator de seleção.

Baseado no sequenciamento dos variantes, foi selecionado apenas um para dar continuidade aos ensaios de expressão. Após a extração dos plasmídeos (Miniprep Kit - ThermoFisher), foi realizado o tratamento enzimático deles utilizando as enzimas *HindIII* e *EcoRI* para liberação do fragmento codificante da lacase.

O produto das reações foi aplicado em gel de agarose seguindo as mesmas condições já citadas no item 4.2. As bandas com tamanho esperado foram isoladas do gel, purificadas e ligadas ao vetor pLAC2a, previamente tratado com as mesmas enzimas utilizadas no fragmento. A reação de ligação foi realizada utilizando a enzima T4 ligase (ThermoFisher) seguindo o protocolo do fabricante.

Inicialmente, os produtos da ligação foram transformados na linhagem DH10B, e após sequenciamento do vetor de expressão, outras duas linhagens também foram transformadas: BL21(DE3) e Rosetta. A seleção dos transformantes positivos para o vetor foi feita por plaqueamento em meio LB suplementados com o antibiótico gentamicina (L-Genta). Após confirmação da presença do vetor através de *single colony*, cada linhagem transformada foi preservada em LB + glicerol 40 % a - 80 °C.

#### 4.13 Análise da expressão da lacase recombinante através de ensaio de SDS-PAGE

Para os ensaios de expressão, as linhagens transformadas foram reativadas em placa LB + antibiótico, cultivadas em estufa bacteriológica, *overnight* a 37 °C. A partir dessas culturas foram preparados os pré-inóculos em 3 mL de LB + antibiótico, suplementados com 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub> e cultivados em shaker, *overnight* a 37 °C e 200 rpm.

Para o preparo do inóculo, foi feita a diluição 1:50 do pré-inóculo em L-Genta suplementado com 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub>. O inóculo foi cultivado até atingir a DO de 0,5, aproximadamente 2 h em shaker, a 37 °C e 200 rpm.

Atingida a DO necessária, uma alíquota de 1,5 mL, foi centrifugada a 12.000 rpm, e retirado o sobrenadante, para congelamento do *pellet* a - 20 °C. Após essa etapa, foi

adicionada arabinose a 0,03 % ao inóculo para indução da transcrição da lacase recombinante. A cultura foi incubada em shaker por 1 h a 37 °C e 200 rpm. Após essa etapa, uma nova alíquota de 1,5 mL foi retirada e a preservação do *pellet* foi realizada a - 20 °C (segundo procedimento acima descrito). Novamente a cultura foi incubada por mais 1 h a 37 °C e 200 rpm. Ao final foi retirada mais uma alíquota de 1,5 mL e a preservação do *pellet* foi realizada a - 20 °C.

As seguintes condições para expressão da lacase recombinante foram avaliadas: cultivo sem indução, cultivo em meio induzido por arabinose durante 1 h, cultivo em meio induzido por arabinose por 2 h.

A extração das proteínas totais foi feita em tampão SDS-Betamercaptoetanol (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após fervura e centrifugação, as amostras foram aplicadas em gel de SDS-Poliacrilamida por 1h e 30 min a 100V. O gel foi corado em solução de *comassie blue* por 30 min e depois descorado sob agitação contínua em solução de metanol/ácido acético, até a perfeita visualização das bandas (aproximadamente 2 h).

#### **4.14 Avaliação qualitativa de atividade enzimática da lacase recombinante**

A análise qualitativa da atividade enzimática da lacase recombinante, foi feita adaptando-se o protocolo de *screening* para enzimas ligninolíticas (VERMA *et al.*, 2010). Da reativação das linhagens até a obtenção de inóculo na DO 0,5, seguiu-se o protocolo descrito no item 4.12.

A partir dos inóculos padronizados, foram feitos diferentes tratamentos modificando as condições do meio cultivo. Ao total, foram analisadas quatro condições diferentes: cultivo em meio com adição de glicose 2 %, cultivo em meio induzido por arabinose 0,03 %, cultivo em meio induzido por arabinose 0,05 % e cultivo em meio sem indução ou repressão.

Após os tratamentos, as culturas foram incubadas por 1h a 37 °C e 200 rpm. Após o cultivo, alíquotas de 3mL foram retiradas e centrifugadas a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi lavado com solução tampão acetato de sódio 0,1 M. Após nova centrifugação e descarte, o *pellet* foi eluído em 1 mL de tampão acetato e procedeu-se a lise química das células por SDS 0,5 %.

Após mais centrifugação, 100  $\mu$ L foram coletados do sobrenadante e aplicados em placa de ágar-guaiacol, previamente preparada e contendo poços para aplicação das amostras.

As placas de ágar-guaiacol foram incubadas, *overnight* a 37 °C em estufa bacteriológica. A presença de coloração marrom ao redor dos poços indicou a presença de lacase quimicamente ativa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração de RNA e sequenciamento do transcriptoma do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063

As amostras de RNA com qualidade e concentração satisfatórias, extraídas com fenol e com o RNeasy Kit apresentaram respectivamente 863,0 ng/ $\mu$ L e 139,2 ng/ $\mu$ L. Tais concentrações estavam dentro ou acima do padrão solicitado pela empresa MacroGen para realização do sequenciamento. Os dados relacionados com os RNAs obtidos pelos diferentes métodos utilizados estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** - Amostras enviadas para sequenciamento na MACROGEN com suas respectivas concentrações de RNA.

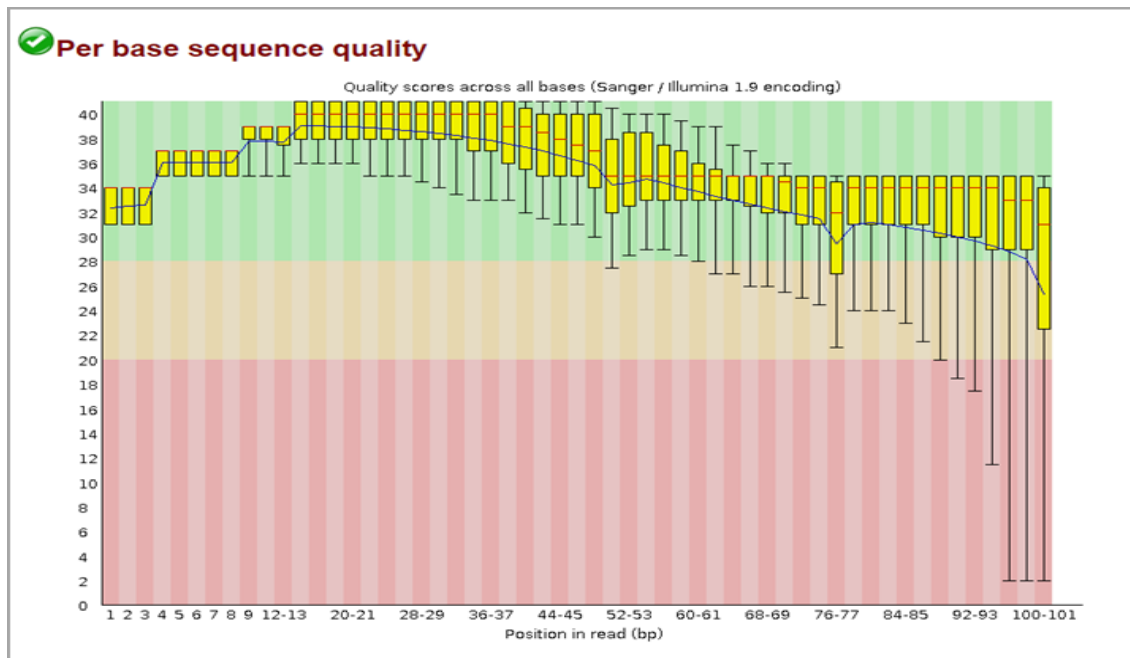
Amostra	Método de Extração	Concentração em ng/ $\mu$ L	Quantidade total por amostra ( $\mu$ g)	Concentração total por amostra exigida pela MacroGen ( $\mu$ g/mL)
1	Rneasy Kit	139,2	5,5	1-10
2	Fenol Quente	863	34,52	

Antes de realizar o sequenciamento, a empresa enviou um relatório com os resultados da integridade do RNA denominado RIN (*Integrity Number*). Apenas passam na análise se o RIN for acima de 7,0. Uma das amostras submetidas passou no controle de qualidade e para essa amostra foi realizado o sequenciamento *paired-end* no equipamento Illumina HiSeq 2000.

Após sequenciamento, os *reads* foram disponibilizados para *download* no formato FASTQ, perfazendo o total de 108.967.464 *reads* com tamanho de 100 pares de bases cada. O controle de qualidade inicial dos *reads* foi feito usando o programa FASTQC. A figura 3 mostra um gráfico de qualidade *Phred* média por base.

As etapas referentes à análise do transcriptoma e obtenção dos transcritos de lacase foram realizadas em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Mauricio Bacci Junior, sob orientação da Dra. Milene Ferro (CEIS-UNESP/RC).

**Figura 3** - Gráfico gerado pelo programa FASTQC mostrando a qualidade *Phred* por base.

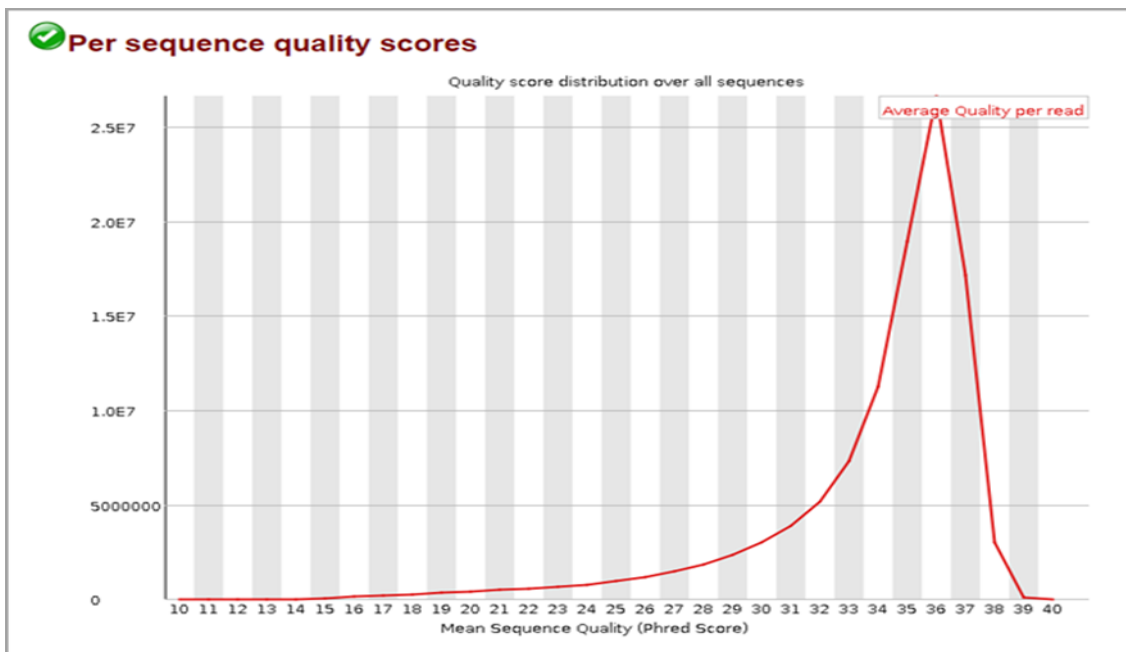


Pode-se observar na figura 3 que a qualidade por base estava alta. No entanto, o final da sequência apresentava qualidade *Phred* (eixo y) um pouco abaixo do que o restante da sequência, que era acima de 30. A Figura 4 mostra que grande parte das bases tiveram qualidade *Phred* média de 36. No entanto, algumas bases chegavam a valor *Phred* de 10. Os resultados do programa FASTQC também mostram que não havia Ns nos *reads* e que não havia sequências de adaptadores, que são trechos e sequências usados para ligar o fragmento de DNA na placa do sequenciador para que ocorra amplificação.

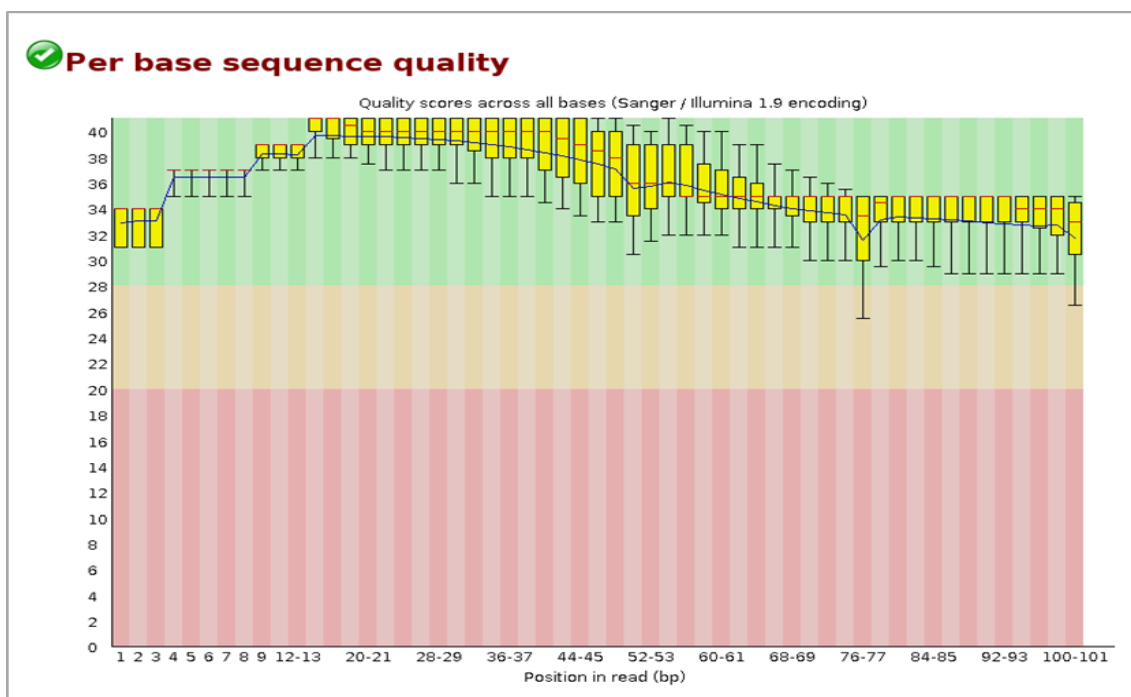
Após analisar os gráficos iniciais, foi estabelecido um “corte” preservando apenas as sequências com qualidade *Phred* mínima igual a 20. Nessa etapa, foi utilizado o programa Trimmomatic para fazer o *trimming* de bases com baixa qualidade. O programa Trimmomatic retirou *reads* com valor de qualidade *Phred* menor do que 20 em uma janela deslizante de quatro bases. Após essa etapa, os *reads* restantes foram novamente

analisados no FASTQC para verificar graficamente se o *trimming* foi suficiente. A figura 5 apresenta a qualidade por base dos *reads* após a filtragem.

**Figura 4** - Gráfico gerado pelo programa FASTQC mostrando a qualidade *Phred* por sequência



**Figura 5** - Gráfico gerado pelo programa FASTQC após *trimming* no Trimmomatic, mostrando a qualidade *Phred* por base nas sequências.



Pode-se observar na Figura 5 que a média da qualidade *Phred* aumentou principalmente no final da sequência, o que mostra que os *reads* que restaram apresentavam média de valor maior do que anteriormente.

Os *reads* mostraram-se ricos em GC, com aproximadamente 57 % de todo conteúdo. Alto conteúdo GC é característica geral dos genes fúngicos, segundo Eggert *et al.*, (1998). Inicialmente 95.7 % dos *reads* apresentavam qualidade de *Phred* acima de 20 %, mas após o pré-processamento esse número reduziu para 87.9 %, em contrapartida a qualidade total ficou acima dos 30 %, indicando que a maioria dos *reads* apresentavam excelente qualidade e que o pré-processamento foi eficiente.

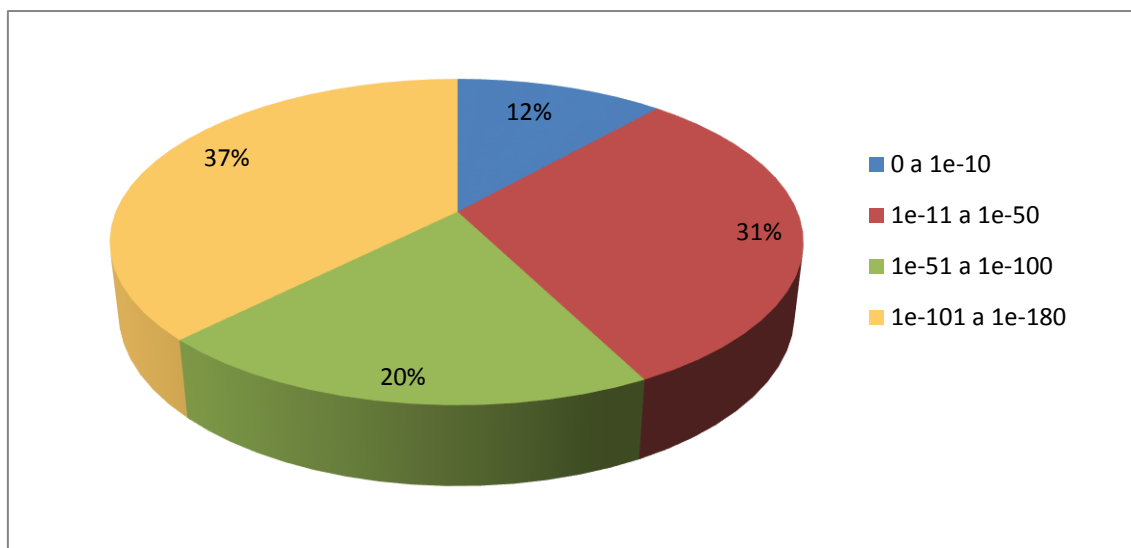
## 5.2 Anotação do transcriptoma

A montagem dos transcritos gerou 36.981 *contigs* com redundância e 16.663 sem redundância. Para as análises com os transcritos de lacase foram utilizados todos os *contigs* obtidos para essa enzima, mas para as demais análises foram selecionados apenas os *contigs* sem redundância, que passaram a ser chamados de unigenes. Os resultados de BLAST indicaram 10.649 unigenes, destes, 8.367 unigenes apresentaram domínios conservados segundo o InterPro. Contudo, apenas 3838 unigenes foram mapeados nos termos da ontologia de genes (*Gene Ontology* - GO).

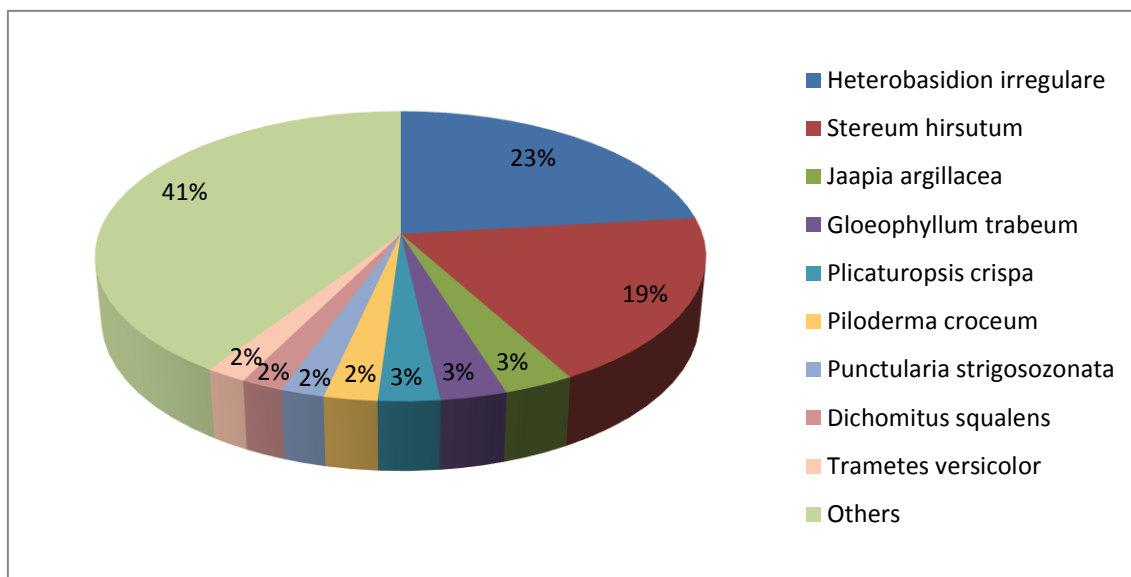
Os unigenes inicialmente submetidos à base NR de proteínas do NCBI, apresentaram 43 % de homologia com outras sequências, com e-value variando entre  $1e-4$  e  $1e-50$ , contudo 57 % dos unigenes apresentaram homologia de moderada a baixa ( $1e-51$  à  $1e-180$ ) (Figura 6). Essa baixa homologia já era esperada tendo em vista a escassez de bibliotecas completas depositadas no NCBI provenientes de micro-organismos derivados do ambiente marinho. Até o momento, o presente trabalho é o primeiro a analisar o transcriptoma de um basidiomiceto derivado desse ambiente.

As espécies com maior número de hits ao fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foram *Heterobasidion irregulare* e *Stereum hirsutum* com 23 % e 19 % de unigenes similares, respectivamente (Figura 7). Os dois basidiomicetos com maior homologia são pertencentes à ordem Russulales, assim como os representantes do gênero *Peniophora*, mas que despertam interesse biotecnológico por diferentes maneiras. *H. irregulare* é um fitopatógeno que ataca espécies de *Pinus* no hemisfério norte (GARBELOTTO; GONTHIER, 2013), enquanto *S. hirsutum*, um cogumelo medicinal, é investigado pelo potencial de aplicação de seus metabólitos secundários (MA *et al.*, 2014).

**Figura 6** - E-value referente ao BLAST na base de dados NR do NCBI.



**Figura 7** - Resultados de BLAST com a porcentagem de homologia do transcriptoma do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 com outros basidiomicetos.



Visando classificar funcionalmente os unigenes, foi utilizado a distribuição dos termos de GO 2. Os 3.838 unigenes foram mapeados em 39 grupos funcionais divididos em três categorias: Funções Moleculares - FM, Processos Biológicos - PB e Processos Celulares - PC. Tendo em vista que cada unigene pode ser mapeado em mais de um termo de GO, os unigenes mapeados correspondem a um total de 7549 termos. Cerca de 1.260 termos foram associados à atividade catalítica (FM), 1.056 com processos metabólicos (PB), 956 com processos celulares (PB), 972 com atividade de “ligação” (FM), 757 com

processos relacionados a organismo isolado (PB) e 471 com estrutura celular (PC) (Figura 8).

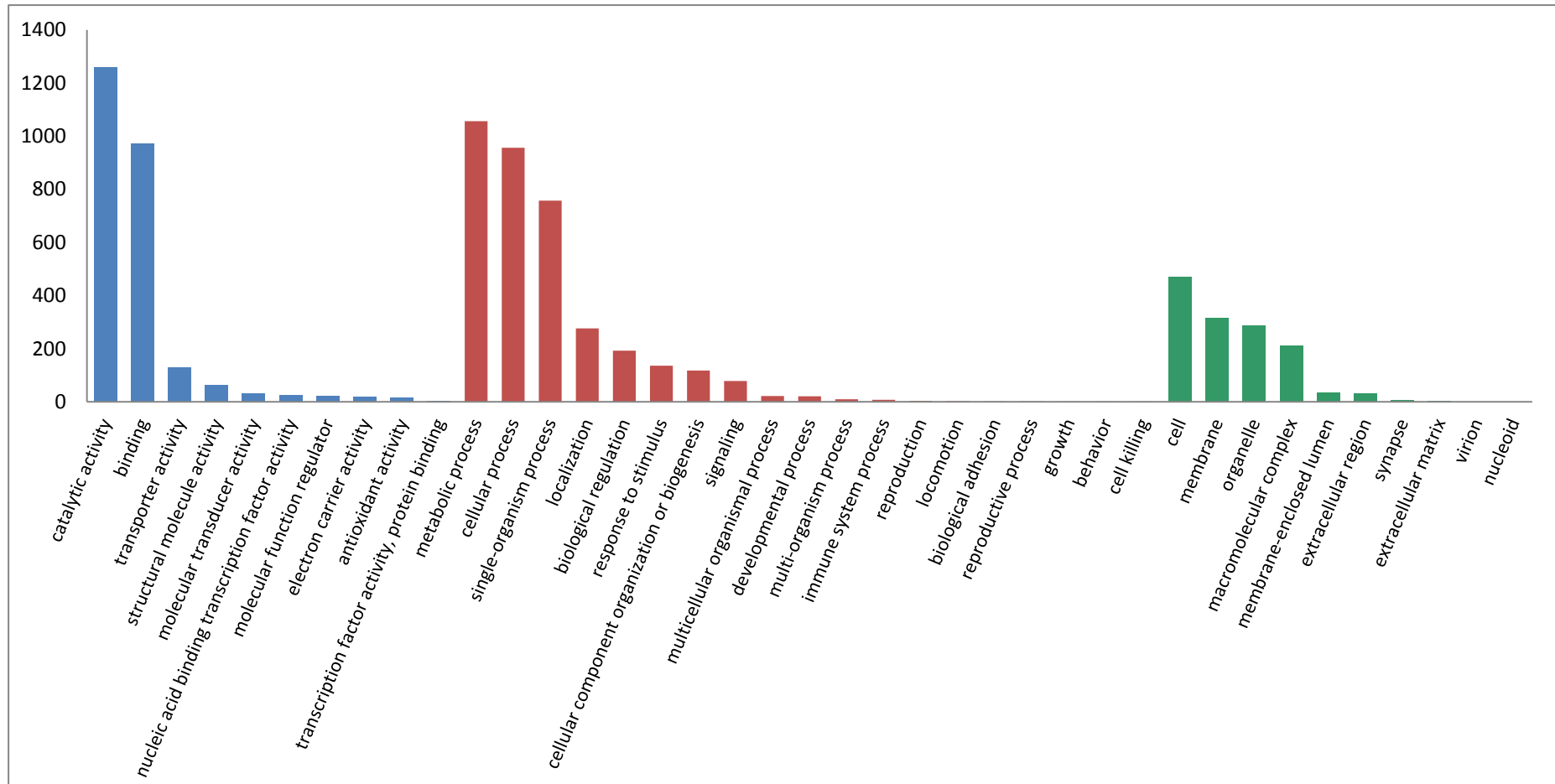
A distribuição de GO propicia uma visão geral da expressão gênica de um organismo sob determinada condição (HUNTLEY *et al.*, 2014). A maioria dos termos estão relacionados a funções moleculares (FM) e processos biológicos (PB), indicando a atuação de uma rica diversidade de enzimas na síntese de metabólitos secundários. De acordo com Wei e colaboradores (2015), caso o número de termos relacionados a processos celulares e processos metabólicos sejam proporcionais, o indicativo é de que o organismo esteja investindo na síntese de metabólitos primários, o que não corresponde aos dados encontrados, tendo em vista a quantidade bem menor de termos envolvidos a processos celulares (PC).

Outro indicativo de que o *Peniphora* sp. CBMAI 1063 esteja investindo em síntese de metabólitos secundários, baseia-se em resultados de biorreator de bancada. Mainardi (2015), demonstrou que o fungo cultivado em condições otimizadas para produção de lacase, em biorreator STR e oxigenação de 1vvm, apresenta aumento de biomassa entre os dias 1 e 4, seguido de queda entre os dias 5 e 6. A diminuição da biomassa micelial pode estar relacionada com as condições do cultivo, mas corresponde aos resultados encontrados, pois apenas 1 termo de GO foi mapeado como “crescimento”. Isto indica que após 7 dias de cultivo o fungo reduza consideravelmente a produção de metabólitos primários.

Com o objetivo de reconhecer os termos mais representativos (atividade catalítica) no transcriptoma, buscou-se os unigenes com E.C. atribuídos pelo Blast2GO. As transferases, hidrolases e oxidoredutases foram os grupos de enzimas mais abundantes, com 180, 169 e 111 unigenes respectivamente (Figura 9A).

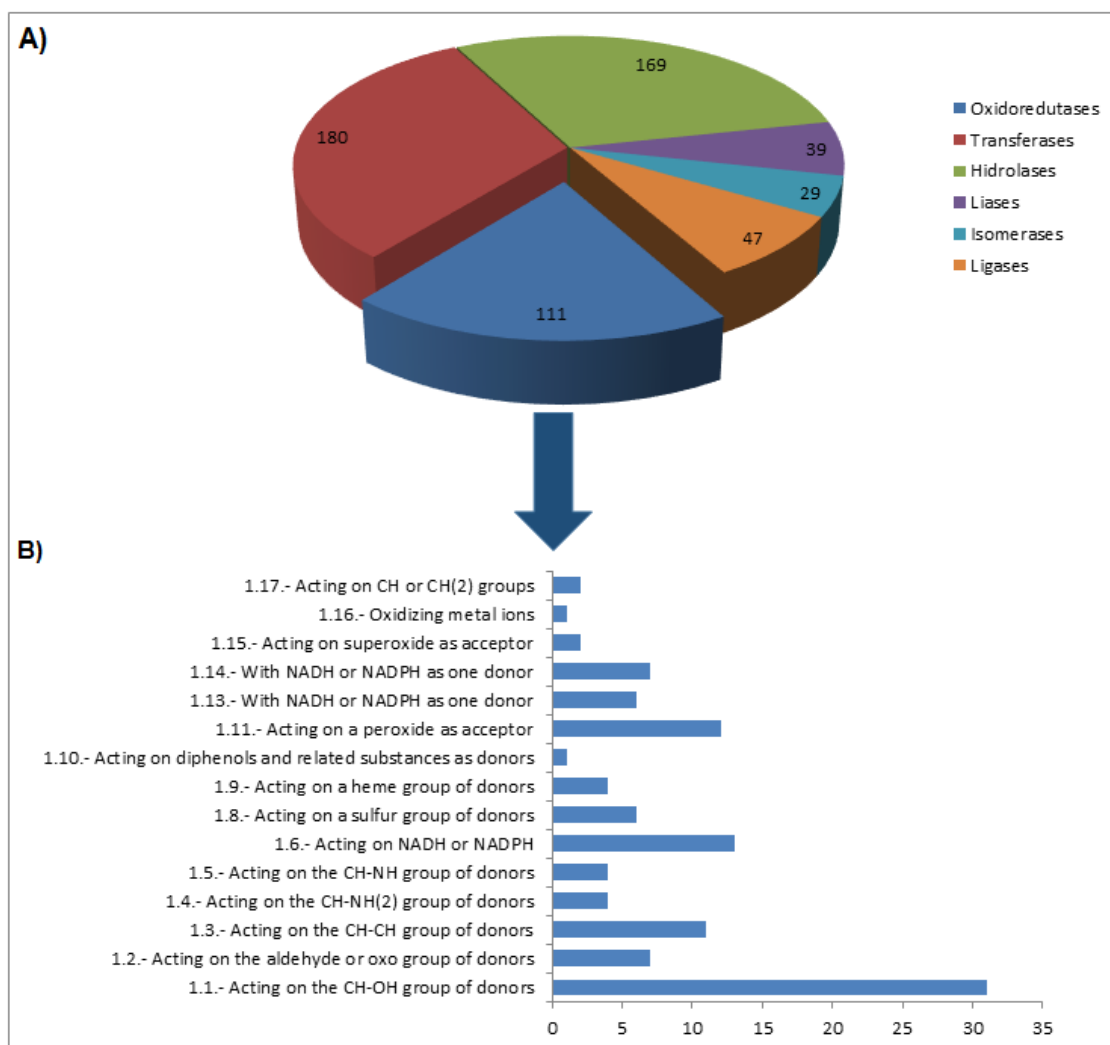
As enzimas de interesse desse trabalho, pertencem ao grupo das oxidoredutases (1), que possuem atividade sobre difenóis e compostos correlatos (10), e que utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons (3), portanto, as lacases (2) são classificadas como E.C 1.10.3.2.

**Figura 8** - Distribuição dos termos de GO 2. Barras azuis - termos mapeados em funções moleculares (FM); barras vermelhas- termos mapeados em processos biológicos (PB); barras verdes - termos mapeados em processos celulares (PC)



Segundo as análises, apenas 1 unigene retornou como uma oxidoreductase atuante sobre difenóis E.C 1.10 (figura 9B). Contudo, esse grupo de enzimas é extremamente abundante com pelo menos outras 18 subcategorias (ExpASy *Data base*). Além disso, trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa e relacionados com a purificação de lacases produzidas pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, demonstraram a presença de pelo menos 2 isoformas da enzima. O que indica aparentemente que o Blast2GO possui limitações de processamento e não é capaz de atribuir E.C a todos os unigenes, contudo, possibilita uma visão geral da distribuição das E.Cs.

**Figura 9** - Distribuição dos unigenes com *Comission Enzyme* (E.C) atribuído. A) Principais grupos enzimáticos. B) Distribuição das oxidoreductases.



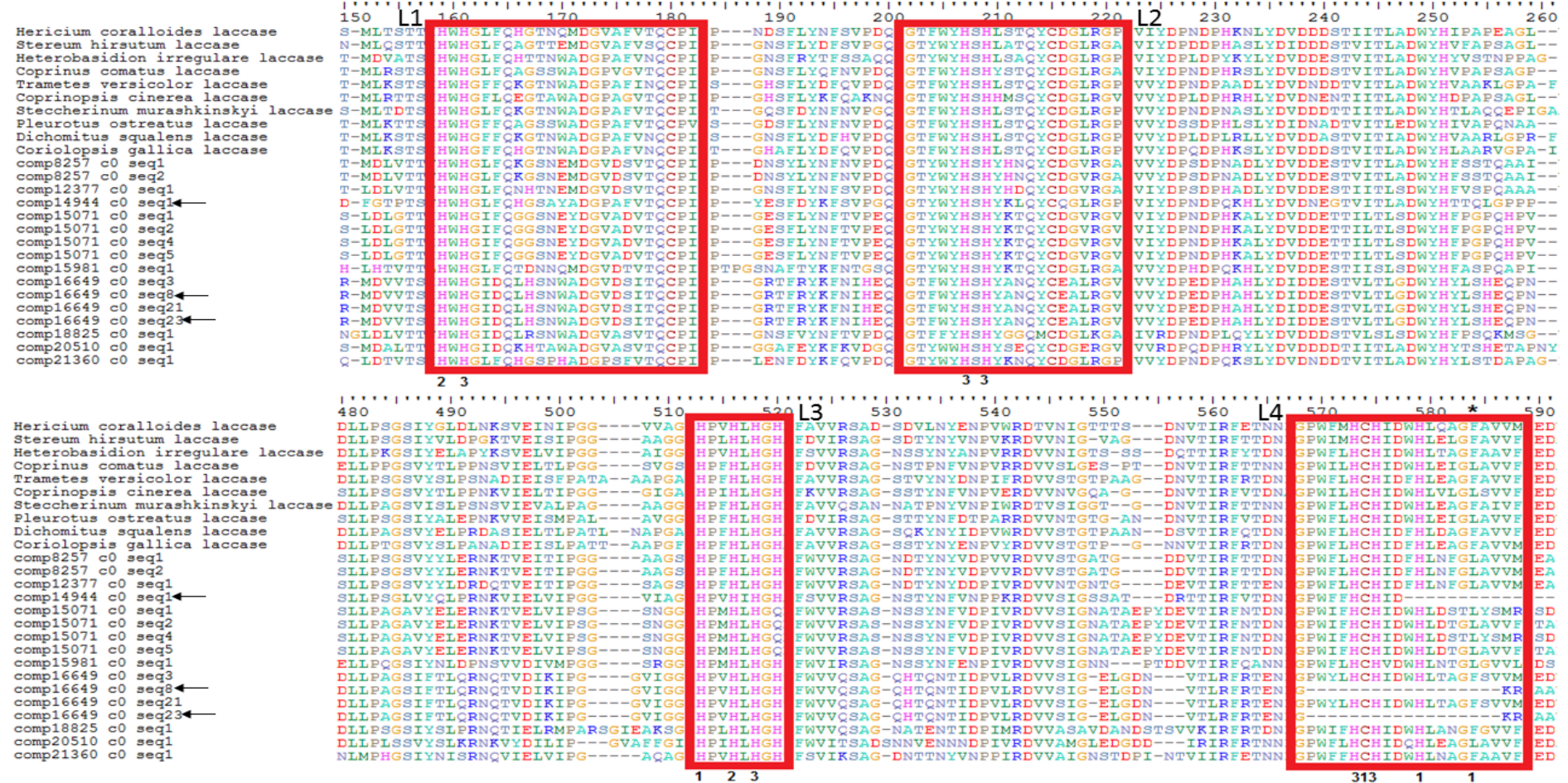
### 5.3 Análise e caracterização dos transcritos de lacase

Após a montagem dos *contigs* pelo programa Trinity e anotação pelo Blast2GO, foram obtidas 47 isoformas de lacase. Dentre elas, 16 apresentaram os três domínios “Cupredoxin-like” completos (Conserved Domains - NCBI), e segundo o BlastDELTA (BORATYN *et al.*, 2012), todas apresentavam similaridade com lacases de outros fungos basidiomicetos.

Entretanto, após alinhamento (CLUSTALW-BioEdit) com outras 10 sequências de lacases recuperadas do GenBank, verificou-se que 3 isoformas não possuíam a região L4 completa, como demonstrado na figura 10. As regiões L1, L2, L3 e L4 compreendem sequências sem intervalo, onde residem os 12 aminoácidos ligantes de cobre, no sítio ativo das lacases (KUMAR *et al.*, 2003; GIARDINA *et al.*, 2010). Desse modo, os transcritos comp14944\_c0\_seq1, comp16649\_c0\_seq8 e comp16649\_c0\_seq23 possivelmente codificam outro tipo de multicobre oxidases, por não possuírem o sítio de ligação ao cobre T1.

Continuando com a análise sobre a região L4, foi possível dividir os 13 transcritos em dois grupos, baseando-se no aminoácido variável que flanqueia o cobre T1 (figura 11): os que apresentam o resíduo Leucina (9 transcritos) nessa posição, e os que apresentam o resíduo Fenilalanina (4 transcritos). Esse dado indica que todas as sequências correspondem a lacases fúngicas verdadeiras, visto que lacases bacterianas, ou “lacases-like”, como as L-ascorbases apresentam o resíduo Metionina nessa posição (MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990; CLAUS, 2004; GIARDINA *et al.*, 2010). Além disso, é possível inferir que as lacases expressas pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em condições otimizadas, desempenham funções diferentes, visto que os resíduos nesta posição possuem atividade regulatória sobre a enzima (EGGERT *et al.*, 1998; CLAUS, 2004).

Figura 10 - Alinhamento dos transcritos com outras lacases fúngicas recuperadas do GeneBank: demonstração das regiões conservadas.



Retângulos vermelhos- regiões conservadas dos genes de lacase: L1, L2, L3 e L4; Números- respectivo ao tipo de cobre em que se ligam; Asterisco- resíduo variável que flanqueia o cobre T1; Setas- possíveis multicobre oxidases.





**Tabela 2** - Quantidade de cisteínas por lacase, em sequências recuperadas do GeneBank relativas a diferentes basidiomicetos

<b>Basidiomiceto</b>	<b>Nº de acesso</b>	<b>Cisteína/seq (Nº)</b>	<b>Cisteína/seq (%)</b>
<i>Hericium coralloides</i>	<a href="#">BAQ25793.1</a>	5	0,98
<i>Stereum hirsutum</i>	<a href="#">XP_007309652.1</a>	5	0,97
<i>Heterobasidion irregulare</i>	<a href="#">XP_009543177.1</a>	5	0,95
<i>Coprinus comatus</i>	<a href="#">AFD97050.1</a>	6	1,16
<i>Trametes versicolor</i>	<a href="#">CAA77015.1</a>	5	0,96
<i>Coprinopsis cinerea</i>	<a href="#">XP_001832271.1</a>	6	1,16
<i>Steccherinum murashkinskyi</i>	<a href="#">AFI41889.1</a>	8	1,48
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<a href="#">AAR21094.1</a>	5	0,94
<i>Dichomitus squalens</i>	<a href="#">XP_007369227.1</a>	6	1,16
<i>Coriolopsis gallica</i>	<a href="#">AJV90966.1</a>	5	0,97

A tabela 3 apresenta as 13 isoformas de lacase obtidas, em ordem de maior expressão, baseada no fator FPKM, e contendo os dados de tamanho das sequências, conteúdo GC, massa em kDa., sítios de clivagem peptídica e similaridade segundo BlastDELTA.

O tamanho das 13 isoformas de lacases variou entre 1449 pb e 1767 pb. Estas mostraram-se ricas em conteúdo GC, com percentual entre 52,2 % e 58,9 %. As sequências dessas isoformas codificam polipetídeos com tamanhos entre 482 aa e 588 aa., e massas entre 53,5 kDa e 64,7 kDa Segundo Claus (2004), o tamanho médio das lacases fúngicas varia entre 50 e 100 kDa, enquanto Giardinna e colaboradores (2010) restringem essa variação para 60 a 70 kDa Apesar de não haver um consenso, as lacases expressas pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 sob condições otimizadas aparentam ter o tamanho médio esperado, tendo em vista que essas enzimas possuem natureza glicoproteica, e o software utilizado para as análises (Genne Runner) avaliou apenas a porção polipeptídica da enzima.

**Tabela 3** - Característica dos transcritos de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentados em ordem de maior expressão segundo o fator FPKM

Sequência	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Massa (kDa)	Conteúdo GC(%)	Sítio de Clivagem	ORF	Similaridade
comp15071_c0_seq1	1647	548	58	58.6	19-20	Inc	Lacase 1 precursor <i>Coprinopsis cinerea</i>
comp16649_c0_seq21	1449	482	53.5	52.2	Sem	Com	Mutant laccase synthetic construct
comp15071_c0_seq4	1632	543	60	58.3	19-20	Inc	Lacase 1 precursor <i>Coprinopsis cinerea</i>
comp8257_c0_seq1	1602	530	56.9	57.4	20-21	Inc	Lacase <i>Steccherinum murashkinskyi</i>
comp8257_c0_seq2	1554	517	55.5	58.1	20-21	Com	Lacase 2 <i>Steccherinum murashkinskyi</i>
comp18825_c0_seq1	1569	522	56.6	53.9	21-22	Com	Lacase <i>Pleurotus ostreatus</i> PC15
comp16649_c0_seq3	1746	581	64.7	52.3	Sem	Com	Lacase <i>Pleurotus</i> sp. 'Florida'
comp15981_c0_seq3	1587	528	58	53.6	22-23	Com	Lacase <i>Pleurotus ostreatus</i>
comp15071_c0_seq5	1596	531	58.5	58.9	19-20	Com	Lacase <i>Pleurotus ostreatus</i> PC15
comp20510_c0_seq1	1767	588	64.4	55.2	16-17	Com	Lacase de <i>Dichomitus squalens</i>
comp15071_c0_seq2	1647	548	60.5	58.6	19-20	Com	Lacase C <i>Trametes</i> sp. 420
comp12377_c0_seq1	1554	517	55.9	53.9	22-23	Com	Lacase <i>Coriolopsis gallica</i>
comp21360_c0_seq1	1659	552	59.9	57.6	18-19	Com	Lacase <i>Pleurotus ostreatus</i> PC15

Pb- pares de bases; aa- aminoácidos; Sem- sem sítio de clivagem peptídica; Inc- incompleta; Com- completa.

A predição de sinal para secreção de proteína, utilizando o software online SignalP 4.1, demonstrou que dos 13 transcritos de lacase, dois não apresentaram sinalização e, portanto, possivelmente correspondem a lacases intracelulares. A maioria das lacase fúngicas já descritas são proteínas extracelulares, contudo, lacases intracelulares já foram relatadas em basidiomicetos (BALDRIAN, 2006). A atividade dessas enzimas pode estar relacionada a catalise de reações envolvendo pequenos compostos fenólicos internos à célula. Wang e colaboradores (2015), por exemplo, associou a lacase intracelular Lac3 de *Flaminula velutipes* com atividades sobre a parede celular do fungo, atuando nela sob processos de alongação e divisão celular.

Nenhuma das sequências analisadas apresentou similaridade maior do que 58% com outras sequências do GenBank, além disso, todos os organismos relacionados às sequências são pertencentes ao ambiente terrestre. Esses dados indicam dois pontos a serem considerados, o primeiro, refere-se aos bancos de sequências, demonstrando um déficit de trabalhos relacionados a análise de genes provenientes de fungos basidiomicetos derivados do ambiente marinho, incluindo nesse grupo, os genes de lacase.

O segundo ponto refere-se à possibilidade de inovação, demonstrando que as lacases produzidas pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 são únicas, e possivelmente dotadas de propriedades distintas das lacases de organismos terrestres. Bonugli-Santos e colaboradores (2015), ressaltam a importância de novos estudos nas áreas de caracterização molecular, cristalografia e modulação enzimática para enzimas derivadas do ambiente marinho, tendo em vista o alto potencial de aplicação das mesmas em condições salinas e não salinas.

Análises filogenéticas dos transcritos, com outras lacases de basidiomicetos (marinhos e terrestres) e lacases de ascomicetos, demonstraram, como já esperado, o agrupamento dos transcritos apenas com lacases de fungos basidiomicetos. Contudo, não houve agrupamento entre os transcritos e as lacases de fungos basidiomicetos marinhos.

Apenas dois genes de lacase já descritos como sendo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010) agruparam com os transcritos obtidos no presente trabalho e formaram um cluster separado dos outros genes de lacase recuperados do GenBank (Figura 13), com exceção do transcrito comp21360\_c0\_seq1

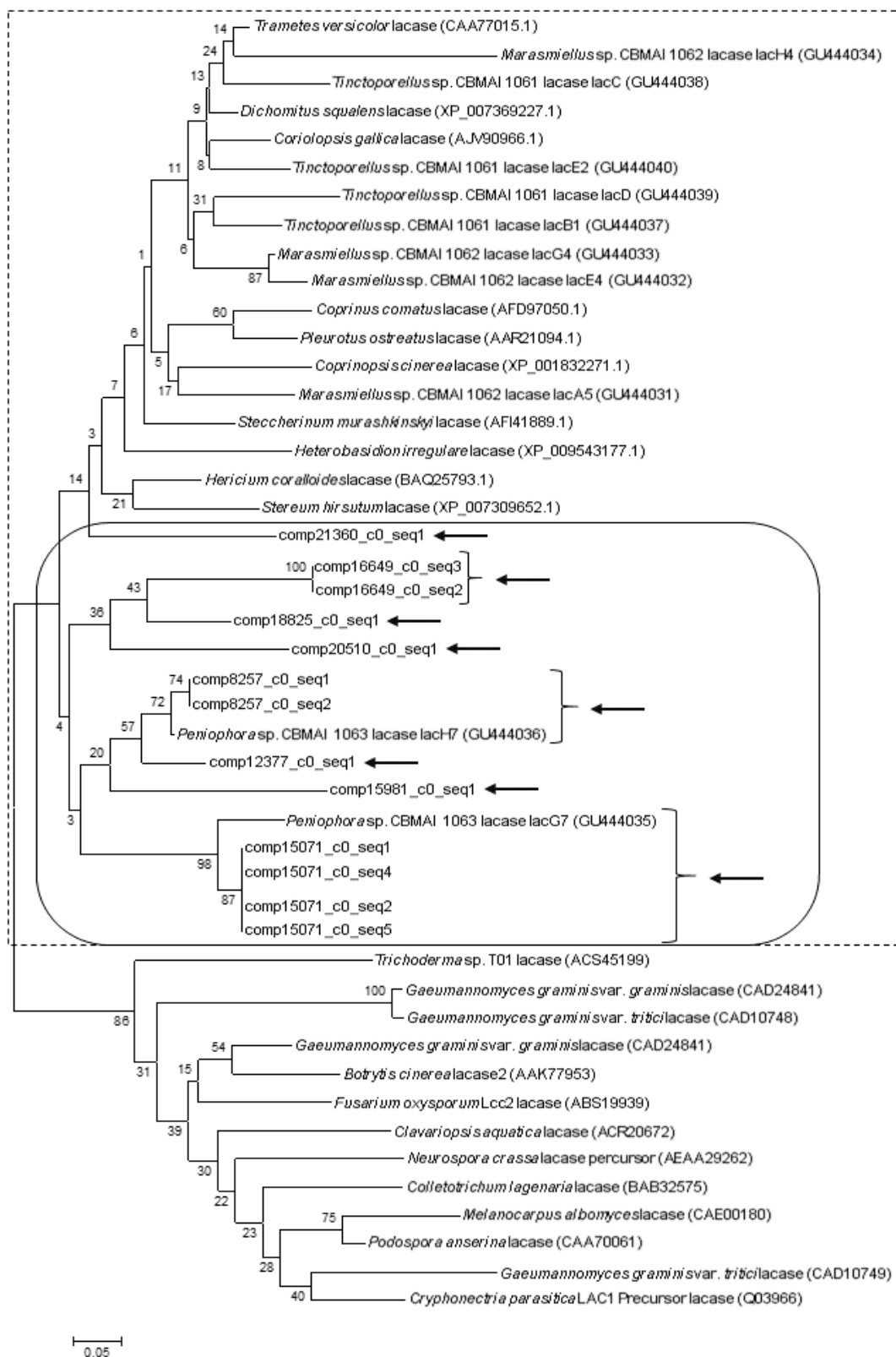
que agrupou no cluster formado pelos genes de lacase de basidiomicetos de origem marinha e terrestres.

Esse resultado reafirma a hipótese de que as lacases expressas pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 são distintas das lacases de outros basidiomicetos, tanto terrestres, quanto derivados do ambiente marinho. Além disso, é possível observar a diferença de similaridade entre os próprios transcritos e evidenciar a presença de 8 grupos gênicos putativos de lacase.

Diferentes genes de lacase num único organismo constituem verdadeiras famílias gênicas e aparenta ser característica geral aos basidiomicetos (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013), contudo, estudos que permitam compreender a expressão desses genes ainda são escassos. Wang e colaboradores (2015), demonstraram recentemente que os 11 genes de lacase presentes em *Flammulina velutipes* são regulados de acordo com a localização no organismo e o estágio de desenvolvimento do basidiomiceto, podendo ser “*up*” ou “*down*” regulados, dependendo da situação.

Bonugli-Santos e colaboradores (2010), demonstraram a presença de 2 genes putativos de lacase para o fungo derivado de ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, sob condições salinas de cultivo. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho apontam a existência de pelo menos 13 transcritos diferentes dessa enzima, expressos em condições otimizadas para produção de lacases. Desse modo, o presente trabalho sugere a ampliação da família gênica do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 para pelo menos 8 genes de lacase.

**Figura 13** - Árvore filogenética agrupando os transcritos do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 a lacases de outros basidiomicetos.



Linha tracejada - lacases de basidiomicetos; linha contínua - transcritos (presente trabalho) e genes putativos (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010) do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063; setas - grupos gênicos putativos. Método de *Neighbor-joining* com *Bootstrap* de 1000 repetições.

A expressão gênica de diferentes lacases encontrada no presente trabalho, pode ser justificada pela adição de cobre ao meio de cultivo otimizado; essa medida tem sido frequente em processos de otimização (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013). Segundo Passarini e colaboradores (2015), a adição de sulfato de cobre ao meio em pequenas concentrações, contribui para o aumento representativo na produção de lacases por fungos.

Sítios múltiplos de regulação podem ser encontrados próximos a região promotora de genes de lacase em fungos. Dentro desse grupo de sequências reguladoras está a *Metal Response Elements* (MREs) (FARACO *et al.*, 2002), que na presença de cobre, pode ser a responsável por promover a expressão de diferentes genes dessa enzima.

Outra via regulatória de lacases possível é aquela que envolve sequências conhecidas como *Xenobiotic Responsive Elements* (XREs) (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013). No presente trabalho foi encontrado no transcrito comp20510\_c0\_seq1, uma epóxido hidrolase (E.C 3.3.2.3) codificada logo após a uma lacase. Essas hidrolases catalisam reações de lise de epóxidos a seus respectivos dióis, e estão relacionadas a processos de detoxificação em eucariotos (ARAND *et al.*, 1999). Esse resultado indica a possibilidade da lacase codificada pelo mesmo transcrito, possuir função correlata ao da epóxido hidrolase na catalise de compostos tóxicos ou xenobióticos, e portanto estarem sujeitas a um mesmo estímulo.

Apesar das lacases constituírem um grupo de enzimas com baixa especificidade por substratos, capazes de catalisar inúmeras reações com diferentes compostos fenólicos (RIVA, 2006), essa característica amplamente citada (KUNAMNENI *et al.*, 2007; GIARDINA *et al.*, 2010; RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013), muito provavelmente se refere ao grupo de enzimas como um todo. As diferentes famílias gênicas de lacases demonstradas em outros trabalhos (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015), associado aos diferentes transcritos obtidos com o presente estudo, demonstram que essas enzimas possuem uma grande variação estrutural, indicando diferentes atividades que, muito provavelmente, se complementam num sinergismo fisiológico.

#### 5.4 Seleção do transcrito para clonagem e expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Na triagem subsequente realizada, para selecionar o transcrito mais adequado para clonagem e expressão heteróloga, foi escolhido o transcrito comp15071\_c0\_seq5 baseado nos seguintes critérios: homologia com o transcrito de lacase mais expresso, presença dos quatro sítios de ligação ao cobre completos e presença de ORF completa.

O transcrito comp15071\_c0\_seq5 foi nomeado Lac15071B e codifica uma proteína com cerca de 531 aminoácidos equivalentes a 58.5 kDa (Gene Runner), massa próxima à lacase purificada do fungo *Peniophora sp.* CBMAI 1063, cultivado em escala de shaker (50 mL), com 67 kDa e da principal lacase produzida em biorreator (3,5 L), com 55 kDa (dados não publicados). A pequena diferença na massa pode ser justificada pela porção glicídica dessas proteínas, mas por outro lado, o transcrito Lac15071B pode corresponder a uma lacase completamente diferente, tendo em vista o fato de outros 8 transcritos também codificarem lacases extracelulares.

O transcrito Lac15071B manteve a característica de alto conteúdo CG (58,9 %), semelhante ao encontrado em lacases de *Pycnoporus cinnabarinus* (58 %) (EGGERT *et al.*, 1998). Já no alinhamento utilizando o *Protein BLASTdelta* (NCBI), o gene Lac15071B apresentou 51 e 52 % de similaridade com *Laccase C* de *Trametes sp.* (código de acesso [AAW28938.1](#)) e com o gene da lacase de *Pleorotus ostreatus* (código de acesso [KDQ26265.1](#)), respectivamente. A baixa similaridade encontrada, ressalta a possibilidade do transcrito Lac15071B se tratar de uma nova lacase.

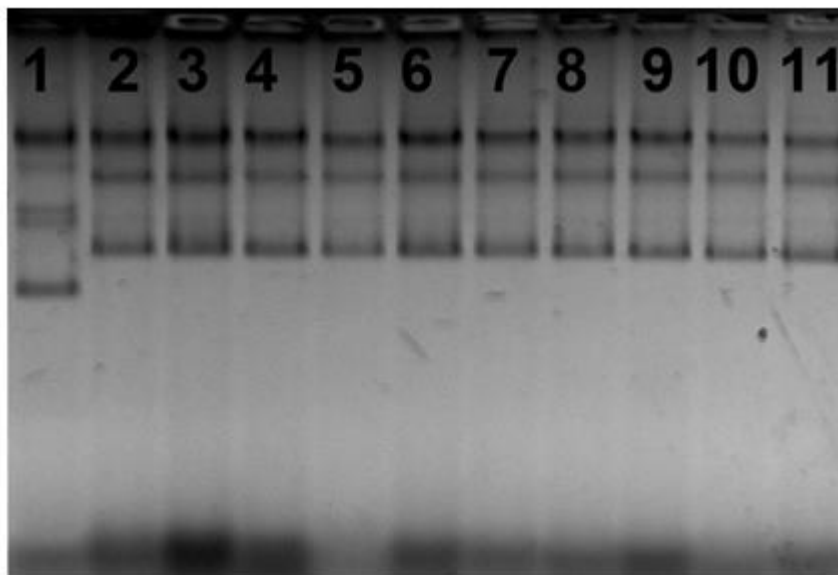
Quanto ao ligante variável do cobre T1, foi possível reconhecer o resíduo Leucina nessa posição. Ensaios com mutação dirigida demonstraram que a alteração desse resíduo pode alterar o potencial de redução da enzima, bem como o pH ótimo para atividade enzimática (XU *et al.*, 1998, 1999), dando indícios de que os resíduos presentes nessas posição estejam diretamente relacionados ao controle da atividade enzimática (KUMAR *et al.*, 2003).

### 5.5 Clonagem do fragmento Lac15071B, transformação em *E. coli* DH10B e correção

Na etapa de clonagem foram obtidas 52 colônias de *E. coli* DH10B transformadas, e como demonstrado no ensaio de *single colony* (Figura 14) todos os clones apresentaram a presença do inserto. O método de predição realizado *in silico* utilizando o software Clone Manager, permitiu o reconhecimento dos sítios de restrição bem como o tamanho dos fragmentos esperado no caso de um tratamento com enzimas de restrição.

A simulação possibilitou prever os fragmentos para o transcrito Lac15071B tanto *in frame* com o promotor do vetor, quanto invertido. Já o ensaio de restrição enzimática confirmou que os insertos possuíam os sítios de clivagem esperado para o transcrito Lac15071B, e que os fragmentos estavam inseridos no vetor em posição invertida (Figura 15). Se durante a clonagem, 100 % dos insertos não apresentarem frame com o promotor do vetor, especula-se que o resultado seja indicativo de toxicidade da proteína recombinante. Contudo, proteínas recombinantes possivelmente tóxicas podem ser expressas utilizando vetores de expressão fortemente regulados, com o intuito de evitar superexpressão e diminuir a toxicidade (GUZMAN *et al.*, 1995).

**Figura 14** - Ensaio de *single colony* demonstrando a confirmação para presença do gene no vetor.



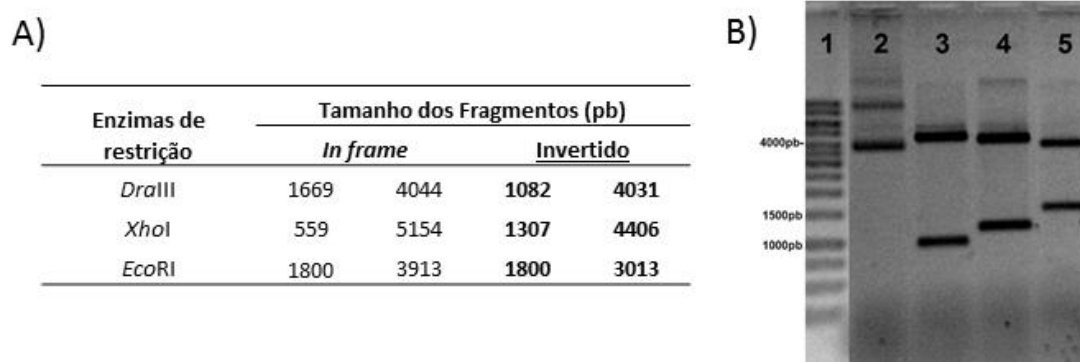
Poço 1 - controle apenas com o vetor TOPO; poços 2 a 11 - vetor mais inserto Lac15071B

O duplo sequenciamento dos vetores permitiu a cobertura completa do cDNA clonado Lac15071B com alto nível de qualidade/base e confirmou o sucesso na clonagem,

pois todos os 10 clones sequenciados apresentaram formação de *contig* com a sequência Lac15071B. Entretanto, a análise comparativa entre as sequências clonadas e o transcrito de referência demonstrou um erro de 27 pb na extremidade na porção 3' de todas as sequências clonadas.

Seguindo a estratégia de correção do cDNA clonado utilizando-se os *primers* Lac35B\_pLacF e Lac35B\_pLacR, optou-se por testar diferentes polimerases devido à complexidade dos *primers* (Anexo 1). Dentre as polimerases utilizadas, as que apresentaram melhor desempenho na amplificação foram a Pfu Platinum (ThermoFisher) e a Taq polimerase (Promega) (Figura 16). Polimerases derivadas de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) possuem atividade exonucleásica 3'-5', apresentando leitura de prova e garantindo maior fidelidade/base adicionada durante a amplificação (LUNDBERG *et al.*, 1991). Desse modo foi selecionado o cDNA corrigido com a Pfu Platinum para dar continuidade a clonagem.

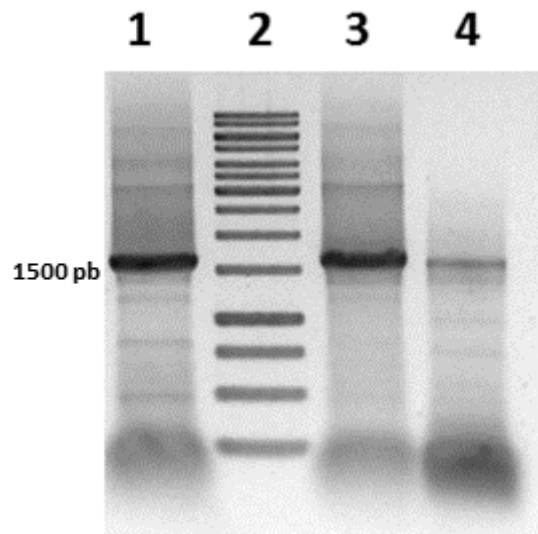
**Figura 15 - A)** Clonagem *in silico* demonstrando o tamanho dos fragmentos esperados utilizando as enzimas de restrição *DraIII*, *XhoI* e *EcoRI*. **B)** Gel de agarose 0,7% demonstrando ensaio de restrição enzimática confirmando o padrão de bandas esperado para o transcrito Lac15071B.



Poço 1 - *ladder* (Promega 1kb); poço 2 - controle sem tratamento; poço 3 - tratamento com *DraIII*; poço 4 - tratamento com *XhoI*; poço 5 - tratamento com *EcoRI*.

Os ensaios de restrição enzimática utilizando *EcoRI* e *HindIII* sobre o fragmento corrigido e reclonado em pJET 1.2, demonstraram a eficiência dos primers na inserção dos dois sítios para ligação no vetor de expressão, e concomitantemente possível correção do fragmento. Na Figura 17 é possível visualizar a liberação do fragmento Lac15071B corrigido (aproximadamente 1500 pb). O sequenciamento subsequente realizado pôde confirmar a correção realizada pelos *primers*.

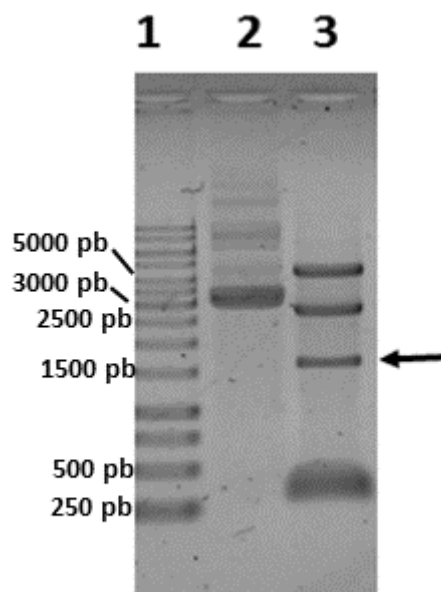
**Figura 16** - Gel de agarose 0,7% demonstrando a amplificação do fragmento Lac15071B após a correção utilizando diferentes polimerases.



Poço 1 - Pfu Platinum (ThermoFisher); poço 2 - *ladder* (Promega 1kb); poço 3 - Taq (Promega); poço 4 - Pfu Phusion (ThermoFisher).

Sob o ponto de vista da aplicação biotecnológica, a clonagem representa parte fundamental na obtenção de proteínas recombinantes codificadas por sequências devidamente caracterizadas, oferecendo subsídios para a construção de bibliotecas de expressão, e possibilitando a preservação dos transcritos codificantes. O sucesso na clonagem do transcrito Lac15071B, no presente trabalho, possibilitou a montagem de diferentes sistemas de expressão da lacase recombinante do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em organismo procarioto, e mantém-se como recurso para a montagem de outros sistemas de expressão heteróloga da lacase recombinante, como aqueles baseados em fungos filamentosos e leveduras.

**Figura 17** - Gel de agarose 0,7% demonstrando a restrição enzimática do vetor pJET 1.2 utilizando as enzimas *EcoRI* e *HindIII*.



Poço 1 - *ladder* (Promega 1kb); poço 2 - vetor de clonagem; poço 3 - vetor clonado tratado com as enzimas; seta - fragmento corrigido. É possível visualizar quatro bandas no poço número 3, duas dessas referem-se a fragmentos do vetor (aproximadamente 300 e 2700 pb), e a última banda com aproximadamente 5000 pb refere-se ao vetor linearizado. Já a banda com aproximadamente 1500 pb refere-se ao fragmento Lac15071B corrigido.

A subclonagem do fragmento corrigido no vetor de expressão pLac2a, utilizando a linhagem DH10B como hospedeiro, gerou 18 clones, que após confirmação por ensaio de restrição enzimática e sequenciamento de 4 clones, possibilitou selecionar aquele com maior similaridade com a sequência de referência. O único clone que apresentou 100 % de *match* foi selecionado para os ensaios de expressão e denominado L3. A partir dos plasmídeos de DH10B\_L3 foram feitas novas transformações nas linhagens de *Escherichia coli* BL21(DE3) e Rosetta. Essas duas linhagens foram escolhidas por serem amplamente utilizadas na expressão heteróloga de proteínas. A garantia de maior estabilidade dos vetores inseridos, e a deficiência em endo e exoproteases são os maiores atrativos das linhagens BL21(DE3) e Rosetta (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disso, a linhagem Rosetta apresenta suplementação de RNAs transportadores com códons tidos como raros, e desponta como a melhor alternativa para expressão de proteínas eucarióticas.

## 5.6 Ensaio de atividade enzimática da lacase recombinante

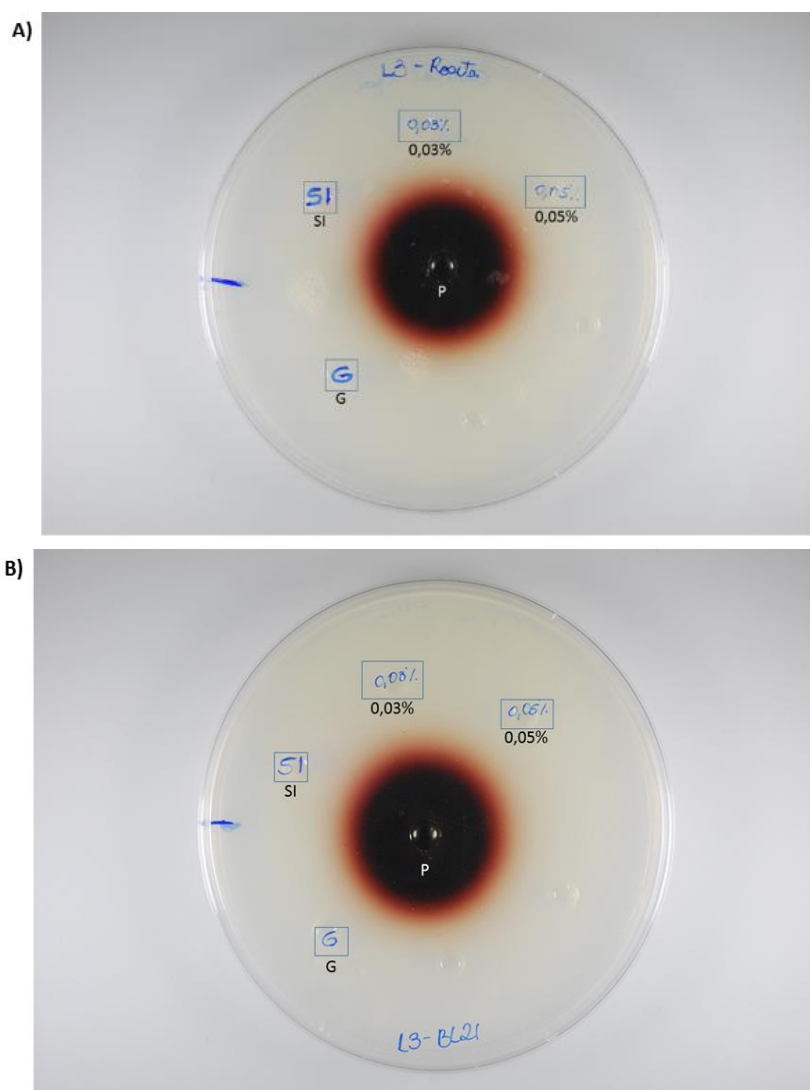
Utilizando o método qualitativo com ágar-guaiacol foi possível avaliar se as linhagens DH10B, BL21(DE3)\_L3 e Rosetta\_L3 estavam expressando a lacase recombinante, através da atividade enzimática. Foram testadas 2 diferentes concentrações de arabinose para indução da expressão da enzima recombinante (0,03 % e 0,05 %), contudo nenhum dos tratamentos expressou lacase quimicamente ativa, para nenhuma das três linhagens.

O composto fenólico guaiacol, é um líquido viscoso de aspecto incolor, que na presença de enzimas ligninolíticas, como lacases, polimeriza-se formando um composto chamado tetraguaiacoquinona de coloração marrom (VERMA *et al.*, 2010). Como observado na figura 18, apenas o controle positivo contendo o extrato enzimático do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou atividade frente o guaiacol.

A ausência de atividade encontrada poderia ser resultado de duas condições, a primeira, diz respeito a seleção da lacase para expressão heteróloga. O presente estudo sugere que as lacases do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 atuem de forma sinérgica sobre diferentes compostos, levantando a hipótese de que nem todas sejam capazes de oxidar um único substrato, sendo assim, a lacase codificada pelo transcrito Lac15071B poderia ser incapaz de oxidar o guaiacol.

Já a segunda justificativa remete a própria expressão da proteína, e nesse sentido foram realizados ensaios com gel de SDS-poliacrilamida para averiguar se as linhagens DH10B, BL21(DE3)\_L3 e Rosetta\_L3 estariam realmente expressando a proteína recombinante.

**Figura 18** - Ensaio qualitativo para presença de lacase em placa ágar-guaiacol. A) linhagem Rosetta\_L3. B) linhagem BL21(DE3)

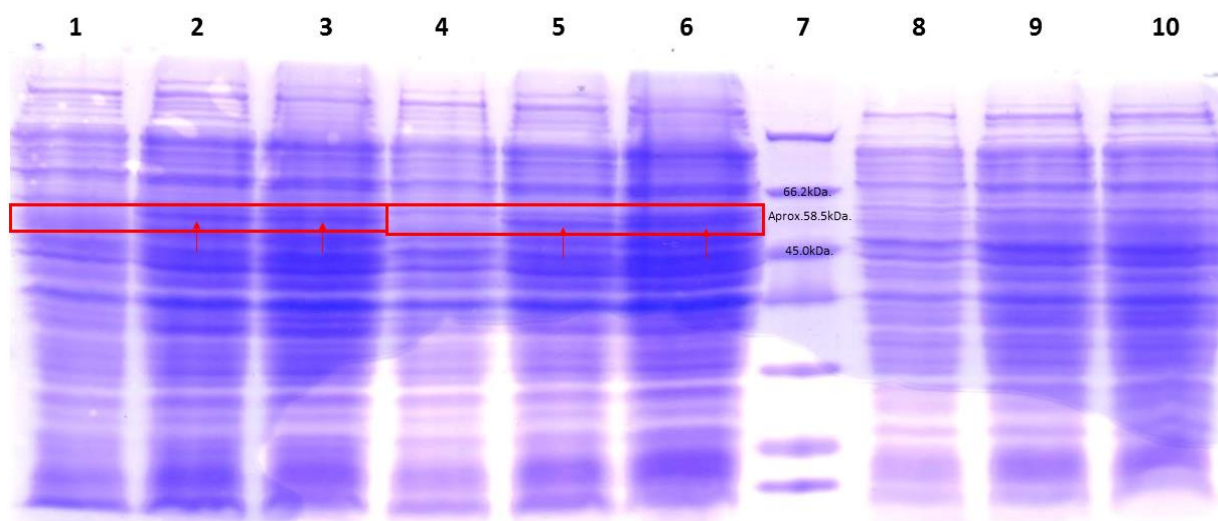


SI - expressão sem indução por arabinose; G - expressão reprimida por glicose; P - controle positivo para presença de lacases

### 5.7 Ensaio de expressão da lacase recombinante em três linhagens de *E. coli*

Os ensaios de expressão da lacase recombinante utilizando condições induzidas para transcrição (0,03 % de arabinose) e não induzidas, demonstraram a presença de uma banda com tamanho aproximado ao esperado para a lacase nativa do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 de 58.5kDa (Figura 19). As bandas encontradas apareceram apenas para as linhagens transformadas de BL21(DE3)\_L3 e Rosetta\_L3, e somente após a indução por arabinose.

**Figura 19** - Gel de SDS-poliacrilamida com as proteínas totais expressas pelas três linhagens transformadas.

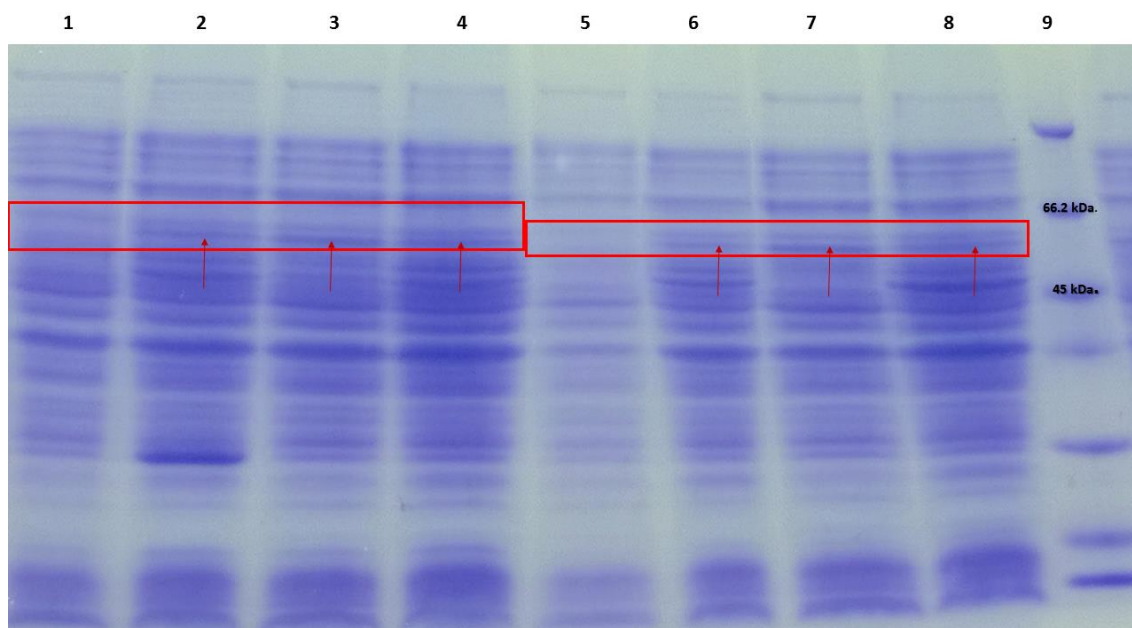


Poços de 1 a 3 - transformante Rosetta\_L3; poços 4 a 6 - transformante BL21(DE3)\_L3; poço 7 - peso molecular (kDa.); poços 8 a 10 - transformante DH10B\_L3. Poços - 1, 4 e 8 sem indução de arabinose; poços 2, 5 e 9 - indução com arabinose 0,03% por 1h; poços 3, 6 e 10 - indução com arabinose 0.03% por 2h. Setas - banda correspondente à possível lacase recombinante.

Este resultado indicou possível sucesso na expressão da lacase recombinante, contudo, em novo ensaio realizado utilizando as linhagens BL21(DE3) e Rosetta (não transformadas) como controle negativo, demonstrou que após a indução com arabinose as linhagens não transformadas também apresentaram a banda com tamanho aproximado de 58 kDa. Indicando que a banda, inicialmente definida como lacase, poderia na verdade se tratar de uma outra proteína nativa de *E. coli* (Figura 20).

O operon de arabinose em *E. coli*, descrito por Lee (1981), e do qual derivam os vetores com sistema pBAD, é constituído por 3 genes estruturais (*araB*, *araA* e *araD*), um gene regulador (*araC*) e uma região regulatória (*araO*<sub>1</sub>, *araO*<sub>2</sub> e *araI*). Na ausência de arabinose, o gene *araC* é expresso e a proteína *araC* impede que os genes estruturais, responsáveis pela metabolização da arabinose, sejam expressos. Já na presença de arabinose, o carboidrato L-arabinose se liga à proteína *araC* e modifica sua conformação, permitindo a expressão dos genes estruturais.

**Figura 20** - Gel de SDS-poliacrilamida com as proteínas totais das linhagens Rosetta e BL21(DE3), transformadas e não transformadas



Poço 1 - Rosetta\_L3 não induzida com arabinose; poço 2 - Rosetta (não transformada) induzida com arabinose 0,03% por 2h; poço 3 - Rosetta\_L3 induzida com arabinose 0,03% por 1h; poço 4 - Rosetta\_L3 induzida com arabinose 0,03% por 2h; poço 5 - BL21(DE3)\_L3 não induzida com arabinose; poço 6 - BL21(DE3) (não transformada) induzida com arabinose 0,03% por 2h; poço 7 - BL21(DE3)\_L3 induzida com arabinose 0,03% por 1h; poço 8 - BL21(DE3)\_L3 induzida com arabinose 0,03% por 2h. Setas - demonstram a presença de proteína nativa de *E. coli* expressa apenas sob indução de arabinose.

Os genes *araB* e *araA* expressam L-ribulose quinase e L-arabinose isomerase, respectivamente. A L-arabinose isomerase de *E. coli* apresenta aproximadamente 56 kDa e pode possivelmente corresponder à banda que inicialmente foi classificada como a lacase recombinante. Além disso, as modificações fisiológicas promovidas pelo operon de arabinose pode induzir a expressão de genes que não estejam necessariamente ligados a ele, o que amplia a discussão sobre a identidade da banda encontrada.

Apesar do resultado encontrado, não é possível determinar se os sistemas procarióticos construídos sejam capazes ou não de expressar a lacase recombinante do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Isso, devido a possibilidade de sobreposição de bandas com o mesmo tamanho. Portanto, para elucidação dessa questão, o presente estudo sugere a realização de ensaios de imunofluorescência, como *Western blot*, para detecção específica da enzima recombinante.

Até o presente momento, consta na literatura apenas um trabalho com a expressão heteróloga de lacase fúngica utilizando *E. coli* (ver SALONY *et al.*, 2008). Entretanto, diversos problemas relacionados ao método impediram os autores de expressarem

corretamente a lacase nativa de *Cyathus bulleri* no sistema procarioto. A lacase recombinante obtida apresentava aproximadamente 200 kDa enquanto que a lacase de *C. bulleri* purificada apresentava 60 kDa, além disso, a ausência de testes de atividade enzimática, ou sequenciamentos impossibilitaram a confirmação da natureza da lacase recombinante.

Sob o ponto de vista teórico, a obtenção de proteínas recombinantes pode ser bastante objetiva. Mas na prática, todo o processo envolve inúmeras etapas, onde todas estão sujeitas a falhas (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Na expressão de proteínas utilizando sistemas baseados em *E. coli*, por exemplo, podemos listar alguns problemas como: presença de códons raros no transcrito, impedindo o término da tradução; presença de endo e exoproteases que degradam a proteína recém-sintetizada ou após a liberação da mesma ao meio; toxicidade da proteína recombinante, que quando super expressa, pode ser letal à célula hospedeira; ausência de modificações pós-traducionais, que podem manter a proteína recombinante em estado inativo, tendo em vista que bactérias como *E. coli*, são, por hora, incapazes de realizar tais modificações (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Ainda que os resultados do presente estudo não tenham sido conclusivos, mas considerando a problemática da expressão de proteínas eucarióticas em sistemas procarióticos, o presente trabalho sugere a utilização de sistemas eucarióticos para a expressão heteróloga de lacases fúngicas. Tendo em vista a maior semelhança da estrutura celular, e a capacidade desses sistemas realizarem modificações pós-traducionais, possibilitando a obtenção de lacases fúngicas recombinantes mais semelhantes às lacases nativas, e com boa atividade enzimática (JOLIVALT *et al.*, 2005; PISCITELLI *et al.*, 2010).

Levando em consideração as vantagens dos sistemas de expressão heteróloga, baseado em leveduras, o transcrito Lac15071B obtido no presente trabalho foi enviado para o Institute of Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms – GENETIKA (Rússia) onde será inserido nas leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Pichia pastoris* visando avaliação da expressão em organismo eucarioto. Estes experimentos estão sendo realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sergey Sineoky e Dr. Ivan Laptev.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho traz contribuições significativas ao estudo das lacases produzidas pelo fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

A montagem da biblioteca de transcritos, utilizando o método *de Novo Assembly* e anotação do transcriptoma utilizando o software Blast2GO, foi útil para obtenção das sequências de lacase, permitindo uma visão geral da expressão gênica do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, quando cultivado em condições otimizadas para produção de lacase.

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 expressa pelo menos 10 lacases diferentes sob condições otimizadas para produção dessa enzima.

As sequências de lacases analisadas codificam enzimas com composição peptídica, tamanho e atividade enzimática diferentes.

A bactéria *E. coli* DH10B foi eficiente para clonagem da lacase recombinante do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Novos ensaios precisam ser realizados afim de determinar se os sistemas construídos, e baseados no vetor pLac2a e nas linhagens *E. coli* DH10B, BL21(DE3) e Rosetta, são capazes de expressar a lacase recombinante do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.-H.; CAVACO-PAULO, A.; GUBITZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357–3362, 2000.

ARAGONA, M.; MINIO, A.; FERRARINI, A.; VALENTE, M. T.; BAGNARESI, P.; ORRÙ, L.; TONONI, P.; ZAMPERIN, G.; INFANTINO, A.; VALÈ, G.; CATTIVELLI, L.; DELLEDONNE, M. De novo genome assembly of the soil-borne fungus and tomato pathogen *Pyrenochaeta lycopersici*. **BMC genomics**, v. 15, p. 313, 2014.

ARAND, M.; HEMMER, H.; DÜRCK, H.; BARATTI, J.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R.; OESCH, F. Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase. **The Biochemical journal**, v. 344 Pt 1, p. 273–280, 1999.

ARCHIBALD, F. .; BOURBONNAIS, R.; JURASEK, L.; PAICE, M. .; REID, I. . Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p. 215–236, 1997.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BENTO, I.; MARTINS, L. O.; GATO LOPES, G.; ARMENIA CARRONDO, M.; LINDLEY, P. F. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. **Dalton Transactions**, n. 21, p. 3507–3513, 2005.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, v. 114, n. 10, p. 863–872, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; VASCONCELOS, M. R. dos S.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SANTOS, J. A. dos; DUARTE, L. de A.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. da S.; FEITOSA, V. A.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–15, 2015.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; VIEIRA, G. A. L.; COLLINS, C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A.; MURRAY, P.; SETTE, L. D. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659–8668, 2016.

BORATYN, G. M.; SCHÄFFER, A. A; AGARWALA, R.; ALTSCHUL, S. F.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST.

**Biology Direct**, v. 7, n. 1, p. 12, 2012.

BRENNA, O.; BIANCHI, E. Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine. **Biothecnology Letters**, v. 16, n. 1, p. 35–40, 1994.

BRISSOS, V.; PEREIRA, L.; MUNTEANU, F. D.; CAVACO-PAULO, A.; MARTINS, L. O. Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 558–563, 2009.

BUCHER, V. V. C.; POINTING, S. B.; HYDE, K. D.; REDDY, C. A. Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 3, p. 331–337, 2004.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. a. G. Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1067–1072, 1991.

CLAUS, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 93–96, 2004.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

COURTY, P. E.; HOEGGER, P. J.; KILARU, S.; KOHLER, A.; BUÉE, M.; GARBAYE, J.; MARTIN, F.; KUES, U. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, v. 182, n. 3, p. 736–750, 2009.

DURRENS, P. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*: The three forms of the major laccase activity. **Archives of Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 121–124, 1981.

DWIVEDI, U. N.; SINGH, P.; PANDEY, V. P.; KUMAR, A. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

EGGERT, C.; LAFAYETTE, P. R.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; EGGERT, C.; FAYETTE, P. R. L. A.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. L. Molecular Analysis of a Laccase Gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1766–1772, 1998.

ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416–19425, 2003.

FARACO, V.; GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SANNIA, G. Metal-activated laccase promoters. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, n. 6, p. 105–111, 2002.

FIETO, J.L.R.; MACIEL, T.E.F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L. M. (Org.). *Ciencias genômicas: fundamentos e aplicações*. São Carlos, Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 f. Disponível em: < <http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 01 de maio de 2016, 13:00:00. p. 27-64.

FIETO, L.G.; LAMEGO, M.R.A. História e importância da genômica. In: MOREIRA, L. M. (Org.). *Ciencias genômicas: fundamentos e aplicações*. São Carlos, Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 f. Disponível em: < <http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 01 de maio de 2016, 13:00:00. p. 21-26.

GAO, Z.; LI, B.; ZHENG, C.; WANG, G. Molecular detection of fungal communities in the hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6091–6101, 2008.

GARBELOTTO, M.; GONTHIER, P. Biology, epidemiology, and control of *Heterobasidion* species worldwide. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 39–59, 2013.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: A never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; PALMA, F. di W., B.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2013.

GUZMAN, L. L. M.; BELIN, D.; CARSON, M. J.; BECKWITH, J. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4121–4130, 1995.

HO, C.-L.; TAN, Y.-C.; YEOH, K.-A.; GHAZALI, A.-K.; YEE, W.-Y.; HOH, C.-C. De novo transcriptome analyses of host-fungal interactions in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 66, 2016.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

HUANG, Y.; WU, X.; JIAN, D.; ZHAN, Y.; FAN, G. De novo transcriptome analysis of a medicinal fungi *phellinus linteus* and identification of SSR markers. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 395–403, 2015.

HUNTLEY, R. P.; SAWFORD, T.; MARTIN, M. J.; O'DONOVAN, C. Understanding how and why the Gene Ontology and its annotations evolve: the GO within UniProt. **GigaScience**, v. 3, n. 1, p. 4, 2014.

JOLIVALT, C.; MADZAK, C.; BRAULT, A.; CAMINADE, E.; MALOSSE, C.;

MOUGIN, C. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 450–456, 2005.

JONES, E.B.G.; PANG, K.-L. Marine fungi and fungal-like organisms. Berlin, De Gruyter, 2012. 532f.

KESTER, D. R.; DUEDALL, I. W.; CONNORS, D. N.; PYTKOWICZ, R. M. Preparation of artificial seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 12, n. 1, p. 176–179, 1967.

KHORER, K.; DOMDEY, H. Preparation of High Molecular Weight RNA. **Methods in enzymology**, v.194, p.398-405, 1991.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 159–162, 2012.

KILARU, S.; HOEGGER, P. J.; KUES, U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. **Current Genetics**, v. 50, n. 1, p. 45–60, 2006.

KIM, H. W.; LEE, S. Y.; PARK, H.; JEON, S. J. Expression, refolding, and characterization of a small laccase from *Thermus thermophilus* HJ6. **Protein Expression and Purification**, v. 114, p. 37–43, 2015.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

KO, E.-M.; LEEM, Y.-E.; CHOI, H. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 98–102, 2001.

KUMAR, S. V. S.; PHALE, P. S.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 386–394, 2003.

KUNAMNENI, A.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J.; ALCALDE, M. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. **Applied Microbiology**, p. 233–245, 2007.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: a patent review. **Recent patents on biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10–24, 2008.

LARRONDO, L. F.; AVILA, M.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. **Microbiology**, v. 149, n. 5, p. 1177–1182, 2003.

- LEE, N. L.; GIELOW, W. O.; WALLACE, R. G. Mechanism of araC autoregulation and the domains of two overlapping promoters, Pc and PBAD, in the L-arabinose regulatory region of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 2, p. 752–6, 1981.
- LEITNER, C.; HESS, J.; GALHAUP, C.; LUDWIG, R.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; HALTRICH, D. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98-100, p. 497–507, 2002.
- LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA A.C.F.; SILVEIRA, C.C. "Green chemistry" - Os 12 princípios da química verde e suas inserções nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.
- LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: Properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3-4, p. 185–227, 2001.
- LI, B.; FILLMORE, N.; BAI, Y.; COLLINS, M.; THOMSON, J. a.; STEWART, R.; DEWEY, C. Evaluation of *de novo* transcriptome assemblies from RNA-Seq data. **Genome biology**, v. 15, n. 15, p. 553, 2014.
- LUNDBERG, K. S.; SHOEMAKER, D. D.; ADAMS, M. W. W.; SHORT, J. M.; SORGE, J. A.; MATHUR, E. J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene**, v. 108, n. 1, p. 1–6, 1991.
- LUO, W.; VRIJMOED, L. L. P.; GARETH JONES, E. B. Screening of marine fungi for lignocellulose-degrading enzyme activities. **Botanica Marina**, v. 48, n. 5-6, p.379-386, 2005.
- MA, K.; BAO, L.; HAN, J.; JIN, T.; YANG, X.; ZHAO, F.; LI, S.; SONG, F.; LIU, M.; LIU, H. New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom *stereum hirsutum*. **Food Chemistry**, v. 143, p. 239–245, 2014.
- MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: Properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694–1717, 2009.
- MAESTRE-REYNA, M.; LIU, W. C.; JENG, W. Y.; LEE, C. C.; HSU, C. A.; WEN, T. N.; WANG, A. H. J.; SHYUR, L. F. Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–28, 2015.
- MAGRINI, M.J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. Campinas, 2012. Dissertação de mestrado, 91f. Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- MAINARDI, P. H. Produção de lacases pelo fungo filamentosso de origem marinha *peniophora* sp . cbmai 1063 em biorreator de bancada produção de lacases pelo fungo filamentosso de origem marinha *Peniophora* sp . CBMAI 1063 em biorreator de

bancada. Rio Claro, 2015. Dissertação de mestrado, 65f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. a; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J.-B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. a; VOLKMER, G. a; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–80, 2005.

MARTINS, L. O.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M. M.; TEIXEIRA, M.; COSTA, T.; JONES, G. H.; HENRIQUES, A. O. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18849–18859, 2002.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 2010.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 341–352, 1990.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 6-7, p. 205–216, 2002.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 4, p. 327–330, 2004.

MOREIRA, L. M. (Org.). Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. São Carlos, Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 f. Disponível em: <<http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 01 de maio de 2016, 13:00:00.

MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. a. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual Review of Genomics and Human**

**Genetics**, v. 10, p. 135–51, 2009.

MOSHKOV, K. A.; ZAITSEV, V. N.; GRISHINA, T. V.; STEFANOV, V. E.  
Multinuclear blue copper-proteins: the evolutionary design. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 50, n. 3, p. 189–205, 2014.

MUTZ, K.-O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J.-G.; STAHL, F.  
Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 22–30, 2013.

NOVOZYMES. **Enzymes at work** (H. S. Damhus, T; Kaasgaard, S.; Olsen, Ed.), 2013.  
O'NEILL, C.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; DELÉE, W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 11, p. 1009–1018, 1999.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Uses of Laccases in the Food Industry. **Enzyme Research**, v. 2010, n. Table 1, p. 1–8, 2010.

PASSARINI, M. R. Z.; OTTONI, C. A.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SETTE, L. D.  
Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015.

PASSARINI, M. R. Z.; RODRIGUES, M. V. N.; DA SILVA, M.; SETTE, L. D.  
Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 364–370, 2011.

PISCITELLI, A.; PEZZELLA, C.; GIARDINA, P.; FARACO, V.; GIOVANNI, S.  
Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252–262, 2010.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19–35, 2008.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA, T. M.; THORN, R. G.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2103–2111, 1999.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Current Science**, v. 80, n. 9, p. 1121–1128, 2001.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 2, p. 290–344, 2011.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, 2006.

RIVERA-HOYOS, C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.;

- PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3-4, p. 67–82, 2013.
- RODOVALHO, C. de M. Caracterização do transcriptoma de genoma mitocondrial da formiga cortadeira *atta laevigata* (formicidae: attini). Rio Claro, 2011. Tese de doutorado, 83f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.
- RODRIGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, 2006.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- SAKURAI, T.; KATAOKA, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, cueo, bilirubin oxidase, and laccase. **Chemical Record**, v. 7, n. 4, p. 220–229, 2007.
- SALONY; GARG, N.; BARANWAL, R.; CHHABRA, M.; MISHRA, S.; CHAUDHURI, T. K.; BISARIA, V. S. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 2, p. 259–268, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 957f.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.
- SINGH, P.; WANG, X.; LENG, K.; WANG, G. Diversity and ecology of marine-derived fungi. In: JONES, E.B.G.; PANG, K.-L. (Eds.). Marine fungi and fungal-like organisms. Berlin, De Gruyter, 2012. p. 383-408.
- SRIDHAR, K.R. Decomposition of materials in the sea. In: JONES, E.B.G.; PANG, K.-L. (Eds.). Marine fungi and fungal-like organisms. Berlin, De Gruyter, 2012. p. 475-500.
- SURGET-GROBA, Y.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 10, p. 1432–1440, 2010.
- ULLRICH, R.; HUONG, L. M.; DUNG, N. L.; HOFRICHTER, M. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 357–363, 2005.
- VASCONCELOS, M.R.S. Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais. São Paulo, 2015. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2015.
- VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G.

Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v. 21, n. 2, p. 217–233, 2010.

VITE-VALLEJO, O.; PALOMARES, L. A.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; AYALA-CASTRO, H. G.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; VALDERRAMA, B.; FOLCH-MALLOL, J. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 233–239, 2009.

WANG, W.; LIU, F.; JIANG, Y.; WU, G.; GUO, L.; CHEN, R.; CHEN, B.; LU, Y.; DAI, Y.; XIE, B. The multigene family of fungal laccases and their expression in the white rot basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Gene**, v. 563, n. 2, p. 142–149, 2015.

WEI, C.; TAO, X.; LI, M.; HE, B.; YAN, L.; TAN, X.; ZHANG, Y.; De novo transcriptome assembly of *Ipomoea nil* using Illumina sequencing for gene discovery and SSR marker identification. **Molecular Genetics and Genomics**, v.290, p. 1873–1884, 2015.

WU, J.; KIM, K.; LEE, J.; LEE, Y. Cloning , expression in *Escherichia coli* , and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 4, p. 635–640, 2010.

XU, F.; BERKA, R. M.; WAHLEITHNER, J. a; NELSON, B. a; SHUSTER, J. R.; BROWN, S. H.; PALMER, a E.; SOLOMON, E. I. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. **The Biochemical journal**, v. 334, p. 63–70, 1998.

XU, F.; PALMER, A. E.; YAVER, D. S.; BERKA, R. M.; GAMBETTA, G. A.; BROWN, S. H.; SOLOMON, E. I. Targeted Mutations in a *Trametes villosa* Laccase. **Biochemistry**, v. 274, n. 18, p. 12372–12375, 1999.

YANG, J.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, heterologous expression, and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 344–349, 2015.

**8. ANEXO 1 - SEQUENCIAS DOS PRIMERS DESENHADOS (5' - 3')****Lac15071FB**

TGTTTAATTATGCGCGTTTCTGCTC

**Lac15071RB**

GTGGTCGTAGGCCGGGGCATAGGTTC

**Forward**

CGAGCAATTCGAGCTATAAC

**Reverse**

GGCCATTGATGAGCGTCGAG

**Lac35B\_pLacF**

AAAGAATTCACCATGCGCGTTTCTGCTC

**Lac35B\_pLacR**TTTAAGCTTACGGAGTCGTGGCCATGAGCTCCATGTAGTGGTCGTAGGCCGG  
GGCATAGGTTC