

DENISE MARA SOARES BAZZOLLI

**ORGANIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PECTINA
LIASE EM *Penicillium griseoroseum***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

RESUMO

BAZZOLLI, Denise Mara Soares, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Organização e regulação de genes que codificam pectina liase em *Penicillium griseoroseum***. Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

Os genes *plg1* e *plg2*, que codificam pectina liase em *Penicillium griseoroseum*, foram isolados e caracterizados. A região estrutural do gene *plg1* possui 1341 pares de bases (pb) e é interrompida por 2 íntrons, de 101 e 115 pb, confirmados pela seqüência do cDNA. A proteína deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos possui 374 aa, com massa molecular estimada em 40,1 KDa, um potencial sítio de glicosilação na posição N¹¹² e *pl* calculado de 9,46.

O gene *plg2* possui 1400 pb, sendo interrompido por quatro íntrons contendo 56, 60, 52 e 39 pb. Estes íntrons estão nas mesmas posições dos íntrons do gene *pelD* de *Aspergillus niger*, embora as seqüências de nucleotídeos sejam diferentes. A proteína deduzida possui 383 aa, massa molecular estimada de 40,5 KDa e *pl* de 5,55. Três possíveis sítios de glicosilação foram encontrados nas posições N³⁸, N¹²⁸ e N²⁵⁷.

Análise por hibridização do DNA total de *P. griseoroseum* e dos respectivos plasmídeos que contêm as seqüências genômicas dos genes *plg1* e *plg2*, revelaram que estes genes estão presentes em cópias únicas no genoma do fungo. Esses resultados sugerem que *P. griseoroseum* possui somente dois genes que codificam pectina liase.

A avaliação da regulação da expressão dos genes *plg1* e *plg2* foi conduzida por hibridização do RNA total e por RT-PCR. Os genes *plg1* e *plg2*

apresentam diferente regulação em nível de transcrição. A expressão do gene *plg1* é induzida por pectina cítrica e sacarose/extrato de levedura, sendo expresso ao longo de 96 horas de crescimento de *P. griseoroseum*. No entanto, o maior acúmulo do transcrito foi detectado com 24 horas de crescimento. A adição de glicose, frutose, galactose ou xilose no meio de cultura, reprimem a transcrição de *plg1* substancialmente. O transcrito do gene *plg2* foi detectado somente por RT-PCR, demonstrando que a sua expressão, mesmo induzida, é muito menor do que a de *plg1*. O gene *plg2* foi transcrito em nível muito baixo em pectina cítrica e em pectina de maçã, não sendo transcrito em sacarose/extrato de levedura. As regiões 5' terminal dos genes *plg1* e *plg2* foram sequenciadas, e potenciais cis-elementos para ligação dos fatores de transcrição CreA e PacC foram identificados. Foram também detectados os cis - elementos CAAT box e TATA box. A presença dos dois primeiros cis-elementos explica a regulação de *plg1*, considerando que este está sujeito à repressão catabólica (CreA) e à influência do pH do meio (PacC).

O gene *plg1* é induzido na presença de sacarose/extrato de levedura. Análise por RT-PCR mostrou que este não foi expresso em meio contendo sacarose somente, e quantidades pequenas do transcrito foram detectadas quando o fungo foi crescido apenas em meio contendo extrato de levedura. Os resultados evidenciam que a expressão do gene *plg1* depende conjuntamente de sacarose e extrato de levedura.

Com o objetivo de verificar se o efeito de sacarose e extrato de levedura na expressão de *plg1* depende do envolvimento do AMPc, o fungo foi crescido em meios contendo sacarose e extrato de levedura, acrescidos de substâncias que atuam na cascata de transdução de sinais via AMPc. Foi verificado que há expressão diferencial de *plg1* nas diferentes substâncias testadas e nos tempos de crescimento analisados, 18 e 24 horas. A presença de cafeína e extrato de levedura provocou aumento na expressão do gene *plg1* em relação ao controle contendo sacarose e extrato de levedura, e a combinação de sacarose/cafeína e extrato de levedura levou a um maior aumento. Somente sacarose e dibutilil-AMPc não promoveram o acúmulo do transcrito do gene *plg1*, como observado em sacarose e extrato de levedura. Este acúmulo só foi detectado na presença de extrato de levedura, o que nos leva a inferir que somente um aumento do AMPc endógeno não seria capaz de induzir a transcrição do gene *plg1*.

ABSTRACT

BAZZOLLI, Denise Mara Soares, D.S., Universidade Federal de Viçosa, april 2003. **Organization and regulation of pectin lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum***. Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Committee members: Marisa Vieira de Queiroz and Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

Two pectin lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* were isolated and characterized. The coding region of the *plg1* gene consists of 1341 base pairs (bp) and is interrupted by two introns of 101 and 115 bp, confirmed by cDNA sequencing. The deduced amino acid (aa) sequence (374 aa) of PLG1 has an estimated molecular mass of 40.1 KDa and a calculated pI of 9.46. One putative N-glycosylation site was found at N¹¹².

The *plg2* coding sequence (1400 bp) is interrupted by four small introns which sizes vary from 36 to 60 bp. These introns were found at identical positions of those of the *pelD* gene from *A. niger* although a detailed comparison revealed sequence divergence. The calculated pI and predicted molecular mass of PLG2 protein are 5.55 and 40.5 KDa, respectively. Three putative glycosylation sites were detected at N³⁸, N¹²⁸, and N²⁵⁷.

Quantitative Southern blot revealed that the *plg1* and *plg2* genes exist as single copies in the *P. griseoroseum* genome. Our results indicate that they are the only members of the pectin lyase gene family in this fungus.

Northern hybridization analysis and RT-PCR were conducted to study the regulation of *plg1* and *plg2* expression. Both genes are regulated at the transcription level although they are controlled in different ways. Citric pectin and sucrose/yeast extract induces *plg1* expression when *P. griseoroseum* is

cultivated during 96 h. However the highest transcript accumulation was detected at 24 h. Transcription of *plg1* is substantially repressed when glucose, fructose, galactose and xylose are added to the medium culture. *plg2* transcripts were only detected by RT-PCR demonstrating that this gene is expressed at lower levels when compared to *plg1*. The *plg2* transcription was seen in sucrose/yeast extract while transcript levels were low in citric pectin and apple pectin. The 5'-flanking regions of *plg1* and *plg2* genes were sequenced and putative CAAT and TATA boxes were identified as well as putative consensus binding sites for CreA and PacC. These cis-elements explain the regulation of these genes since both undergo catabolite repression (CreA) and are influenced by the medium pH (PacC).

The *plg1* gene is induced by sucrose/yeast extract. RT-PCR analysis showed that sucrose alone doesn't trigger its expression and low amounts of *plg1* transcript were detected when the fungus was cultivated only in yeast extract. These results provide strong evidence that *plg1* expression relies on both sucrose and yeast extract.

P. griseoroseum was grown on medium containing sucrose and yeast extract in order to analyze if *plg1* expression also depends on cAMP. Differential expression was seen when different substances were added and at the time points sampled, 18 and 24 h. Caffeine and yeast extract raised the expression of *plg1* gene when compared to the control, sucrose and yeast extract. Even higher expression was seen from combination of sucrose/caffeine and yeast extract. No transcript accumulation was detected when the fungus was cultivated on sucrose and dibutyryl-cAMP in opposition to cultivation on sucrose and yeast extract. This accumulation was only observed in the presence of yeast extract and provides evidence that a simple raise in the endogenous cAMP level would not be able to induce *plg1* transcription.