

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

DOUGLAS MORAES MENDEL SOARES

L-DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*:

revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga,
caracterização funcional e contextualização filogenética

Versão da Tese corrigida

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

11/02/2019

DOUGLAS MORAES MENDEL SOARES

L-DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*:

revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga,
caracterização funcional e contextualização filogenética

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências (Bioquímica).*

*Orientador: Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta
Coorientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos*

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S6761 Soares, Douglas Moraes Mendel
L-DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*: revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga, caracterização funcional e contextualização filogenética / Douglas Moraes Mendel Soares. - São Paulo, 2019.
183 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Hotta, Carlos Takeshi
Coorientador: Bastos, Erick Leite

1. Dioxigenase. 2. *Amanita muscaria*. 3. Filogenia. 4. Cinética enzimática. 5. Pigmentos naturais. I. T. II. Hotta, Carlos Takeshi, orientador. III. Bastos, Erick Leite, coorientador.

Esta página será substituída pela folha de aprovação.

Aos meus amados pais, Lili e Cícero, dedico.

Agradecimentos

Aos Professores Dr. Carlos Takeshi Hotta e Dr. Erick Leite Bastos pela orientação e amizade. Mais que profissionais, vocês sempre me encorajaram e me fizeram acreditar que eu poderia ir mais longe do que imaginava. Parafrazeando o Erick: “Douglas, meu rei: às vezes estamos no lugar certo, no momento certo e com as pessoas certas”. Eu serei eternamente grato a vocês!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado concedida e à Natura que, por meio do Programa Natura Campus, financiou o Projeto Aquarela, complementou a minha bolsa de Doutorado e me concedeu a oportunidade de colaborar na pesquisa aplicada de pigmentos naturais. Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento à pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (Hotta Lab) e do Laboratório de Química de Pigmentos Naturais (Bastos Lab) pelo inestimável apoio e amizade; em especial, à Dra. Juliana Luz, Dra. Letícia Gonçalves, Carol Machado, Dra. Nathana Lopes, Dr. Renan Pioli, Dra. Ana Paula Pagano, Maira Dourado, Lucas Barros e Flávia Adachi.

Ao Prof. Dr. Cassius Stevani (IQ/USP) e Enrico Stevani pela coleta do fungo *Amanita muscaria*; à Profa. Dra. Glaucia Souza (IQ/USP) pela disposição do laboratório e equipamentos na condução de alguns experimentos; à Profa. Dra. Carla Columbano (IQ/USP) e à Mestra Fiorella Orellana pelo auxílio com a expressão e purificação das

proteínas recombinantes; ao Prof. Dr. João Carlos Setubal (IQ/USP), Dr. Luiz Thiberio Rangel e Dr. José Patané pela colaboração com as análises de Bioinformática; e à Profa. Dra. Renata Tonelli (UNIFESP), Prof. Dr. Renato Mortara (UNIFESP) e Dr. Mário Cruz (CEFAP-ICB/USP) pelo apoio com os experimentos de microscopia confocal de fluorescência.

Aos Professores Dr. Asaph Aharoni (*Weizmann Insitute of Science*, Israel), Dr. Fernando Gandía-Herrero (*Universidad de Murcia*, Espanha) e Dr. Samuel Brockington (*University of Cambridge*, Inglaterra), ícones no estudo de betalainas, por serem sempre tão solícitos e dispostos à colaborar com o nosso grupo de pesquisa; em especial, ao Prof. Dr. Brockington e ao Dr. Samuel Lopez-Nieves pela oportunidade de conhecê-los pessoalmente e discutir algumas das análises apresentadas nesta Tese.

Ao Prof. Dr. Alex Webb (*University of Cambridge*, Inglaterra), meu “avô científico”, pelo bate-papo tão agradável e por ser inspiração para tantos cientistas; aos alunos de Doutorado Alfonso Timoneda, Jordan e Nat (Brockington Lab) por me receberem tão bem em Cambridge; e ao Dr. Rodrigo Duarte (*King's College London*) pela amizade.

Aos docentes e servidores do IQ/USP, em especial à Profa. Dra. Nadja Cristhina Pinto, Prof. Dr. Sandro Marana e Profa. Dra. Maria Teresa Machini pelas valiosas contribuições durante o meu Exame de Qualificação de Doutorado; ao Prof. Dr. Bayardo Torres pelas agradáveis conversas e por ser um grande exemplo de competência e dedicação; à Erica Bandeira, Alessandra Teixeira e Dra. Carolina Lembke pelo apoio técnico e amizade; à Viviane Santos, Fábio Batista e Simone Corrêa do Departamento de

Bioquímica pelo apoio institucional às atividades discentes; e à Dona Maria, que colaborava com a limpeza do Hotta Lab, por ser tão gentil e agradável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela formação acadêmica, suporte financeiro e institucional, bem como aos colegas de pós-graduação pelo convívio e amizade, em especial aqueles que dividiram comigo as responsabilidades da representação discente e da organização dos Seminários de Pós-Graduandos e Pós-Doutores do Departamento de Bioquímica.

Aos amigos Thays e Fran por me ouvirem, aconselharem, apoiarem e compartilharem tantos momentos especiais nos últimos anos; ao Vitor e a Paula, pela oportunidade de ter a companhia dos gatos Corisco e Pururuca; ao Pablo e Sandra, pelo grande apoio e incentivo no início do Doutorado; e aos Professores Me. Manoel Grifo (UFES), Dra. Milene Praça-Fontes e Dra. Adriana da Silva (UFES) por acreditarem no meu potencial.

Aos meus pais, Lili e Cícero, e aos meus irmãos: Rosinha, Lu, Mene, Paulinho, Deirim e China, bem como aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos, e à Tia Bete, por sempre me apoiarem e compreenderem a minha ausência durante todo esse tempo. Vocês são o meu alicerce e eu amo vocês!

A Deus, pela oportunidade de vivenciar a concretização deste grande sonho e por me permitir conhecer pessoas tão especiais ao longo dessa trajetória. Agradeço por me sustentar, amparar e me dar forças para superar os obstáculos, mesmo quando eles pareciam ser muito maiores do que eu. À Hillsong São Paulo e à *Hillsong London*, minha gratidão pela acolhida tão calorosa e pelos momentos tão únicos e especiais. A tudo, a todos e por tudo o que me fez chegar até aqui, eu sou extremamente grato!

“The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science. He to whom the emotion is a stranger, who can no longer pause to wonder and stand wrapped in awe, is as good as dead; his eyes are closed.”

Albert Einstein, The world as I see it, 1934.

Resumo

SOARES, D.M.M. **L-DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*: revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga, caracterização funcional e contextualização filogenética**. 2018. 183 p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Extradiol dioxigenases são enzimas que catalisam a clivagem oxidativa de ligações C-C entre grupos hidroxila fenólicos adjacentes utilizando catecóis como substratos. Esta classe de enzimas é bem caracterizada em bactérias, onde catalisam a degradação de compostos aromáticos. Na maioria das plantas Caryophyllales, como a beterraba, primavera e a maravilha, L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) extradiol dioxigenases (DODAs) catalisam a clivagem oxidativa de L-DOPA na posição 4,5 gerando o ácido betalâmico, aldeído precursor das betalainas, uma classe de pigmentos naturais que substitui as antocianinas na pigmentação dessas espécies. Alguns fungos basidiomicetos também produzem betalainas, como o agário-das-moscas (*Amanita muscaria*). Nesse organismo, DODA é capaz de catalisar uma clivagem adicional na posição 2,3 da L-DOPA, formando muscaflavina, um isômero do ácido betalâmico que dá origem a uma outra classe de pigmentos naturais: as higroaurinas. Desde a caracterização do gene *dodA*, o qual codifica para a DODA de *A. muscaria* (AMAMU), não existem relatos na literatura que explorem a promiscuidade catalítica desta enzima, sua relação com outras linhagens de DODAs e a síntese quimioenzimática de betalainas a partir desta enzima. Dessa forma, buscamos contextualizar as relações filogenéticas e funcionais entre AMAMU e diferentes linhagens de DODAs, bem como estabelecer um método que viabilize a clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional desta

enzima. As análises filogenéticas revelaram que AMAMU possui uma evolução convergente com DODAs de plantas e bactérias e que, apesar de AMAMU ser funcionalmente homóloga à DODA da bactéria *Escherichia coli*, esta última apresenta homologia com DODAs de plantas. Logo, não há uma relação direta entre a sequência primária de DODAs e sua função. Nós também demonstramos que não há uma relação entre a expressão de transcritos de *BvDODA1*, e de seu parálogo *BvDODA2*, e a diferença de pigmentação entre variedades de beterrabas amarelas e vermelhas. A clonagem da sequência codificadora (CDS) publicada para o gene *dodA* de *A. muscaria* resultou na retenção do primeiro íntron, o que impedia a sua expressão. Então, uma nova CDS de 558 nucleotídeos foi proposta para este gene, a qual inclui um códon de início da tradução que se mantém na fase de leitura e codifica para uma proteína de 185 resíduos, 43 a menos que AMAMU. A expressão desta CDS resultou na proteína recombinante AmDODA, capaz de catalisar a síntese de ácido betalâmico e muscaflavina a partir de L-DOPA e D-DOPA. AmDODA possui um tamanho aproximado de 22 kDa, com um pH ótimo de atividade de 8,5 e uma constante de Michaelis (K_M) de $3,7 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e de velocidade máxima (V_{max}) de $3,3 \pm 0,4 \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Sua utilização foi demonstrada na síntese quimioenzimática de betalaínas-modelo com potencial aplicação como sondas para microscopia confocal de fluorescência de dois fótons. Neste contexto, esta Tese explora os aspectos moleculares, bioquímicos e biológicos da DODA do fungo *A. muscaria* e traz importantes contribuições acerca da pigmentação por betalaínas na natureza.

Palavras-chave: Dioxigenase, *Amanita muscaria*, filogenia, cinética enzimática, pigmentos naturais.

Abstract

SOARES, D.M.M. *Amanita muscaria* L-DOPA extradiol dioxygenase: coding sequence review, heterologous expression, functional characterization, and phylogenetic context. 2018. 183 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Extradiol dioxygenases are enzymes that catalyze the oxidative cleavage of C-C bonds between adjacent phenolic hydroxyl groups using catechols as substrates. This class of enzymes is well characterized in bacteria, where they catalyze the degradation of aromatic compounds. In most plants of the Order Caryophyllales, such as beet, paperflower and four o'clock flower, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) extradiol dioxygenases (DODAs) catalyze the oxidative 4,5-cleavage of L-DOPA generating the betalamic acid, an aldehyde precursor of the betalains, a class of natural pigments that replaces anthocyanins in the pigmentation of these species. Some basidiomycete fungi also produce betalains, such as the fly agaric (*Amanita muscaria*). In this organism, DODA is able to catalyze an additional 2,3-cleavage of L-DOPA, yielding muscaflavine, an isomer of betalamic acid that gives rise to another class of natural pigments: the hygrouurins. Since the characterization of the *dodA* gene, which encodes the *A. muscaria* DODA (AMAMU), there are no reports in the literature that explore the catalytic promiscuity of this enzyme, its relation to other DODAs and the chemoenzymatic synthesis of betalains from this enzyme. Thus, we seek to contextualize the phylogenetic and functional relationships between AMAMU and different DODA lineages, as well as to establish a method that enable the cloning, heterologous expression and functional characterization of this enzyme. Phylogenetic analysis revealed that AMAMU has a convergent evolution

with plant and bacterial DODAs and that although AMAMU is functionally homologous to the DODA of the *Escherichia coli* bacteria, this latter is homologous to the plant DODAs. Therefore, there is no direct relationship between the primary sequence of DODAs and their function. We have also shown that there is no relationship between the expression of *BvDODA1* transcripts, and its *BvDODA2* paralogue, and the pigment difference between yellow and red beet varieties. Cloning of the published coding sequence (CDS) for the *dodA* gene of *A. muscaria* resulted in the retention of the first intron, which prevented its expression. Then, a new CDS of 558 nucleotides was proposed for this gene, which includes a translation start codon that remains in the open reading frame and encodes for a protein 185 residues long, 43 less than AMAMU. Expression of this CDS resulted in the recombinant AmDODA protein, able to catalyze the synthesis of betalamic acid and muscaflavine from L-DOPA and D-DOPA. AmDODA has an approximate size of 22 kDa, with an optimum activity pH of 8.5 and a Michaelis constant (K_M) of 3.7 ± 0.9 mmol L⁻¹ and a maximum velocity (V_{max}) of 3.3 ± 0.4 μ mol min⁻¹ mg⁻¹. Its use was demonstrated in the chemoenzymatic synthesis of betalains-model with potential application as probes for confocal microscopy of two-photon fluorescence. In this context, this thesis explores the molecular, biochemical and biological aspects of the DODA of the fungus *A. muscaria* and brings important contributions about the pigmentation by betalains in nature.

Keywords: Dioxygenase, *Amanita muscaria*, phylogeny, enzyme kinetics, natural pigments.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 0-1. Alguns exemplos das classes de pigmentos vegetais mais abundantes.....	27
Figura 0-2. Filogenia das angiospermas e, em destaque, das Caryophyllales <i>core</i> , que incluem linhagens betalaínicas e antocianínicas	28
Figura 0-3. Exemplos de espécies de plantas Caryophyllales de interesse agrônômico e ornamental e de alguns fungos basidiomicetos que acumulam betalaínas.....	29
Figura 0-4. Esquema simplificado da biossíntese de betalaínas.....	31
Figura 0-5. Diagrama esquemático das rotas metabólicas que levam à biossíntese dos aminoácidos aromáticos, dentre eles fenilalanina e tirosina, precursores das vias de biossíntese de antocianinas e betalaínas, respectivamente	36
Figura 0-6. Via de biossíntese de betalaínas	38
Figura 0-7. Estruturas químicas dos intermediários da via de biossíntese de betalaínas.	40
Figura 0-8. Estruturas químicas das principais betalaínas encontradas em plantas	47
Figura 0-9. Esquema simplificado da via de biossíntese de antocianinas e outros flavonoides em plantas	62
Figura 1-1. Reações catalisadas por intradiol e extradiol dioxigenases.	88
Figura 1-2. Comparação das principais etapas catalíticas em reações catalisadas por extradiol e intradiol dioxigenases	90
Figura 1-3. Distribuição, em táxons, das sequências de aminoácidos de DODAs de fungos com identidade maior ou igual a 60% em relação à DODA de <i>A. muscaria</i> (AMAMU).....	97
Figura 1-4. Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos da DODA de <i>A. muscaria</i> (AMAMU) e dez sequências de DODAs com maior identidade à esta	99

Figura 1-5. Alinhamento de sequências de aminoácidos entre DODAs do fungo <i>A. muscaria</i> e de Caryophyllales betalaínicas representativas.....	101
Figura 1-6. Alinhamento de sequências de aminoácidos de DODAs do fungo <i>A. muscaria</i> (AMAMU), da bactéria <i>Escherichia coli</i> (EcoDODA) e de Caryophyllales betalaínicas representativas	104
Figura 1-7. <i>Heat map</i> gerado a partir da matriz de dissimilaridade baseada no perfil-HMM (<i>Hidden Markov Model</i>) após o alinhamento múltiplo de 537 sequências de DODAs obtidas a partir do banco de dados do NCBI.....	106
Figura 1-8. Árvore gerada a partir do alinhamento de 537 sequências de aminoácidos de DODAs de fungos, plantas e bactérias	108
Figura 1-9. Alinhamento das sequências de DODAs de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (bactéria, SmDODA α/β) com DODAs de <i>A. muscaria</i> (fungo, AMAMU) e <i>Beta vulgaris</i> (Caryophyllales, BvDODA1)	110
Figura 1-10. Identificação de resíduos conservados entre DODAs de bactérias, plantas não-Caryophyllales, Caryophyllales que acumulam antocianinas e Caryophyllales que acumulam betalaínas.....	113
Figura 1-11. <i>Bean plot</i> para os valores de Ct (<i>cycle threshold</i>) do gene <i>BvDODA2</i> e outros quatro genes envolvidos na biossíntese de betalaínas (<i>BvDODA1</i> , <i>CYP76AD1</i> , <i>CYP76AD6</i> e <i>BvMYBI</i>) a partir de análises de RT-qPCR.....	120
Figura 2-1. Gel de agarose após a separação eletroforética de produtos de amplificação da CDS de <i>dodA</i> a partir de amostras de cDNA do píleo colorido de quatro espécimes do fungo <i>A. muscaria</i>	141
Figura 2-2. Trecho do alinhamento entre as sequências publicadas para o gene <i>dodA</i> e seu RNA mensageiro (mRNA) e as sequências de quatro clones contendo os produtos de	

amplificação da CDS do gene <i>dodA</i> a partir de amostras de cDNA do píteo de <i>A. muscaria</i>	143
Figura 2-3. Trecho do alinhamento entre as sequências publicadas para o gene <i>dodA</i> e seu RNA mensageiro (mRNA) e as sequências de quatro clones contendo os produtos de amplificação da CDS do gene <i>dodA</i> a partir de amostras de cDNA do píteo de <i>A. muscaria</i> , ilustrando a remoção dos íntrons 2 e 3	144
Figura 2-4. Comparação da sequência de nucleotídeos publicada para o gene <i>dodA</i> de <i>A. muscaria</i> , que codifica para a enzima AMAMU, e da sequência proposta para AmDODA	146
Figura 2-5. Sequência de DNA para o gene <i>dodA</i> de <i>A. muscaria</i>	147
Figura 2-6. Gel SDS-PAGE da separação eletroforética de proteínas para verificar as condições de expressão da AmDODA recombinante.....	148
Figura 2-7. Gel SDS-PAGE para separação eletroforética das proteínas após a purificação da AmDODA recombinante pelos métodos Ni-NTA Agarose, Magne-His™ e Q-Sepharose.....	149
Figura 2-8. Purificação da AmDODA recombinante em resina Ni-NTA Agarose.....	150
Figura 2-9. Estudo da atividade da enzima AmDODA.....	152
Figura 2-10. Reações ocorrendo em paralelo e comprimentos de onda máximos aproximados dos produtos conforme medidas de HPLC-PDA e/ou espectrofotometria UV-Vis em água.	156
Figura 2-11. Reação de oxidação de L-DOPA por oxigênio na presença de AmDODA	157
Figura 2-12. Espectros de absorção da reação de oxidação de D- e L-DOPA por oxigênio na presença de AmDODA	158

Figura 2-13. Superfície acessível ao solvente (140 pm) e estrutura com resíduos de HIS e GLU explícitos conforme estrutura proposta pelo programa Phyre ²	159
Figura 2-14. Reação de oxidação da L-DOPA por oxigênio catalisada por AmDODA e semissíntese das betalaínas não-naturais	161
Figura 2-15. Semissíntese de três betalaínas cumarínicas e uma betalaína carboestiril através da reação de ácido betalâmico com aminas em acetato de etila na presença de ácido <i>p</i> -toluenossulfônico.....	163
Figura 2-16. (a) Cromatogramas de misturas dos produtos das semissínteses com ácido betalâmico obtido de suco de beterraba hidrolisado e pelo método químioenzimático; (b) espectros de absorção médio obtido no tempo de retenção nos quais a absorção em 520 nm era máxima; e espectros de fluorescência registrados empregando-se os padrões dos quatro compostos pela Dra. Ana Clara B. Rodrigues (Rodrigues, 2017).....	164
Figura 2-17. Microscopia confocal de contraste de interferência (DIC) e fluorescência de raízes íntegras de <i>Arabidopsis thaliana</i> incubadas com as sondas betalaínicas.....	167
Tabela 1. Principais espécies de plantas que produzem betalaínas	46
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados durante na amplificação dos genes de interesse por RT-qPCR.....	127

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

λ^{abs} :	Comprimento de onda de absorção máximo.
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básica (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>).
cDNA	Molécula de DNA complementar, sintetizada a partir do mRNA.
CDS	Região codificadora (<i>Coding Sequence</i>).
Ct	Número de ciclos necessários em uma reação de RT-qPCR para o início da amplificação da sequência gênica-alvo (<i>Cycle threshold</i>).
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DODA	DOPA extradiol dioxigenase.
(L/D)-DOPA	(L/D)-3,4-diidroxifenilalanina.
EC	Esquema de classificação numérica de enzimas (<i>Enzyme Commission Numbers</i>).
EROs	Espécies reativas oxidantes.
His-tag/6xHis-tag	Motivo de aminoácidos que consiste em 6 resíduos de histidina, geralmente adicionado à região C-terminal ou N-terminal da proteína recombinante.
HMM	Modelo oculto de Markov (<i>Hidden Markov Model</i>).
kDa	Kilodalton, quantidade equivalente a 1.000 unidades de massa atômica ou daltons (Da).
K_M	Constante de Michaelis.
mRNA	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro.
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica, EUA (<i>National Center for Biotechnology Information</i>).
ORF	Fase aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>).

pb	Pares de bases, em nucleotídeos.
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
RT-qPCR	PCR quantitativa da transcrição reversa em tempo real (<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR</i>).
V_{max}	Velocidade máxima da reação.

Lista de Enzimas

- AMAMU** DOPA 4,5-dioxigenase do fungo *Amanita muscaria*, EC: 1.14.99.-, UniProtKB: P87064.
- AhDODA** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase da planta Caryophyllales *Amaranthus hypocondriacus*, UniProtKB: K9JXA1.
- AtLigB** Dioxigenase de clivagem extradiol de anéis da planta *Arabidopsis thaliana*, EC: 1.13.11.-, UniProtKB: Q949R4.
- BgDODA** DOPA 4,5-dioxigenase da planta Caryophyllales *Bougainvillea glabra*, UniProtKB: B6F0W9.
- BmDODA1** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase 1 do inseto bicho-da-seda (*Bombyx mori*), Sequência de referência NCBI: MG882761.
- BvDODA1** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase 1 da planta Caryophyllales *Beta vulgaris*, EC: 1.13.11.29, UniProtKB: I3PFJ3.
- BvDODA2** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase 2 da planta Caryophyllales *Beta vulgaris*, UniProtKB: I3PFJ4.
- EcoDODA** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase da bactéria *Escherichia coli*, EC: 1.13.11.29, UniProtKB: P24197.
- MjDODA1** DOPA 4,5-dioxigenase 1 da planta Caryophyllales *Mirabilis jalapa*, UniProtKB: A0A0U1YJD2.

- MjDODA2** DOPA 4,5-dioxigenase 2 da planta Caryophyllales *Mirabilis jalapa*, UniProtKB: A0A0U1YJW3.
- PgDODA** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase da planta Caryophyllales *Portulaca grandiflora*, EC: 1.13.11.29, UniProtKB: Q7XA48.
- PpDODA** 4,5-extradiol dioxigenase da briófito *Physcomitrella patens*, UniProtKB: Q70FG8.
- SmDODA α** DOPA 4,5-dioxigenase da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, Sequência de referência NCBI: WP_080104355.
- SmDODA β** DOPA 4,5-extradiol dioxigenase da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, Sequência de referência NCBI: CRD61058.

Sumário

Prólogo	24
Aspectos gerais	25
Pigmentos naturais: importância histórica, biológica e econômica.....	25
Betalainas: estrutura e função.....	29
Biossíntese, catabolismo e regulação da via de biossíntese de betalainas.....	35
Betalainas e antocianinas não coexistem em plantas e fungos.....	57
Referências bibliográficas	67
Objetivos.....	85
Capítulo 1 - L-DOPA extradiol dioxigenases: Contextualização filogenética e funcional de variedades oriundas de diferentes linhagens evolutivas	86
1-1. Objetivos	94
1-2. Resultados e Discussão	95
1-2-1. <i>A DODA de Amanita muscaria é homóloga a de outros fungos Basidiomicetos e Ascomicetos</i>	95
1-2-2. <i>DODAs de Amanita muscaria e Caryophyllales apresentam convergência evolutiva</i>	100
1-2-3. <i>DODAs de Caryophyllales e da bactéria Escherichia coli compartilham a mesma origem evolutiva</i>	102
1-2-4. <i>Não há uma relação entre a sequência primária de DODAs e sua função</i>	105

1-2-5. <i>DODAs de Caryophyllales exibem um padrão de resíduos catalíticos conservado</i>	111
1-2-6. <i>Não há uma relação entre a expressão de transcritos de genes parálogos de DODA e a coloração em variedades de beterrabas amarelas e vermelhas</i>	119
1-3. Conclusões	123
1-4. Material e Métodos.....	125
1-4-1. <i>Análises in silico de DODAs de diferentes linhagens evolutivas</i>	125
1-4-2. <i>Análise da expressão de transcritos de BvDODA2 e de genes de betalainas em beterrabas amarelas e vermelhas</i>	126
1-5. Referências Bibliográficas	128
Capítulo 2 - L-DOPA extradiol dioxigenase de <i>Amanita muscaria</i> : Revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga, caracterização funcional e aplicação.....	136
2-1. Objetivos	139
2-2. Resultados e Discussão	140
2-2.1. <i>A revisão da sequência codificadora do gene dodA é necessária para a expressão da L-DOPA extradiol dioxigenase de Amanita muscaria</i>	140
2-2.2. <i>AmDODA pode ser utilizada para a síntese biotecnológica de ácido betalâmico e muscaflavina</i>	151
2-2.3. <i>AmDODA possui mais de um motivo His2Glu em sua estrutura</i>	158
2-2.4. <i>A síntese quimioenzimática de ácido betalâmico e muscaflavina pode ser explorada na obtenção de sondas para imagens de microscopia de fluorescência</i>	161

2-3. Conclusões	168
2-4. Material e Métodos.....	170
2-4.1. Clonagem da CDS de <i>dodA</i> e de <i>AmDODA</i>	170
2-4.2. Expressão e purificação de <i>AmDODA</i>	173
2-4.3. Ensaio de atividade enzimática de <i>AmDODA</i>	177
2-4.4. Síntese quimioenzimática de ácido betalâmico e sua aplicação em imagens de microscopia de fluorescência	177
2-5. Referências Bibliográficas	180
Considerações Finais	182
Anexo I.....	184
Anexo II.....	185
Súmula Curricular	187

Prólogo

Nesta Tese de Doutorado são descritos os resultados obtidos no estudo da enzima L-DOPA extradiol dioxigenase presente no fungo basidiomiceto agário-das-moscas (*Amanita muscaria*). A Tese é dividida em três partes, e se inicia com alguns **Aspectos Gerais** da bioquímica de L-DOPA extradiol dioxigenases (DODAs), incluindo seu papel na biossíntese de pigmentos naturais. No **Capítulo 1**, discute-se a versatilidade funcional de DODAs e seu papel na clivagem oxidativa de compostos aromáticos em fungos, bactérias e plantas. A DODA de *A. muscaria* é contextualizada filogeneticamente em relação às linhagens de DODA encontradas em outras espécies e a abundância de transcritos para os genes envolvidos na biossíntese de betalaínas em variedades amarelas e vermelhas de beterraba (*Beta vulgaris*) é comparada.

No **Capítulo 2**, as limitações encontradas na clonagem da região codificadora do gene *dodA* são discutidas e contornadas. A descoberta de uma nova CDS para este gene nos levou a uma enzima (AmDODA) com 43 resíduos de aminoácidos a menos do que a dioxigenase previamente descrita (AMAMU). AmDODA catalisa a oxidação de L-DOPA em 2,3- e 4,5-*seco*-DOPAs, permitindo a síntese quimioenzimática de betalaínas e higoaurinas. O potencial desta enzima no desenvolvimento de aplicações é demonstrado na síntese de uma sonda fluorescente para microscopia confocal de fluorescência por absorção de dois fótons em raízes de *Arabidopsis thaliana*. Por fim, algumas **Considerações Finais** destacam os principais resultados deste trabalho e apresentam as perspectivas que se originam deste estudo.

Aspectos gerais

Pigmentos naturais: importância histórica, biológica e econômica

Por definição, corantes e pigmentos são substâncias capazes de absorver luz na região visível do espectro eletromagnético (400-800 nm) (Hari *et al.*, 1994). Corantes são solúveis no meio que tingem, enquanto pigmentos são insolúveis (Gürses *et al.*, 2016). Apesar disso, produtos naturais coloridos são, em geral, identificados como *pigmentos* (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Paliwal *et al.*, 2016). Sob o ponto de vista físico, corantes e pigmentos contêm uma porção chamada de cromofórica, tipicamente um sistema insaturado contendo, ou não, substituintes com propriedades doadoras e/ou atraentes de elétrons chamados de grupos auxocrômicos (Hari *et al.*, 1994). Conforme o grau de insaturação do cromóforo e das propriedades eletrônicas dos grupos ligados a ele a energia necessária para promover a molécula ao seu estado eletronicamente excitado muda, o que se reflete na mudança do comprimento de onda da luz absorvida e, conseqüentemente, na cor da substância (Hari *et al.*, 1994).

A cor de um objeto é a interpretação cognitiva de um impulso elétrico originado no aparelho ocular (Hari *et al.*, 1994). Seres humanos são tricrômicos e seus fotorreceptores são adaptados para reconhecer as cores azul, verde e vermelho. Entretanto, dependendo da sensibilidade e resolução espectral dos seus fotorreceptores, outros animais podem visualizar, além de cores, padrões de contraste nas regiões do ultravioleta (UV) ou infravermelho próximos. Assim, a pigmentação das estruturas

reprodutivas das plantas exerce um papel biológico relevante na atração de polinizadores (Davies *et al.*, 2012).

Nas angiospermas, pigmentos são acumulados em diversos tecidos, incluindo folhas, flores, frutos e raízes, e suas funções biológicas vão muito além da beleza conferida por suas cores e no seu papel na atração de polinizadores e dispersores de sementes. Pigmentos protegem as plantas contra estresses bióticos e abióticos como, por exemplo, o ataque de fitopatógenos, a presença de metais pesados no solo e o excesso de luz (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Brockington *et al.*, 2011; Paliwal *et al.*, 2016).

Antocianinas, betalainas, carotenoides e clorofilas são as quatro principais classes de pigmentos vegetais. Em conjunto, estes compostos compõe uma paleta de cores que preenche quase todo o espectro visível (**Figura 0-1**). Clorofilas são derivados de tetrapirróis que se acumulam nos cloroplastos e cuja função é absorver fótons e convertê-los em elétrons que serão usados em outras etapas da fotossíntese. Carotenóides formam complexos com clorofilas e protegem o aparelho fotossintetizante de processos deletérios fotoinduzidos (Paliwal *et al.*, 2016). Antocianinas e betalainas são pigmentos vacuolares com função biológica, distribuição em tecidos vegetativos e reprodutivos e cores similares, mas que nunca são encontrados juntos *in vivo* (Tanaka *et al.*, 2008). Embora antocianinas pigmentem 90% das angiospermas (Du *et al.*, 2018), a maior parte das plantas Caryophyllales são pigmentadas por betalainas (**Figura 0-2**). Contudo, a ausência de betalainas e presença de antocianinas em algumas famílias de Caryophyllales, como a Caryophyllaceae e e Molluginaceae, é uma evidência que suporta exclusividade mútua destes pigmentos em plantas (Clement & Mabry, 1996). Os próximos itens desta seção discutem as funções biológicas e a biossíntese de betalainas, bem como a sua ocorrência em plantas e fungos.

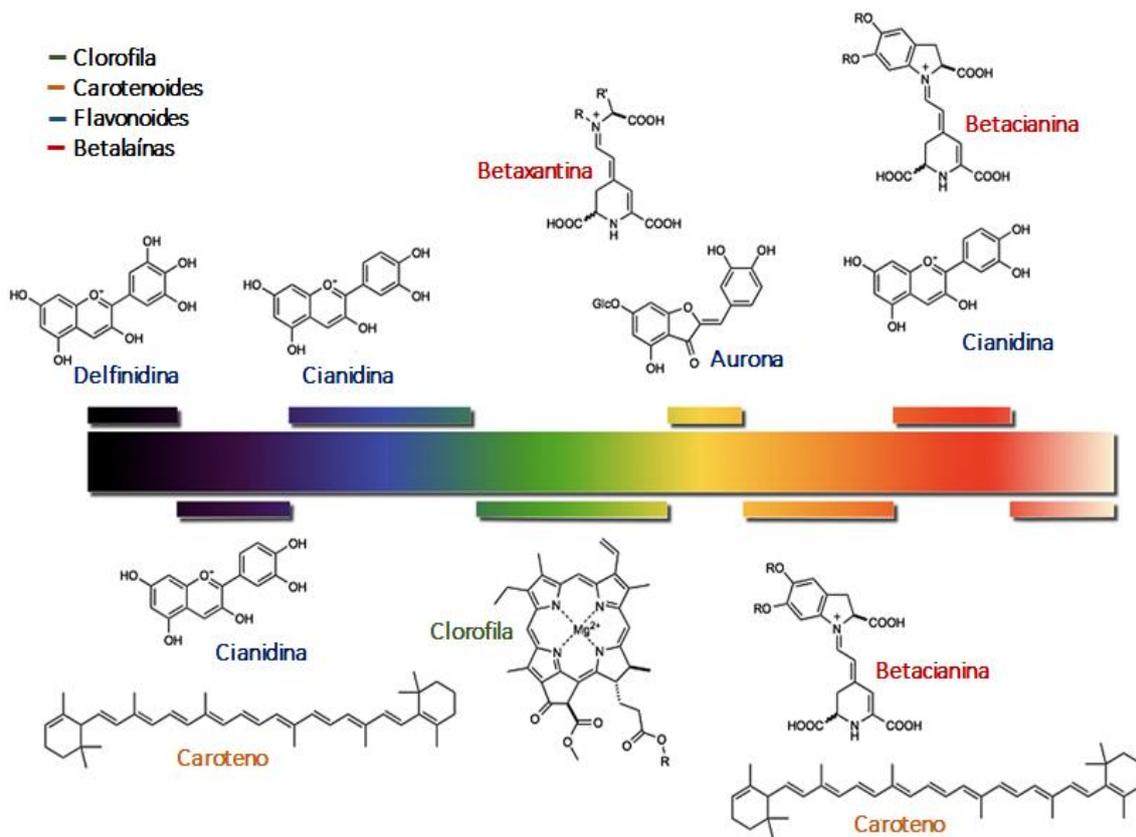


Figura 0-1. Alguns exemplos das classes de pigmentos vegetais mais abundantes: clorofila, carotenoides, flavonoides e betalainas. Dentre os flavonoides, delfinidina e cianidina são exemplos de antocianinas.

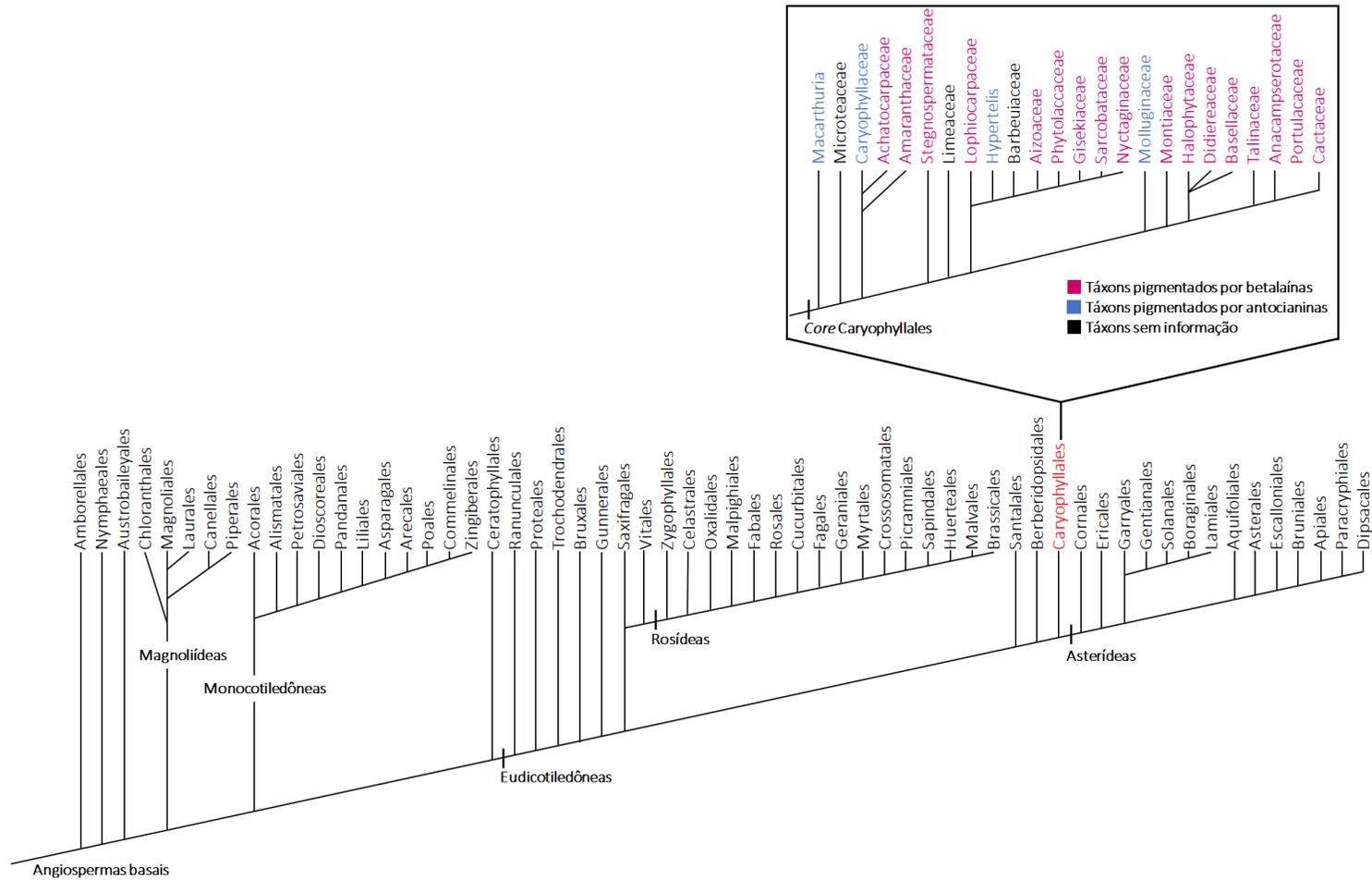


Figura 0-2. Filogenia das angiospermas e, em destaque, das Caryophyllales core, que incluem linhagens betaínaicas (táxons em rosa) e antocianínicas (táxons em azul). A filogenia apresentada foi obtida a partir do *Angiosperm Phylogeny Website* versão 14 (Stevens, 2001) e as informações sobre a pigmentação dos táxons foram obtidas a partir do trabalho de Brockington *et al.*, (2015).

Betalainas: estrutura e função

Betalainas são pigmentos hidrossolúveis derivados do metabolismo da L-tirosina e cuja coloração varia do amarelo ao violeta. Plantas Caryophyllales com interesse agrônômico e ornamental, como a beterraba (*Beta vulgaris*), o amaranto (*Amaranthus spp.*), a maravilha (*Mirabilis japa*), a onze-horas (*Portulaca grandiflora*), a Bougainvillea (*Bougainvillea spp.*) e a opúncia (*Opuntia ficus-indica*) são pigmentadas por betalainas (Figura 0-3). A pigmentação por betalainas também é observada no píleo de alguns fungos basidiomicetos dos gêneros *Amanita*, *Hygrocybe* e *Hygrophorus*, dentre eles o cogumelo psicodélico agário-das-moscas (*Amanita muscaria*), reconhecido pelo seu notável píleo vermelho com pontos brancos (Terradas & Wyler, 1991b; Babos *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2015) (Figura 0-3).

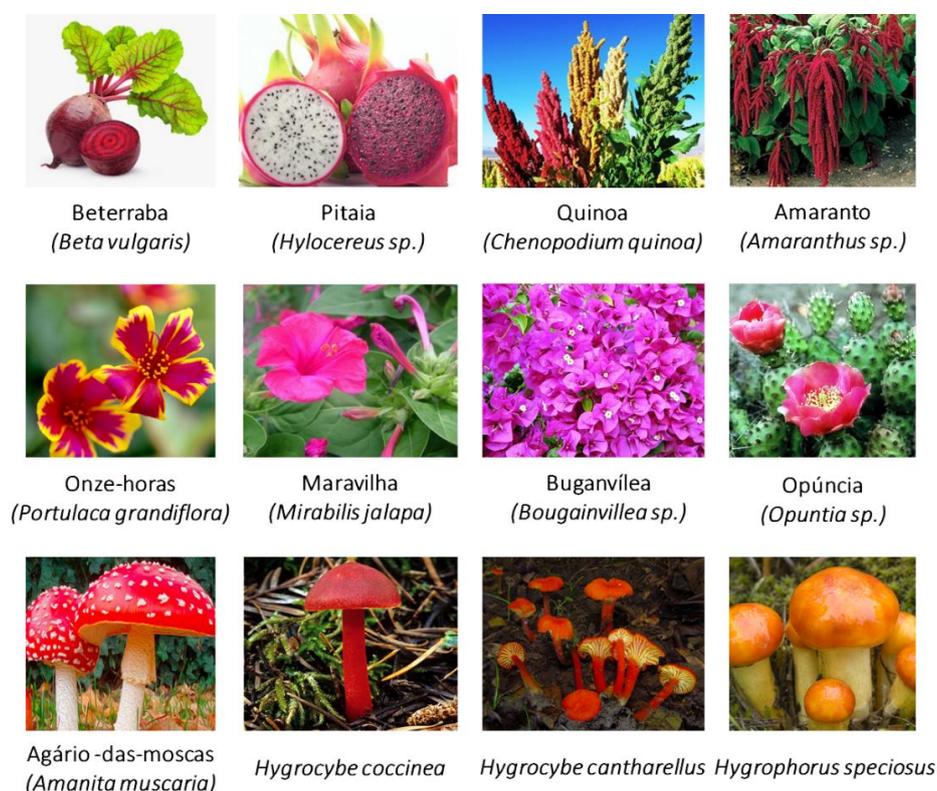


Figura 0-3. Exemplos de espécies de plantas Caryophyllales de interesse agrônômico e ornamental e de alguns fungos basidiomicetos que acumulam betalainas. Todas as imagens

foram utilizadas apenas para fins de ilustração e foram obtidas a partir do mecanismo de busca *Google Images* (2018).

As betalaínas são o produto do acoplamento entre o ácido betalâmico e aminas ou aminoácidos e, dependendo de sua estrutura, betalaínas são classificadas em betaxantinas e betacianinas (**Figura 0-4**). Betacianinas tem cor vermelho-violáceo e comprimento de onda de absorção máximo (λ^{abs}) ao redor de 540 nm. Sua biossíntese é o resultado de um processo convergente que inclui um acoplamento aldimínico espontâneo entre a *ciclo*-3,4-diidroxifenilalanina (*ciclo*-DOPA) e o ácido betalâmico, ambos produtos de oxidação da L-DOPA (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013a). Betacianinas podem ser glicosiladas ou não, sendo a betanina (betanidina-5-*O*-glicosídeo) o exemplo mais conhecido desta classe. Betaxantinas são o resultado do acoplamento entre o ácido betalâmico e outros aminoácidos e aminas. Sua cor amarela relaciona-se com um λ^{abs} em torno de 480 nm (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013a). Betaxantinas são fracamente fluorescentes, fenômeno não observado em betacianinas. Como resultado, algumas flores pigmentadas por betaxantinas são fluorescentes (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013a). Esse fenômeno ainda não é bem entendido, mas o baixo rendimento quântico de fluorescência das betalaínas sugere que dificilmente esta propriedade seria útil para polinização (Iriel & Lagorio, 2010; Lagorio *et al.*, 2015).

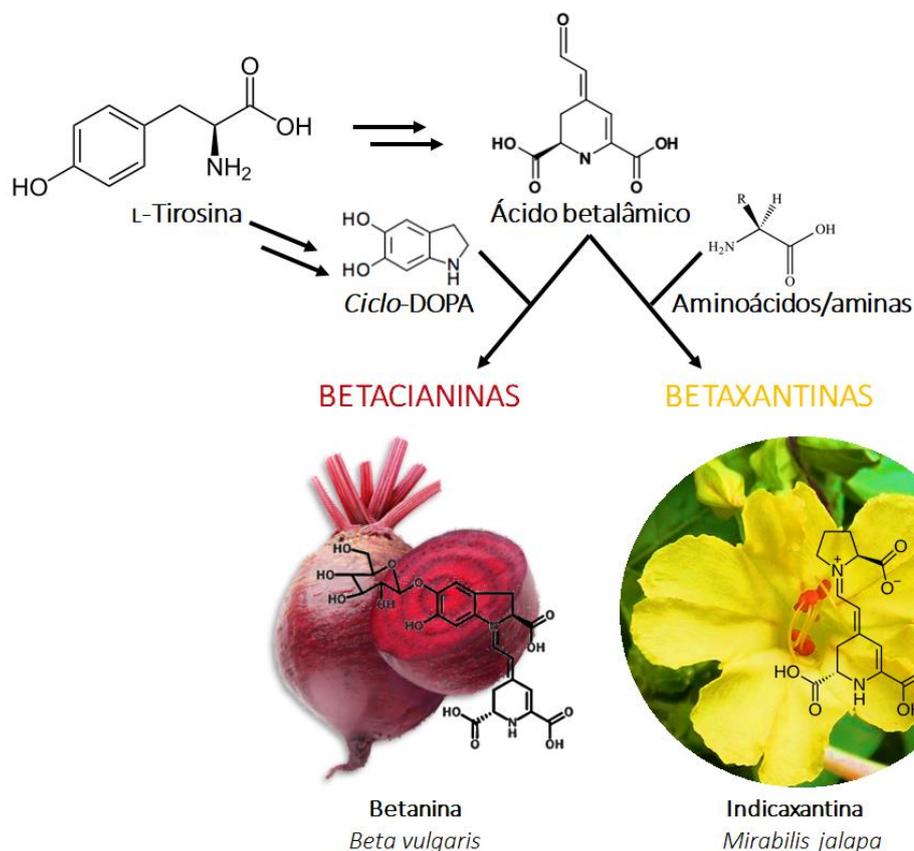


Figura 0-4. Esquema simplificado da biossíntese de betalainas. O ácido betalâmico, gerado a partir do metabolismo de L-tirosina, pode ser acoplado, espontaneamente, à ciclo-DOPA, também formada a partir de L-tirosina, e dar origem às betacianinas, de cor vermelha. Já o acoplamento entre o ácido betalâmico e aminoácidos ou aminas resulta nas betaxantinas, de cor amarela. As imagens ilustram a betanina, uma betacianina majoritária encontrada em beterrabas vermelhas (*Beta vulgaris*), e a indicaxantina, uma betaxantina abundante em pétalas de maravilha (*Mirabilis jalapa*). As imagens foram utilizadas apenas para fins de ilustração e foram obtidas a partir do mecanismo de busca *Google Images* (2018).

As betalainas exibem um papel fotoprotetor e antioxidante por absorverem o excesso de luz incidente no aparelho fotossintético e sequestrarem as espécies reativas oxidantes (EROs) (Jain *et al.*, 2015). Estas características, e o fato de serem compostos iônicos, permitem que as betalainas atuem na defesa de plantas contra os danos causados pela exposição à luz UV (Klein *et al.*, 2018), peróxido de hidrogênio (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004), cobre (Cu^{2+}) (Morales *et al.*, 2012), estresse salino (Casique-Arroyo *et al.*, 2014; Jain & Gould, 2015b; Jain *et al.*, 2015), estresse hídrico (Casique-Arroyo *et al.*,

2014), ferimento mecânico (Casique-Arroyo *et al.*, 2014), herbivoria (Casique-Arroyo *et al.*, 2014) e infiltração com bactérias, como *Pseudomonas syringae* e *Agrobacterium tumefaciens* (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004).

Por serem notáveis antioxidantes, betalaínas podem proteger lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) contra modificações oxidativas (Tesoriere *et al.*, 2006; Allegra *et al.*, 2007), evitar a oxidação de lipídeos e da hemoglobina em pacientes portadores de β -talassemia (Tesoriere *et al.*, 2006), além de evitar a liberação de citocininas pró-inflamatórias e a formação de EROs, com potencial para modular os processos redox na doença inflamatória intestinal crônica (Tesoriere *et al.*, 2014). Betalaínas também podem inibir o crescimento e a proliferação de linhagens de tumores humanos (Reddy *et al.*, 2005; Sreekanth *et al.*, 2007; Kapadia *et al.*, 2011) e o seu consumo na dieta parece inibir a formação de tumores *in vivo* em camundongos (Lu *et al.*, 2009; Lechner *et al.*, 2010).

Devido às suas propriedades antioxidantes e benéficas à saúde humana, além de serem estáveis numa ampla faixa de pH (entre 3 e 7), as betalaínas têm um grande potencial de serem utilizadas como uma alternativa aos corantes sintéticos empregados nas indústrias alimentícia e cosmética, sobretudo em laticínios e alimentos com baixa acidez, onde as antocianinas não são estáveis (Stintzing & Carle, 2004).

As principais fontes comerciais de betalaínas são os pós e os concentrados de extratos de beterraba (*Beta vulgaris*) e de opúncia (*Opuntia ficus-indica*), os quais também podem ser obtidos a partir de sistemas biotecnológicos *in vitro*, como o cultivo de raízes transformadas de beterrabas (Georgiev *et al.*, 2008). Diversos fatores químicos, físicos e biológicos capazes de aumentar o acúmulo de betalaínas em plantas, denominados elicitores, têm sido identificados, dentre eles a temperatura, oxigênio, sonicação, pH e suplementação com ácido salicílico, quitosana, pululano e extrato do fungo *Penicillium notatum*, os quais podem ser explorados para otimizar a sua produção

biotecnológica (Thimmaraju *et al.*, 2003; Savitha *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2016). Além disso, a identificação desses elicitores pode ser relevante na produção de alimentos biofortificados com betalaínas, de grande interesse devido às propriedades benéficas desses pigmentos à saúde humana, como já demonstrado no cultivo hidropônico de espinafre suplementado com sacarose, cujos níveis de betalaínas são aumentados (Watanabe *et al.*, 2018).

Recentemente, novas fontes que podem ser exploradas para a produção biotecnológica de betalaínas têm sido descobertas, como o fungo *Penicillium novae-zelandiae* que, quando cultivado sob agitação não produz betalaínas, mas quando cultivado em condições fermentativas suplementado com palha de milho é capaz de sintetizar altas concentrações deste pigmento (Wang *et al.*, 2018).

O fato de betalaínas responderem aos mesmos sinais bióticos e abióticos que regulam a produção de antocianinas, compartilhar padrões de acúmulo similares em tecidos vegetativos e reprodutivos, bem como o seu papel antioxidante e benéfico à saúde humana, fez com que esses pigmentos fossem chamados, inicialmente, de “antocianinas nitrogenadas”, em alusão à uma possível homologia funcional com a pigmentação por antocianinas em plantas (Hatlestad & Lloyd, 2015). Essa ideia é suportada pela aparente exclusividade mútua na ocorrência de antocianinas e betalaínas na natureza, isto é, não se conhece, até o momento nenhuma linhagem de plantas que acumule ambos os tipos de pigmentos (Clement & Mabry, 1996). Esse fenômeno tem despertado a curiosidade de diversos cientistas, cujas contribuições para a compreensão da evolução desses pigmentos na natureza serão discutidas em detalhes posteriormente.

Por outro lado, o fato das betalaínas serem pigmentos restritos às Caryophyllales, reconhecidas por sua grande adaptação morfológica e fisiológica, associado a evidências de seleção positiva nos genes relacionados à produção de betalaínas em linhagens de

Caryophyllales, sugere que esta classe de pigmentos pode conferir vantagens adaptativas aos organismos que a produzem (Brockington *et al.*, 2015). Apesar da relevância funcional de betalaínas e antocianinas ser amplamente discutida em plantas (Jain & Gould, 2015a), a significância biológica da pigmentação por betalaínas em fungos permanece não explorada, o que é essencial para a compreensão da evolução desses pigmentos na natureza.

Biossíntese, catabolismo e regulação da via de biossíntese de betalaínas

Betalaínas são pigmentos nitrogenados derivados da L-tirosina, um aminoácido essencial requerido na síntese de proteínas em todos os organismos, sendo sintetizado *de novo* apenas em fungos, plantas e bactérias; enquanto animais precisam consumir tirosina ou fenilalanina (que pode ser hidroxilado à tirosina) na dieta (Lopez-Nieves *et al.*, 2018). A biossíntese de tirosina, assim como a dos aminoácidos aromáticos triptofano e fenilalanina, ocorre a partir do produto final da via do ácido chiquímico: o corismato, o qual pode ser convertido em antranilato e, em seguida, originar o aminoácido triptofano, ou pode produzir prefenato pela atividade enzimática da corismato mutase (**Figura 0-5**) (Maeda & Dudareva, 2012). Na maioria das bactérias e fungos, prefenato pode ser descarboxilado oxidativamente à 4-hidróxi-fenilpiruvato, em uma reação catalisada pela prefenato desidrogenase (PDH), e, em seguida, ser transaminado à tirosina; enquanto em plantas, prefenato é transaminado inicialmente à arogenato e, em seguida, descarboxilado à tirosina pela arogenato desidrogenase (ADH), ambas as reações ocorrendo nos plastídeos (**Figura 0-5**) (Maeda & Dudareva, 2012).

A biossíntese de tirosina é altamente regulada nas enzimas PDH e ADH, as quais são fortemente inibidas por retroalimentação negativa pela própria tirosina (**Figura 0-5**) (Lopez-Nieves *et al.*, 2018). Uma vez que tanto prefenato quanto arogenato podem ser convertidos em L-fenilalanina, o aminoácido precursor da via de biossíntese de antocianinas, acredita-se que este mecanismo regulatório possa controlar o fluxo de carbono entre essas duas vias: a de betalaínas, pela disponibilidade de L-tirosina, e a de antocianinas, pela disponibilidade de L-fenilalanina (Lopez-Nieves *et al.*, 2018).

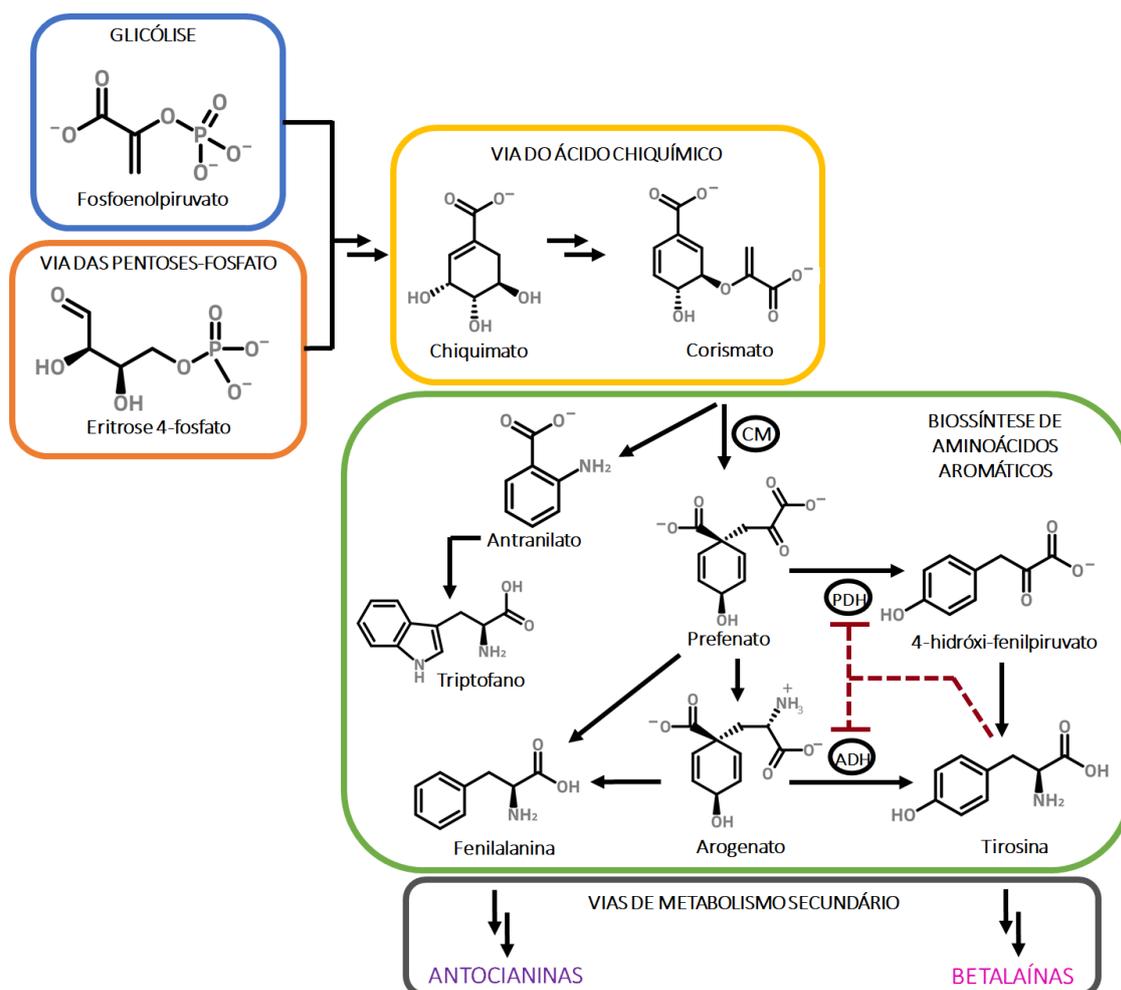


Figura 0-5. Diagrama esquemático das rotas metabólicas que levam à biossíntese dos aminoácidos aromáticos, dentre eles fenilalanina e tirosina, precursores das vias de biossíntese de antocianinas e betalainas, respectivamente. CM, corismato mutase; PDH, prefenato desidrogenase e ADH, arogenato desidrogenase. A linha pontilhada representa a regulação negativa da atividade de ADH e PDH por tirosina.

Recentemente, duas ADHs envolvidas na biossíntese de tirosina foram identificadas em beterrabas (*Beta vulgaris*), a qual produz altas concentrações de betalainas: a variante BvADH β , também encontrada em outras plantas, que sofre regulação negativa por tirosina; e uma enzima ADH variante, denominada ADH α , que apresenta uma reduzida sensibilidade à inibição por tirosina, resultando em um alto acúmulo de L-tirosina e, conseqüentemente, de betalainas (Lopez-Nieves *et al.*, 2018). As evidências encontradas por análises filogenéticas e caracterização das reações por meio

da obtenção de enzimas recombinantes sugerem que as enzimas ADH α surgiram durante a evolução da pigmentação por betalaínas e foram perdidas ou silenciadas em táxons antocianínicos de Caryophyllales, o que pode ter contribuído para a evolução da pigmentação por betalaínas em plantas (Lopez-Nieves *et al.*, 2018).

A primeira etapa da via de biossíntese de betalaínas consiste na hidroxilação de L-tirosina à 3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) e sua oxidação à dopaquinona (**Figura 0-6 e Figura 0-7**), ambas catalisadas por enzimas com atividade de tirosinase ou tirosina hidroxilase pertencentes ao grupo das polifenol oxidases (PPOs) (Steiner *et al.*, 1999). Em humanos, L-DOPA está envolvida na síntese de neuromelanina em neurônios dopaminérgicos da substância nigra do mesencéfalo responsável pela produção de dopamina e outros neurotransmissores catecolamínicos (Haavik, 2002; Hornykiewicz, 2010; Schwinn, 2016). Dopaquinona, por sua vez, pode ser ciclizada espontaneamente em *leuco*-DOPA-cromo (*ciclo*-DOPA), cuja polimerização resulta na formação de melanina em bactérias, fungos, plantas e animais (Lerner & Fritzpatrick, 1950; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Van Gelder *et al.*, 1997).

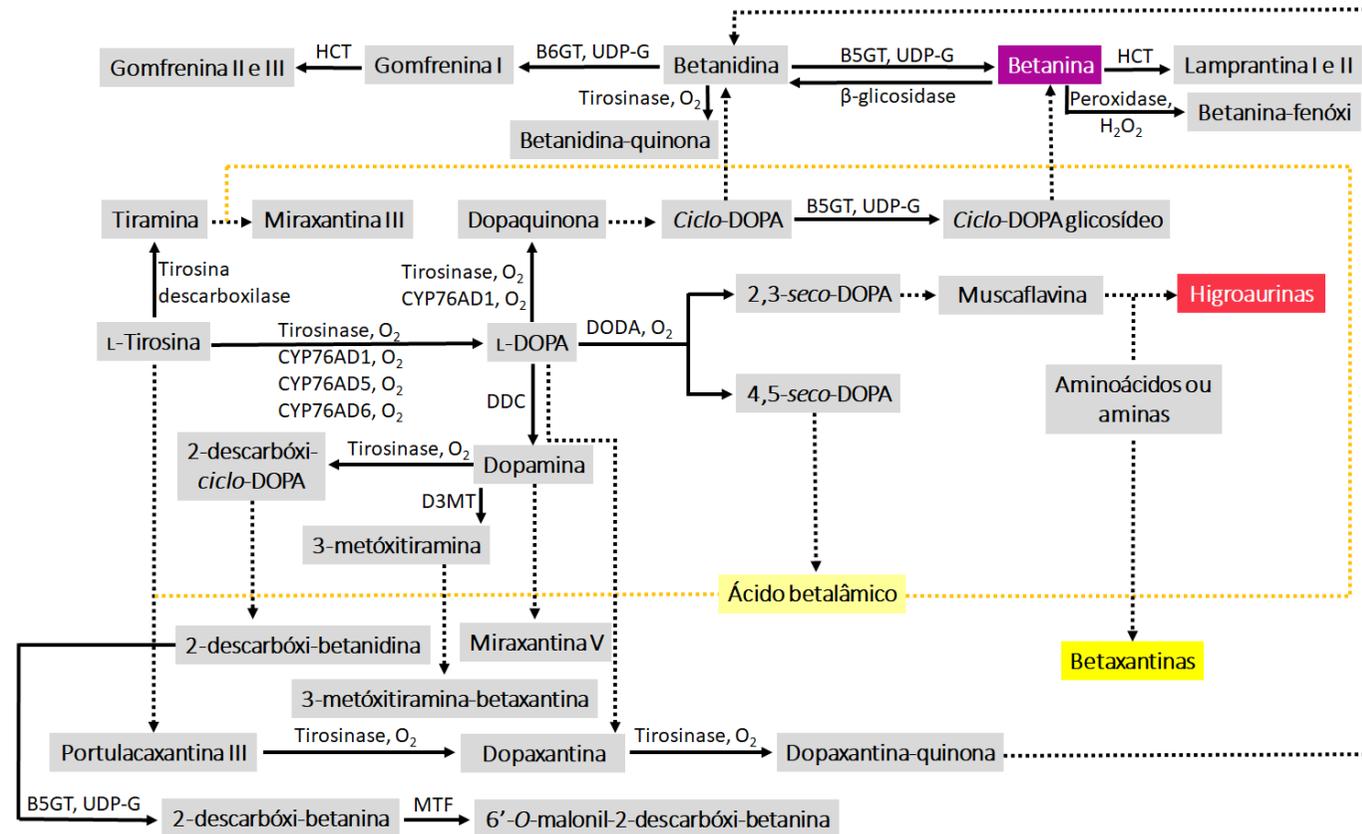
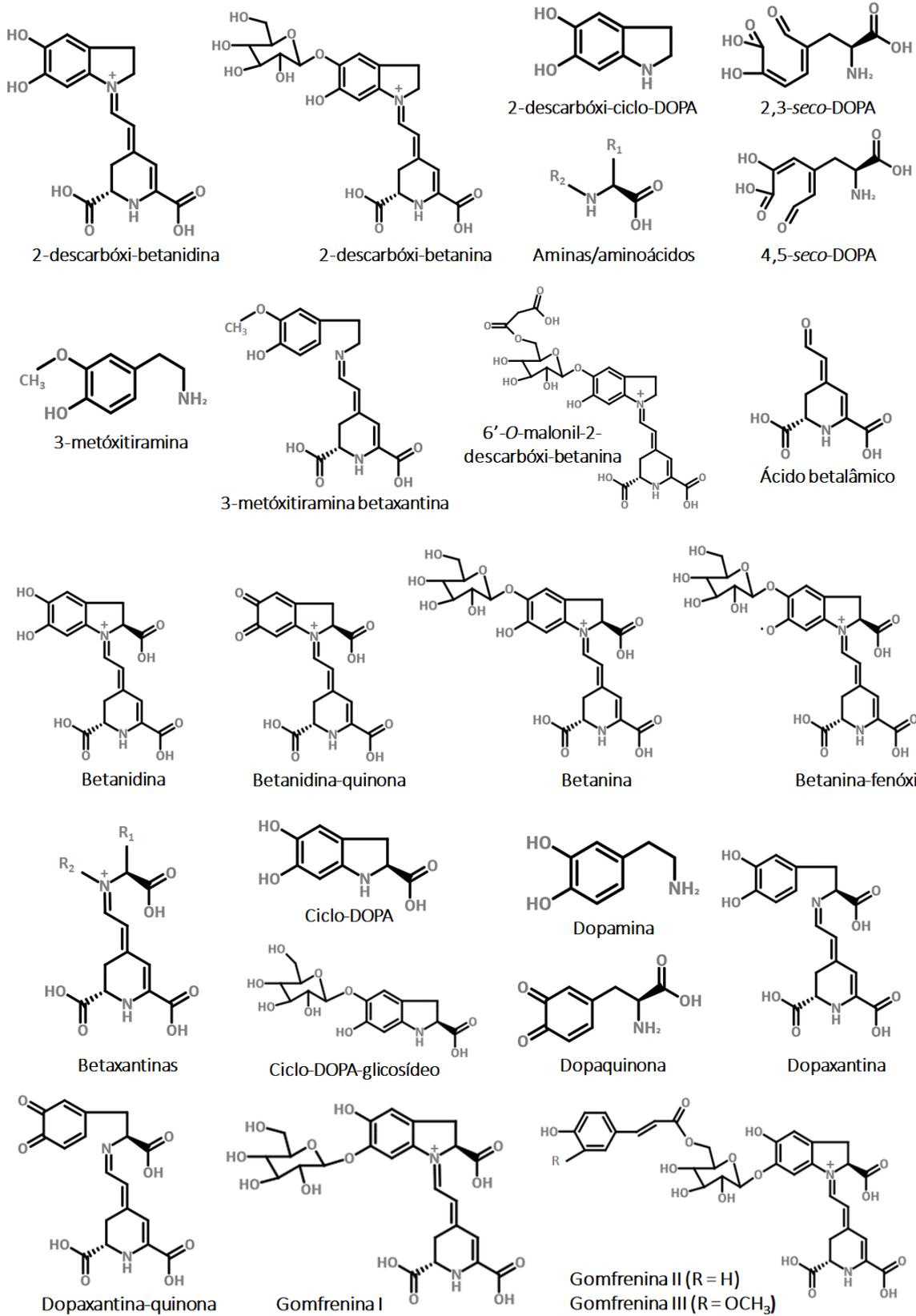


Figura 0-6. Via de biossíntese de betalainas. Etapas enzimáticas são representadas por setas preenchidas com a sigla ou nome da enzima, enquanto setas pontilhadas indicam as etapas espontâneas. O cruzamento das setas simboliza a formação de produtos. CYP76AD(1,5,6): enzimas do citocromo P450 caracterizadas em beterrabas (*Beta vulgaris*); DODA: L-DOPA extradiol dioxigenase; cDOPA5GT: *Ciclo-DOPA* 5-*O*-glicosiltransferase; B5GT: Betanidina 5-*O*-glicosiltransferase; B6GT: Betanidina 6-*O*-glicosiltransferase; HCT: Hidroxicinamoiltransferase; DDC: DOPA descarboxilase; D3MT: Dopamina 3-*O*-metiltransferase; MTF: Maloniltransferase; UDP-G: Uridina difosfato glicose. (Mueller *et al.*, 1997a; Strack *et al.*, 2003; Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013a).



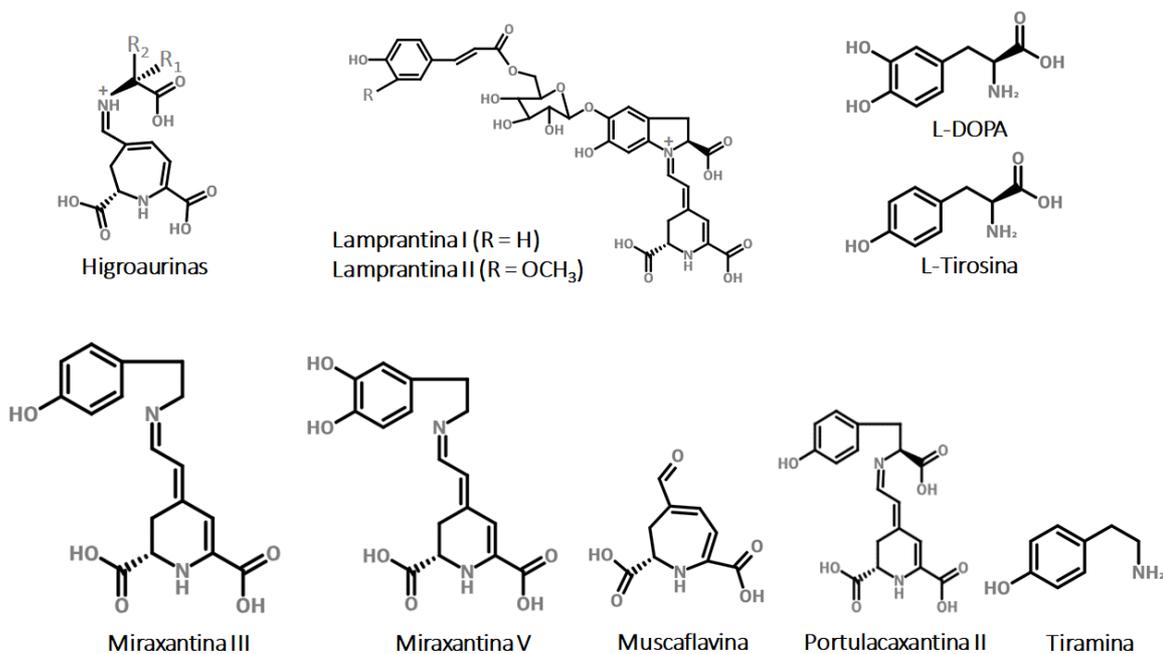


Figura 0-7. Estruturas químicas dos intermediários da via de biossíntese de betalainas.

O mecanismo catalítico das PPOs, as quais contêm cobre como grupo prostético, envolve a utilização de oxigênio molecular para catalisar a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenóis (atividade de monofenolase) e a oxidação de *o*-difenóis a *o*-quinonas (atividade de difenolase) (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Diversas tirosinases pertencentes ao grupo de PPOs têm sido identificadas e caracterizadas em bactérias (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006; Shuster & Fishman, 2009; El-Naggar & El-Ewasy, 2017) e em fungos (Sato *et al.*, 2009; Van Gelder *et al.*, 1997; Weijn *et al.*, 2012). Devido à sua capacidade de reagir com fenóis e poder ser explorada no desenvolvimento de biossensores, biocatalisadores e na produção biotecnológica de L-DOPA, utilizada no tratamento da doença de Parkinson, diversos métodos para a expressão recombinante de tirosinases têm sido desenvolvidos (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2013).

A participação de uma única enzima PPO com atividade de tirosinase ou tirosina hidroxilase na catálise das reações de formação de L-DOPA e dopaquinona foi sugerida

a partir de diversos estudos realizados nas plantas Caryophyllales erva-tintureira (*P. americana*) (Joy *et al.*, 1995), onze-horas (*P. grandiflora*) (Steiner *et al.*, 1996, 1999; Yamamoto *et al.*, 2001), beterraba (*B. vulgaris*) (Steiner *et al.*, 1999) e também no fungo basidiomiceto *A. muscaria* (Mueller *et al.*, 1996), onde sua atividade enzimática aparenta ter uma correlação positiva com o acúmulo de betalainas. Entretanto, foi observado que algumas linhagens de Caryophyllales que sintetizam apenas betalainas amarelas (betaxantinas) falham em produzir *ciclo*-DOPA, requerida para a síntese de betalainas vermelhas (betacianinas) (Hatlestad *et al.*, 2012). Isso indica, portanto, que a hidroxilação de L-tirosina à L-DOPA ocorre normalmente nesses organismos, enquanto a oxidação de L-DOPA à dopaquinona, a qual é ciclizada à *ciclo*-DOPA, é comprometida, o que sugere o envolvimento de enzimas diferentes na catálise dessas reações.

Ao explorar o *locus R* de beterrabas (*B. vulgaris*), previamente associado à ocorrência de beterrabas vermelhas e amarelas (Keller, 1936), Hatlestad e coautores (2012) observaram que o mesmo codifica para uma enzima do citocromo P450, CYP76AD1, capaz de catalisar tanto a hidroxilação de L-tirosina à L-DOPA quanto a oxidação de L-DOPA à dopaquinona (Hatlestad *et al.*, 2012). Porém, em beterrabas amarelas, o *locus R* apresenta uma inserção de 5 pb (TAAAT) localizada a 325 pb antes do códon de término da tradução, a qual altera a fase aberta de leitura (ORF) e substitui 108 aminoácidos nativos por 27 novos resíduos, seguido de um códon de término prematuro, o que resulta na deleção do sítio de ligação ao anel heme e, portanto, em uma enzima CYP76AD1 não-funcional (Hatlestad *et al.*, 2012). Recentemente, foi demonstrado que as enzimas do citocromo P450 CYP76AD6 (Polturak *et al.*, 2015) e CYP76AD5 (Sunnadeniya *et al.*, 2016), assim como CYP76AD1, são redundantes para a catálise da reação de hidroxilação da L-tirosina à L-DOPA, enquanto a reação de

oxidação de L-DOPA à dopaquinona é catalisada exclusivamente por CYP76AD1, o que explicaria a ausência de betacianinas e a síntese apenas de betaxantinas em beterrabas amarelas. Homólogos de enzimas do citocromo P450 envolvidas na biossíntese de betalainas também foram encontrados na Caryophyllales maravilha (*Mirabilis jalapa*), onde CYP76AD3 apresenta atividade similar à CYP76AD1 de beterrabas (Suzuki *et al.*, 2013; Sunnadeniya *et al.*, 2016), enquanto CYP76AD15 é funcionalmente homóloga às CYP76AD5/6 (Sunnadeniya *et al.*, 2016).

A clivagem oxidativa do anel de L-DOPA e sua subsequente ciclização em ácido betalâmico, o precursor de todas as betalainas, é reconhecida como a etapa-chave na biossíntese dessa classe de pigmentos naturais desde 1972, embora as enzimas relacionadas à essa catálise não fossem conhecidas na época (Fischer & Dreiding, 1972). Em 1991, Terradas & Wyler isolaram pela primeira vez a enzima L-DOPA 2,3/4,5-extradiol dioxigenase (DODA), capaz de catalisar clivagens oxidativas entre as posições 2,3 e 4,5-extradiol do anel aromático de L-DOPA, a partir do fungo basidiomiceto *Amanita muscaria* (Terradas & Wyler, 1991a). A catálise enzimática realizada pela DODA promíscua de *A. muscaria* resulta na formação dos intermediários instáveis 2,3- e 4,5-*seco*-DOPA, os quais sofrem rearranjos intramoleculares espontâneos produzindo, respectivamente, os isômeros muscaflavina e ácido betalâmico (Terradas & Wyler, 1991; Mueller *et al.*, 1997a). O acoplamento espontâneo entre a muscaflavina e aminas ou aminoácidos resulta na biossíntese de higoaurinas, uma classe de pigmentos de ocorrência aparentemente restrita a fungos, enquanto o ácido betalâmico é utilizado como o cromóforo precursor de todas as betalainas (Mueller *et al.*, 1997a). A produção de anticorpos contra a enzima nativa possibilitou isolar clones de cDNA de *A. muscaria*, o

que resultou, anos depois, na caracterização do gene *dodA* e na expressão da enzima recombinante (Hinz *et al.*, 1997).

Desde então, diversas DODAs têm sido identificadas e caracterizadas em linhagens betalaínicas de Caryophyllales, como nas flores onze-horas (*Portulaca grandiflora*) (Christinet *et al.*, 2004), maravilha (*Mirabilis jalapa*) (Sasaki *et al.*, 2009) e em beterrabas (*Beta vulgaris*) (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2012). Ao contrário da DODA promíscua de *A. muscaria*, essas enzimas catalisam apenas clivagens extradiol entre as posições 4,5 do anel aromático de L-DOPA, resultando apenas na formação de ácido betalâmico e, conseqüentemente, de betalaínas (Christinet *et al.*, 2004). Por outro lado, foi demonstrado recentemente que o gene *ygiD* da proteobactéria *Escherichia coli* codifica para uma DODA com promiscuidade catalítica capaz de catalisar a síntese de betalaínas e higroaurinas (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013b), sendo, portanto, funcionalmente homóloga à DODA do fungo *A. muscaria*. Entretanto, não há registros na literatura que explorem as relações evolutivas e funcionais entre DODAs de plantas, fungos e bactérias.

O ácido betalâmico, produto da reação catalisada pela DODA, é utilizado na síntese de ambas as classes de betalaínas: as betaxantinas, de cor amarela/laranja e com propriedades fluorescentes, e as betacianinas, de cor vermelha/violeta. A síntese de betaxantinas envolve um acoplamento aldimínico entre o ácido betalâmico e aminas ou aminoácidos. Um estudo realizado com a suplementação de ácido betalâmico em plantas de feijão-fava (*Vicia faba* L.), conhecidas por acumularem altos níveis de L-DOPA mas não sintetizarem betaxantinas, resultou na formação de dopaxantinas, o que sugere que o acoplamento entre o ácido betalâmico e aminas ou aminoácidos é espontâneo e não requer a participação de enzimas (Schliemann *et al.*, 1999).

A síntese de betacianinas também envolve um acoplamento espontâneo, o qual ocorre entre o ácido betalâmico e derivados de L-DOPA, levando à formação da aglicona betanidina, o intermediário-chave das betacianinas. Duas possibilidades têm sido sugeridas para esta etapa: a primeira delas, envolve o acoplamento de ácido betalâmico diretamente com *ciclo*-DOPA, originando betanidina, a qual é glicosilada à betanina pela enzima Betanidina 5-*O*-glicosiltransferase (B5GT) (Vogt *et al.*, 1997, 1999a; Grimm, *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2013); enquanto a outra consiste na condensação entre o ácido betalâmico e *ciclo*-DOPA glicosídeo, gerado a partir da glicosilação de *ciclo*-DOPA pela enzima *Ciclo*-DOPA 5-*O*-glicosiltransferase (cDOPA5GT) (Sasaki *et al.* 2005b), resultando na síntese de betanina, cuja reversão à betanidina é possível pela atividade catalítica da enzima β -glicosidase (Zakharova & Petrova, 2000). A caracterização de enzimas envolvidas na glicosilação de betanidinas (Vogt *et al.*, 1997, 1999a; Grimm, *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2013), bem como o acúmulo de *ciclo*-DOPA glicosídeo em beterrabas (Wyler *et al.*, 1984) estão entre as evidências que suportam a ocorrência de ambas as reações na formação de betacianinas, embora a discussão sobre qual delas seria predominante ainda seja bastante controversa (Tanaka *et al.*, 2008).

Gandía-Herrero e coautores (2005) demonstraram que a síntese de betacianinas também pode ser explicada pela utilização da betaxantina de tirosina (portulacaxantina II) e de dopaxantina como substratos pela tirosinase. Esta enzima poderia catalisar a conversão de portulacaxantina II em dopaxantina (atividade de monofenolase) e de dopaxantina em dopaxantina-quinona (atividade de difenolase), a qual pode sofrer uma ciclização espontânea e originar betanidina (Gandía-Herrero *et al.*, 2005).

De forma similar ao que ocorre em antocianinas, betalainas podem ser modificadas, em geral, pela glicosilação ou acilação de *ciclo*-DOPA, *ciclo*-DOPA

glicosídeo ou betanidina e a etapa na qual essas modificações ocorrem durante a biossíntese de betalaínas pode variar entre espécies (Tanaka *et al.*, 2008). Estas modificações incluem, por exemplo, a glicosilação de betanidina pela enzima Betanidina 6-*O*-glicosiltransferase (B6GT), gerando gomfrenina I, a qual pode resultar na formação das gomfreninas II e III pela atividade catalítica da Hidroxicinamoiltransferase (HCT) (Vogt *et al.*, 1997); e a formação das lamprantinas I e II a partir de betanina também pela ação da HCT (Strack *et al.*, 2003). Outras reações de modificação não-exemplificadas na **Figura 0-6** incluem: a glucuronidação de *ciclo*-DOPA glicosídeo à *ciclo*-DOPA glucuronosil-glicosídeo pela enzima Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase (Glucuronosiltransferase), o qual pode ser acoplado com ácido betalâmico e dar origem à betacianina amarantina (Sasaki *et al.* 2005a); e a formação da celosianina I e II (*p*-cumaroil e *p*-feruloilamarantinas) pela acilação da amarantina com 1-*O*-(*p*-cumaroil)- β -glicose (I) e 1-*O*-(*p*-feruloil)- β -glicose (II), respectivamente, catalisada por enzimas Aciltransferases dependentes de acil-glicoses (Bokern & Strack, 1988; Bokern *et al.*, 1992). Além disso, as moléculas de glicose adicionadas podem ser decoradas em múltiplas posições com uma variedade de grupos incluindo acil, malonil, apiosil, feruloil, glicosil e hidroxicinamoil, por diversas enzimas com atividade de aciltransferase, maloniltransferase, glicosiltransferase e hidroxicinamoiltransferase (Strack *et al.*, 2003; Hatlestad & Lloyd, 2015). Algumas das principais betalaínas encontradas em plantas são apresentadas na **Tabela 1** e suas respectivas estruturas químicas na **Figura 0-8**.

Tabela 1. Principais espécies de plantas que produzem betalainas. Reproduzido de (Bastos & Gonçalves, 2017).

Família	Espécie	Nome comum	Betalainas
Aizoaceae	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Flor de gelo	Betacianinas e mesembriantina
	<i>Amaranthus</i> sp.	Amaranto	Amarantina e isoamarantina
Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Beterraba vermelha	Vulgaxantina (I e II), indicaxantina, betanina, prebetanina, isobetanina e neobetanina
	<i>B. vulgaris</i> L. ssp. <i>cicla</i> [L.] Alef	Acelga	Betaxantinas (20 tipos) e betacianinas (9 tipos)
	<i>Chenopodium rubrum</i>	Quenopódio	Vulgaxantina (I e II), amarantina, celosianina e betanina
Cactaceae	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Pitaia vermelha	Betanina, isobetanina, filocactina, isofilocactina, hilocerenina e bougainvilleína -r-I
	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Opúncia	Hilocerenina, isohilocerenina e apiofuranosil-betacianinas
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i> sp.	Buganvílea	Gomfrenina I, derivados de bougainvilleína V e betaxantinas
Portulacaceae	<i>Portulaca grandiflora</i>	Onze-horas	Dopaxantina, vulgaxantina I, portulacaxantina II, miraxantina V e indicaxantina

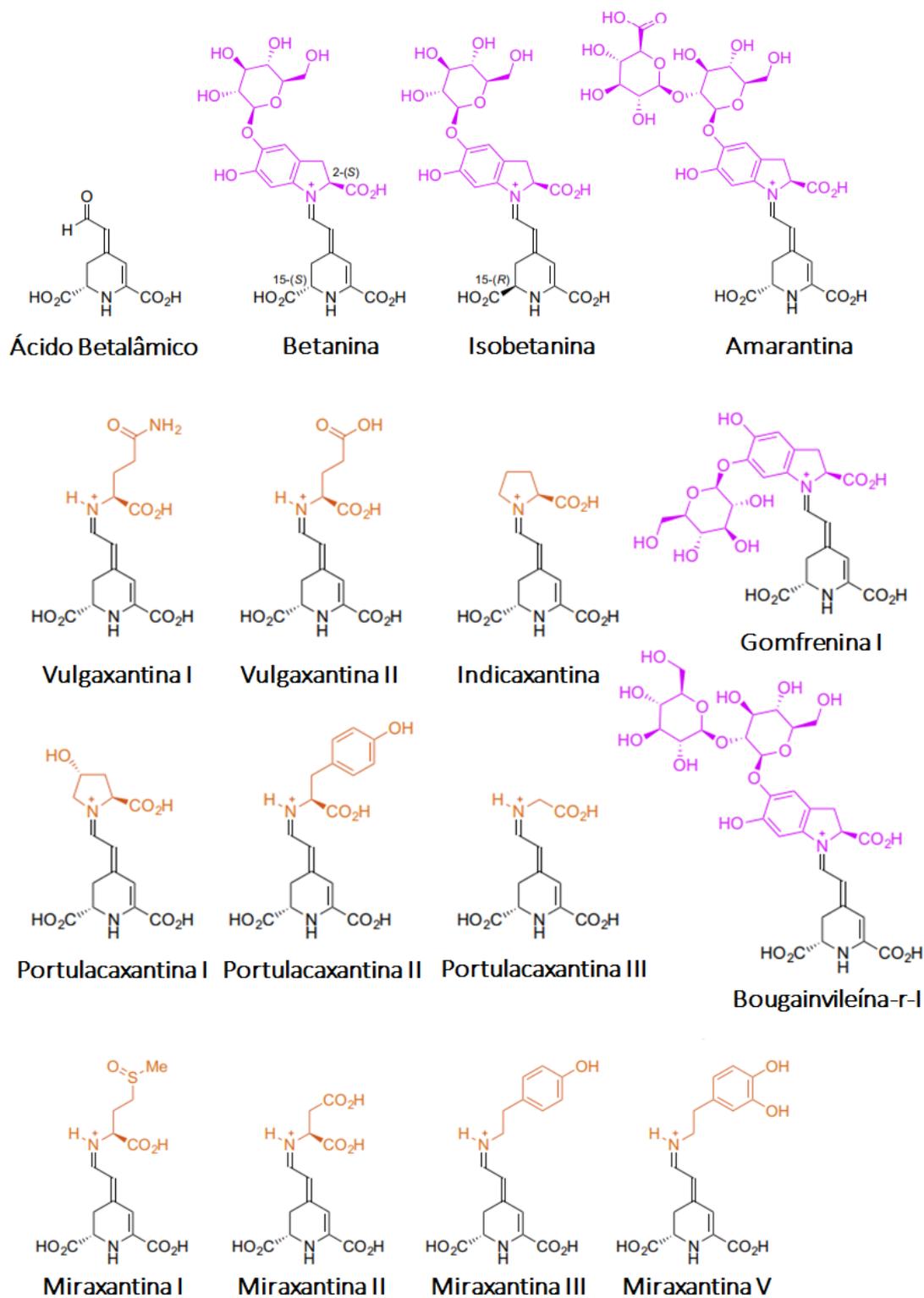


Figura 0-8. Estruturas químicas das principais betalainas encontradas em plantas. Reproduzido de (Bastos & Gonçalves, 2017).

Embora a glicosilação de betanidina à betanina tenha um importante papel na estabilidade desses pigmentos, o grupo hidroxila remanescente pode ser oxidado a um radical betanina-fenóxi por uma peroxidase (Martínez-Parra & Muñoz, 1997). Esta mesma enzima, assim como a tirosinase mencionada anteriormente, pode aceitar betanidina como substrato e catalisar a formação de betanidina-quinona por meio de um mecanismo radicalar (Martínez-Parra & Muñoz, 2001) que, dependendo do pH, pode levar à degradação do pigmento pela formação de derivados desidrogenados ou descarboxilados de betalaínas (Wybraniec & Michalowski, 2011).

A ocorrência da betalaína descarboxilada 2-descarbóxi-betanidina, uma betacianina derivada de dopamina, têm sido observada em flores de *Carpobrotus acinaciformis* (Piattelli & Impellizzeri, 1970) e de celósia (*Celosia argentea*) (Schliemann *et al.*, 2001) e também em raízes de beterrabas amarelas (Kobayashi *et al.*, 2001), as quais contém uma estrutura leuco-dopamina-cromo ao invés de leuco-DOPA-cromo, como ocorre em outras betalaínas (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013a). Algumas alternativas para a formação de betalaínas descarboxiladas têm sido propostas, embora evidências conclusivas *in vivo* não estejam disponíveis na literatura (Polturak & Aharoni, 2018). Uma dessas rotas depende, assim como a formação de tiramina-betaxantina (miraxantina III) e dopamina-betaxantina (miraxantina V), de reações catalisadas pela Tirosina descarboxilase e DOPA-descarboxilase (DDC) a partir de L-tirosina e L-DOPA livres, produzindo tiramina e dopamina, respectivamente (Strack *et al.*, 2003; Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013a). Uma vez formada, dopamina pode ser metilada em uma reação catalisada pela dopamina 3-*O*-metiltransferase (D3MT), originando 3-metóxitiramina cujo acoplamento com o ácido betalâmico leva à formação de 3-metóxitiramina-betaxantina; ou pode ser oxidada por uma tirosinase seguida de uma

ciclização intramolecular originando 2-descarbóxi-*ciclo*-DOPA que, condensada ao ácido betalâmico, gera 2-descarbóxi-betanidina (Kobayashi *et al.*, 2001; Strack *et al.*, 2003). Esta betanidina descarboxilada pode ser glicosilada pela ação da B5GT, formando 2-descarbóxi betanina, substrato de uma maloniltransferase (MTF) que catalisa a síntese de 6'-*O*-malonil-2-descarbóxi-betanina. Como mencionado anteriormente, a formação de betalaínas descarboxiladas também pode ocorrer pela ação catalítica de peroxidases via betanidina-quinona (Wybraniec & Michałowski, 2011). De forma geral, as reações de descarboxilação estão mais relacionadas ao catabolismo do que à biossíntese de betalaínas, uma vez que estes compostos têm sido identificados como produtos de degradação de betacianinas (Wybraniec, 2005).

O catabolismo de betalaínas parece envolver fatores abióticos como luz, temperatura, pH e oxigênio e a ação das enzimas β -glicosidases, peroxidases e PPOs, embora nenhuma dessas enzimas sejam identificadas ao nível de genes (Polturak & Aharoni, 2018). Evidências sugerem que após a remoção da porção de açúcar das betaninas, catalisada pela β -glicosidase (Zakharova & Petrova, 2000), a oxidação das betanidinas pode ser catalisada por enzimas peroxidases, as quais também aceitam betaninas como substrato (Martínez-Parra & Muñoz, 2001), e por PPOs que atuam preferencialmente sobre betanidinas, uma vez que estas geralmente contêm estruturas monofenólicas ou difenólicas raramente encontradas em betaxantinas e requeridas como substrato por essas enzimas (Polturak & Aharoni, 2018). A inibição da atividade descolorante sobre betalaínas em culturas de calos de *P. grandiflora* pela adição de ácido ascórbico, que inibe a atividade oxidante de PPOs, e de β -gluconolactona, inibidor da β -glicosidase, corroboram com o envolvimento dessas enzimas no catabolismo de betalaínas (Strack *et al.*, 2003).

A compreensão acerca das reações e enzimas envolvidas na via de biossíntese de betalainas tem possibilitado a expressão heteróloga dos genes que codificam para as enzimas-chave envolvidas na produção de betalainas e, conseqüentemente, tornado viável a sua síntese em organismos que não as produzem naturalmente. Isso foi demonstrado pela primeira vez mediante a transformação de pétalas brancas de *P. grandiflora* com um clone de cDNA codificando a DODA do fungo *A. muscaria*, a qual resultou na síntese de betalainas e higoaurinas, sendo esta última nunca antes detectada em plantas, sugerindo, portanto, que a enzima do fungo era funcionalmente ativa e que poderia ser utilizada para complementar a via de betalainas em plantas (Mueller *et al.*, 1997b).

Embora a primeira tentativa de expressão heteróloga de uma DODA de Caryophyllales em bactéria não tenha sido bem sucedida (Christinet *et al.*, 2004), anos depois, Sasaki e coautores relataram a síntese *in vitro* de ácido betalâmico a partir da expressão recombinante da DODA da Caryophyllales maravilha (*M. jalapa*) em *E. coli* e em leveduras, porém, neste último, os dados não foram apresentados (Sasaki *et al.*, 2009). A partir daí, outros estudos também observaram a síntese de ácido betalâmico e betaxantinas em ensaios enzimáticos que utilizavam DODAs recombinantes de beterraba (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2012) e de *E. coli* (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013b) com a suplementação de L-DOPA, o substrato de DODA. A produção de muscaflavina também foi detectada em ensaios enzimáticos utilizando a DODA recombinante de *E. coli*, comprovando sua homologia funcional com a DODA do fungo *A. muscaria* (Mueller *et al.*, 1997a).

A produção de betalainas *in vivo* por sistemas heterólogos foi demonstrada pela primeira vez por Harris e colaboradores (2012), os quais relataram ser possível produzir betalainas em plantas que naturalmente acumulam antocianinas pela introdução de

construtos de DNA que resultavam na superexpressão de DODAs da Caryophyllales *P. grandiflora* e do fungo *A. muscaria* em culturas de células de batata (*Solanum tuberosum*) e pétalas de boca-de-leão (*Antirrhinum majus*), mediante suplementação com L-DOPA (Harris *et al.*, 2012). Para contornar a necessidade de suplementação com L-DOPA no sistema heterólogo, Nakatsuka e colaboradores combinaram a expressão transiente da tirosinase do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) com a DODA de maravilha (*M. jalapa*) em culturas de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e de Arabidopsis (*A. thaliana*) (Nakatsuka *et al.*, 2013). Porém, apenas a produção de betaxantinas foi detectada (Nakatsuka *et al.*, 2013), ao contrário da linhagem transgênica de *Arabidopsis thaliana* que expressa a DODA de *P. grandiflora*, a qual é capaz de produzir betaxantinas e betacianinas mediante a suplementação com L-DOPA (Harris *et al.*, 2012). Isso sugere a presença de uma enzima neste organismo capaz de catalisar a formação de *ciclo*-DOPA a partir de L-DOPA, resultando na síntese de betacianinas, embora esta enzima permaneça desconhecida até o momento em plantas não-Caryophyllales (Harris *et al.*, 2012). Paralelamente à publicação destes resultados, Hatlestad e coautores identificaram esta enzima em plantas Caryophyllales como CYP76AD1, pertencente ao citocromo P450, e demonstraram que quando leveduras eram transformadas com a sequência codificadora para a DODA de beterraba (BvDODA1) e suplementadas com L-DOPA, apenas betaxantinas eram formadas, mas a adição de CYP76AD1 à essas leveduras resultava na formação de betacianinas, como resultado da síntese de *ciclo*-DOPA (Hatlestad *et al.*, 2012). A transformação de beterrabas amarelas com *CYP76AD1* também resultava na produção de pigmentos vermelhos, corroborando o envolvimento desta enzima na produção de *ciclo*-DOPA (Hatlestad *et al.*, 2012). Resultados similares foram observados quando o tabaco selvagem (*Nicotiana benthamiana*) foi transformado com *BvDODA1* e

CYP76AD1, onde a síntese de betacianinas foi detectada; enquanto a transformação de *N. benthamiana* com *BvDODAI* e *CYP76AD6*, a qual não está envolvida na síntese de *ciclo-DOPA*, resultava apenas na formação de betaxantinas (Polturak *et al.*, 2015). Recentemente, foi demonstrada que a expressão heteróloga combinada de *CYP76AD15*, uma enzima encontrada na flor maravilha (*M. jalapa*) homóloga à *CYP76AD6*, e *BvDODAI* em *N. benthamiana* também resulta apenas na síntese de L-DOPA e de betaxantinas (Polturak *et al.*, 2018).

Polturak e colaboradores (2017) relataram que a expressão de três genes da via de betalainas, *CYP76AD1*, *BvDODAI* e *cDOPA5GT*, em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*) e berinjela (*Solanum melongena*), resulta na produção heteróloga de betalainas, o que abre a possibilidade de explorar, pela primeira vez, a biofortificação de plantas de interesse agrônomico com esta classe de pigmentos naturais (Polturak *et al.*, 2017). Além disso, este mesmo estudo observou que linhagens de tabaco transformadas com genes de betalainas apresentam resistência ao fungo *Botrytis cinerea*, que causa a podridão cinzenta, responsável por uma das maiores perdas na agricultura (Polturak *et al.*, 2017).

De forma geral, o conhecimento crescente acerca das reações e enzimas envolvidas na biossíntese de betalainas tem possibilitado o desenvolvimento de métodos para a obtenção de enzimas recombinantes e de sistemas heterólogos relacionados tanto à produção biotecnológica de L-DOPA, utilizada no tratamento de pacientes com doença de Parkinson, quanto de betalainas, exploradas principalmente como corantes naturais em alimentos e em suplementos dietéticos (Polturak & Aharoni, 2018).

Ao contrário da via de antocianinas, pouco se conhece sobre a regulação molecular da via de biossíntese de betalainas. Em beterrabas, foi demonstrado que o *locus*

Y codifica para uma proteína MYB-like (BvMYB1) cujo silenciamento reprime a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de betalaínas e a produção do pigmento, enquanto a sua superexpressão é acompanhada por um aumento na expressão de genes betalaínicos e, conseqüentemente, no aumento da produção de betalaínas (Hatlestad *et al.*, 2015). BvMYB1 contém domínios MYB R2 e R3 e um domínio de ativação C-terminal que aparentemente possuem uma origem evolutiva comum com MYBs de eudicotiledôneas que acumulam antocianinas (Hatlestad *et al.*, 2015). Aliada à forte correlação biológica funcional entre antocianinas e betalaínas, acreditava-se que a regulação molecular da via de betalaínas compartilhava os mesmos componentes da via de antocianinas, onde um complexo regulatório de fatores de transcrição MBW, constituído por proteínas contendo motivos MYB, bHLH e repetições WD regulam a expressão do pigmento (Hatlestad *et al.*, 2015). Entretanto, foi observado que BvMYB1 não possui resíduos conservados que permitem à sua interação com membros bHLH de complexos MBW relacionados à regulação da via de antocianinas e, portanto, o mecanismo regulatório da via de betalaínas que envolve BvMYB1 parece ocorrer de outro modo (Hatlestad *et al.*, 2015). Brockington e colaboradores (2015) sugerem que o fato de *BvMYB1* estar localizado no cromossomo 2 de beterraba, assim como os genes que codificam as enzimas-chave de betalaínas CYP76AD1 e DODA, os quais estão separados a apenas 50 kb um do outro por um único *locus* não-caracterizado, poderia resultar na formação de um *operon* metabólico, sujeito, portanto, a um mecanismo regulatório comum (Brockington *et al.*, 2015).

A regulação da biossíntese de betalaínas também tem sido explorada em estudos que buscam identificar fatores abióticos e bióticos que possam resultar na indução do acúmulo desses pigmentos *in vitro* visando a sua aplicação comercial, sobretudo na

indústria alimentícia (Savitha *et al.*, 2006). Dentre estes fatores, foi demonstrado que a suplementação com sacarose em espinafre (*Spinacia oleracea*) cultivado por hidroponia é capaz de induzir a expressão de vários genes betaláinicos e aumentar o conteúdo de betacianinas (Watanabe *et al.*, 2018); assim como ocorre com a adição de cloreto de cálcio (Savitha *et al.*, 2006; Lakhotia *et al.*, 2014); de alguns polissacarídeos, como a quitosana em plantas de *Rivina humilis* (Khan *et al.*, 2016), o β -glicano em cultura de calos de buganvílea (*Bougainvillea spp.*) (Lakhotia *et al.*, 2014) e o pululano no cultivo de raiz pilosa de beterrabas (*B. vulgaris*) (Savitha *et al.*, 2006); de ácido salicílico em plantas de *Rivina humilis* (Khan *et al.*, 2016); de metil-jasmonato, Fe-EDTA e sulfato de cobre suplementados em concentrações específicas no cultivo de calos de buganvílea (*Bougainvillea spp.*) (Lakhotia *et al.*, 2014) e no cultivo hidropônico de beterrabas (Morales *et al.*, 2012); e da suplementação com citocininas, ácido indolacético (IAA) e ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) no cultivo de células de linhagens betaláinicas (Stafford, 1994).

Algumas evidências apontam para um maior acúmulo de betaláinas em folhas e caules de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) submetidos à seca (Casique-Arroyo *et al.*, 2014); assim como ocorre na Caryophyllales *Mesembryanthemum crystallinum* exposta à luz branca de alta intensidade e à radiação ultravioleta A (UV-A) (Vogt *et al.*, 1999b); em plantas de *Alternanthera sessilis* e *A. brasiliana* expostas à radiação UV-B (Klein *et al.*, 2018); e em folhas de beterraba (*B. vulgaris*) após ferimento mecânico e exposição a um sistema gerador de peróxido de hidrogênio (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Alguns fatores bióticos também podem elevar o acúmulo de pigmentos betaláinicos, como observado em raízes pilosas de beterrabas cultivadas com o pó seco de células do fungo *Penicillium notatum* (Savitha *et al.*, 2006); em calos de celósia

(*Celosia cristata*) cultivados com o fungo *Fusarium oxysporum* (Warhade & Badere, 2018); em folhas de beterraba infiltradas com as bactérias *Pseudomonas syringae* e *Agrobacterium tumefaciens* (*B. vulgaris*) (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004); e em condições de cultivo fermentativo do fungo *Penicillium novae-zelandiae* na presença de palha de milho (Wang *et al.*, 2018).

Embora os mecanismos moleculares que culminam no acúmulo de betalaínas por grande parte dos fatores listados acima não sejam conhecidos, evidências encontradas em plantas de *Suaeda salsa* regadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e em folhas de beterraba submetidas a estresse mecânico, infiltração bacteriana e a um sistema gerador de espécies oxidantes sugerem que a síntese de betalaínas é precedida por um *burst* oxidativo que levaria a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como H₂O₂, radicais superóxido (O₂^{•-}), hidroxila (•OH) e oxigênio singlete (¹O₂), mensageiros de cascatas de sinalização que poderiam induzir a biossíntese de betalaínas, as quais poderiam atuar como *scavengers* de EROs, limitando os danos fisiológicos causados por alguns fatores bióticos e abióticos (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Comparada à biossíntese de antocianinas, cujas reações, enzimas e regulação são bem elucidadas, pouco é conhecido, ao nível molecular, sobre as etapas e enzimas envolvidas na via de biossíntese de betalaínas, como esta via é regulada e como se deu a sua evolução (Hatlestad & Lloyd, 2015). Isso se deve, em parte, à limitação de ferramentas moleculares disponíveis para os estudos de táxons betalaínicos comparado com os organismos-modelos antocianínicos já bem estudados, como *Arabidopsis*, *Petunia* e *Zea* (Brockington *et al.*, 2011). Entretanto, avanços recentes na elucidação dos principais genes da via de betalaínas abrem possibilidades para o estudo das funções biológicas desses pigmentos em plantas, bem como na nutrição e saúde humana e que,

juntamente com a produção heteróloga de betalaínas em plantas e em microorganismos, pode levar à compreensão sobre a sua origem e evolução, além de explorar o seu potencial biotecnológico (Polturak & Aharoni, 2018).

Betalainas e antocianinas não coexistem em plantas e fungos

Em contraste à pigmentação por betalainas, de ocorrência exclusiva em plantas Caryophyllales, as antocianinas constituem a pigmentação floral predominante em mais de 90% das angiospermas (Du *et al.*, 2018). A ausência de antocianinas em plantas que acumulam betalainas e de betalainas em táxons antocianínicos, como nas Caryophyllales Molluginaceae e Caryophyllaceae, sugere que ambas as classes de pigmentos são mutuamente exclusivas em plantas (Clement & Mabry, 1996). Além disso, fungos não produzem clorofilas ou antocianinas, classes de pigmentos que dominam a coloração de plantas (Velíšek & Cejpek, 2011).

Diversas hipóteses têm sido levantadas para explicar a evolução da pigmentação por betalainas na natureza, as quais tentam esclarecer os mecanismos por trás da origem única das betalainas em Caryophyllales, a ocorrência de linhagens de Caryophyllales pigmentadas por antocianinas e betalainas e a mutualidade exclusiva desses pigmentos em plantas; embora, até o momento, nenhuma delas explique estes fenômenos em sua totalidade (Brockington *et al.*, 2011).

Para explicar a origem única das betalainas em Caryophyllales, Ehrendorfer (1976) levou em conta a importância biológica da pigmentação floral na atração de polinizadores e sugeriu que o ancestral das Caryophyllales teria evoluído em um ambiente com condições áridas, privado de polinizadores e onde a polinização pelo vento teria prevalecido, resultando na perda da pigmentação por antocianinas, já que esta não era mais requerida para atrair polinizadores (Ehrendorfer, 1976). A partir da irradiação adaptativa dos polinizadores, a pigmentação floral por betalainas teria surgido e prevalecido em relação às antocianinas (Ehrendorfer, 1976). Embora as características morfológicas florais de Caryophyllales extintas sejam compatíveis com a ideia da

polinização pelo vento, a filogenia dessa Ordem sofreu grandes mudanças desde a elaboração desta hipótese como, por exemplo, a inclusão de algumas linhagens que sugerem a entomofilia como sendo o estado ancestral (Brockington *et al.*, 2009). Além disso, explicar a origem única das betalaínas considerando apenas a sua importância na biologia floral não é adequado, uma vez que, assim como as antocianinas, estes pigmentos também se acumulam nos tecidos vegetativos (Brockington *et al.*, 2011).

Uma hipótese alternativa foi apresentada por Stafford (1994), a qual sugeriu que as betalaínas poderiam ter tido sua origem em fungos basidiomicetos e que, por transferência horizontal de genes para o ancestral das Caryophyllales, teria evoluído como pigmentação principal neste grupo (Stafford, 1994). Entretanto, esta ideia permanece ainda não explorada.

Já para Clement & Mabry (1996), a ocorrência de táxons antocianínicos e betalaínicos se deve à coocorrência destes pigmentos em uma linhagem ancestral extinta de Caryophyllales, seguida da “perda estocástica” de um ou outro pigmento (Clement & Mabry, 1996). Embora os mecanismos específicos envolvidos com estes processos não tenham sido sugeridos, Brockington e colaboradores inferem que a coexistência poderia ser explicada pela complementaridade funcional entre a pigmentação por antocianinas e as propriedades antifúngicas de betalaínas (Brockington *et al.*, 2011). Porém, apenas a ocorrência de ambos os pigmentos em um táxon ancestral não explica a sua exclusão mútua definitiva. Além disso, análises filogenéticas de Caryophyllales utilizando os genes marcadores plastidiais *rbcL/matK* sugerem que uma condição ancestral pigmentada unicamente por antocianinas seria a mais provável na evolução dessa Ordem de plantas (Brockington *et al.*, 2011).

Brockington e colaboradores (2011) acreditavam, inicialmente, que a ocorrência intercalada de linhagens antocianínicas e betalainicas em Caryophyllales era consistente com a ideia de múltiplas origens da pigmentação por betalainas a partir de uma condição antocianínica ancestral (Brockington *et al.*, 2011). Entretanto, evidências encontradas pelo mesmo grupo, como a perda ou regulação negativa dos genes CYP76AD1 α e DODA α em linhagens de Caryophyllales antocianínicas, essenciais para a produção de betalainas, sugere que o seu ancestral provavelmente possuía uma via de betalainas completamente funcional e, portanto, corrobora com uma origem única para a pigmentação por betalainas em Caryophyllales (Brockington *et al.*, 2015).

Ao analisarem a relação custo x eficiência de betalainas e antocianinas, Clement & Mabry (1996) observaram que, embora o coeficiente de extinção molar das betalainas seja quase duas vezes maior que o de antocianinas, o que torna as betalainas mais eficientes em absorver a luz visível, a sua biossíntese requer um custo extra de dois átomos de nitrogênio por molécula de pigmento e, por isso, elas seriam menos bem sucedidas que as antocianinas (Clement & Mabry, 1996; Jain & Gould, 2015). Entretanto, Brockington e colaboradores (2011) acreditam que esses resultados não são conclusivos, pois o papel desses pigmentos em plantas não é bem estabelecido, o custo metabólico não pode ser facilmente mensurado e, ao considerar a relação custo x eficiência apenas em termos de luz visível, pode-se subestimar a importância desses pigmentos na atração de polinizadores que possuem receptores de luz UV, como a abelha *Apis mellifera*, uma vez que a ineficiência de betalainas em absorver luz UV pode resultar em uma maior refletância desta radiação e reforçar a aparência das flores a esses polinizadores (Brockington *et al.*, 2011).

Jain & Gould (2015) exploraram a evolução de betalaínas sob o ponto de vista de uma possível homologia funcional entre antocianinas e betalaínas na interação planta-ambiente, baseados em evidências de padrões similares de acúmulo em tecidos vegetativos e reprodutivos, além do fato de ambos os pigmentos poderem atuar como sequestradores de espécies reativas de oxigênio e estar associados à resposta a diferentes estressores abióticos, como excesso de luz, seca e salinidade (Jain & Gould, 2015). Por outro lado, características intrínsecas às betalaínas, como sua capacidade de manter a coloração independente de mudanças no pH vacuolar, poderiam ter resultado em uma seleção positiva desta classe de pigmentos em relação às antocianinas em plantas Caryophyllales (Jain & Gould, 2015). Contudo, a ausência de estudos sobre a função de betalaínas em fungos e bactérias limitam a compreensão sobre a significância biológica desses pigmentos na natureza.

Os padrões de acúmulo similares entre antocianinas e betalaínas em tecidos vegetativos e reprodutivos também foram considerados por Stafford (1994), a qual inferiu que estes poderiam sugerir um mecanismo regulatório comum em que a última etapa da síntese de betalaínas poderia inibir, de alguma forma, a síntese de antocianinas, culminando na sua substituição pela pigmentação por betalaínas em Caryophyllales (Stafford, 1994; Brockington *et al.*, 2011). Embora a via de biossíntese de antocianinas seja um dos sistemas regulatórios mais estudados em plantas e possa ser induzida tanto por fatores internos, como o relógio biológico, quanto por fatores bióticos e abióticos comuns à via de betalaínas, pouco é conhecido sobre a regulação da biossíntese de betalaínas (Brockington *et al.*, 2011). Até hoje, apenas um componente regulatório da via de betalaínas é conhecido: o fator de transcrição MYB-like, também envolvido na formação de um complexo regulatório da via de antocianinas, embora o mecanismo

pareça não ser o mesmo (Hatlestad *et al.*, 2015). Outros estudos, pautados em análises genéticas comparativas de plantas (Christinet *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2008; Lopez-Nieves *et al.*, 2018), corroboram a ideia de um mecanismo regulatório associado à mutualidade exclusiva desses pigmentos em plantas e, para considerarmos essas contribuições, apresentaremos a seguir, uma visão geral a respeito da via de biossíntese de antocianinas.

Ao contrário da via de biossíntese de betalaínas, apresentada com detalhes no tópico anterior, onde apenas três enzimas (CYP76AD1, DODA e cDOPA5GT) são requeridas para a expressão desses pigmentos em plantas que não os produzem naturalmente (Polturak *et al.*, 2017), a via de antocianinas envolve, pelo menos, dez enzimas diferentes (**Figura 0-9**) e, apesar de ser mais complexa, os componentes e sua regulação parecem bem conservados em plantas (Brockington *et al.*, 2011).

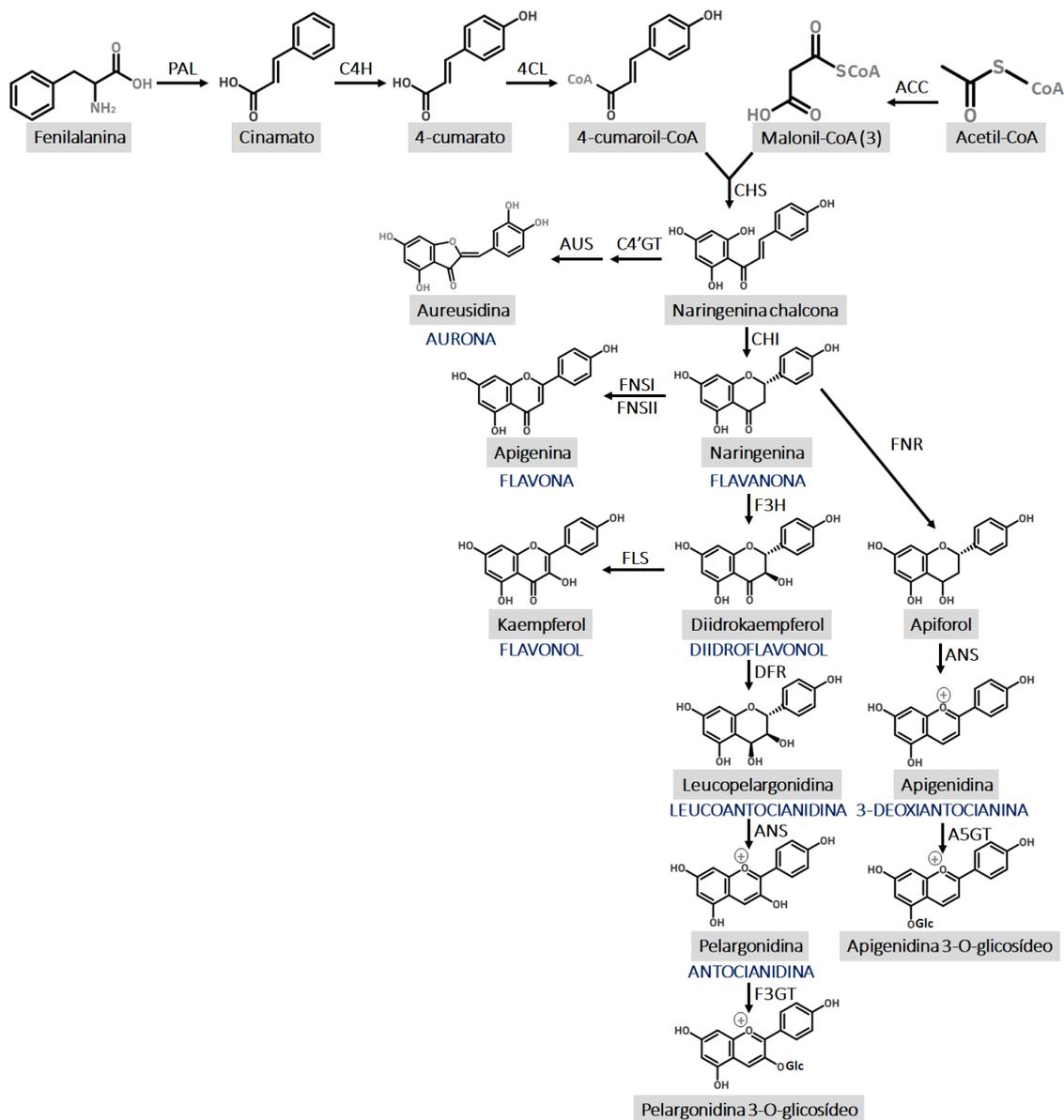


Figura 0-9. Esquema simplificado da via de biossíntese de antocianinas e outros flavonoides em plantas. PAL: Fenilalanina amônia liase, C4H: Cinamato 4-hidroxilase, 4CL: 4-cumaroil:CoA-ligase, ACC: Acetil-CoA carboxilase, CHS: Chalcona sintase, AUS: Aureusidina sintase, C4'GT: Chalcona 4'-O-glicosiltransferase, CHI: Chalcona isomerase, FNSI/II: Flavona sintase I/II, FNR: Flavanona 4-redutase, F3H: Flavanona 3-hidroxilase, FLS: Flavonol sintase, DFR: Diidroflavonol-4-redutase, ANS: Antocianidina sintase, F3GT: Antocianidina 3-O-glicosiltransferase, A5GT: Antocianidina 5-O-glicosiltransferase.

De forma geral, esta via consiste em um ramo da biossíntese de flavonoides e requer como precursor o aminoácido fenilalanina, o qual é convertido, inicialmente, a *p*-

cumaroil-CoA pelos intermediários cinamato e *p*-cumarato, em reações catalisadas pelas enzimas Fenilalanina amônia liase (PAL), Cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-cumaroil:CoA-ligase (4CL), respectivamente. A enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC) catalisa a formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. Então, uma molécula de *p*-cumaroil-CoA é condensada com três moléculas de malonoil-CoA para dar origem à naringenina chalcona, em uma reação catalisada pela enzima citosólica Chalcona sintase (CHS). Este intermediário pode ser utilizado na síntese de auronas pela ação das enzimas Chalcona 4'-*O*-glicosiltransferase (C4'GT) e Aureusidina sintase (AUS); ou pode sofrer uma isomerização à flavanona naringenina, a qual pode ocorrer espontaneamente ou pela ação enzimática da chalcona isomerase (CHI). A naringenina pode ser convertida à apiforol pela Flavanona 4-redutase (FNR), seguida da formação de 3-deoxiantocianina pela Antocianidina sintase (ANS) e posterior glicosilação pela ação da Antocianidina 5-*O*-glicosiltransferase (A5GT). Além disso, naringenina também pode ser convertida à flavona pela ação da Flavona sintase I/II (FNS I/II) ou ser hidroxilada à diidroflavonol pela Flavanona 3-hidroxilase (F3H), o qual pode ser utilizado na síntese de flavonol pela Flavonol sintase (FLS) ou ser convertido em leucoantocianidina pela Diidroflavonol-4-redutase (DFR) (Davies, 2008). Por fim, a leucoantocianidina pode ser convertida à antocianidina pela atividade enzimática da Antocianidina sintase/Leucoantocianidina dioxigenase (ANS/LDOX) e ser estabilizada pela Antocianidina 3-*O*-glicosiltransferase (F3GT). Outras reações de modificação, incluindo metilação, acetilação e sulfurilação catalisadas por Metiltransferases (MT), Aciltransferases (AT) e Sulfiltransferases (ST), respectivamente, podem gerar uma diversidade de antocianinas estáveis, as quais podem ser espécie- e família-específicas (Brockington *et al.*, 2011). Além disso, a distribuição espacial e temporal desses pigmentos em diferentes tecidos da planta pode ser regulada

ao nível transcricional dos genes que codificam as enzimas envolvidas na via de biossíntese e, de forma análoga ao que ocorre na síntese de betalainas, os pigmentos estabilizados são transportados do citosol e acumulados nos vacúolos de camadas subepidermais e epidermais de tecidos reprodutivos e vegetativos (Brockington *et al.*, 2011).

A ocorrência de proantocianidinas em sementes de diversas Caryophyllales betalainicas, bem como a presença de flavonóis e flavonol-glicosídeos em plantas betalainicas, como observado nas brácteas da Caryophyllales *Bougainvillea glabra*, onde conjugados dos flavonóis kaempferol e quercetina alcançam uma proporção de até 1:1 com betacianinas (Heuer *et al.*, 1994), sugerem que as etapas finais da biossíntese de antocianinas a partir de diidroflavonóis poderiam estar comprometidas nas Caryophyllales (Shimada *et al.*, 2007). Moléculas de cDNA que codificam para DFR e ANS/LDOX, envolvidas nestas etapas, foram isoladas a partir das Caryophyllales *Spinacia oleracea* e *Phytolacca americana*, cuja expressão resulta em enzimas funcionais (Shimada *et al.*, 2004, 2005). Ao analisarem os transcritos desses genes em linhagens betalainicas, Shimada e colaboradores (2007) observaram que, ao contrário de CHS, um gene da fase inicial da via de antocianinas cujos transcritos eram expressos amplamente em todos os tecidos, DFR e ANS/LDOX não eram expressos na maioria dos tecidos, exceto nas sementes, o que corrobora com a presença de proantocianidinas em sementes de linhagens betalainicas (Shimada *et al.*, 2007). Este estudo também revelou que os promotores dos genes DFR e ANS/LDOX em Caryophyllales difere dos encontrados em plantas não-Caryophyllales e que este fato, juntamente com a manutenção desses *loci* em Caryophyllales betalainicas e sua regulação transcricional negativa, poderiam explicar a

reversão à pigmentação por antocianinas em algumas linhagens de Caryophyllales, como Caryophyllaceae e Molluginaceae (Shimada *et al.*, 2007).

Paralelamente, alguns genes que codificam para enzimas importantes envolvidas na biossíntese de betalaínas também foram identificados em angiospermas pigmentadas por antocianinas, incluindo ortólogos de DODAs, com atividade catalítica demonstrada *in vitro* (Christinet *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2008), e de B5GT/6GT, glicosiltransferases envolvidas na estabilização de betalaínas de forma análoga à glicosilação de antocianidinas por F3GT, e que podem aceitar tanto betanidinas quanto flavonoides como substratos (Vogt *et al.*, 1997). Juntos, esses dados corroboram com a hipótese sugerida por Stafford (1994), onde um mecanismo de regulação metabólica poderia estar envolvido na mutualidade exclusiva de antocianinas e betalaínas em plantas (Stafford, 1994).

Recentemente, Lopez-Nieves e colaboradores (2018) encontraram evidências importantes sobre esse mecanismo regulatório ao explorar o metabolismo primário que leva à biossíntese dos precursores das vias de antocianinas e betalaínas em plantas. Conforme explicado em detalhes previamente, os autores observaram em beterrabas que a síntese de tirosina, o precursor da via de betalaínas, é catalisada pela enzima arogenato desidrogenase (ADH), codificada por dois genes: BvADH β , que assim como os ortólogos encontrados em outras plantas é sensível à inibição por tirosina, e BvADH α , que apresenta uma sensibilidade reduzida à inibição por tirosina. O fato de BvADH α ter sido perdida ou regulada negativamente em linhagens de Caryophyllales que reverteram a pigmentação para antocianinas sugere que, nessas plantas, a inibição de BvADH β por tirosina torna o substrato arogenato disponível para a síntese de fenilalanina e, conseqüentemente, de antocianinas; enquanto a sensibilidade reduzida à regulação

negativa de tirosina exibida por BvADH α faz com que esta enzima contribua com os níveis elevados de tirosina encontrados em Caryophyllales e que, conseqüentemente, resultam na síntese de betalaínas nessas linhagens (Lopez-Nieves *et al.*, 2018). Em concordância com os dados obtidos por Lopez-Nieves (2018), os quais observaram um aumento de 100 vezes nos níveis de tirosina na planta antocianínica *Nicotiana benthamiana* expressando ADH α , um outro estudo também demonstrou que a produção de betalaínas em pétalas de *Portulaca* é precedida por um aumento de 200 vezes na concentração de tirosina (Kishima *et al.*, 1991), o que reforça a ideia de que a produção elevada de tirosina desempenha um papel importante na produção geral de betalaínas.

Embora todas as evidências aqui apresentadas contribuam significativamente com o progresso sobre o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na exclusão mútua de antocianinas e betalaínas em plantas, o envolvimento de outros fatores e da regulação de genes que levam à produção de tirosina e fenilalanina, bem como de antocianinas e betalaínas, ainda pouco explorada, podem colaborar com a compreensão deste mistério que tem fascinado diversos cientistas ao longo de décadas.

Referências bibliográficas

Allegra, M., Tesoriere, L., & Livrea, M. (2007). Betanin inhibits the myeloperoxidase/nitrite-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Free Radical Research*, *41*(3), 335–341. <https://doi.org/10.1080/10715760601038783>

Babos, M., Halász, K., Zagyva, T., Zöld-Balogh, Á., Szego, D., & Bratek, Z. (2011). Preliminary notes on dual relevance of ITS sequences and pigments in *Hygrocybe* taxonomy. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *26*, 99–107. <https://doi.org/10.3767/003158511X578349>

Bastos, E. L., & Gonçalves, L. C. P. (2017). Microwave-assisted extraction of betalains. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 245–268). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00009-7>

Bokern, M., Heuer, S., & Strack, D. (1992). Hydroxycinnamic Acid Transferases in the Biosynthesis of Acylated Betacyanins: Purification and Characterization from Cell Cultures of *Chenopodium rubrum* and Occurrence in Some Other Members of the Caryophyllales. *Botanica Acta*, *105*(3), 146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00280.x>

Bokern, M., & Strack, D. (1988). Synthesis of hydroxycinnamic acid esters of betacyanins via 1-O-acylglucosides of hydroxycinnamic acids by protein preparations from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* and petals of *Lampranthus sociorum*. *Planta*, *174*(1), 101–105. <https://doi.org/10.1007/BF00394880>

Brockington, S. F., Alexandre, R., Ramdial, J., Moore, M. J., Crawley, S., Dhingra, A., ... Soltis, P. S. (2009). Phylogeny of the Caryophyllales Sensu Lato: Revisiting

Hypotheses on Pollination Biology and Perianth Differentiation in the Core Caryophyllales. *International Journal of Plant Sciences*, 170(5), 627–643.
<https://doi.org/10.1086/597785>

Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2011). Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist*, 190, 854–864.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03687.x>

Brockington, S. F., Yang, Y., Gandia-Herrero, F., Covshoff, S., Hibberd, J. M., Sage, R. F., ... Smith, S. A. (2015). Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 207(4), 1170–1180.
<https://doi.org/10.1111/nph.13441>

Cabrera-Valladares, N., Martínez, A., Piñero, S., Lagunas-Muñoz, V. H., Tinoco, R., De Anda, R., ... Gosset, G. (2006). Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.004>

Casique-Arroyo, G., Martínez-Gallardo, N., De La Vara, L. G., & Délano-Frier, J. P. (2014). Betacyanin biosynthetic genes and enzymes are differentially induced by (a)biotic stress in *Amaranthus hypochondriacus*. *PLoS ONE*, 9(6), 19–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099012>

Christinet, L., Burdet, F. X., Zaiko, M., Hinz, U., & Zrýd, J. P. (2004). Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiology*, 134(1), 265–274. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031914>

Clement, J. S., & Mabry, T. J. (1996). Pigment evolution in the Caryophyllales: A systematic overview. *Botanica Acta*, *109*(5), 360–367. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1996.tb00584.x>

Das, S. S., Gauri, S. S., Misra, B. B., Biswas, M., & Dey, S. (2013). Purification and characterization of a betanidin glucosyltransferase from *Amaranthus tricolor* L. catalyzing non-specific biotransformation of flavonoids. *Plant Science*, *211*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.003>

Davies, K. M., Albert, N. W., & Schwinn, K. E. (2012). From landing lights to mimicry: The molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Functional Plant Biology*, *39*(8), 619–638. <https://doi.org/10.1071/FP12195>

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

Du, H., Lai, L., Wang, F., Sun, W., Zhang, L., Li, X., ... Zheng, Y. (2018). Characterisation of flower colouration in 30 *Rhododendron* species via anthocyanin and flavonol identification and quantitative traits. *Plant Biology*, *20*(1), 121–129. <https://doi.org/10.1111/plb.12649>

Ehrendorfer, F. (1976). Closing remarks: Systematics and evolution of centrosperous families. *Plant Systematics and Evolution*, *126*(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/BF00986077>

El-Naggar, N. E. A., & El-Ewasy, S. M. (2017). Bioproduction, characterization,

anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/srep42129>

Fischer, N., & Dreiding, A. S. (1972). Biosynthesis of betalaines. On the cleavage of the aromatic ring during the enzymatic transformation of Dopa into betalamic acid. *Helvetica Chimica Acta*, 55(2), 649–658. <https://doi.org/10.1002/hlca.19720550240>

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology*, 138(1), 421–432. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057992>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2012). Characterization of recombinant *Beta vulgaris* 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase active in the biosynthesis of betalains. *Planta*, 236, 91–100. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1593-2>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013a). Biosynthesis of betalains: Yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18(6), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.003>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013b). *Escherichia coli* protein YgiD produces the structural unit of plant pigments betalains: characterization of a prokaryotic enzyme with DOPA-extradiol-dioxygenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4961-3>

Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., & Pavlov, A. (2008). Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581–593.

<https://doi.org/10.1007/s11738-008-0170-6>

Gonçalves, L. C. P., Marcato, A. C., Rodrigues, A. C. B., Pagano, A. P. E., Freitas, B. C. de, Machado, C. de O., ... Bastos, E. L. (2015). Betalains: from the Colors of Beetroots to the Fluorescence of Flowers. *Revista Virtual de Química*, 7(1), 292–309. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150015>

Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K., & Gürses, M. S. (2016). Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. In S. K. Sharma (Ed.), *SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability* (pp. 13–29). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33892-7_2

Haavik, J. (2002). L-DOPA is a substrate for tyrosine hydroxylase. *Journal of Neurochemistry*, 69(4), 1720–1728. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041720.x>

Hari, R. K., Patel, T. R., & Martin, A. M. (1994). An overview of pigment production in biological systems: Functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Reviews International*, 10(1), 49–70. <https://doi.org/10.1080/87559129409540985>

Harris, N. N., Javellana, J., Davies, K. M., Lewis, D. H., Jameson, P. E., Deroles, S. C., ... Schwinn, K. E. (2012). Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC Plant Biology*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-34>

Hatlestad, G. J., Akhavan, N. A., Sunnadeniya, R. M., Elam, L., Cargile, S., Hembd, A., ... Lloyd, A. M. (2015). The beet *Y* locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. *Nature Genetics*, 47(1), 92–96.

<https://doi.org/10.1038/ng.3163>

Hatlestad, G. J., & Lloyd, A. (2015). The Betalain Secondary Metabolic Network. In: C. Chen (Ed.), *Pigments in Fruits and Vegetables: Genomics and Dietetics* (pp. 127–140). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2356-4_6

Hatlestad, G. J., Sunnadeniya, R. M., Akhavan, N. A., Gonzalez, A., Goldman, I. L., McGrath, J. M., & Lloyd, A. M. (2012). The beet *R* locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*, *44*(7), 816–820. <https://doi.org/10.1038/ng.2297>

Heuer, S., Richter, S., Metzger, J. W., Wray, V., Nimtz, M., & Strack, D. (1994). Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry*, *37*(3), 761–767. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90354-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90354-6)

Hinz, U. G., Fivaz, J., Girod, P. A., & Zyrd, J. P. (1997). The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Molecular and General Genetics*, *256*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s004380050539>

Hornykiewicz, O. (2010). A brief history of levodopa. *Journal of Neurology*, *257*(2), 249–252. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5741-y>

Iriel, A., & Lagorio, M. G. (2010). Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? *Naturwissenschaften*, *97*(10), 915–924. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0709-4>

Jain, G., & Gould, K. S. (2015a). Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants? *Environmental and Experimental Botany*, *119*, 48–53.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.002>

Jain, G., & Gould, K. S. (2015b). Functional significance of betalain biosynthesis in leaves of *Disphyma australe* under salinity stress. *Environmental and Experimental Botany*, *109*, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.002>

Jain, G., Schwinn, K. E., & Gould, K. S. (2015). Betalain induction by L-DOPA application confers photoprotection to saline-exposed leaves of *Disphyma australe*. *New Phytologist*, *207*(4), 1075–1083. <https://doi.org/10.1111/nph.13409>

Joy, R., Sugiyama, M., Fukuda, H., & Komamine, A. (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiology*, *107*(4), 1083–1089. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1083>

Kapadia, G. J., Azuine, M. A., Rao, G. S., Arai, T., Iida, A., & Tokuda, H. (2011). Cytotoxic Effect of the Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extract Compared to Doxorubicin (Adriamycin) in the Human Prostate (PC-3) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *11*(3), 280–284. <http://dx.doi.org/10.2174/187152011795347504>

Keller, W. (1936). Inheritance of Some Major Color Types in Beets. *Journal of Agricultural Research*, *52*(1), 27–38. <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43968811/PDF>

Khan, M. I., Kumar, A., & Giridhar, P. (2016). Betalains and expression of antioxidant enzymes during development and abiotic stress in *Rivina humilis* L. berries. *Turkish Journal of Botany*, *40*(1), 28–36. <https://doi.org/10.3906/bot-1405-32>

Kishima, Y., Suiko, M., & Adachi, T. (1991). Betalain Pigmentation in Petal of *Portulaca* is Preceded by a Dramatic Tyrosine Accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 137(4), 505–506. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80325-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80325-1)

Klein, F. R. S., Reis, A., Kleinowski, A. M., Telles, R. T., Amarante, L. do, Peters, J. A., & Braga, E. J. B. (2018). UV-B radiation as an elicitor of secondary metabolite production in plants of the genus *Alternanthera*. *Acta Botanica Brasilica*, 32(4), 615–623. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0120>

Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V., & Schliemann, W. (2001). Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry*, 56(5), 429–436. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00383-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00383-6)

Lagorio, M. G., Cordon, G. B., & Iriel, A. (2015). Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14, 1538–1559. <https://doi.org/10.1039/C4PP00370E>

Lakhotia, P., Singh, K. P., Singh, S. K., Singh, M. C., Prasad, K. V., & Swaroop, K. (2014). Influence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in bougainvillea callus cultures. *Indian Journal of Horticulture*, 71(3), 373–378.

Lechner, J. F., Wang, L., Rocha, C. M., Larue, B., Henry, C., McIntyre, C. M., ... Stoner, G. D. (2010). Drinking Water with Red Beetroot Food Color Antagonizes Esophageal Carcinogenesis in N -Nitrosomethylbenzylamine-Treated Rats. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 733–739. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0280>

Lerner, A. B., & Fritzpatrick, T. B. (1950). Biochemistry of melanin formation. *Physiological Reviews*, 30, 91–126. <https://doi.org/10.1152/physrev.1950.30.1.91>

Lopez-Nieves, S., Yang, Y., Timoneda, A., Wang, M., Feng, T., Smith, S. A., ... Maeda, H. A. (2018). Relaxation of tyrosine pathway regulation underlies the evolution of betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 217(2), 896–908. <https://doi.org/10.1111/nph.14822>

Lu, X., Wang, Y., & Zhang, Z. (2009). Radioprotective activity of betalains from red beets in mice exposed to gamma irradiation. *European Journal of Pharmacology*, 615(1–3), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.04.064>

Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>

Martínez-Parra, J., & Muñoz, R. (1997). An Approach to the Characterization of Betanine Oxidation Catalyzed by Horseradish Peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2984–2988. <https://doi.org/10.1021/jf970187m>

Martínez-Parra, J., & Muñoz, R. (2001). Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4064–4068. <https://doi.org/10.1021/jf0013555>

Morales, J. M. L., Rodríguez-Monroy, M., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2012). Betacyanin accumulation and guaiacol peroxidase activity in *Beta vulgaris* L. leaves following copper stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(3), 193–201. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.019>

Mueller, L. A., Hinz, U., & Zrýd, J. P. (1996). Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, 42(6), 1511–1515.

[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00171-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00171-9)

Mueller, L. A., Hinz, U., & Zryd, J. P. (1997a). The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*, *44*(4), 567–569. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00625-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00625-5)

Mueller, L. A., Hinz, U., Uze, M., Sautter, C., & Zryd, J. (1997b). Biochemical complementation of the betalain biosynthetic pathway in *Portulaca grandiflora* by a fungal 3,4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase. *Planta*, *203*, 260–263. <https://doi.org/10.1007/s004250050190>

Nakatsuka, T., Yamada, E., Takahashi, H., Imamura, T., Suzuki, M., Ozeki, Y., ... Nishihara, M. (2013). Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. *Scientific Reports*, *3*, 1970. <https://doi.org/10.1038/srep01970>

Paliwal, H., Goyal, S., Singla, S., & Daksh, S. (2016). Pigments from natural sources: an overview. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Issue*, *1*(3), 2455–2698. <https://doi.org/10.22271/pharmacy>

Piattelli, M., & Impellizzeri, G. (1970). 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*. *Phytochemistry*, *9*(12), 2553–2556. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85776-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85776-3)

Polturak, G., & Aharoni, A. (2018). “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant*, *11*(1), 7–22. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.008>

Polturak, G., Breitel, D., Grossman, N., Sarrion-Perdigones, A., Weithorn, E., Pliner, M.,

... Aharoni, A. (2015). Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytologist*, 210(1), 269–283. <https://doi.org/10.1111/nph.13796>

Polturak, G., Grossman, N., Vela-Corcia, D., Dong, Y., Nudel, A., Pliner, M., ... Aharoni, A. (2017). Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201707176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707176114>

Polturak, G., Heinig, U., Grossman, N., Battat, M., Leshkowitz, D., Malitsky, S., ... Aharoni, A. (2018). Transcriptome and Metabolic Profiling Provides Insights into Betalain Biosynthesis and Evolution in *Mirabilis jalapa*. *Molecular Plant*, 11(1), 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.002>

Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., & Nair, M. G. (2005). Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>

Ren, Q., Henes, B., Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2013). High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 13(1), 13–18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-18>

Sánchez-Ferrer, Á., Neptuno Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-T](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-T)

Sasaki, N., Abe, Y., Wada, K., Koda, T., Goda, Y., Adachi, T., & Ozeki, Y. (2005a). Amaranthin in feather cockscombs is synthesized via glucuronylation at the cyclo-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway. *Journal of Plant Research*, *118*(6), 439–442. <https://doi.org/10.1007/s10265-005-0237-z>

Sasaki, N., Wada, K., Koda, T., Kasahara, K., Adachi, T., & Ozeki, Y. (2005b). Isolation and characterization of cDNAs encoding an enzyme with glucosyltransferase activity for cyclo-DOPA from four o'clocks and feather cockscombs. *Plant and Cell Physiology*, *46*(4), 666–670. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci064>

Sasaki, N., Abe, Y., Goda, Y., Adachi, T., Kasahara, K., & Ozeki, Y. (2009). Detection of DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) activity using recombinant protein prepared from *Escherichia coli* cells harboring cDNA encoding DOD from *Mirabilis jalapa*. *Plant and Cell Physiology*, *50*(5), 1012–1016. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp053>

Sato, T., Kanda, K., Okawa, K., Takahashi, M., Watanabe, H., Hirano, T., ... Uchimiya, H. (2009). The tyrosinase-encoding gene of *Lentinula edodes*, *Letyr*, is abundantly expressed in the gills of the fruit-body during post-harvest preservation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(5), 1042–1047. <https://doi.org/10.1271/bbb.80810>

Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., & Ravishankar, G. A. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, *41*(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.071>

Schliemann, W., Kobayashi, N., & Strack, D. (1999). The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction. *Plant Physiology*, *119*(4), 1217–1232.

<https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1217>

Schliemann, W., Cai, Y., Degenkolb, T., Schmidt, J., & Corke, H. (2001). Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*, *58*(1), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00141-8)

Schwinn, K. E. (2016). The dope on L-DOPA formation for betalain pigments. *New Phytologist*, *210*(1), 6–9. <https://doi.org/10.1111/nph.13901>

Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2004). Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *64*(3), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.08.003>

Shimada, S., Inoue, Y. T., & Sakuta, M. (2005). Anthocyanidin synthase in non-anthocyanin-producing Caryophyllales species. *Plant Journal*, *44*(6), 950–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02574.x>

Shimada, S., Otsuki, H., & Sakuta, M. (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. *Journal of Experimental Botany*, *58*(5), 957–967. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl256>

Shimada, S., Takahashi, K., Sato, Y., & Sakuta, M. (2004). Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-anthocyanin-producing species in the caryophyllales. *Plant and Cell Physiology*, *45*(9), 1290–1298. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch156>

Shuster, V., & Fishman, A. (2009). Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *Journal of*

Molecular Microbiology and Biotechnology, 17(4), 188–200.

<https://doi.org/10.1159/000233506>

Sreekanth, D., Arunasree, M. K., Roy, K. R., Chandramohan Reddy, T., Reddy, G. V., & Reddanna, P. (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562.

Phytomedicine, 14(11), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.017>

Stafford, H. A. (1994). Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science*, 101(2), 91–98. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90244-5)

Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H., & Strack, D. (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208(1), 114–124.

<https://doi.org/10.1007/s004250050541>

Steiner, U., Schliemann, W., & Strack, D. (1996). Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. *Analytical Biochemistry*, 238(1), 72–75. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0253>

Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017.

Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 10 set. 2018.

Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.004>

Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research.

Phytochemistry, 62, 247–269. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00564-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2)

Sunnadeniya, R., Bean, A., Brown, M., Akhavan, N., Hatlestad, G., Gonzalez, A., ... Lloyd, A. (2016). Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). *PLoS ONE*, 11(2), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149417>

Suzuki, M., Miyahara, T., Tokumoto, H., Hakamatsuka, T., Goda, Y., Ozeki, Y., & Sasaki, N. (2013). Transposon-mediated mutation of *CYP76AD3* affects betalain synthesis and produces variegated flowers in four o'clock (*Mirabilis jalapa*). *Journal of Plant Physiology*, 171(17), 1586–1590. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.07.010>

Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, 54, 733–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>

Terradas, F., & Wyler, H. (1991a). 2,3- and 4,5-secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-DOPA by an enzyme system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains. *Helvetica Chimica Acta*, 74(1), 124–140. <https://doi.org/10.1002/hlca.19910740115>

Terradas, F., & Wyler, H. (1991b). The secodopas, natural pigments in *Hygrocybe conica* and *Amanita muscaria*. *Phytochemistry*, 30(10), 3251–3253. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83187-P](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83187-P)

Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2006). Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in β -thalassemia red blood cells.

Free Radical Research, 40(7), 753–761. <https://doi.org/10.1080/10715760600554228>

Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- κ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 111(03), 415–423. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002663>

Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M. S., & Ravishankar, G. A. (2003). Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. *Process Biochemistry*, 38(7), 1069–1076. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00234-0)

Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H., & Wichers, H. J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45(7), 1309–1323. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00186-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00186-6)

Velíšek, J., & Cejpek, K. (2011). Pigments of higher fungi - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(2), 87–102. <https://doi.org/10.17221/524/2010-CJFS>

Vogt, T., Zimmermann, E., Grimm, R., Meyer, M., & Strack, D. (1997). Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell-suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* indicative of their phylogenetic relationship with flavonoid glucosyltransferases? *Planta*, 203(3), 349–361. <https://doi.org/10.1007/s004250050201>

Vogt, T., Grimm, R., & Strack, D. (1999a). Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *Plant Journal*, 19(5),

509–519. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00540.x>

Vogt, T., Ibdah, M., Schmidt, J., Wray, V., Nimtz, M., & Strack, D. (1999b). Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry*, 52(4), 583–592. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00151-X)

Wang, C. Q., Chen, M., & Wang, B. S. (2007). Betacyanin accumulation in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. is induced by watering roots with H₂O₂. *Plant Science*, 172(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.015>

Wang, H., Li, Y., Zhang, K., Ma, Y., & Li, P. (2018). Feasibility and transcriptomic analysis of betalain production by biomembrane surface fermentation of *Penicillium novae-zelandiae*. *AMB Express*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0529-4>

Warhade, M. I., & Badere, R. S. (2018). *Fusarium oxysporum* cell elicitor enhances betalain content in the cell suspension culture of *Celosia cristata*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(2), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0511-x>

Watanabe, S., Ohtani, Y., Aoki, W., Uno, Y., Sukekiyo, Y., Kubokawa, S., & Ueda, M. (2018). Detection of betacyanin in red-tube spinach (*Spinacia oleracea*) and its biofortification by strategic hydroponics. *Plos One*, 13(9), e0203656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203656>

Weijn, A., Bastiaan-Net, S., Wichers, H. J., & Mes, J. J. (2012). Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genetics and Biology*, 55, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.10.004>

Wybraniec, S. (2005). Formation of Decarboxylated Betacyanins in Heated Purified Betacyanin Fractions from Red Beet Root (*Beta vulgaris* L.) Monitored by LC–MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3483–3487. <https://doi.org/10.1021/jf048088d>

Wybraniec, S., & Michałowski, T. (2011). New Pathways of Betanidin and Betanin Enzymatic Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9612–9622. <https://doi.org/10.1021/jf2020107>

Wyler, H., Meuer, U., Bauer, J., & Stravs-Mombelli, L. (1984). Cyclo-dopa glucoside and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helvetica Chimica Acta*, 67, 1348-1355. <https://doi.org/10.1002/hlca.19840670520>

Yamamoto, K. I., Kobayashi, N., Yoshitama, K., Teramoto, S., & Komamine, A. (2001). Isolation and purification of tyrosine hydroxylase from callus cultures of *Portulaca grandiflora*. *Plant and Cell Physiology*, 42(9), 969–975. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce125>

Zakharova, N. S., & Petrova, T. A. (2000). β -glucosidases from leaves and roots of the common beet *Beta vulgaris*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(4), 394–397. <https://doi.org/10.1007/BF02738049>

Objetivos

Esta Tese de Doutorado trata dos aspectos moleculares, bioquímicos e biológicos da L-DOPA extradiol dioxigenase do fungo *Amanita muscaria* visando os seguintes objetivos:

- i. Contextualizar DODAs de plantas, fungos e bactérias sob o ponto de vista filogenético e entender se existe uma relação entre a função da enzima com a sua sequência primária e estrutura;
- ii. Determinar se o gene *BvDODA1* e o seu parálogo *BvDODA2* são responsáveis pela diferença de cor de beterrabas *Golden* (amarelas) e *Boldor* (vermelhas);
- iii. Viabilizar a expressão heteróloga de L-DOPA extradiol dioxigenase de *A. muscaria* a partir da região codificadora (CDS) do gene *dodA* e caracterizar a sua atividade enzimática;
- iv. Obter ácido betalâmico e muscaflavina por via quimioenzimática e utilizar esta metodologia para a semissíntese de betalaínas e higoaurinas-modelo com potencial aplicação.

Capítulo 1

L-DOPA extradiol dioxigenases

Contextualização filogenética e funcional de variedades oriundas de diferentes linhagens evolutivas

Algumas enzimas encontradas na natureza ativam o oxigênio molecular, viabilizando uma ampla variedade de processos redox com relevância biológica. Por exemplo, algumas oxidases utilizam o oxigênio como um aceptor de elétrons produzindo peróxido de hidrogênio ou água. Oxigenases, catalisam a inserção de um ou dois átomos de oxigênio advindos do oxigênio molecular em seus substratos (Bugg, 2003).

São conhecidas diversas oxigenases. As catecol dioxigenases catalisam clivagens oxidativas em catecóis e catecóis substituídos. Rieske ou areno dioxigenases, proteínas ferro-enxofre que atuam predominantemente sobre hidrocarbonetos aromáticos; dioxigenases dependentes de α -cetogluturato, que catalisam reações de monohidroxilação e dessaturação utilizando α -cetogluturato como co-substrato; lipo- e ciclooxigenases, que catalisam a conversão de ácidos graxos poliinsaturados em hidroperóxidos lipídicos em animais e plantas; 2-hidroxiethylfosfonato dioxigenases, capazes de clivar ligações C-H em substratos alifáticos; e cisteína dioxigenases, envolvidas na metabolização da L-cisteína em mamíferos (Bugg, 2003; White & Flashman, 2016).

Grande parte das oxigenases requerem um cátion metálico como cofator. Ferro(II) e Ferro(III), em sistemas heme ou não-heme, vem sendo muito investigados (Bugg, 2003). Em plantas, oxigenases não-heme ferro-dependentes estão envolvidas em diversas

funções metabólicas primárias e secundárias. Oxigenases 2-oxoglutarato-dependentes catalisam as etapas-chaves da biossíntese de giberelinas, que atuam sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal. Dioxigenases também clivam carotenoides e geram precursores de espécies sinalizadoras, como estrigolactonas e ácido abscísico. Ainda, a dioxigenase acirredutona é fundamental na manutenção dos níveis celulares de *S*-adenosil-metionina, requerido na biossíntese de etileno (White & Flashman, 2016). Exemplos de dioxigenases ferro-dependentes contendo o grupo heme que estão envolvidas no metabolismo primário incluem a triptofano 2,3-dioxigenase e indoleamina 2,3-dioxigenase, que catalisam a clivagem oxidativa de triptofano e de outros derivados de indoleamina, respectivamente (Bugg, 2003).

Existem ainda dioxigenases que são dependentes de outros íons metálicos bivalentes, como a 3,4-diidroxifenilactato 2,3-dioxigenase da bactéria *Arthrobacter globiformis*, uma catecol extradiol dioxigenase manganês-dependente (Whiting *et al.*, 1996), e a flavonol 2,4-dioxigenase, cobre-dependente, envolvida na degradação de flavonoides pelo fungo *Aspergillus niger* (Hund *et al.*, 1999); bem como dioxigenases independentes de cofatores, como algumas 2,4-dioxigenases bacterianas, envolvidas na degradação de quinolinas (Bugg, 2003).

Alguns microorganismos utilizam hidrocarbonetos aromáticos como única fonte de energia e carbono, lançando mão de estratégias catabólicas aeróbias e anaeróbias que incluem a ativação do anel estável de benzeno e a sua clivagem, gerando intermediários comuns às demais vias metabólicas do organismo (Vaillancourt *et al.*, 2006). Na degradação bacteriana aeróbia de compostos aromáticos, por exemplo, enzimas oxigenases podem ativar o anel de benzeno ao catalisar a incorporação de substituintes contendo oxigênio, enquanto as dioxigenases catalisam a clivagem oxidativa do anel (Vaillancourt *et al.*, 2006). Essa enzimas são de grande interesse para aplicações em

biorremediação ambiental, devido ao seu potencial em degradar poluentes ambientais, como bifenis policlorados (PCBs), bem como sobre a possibilidade de aceitar como substrato xenobióticos estruturalmente similares aqueles que são metabolizados naturalmente (Vaillancourt *et al.*, 2006).

As dioxigenases catecólicas ferro-dependentes não-heme são as enzimas-chave na degradação bacteriana de compostos aromáticos no ambiente, as quais catalisam a clivagem oxidativa de catecóis e catecóis substituídos (Bugg, 2003). Essa classe de enzimas pode ser agrupada em duas famílias: as intradiol dioxigenases, as quais catalisam a clivagem da ligação C-C entre grupos hidroxila fenólicos e requerem um cofator mononuclear Fe(III) ligado por quatro cadeias laterais de aminoácidos: duas imidazólicas, de resíduos de histidinas, e duas fenólicas, de tirosinas, com a água como quinto ligante completando a estrutura birapimidal trigonal; e as extradiol dioxigenases, que catalisam a clivagem de ligações C-C adjacentes a grupos hidroxila fenólicos e utilizam como cofator um centro Fe(II) mononuclear ligado a duas histidinas e um ácido glutâmico ou outros íons metálicos bivalentes (Harayama & Rejik, 1989; Bugg, 2003; Bugg & Ramaswamy, 2008, **Figura 1-1**).

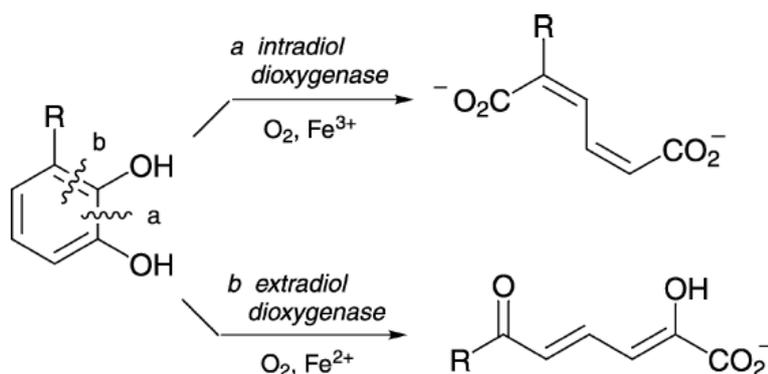


Figura 1-1. Reações catalisadas por intradiol e extradiol dioxigenases (Bugg, 2003).

Análises de genética comparativa de diversas dioxigenases sugerem que as enzimas intradiol consistem em uma família mais ancestral quando comparadas às extradiol dioxigenases (Harayama & Reikik, 1989). As extradiol dioxigenases podem ser agrupadas em pelo menos três famílias evolutivamente independentes: as de classe I, que inclui extradiol dioxigenases com um ou dois domínios pertencentes à superfamília quelato de oxigênio vicinal, como a catecol 2,3-dioxigenase; as de classe II, que engloba enzimas com uma ou duas diferentes subunidades e que evoluíram por duplicação gênica a partir das extradiol dioxigenases de classe I, como a protocatecolato 4,5-dioxigenase; e as de classe III, que compreende extradiol dioxigenases pertencentes à superfamília *cupin* com um domínio conservado em barril, como a homogentisato 1,2-dioxigenase, e que se diferenciam em sequência e estrutura das extradiol dioxigenases de classes I e II, embora compartilhem características comuns do sítio ativo (Vaillancourt *et al.*, 2006).

As reações catalisadas por intradiol e extradiol dioxigenases diferem-se desde as etapas iniciais (**Figura 1-2**): na clivagem extradiol, um catecolato monoânion é formado e o oxigênio é ativado pelo centro mononuclear Fe(II) não-heme como superóxido, seguido da formação da ligação C-O que gera um intermediário hidroperóxido proximal; já na clivagem intradiol, o substrato diânion é ativado pelo centro mononuclear Fe(III) não-heme e reage diretamente com o oxigênio molecular, produzindo um intermediário hidroperóxido similar ao produzido pelas extradiol dioxigenases. Em seguida, este intermediário é processado por dois diferentes rearranjos de Criegee: enquanto nas extradiol dioxigenases o peróxido sofre migração do grupo alcenil e origina um intermediário lactona de sete membros que é hidrolisado no produto final, nas intradiol dioxigenases este sofre uma migração do grupo acila e é hidrolisado em ácido mucônico (Bugg & Ramaswamy, 2008).

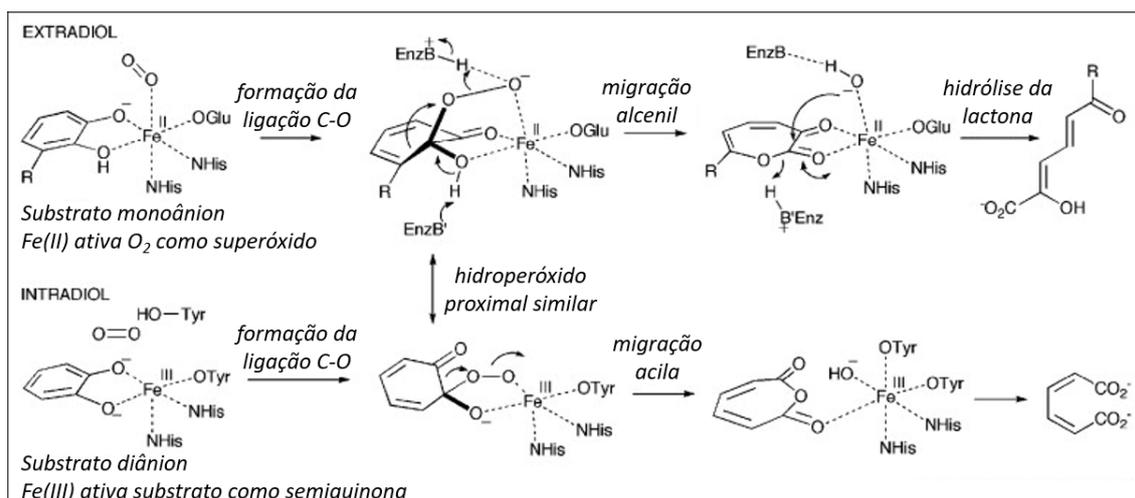


Figura 1-2. Comparação das principais etapas catalíticas em reações catalisadas por extradiol e intradiol dioxigenases (Bugg & Ramaswamy, 2008).

Uma das hipóteses levantadas para explicar o modo de clivagem dessas enzimas considera os fatores estereo-eletrônicos da espécie ferro-álquilperóxido em relação ao substrato orgânico, de modo que as extradiol dioxigenases formam espécies ferro-álquilperóxido cuja orientação favorece a migração alcenil, enquanto nas intradiol dioxigenases a migração acila é favorecida (Vaillancourt *et al.*, 2006). O fato de algumas enzimas intradiol dioxigenases, como a catecol 1,2-dioxigenase (pirocatecase), serem capazes de oxidar catecóis substituídos em uma mistura de produtos oriundos, majoritariamente, de clivagens intradiol e uma minoria de clivagens extradiol, bem como a possibilidade de mutações pontuais nas dioxigenases alterarem a especificidade extradiol à intradiol, parece sugerir que ambos os cofatores metálicos Fe(II) e Fe(III) são capazes de catalisar tanto clivagens intradiol quanto clivagens extradiol (Borowski & Siegbahn, 2006; Schlosrich *et al.*, 2006).

As estruturas cristalográficas de algumas extradiol dioxigenases revelam que o cofator metálico Fe(II) no sítio ativo é coordenado por um motivo tríade 2-His-1-carboxilato facial (*His2Glu/Asp*), constituído por dois resíduos de histidina e um de

glutamato ou aspartato. Esse motivo é encontrado em mais de 20 famílias de enzimas, incluindo oxigenases Fe(II)-dependentes não-heme, como a homogentisato dioxigenase humana, envolvida na degradação dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina em mamíferos, cuja disfunção está associada com importantes desordens metabólicas, como a alcaptonúria que leva à artrite degenerativa (Borowski *et al.*, 2005). A vantagem conferida pelo motivo *His2Glu/Asp* resulta no fato de que os dois resíduos de histidina e um resíduo de glutamato ou aspartato que se ligam ao metal no sítio ativo ocupam apenas uma face da esfera de coordenação, de forma que as outras três posições fornecem sítios para a ligação do oxigênio molecular, substratos orgânicos ou ligantes de água, permitindo um acoplamento eficiente da ativação do oxigênio molecular e a oxidação do substrato, além de proteger o centro metálico da auto-oxidação (Buongiorno & Straganz, 2013). No caso das extradiol dioxigenases, acredita-se que os oxigênios da hidroxila do substrato catecólico ocupam duas dessas posições, enquanto o oxigênio molecular ocupa a terceira, de tal modo que os dois substratos estariam eletronicamente conectados por um metal, o que facilitaria a transferência de elétron do catecol ao oxigênio molecular (Lipscomb, 2008). Embora a maioria dos centros mononucleares Fe(II) não-heme das extradiol dioxigenases sejam ligados a duas histidinas e um carboxilato, alguns centros metálicos atípicos são conhecidos, incluindo aqueles onde o Fe(II) aparece coordenado por duas ou três histidinas, três histidinas e um carboxilato ou até mesmo quatro cadeias laterais de histidina (Buongiorno & Straganz, 2013).

As reações catalisadas por intradiol e extradiol dioxigenases não são restritas apenas a rotas catabólicas envolvendo a degradação de anéis aromáticos e podem ser observadas em vias de biossíntese de uma grande variedade de compostos biologicamente ativos como, por exemplo, na clivagem oxidativa do anel aromático de L-3,4-diidróxifenilalanina (L-DOPA) durante a biossíntese dos antibióticos lincomicina e

antramicina (Vaillancourt *et al.*, 2006), bem como em uma reação similar catalisada pela L-DOPA extradiol dioxigenase (DODA) que leva à biossíntese de ácido betalâmico, a etapa-chave da biossíntese de betalaínas, uma classe de pigmentos naturais de ocorrência restrita a plantas Caryophyllales e alguns fungos basidiomicetos (Terradas & Wyler, 1991).

Dados de filotranscritômica em Caryophyllales parecem indicar que, nesta Ordem de plantas vasculares, DODA possui uma origem única, cuja evolução se deu por meio de duplicações e neofuncionalização a partir de *DODA β*, uma variante mais ancestral, dando origem à variante *DODAα*, característica de Caryophyllales que acumulam betalaínas (Brockington *et al.*, 2015). Até o momento, ortólogos de *DODAα* foram caracterizados funcionalmente nas flores onze-horas (*Portulaca grandiflora*, PgDODA) (Christinet *et al.*, 2004) e maravilha (*Mirabilis jalapa*, MjDODA) (Sasaki *et al.*, 2009), e também em beterraba (*Beta vulgaris*, BvDODA) (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2012). Essas enzimas catalisam uma clivagem oxidativa 4,5-extradiol no anel aromático de L-DOPA resultando na produção de 4,5-*seco*-DOPA, que cicliza-se espontaneamente em ácido betalâmico, o precursor das betalaínas.

Algumas Caryophyllales betalaínicas, como a beterraba e a flor maravilha, possuem duplicações de genes *DODAα* cujas funções não são muito bem estabelecidas. Em beterrabas, por exemplo, sabe-se que a enzima BvDODA1 está envolvida na biossíntese de betalaínas (Hatlestad *et al.*, 2012), entretanto, até pouco tempo, não se conhecia nada a respeito do papel funcional do seu parólogo *BvDODA2*.

Ao contrário do clado de *DODA α*, envolvido apenas na catálise 4,5-extradiol em Caryophyllales betalaínicas, a DODA do fungo basidiomiceto agário-das-moscas (*Amanita muscaria*, AmDODA) exibe promiscuidade catalítica e pode catalisar uma clivagem 2,3-extradiol adicional gerando muscaflavina, o isômero do ácido betalâmico e

precursor de uma outra classe de pigmentos naturais aparentemente exclusiva de fungos: as higroaurinas (Hinz *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1997). Análises comparativas entre DODAs de Caryophyllales e AmDODA têm sugerido que essas linhagens não compartilham uma origem evolutiva comum e que seriam, portanto, um exemplo de convergência evolutiva (Christinet *et al.*, 2004; Brockington *et al.*, 2015). Recentemente, o gene *ygiD*, que também codifica para uma DODA promíscua (EcoDODA) funcionalmente homóloga à AmDODA e, portanto, capaz de catalisar clivagens 2,3/4,5-extradiol que levam à síntese de betalainas e higroaurinas a partir de L-DOPA, foi encontrado no genoma da bactéria *Escherichia coli* e caracterizado funcionalmente por meio de sua expressão heteróloga (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2014). Porém, as relações evolutivas entre EcoDODA e DODAs de outras bactérias, fungos e plantas ainda não foram investigadas.

Além disso, embora alguns homólogos putativos de DODAs tenham sido identificados em táxons de angiospermas não-betalainicos, sua relação com variantes específicas envolvidas na biossíntese de betalainas é desconhecida (Brockington *et al.*, 2015). Dada a ausência de registros na literatura comparando a origem e função de DODAs de diferentes linhagens evolutivas, decidimos analisar comparativamente DODAs de plantas, fungos e bactérias com vistas a compreender as relações evolutivas e funcionais desta enzima e contribuir com o entendimento sobre a pigmentação por betalainas na natureza.

1-1. Objetivos

- Contextualizar DODAs de plantas, fungos e bactérias sob o ponto de vista filogenético e entender se existe uma relação entre a função da enzima com a sua sequência primária;
- Avaliar se eventuais diferenças nos níveis de transcrição dos principais genes de betalaínas e de *BvDODA2*, parálogo de *BvDODA1*, são responsáveis pela diferença de cor de beterrabas *Golden* (amarelas) e *Boldor* (vermelhas).

1-2. Resultados e Discussão

1-2-1. A DODA de *Amanita muscaria* é homóloga a de outros fungos Basidiomicetos e Ascomicetos

Buscando compreender as relações filogenéticas entre DODAs de diferentes linhagens evolutivas, examinamos, inicialmente, a DODA do fungo *Amanita muscaria* (AMAMU), a qual foi a primeira enzima da via de betalaínas a ser caracterizada funcionalmente (Hinz *et al.*, 1997). É importante ressaltar que, embora possamos encontrar pelo menos outras duas sequências DODA-like putativas no genoma de *A. muscaria* (DOE Joint Genome Institute – JGI), estas não foram consideradas em nossas análises pelo fato de não terem sido reconhecidas oficialmente nos bancos de dados de nucleotídeos e proteínas, bem como não terem sido caracterizadas estruturalmente e funcionalmente.

Em fungos, além do gênero *Amanita sp.*, o acúmulo de betalaínas foi relatado para os gêneros *Hygrocybe sp.* e *Hygrosporus sp.* (Delgado-Vargas *et al.*, 2000) e, recentemente, para o fungo *Penicillium novae-zelandiae* quando cultivado em condições fermentativas (Wang *et al.*, 2018). Entretanto, nenhuma informação sobre a DODA ou sobre o genoma desses organismos está disponível na literatura, o que não torna possível a sua comparação com a AMAMU.

Ao buscarmos por sequências de aminoácidos homólogas à AMAMU, encontramos 79 sequências de DODAs de fungos com identidade maior ou igual a 60%. Estas sequências pertencem, em geral, a fungos saprófitos, lignolíticos e que vivem em simbiose com outras plantas, incluindo fungos utilizados na alimentação humana, como o buna-shimeji (*Hypsizygus marmoreus*, Agaricales), champignon (*Agaricus bisporus*, Agaricales) e maitake (*Grifola frondosa*, Polyporales); na medicina oriental (*Wolfiporia*

cocos, *Trametes versicolor* e *Ganoderma sinense*, Polyporales); como corantes naturais em têxteis (*Pisolithus tinctorius*, Boletales); na agricultura (*Laccaria bicolor*, Agaricales); e como psicodélicos (*Galerina marginata* e *Psilocybe cubensis*, Agaricales - um dos cogumelos alucinógenos mais populares do mundo). Alguns desses fungos exibem relevantes papéis ecológicos, seja na ciclagem de nutrientes (*Fomitopsis pinicola*, Polyporales), biorremediação (*Laccaria amethystina*, Agaricales – capaz de bioacumular arsênio), ou como promotores do crescimento vegetal e indutores do sistema de defesa contra fitopatógenos (*Trichoderma gamsii* e *Trichoderma atroviride*, Hypocreales) (Figura 1-3).

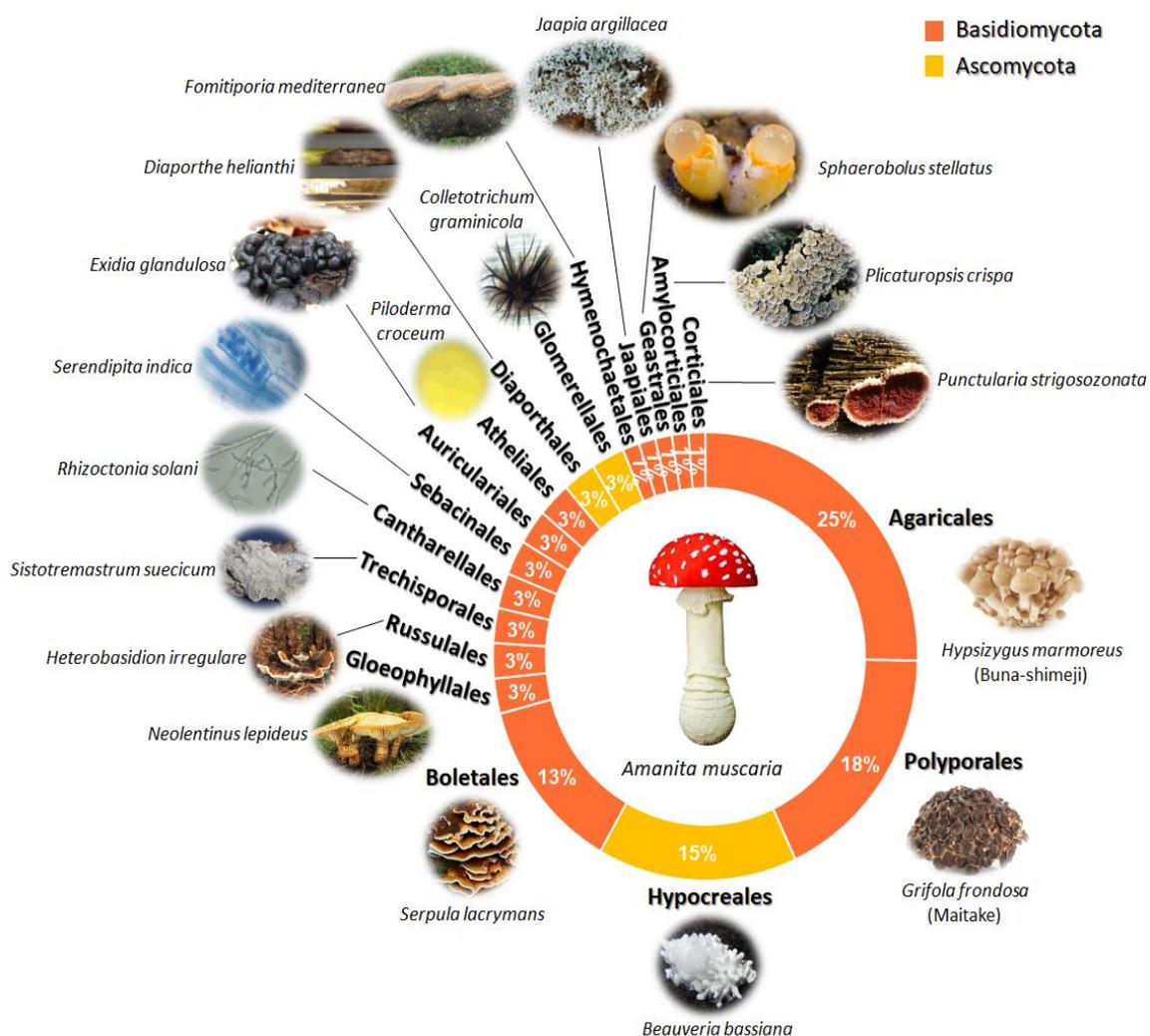


Figura 1-3. Distribuição, em táxons, das sequências de aminoácidos de DODAs de fungos com identidade maior ou igual a 60% em relação à DODA de *A. muscaria* (AMAMU). As sequências homólogas foram identificadas utilizando-se a ferramenta *Blastp* (NCBI). Sequências de fungos Basidiomicetos e Ascomicetos são representadas nas cores laranja e amarela, respectivamente, e exemplos de fungos pertencentes a cada Ordem são apresentados. Imagens: *Google Images*.

Também encontramos sequências homólogas à AMAMU em alguns fungos patogênicos, incluindo um patógeno oportunista de humanos imunocomprometidos (*Trichoderma citrinoviride*, Hypocreales), entomopatógenos (*Cordyceps confragosa* e *Beauveria bassiana*, Hypocreales) e fitopatógenos de importância agrônômica, como os que causam a podridão seca (*Serpula lacrymans*, Boletales), monilíase (*Moniliophthora roreri*, Agaricales), antracnose (*Colletotrichum orbiculare* e *Colletotrichum graminicola*, Glomerellales), podridão do colo (*Rhizoctonia solani*, Cantharellales), mancha cinzenta da haste do girassol (*Diaporthe helianthi*, Diaporthales), esca (*Fomitiporia mediterranea*, Hymenochaetales) e a doença-do-pinheiro (*Heterobasidion irregulare*, Russulales). Entretanto, não há relatos na literatura acerca da produção de betalainas nessas espécies de fungos.

Grande parte das espécies encontradas são basidiomicetos (79,7%) que pertencem à Ordem Agaricales (25,3%), o mesmo táxon de *A. muscaria*, o que confirma as relações filogenéticas entre as DODAs desses organismos (**Figura 1-3**). A sequência da DODA do basidiomiceto *Neolentinus lepideus* (Gloeophyllales) exibiu o maior nível de identidade em relação à AMAMU (80%) e este só não foi maior porque a porção N-terminal de AMAMU, especificamente pouco mais dos 40 primeiros resíduos, não compartilha nenhuma região de homologia com outras DODAs, conforme observado em um alinhamento realizado entre a sequência de AMAMU e outras dez sequências com maior identidade à esta (**Figura 1-4**).

Curiosamente, ao publicarem a sequência do gene *dodA* que codifica para a DODA de *A. muscaria*, Hinz e coautores relataram que os clones de cDNA obtidos não eram completos e resultavam na expressão de uma proteína com perda de cerca dos 27 primeiros aminoácidos da região N-terminal, os quais não eram importantes para a estabilidade do polipeptídeo e para a atividade enzimática (Hinz *et al.*, 1997). Essas observações nos levaram à examinar cuidadosamente a região codificadora do gene *dodA* e à sugerir uma revisão desta sequência, a qual será abordada com detalhes no Capítulo 2.

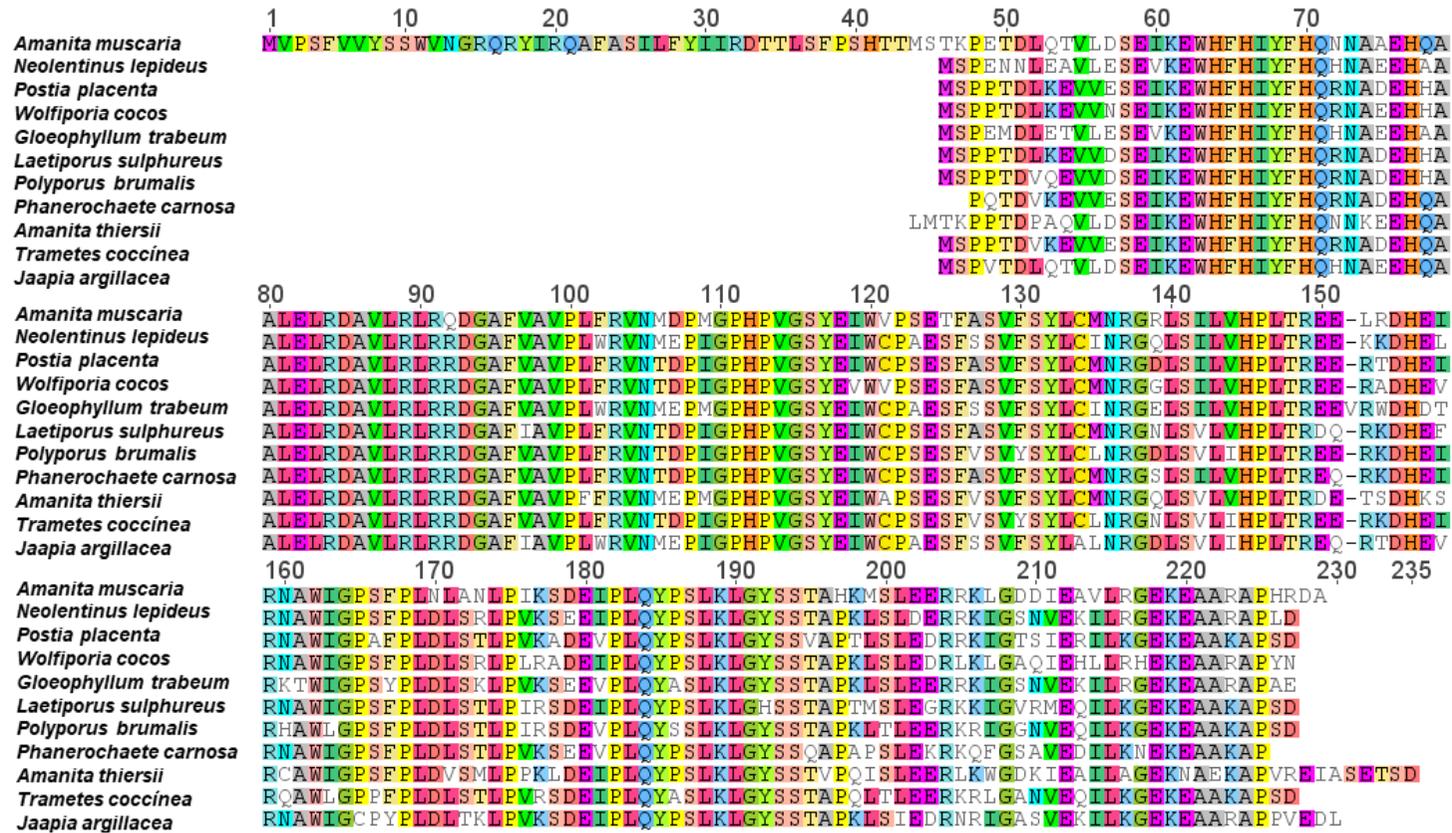


Figura 1-4. Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos da DODA de *A. muscaria* (AMAMU) e dez sequências de DODAs com maior identidade à esta utilizando-se a ferramenta de alinhamento *MUSCLE* no programa *Geneious*. As sequências das DODAs aparecem em ordem de identidade em relação à sequência da DODA de *A. muscaria*. Os resíduos de aminoácidos idênticos são destacados.

1-2-2. DODAs de *Amanita muscaria* e *Caryophyllales* apresentam convergência evolutiva

Em busca de pistas que explicassem a promiscuidade catalítica observada em AMAMU em contraste com a especificidade catalítica de DODAs de *Caryophyllales*, decidimos investigar as relações entre as sequências de AMAMU e de DODAs das *Caryophyllales* betaláinicas representativas *Amaranthus hypocondriacus* (AhDODA), *B. vulgaris* (BvDODA1), *Bougainvillea glabra* (BgDODA), *M. jalapa* (MjDODA1) e *Portulaca grandiflora* (PgDODA). No primeiro alinhamento, gerado com a matriz de substituição *BLOSUM62* (*BLOCKS of Amino Acid SUBstitution Matrix*), a sequência de AMAMU praticamente não se alinha com as de DODAs *Caryophyllales*, exceto por poucos resíduos espaçados na região N-terminal de AMAMU (**Figura 1-5a**). Esta ferramenta, a qual é ideal para o alinhamento de sequências de proteínas divergentes, busca por regiões conservadas de famílias proteínas considerando a frequência relativa de aminoácidos e suas probabilidades de substituição (Henikoff & Henikoff, 1992) e, portanto, a ausência de “blocos” conservados entre as sequências de AMAMU e de DODA de *Caryophyllales* penaliza o alinhamento. Ao utilizarmos a ferramenta de alinhamento múltiplo *MUSCLE* (*MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation*), de boa acurácia e rapidez (Edgar, 2004), alguns resíduos pontuais de AMAMU, idênticos ou similares aos de DODAs de *Caryophyllales* são identificados, embora sejam bem espaçados e que não resultam em um bom alinhamento num contexto geral (**Figura 1-5b**). Ambos os alinhamentos confirmaram a homologia esperada entre as DODAs de *Caryophyllales*, com uma identidade de sequência de pouco mais de 38%, e revelaram que DODAs de *Caryophyllales* não possuem homologia com AMAMU, como já observado anteriormente para AMAMU e PgDODA (Christinet *et al.*, 2004), o que sugere, portanto, uma evolução convergente entre DODAs de plantas e AMAMU.



Figura 1-5. Alinhamento de seqüências de aminoácidos entre DODAs do fungo *Amanita muscaria* (AMAMU, em vermelho) e de Caryophyllales betalaínicas representativas (em magenta): *Amaranthus hypocondriacus* (AhDODA), *Beta vulgaris* (BvDODA1), *Bougainvillea glabra* (BgDODA), *Mirabilis jalapa* (MjDODA1) e *Portulaca grandiflora* (PgDODA). Segmentos na cor verde representam resíduos com 100% de similaridade; em amarelo, 60-99% de similaridade; e em branco, menos que 60% de similaridade. Os alinhamentos apresentados foram gerados com o software *Geneious* (v. 7.0.6), utilizando-se as ferramentas *Blosum62* (a) e *MUSCLE* (b).

1-2-3. DODAs de Caryophyllales e da bactéria *Escherichia coli* compartilham a mesma origem evolutiva

Uma vez determinada a relação evolutiva entre a DODA fúngica AMAMU e DODAs de Caryophyllales betalaínicas, decidimos explorar a DODA promíscua da bactéria *E. coli* (EcoDODA), homóloga em função à AMAMU. Um alinhamento gerado entre AMAMU, EcoDODA e algumas DODAs de Caryophyllales betalaínicas revelou que, embora EcoDODA compartilhe uma homologia funcional com a DODA fúngica AMAMU, não existe homologia em sequência entre essas enzimas, mas sim entre a EcoDODA, promíscua, e DODAs de Caryophyllales betalaínicas, de especificidade catalítica (**Figura 1-6**). Uma busca por homólogos de EcoDODA utilizando-se a ferramenta *Blastp*, do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), demonstrou que a enzima de bactérias também possui homologia com DODAs de plantas não-Caryophyllales, como por exemplo, uma enzima DODA-like de *Nelumbo nucifera* (flor-de-lótus, Proteales), cuja identidade com EcoDODA é de 40%. A busca por domínios conservados em EcoDODA no banco de dados do CDD (*Conserved Domain Database*, NCBI) resultou na identificação do domínio PRK10628 pertencente à superfamília *Extradiol dioxygenase 3B like*, a qual também inclui o domínio *45_DOPA_dioxygenase* conservado em DODAs de plantas, o que confirma a homologia entre EcoDODA e DODAs de plantas.

Dados preliminares de RT-qPCR obtidos a partir de amostras de bactérias *E. coli* sob cultivo padrão (37 °C, sob agitação) sugerem que o gene *ygiD*, que codifica para a EcoDODA, produz um nível de transcritos consideravelmente menor (Ct: 26,53) quando comparado ao do gene *housekeeping rrsA* (Ct: 14,92), que codifica para o rRNA 16S, componente da subunidade menor (30S) do ribossomo de *E. coli*. De forma similar ao que ocorre com os genes da via de biossíntese de betalaínas em Caryophyllales

submetidas a estresses bióticos e abióticos (Thimmaraju *et al.*, 2003; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2012; Casique-Arroyo *et al.*, 2014; Jain *et al.*, 2015), um aumento nos níveis de transcritos para o gene *ygiD* é relatado na literatura em dados de transcriptoma obtidos a partir do cultivo de *E. coli* em condições de estresse nutricional, de temperatura e no estágio de maturação do biofilme (Ito *et al.*, 2008, 2009; Jozefczuk *et al.*, 2010).

Dados recentes também sugerem que a biossíntese de betalainas pode ser induzida de acordo com as condições de cultivo do organismo, como acontece com o fungo *Penicillium novae-zelandiae* (Ascomycota, Ordem Eurotiales), isolado da planta *Festuca novae-zelandiae* (Wang *et al.*, 2018). Quando cultivado sob agitação, nenhuma produção de pigmento é detectada, porém quando cultivado sob condições fermentativas na superfície de uma biomembrana, a produção de pigmentos vermelhos contendo betalainas é observada, cuja abordagem tem sido explorada para a produção biotecnológica desses pigmentos em larga escala (Wang *et al.*, 2018). Dados de RNA-seq revelaram que a síntese de betalainas neste caso é precedida por um aumento no nível de transcritos que codificam enzimas com atividade de tirosinase, envolvidas na catálise da primeira etapa da via de betalainas (Wang *et al.*, 2018). Entretanto, não existem informações na literatura sobre a etapa-chave da biossíntese de betalainas, catalisada por DODA, neste fungo, o que limita a sua comparação com homólogos já caracterizados funcionalmente.

1-2-4. Não há uma relação entre a sequência primária de DODAs e sua função

Buscando entender, de forma geral, as relações filogenéticas entre homólogos de DODAs de diferentes linhagens evolutivas, amostramos 537 sequências de aminoácidos anotadas como DODA ou DODA-like no banco de dados de proteínas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) oriundas de fungos, bactérias, plantas não-Caryophyllales, plantas Caryophyllales betalaínicas, plantas Caryophyllales antocianínicas, demais eucariotos e uma espécie de Archaea. Em colaboração com o Prof. Dr. João Carlos Setubal (IQ/USP) e com o auxílio do Dr. Luiz Thiberio Rangel e Dr. José Patané, traçamos um perfil-HMM (*Hidden Markov Model*) para identificar homologias a partir do alinhamento múltiplo das sequências.

Um *heat map* gerado a partir da dissimilaridade entre as sequências permitiu identificar a existência de pelo menos quatro linhagens de DODAs de bactérias: três delas (**Figura 1-7**, subgrupos *a1-a3*) compartilham um nível alto de similaridade com sequências de outras bactérias; enquanto uma outra linhagem (**Figura 1-7**, subgrupo *a4*), que inclui a DODA de *E. coli*, apresenta similaridade com DODAs de plantas e *Methanobacterium congolense* (Archaea). A DODA do fungo *A. muscaria*, funcionalmente homóloga à DODA de *E. coli*, forma um clado definido (**Figura 1-7**, subgrupo *b*) juntamente com grande parte das sequências de fungos analisadas, as quais não apresentam similaridade considerável com DODAs de bactérias e plantas. Portanto, não há uma relação direta entre a sequência de aminoácidos e a promiscuidade catalítica exibida pelas DODAs do fungo *A. muscaria* e da bactéria *E. coli*. As demais DODAs de eucariotos não apresentam similaridade com outras linhagens, exceto a de alguns fungos, similares ao subgrupo *b* (**Figura 1-7**), que inclui a DODA de *A. muscaria*.

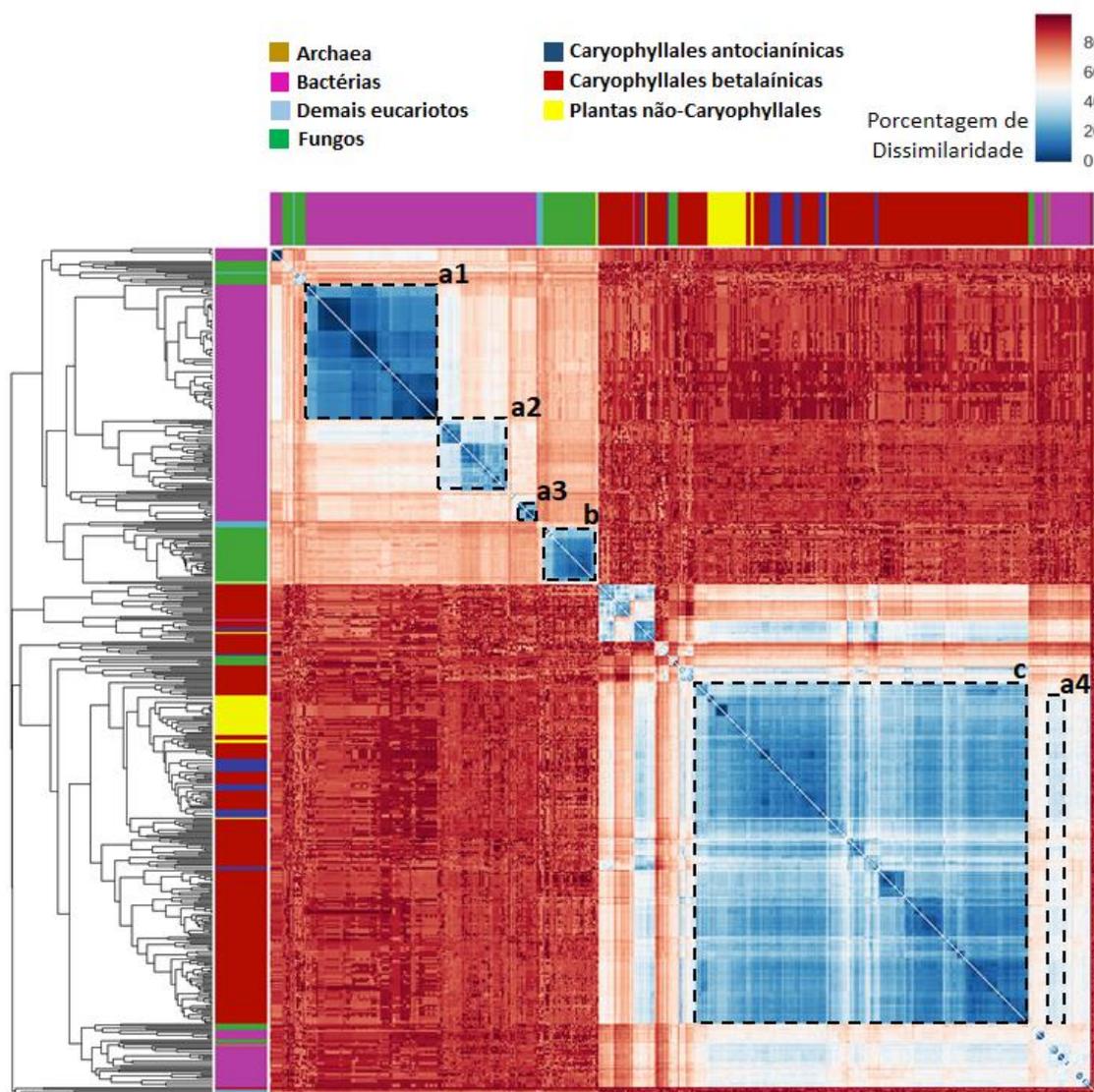


Figura 1-7. Heat map gerado a partir da matriz de dissimilaridade baseada no perfil-HMM (*Hidden Markov Model*) após o alinhamento múltiplo de 537 sequências de DODAs obtidas a partir do banco de dados do NCBI. As linhas pontilhadas destacam 6 subgrupos contendo DODAs com considerável nível de similaridade entre si: **a** correspondem a linhagens de DODAs de bactérias; **b** de fungos, incluindo *Amanita muscaria*; e **c** consiste em um grande grupo que engloba DODAs de plantas Caryophyllales e não-Caryophyllales. O subgrupo **a4** ilustra algumas DODAs de bactérias similares às DODAs de plantas. Dados obtidos em colaboração com o Prof. Dr. João Carlos Setubal, Dr. Luiz Thiberio Rangel e Dr. José Patané (IQ/USP).

As DODAs de plantas formam um grande grupo (**Figura 1-7**, subgrupo **c**) caracterizado por um alto grau de similaridade entre as sequências, o que reflete uma origem evolutiva comum entre as enzimas de Caryophyllales betalainicas, antocianínicas

e das demais plantas. Esses dados corroboram com análises filogenéticas de linhagens de DODAs de Caryophyllales, as quais sugerem uma origem única para DODA que, a partir da variante ancestral *DODA β* presente em linhagens antocianínicas originou, por pelo menos 11 eventos de duplicação gênica e neofuncionalização, a variante *DODA α* , a qual sofreu seleção positiva e se tornou especializada na biossíntese de betalainas (Brockington *et al.*, 2015).

Uma árvore filogenética gerada a partir do alinhamento das 537 sequências de DODAs confirma, em uma escala de análise maior, a homologia entre DODAs de plantas e EcoDODA e a convergência funcional entre DODAs de fungos e plantas, embora estas não compartilhem uma origem comum (**Figura 1-8**). Apesar da evolução de DODAs ser bem explorada em Caryophyllales, informações sobre a evolução de linhagens de DODAs em fungos são limitadas, sobretudo, devido ao número restrito de sequências putativas identificadas como homólogas à DODA nesses organismos.

A posição das enzimas DODA α AhDODA, BgDODA, BvDODA1, MjDODA1 e PgDODA, envolvidas na biossíntese de betalainas em Caryophyllales, é destacada na árvore, assim como as enzimas AtLigB, um homólogo de DODA relacionada à produção de arabidopironas na não-Caryophyllales modelo *Arabidopsis thaliana*; e BvDODA2, uma enzima homóloga à BvDODA1 e que não está envolvida na síntese de betalainas. Curiosamente, EcoDODA, homóloga às DODAs de plantas, possui homologia apenas com um pequeno número de DODAs de bactérias, enquanto a maioria das DODAs de bactérias agrupam-se em um ramo distante na árvore, o que sugere que as enzimas deste grupo podem estar envolvidas com a clivagem oxidativa durante o catabolismo de anéis aromáticos, como é comumente observado em diversos microrganismos. Devido a similaridade estrutural com o sítio catalítico de DODAs de bactérias, acredita-se que

outras enzimas DODA-like, como a BvDODA2 e homólogos de DODAs encontrados em plantas não-betalaínicas, também possam estar relacionados com a metabolização de compostos aromáticos (Christinet *et al.*, 2004). Em *Nicotiana benthamiana*, por exemplo, o silenciamento do gene DODA-like resulta em um aumento na susceptibilidade à patógenos hemibiotróficos, o que sugere o envolvimento desta enzima no metabolismo de compostos aromáticos com atividade antimicrobiana (Bahramnejad *et al.*, 2010).

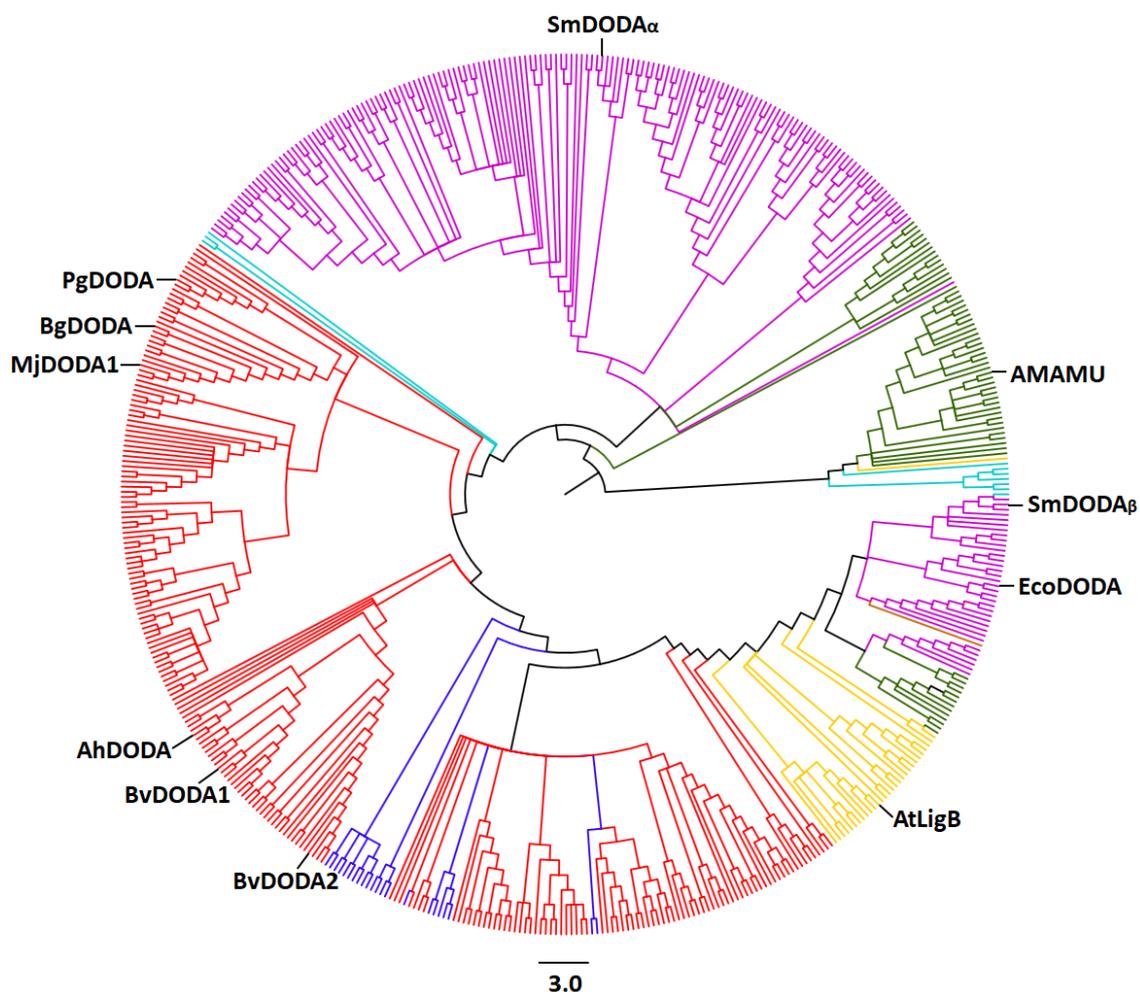


Figura 1-8. Árvore gerada a partir do alinhamento de 537 sequências de aminoácidos de DODAs de fungos, plantas e bactérias. Algumas DODAs envolvidas na biossíntese de betalaínas são destacadas: AhDODA, de *Amaranthus hypocondriacus*; AMAMU, de *Amanita muscaria*; BgDODA, de *Bougainvillea glabra*; BvDODA1, de *Beta vulgaris*; EcoDODA, de *Escherichia coli*; MjDODA1, de *Mirabilis jalapa*; PgDODA, de *Portulaca grandiflora*; além de BvDODA2, uma enzima homóloga à BvDODA1 e sem envolvimento na síntese de betalaínas; AtLigB, envolvida na produção de fenilpropanoides, encontrada na não-Caryophyllales *Arabidopsis thaliana*; e as DODAs SmDODA α e SmDODA β , encontradas na bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*.

Dados obtidos em colaboração com o Prof. Dr. João Carlos Setubal, Dr. Luiz Thiberio Rangel e Dr. José Patané (IQ/USP).

A presença de linhagens de fungos e bactérias nas linhagens de DODAs de plantas sugere a ocorrência de eventos de transferência horizontal entre estes organismos, a qual requer análises de reconciliação filogenética para ser, de fato, comprovada. Algumas bactérias e fungos contemplados nestas análises são comumente encontrados associados às plantas como, por exemplo, a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*. Curiosamente, nós observamos a ocorrência de duas diferentes linhagens de DODAs nesta bactéria: uma delas, aqui denominada SmDODA α , apresenta 24,7% de identidade com a sequência de AMAMU, as quais compartilham o domínio *DOPA_dioxygen* (pfam08883). Por outro lado, a outra sequência, identificada como SmDODA β , apresenta 40,4% de sítios idênticos à BvDODA1, as quais compartilham o domínio *45_DOPA_dioxygenase* (cd07363), membro da superfamília Dioxygenase-extradiol de classe III, a mesma superfamília do domínio identificado na EcoDODA (**Figura 1-9**).

Neste contexto, *S. maltophilia* se torna um excelente modelo para o estudo de evolução em DODAs ao reunir, em um mesmo organismo, DODAs de diferentes linhagens evolutivas. Isso pode ser usado tanto para explorar a funcionalidade de ambas as DODAs nesta bactéria quanto para posicioná-las em um contexto evolutivo, uma vez que este organismo pode ser um elo importante na evolução das linhagens de DODAs de fungos e plantas.

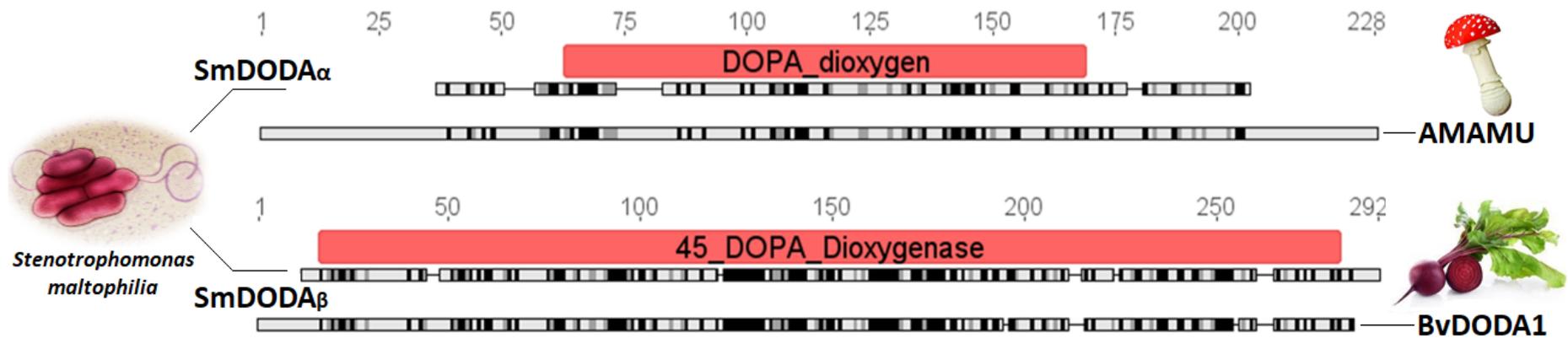


Figura 1-9. Alinhamento das sequências de DODAs de *Stenotrophomonas maltophilia* (bactéria, SmDODA α/β) com DODAs de *Amanita muscaria* (fungo, AMAMU) e *Beta vulgaris* (Caryophyllales, BvDODA1). As regiões correspondentes aos domínios das proteínas estão destacadas em vermelho, as quais foram identificadas no banco de dados CDD/NCBI (*Conserved Domain Database*). Os segmentos em preto dentro das sequências representam os resíduos de aminoácidos idênticos entre as sequências comparadas.

1-2-5. DODAs de Caryophyllales exibem um padrão de resíduos catalíticos conservado

Embora nenhum dado esteja disponível sobre a estrutura tridimensional de DODAs, Christinet e colaboradores identificaram uma identidade de 34% e similaridade de 48% entre a sequência de aminoácidos de PgDODA e o domínio LigB (*45_DOPA_Dioxygen*) presente em diversas extradiol 4,5-dioxigenases bacterianas envolvidas no metabolismo de compostos aromáticos (Christinet *et al.*, 2004). Este domínio foi identificado pela primeira vez na subunidade β da enzima LigAB protocatecuato 4,5-dioxigenase (PCA 4,5-dioxigenase) da bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, cuja estrutura cristalográfica é resolvida (Sugimoto *et al.*, 1999). Ao analisar comparativamente as sequências de PgDODA e PCA 4,5-dioxigenase de *S. paucimobilis*, Christinet e colaboradores identificaram resíduos de aminoácidos conservados no sítio catalítico de DODA que estariam envolvidos com a orientação do substrato aromático e com a coordenação do cofator Fe^{2+} . Para verificarmos se estes resíduos eram conservados entre sequências de DODAs de outros organismos, estendemos esta análise para DODAs de plantas não-Caryophyllales e de Caryophyllales pertencentes às famílias Molluginaceae e Caryophyllaceae, as quais acumulam antocianinas, além de DODAs de bactérias com homologia à DODA de plantas (**Figura 1-10**).

	1	10	20	30	40	50	60
● <i>Xanthomonas translucens</i>							
● <i>Escherichia coli</i>					MTPLVKDIIMSSTRMPALFLGH	-GSPMNVLEDNLYTR	---SSWQKL
● <i>Acetobacter pasteurianus</i>					MPIPGSSLP	RQPVLF	PHGGGCP
● <i>Bacillus thuringiensis</i>					MMPSLFLAH	-GSPMLAIQD	TDYTR-FLKTLG--
● <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					MSRLPSLYISH	-GSPMTALHPGQV	GVRLGEL----
● <i>Glycine soja</i>					MALKDTFYISH	-GSPTLSIDESI	QARKFLQSWK--
● <i>Nicotiana tabacum</i>					MALPLK	LKETFFISH	-GSPTLSIDESL
● <i>Solanum lycopersicum</i>					MGSQMAVPVNETFFISH	-GSPMLSIDDSL	PARHFLKCFN--
● <i>Brassica oleracea</i>					MKPLELVGETESKNQDLTKTRERERDSMEKVNQ	TFFLSH	-GSPTLSIDDSLEARQFFKSWT--
● <i>Arabidopsis thaliana</i>					MEKVNQ	TFFLSH	-GSPTLSIDDSLEARQFFKSWT--
● <i>Trigastrotheca pentaphylla</i>					D	TFVSH	-GAPSLAVDDSL
● <i>Mollugo verticillata</i>					E	TFVSH	-GSPTLSIDESL
● <i>Schiedea membranacea</i>					D	TFVSH	-GSPMLSIDDSL
● <i>Spergularia media</i>							
● <i>Silene latifolia</i>							
● <i>Amaranthus hypocondriacus</i>							
● <i>Beta vulgaris</i>							
● <i>Chenopodium quinoa</i>							
● <i>Mirabilis jalapa</i>							
● <i>Portulaca grandiflora</i>							
● <i>Xanthomonas translucens</i>							
● <i>Escherichia coli</i>							
● <i>Acetobacter pasteurianus</i>							
● <i>Bacillus thuringiensis</i>							
● <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>							
● <i>Glycine soja</i>							
● <i>Nicotiana tabacum</i>							
● <i>Solanum lycopersicum</i>							
● <i>Brassica oleracea</i>							
● <i>Arabidopsis thaliana</i>							
● <i>Trigastrotheca pentaphylla</i>							
● <i>Mollugo verticillata</i>							
● <i>Schiedea membranacea</i>							
● <i>Spergularia media</i>							
● <i>Silene latifolia</i>							
● <i>Amaranthus hypocondriacus</i>							
● <i>Beta vulgaris</i>							
● <i>Chenopodium quinoa</i>							
● <i>Mirabilis jalapa</i>							
● <i>Portulaca grandiflora</i>							
● <i>Xanthomonas translucens</i>							
● <i>Escherichia coli</i>							
● <i>Acetobacter pasteurianus</i>							
● <i>Bacillus thuringiensis</i>							
● <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>							
● <i>Glycine soja</i>							
● <i>Nicotiana tabacum</i>							
● <i>Solanum lycopersicum</i>							
● <i>Brassica oleracea</i>							
● <i>Arabidopsis thaliana</i>							
● <i>Trigastrotheca pentaphylla</i>							
● <i>Mollugo verticillata</i>							
● <i>Schiedea membranacea</i>							
● <i>Spergularia media</i>							
● <i>Silene latifolia</i>							
● <i>Amaranthus hypocondriacus</i>							
● <i>Beta vulgaris</i>							
● <i>Chenopodium quinoa</i>							
● <i>Mirabilis jalapa</i>							
● <i>Portulaca grandiflora</i>							
● <i>Xanthomonas translucens</i>							
● <i>Escherichia coli</i>							
● <i>Acetobacter pasteurianus</i>							
● <i>Bacillus thuringiensis</i>							
● <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>							
● <i>Glycine soja</i>							
● <i>Nicotiana tabacum</i>							
● <i>Solanum lycopersicum</i>							
● <i>Brassica oleracea</i>							
● <i>Arabidopsis thaliana</i>							
● <i>Trigastrotheca pentaphylla</i>							
● <i>Mollugo verticillata</i>							
● <i>Schiedea membranacea</i>							
● <i>Spergularia media</i>							
● <i>Silene latifolia</i>							
● <i>Amaranthus hypocondriacus</i>							
● <i>Beta vulgaris</i>							
● <i>Chenopodium quinoa</i>							
● <i>Mirabilis jalapa</i>							
● <i>Portulaca grandiflora</i>							

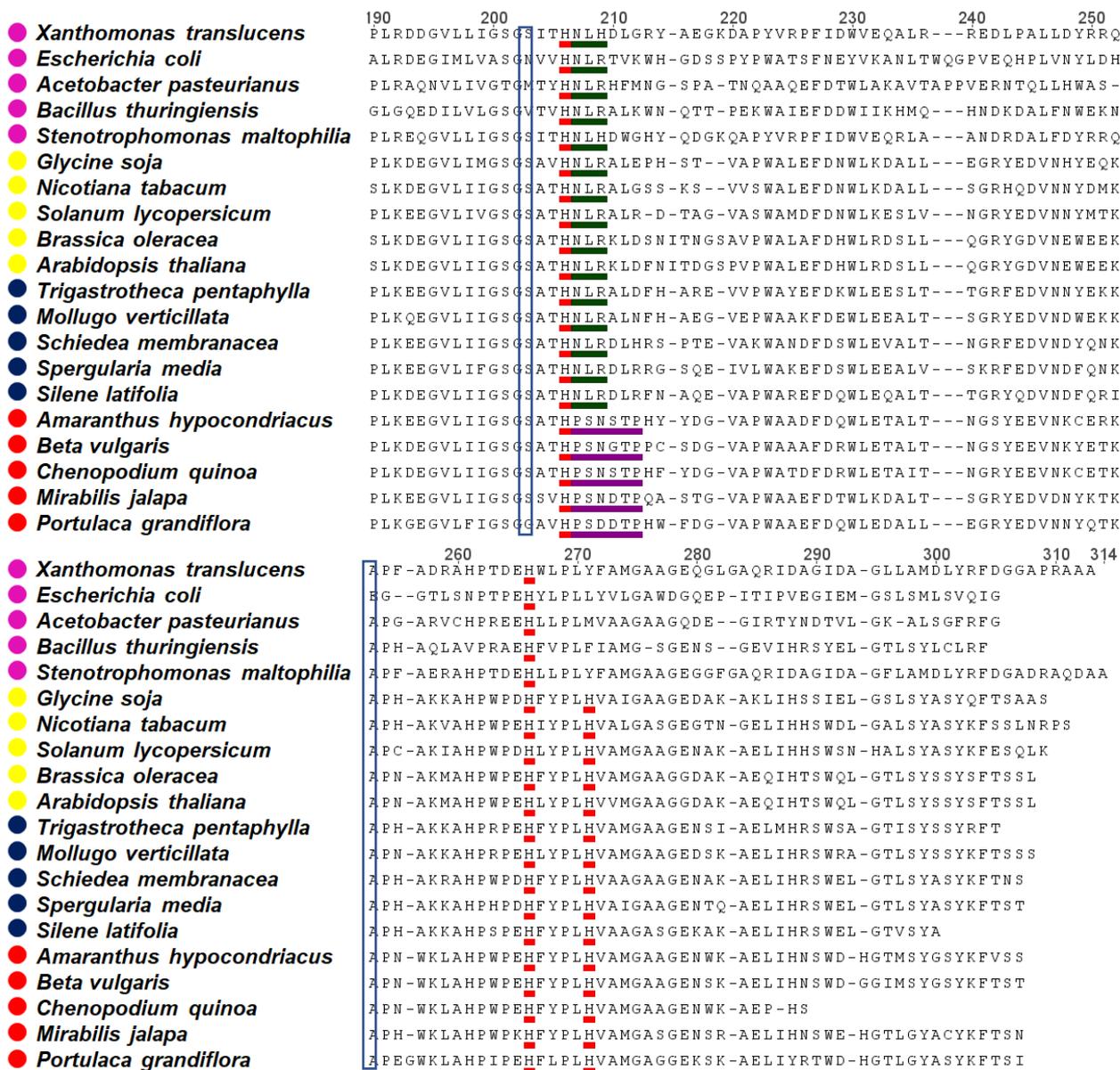


Figura 1-10. Identificação de resíduos conservados entre DODAs de bactérias (magenta), plantas não-Caryophyllales (amarelo), Caryophyllales que acumulam antocianinas (azul) e Caryophyllales que acumulam betalainas (vermelho). Essas sequências possuem o domínio LigB em comum com a enzima PCA 4,5-dioxigenase de *Spingomonas paucimobilis*, cuja estrutura cristalográfica é conhecida e foi utilizada por Christinet e coautores para identificar na sequência de PgDODA os resíduos responsáveis pela orientação do substrato aromático no sítio catalítico (identificados neste alinhamento como Ser-38, His-150 e His-206) e os resíduos envolvidos com a coordenação com o cofator Fe²⁺ (His-39, His-81 e His-266) (Christinet *et al.*, 2004). As posições 207 e 257 do alinhamento são destacadas para indicar que os aminoácidos Pro-207 e Trp-257 (W) são invariavelmente conservados em DODAs de Caryophyllales que produzem betalainas (Brockington *et al.*, 2015). O resíduo His-271 mostrou-se conservado apenas entre DODAs de plantas. Os resíduos seguintes à posição His-206 possuem um padrão

conservado entre DODAs de Caryophyllales (H-P-S-N/D-x-T-P, destacado em magenta), o qual difere claramente de um outro padrão encontrado nas demais DODAs (H-N-L-R/H, destacado em verde).

Esta análise revelou que os resíduos relacionados à orientação do substrato no sítio catalítico em enzimas com domínio LigB (identificados como Ser-38, His-150 e His-206 no alinhamento da **Figura 1-10**) e os resíduos envolvidos com a coordenação do cofator Fe²⁺ não-heme (His-39, His-81 e His-266, **Figura 1-10**) são estritamente conservados em todas as sequências analisadas. Nós também encontramos o padrão de resíduos H-P-S-N/D-x-T-P como sendo característico de DODAs de Caryophyllales que produzem betalaínas, em contraste com as DODAs dos demais organismos aqui analisados, onde este padrão é substituído por H-N-L-R/H. A identificação deste motivo corrobora com os resultados obtidos por Christinet e coautores ao comparar PgDODA e DODAs de algumas arqueobactérias, monocotiledôneas e briófitas (Christinet *et al.*, 2004). Este padrão conservado entre Caryophyllales que produzem betalaínas segue o resíduo His-206, invariável e essencial para a atividade catalítica de enzimas extradiol dioxigenases de classe III, como é o caso de PgDODA e PCA 4,5-dioxigenase de *S. paucimobilis*. Modelagens preliminares tridimensionais comparativas entre essas enzimas sugerem que os aminoácidos que seguem His-206 poderiam atuar controlando o acesso do substrato ao sítio catalítico de DODAs e, portanto, estariam envolvidos com a especificidade ao substrato (Christinet *et al.*, 2004). Porém, informações sobre a promiscuidade de DODAs quanto ao substrato só estão disponíveis para AMAMU, do fungo *A. muscaria* (Terradas & Wyler, 1991), a qual possui origem evolutiva distinta da DODA de plantas e pode aceitar outros catecóis em seu sítio ativo.

Nossos resultados também confirmam em outras linhagens o que foi observado por Brockington e coautores (2015) em análises de filotranscritômica de Caryophyllales com flores, os quais sugerem que os resíduos Pro-207 (P) e Trp-257 (W) (**Figura 1-10**) são diagnósticos de DODAs especializadas na biossíntese de betalaínas, denominadas DODA α , os quais são substituídos quase que invariavelmente por Asn-207 (N) e Ala-257 (A) (**Figura 1-10**) nas demais DODAs de Caryophyllales, denominadas DODA β (Brockington *et al.*, 2015). Recentemente, foi demonstrado em beterrabas que mutações que resultam na substituição de pelo menos sete resíduos de aminoácidos da DODA não-funcional BvDODA2, por aqueles da enzima paróloga DODA α BvDODA1, torna BvDODA2 capaz de catalisar a síntese de ácido betalâmico a partir de L-DOPA, o que permitiu a identificação dos resíduos-chave relacionados à evolução de DODAs betalaínicas em plantas (Bean *et al.*, 2018).

Eventos de duplicação também foram encontrados para o gene *CYP76AD1* (Brockington *et al.*, 2015), que codifica para uma enzima do citocromo P450 envolvida na etapa inicial da via de betalaínas, cuja variante CYP76AD1 α , assim com DODA α , parece ser betalaína-específica, uma vez que esses *loci* são perdidos ou silenciados nos táxons antocianínicos Molluginaceae e Caryophyllaceae (Brockington *et al.*, 2015). Logo, embora seja sugerido que alguns componentes genéticos para a expressão de betalaínas estejam presentes em plantas não-Caryophyllales (Harris *et al.*, 2012), apenas a substituição do motivo característico de DODA α em DODAs de plantas não-Caryophyllales não faria por si só, com que essas plantas acumulassem betalaínas, uma vez que a variante betalaína-específica CYP76AD1 α também é requerida para a expressão do pigmento (Hatlestad *et al.*, 2012; Brockington *et al.*, 2015).

A perda ou silenciamento de homólogos de DODA α e CYP76AD1 α em Caryophyllales antocianínicas tem sido levantada como uma possível explicação molecular sobre a exclusão de betalaínas nessas espécies, em contraste com a exclusão de antocianinas em táxons betalaínicos, a qual parece ocorrer como consequência de um mecanismo regulatório (Brockington *et al.*, 2015). Juntamente com a existência de linhagens pigmentadas por antocianinas intercalada com linhagens pigmentadas por betalaínas em Caryophyllales, esses dados, parecem suportar a hipótese da origem única de betalaínas em plantas, em que o ancestral das Caryophyllales antocianínicas Molluginaceae e Caryophyllaceae teriam possuído uma via pigmentada por betalaínas completamente funcional, a qual foi perdida ou silenciada nos táxons antocianínicos (Brockington *et al.*, 2015).

Contextualizando as informações disponíveis na literatura com os dados aqui obtidos, podemos propor que AMAMU, a DODA promíscua do fungo *A. muscaria* e DODAs de especificidade catalítica encontrada em Caryophyllales pertencem a linhagens evolutivas completamente independentes e, portanto, consistem em um caso de convergência evolutiva. Embora a evolução da DODA da linhagem de fungos não seja bem compreendida, a evolução desta enzima em Caryophyllales é bem caracterizada, onde a presença de um padrão de resíduos catalíticos altamente conservado permite distinguir duas variantes. DODA β , mais ancestral, sofreu eventos de duplicação e neofuncionalização e deu origem à variante DODA α , presente em todas as Caryophyllales betalaínicas, mas que é perdida ou silenciada em Caryophyllales antocianínicas e, por isso, parece ser uma variante betalaína-específica. Nossos resultados confirmam a ocorrência de resíduos diagnósticos conservados para DODA α em Caryophyllales betalaínicas e para DODA β em Caryophyllales antocianínicas, plantas

não-Caryophyllales e bactérias. Entretanto, não é possível correlacionar a sequência primária de todas as variantes de DODAs com suas funções. A DODA da bactéria *E. coli* (EcoDODA), por exemplo, promíscua e funcionalmente homóloga à AMAMU, possui homologia de sequência com a DODA β de Caryophyllales, embora essa variante em plantas não esteja associada com a biossíntese de betalainas, como já demonstrado para a enzima BvDODA2 em beterrabas (Bean *et al.*, 2018). O mesmo é observado para a enzima AtLigB em *Arabidopsis thaliana*, a qual é homóloga às DODAs de plantas, mas não é betalaina-funcional e está envolvida na biossíntese de uma classe de fenilpropanoides (Weng *et al.*, 2012).

A presença de homólogos de DODA em linhagens de plantas, fungos e bactérias sugere a ocorrência de eventos de transferência horizontal entre esses organismos, a qual requer análises de reconciliação filogenética para ser validada. Esta hipótese é reforçada ao analisarmos a bactéria *S. maltophilia*, a qual apresenta uma DODA com homologia à DODA β de plantas e outra DODA com homologia à do fungo *A. muscaria*. Embora a biossíntese de betalainas e higoaurinas não seja observada nesta espécie, a presença de DODAs com origens evolutivas diferentes em um mesmo organismo, torna esta bactéria um alvo interessante para explorar a evolução de DODAs.

De forma geral, os resultados aqui apresentados mostram-se relevantes para direcionar futuros experimentos que possam elucidar questões que permanecem abertas para o entendimento da evolução da DODA e, conseqüentemente, da pigmentação por betalainas na natureza. Acredita-se que esta classe de pigmentos poderia conferir vantagens adaptativas aos organismos que a produzem (Brockington *et al.*, 2011). Algumas evidências têm confirmado esta hipótese, como o fato desses pigmentos serem eficientes em lidar com espécies reativas de oxigênio e estar envolvidos com mecanismos

de fotoproteção e tolerância ao estresse salino e seca (Savitha *et al.*, 2006; Casique-Arroyo *et al.*, 2014; Jain & Gould, 2015; Jain *et al.*, 2015), associados ao fato das isoformas betalína-específicas DODA α e CYP76AD1 α terem sofrido seleção positiva em sua evolução (Brockington *et al.*, 2015). Além disso, nossa hipótese de transferência horizontal de genes durante a evolução de DODAs presume que a fixação desses genes seja uma consequência de algum tipo de vantagem adaptativa conferida aos organismos.

Embora a significância biológica do estabelecimento da via de betalínas em plantas seja mais bem elucidado, pouco se sabe sobre a importância desses pigmentos em fungos e bactérias. Nesse sentido, a caracterização funcional de linhagens de DODA β , por exemplo, poderia esclarecer o funcionamento desta variante em plantas não-Caryophyllales, bactérias e alguns fungos que possuem homologia à esta, contribuindo para o entendimento dos mecanismos que expliquem a ausência de pigmentação nesses organismos.

A compreensão sobre a origem, evolução e o mecanismo catalítico de DODAs de diferentes linhagens evolutivas pode permitir o desenvolvimento de métodos para a obtenção de enzimas recombinantes direcionadas à produção em larga escala de betalínas, de interesse comercial (Thimmaraju *et al.*, 2003; Georgiev *et al.*, 2008; Sekiguchi *et al.*, 2010). Além disso, há um grande potencial para explorar a promiscuidade da DODA na biorremediação de compostos não-naturais, como hidrocarbonetos aromáticos policondensados e sistemas fenólicos e catecólicos que impactam o meio ambiente, os quais poderiam ser convertidos em intermediários comuns ao metabolismo, como é relatado para dioxigenases bacterianas que degradam compostos aromáticos (Moorman, 2018).

1-2-6. Não há uma relação entre a expressão de transcritos de genes parálogos de DODA e a coloração em variedades de beterrabas amarelas e vermelhas

L-DOPA extradiol dioxigenases (DODAs) desempenham um papel crucial na biossíntese de betalainas. Sabe-se que em beterrabas (*B. vulgaris*), o gene *BvDODA1* codifica para uma DODA envolvida nesta via (Hatlestad *et al.*, 2012). Entretanto, até pouco tempo atrás, não havia nenhuma informação disponível na literatura sobre o papel funcional do parálogo *BvDODA2* e o seu possível envolvimento na síntese de betalainas. Diante deste cenário, buscamos, inicialmente, por pistas que confirmassem ou não o envolvimento de *BvDODA2* na biossíntese de betalainas. Então, analisamos a abundância de transcritos de *BvDODA2* em variedades de beterrabas *Golden* (amarelas) e *Boldor* (vermelhas) com o objetivo de verificar se este gene era transcrito e se poderia existir uma possível correlação entre a diferença de pigmentação nessas variedades e a ocorrência desses transcritos em beterrabas.

Nós observamos que o gene *BvDODA2* é transcrito nas variedades *Golden* e *Boldor*, não havendo diferenças significativas na abundância destes transcritos entre elas (**Figura 1-11**). O mesmo foi observado para o gene parálogo *BvDODA1*, sabidamente envolvido na via de betalainas e, portanto, não foi possível correlacionar a diferença de pigmentação entre essas variedades com a expressão diferencial de transcritos desses parálogos de DODA.

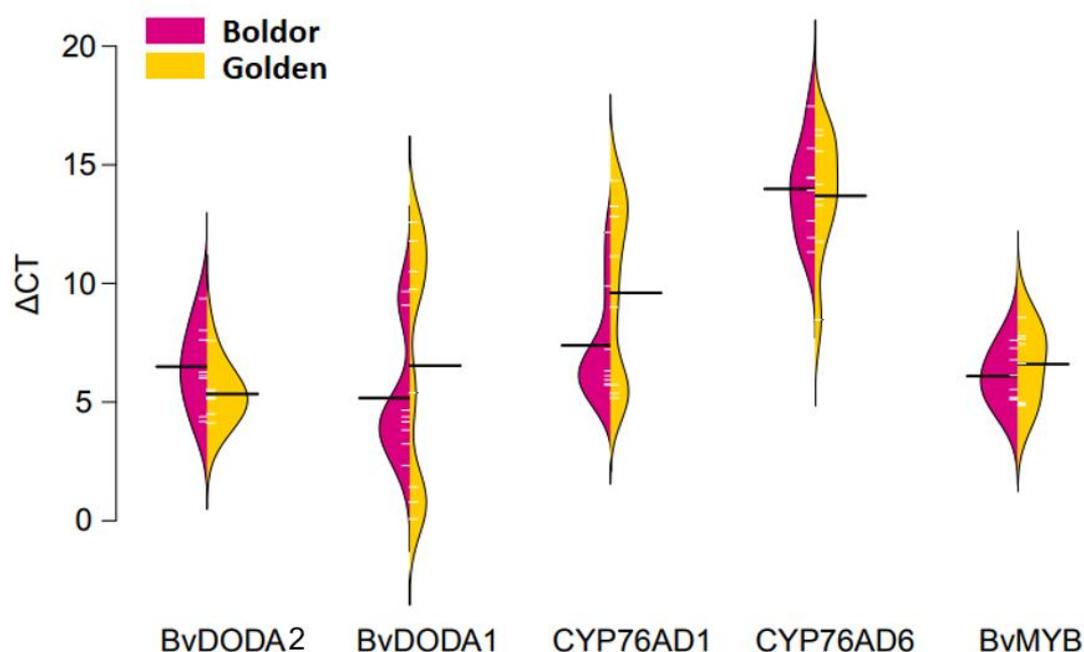


Figura 1-11. *Bean plot* para os valores de Ct (*cycle threshold*) do gene *BvDODA2* e outros quatro genes envolvidos na biossíntese de betalaínas (*BvDODA1*, *CYP76AD1*, *CYP76AD6* e *BvMYB1*) a partir de análises de RT-qPCR. As cores magenta e amarela correspondem aos dados para as variedades de beterraba *Boldor* e *Golden*, respectivamente. As linhas pretas representam as medianas e, linhas brancas, os dados para cada replicata biológica (n=8). *BvActin* foi utilizado como gene *housekeeping* na análise dos dados.

Recentemente, Bean e colaboradores (2018) observaram que quando a angiosperma não-betalaínica *Arabidopsis thaliana* era transformada com o gene *BvDODA1* e suplementada com o substrato de DODA L-DOPA, betaxantinas eram sintetizadas, assim como ocorria quando *BvDODA1* era superexpresso em beterrabas brancas (Bean *et al.*, 2018). Por outro lado, nenhum efeito era observado quando os mesmos experimentos eram realizados com o parálogo *BvDODA2*. Porém, quando resíduos específicos de *BvDODA2* eram alterados para os de *BvDODA1*, esta enzima se tornava apta a catalisar a formação de ácido betalâmico a partir de L-DOPA (Bean *et al.*, 2018). Resultados similares foram obtidos para os genes *MjDODA1* e *MjDODA2* em maravilha (*Mirabilis jalapa*), reforçando que apenas os produtos dos genes ortólogos

DODAI eram capazes de catalisar a síntese de ácido betalâmico (Bean *et al.*, 2018). Dessa forma, embora seja expresso em beterrabas, *BvDODA2* não está envolvido na biossíntese de betalainas e sua função em Caryophyllales ainda permanece desconhecida.

Nós também analisamos o nível de transcrição de outros três genes previamente associados à via de betalainas: *CYP76AD1* e *CYP76AD6*, que codificam para enzimas redundantes do citocromo P450 envolvidas na hidroxilação de L-tirosina à L-DOPA e na oxidação de L-DOPA à *ciclo*-DOPA (esta última etapa catalisada apenas por *CYP76AD1*); e *BvMYB1*, um fator de transcrição relacionado à regulação da via de betalainas e antocianinas em plantas. Para todos os genes analisados, não foram observadas diferenças significativas na abundância de transcritos entre as variedades de beterrabas *Golden* e *Boldor* (**Figura 1-11**).

Níveis similares de transcritos para o gene *BvDODAI* também foram observados por Hatlestad e colaboradores (2012) ao analisarem as variedades *Golden Globe* (amarela) e *Bull's Blood* (vermelha) (Hatlestad *et al.*, 2012). Por outro lado, uma redução na expressão de *CYP76AD1* foi relatado para beterrabas *Golden Globe*, cujo nível de transcritos foi de apenas 4% ao encontrado em beterrabas *Bull's Blood* (Hatlestad *et al.*, 2012). Ao investigarem a estrutura do gene *CYP76AD1* em beterrabas amarelas, os autores identificaram uma inserção de 5 pb (TAAAT) localizada a 325 pb antes do códon de término da tradução, a qual altera a fase aberta de leitura (ORF) e substitui 108 aminoácidos nativos por 27 novos resíduos, seguido de um códon de término prematuro, o que resulta na deleção do sítio de ligação ao anel heme e, portanto, em uma enzima *CYP76AD1* não-funcional (Hatlestad *et al.*, 2012). Como resultado, a síntese de *ciclo*-DOPA e, conseqüentemente, de betacianinas, as betalainas de cor vermelha, é

comprometida nessas variedades, o que explicaria apenas a ocorrência da pigmentação amarela.

Os genes da via de biossíntese de betalaínas são regulados positivamente por um fator de transcrição *MYB-like*, também encontrado na regulação da síntese de antocianinas, que é codificado pelo gene *BvMYB1*, localizado no *locus Y* de beterrabas (Hatlestad *et al.*, 2015). Variedades de beterrabas brancas são geneticamente recessivas para *BvMYB1* (*yy*), resultando em uma menor expressão dos genes de betalaínas e em baixos níveis desses pigmentos quando comparadas às variedades de beterrabas vermelhas (Bean *et al.*, 2018). Na beterraba branca *Blankoma*, por exemplo, Hatlestad e colaboradores (2012) observaram que os níveis de transcritos para os genes *CYP76ADI* e *BvDODAI* correspondiam a apenas 8,4% e 1,4%, respectivamente, dos níveis encontrados na variedade vermelha *Bull's Blood* (Hatlestad *et al.*, 2012). Neste contexto, o fato de não encontrarmos diferenças significativas na abundância de transcritos para o gene *BvMYB* entre as variedades *Golden* e *Boldor* corroboram com os dados disponíveis na literatura, uma vez que ambas as variedades de beterraba analisadas produzem grandes quantidades de betalaínas e, portanto, é esperado que a sua biossíntese esteja sendo regulada positivamente por um fator de transcrição *BvMYB1* ativo e funcional, cuja expressão só é diminuída em variedades que produzem baixos níveis de betalaínas.

1-3. Conclusões

- A DODA do fungo *A. muscaria* (AMAMU) apresenta homologia com outras DODAs de fungos basidiomicetos e ascomicetos, embora não existam evidências sobre o acúmulo de betalaínas e higoaurinas nestas espécies;
- A identidade de sequência de até 80% entre AMAMU e homólogos em outros fungos só não é maior porque pouco mais dos 40 primeiros aminoácidos de AMAMU são de ocorrência exclusiva desta enzima;
- A origem evolutiva de AMAMU é distinta da DODA de plantas, sendo, portanto, um exemplo de convergência evolutiva. Curiosamente, ao contrário do que se esperava observar, EcoDODA, a DODA de *E. coli* (bactéria), possui homologia de sequência com DODAs de plantas e não com AMAMU, com a qual compartilha homologia funcional;
- Análises filogenéticas entre DODAs de plantas, fungos e bactérias sugerem que a evolução deste gene em plantas se deu por eventos de duplicação e neofuncionalização, seguidos de perda ou silenciamento gênico em táxons de Caryophyllales antocianínicas, além de eventos de transferência horizontal de genes entre linhagens de plantas, fungos e bactérias;
- Padrões de resíduos catalíticos diagnósticos da linhagem ancestral *DODAβ* mantiveram-se conservados nas plantas e bactérias analisadas, assim como o padrão de resíduos catalíticos betalaína-específicos característico da linhagem *DODAα*;
- O gene *BvDODA2* e o seu parálogo *BvDODAI*, que catalisa a etapa-chave da biossíntese de betalaínas em beterrabas, não são diferencialmente transcritos em beterrabas amarelas e vermelhas. O mesmo é observado para os genes de

betalaínas *CYP76AD1*, *CYP76AD6* e *BvMYB*. Logo, não é possível associar a expressão de linhagens diferentes de DODAs com diferenças na pigmentação entre beterrabas amarelas e vermelhas.

1-4. Material e Métodos

1-4-1. Análises *in silico* de DODAs de diferentes linhagens evolutivas

Inicialmente, a sequência primária de aminoácidos da DODA do fungo *Amanita muscaria* (GenBank P87064) foi obtida a partir do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e utilizada na busca por homólogos pela ferramenta *Blastp* (NCBI). Dez sequências de fungos com maior identidade à DODA de *A. muscaria* foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI e alinhadas pelo algoritmo *MUSCLE*, com um máximo de 8 iterações, no programa *Geneious v.7.0.6 (Biomatters)*. Com a finalidade de comparar as sequências de DODAs entre o fungo *A. muscaria* e Caryophyllales betalaínicas, sequências de Caryophyllales representativas, a saber: *Amaranthus hypocondriacus* (ADZ48644), *Beta vulgaris* (I3PFJ3), *Bougainvillea glabra* (B6F0W9), *Mirabilis jalapa* (B6F0W8) e *Portulaca grandiflora* (Q7XA48) foram obtidas do banco de dados do NCBI e submetidas a um alinhamento global pelos algoritmos *BLOSUM62* e *MUSCLE* no programa *Geneious v.7.0.6 (Biomatters)*. Um novo alinhamento incluindo a sequência da bactéria *Escherichia coli* (P24197) foi realizado. Para compreender as relações entre DODAs de diferentes linhagens evolutivas, 537 sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados do NCBI como DOPA 4,5-dioxigenases foram obtidas e submetidas a um alinhamento global, seguido de uma análise de perfil-HMM (*Hidden Markov Model*), em colaboração com o Prof. Dr. João Carlos Setubal, Dr. Luiz Thiberio Rangel e Dr. José Patané (IQ/USP). Então, as sequências foram agrupadas no formato de um *heat map* de acordo com a porcentagem de dissimilaridade entre elas. O alinhamento múltiplo das sequências, obtido com o algoritmo *MUSCLE*, também foi utilizado para gerar uma árvore pelo método de *Neighbor-Joining* com *bootstrap* no programa *Geneious v.7.0.6 (Biomatters)*. Em seguida, a árvore foi enraizada pelo método MAD (*minimal*

ancestor deviation) (Tria *et al.*, 2017) e analisada no programa *FigTree* v.1.4.3. Por fim, algumas sequências representativas de DODAs de diferentes origens evolutivas foram utilizadas como consulta para a identificação de domínios conservados no banco de dados CDD (*Conserved Domain Database*, NCBI) (Marchler-Bauer *et al.*, 2017).

1-4-2. Análise da expressão de transcritos de *BvDODA2* e de genes de betalínas em beterrabas amarelas e vermelhas

Beterrabas das variedades *Golden* (amarela) e *Boldor* (vermelha) foram cultivadas em condições de campo até a época de colheita, sendo as amostras coletadas limpas e armazenadas em freezer a -20°C . O RNA total foi extraído a partir do hipocótilo congelado de oito replicatas biológicas de cada variedade de beterraba utilizando o *RNeasy[®] Plant Mini Kit* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. Todas as amostras de RNA foram tratadas com *DNaseI (RNase-free)* (Ambion[™]) e quantificadas em um espectrofotômetro *NanoDrop[®]* (Thermo Scientific). A integridade das amostras de RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% pela inspeção visual das bandas de RNA ribossomal coradas com brometo de etídeo. Um total de 1 μg de RNA foi utilizado em reações de transcrição reversa para gerar as amostras de cDNA utilizando-se um *primer oligo(dT)₂₀* e a enzima transcriptase reversa *SuperScriptIII* (Invitrogen). Uma alíquota dessas reações foi diluída 10 vezes em água *RNase-free* para serem utilizadas como molde nas reações de amplificação dos transcritos de interesse por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Os *primers* utilizados na amplificação dos genes *BvDODA* (HQ656022), *BvDODA1* (HQ656027), *BvCYP76AD1* (HQ656023), *BvCYP76AD6* (KM592962) e *BvMYB1* (JF432080) estão listados na **Tabela 2**. As reações foram preparadas em um volume final de 12 μL contendo: 2 μL de cDNA, 0,36 μL de cada *primer* (10 μM), 6 μL de *Fast SYBR[™] Green Master Mix* (Applied

Biosystems) e 3,28 μ L de água *RNase-free* estéril. As reações de RT-qPCR foram analisadas em triplicatas para cada amostra na plataforma *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) seguindo o protocolo: 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 1 minuto. A especificidade dos *amplicons* foi verificada pela análise da curva de *melting*. Todas as amplificações após 32 ciclos não foram consideradas nas análises. Os valores de Ct (*cycle threshold*) foram determinados automaticamente usando o *Real-Time PCR System software* (Applied Biosystems). As eficiências da PCR para todos os genes testados foram superiores à 95%. Os dados de abundância dos transcritos de interesse foram normalizados contra à mediana da abundância dos transcritos para o gene *housekeeping BvActin* (HQ656028) e analisados na ferramenta virtual *BoxPlotR*.

Tabela 2. *Primers* utilizados durante na amplificação dos genes de interesse por RT-qPCR.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	<i>GenBank</i>	Referência
BvACT F	TCTATCCTTGCATCTCTCAG	HQ656028	Hatlestad <i>et al.</i> (2012)
BvACT R	ATCATACTCGCCCTTGGAGA	HQ656028	Hatlestad <i>et al.</i> (2012)
BvDODA1 F	CATTGGTTCAGGAAGTGCAA	HQ656027	Hatlestad <i>et al.</i> (2012)
BvDODA1 R	ACGAAGCCATGAATCAAAGG	HQ656027	Hatlestad <i>et al.</i> (2012)
BvDODA2 F	ATGGGTGCCTCTAATGCTGA	HQ656022	-
BvDODA2 R	TGGTGTGTTCCATCCAAATG	HQ656022	-
BvCYP76AD1 F	CTTTTCAGTGGAATTAGCCCACC	HQ656023	Hatlestad <i>et al.</i> (2012)
BvCYP76AD1 R	CCCAATATCTTCCATAATGTTCCA	HQ656023	Hatlestad <i>et al.</i> (2012)
BvCYP76AD6 F	GCTAACCGAACCATTCTCTGA	KM592962	Sunnadeniya <i>et al.</i> (2016)
BvCYP76AD6 R	TTGGACAGCGGAGATTTTTC	KM592962	Sunnadeniya <i>et al.</i> (2016)
BvMYB11 F	GCCGACGATTCTGGCC	JF432080	Hatlestad <i>et al.</i> (2015)
BvMYB11 R	GATGGTCTTTGATAGCAGC	JF432080	Hatlestad <i>et al.</i> (2015)

1-5. Referências Bibliográficas

- Bahramnejad, B., Erickson, L. R., & Goodwin, P. H. (2010). Induction of expression and increased susceptibility due to silencing a 4,5-DOPA dioxygenase extradiol-like gene of *Nicotiana benthamiana* in the interaction with the hemibiotrophic pathogens, *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Science*, *178*(2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.10.007>
- Bean, A., Sunnadeniya, R., Akhavan, N., Campbell, A., Brown, M., & Lloyd, A. (2018). Gain-of-function mutations in beet *DODA2* identify key residues for betalain pigment evolution. *New Phytologist*, *219*(1), 287–296. <https://doi.org/10.1111/nph.15159>
- Borowski, T., Georgiev, V., & Siegbahn, P. E. M. (2005). Catalytic reaction mechanism of homogentisate dioxygenase: a hybrid DFT study. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(49), 17303–17314. <https://doi.org/10.1021/ja054433j>
- Borowski, T., & Siegbahn, P. E. M. (2006). Mechanism for catechol ring cleavage by non-heme iron intradiol dioxygenases: a hybrid DFT study. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(39), 12941–12953. <https://doi.org/10.1021/ja0641251>
- Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2011). Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist*, *190*, 854–864. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03687.x>
- Brockington, S. F., Yang, Y., Gandia-Herrero, F., Covshoff, S., Hibberd, J. M., Sage, R. F., ... Smith, S. A. (2015). Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, *207*(4), 1170–1180. <https://doi.org/10.1111/nph.13441>

Bugg, T. D. H. (2003). Dioxygenase enzymes: Catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59(36), 7075–7101. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00944-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00944-X)

Bugg, T. D. H., & Ramaswamy, S. (2008). Non-heme iron-dependent dioxygenases: unravelling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.12.007>

Buongiorno, D., & Straganz, G. D. (2013). Structure and function of atypically coordinated enzymatic mononuclear non-heme-Fe(II) centers. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(2), 541–563. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.028>

Casique-Arroyo, G., Martínez-Gallardo, N., De La Vara, L. G., & Délano-Frier, J. P. (2014). Betacyanin biosynthetic genes and enzymes are differentially induced by (a)biotic stress in *Amaranthus hypochondriacus*. *PLoS ONE*, 9(6), 19–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099012>

Christinet, L., Burdet, F. X., Zaiko, M., Hinz, U., & Zrýd, J.-P. (2004). Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiology*, 134(1), 265–274. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031914>

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

Edgar, R. C. (2004). *MUSCLE*: Multiple sequence alignment with high accuracy and high

throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2012). Characterization of recombinant *Beta vulgaris* 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase active in the biosynthesis of betalains. *Planta*, 236, 91–100. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1593-2>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013). *Escherichia coli* protein YgiD produces the structural unit of plant pigments betalains: characterization of a prokaryotic enzyme with DOPA-extradiol-dioxygenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4961-3>

Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., & Pavlov, A. (2008). Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581–593. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0170-6>

Harayama, S., & Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15328–15333. <https://doi.org/10.1155/2014/561567>

Harris, N. N., Javellana, J., Davies, K. M., Lewis, D. H., Jameson, P. E., Deroles, S. C., ... Schwinn, K. E. (2012). Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC Plant Biology*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-34>

Hatlestad, G. J., Sunnadeniya, R. M., Akhavan, N. a, Gonzalez, A., Goldman, I. L., McGrath, J. M., & Lloyd, A. M. (2012). The beet *R* locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*, 44(7), 816–820.

<https://doi.org/10.1038/ng.2297>

Hatlestad, G. J., Akhavan, N. A., Sunnadeniya, R. M., Elam, L., Cargile, S., Hembd, A., ... Lloyd, A. M. (2015). The beet *Y* locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. *Nature Genetics*, *47*(1), 92–96.
<https://doi.org/10.1038/ng.3163>

Henikoff, S., & Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(22), 10915–10919.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10915>

Hinz, U. G., Fivaz, J., Girod, P. A., & Zyrd, J. P. (1997). The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Molecular and General Genetics*, *256*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s004380050539>

Hund, H. K., Breuer, J., Lingens, F., Hüttermann, J., Kappl, R., & Fetzner, S. (1999). Flavonol 2,4-dioxygenase from *Aspergillus niger* DSM 821, a type 2 Cu(II)-containing glycoprotein. *European Journal of Biochemistry*, *263*(3), 871–878.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00574.x>

Ito, A., May, T., Kawata, K., & Okabe, S. (2008). Significance of *rpoS* during maturation of *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, *99*(6), 1462–1471.
<https://doi.org/10.1002/bit.21695>

Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., & Okabe, S. (2009). Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(12), 4093–4100. <https://doi.org/10.1128/AEM.02949-08>

Jain, G., & Gould, K. S. (2015). Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants? *Environmental and Experimental Botany*, *119*, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.002>

Jain, G., Schwinn, K. E., & Gould, K. S. (2015). Betalain induction by L-DOPA application confers photoprotection to saline-exposed leaves of *Disphyma australe*. *New Phytologist*, *207*(4), 1075–1083. <https://doi.org/10.1111/nph.13409>

Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhauser, D., ... Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, *6*(364), 1–16. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.18>

Lipscomb, J. D. (2008). Mechanism of extradiol aromatic ring-cleaving dioxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, *18*(6), 644–649. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.11.001>

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., ... Bryant, S. H. (2017). CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), 200–203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>

Morales, J. M. L., Rodríguez-Monroy, M., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2012). Betacyanin accumulation and guaiacol peroxidase activity in *Beta vulgaris* L. leaves following copper stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *81*(3), 193–201. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.019>

Mueller, L. A., Hinz, U., & Zryd, J. P. (1997). The formation of betalamic acid and

muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*, *44*(4), 567–569. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00625-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00625-5)

Sasaki, N., Abe, Y., Goda, Y., Adachi, T., Kasahara, K., & Ozeki, Y. (2009). Detection of DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) activity using recombinant protein prepared from *Escherichia coli* cells harboring cDNA encoding DOD from *Mirabilis jalapa*. *Plant and Cell Physiology*, *50*(5), 1012–1016. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp053>

Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., & Ravishankar, G. A. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, *41*(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.071>

Schlosrich, J., Eley, K. L., Crowley, P. J., & Bugg, T. D. H. (2006). Directed evolution of a non-heme-iron-dependent extradiol catechol dioxygenase: identification of mutants with intradiol oxidative cleavage activity. *ChemBioChem*, *7*(12), 1899–1908. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600296>

Sekiguchi, H., Ozeki, Y., & Sasaki, N. (2010). In vitro synthesis of betaxanthins using recombinant DOPA 4,5-dioxygenase and evaluation of their radical-scavenging activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(23), 12504–12509. <https://doi.org/10.1021/jf1030086>

Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2005). A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, *56*(412), 605–611. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri036>

Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M., & Mitsui, Y. (1999). Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure*, 7(8), 953–965. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80122-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80122-1)

Sunnadeniya, R., Bean, A., Brown, M., Akhavan, N., Hatlestad, G., Gonzalez, A., Symonds, V. V., & Lloyd, A. (2016) Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). PLoS ONE, 11(2), e0149417. <https://doi:10.1371/journal.pone.0149417>

Terradas, F., & Wyler, H. (1991). 2,3- and 4,5-secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-DOPA by an enzyme system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains. *Helvetica Chimica Acta*, 74(1), 124–140. <https://doi.org/10.1002/hlca.19910740115>

Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M. S., & Ravishankar, G. A. (2003). Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. *Process Biochemistry*, 38(7), 1069–1076. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00234-0)

Tria, F. D. K., Landan, G., & Dagan, T. (2017). Phylogenetic rooting using minimal ancestor deviation. *Nature Ecology & Evolution*, 1, 193. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0193>

Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2006). The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 241–267.

<https://doi.org/10.1080/10409230600817422>

Wang, H., Li, Y., Zhang, K., Ma, Y., & Li, P. (2018). Feasibility and transcriptomic analysis of betalain production by biomembrane surface fermentation of *Penicillium novae-zelandiae*. *AMB Express*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0529-4>

White, M. D., & Flashman, E. (2016). Catalytic strategies of the non-heme iron dependent oxygenases and their roles in plant biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.017>

Whiting, A. K., Boldt, Y. R., Hendrich, M. P., Wackett, L. P., & Que, L. (1996). Manganese(II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2. *Biochemistry*, 35(1), 160–170. <https://doi.org/10.1021/bi951979h>

Capítulo 2

L-DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*

Revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga, caracterização funcional e aplicação

A L-DOPA extradiol dioxigenase (DODA) é considerada a enzima-chave da via de biossíntese de betalainas por catalisar a conversão do substrato L-DOPA em ácido betalâmico, o cromóforo desta classe de pigmentos naturais. Em plantas, DODA catalisa apenas clivagens oxidativas entre as posições 4 e 5 do anel aromático de L-DOPA, resultando na formação de ácido betalâmico e, conseqüentemente, de betalainas. Entretanto, no fungo *Amanita muscaria*, DODA pode catalisar uma clivagem oxidativa adicional entre as posições 2 e 3 gerando muscaflavina, um isômero do ácido betalâmico que leva à produção de uma outra classe de pigmentos naturais de ocorrência aparentemente exclusiva em fungos: as higroaurinas. Conforme discutido no Capítulo anterior, embora sejam funcionalmente homólogas, DODAs de plantas e fungos possuem origens evolutivas completamente distintas (Christinet *et al.*, 2004).

O gene *dodA*, que codifica para a DODA de *A. muscaria*, foi o primeiro gene da via de biossíntese de betalainas a ser caracterizado (Hinz *et al.*, 1997). Utilizando um

anticorpo anti-DODA desenvolvido a partir da proteína nativa isolada de *A. muscaria*, Hinz e coautores identificaram um clone de cDNA que codificava para a DODA neste fungo (Hinz *et al.*, 1997). O clone de cDNA foi então isolado e expresso em *E. coli*, resultando em uma proteína recombinante capaz de catalisar a formação de ácido betalâmico e muscaflavina a partir do substrato L-DOPA (Mueller *et al.*, 1997). A sequência de nucleotídeos depositada no GenBank (NCBI) para o gene *dodA* possui 1.003 pb, os quais incluem seis éxons e cinco íntrons, codificando para uma dioxigenase de 228 aminoácidos. Entretanto, os autores relataram que o clone de cDNA obtido estava incompleto e resultava em uma enzima recombinante com pelo menos 20 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal ausentes, embora a atividade da enzima recombinante fosse idêntica à da enzima nativa. Curiosamente, nenhuma produção quimioenzimática de betalaínas e higroaurinas a partir da DODA de *A. muscaria* foi explorada desde então, bem como nenhuma informação a respeito da caracterização estrutural desta dioxigenase foi obtida.

Devido ao crescente interesse econômico em betalaínas, tentamos clonar e expressar a região codificadora da DODA de *A. muscaria* a partir da sequência publicada no banco de nucleotídeos de NCBI. Porém, os clones obtidos apresentavam uma retenção do primeiro íntron, o que resultaria em um polipeptídeo truncado de apenas 35 resíduos. Neste Capítulo, descrevemos a revisão da sequência de nucleotídeos da região codificadora do gene *dodA* de *A. muscaria* requerida para a correta expressão da proteína recombinante, bem como as condições de otimização para sua expressão heteróloga em *E. coli*. A proteína recombinante, aqui denominada AmDODA, teve sua atividade catalítica demonstrada, sendo utilizada na síntese quimioenzimática de quatro betalaínas-modelo, cuja aplicação biotecnológica para o desenvolvimento de sondas para a aquisição

de imagens de microscopia de fluorescência foi explorada. Juntos, esses resultados representam um avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos com a promiscuidade catalítica da DODA de *A. muscaria* e descrevem um método otimizado para a obtenção de uma DODA promíscua recombinante que pode ser explorada para a biossíntese biotecnológica de betalaínas e higoaurinas.

2-1. Objetivos

- Viabilizar a expressão heteróloga de L-DOPA extradiol dioxigenase de *A. muscaria* a partir da região codificadora (CDS) do gene *dodA*;
- Caracterizar a atividade enzimática da enzima AmDODA;
- Obter ácido betalâmico e muscaflavina por via quimioenzimática e utilizar esta metodologia para a semissíntese de betalaínas e higoaurinas-modelo com potencial aplicação.

2-2. Resultados e Discussão

2-2.1. A revisão da sequência codificadora do gene *dodA* é necessária para a expressão da L-DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*

A enzima L-DOPA extradiol dioxigenase do fungo *Amanita muscaria* (AMAMU) é de grande relevância para a compreensão da origem e função da pigmentação por betalaínas na natureza, sobretudo devido a sua convergência evolutiva com DODAs de plantas e por exibirem uma promiscuidade catalítica que também leva a biossíntese de higoaurinas em fungos, em contraste às DODAs betalaína-específicas encontradas em plantas. Embora tenha sido a primeira enzima relacionada à via de betalaínas a ser caracterizada funcionalmente e ter sua estrutura gênica determinada (Hinz *et al.*, 1997), desde então, nenhum avanço quanto à compreensão dos mecanismos envolvidos com a promiscuidade catalítica e sua relação com a estrutura desta enzima foram alcançados. Nesse sentido, decidimos clonar a região codificadora (CDS, de *Coding Sequence*) do gene *dodA* de *A. muscaria*, o qual codifica para a AMAMU, a fim de obtermos uma DODA de *A. muscaria* recombinante para explorarmos sua funcionalidade.

A amplificação da CDS do gene *dodA*, a partir de amostras de cDNA obtidas do píleo colorido de *A. muscaria*, resultou em fragmentos de DNA com tamanho de aproximadamente 800 nucleotídeos (**Figura 2-1**), em contraste com o tamanho de 687 nucleotídeos previsto para a CDS de *dodA*. Para verificar se esta discrepância poderia ter sido ocasionada por um evento de *splicing* alternativo ou mesmo pela extração de um material genético de uma variedade diferente de *A. muscaria*, utilizamos diferentes replicatas biológicas do fungo para a extração do RNA e síntese de cDNA e clonamos os

produtos de amplificação de *dodA* obtidos a partir de amostras de cDNA e de DNA genômico em um vetor para o sequenciamento do DNA.

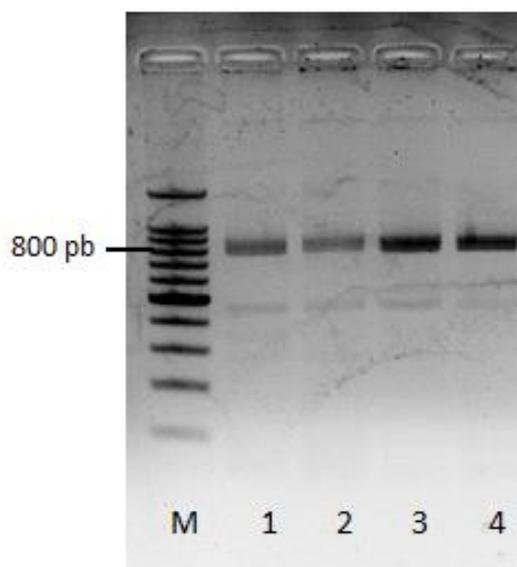


Figura 2-1. Gel de agarose após a separação eletroforética de produtos de amplificação da CDS de *dodA* a partir de amostras de cDNA do píleo colorido de quatro espécimes (1-4) do fungo *Amanita muscaria*. M: marcador de peso molecular 100 pb (Promega).

A análise do sequenciamento de DNA de quatro clones oriundos de dois espécimes biológicos diferentes confirmou um fragmento de DNA correspondente à CDS do gene *dodA* de *A. muscaria* com tamanho de 784 nucleotídeos, 97 a mais do que o esperado para a sequência publicada. O alinhamento da sequência de DNA dos clones com as do gene *dodA* e de seu RNA mensageiro (mRNA) identificou uma retenção do primeiro íntron em todos os clones analisados, cujo tamanho é de exatamente 97 nucleotídeos. A análise do sequenciamento dos clones revelou que essa retenção é uma consequência da substituição de três nucleotídeos (CAG), que inclui o sítio canônico de *splicing* 3'-AG do íntron 1 na sequência publicada para o gene *dodA*, por TGA em todos os clones (**Figura 2-2**), o que abole o sinal para o *splicing* da região 3' do íntron 1 e impede o seu reconhecimento pelo *spliceossomo*. Todos os demais sítios de *splicing*

permanecem inalterados nos clones analisados, conforme ilustrado para os íntrons 2 e 3 na **Figura 2-3**.

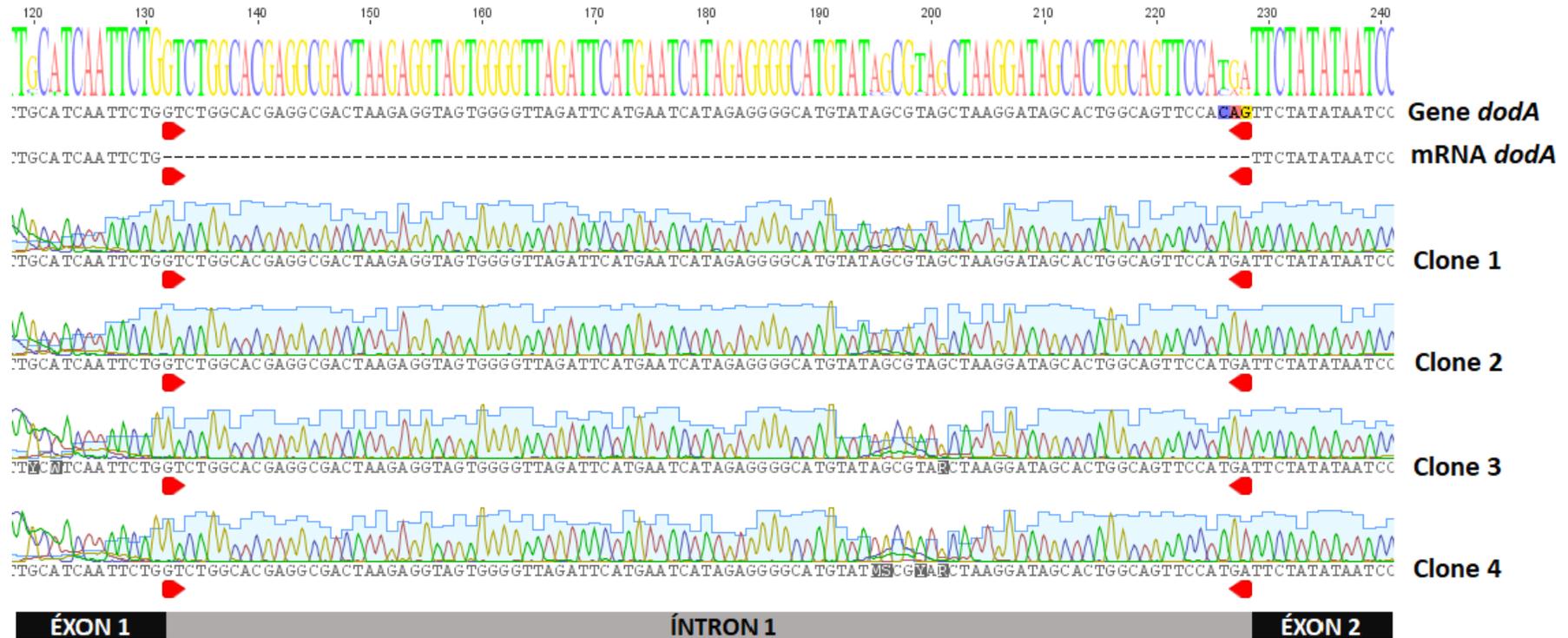


Figura 2-2. Trecho do alinhamento entre as sequências publicadas para o gene *dodA* e seu RNA mensageiro (mRNA) e as sequências de 4 clones contendo os produtos de amplificação da CDS do gene *dodA* a partir de amostras de cDNA do pílculo de *Amanita muscaria*. Em vermelho são indicados os sítios canônicos de *splicing* 5'-GT e 3'-AG, respectivamente. Note que três nucleotídeos – CAG – que inclui o sítio de *splicing* 3'-AG no gene *dodA* é substituído pelos nucleotídeos TGA em todos os clones sequenciados, o que abole o sítio de *splicing* e resulta na retenção do primeiro íntron.

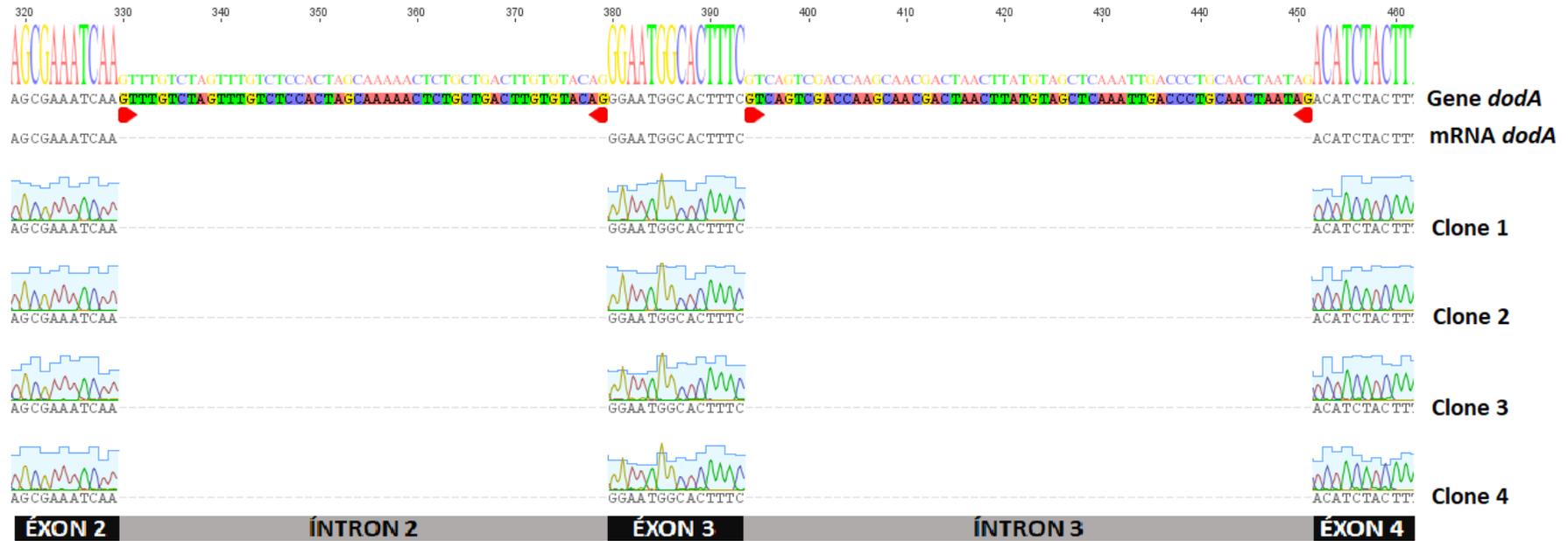


Figura 2-3. Trecho do alinhamento entre as sequências publicadas para o gene *dodA* e seu RNA mensageiro (mRNA) e as sequências de 4 clones contendo os produtos de amplificação da CDS do gene *dodA* a partir de amostras de cDNA do pílco de *Amanita muscaria*, ilustrando a remoção dos íntrons 2 e 3 em todos os clones analisados, assim como ocorre para os demais íntrons, exceto para o primeiro, como mostrado na **Figura 2-2**. Em vermelho são indicados os sítios canônicos de *splicing* 5'-GT e 3'-AG, respectivamente.

A tradução *in silico* da sequência de 784 nucleotídeos, gerada pela amplificação da CDS do gene *dodA*, a partir do códon de início previsto para este gene resultaria em um polipeptídeo truncado de apenas 35 resíduos de aminoácidos, em contraste com os 228 aminoácidos esperados para AMAMU. Logo, a sequência publicada para o gene *dodA* não permite a sua clonagem e a expressão heteróloga da enzima AMAMU a partir do material biológico utilizado.

Ao determinar a sequência do gene *dodA*, Hinz e coautores (1997) relataram que a expressão heteróloga de clones de cDNA contendo a CDS do gene resultavam em uma enzima com atividade de DODA, estável e cataliticamente ativa, mas com a ausência de pelo menos 27 dos primeiros resíduos de aminoácidos previstos para a enzima. Curiosamente, conforme discutido no Capítulo anterior desta Tese, o alinhamento da sequência de aminoácidos de AMAMU com outros fungos homólogos revela um alto nível de identidade entre as sequências, exceto pelos primeiros 40 aminoácidos, os quais parecem ser exclusivos de AMAMU.

Juntas, essas evidências nos levaram a buscar por outros códons de início da tradução para a sequência do gene *dodA*. Ao todo, 14 “ATGs” alternativos foram encontrados, todos resultando em polipeptídeos truncados, exceto por um códon de início da tradução encontrado dentro do segundo éxon de *dodA*, especificamente na posição 297, o qual permanece exatamente na mesma fase aberta de leitura (ORF, de *Open Reading Frame*) que a CDS publicada para o gene (**Figura 2-4 e Figura 2-5**). A sequência de nucleotídeos começando a partir deste “ATG” e prosseguindo até o códon de parada da tradução previsto para a CDS de *dodA* possui 558 nucleotídeos de tamanho e sua expressão, *in silico*, resulta em uma proteína de 185 aminoácidos, cuja sequência é exatamente a mesma que a publicada por Hinz e coautores (1997), exceto pela ausência

dos primeiros 43 aminoácidos. Para avaliarmos a função da proteína codificada por esta nova CDS, clonamos esta sequência em um vetor para a expressão heteróloga da proteína recombinante contendo uma marcação 6xHis na porção C-terminal, a qual denominamos AmDODA, para diferenciá-la da proteína AMAMU.

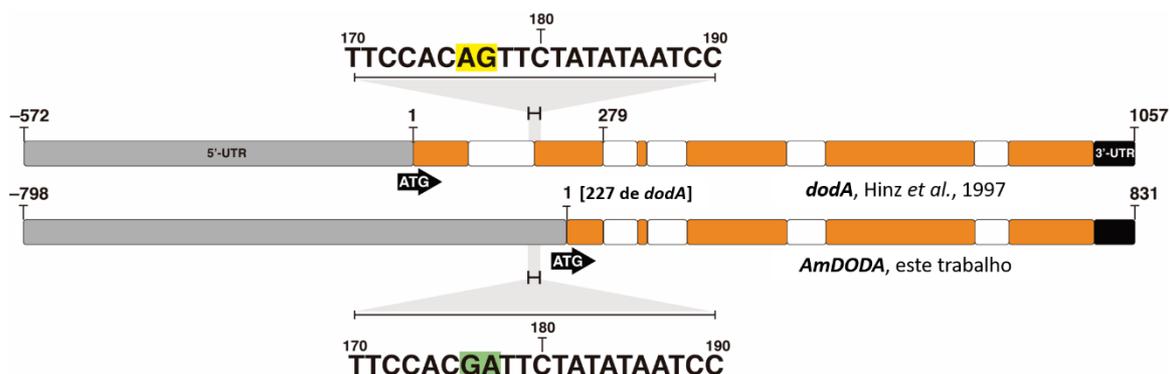


Figura 2-4. Comparação da sequência de nucleotídeos publicada para o gene *dodA* de *Amanita muscaria*, que codifica para a enzima AMAMU (Hinz *et al.* 1997), e da sequência proposta para AmDODA. As regiões expandidas destacam a alteração no sítio canônico de *splicing* 3' observada a partir da amplificação de amostras de cDNA do píleo de *A. muscaria*. O códon de início da tradução é indicado pela sequência "ATG". Blocos em laranja representam os éxons e, em branco, os introns. A sequência completa é apresentada na **Figura 2-5**.

```

1  acatgcgctt  cgtcactcaa  atatatccat  tggtttcgcg  acacgctggt  tccgaacca
61 gagagtctcg  cgactctctt  cagaaattct  cccaacttgc  gttccttcaa  caccctttg
121 gtgcccgcg  cagaggactg  cgacagttag  ccatgacgga  ttctttcatt  cctctctgac
181 gactatccat  gcagaggcca  ggattctgga  ctatgctagt  cctatcccac  ctcatctcat
241 gaaccttct  tctctacgcc  agatgtcctt  cgttgttctt  ctttcgccgg  gcagacgcac
301 gttggcgag  tttcctcgag  tggcatgggt  cacgtttaca  gcataatcaa  gctttgattt
361 accttgcaag  gaaccacttc  cagtccgact  tggcctacat  tgcacatca  tgccgcaacc
421 ttcttagact  cgatcttgct  ttctcccatt  ggacggcata  tgccgtttcc  tgttagcctc
481 ccgctacag  tggaacatct  gggcatcttt  tgtactcagg  gtcagatcgc  caactaccag
541 acgttcttct  ctcgtttaga  taggatcgag  tatggtgcca agcttcggtg tatacagttc
601 ttgggtaaac ggacgtcaga gatatattcg acaagcattt gcatcaattc tggtctggca
661 cgagggcact  aagaggtagt  ggggttagat  tcatgaatca  tagaggggca  tgtatagcgt
721 agctaaggat  agcactggca  gttccacagt  tctatataat  ccgtgatagc  actctctcgt
781 tcccctcaca tactaccatg tccaccaagc cagagactga ccttcaact gtcctcgaca
841 gcgaaatcaa gtttgtctag tttgtctcca ctagcaaaaa ctctgctgac ttgtgtacag
901 ggaatggcac tttcgtcagt cgaccaagca acgactaact tatgtagctc aaattgacct
961 tgcaactaat agacatctac tttcatcaga acaacgccgc agagcatcaa gctgcgcttg
1021 agcttcgtga cgcggttctg aggctcagac aagacggcgc attcgtcggc gttcccttgt
1081 tcccggttaa catggacccc atgggtcctc atcctgtcgg tcagtagtca tcgcaatcac
1141 accaccagtc cttgaacaag tcccttgact ctcaagggtc ttatgagatc tggtttccgt
1201 ctgaaacggt cgcttccgtg ttctcctact tgtgcatgaa cagagggaga ttaagcatcc
1261 ttgtgcatcc tttgacacgc gaagaactca gagaccatga aattcgtaat gcctggatag
1321 gacctctttt cccactcaat ctcgccaacc taccgatcaa gagtgatgag atccctttgc
1381 aatatccaag cctcagtatg tcatctcacc actctctggc ggccctcagt gacaaattgt
1441 tgcaagagctt gggtactcat cgacagcgca taagatgtca ttggaagaaa ggcggaaatt
1501 aggcgacgat atagaagcag tgcttagggg agagaaagag gcgccagag cgccccatcg
1561 agatgcatag agctacattc gattgtctat attgctactg acatagggta atgttggaa
1621 tttctgccc

```

Figura 2-5. Sequência de DNA para o gene *dodA* de *Amanita muscaria* (Hinz *et al.*, 1997; GenBank Y12886, NCBI). Os éxons são destacados em azul e o sítio canônico de splicing 3'-AG, alterado para 3'-GA na CDS que codifica para AmDODA é destacado em amarelo. O codon de início da tradução para a CDS de AmDODA é mostrado em vermelho.

O plasmídeo recombinante pET28b-AmDODA-His, contendo a CDS para a AmDODA, foi utilizado na transformação quimiocompetente de células de *Escherichia coli* BL21 (DE3), seguido da indução de sua expressão pela adição de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo) ao meio de cultivo das bactérias. A mais alta expressão de proteínas recombinantes foi obtida após a indução com 0,5 mM de IPTG seguido do cultivo a 30 °C durante *overnight*, conforme revelado pela banda intensa próxima ao tamanho esperado (22 kDa) após a separação eletroforética das proteínas (**Figura 2-6**).

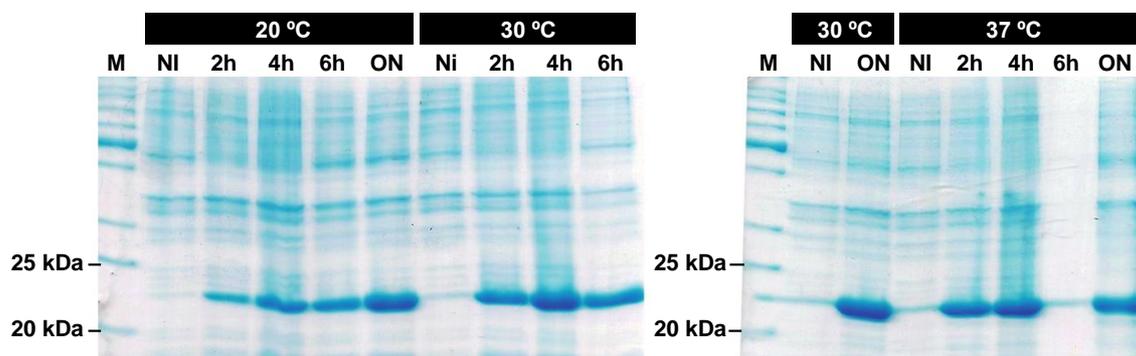


Figura 2-6. Gel SDS-PAGE da separação eletroforética de proteínas para verificar as condições de expressão da AmDODA recombinante. M: marcador de peso molecular *SeeBlue™ Plus2 Prestained* (Invitrogen); NI: cultura não suplementada com IPTG (expressão de AmDODA não-induzida); 2h, 4h e 6h: amostras coletadas após 2 horas, 4 horas e 6 horas da indução com IPTG; ON: *overnight*.

Após a indução da expressão heteróloga de AmDODA, as bactérias foram lisadas para a purificação do extrato total de proteínas por três diferentes métodos (**Figura 2-7**). No primeiro deles, Ni-NTA Agarose, o extrato total de proteínas foi incubado durante uma hora com uma resina de níquel, a qual possui afinidade com proteínas contendo marcação *His-tag*, como é o caso da AmDODA. Após a lavagem da coluna com tampão fosfato, a proteína recombinante foi eluída com o mesmo tampão contendo 0,2 M de imidazol, o qual compete pelas proteínas com a resina de níquel. Uma banda expressiva foi obtida para a proteína de interesse em comparação às demais proteínas. Este eluato foi então utilizado como ponto de partida em um segundo método de purificação, que envolve uma resina de troca iônica de Q-Sepharose. Após a lavagem da coluna com tampão, as proteínas foram eluídas em um gradiente de cloreto de sódio, entretanto, como pode ser observado na **Figura 2-7**, a maior parte da proteína recombinante foi eluída juntamente com as demais proteínas presentes no *flowthrough* (F), uma vez que o tampão já continha cloreto de sódio na concentração de 0,3 M. Logo, a purificação por este método requer a otimização do tampão utilizado para uma purificação mais eficiente da

proteína. Um terceiro método de purificação baseado no kit comercial Magne-His™, que envolve a utilização de beads magnéticas, foi testado a partir do lisado da cultura de bactérias expressando AmDODA. Após a lavagem das *beads* magnéticas para remover proteínas não-ligantes, as proteínas foram eluídas e a banda observada para a proteína de interesse não apresentou uma intensidade muito maior do que as demais proteínas eluídas (Figura 2-7). Logo, dos três métodos de purificação de proteínas avaliados, o método Ni-NTA Agarose se mostrou o mais adequado.

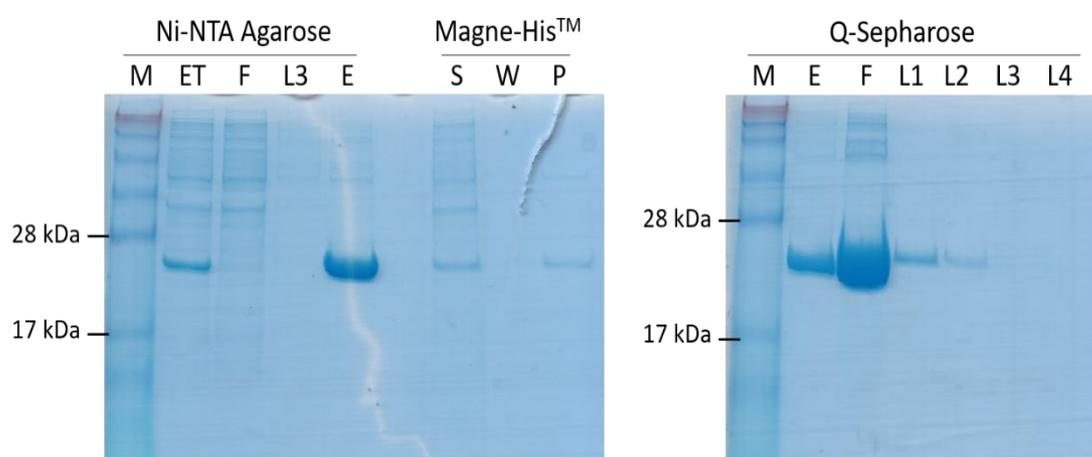


Figura 2-7. Gel SDS-PAGE para separação eletroforética das proteínas após a purificação da AmDODA recombinante pelos métodos Ni-NTA Agarose (QIAGEN), Magne-His™ (Promega) e Q-Sepharose (GE Healthcare). M: marcador de peso molecular *SeeBlue™ Plus2 Prestained* (Invitrogen); ET: extrato total de proteínas; F: *flowthrough*; L3: terceira lavagem da coluna com tampão fosfato; E: AmDODA recombinante eluída com 0,2 M de imidazol; S: amostra do sobrenadante após ligação das proteínas às *beads* magnéticas; W: amostra após a lavagem das *beads* com o *wash buffer*; P: AmDODA recombinante eluída pelo método Magne-His™ (Promega); L1-L4: lavagens da coluna com concentrações de cloreto de sódio de 0,2, 0,3, 0,5 e 1 M, respectivamente.

Com o objetivo de otimizar a concentração de imidazol utilizada na eluição da proteína de interesse no método Ni-NTA Agarose, uma nova purificação foi realizada em um gradiente de 0,1 a 0,5 M de imidazol, com duas eluições para cada concentração. Um

gel SDS-PAGE corado após a separação eletroforética das proteínas confirmou que a concentração de 0,2 M de imidazol resulta na maior eluição das proteínas recombinantes (**Figura 2-8**) e, portanto, esta condição foi utilizada em experimentos posteriores. Para remover os componentes do tampão de purificação, como o imidazol, as amostras foram dialisadas em 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4 após a purificação.

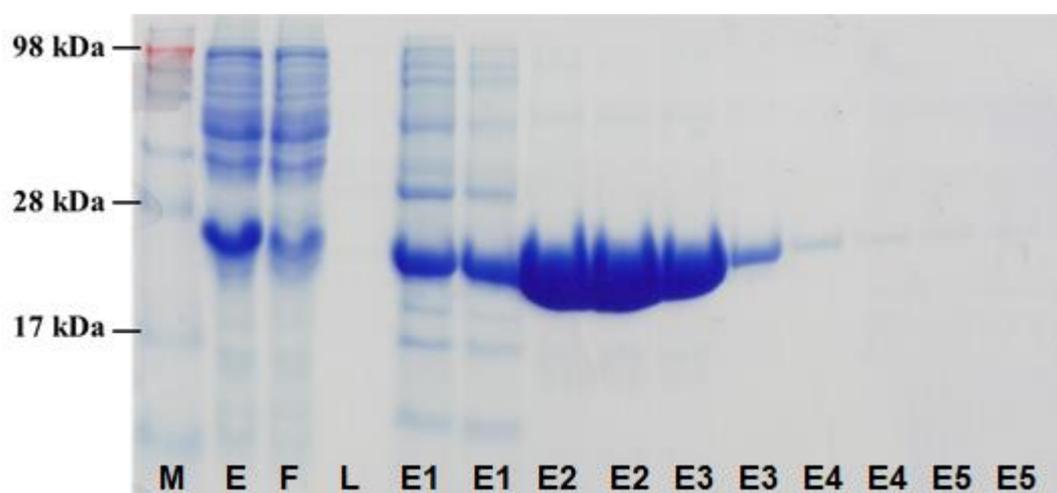


Figura 2-8. Purificação da AmdODA recombinante em resina Ni-NTA Agarose (QIAgen). M: marcador de peso molecular *SeeBlue™ Plus2 Prestained (Invitrogen)*; E: extrato total de proteínas; F: *flow-through*; L: terceira lavagem da coluna com tampão fosfato; E1-E5: eluição de AmdODA em um gradiente de imidazol de 0,1 a 0,5 M. O peso molecular esperado para AmdODA é de 22 kDa.

Uma alíquota da proteína recombinante dialisada foi utilizada em experimentos visando a obtenção de cristais de AmdODA, por meio de um *screening* de 98 condições de cristalização de proteínas utilizando-se kits disponíveis comercialmente. Ao todo 6 condições resultaram na formação de cristais, entretanto, estes não difrataram quando submetidos a irradiação com raios-X e, portanto, não são úteis na determinação da estrutura cristalográfica da proteína recombinante.

2-2.2. AmDODA pode ser utilizada para a síntese biotecnológica de ácido betalâmico e muscaflavina

A expressão heteróloga e otimização das condições de purificação da AmDODA viabilizaram o estudo da sua atividade catalítica na conversão de L-DOPA em 2,3- e 4,5-*seco*-DOPA. Empregando-se as condições experimentais descritas por Gandía-Herrero & García-Carmona (2014) no estudo da DODA da bactéria *Escherichia coli* (EcoDODA), inicialmente foi investigado o efeito do pH sobre a atividade específica da AmDODA. Neste sistema, a enzima ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) é adicionada a uma solução de L-DOPA ($1,0 \text{mmol L}^{-1}$) e ácido ascórbico (10mmol L^{-1}) em solução de fosfato (50mmol L^{-1}) no pH de interesse (**Figura 2-9a**) e o espectro de absorção é monitorado em função do tempo de reação (**Anexo I**). O ajuste linear da variação da absorção em 416 nm na fase inicial da reação permitiu calcular a velocidade inicial da reação, que foi convertida em atividade específica. A atividade da AmDODA varia com o pH, sendo mais alta em meio alcalino do que em condições ácidas e neutras de reação. Em pH 8,5, a atividade específica de AmDODA atinge o valor máximo de $0,74 \pm 0,17 \text{ U mg}^{-1}$, empregando-se uma concentração de L-DOPA de $1,0 \text{mmol L}^{-1}$. Este pH também é o pH ótimo para a atividade da DODA de *A. muscaria* (AMAMU) previamente caracterizada (Mueller *et al.*, 1997) e para a DODA de beterraba (*Beta vulgaris*, BvDODA) (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2012); e próximo ao pH 8,0 relatado como condição ótima para a EcoDODA (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2014).

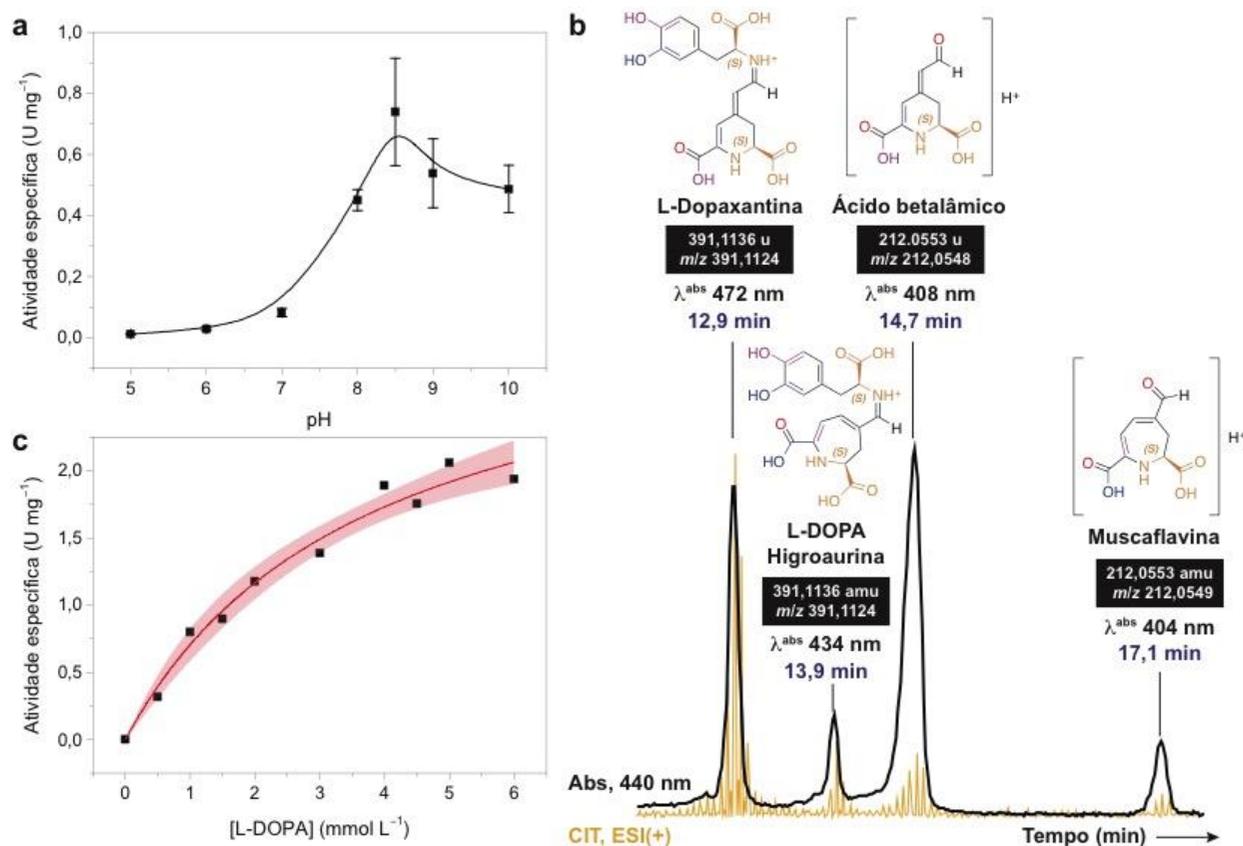


Figura 2-9. Estudo da atividade da enzima AmDODA. (a) Dependência da atividade específica da enzima com o pH do meio. Condições: [AmDODA] = 1 μmol L⁻¹, [AscH] = 10 mmol L⁻¹, [L-DOPA] = 1 mmol L⁻¹, solução fosfato de sódio (50 mmol L⁻¹). (b) Perfil cromatográfico correspondente a espécies com absorção em 440 nm e aos íons totais. (c) Atividade específica em função da concentração de substrato (L-DOPA). A linha vermelha corresponde ao ajuste não-linear obtido com a equação de Michaelis-Mentem e a região vermelha indica 95% de intervalo de confiança no ajuste.

A reação foi então submetida à análise cromatográfica com detecção por espectrofotometria de absorção na região UV-Vis e espectrometria de massas de alta resolução (**Figura 2-9b**). Os picos cromatográficos correspondentes ao ácido betalâmico e à muscaflavina têm tempo de retenção 14,7 min e 17,1 min, respectivamente. A identidade dos compostos é inferida pela relação massa/carga (m/z) dos respectivos íons $[M+H]^+$, 212,0458, que estão de acordo com o valor calculado para estes isômeros (m/z 212,0553 u) e pelo tempo de retenção observado para o padrão de ácido betalâmico obtido pela hidrólise de suco de beterraba (14,7 min). A fragmentação destes íons (MS^2 dos íons com m/z 212,0458) tem perfil idêntico, não permitindo diferenciar por este método o ácido betalâmico e a muscaflavina. A análise por espectrometria de massas das substâncias com tempo de retenção 12,9 min e 13,9 min revelou a presença de dois isômeros com m/z 391,1124, valores que estão de acordo com o valor esperado para a L-dopaxantina e para a L-DOPA higroaurina (m/z 391,1136). Assim, com a ajuda da doutoranda Larissa Esteves, foi semissintetizado um padrão de L-dopaxantina que revelou que o pico com tempo de retenção 12,9 min corresponde à betalaína. A betalaína e a higroaurina têm máximos de absorção em 472 nm e 434 nm, respectivamente, e os pigmentos contendo anéis de sete membros são menos polares que aqueles contendo anéis de seis membros, dado o maior tempo de retenção da muscaflavina e da L-DOPA higroaurina comparados ao ácido betalâmico e a L-dopaxantina.

Em seguida, o efeito da concentração de substrato sobre a atividade específica da enzima foi investigado. O perfil de saturação do gráfico de atividade em função da concentração de L-DOPA está de acordo com o observado para outras DODAs (**Figura 2-9c**). Os valores da constante de Michaelis (K_M) e da velocidade máxima (V_{max}) em condições nas quais a concentração de substrato satura a enzima (V_{max}) foram calculados

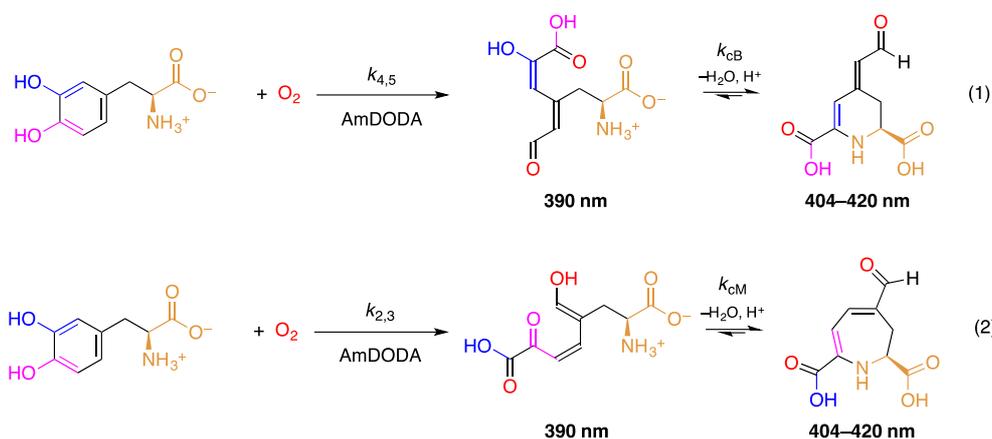
em $3,7 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e $3,3 \pm 0,4 \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente, através de ajuste não-linear com a equação de Michaelis–Menten ($\text{Adj-R}^2 = 0,9764$). Como esperado, AmDODA possui uma afinidade pelo substrato L-DOPA similar à AMAMU, cujos valores de K_M relatados para a enzima nativa e recombinante foram de $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $3,9 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (Mueller *et al.*, 1997). A afinidade de L-DOPA por AmDODA parece ser maior que BvDODA ($K_M: 6,9 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e $V_{\text{max}}: 1,2 \pm 0,1 \mu \text{ mol min}^{-1}$) (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2012) e EcoDODA ($K_M: 7,9 \pm 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $V_{\text{max}}: 2,6 \pm 0,6 \mu \text{ mol min}^{-1}$) (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2014) e menor que a DODA do bicho-da-seda (BmDODA1, $K_M: 1,06 \pm 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ e $V_{\text{max}}: 0,1678 \pm 0,003 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (Wang *et al.*, 2018).

A comparação de resultados da análise cinética de reações enzimáticas pode ser difícil, dado o uso de diferentes unidades nos parâmetros calculados. Nesta Tese, são usadas as definições e unidades recomendadas por Harris e Keshwani (2009) para velocidade e atividade específica (Harris & Keshwani, 2009). A velocidade inicial e a atividade específica são dadas por:

$$(v, \text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}) = \frac{(d[P], \text{mol L}^{-1})}{(dt, \text{s}^{-1})} = \frac{V_{\text{max}}[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\begin{aligned} \text{Atividade específica } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}) &= \frac{v}{[E]_0} \\ &= \frac{(dA/dt, \text{min}^{-1})}{(\epsilon, \text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})(b, \text{cm})([E]_0, \text{mg mL}^{-1})} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 2})$$

O estudo da reação de oxidação da L-DOPA por oxigênio catalisado por AmDODA foi realizado medindo-se a mudança do perfil de absorção em função do tempo. Contudo, trata-se de um sistema complexo, no qual a L-DOPA está em excesso e seu consumo não pode ser medido por espectrofotometria de absorção. Desta forma, optou-se por medir a formação do produto com absorção em cerca de 420 nm, conforme proposto por Gandía-Herrero e García-Carmona (2012, 2014). Entretanto, os produtos diretos da reação de oxidação da L-DOPA são a 2,3- e a 4,5-*seco* DOPA, cuja absorção é máxima ao redor de 390 nm, conforme indicado por análise da reação por HPLC-PDA-MS_n/ESI(+) (**Figura 2-10**, reações 1 e 2). A ciclização das *seco*-DOPAs leva à muscaflavina e ao ácido betalâmico, cujos valores de λ^{\max} são similares e estão entre 404 e 420 nm, dependendo do pH e da polaridade do meio. Uma vez formados, estes aldeídos se acoplam com a L-DOPA em excesso, formando a L-dopaxantina e a L-DOPA higoaurina (**Figura 2-10**, reações 3 e 4), que absorvem luz na faixa entre 400 a 500 nm. Desta forma, os parâmetros cinéticos relatados nesta Tese e em qualquer relato da literatura só estão corretos se as reações de ciclização são rápidas comparada à formação das *seco*-DOPAs, ou seja, se k_{cB} e $k_{cM} \gg k_{4,5}$ e $k_{2,3}$ (**Figura 2-10**).



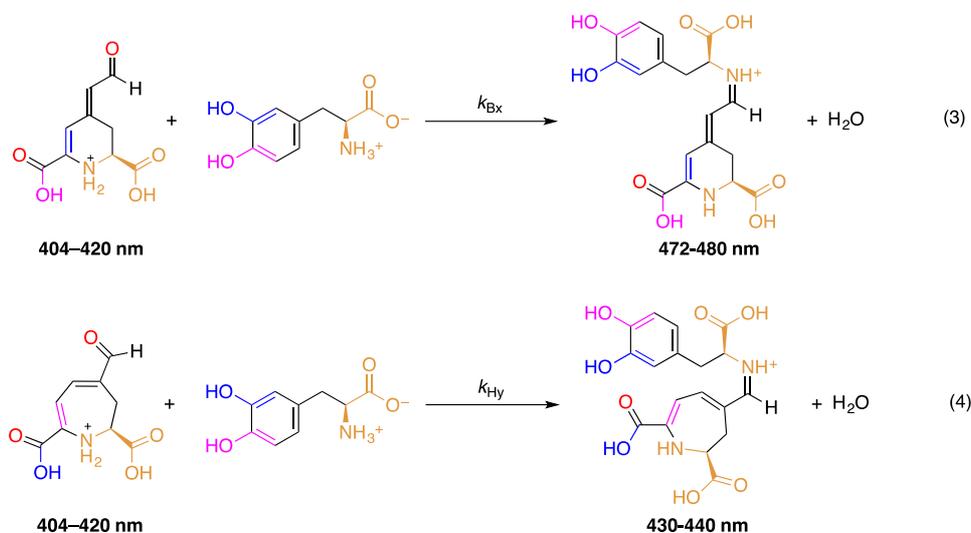


Figura 2-10. Reações ocorrendo em paralelo e comprimentos de onda máximos aproximados dos produtos conforme medidas de HPLC-PDA (mistura água/acetonitrila/HCO₂H) e/ou espectrofotometria UV-Vis em água.

Com o objetivo de tentar separar a contribuição de cada banda no espectro total obtido durante o curso da reação, empregamos um ajuste não linear de três funções gaussianas, duas delas com máximo fixo em 388 nm e 449 nm e a terceira com máximo ajustável (**Figura 2-11**). O perfil cinético obtido com as curvas separadas mostra que no primeiro minuto de reação a velocidade de conversão de L-DOPA nestes produtos é praticamente idêntica, sugerindo que seria possível estudar a cinética dos três componentes separadamente. Infelizmente, os valores de coeficiente de absorção molar para os compostos com máximo de absorção em 388 nm e 449 nm são desconhecidos, sendo impossível empregar os dados deste experimento para obter dados de atividade enzimática. Entretanto, uma estimativa obtida pela comparação do coeficiente angular obtido dos dados originais e da banda de absorção deconvoluída sugerem que o valor de V_{\max} poderia estar errado em toda literatura por um fator de duas vezes. O tratamento de todo o conjunto de dados com essa abordagem e a comparação com análise por HPLC-

PDA-MS_n/ESI(+) com reações que tiveram seus produtos sequestrados (*quenching*), podem oferecer uma forma mais apropriada para estudo do percurso dessas reações.

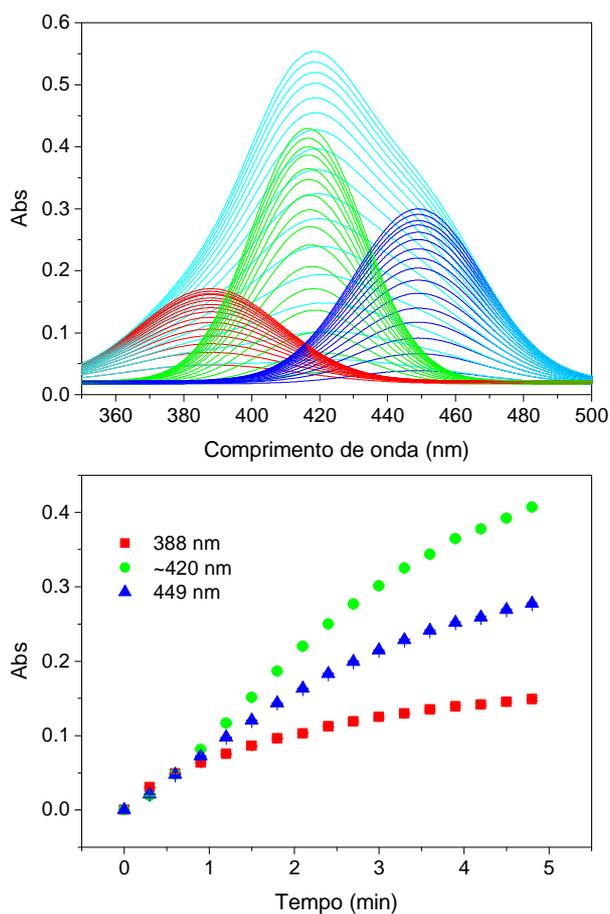


Figura 2-11. Reação de oxidação de L-DOPA por oxigênio na presença de AmDODA. (a) Espectros de absorção adquiridos a cada 0,3 min por 4,8 min e deconvolução das bandas com máximos em 388 nm (fixo), 418 ± 3 nm e 449 nm (fixo). (b) Cinética de formação de compostos com máximo de absorção nestes três comprimentos de onda.

A substituição do substrato L-DOPA pelo seu enantiômero D-DOPA na reação catalisada por AmDODA resulta na formação de produtos com espectro de absorção similares àqueles resultantes da oxidação de L-DOPA, conforme apresentado na **Figura 2-12**.

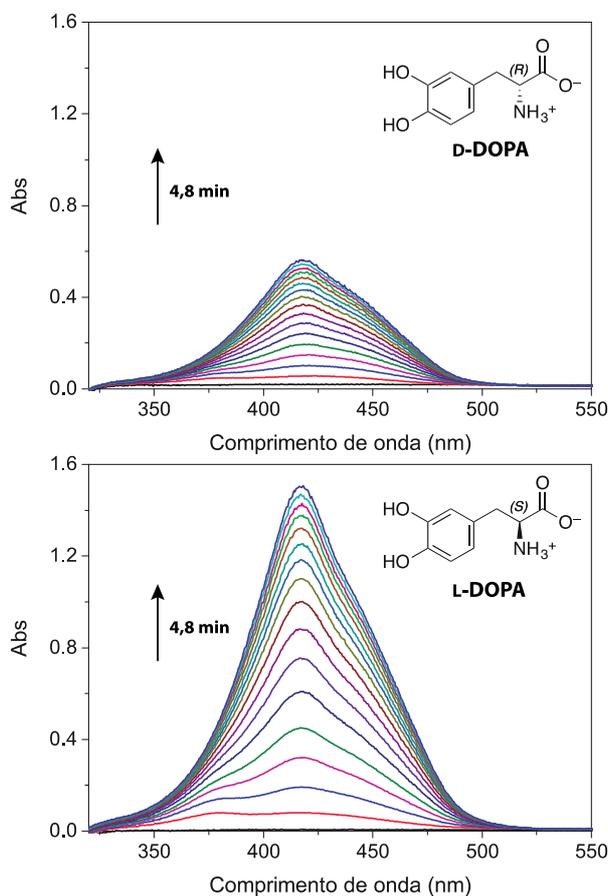


Figura 2-12. Espectros de absorção da reação de oxidação de D- e L-DOPA por oxigênio na presença de AmDODA. Condições: [DOPA] = 1 mmol L⁻¹, [Asch] = 10 mmol L⁻¹, [AmDODA] = 1 μmol L⁻¹, pH 8,5.

2-2-3. AmDODA possui mais de um motivo His2Glu em sua estrutura

Com o objetivo de entender como a AmDODA é capaz de catalisar a conversão de D/L-DOPA tanto em 2,3- quanto 4,5-*seco* DOPAs, a sequência de aminoácidos foi submetida a uma análise *in silico* empregando-se o método de encadeamento implementado no programa *Phyre*². Foi possível modelar a estrutura de 109 resíduos da sequência (59%) com 100% de confiança baseando a análise na comparação com a estrutura obtida por difração de raios-X de uma dioxigenase putativa de *Burkholderia xenovorans* (YP_555069.1, PDB 2P8I, DOI: 10.2210/pdb2P8I/pdb). A estrutura obtida é apresentada em termos de superfície acessível ao solvente e com os resíduos de HIS e

GLU explícitos (**Figura 2-13**). Observa-se a presença de diversos núcleos contendo o motivo *His2Glu*, característico de extradiol dioxigenases ferro-dependentes não-heme. Em particular, a região contendo cinco resíduos HIS e três resíduos GLU se encontra em um bolsão na enzima que sugere o sítio ativo.

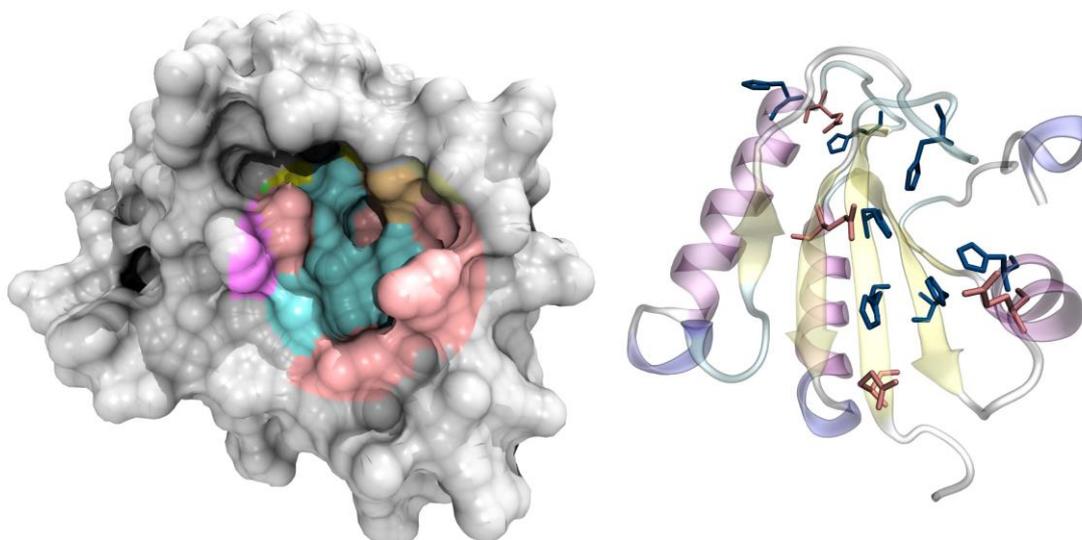


Figura 2-13. Superfície acessível ao solvente (140 pm) e estrutura com resíduos de HIS (azul) e GLU (vermelho) explícitos conforme estrutura proposta pelo programa Phyre². A coloração no bolsão da enzima se refere aos mesmos resíduos.

Pode-se especular que a complexação entre os resíduos de histidina e o ácido glutâmico na forma de glutamato com os íons Fe^{2+} seja necessário para estruturar o sítio ativo da AmDODA. Experimentos com adição de diferentes concentrações de íons Fe^{2+} foram inconclusivos, pois concentrações maiores de ferro do que as comumente utilizadas em reações com DODAs resultavam na alteração da coloração da reação mesmo antes da adição da enzima (**Anexo IIa**). A concentração de 1 μM de FeSO_4 , que visivelmente não alterava a coloração da reação, foi utilizada na suplementação da reação com AmDODA e resultou em um leve aumento na absorbância na região do espectro esperado para ácido betalâmico e muscaflavina (**Anexo IIb,c**). Em contrapartida, quando o tampão fosfato de

sódio da reação era substituído por EDTA, um agente quelante de diversos íons metálicos, rapidamente a reação se tornava escura como resultado da oxidação de L-DOPA. Assim, supondo que o sítio ativo contenha Ferro(II) obtido por contaminação de reagentes e vidrarias, é possível imaginar duas possibilidades: (i) o sítio ativo aloca a L-DOPA de forma que o ataque do oxigênio seja (*quasi*)simétrico nos carbonos 3 e 4, viabilizando tanto a clivagem das ligações 2,3 e 4,5 ou (ii) que existam dois sítios ativos na cavidade da enzima. De qualquer modo, a transformação que se segue para a conversão de *seco*-DOPAs em ácido betalâmico e muscaflavina depende de uma série de tautomerizações e etapas de condensação e hidrólise (**Figura 2-14**). Todas estas espécies têm propriedades similares, o que sugere que a caracterização completa da via catalítica de AmDODA será bastante complexa.

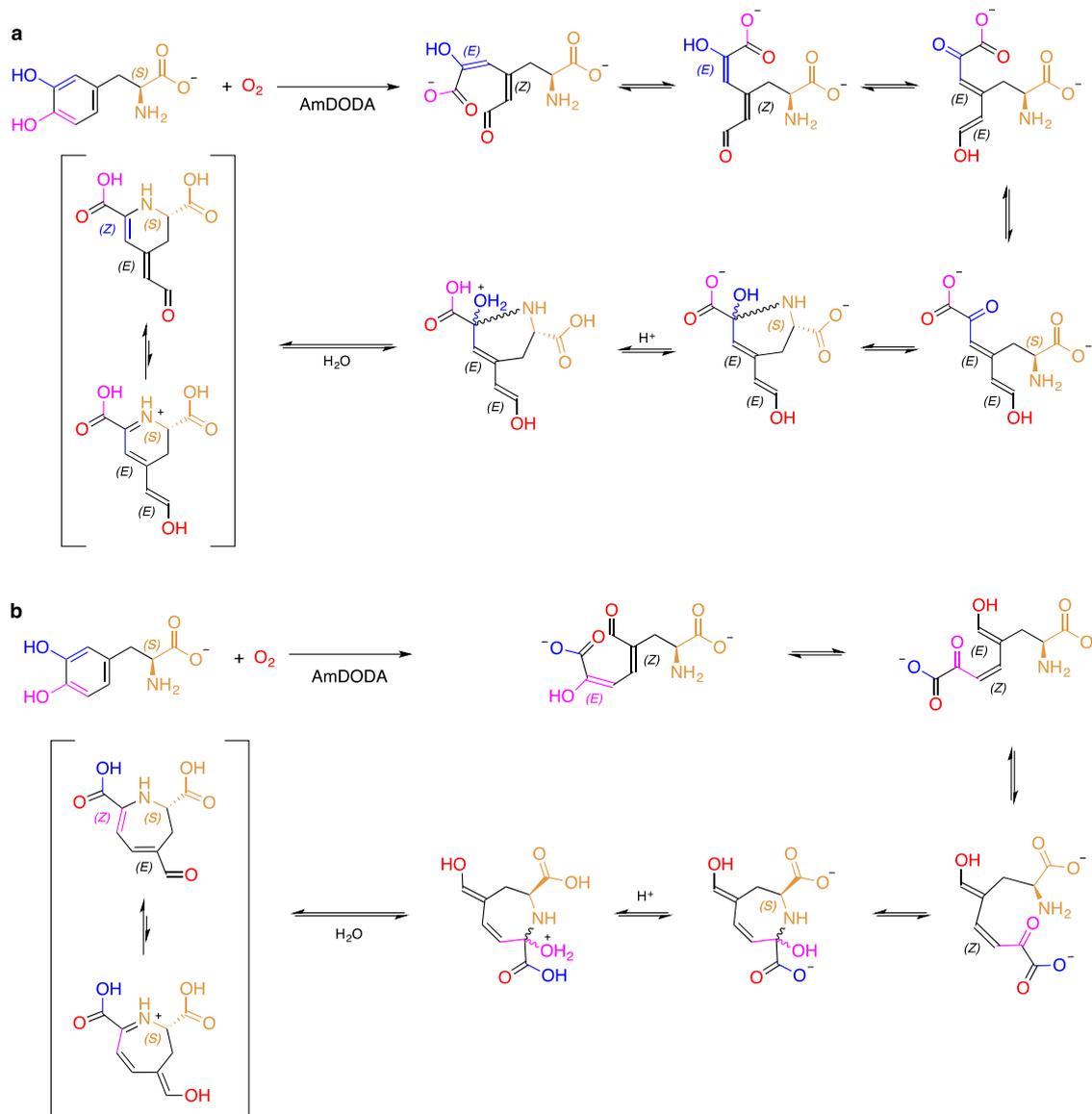


Figura 2-14. Reação de oxidação da L-DOPA por oxigênio catalisada por AmDODA e semissíntese das betalainas não-naturais. (a) Clivagem da L-DOPA na posição 4,5 dando origem ao ácido betalâmico. (b) Clivagem da L-DOPA na posição 2,3 dando origem à muscaflavina.

2-2.4. A síntese quimioenzimática de ácido betalâmico e muscaflavina pode ser explorada na obtenção de sondas para imagens de microscopia de fluorescência

Com a síntese quimioenzimática para obtenção de ácido betalâmico e muscaflavina estabelecida, foi realizada a semissíntese de quatro betalainas com potencial aplicação como sondas fluorescentes capazes de absorverem dois fótons (2-pa). Uma

espécie química pode absorver um fóton (1-pa) e ser promovida ao seu estado eletronicamente excitado. Em alguns casos, a espécie excitada volta ao estado fundamental emitindo fluorescência. Neste caso, a luz emitida (fluorescência) sempre tem comprimento de onda maior (menos energia) do que a absorvida. Desta forma, uma molécula que, por exemplo, absorva luz azul de 450 nm emitirá luz com comprimento de onda maior que 450 nm. Algumas espécies químicas absorvem dois fótons que, individualmente, tem energia menor que a emissão de fluorescência, mas em conjunto tem energia idêntica (ou próxima) ao fóton que leva à excitação. Assim, no exemplo acima, uma molécula capaz de 2-pa poderia absorver dois fótons de 900 nm, perfazendo a mesma energia da absorção de um fóton (1-pa) de 450 nm, que é suficiente para popular o estado excitado. Espécies com essa propriedade podem ser excitadas com dois fótons na região do vermelho ou infravermelho próximo, cuja penetração em tecidos vivos é mais alta do que luz com comprimentos de onda mais curtos (mais energética).

Plantas pigmentadas por betalaínas podem emitir fluorescência em diferentes tecidos e órgãos, incluindo flores (Gandía-Herrero *et al.*, 2005). *Arabidopsis thaliana* não produz betalaínas, mas seus tecidos poderiam ser imageados com o auxílio de sondas fluorescentes. Assim, decidiu-se investigar o potencial de betalaínas não naturais na aquisição de imagens do xilema de raízes de *Arabidopsis thaliana* por microscopia confocal de fluorescência de um e dois fótons.

AmDODA foi utilizada para catalisar a formação do ácido betalâmico, o precursor de todas as betalaínas, a partir do substrato L-DOPA. Então, o ácido betalâmico foi acoplado com três diferentes aminocumarinas, cumarina 120 (C120), cumarina 151 (C151), amino benzocumarina (CBz) e a aminocarboestiril 124 (Cs124) em acetato de etila na presença de ácido para-toluenossulfônico como catalizador ácido, resultando na

formação das betalaínas cBeet120, cBeet151, csBeet124 e cBzBeet, respectivamente (**Figura 2-15**). Acetato de etila é considerado um solvente orgânico ambientalmente compatível e que oferece baixo risco à saúde humana quando comparado a outros solventes orgânicos convencionais.

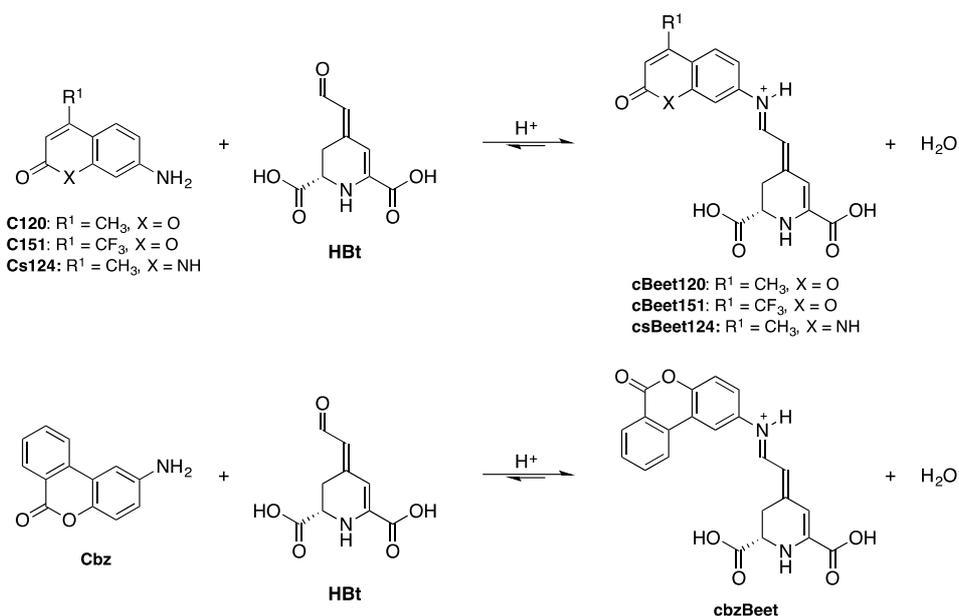


Figura 2-15. Semissíntese de três betalaínas cumarínicas e uma betalaína carboestiril através da reação de ácido betalâmico com aminas em acetato de etila na presença de ácido *p*-toluenossulfônico.

Para avaliar se a semissíntese empregando o ácido betalâmico obtido por via quimioenzimática produz os mesmos produtos que a semissíntese empregando ácido betalâmico obtido de suco de beterraba hidrolisado, as amostras dos compostos obtidos pelos dois métodos foram misturadas e submetidas a análise cromatográfica (**Figura 2-16**). Observou-se apenas um pico cromatográfico, que indica que as betalaínas obtidas são idênticas; não foram observados picos referentes às higoaurinas correspondentes, possivelmente por serem menos estáveis que as betalaínas. As propriedades fotofísicas dos compostos já haviam sido previamente caracterizadas por espectroscopias de

absorção e fluorescência bem como as características de absorção de dois fótons (Rodrigues, 2017).

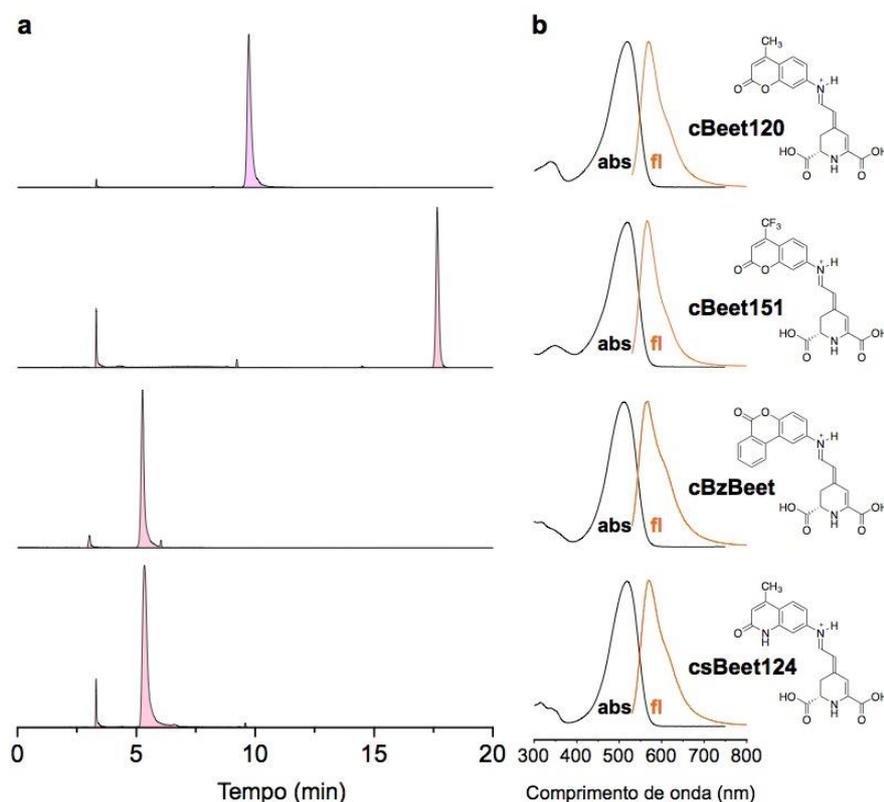


Figura 2-16. (a) Cromatogramas de misturas dos produtos das semissínteses com ácido betalâmico obtido de suco de beterraba hidrolisado e pelo método químioenzimático; condições: HPLC-DAD com monitoramento em 520 nm, solvente A: água/HCO₂H 0,05% v/v, solvente B: MeCN/H₂O/HCO₂H 60/39,95/0,05% v/v, corrida de 30-45% de B em 15 minutos a um fluxo de 1 mL min⁻¹. (b) espectros de absorção médio obtido no tempo de retenção nos quais a absorção em 520 nm era máxima; e espectros de fluorescência registrados empregando-se os padrões dos quatro compostos pela Dra. Ana Clara B. Rodrigues (Rodrigues, 2017).

Raízes intactas de *A. thaliana* foram incubadas por três minutos com as aminocumarinas, com o carboestiril 124 (controles) ou com as betaláinas correspondentes. Observa-se que na ausência de qualquer composto fluorescente (controle negativo), são observados cloroplastos em magenta e a região periférica ao xilema (azul). Contudo, na presença de cBeet120, pode-se observar que o xilema é

marcado e pode ser visualizado pela emissão verde resultante tanto pela excitação com um fóton em 514 nm ou dois fótons de 800 nm (**Figura 2-17**). Os demais compostos tiveram resultado qualitativamente similar, mas a intensidade de fluorescência obtida é menor, possivelmente pela menor absorção dos compostos no tecido, visto que a intensidade de emissão em solução destes compostos é bastante similar (RODRIGUES, 2017). Estes resultados mostram o potencial da produção de ácido betalâmico na obtenção de compostos com interesse aplicado, viabilizando o aumento da escala de semissíntese.

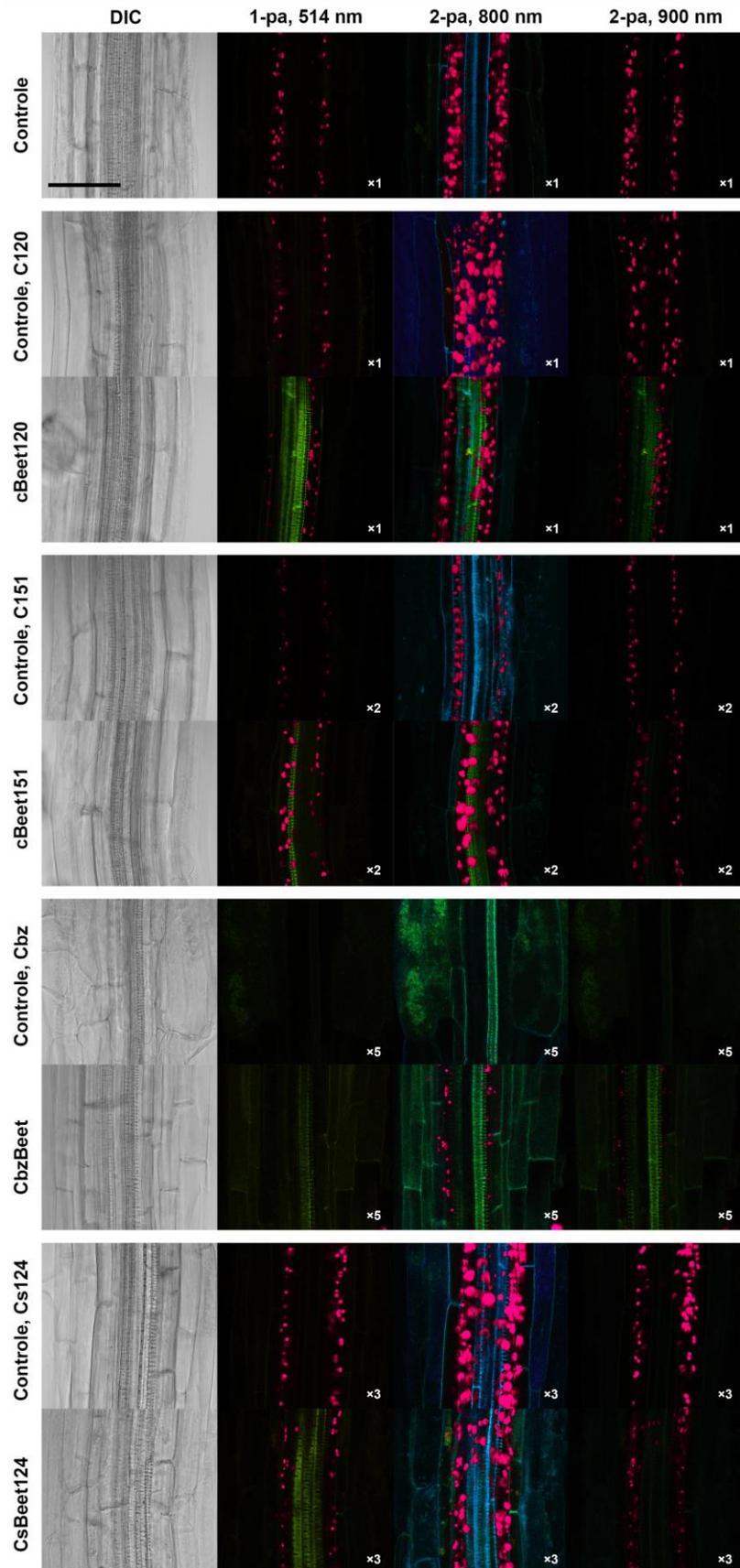


Figura 2-17. Microscopia confocal de contraste de interferência (DIC) e fluorescência de raízes íntegras de *Arabidopsis thaliana* incubadas com as sondas betalaínicas. Experimentos controle com incubação com água ou com os precursores das sondas são apresentados para comparação. Os experimentos foram feitos com excitação com um fóton (1-pa, 514 nm) ou dois fótons (2-pa, 800 nm e 900 nm). A emissão de fluorescência foi monitorada entre 415 e 691 nm. Os números em branco indicam a intensificação de brilho usado para a montagem da imagem. [Sonda]: 0,1 mmol L⁻¹, Tempo de incubação: 3 min.

2-3. Conclusões

- A amplificação da região codificadora (CDS) do gene *dodA* a partir de amostras de cDNA do píleo de *Amanita muscaria* resulta em um fragmento de DNA de 784 pb, 97 pb a mais do que o esperado para a CDS de *dodA*. Esta sequência possui uma retenção do primeiro íntron devido a substituição do sítio canônico de *splicing* 3'-AG por 3'-GA. A tradução *in silico* desta CDS resulta em um peptídeo truncado de apenas 35 aminoácidos, em contraste aos 228 resíduos esperados para AMAMU;
- Uma nova CDS de 558 nucleotídeos proposta para o gene *dodA*, com início em um "ATG" localizado no éxon 2 da sequência publicada para o gene e que mantém se na mesma fase aberta de leitura (ORF) de AMAMU, produz uma proteína de 185 aminoácidos idêntica em sequência à AMAMU, exceto pela ausência dos primeiros 43 aminoácidos;
- A clonagem da nova CDS em um vetor de expressão resultou no plasmídeo pET28b-AmDODA-His, o qual produz grandes quantidades da proteína recombinante AmDODA quando induzido com 0,5 mM de IPTG, seguido do cultivo a 30 °C durante *overnight*;
- AmDODA, que possui um tamanho aproximado de 22 kDa, pode ser eficientemente purificada pelo método Ni-NTA Agarose após eluição com 0,2 M de imidazol. Um *screening* da enzima em 96 condições de cristalização resultou na formação de algumas estruturas de aparência similar a de cristais, mas que não difrataram quando irradiadas com raios-X;
- AmDODA mostrou-se capaz de catalisar a síntese de ácido betalâmico e muscaflavina e, conseqüentemente, betalaínas e higoaurinas, a partir dos

substratos L- e D-DOPA; com um pH ótimo de atividade de 8,5 e valores de constante de Michaelis (K_m) e velocidade máxima de $3,7 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e $3,3 \pm 0,4 \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente;

- AmDODA pode ser empregada na síntese quimioenzimática de quatro betalainas-modelo com potencial aplicação como sondas fluorescentes para a aquisição de imagens de microscopia confocal de fluorescência de dois fótons em raízes de *Arabidopsis thaliana*.

2-4. Material e Métodos

2-4.1. Clonagem da CDS de *dodA* e de *AmdODA*

As amostras do fungo basidiomiceto *Amanita muscaria* (Agaricales) foram coletadas no município de Santana de Paranaíba/SP (Brasil), próximo à área do Residencial Tamboré 3, entre o período de maio e julho de 2015, sendo armazenadas a -80 °C até a sua utilização. As amostras de DNA genômico e RNA foram extraídas a partir de 100 mg do pó macerado do píleo do fungo com os kits *DNeasy*[®] e *RNeasy*[®] (QIAGEN), respectivamente, conforme protocolo do fabricante. As amostras de RNA foram limpas utilizando-se o kit *RNA Cleanup* (QIAGEN) conforme protocolo do fabricante e eluídas em um volume final de 40 µL. Um volume de 1 µL de cada amostra foi utilizado para a quantificação de ácidos nucleicos no espectrofotômetro *NanoDrop*[™] (Thermo Fisher Scientific). Para a eliminação da contaminação com DNA genômico em amostras de RNA, 10 µg de cada amostra foram tratados com 2 U da enzima DNaseI (Ambion) conforme protocolo do fabricante. Uma nova quantificação de RNA e DNA foi realizada no fluorímetro *Qubit*[®] (Life Technologies) e a integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose de 1,5% contendo hipoclorito de sódio (3% de uma solução-estoque de 2%) e brometo de etídeo (0,5 mg L⁻¹) a 110 volts por 25 minutos. Para a síntese do cDNA, 1 µg do RNA total tratado com DNaseI foi utilizado na reação de transcrição reversa (RT) pela enzima *SuperScript*[®] III (Invitrogen) com o *primer oligo*(dT)₂₀, conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Então, a CDS que codifica para a DODA de *A. muscaria* foi amplificada a partir das amostras de cDNA utilizando-se os *primers dodA-F* (CACCATGGTGCCAAGCTTCGTTGT) e *dodA-R* (CTATGCATCTCGATGGGGCGCTCT), desenhados a partir da sequência de *dodA* depositada por Hinz e coautores (1997) no banco de dados de nucleotídeos do NCBI

(acesso *GenBank* Y12886). O mesmo par de *primers* também foi utilizado para a amplificação do DNA genômico de *A. muscaria*. As reações de amplificação do DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas com a polimerase de alta fidelidade *Phusion HF* (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 25 μL , conforme instruções do fabricante, sendo incubadas em um termociclador *SimpliAmpTM* (Applied Biosystems) a 98 °C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos a 98 °C por 10 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Um volume de 5 μL de cada reação foi aplicado em um gel de agarose de 1,5 % contendo 0,5 mg L^{-1} de brometo de etídeo e os produtos de amplificação foram separados por 30 minutos a 120 volts. A imagem do gel foi adquirida no fotodocumentador *ImageQuantTM300* (GE Healthcare Life Sciences). A banda de interesse foi purificada em um gel de agarose de 0,8 % *clone well* no sistema *E-gel[®]* (Thermo Fisher Scientific) e utilizada na proporção de 2:1 (inserto:vetor) em reações de clonagem no vetor *Gateway[®] pENTRTM/SD/D-TOPOTM* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, para o sequenciamento do DNA. As reações de clonagem foram utilizadas para a transformação de bactérias *E. coli DH5 α* quimiocompetentes, conforme o protocolo *OneShot[®] Chemical Transformation* (Invitrogen), seguida do plaqueamento em meio LB contendo canamicina e cultivo a 37 °C por 16 horas. Algumas colônias foram amostradas e cultivadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio LB e 3 μL de canamicina a 37°C por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído com o kit *PureYieldTM Plasmid Miniprep System* (Promega), conforme instruções do fabricante, e o mesmo foi digerido com as enzimas de restrição *AscI* e *NotI* (New England Biolabs) para a confirmação da presença do inserto, conforme protocolo do fabricante. As amostras de DNA plasmidial contendo os insertos correspondentes à amplificação da CDS de *dodA* a

partir de amostras de cDNA e de DNA genômico de *A. muscaria* foram enviadas para o sequenciamento de DNA no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH-USP), utilizando-se os primers *M13 forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e *M13 reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), que flanqueiam a região do inserto no vetor. A amplificação da nova CDS proposta para o gene *dodA*, a qual codifica para a enzima recombinante AmDODA com marcação *His-tag* C-terminal, foi realizada a partir de amostras de cDNA de *A. muscaria* utilizando-se o par de primers *AmDODA-F* (5'-ACTTTAAGAAGGAGATATACATGTCCACCAAGCCAGAG-3') e *AmDODA-R* (5'-GTCGACGGAGCTCGAATTCGGTGCATCTCGATGGGGCG-3'), desenhados para gerar produtos de PCR contendo extremidades sobreponíveis ao vetor pET28b e com a ausência do códon de parada da tradução para permitir a adição da marcação *His-tag* C-terminal pelo vetor. A Q5[®] DNA polimerase de alta fidelidade (New England Biolabs) foi utilizada nas reações de amplificação, as quais foram incubadas, inicialmente, por 30 segundos a 98 °C; seguida de 30 ciclos de amplificação, sendo: (1) 10 segundos a 98 °C, (2) 30 segundos a 60 °C e (3) 45 segundos a 72 °C; e uma etapa de extensão final de 2 minutos a 72 °C, em termociclador *SimpliAmp* (Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e as beas de interesse foram purificadas no sistema *E-gel*[®] (Thermo Fisher Scientific), em gel de agarose 0,8% *clone well*. O vetor pET28b (Novagen) foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *NotI* (New England Biolabs), conforme instruções do fabricante e, em seguida, o mesmo foi usado em reações de *assembly* com o produto de PCR purificado de acordo com o método de clonagem independente de sequência e ligação (SLIC) (Jeong *et al.*, 2012). Essas reações foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo:

0,04 pmol do vetor pET28b digerido com as enzimas *BamHI* e *NcoI*, 0,2 pmol do produto de PCR purificado, 1 µL do tampão NEB 2.1, 1 µL de albumina de soro bovino (BSA) 1X, 0,2 µL de T4 DNA Polymerase (Invitrogen) e água livre de nucleases para completar o volume. As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos e 45 segundos e, em seguida, no gelo por 10 minutos. O volume total foi adicionado em um tubo contendo 100 µL de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes, sendo incubado no gelo por 30 minutos. Um choque térmico foi realizado a 37 °C por 45 segundos e, em seguida, o tubo foi mantido no gelo por 5 minutos. Então, 900 µL de meio LB foi adicionado ao tubo e a cultura foi mantida a 37 °C por 1 hora. Após este período, a cultura foi plaqueada em meio seletivo contendo LB e canamicina e incubado a 37 °C *overnight*. As colônias contendo o inserto para a CDS de AmDODA foram confirmadas por reações de PCR utilizando-se os *primers* *AmDODA-F* e *AmDODA-R* e a enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. As colônias positivas foram enviadas para o sequenciamento de DNA utilizando-se os *primers* *T7 promoter* (5'- TAATACGACTCACTATAG-3') e *T7 terminator* (5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'). O plasmídeo recombinante pET28b-AmDODA foi então utilizado para a expressão da proteína recombinante.

2-4.2. Expressão e purificação de AmDODA

Inicialmente, o vetor recombinante pET28b-AmDODA foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* BL21 (DE3). As colônias obtidas foram então pinçadas e cultivadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio 2YT e 3 µL de canamicina (50 mg/mL) a 37 °C, 200 rpm, *overnight*. No dia seguinte, 100 µL do pré-inóculo foram adicionados a três diferentes Erlenmeyers de 100 mL, contendo 9,9 mL de meio 2YT e 10 µL de canamicina (50 mg/mL). A cultura foi incubada a 37 °C por aproximadamente 1 hora e 30 minutos,

até alcançar uma OD₆₀₀ de 0,6. Em seguida, foi coletado 1 mL de cultura de cada Erlenmeyer como controle da indução da expressão da AmDODA recombinante e, então, o indutor isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado para uma concentração final de 0,5 mM. Os Erlenmeyers foram cultivados a 20 °C, 30 °C e 37 °C e 1 mL da cultura foi coletado 2 h, 4 h, 6 h e *overnight* após a indução para posterior análise. Ao término do cultivo, todas as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de água autoclavada. Um volume de 150 μL foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 15 μL de tampão para proteínas contendo SDS e β-mercaptoetanol e incubado a 95 °C por 5 minutos, seguido da aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 12% para separação das proteínas por eletroforese. O gel SDS-PAGE foi preparado em duas partes: a inferior continha buffer *Lower* 1X (TRIS 1,5 M e SDS 10% em pH 8,0), acrilamida 40%, persulfato de amônio (APS) 10% e tetrametiletilenodiamina (TEMED); e a parte superior do gel continha buffer *Upper* 1X (TRIS 0,5 M e SDS 10% em pH 6,7), acrilamida 40%, APS 10% e TEMED. Após a polimerização, o gel foi inserido no sistema de eletroforese *MINI-PROTEAN* (BioRad) e completado com o tampão de corrida *MES SDS* 1X (Invitrogen). Um volume de 7 μL do marcador de peso molecular *SeeBlue*[®] *Plus2 Prestained* (Invitrogen) ou 5 μL de cada uma das amostras foram aplicados em cada poço do gel. As amostras foram separadas a 135 volts. Em seguida, o gel SDS-PAGE foi corado com uma solução de Coomassie Blue por 30 minutos e descorado com uma solução de 30% de etanol absoluto e 10% de ácido acético até que as beas ficassem nítidas para a aquisição da imagem do gel. A melhor condição de expressão da proteína recombinante foi utilizada para uma nova indução em um volume final de 1 L, visou a purificação da AmDODA recombinante e sua utilização

em ensaios de atividade enzimática e obtenção de cristais. Após a indução e o cultivo das bactérias contendo a proteína recombinante, a cultura foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 20 mL de água autoclavada. Uma nova centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos foi realizada e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi então ressuscitado em um volume de 30 mL de tampão para lise das células, composto por 0,3 M de NaCl, 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4, 10 mM de imidazol, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 2 mM de β -mercaptoetanol. Um volume de 100 μ L de coquetel inibidor de protease (Roche) foi adicionado à essa amostra e a mesma foi lisada no equipamento *French Press Cell G-M™* (Thermo Scientific). O lisado foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos e 500 μ L do sobrenadante foi coletado para a posterior análise do extrato total de proteínas (ET). Três métodos foram avaliados para a purificação da proteína recombinante. Para o método de cromatografia de afinidade utilizando-se a resina de níquel Ni-NTA Agarose (QIAGEN), a coluna foi inicialmente preparada pela tríplice lavagem da mesma com 50 mM de tampão fosfato pH 7,4, seguida da adição de 250 μ L da resina. Um volume de 15 mL do extrato total de proteínas (ET) foi aplicado na coluna e incubado em câmara fria sob rotação por 1 hora. Em seguida, o *flow through* (FT) foi coletado para análise e a coluna foi lavada três vezes (L1, L2 e L3) com 50 mM de tampão fosfato pH 7,4 para remover ligações inespecíficas de proteínas. Então, o eluato (E) contendo a proteína recombinante AmDODA foi obtido pela adição de uma solução de 350 mM de imidazol à coluna. O eluato (E) foi utilizado em um segundo método de purificação por cromatografia de troca iônica em uma resina de *Q-Sepharose* (GE Healthcare). Para isso, um volume de 500 μ L da resina juntamente com o eluato foram adicionados a uma coluna, que foi incubada por 1 h em câmara fria sob rotação. O *flow through* (FT) foi coletado para análise e a coluna

foi lavada quatro vezes (L1, L2, L3 e L4) com soluções de cloreto de sódio (NaCl) nas molaridades de 0,2 M, 0,3 M, 0,5 M e 1 M para eluição da proteína recombinante. Um terceiro método de purificação com o kit *MagneHis* (Promega), baseado na utilização de *beads* magnéticas, foi testado conforme instruções do fabricante. Para este método foi utilizado um volume de 1 mL do cultivo de bactérias *overnight* após a indução da expressão de AmDODA. O sobrenadante (S), a terceira lavagem (L3) e o eluato contendo a proteína (P) foram coletados para análise por SDS-PAGE. Todas as amostras coletadas para análise por SDS-PAGE foram previamente quantificadas no fluorímetro *Qubit* (Life Technologies), conforme protocolo do fabricante, e um total de 400 µg de proteínas foram concentrados por rotação à vácuo a 30 °C. Em seguida, um volume de 10 µL de tampão de proteínas contendo SDS e β-mercaptoetanol foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas em um gel SDS-PAGE para separação por eletroforese. Para a otimização do processo de purificação da proteína recombinante, o método de cromatografia por afinidade com a resina de níquel Ni-NTA Agarose foi repetido utilizando-se um gradiente de eluição de 100 mM a 500 mM de imidazol. Após definida a melhor condição de expressão e purificação da proteína recombinante, a amostra foi dialisada em 50 mM do tampão fosfato de sódio pH 7,4 e quantificada no fluorímetro *Qubit* conforme instruções do fabricante. Alíquotas de 1 µL da enzima AmDODA recombinante dialisada e na concentração de 1 mg mL⁻¹ foram utilizadas em um *screening* de 96 condições de cristalização com os kits *Crystal Screen*TM HR2-110 e HR2-112 (Hampton Research) em placas de 24 poços, os quais foram monitorados diariamente em microscópio estereoscópico para a formação de cristais. Quando observada a formação de estruturas de aparência similar a de cristais, estas foram

irradiadas com raios-X, mediante colaboração com o Prof. Dr. Shaker Chuck Farah (IQ/USP).

2-4.3. Ensaio de atividade enzimática de AmDODA

Os experimentos de cinética enzimática de AmDODA foram realizados em reações contendo: [AmDODA] = 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [AscH] = 10 mmol L^{-1} , [L-DOPA] = 1 mmol L^{-1} e solução fosfato de sódio de 50 mmol L^{-1} . O espectro de absorção foi monitorado em função do tempo de reação e o ajuste não-linear da variação da absorção em 416 nm na fase inicial da reação permitiu calcular a velocidade inicial da reação, que foi convertida em atividade específica. Os produtos foram analisados por HPLC-DAD (*High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos) em colunas C-18 de 250 x 4,6 mm injetando-se um volume de 30 μL de cada amostra. As amostras foram separadas em um gradiente linear de 0 a 35% de uma solução de acetonitrila e 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) por 25 minutos. A definição de unidade (U) usada equivale a conversão de 1 μmol de substrato por minuto; consequentemente, a *atividade específica* é expressa como unidade por miligrama de enzima (U mg^{-1}) (Harris & Keshwani, 2009).

2-4.4. Síntese quimioenzimática de ácido betalâmico e sua aplicação em imagens de microscopia de fluorescência

O ácido betalâmico produzido pelo método quimioenzimático, utilizando-se a AmDODA recombinante, foi acoplado com diferentes aminas para a semissíntese de betalaínas. Inicialmente, o pH da amostra contendo ácido betalâmico foi ajustado para 3 com 0,1 M de ácido clorídrico (HCl) e, em seguida, acetato de etila foi adicionado na proporção de 1:1, sendo o volume final agitado e centrifugado a 5 $^{\circ}\text{C}$, 7.000 x g, por 10 minutos. O

ácido betalâmico coletado foi utilizado nas reações de semissíntese das betalaínas, adicionando-se 100 µL das aminas 7-amino-4-metilcumarina (cumarina 120, C120), 7-amino-4-trifluormetilcumarina (cumarina 151, C151), 7-amino-4-metil-2-hidroxiquinolina (carboestiril 124, Cs124) ou 300 µL de 6-amino-3,4-benzocumarina (Cbz) dissolvidas em acetato de etila. Em seguida, 50 µL de ácido p-toluenossulfônico a 0,1 M e 500 µL de água foram adicionados, sendo as betalaínas coletadas em fase aquosa. As betalaínas semissintéticas obtidas pelo acoplamento entre as aminas e o ácido betalâmico produzido pelo método quimioenzimático foram misturadas com padrões de betalaínas semissintéticas obtidas a partir do acoplamento entre as aminas e o ácido betalâmico natural, extraído a partir do suco de beterrabas, em uma concentração final de 1 µM. Essa mistura foi analisada por HPLC-DAD nas condições descritas por Rodrigues (2017), a qual já havia caracterizado previamente as propriedades fotofísicas das betalaínas semissintéticas oriundas do acoplamento das aminas com o ácido betalâmico natural. Após demonstrarmos a síntese quimioenzimática das betalaínas cBeet120, cBeet151, csBeet124 e cBzBeet, resultantes do acoplamento entre o ácido betalâmico e as aminas C120, C151, Cs124 e CBz, respectivamente, as mesmas foram analisadas quanto ao seu potencial como fluoróforos na marcação de estruturas em raízes de *Arabidopsis thaliana*, um organismo-modelo vegetal que não sintetiza betalaínas naturalmente. Para isso, inicialmente, sementes de *A. thaliana* ecótipo Columbia (Col0) lote At27 foram desinfestadas em uma solução de álcool etílico absoluto por 1 minuto, seguida da imersão por 7 minutos em uma solução contendo água destilada, hipoclorito de sódio 2% e uma gotícula do detergente Tween20 e, por último, a tríplice lavagem das sementes em água destilada. As sementes foram plaqueadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, sem sacarose e com 2% de ágar e incubadas na posição vertical

em câmara de crescimento a 22°C, 60% de umidade relativa do ar (UR) e fotoperíodo de 12h para indução à germinação. Após 3 semanas, as raízes foram cortadas em tamanhos de aproximadamente 10 mm, lavadas em água destilada e incubadas em uma solução fresca de BtC120 a $100 \mu \text{mol L}^{-1}$ por 3 minutos. As raízes foram lavadas três vezes em água destilada e colocadas em uma lâmina com $10 \mu \text{L}$ de PBS, a qual foi coberta com uma lamínula. As imagens foram obtidas no microscópio vertical de epifluorescência Olympus BX51 acoplado a uma câmera DP-71, localizado no Laboratório do Prof. Dr. Renato Mortara da Escola Paulista de Medicina (EPM-UNIFESP). As imagens foram obtidas na presença e ausência da sonda para observação de autofluorescência, característica de células vegetais. Imagens de microscopia de excitação por dois fótons foram adquiridas no microscópio confocal Zeiss LSM-780-NLO do Centro de Facilidades para a Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP/USP).

2-5. Referências Bibliográficas

Christinet, L., Burdet, F. X., Zaiko, M., Hinz, U., & Zrýd, J.-P. (2004). Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiology*, 134(1), 265–274. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031914>

Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2005). Botany: Floral fluorescence effect. *Nature*, 437(7057), 334–334. <https://doi.org/10.1038/437334a>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2012). Characterization of recombinant *Beta vulgaris* 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase active in the biosynthesis of betalains. *Planta*, 236(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1593-2>

Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2014). *Escherichia coli* protein YgiD produces the structural unit of plant pigments betalains: characterization of a prokaryotic enzyme with DOPA-extradiol-dioxygenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1165–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4961-3>

Grewal, P. S., Modavi, C., Russ, Z. N., Harris, N. C., & Dueber, J. E. (2018). Bioproduction of a betalain color palette in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 45, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.12.008>

Harris, T. K., & Keshwani, M. M. (2009). Measurement of Enzyme Activity. In R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*, 2nd Edition, vol. 463, pp. 57–71. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63007-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63007-X)

- Hinz, U. G., Fivaz, J., Girod, P. A., & Zryd, J. P. (1997). The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Molecular and General Genetics*, 256(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s004380050539>
- Jeong, J. Y., Yim, H. S., Ryu, J. Y., Lee, H. S., Lee, J. H., Seen, D. S., & Kang, S. G. (2012). One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5440–5443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>
- Mueller, L. A., Hinz, U., & Zryd, J. P. (1997). The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*, 44(4), 567–569. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00625-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00625-5)
- Rodrigues, A. C. B. (2017). Betalaínas funcionais: semissíntese, propriedades fotofísicas e interações intermoleculares. 165 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Wang, C., Sun, W., & Zhang, Z. (2019). Functional characterization of the horizontally transferred 4,5-DOPA extradiol dioxygenase gene in the domestic silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, (1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/imb.12558>

Considerações Finais

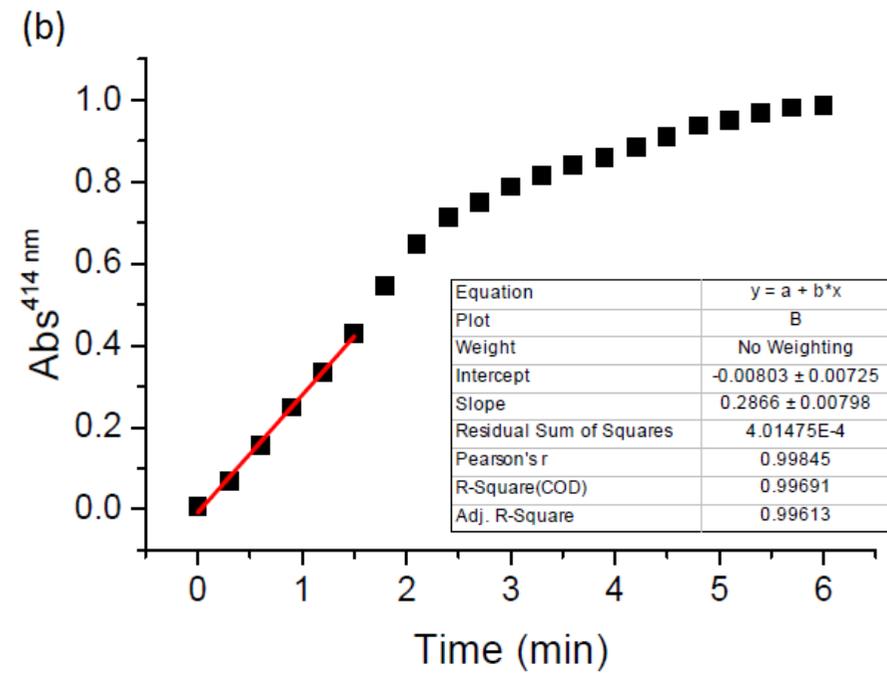
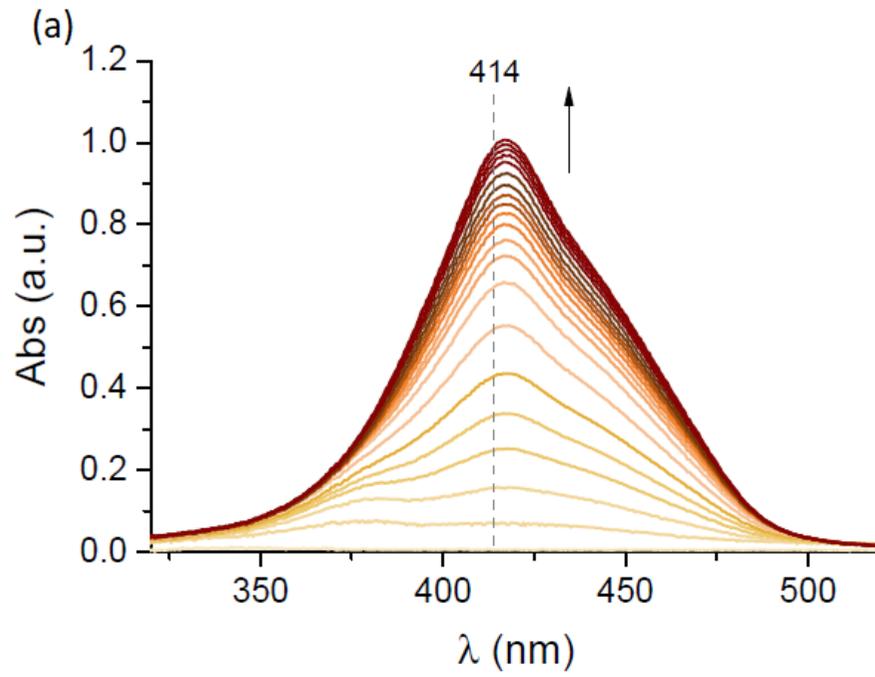
L-DOPA extradiol dioxigenases (DODAs) catalisam a etapa-chave da via de biossíntese de betalainas, pigmentos naturais nitrogenados de ocorrência restrita na natureza. Ao contrário das DODAs de plantas Caryophyllales, as quais catalisam apenas clivagens específicas na posição 4,5 de L-DOPA, a DODA promíscua do fungo basidiomiceto *Amanita muscaria* (AMAMU) pode catalisar uma clivagem adicional na posição 2,3, levando à produção de higroaurinas, uma outra classe de pigmentos de ocorrência aparentemente exclusiva em fungos. Curiosamente, desde a publicação da sequência do gene *dodA*, que codifica para AMAMU, nenhuma informação adicional sobre a promiscuidade catalítica desta enzima, sua relação com DODAs de outras linhagens evolutivas e sua aplicação na síntese quimioenzimática de betalainas foram exploradas.

Ao compararmos AMAMU com DODAs de diferentes linhagens evolutivas, notamos que AMAMU apresenta homologia com outras DODAs de fungos basidiomicetos e ascomicetos, embora não existam evidências sobre o acúmulo de betalainas e higroaurinas nestas espécies. Por outro lado, AMAMU é evolutivamente convergente com DODAs de plantas e bactérias e, embora seja funcionalmente homóloga à DODA da bactéria *Escherichia coli*, esta última não possui homologia com AMAMU, mas sim com DODAs de plantas. Análises filogenéticas entre DODAs de plantas, fungos e bactérias corroboram com os dados apresentados na literatura, os quais parecem indicar que a evolução de DODAs em plantas se deu por eventos de duplicação e neofuncionalização, seguidos de perda ou silenciamento gênico em táxons de Caryophyllales antocianínicas; e sugere eventos de transferência horizontal de genes

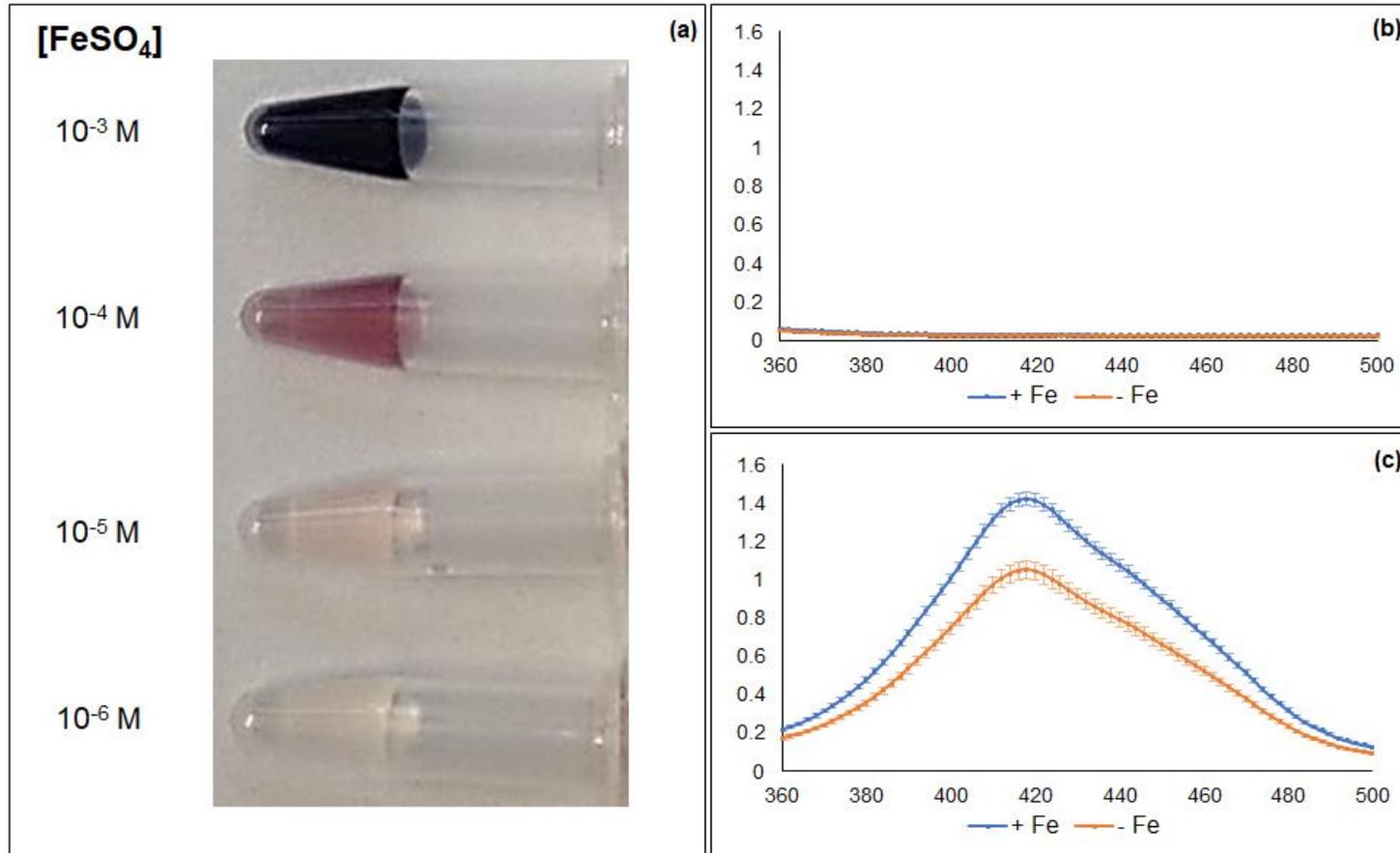
entre linhagens de plantas e alguns fungos e bactérias. Nós também encontramos um padrão de resíduos catalíticos betalaína-específicos, característico da linhagem *DODA* α , em Caryophyllales betalaínicas e demonstramos que não é possível associar a expressão de transcritos de diferentes linhagens de DODAs com diferenças na pigmentação entre beterrabas amarelas e vermelhas.

Ao tentarmos clonar a região codificadora de *dodA* para obtermos a proteína recombinante a partir do fungo *A. muscaria*, observamos que a amplificação da CDS resultava em um fragmento de DNA com 97 pb a mais do que o esperado, como resultado da retenção do primeiro íntron devido a substituição do sítio canônico de *splicing* 3'-AG por 3'-GA. A clonagem e expressão de uma nova CDS de 558 nucleotídeos com início em um novo códon que se mantém na mesma fase de leitura (ORF) de AMAMU, resulta em uma proteína de 185 aminoácidos idêntica em sequência à AMAMU, exceto pela ausência dos primeiros 43 aminoácidos. AmDODA, assim denominada, possui um tamanho aproximado de 22 kDa e mostrou-se capaz de catalisar a síntese de ácido betalâmico e muscaflavina a partir dos substratos L- e D-DOPA com um pH ótimo de atividade de 8,5 e valores de constante de Michaelis (K_M) e velocidade máxima (V_{max}) de $3,7 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e $3,3 \pm 0,4 \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente, próximos aos descritos na literatura para outras DODAs betalaínicas. Por fim, demonstramos que AmDODA pode ser empregada na síntese quimioenzimática de quatro betalaínas-modelo com potencial aplicação como sondas fluorescentes para a aquisição de imagens de microscopia confocal de fluorescência de dois fótons em raízes de *Arabidopsis thaliana*. Dessa forma, os resultados aqui apresentados colaboram com o entendimento da evolução de DODAs na natureza e descreve um método que viabiliza a produção biotecnológica de betalaínas e higroaurinas, com potencial aplicação, a partir de uma mesma enzima.

Anexo I



Anexo II



Anexo I

Estudo da atividade da enzima AmDODA. (a) Espectro de absorção monitorado em função do tempo de reação. (b) Ajuste linear da variação da absorção em 416 nm na fase inicial da reação para o cálculo da velocidade inicial. Condições: [AmDODA] = 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [AscH] = 10 mmol L^{-1} , [L-DOPA] = 1 mmol L^{-1} , solução fosfato de sódio (50 mmol L^{-1}).

Anexo II

(a) Reações conforme o protocolo de Grewal *et al.* (2018), contendo 4,4 mM de ácido ascórbico e 0,88 mM de L-DOPA suplementadas com concentrações entre 10^{-3} e 10^{-6} M de FeSO_4 , sem adição de enzima. (b) Espectro de absorção do tempo zero das reações conforme protocolo de Gandía-Herrero & García-Carmona (2014), contendo: 2,5 mM de L-DOPA, 10 mM de ácido ascórbico, 1 μM de AmDODA, suplementadas ou não com 1 μM de FeSO_4 , em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,5. (b) Espectro de absorção das reações apresentadas em (a) 60 minutos após o início.

Súmula Curricular

Douglas Moraes Mendel Soares; SOARES, D. M. M.

douglas@iq.usp.br | <http://lattes.cnpq.br/9881543977135448>

1. Formação

Ano	Título	Instituição
2009	Ensino Médio e Técnico em Agropecuária	Instituto Federal do Espírito Santo (IFES)
2014	Bacharel em Ciências Biológicas com Ênfase em Biotecnologia	Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
2019	Doutorado em Ciências Biológicas/Bioquímica	Instituto de Química/Universidade de São Paulo (IQ/USP)

2. Histórico Profissional, Distinções Acadêmicas e Prêmios

2010-2011: Aluno voluntário de Iniciação Científica no projeto “Obtenção de *primers* SSR a partir de ESTs originadas de diferentes tecidos do cafeeiro” - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2011-2014: Monitor das disciplinas de graduação: “Histologia e Anatomia Vegetal”, “Biologia Molecular” e “Genética de Populações” oferecidas pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2011-2012: Aluno voluntário de Iniciação Científica no projeto: “Amplificação cruzada e caracterização de marcadores microssatélites entre espécies de *Pticaoirnioideae* e *Bromelioideae* (Bromeliaceae)” - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2012: Representante discente do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas junto ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2012: Colaborador no Programa de Extensão de Promoção à Saúde da Mulher - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2012-2013: Aluno bolsista de Iniciação Científica no projeto: “Obtenção de *primers* SSR a partir de ESTs originadas de diferentes tecidos do cafeeiro objetivando transposição entre espécies” - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2013-2014: Aluno voluntário de Iniciação Científica no projeto: “Avaliação da fidelidade genética de plântulas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regeneradas através de embriogênese somática indireta utilizando marcadores ISSR” - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2014: Menção honrosa como melhor trabalho na área de Ciências Biológicas concedida na XXIV Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2014-2018: Bolsista do Projeto Aquarela, Programa NATURA Campus, na Universidade de São Paulo (USP).

2016: Menção honrosa no Prêmio de Evolução Francisco Mauro Salzano concedido durante o "62nd Brazilian-International Congress of Genetics", organizado pela Sociedade Brasileira de Genética.

2016-2017: Estagiário em duas edições do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) nos módulos de Bioquímica e Biologia Molecular oferecidos para o curso de graduação em Medicina da Universidade de São Paulo.

2016-2018: Representante discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) do Instituto de Química/Universidade de São Paulo (IQ/USP) na Comissão Coordenadora do Programa (CCP), Comissão de Pós-Graduação (CPG), Conselho do Departamento de Bioquímica e Congregação do Instituto de Química.

2016-2018: Organizador do Ciclo de Seminários de Pós-Graduandos e Pós-Doutores do Departamento de Bioquímica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP).

3. Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes

- Artigos científicos:

1. D. M. M. SOARES *et al.* Assessment of genetic stability in three generations of in vitro propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. *Tropical Plant Biology*, v. 9, p. 229-238, 2016. Número de citações: 2.

2. A. M. A. SILVA-CONFORTI *et al.* Rede do Bem Capixaba: uma experiência de organização social na prevenção ao uso de álcool, tabaco e drogas. *Revista Guará*, v. 3, p. 121-129, 2015. Número de citações: 1.

- Resumos publicados em anais de congressos:

3. D. M. M. SOARES *et al.* Comparison of bacterial, fungal and plant dioxygenases: catalytic promiscuity and evolution. Apresentação oral. Menção honrosa no Prêmio de Evolução Francisco Mauro Salzano. 62nd Brazilian-International Congress of Genetics, Caxambu/MG, 2016.

4. D. M. M. SOARES *et al.* Why are there yellow beets? VI Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Ouro Preto/MG, 2017.

5. D. M. M. SOARES *et al.* Obtenção de *primers* SSR a partir de ESTs originadas de diferentes tecidos de *Coffea arabica*. VIII Encontro de Genética e Melhoramento e III Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento, Viçosa/MG, 2011.

6. R. D. MOURA *et al.* Desenvolvimento de *primers* EST-SSR a partir de sequências de *Coffea arabica* potencialmente associadas com a resistência a doenças. VIII Encontro de Genética e Melhoramento e III Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento, Viçosa/MG, 2011.

7. E. U. NOGUEIRA *et al.* Diversidade genética de *Pitcairnia flammea* (L.) John. (Bromeliaceae) em uma população sob variadas condições de antropização. Apresentação oral. XXI Encontro Regional de Botânicos de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo, Viçosa/MG, 2011.

8. C. V. M. SILVA *et al.* Rede do Bem Capixaba, Uma Experiência de Organização Social na Prevenção do Álcool, Tabaco e Drogas. Jornada Integrada de Extensão da UFES, Vitória/ES, 2013.

- Capítulos de livro:

9. A. M. A. SILVA-CONFORTI *et al.* Capítulo 1 - Tabaco. Brincar e Viver Feliz - Exercícios Psicoeducativos em Educação Alimentar e Prevenção do uso de tabaco, álcool e outras drogas - Livro do aluno. 1ª ed. Alegre: CAUFES, 2013, v. 1, p. 8-60.

10. A. M. A. SILVA-CONFORTI *et al.* Capítulo 1 - Tabaco. Brincar e Viver Feliz - Capacitação e Exercícios Psicoeducativos comentados sobre Ciência e o bem viver - Educação Alimentar e

Prevenção do uso de tabaco, álcool e outras drogas - Livro do professor. 1ª ed. Alegre: CAUFES, 2013, v. 1, p. 15-59.

4. Indicadores quantitativos

Publicações: 2

Citações: 3

Resumos em anais de congressos: 12

Capítulos de livro: 2

Colaborações na orientação de alunos de Iniciação Científica: 5

Colaborações na orientação de alunos de Doutorado: 1

5. MyResearcherID (ISI)/GoogleScholar

<http://www.researcherid.com/rid/G-9903-2017>

<https://scholar.google.com.br/citations?user=RRcnLSEAAAAJ&hl=pt-BR&oi=ao>

6. Outras informações

- Colaborou na orientação de três alunas do curso Técnico em Química da Escola Técnica Estadual Getúlio Vargas (ETEC) com o Trabalho de Conclusão de Curso: “Biossíntese de betalaínas em beterrabas submetidas à estresse salino e bacteriano”.

- Colabora na orientação de dois alunos de Iniciação Científica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP), nos projetos: “Papel biológico do gene *ygiD* em

Escherichia coli” e “Caracterização do gene L-DOPA 4,5-dioxigenase (DODA) em cravo (*Dianthus caryophyllus*)”.

- Colabora na orientação de uma aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Bioquímica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP) com o projeto: “Análise comparativa de L-DOPA 4,5-dioxigenases (DODAs) de diferentes linhagens evolutivas”.