

Carbohydrate-active enzymes (CAZymes)

Profa. Dra. Chirlei Glienke
BIOGEMM-UFPR

CAZymes

- Várias classes de enzimas que catalisam a montagem e a quebra de oligossacarídeos e polissacarídeos
- Oligômeros e polímeros de carboidratos:
 - representam a maior parte do carbono fixado na fotossíntese
 - são utilizadas por quase todos os organismos vivos (autotróficos ou heterotróficos) para energia, estrutura, e uma infinidade de sinalização intra e intercelular
 - Participam das interações patógeno-hospedeiro

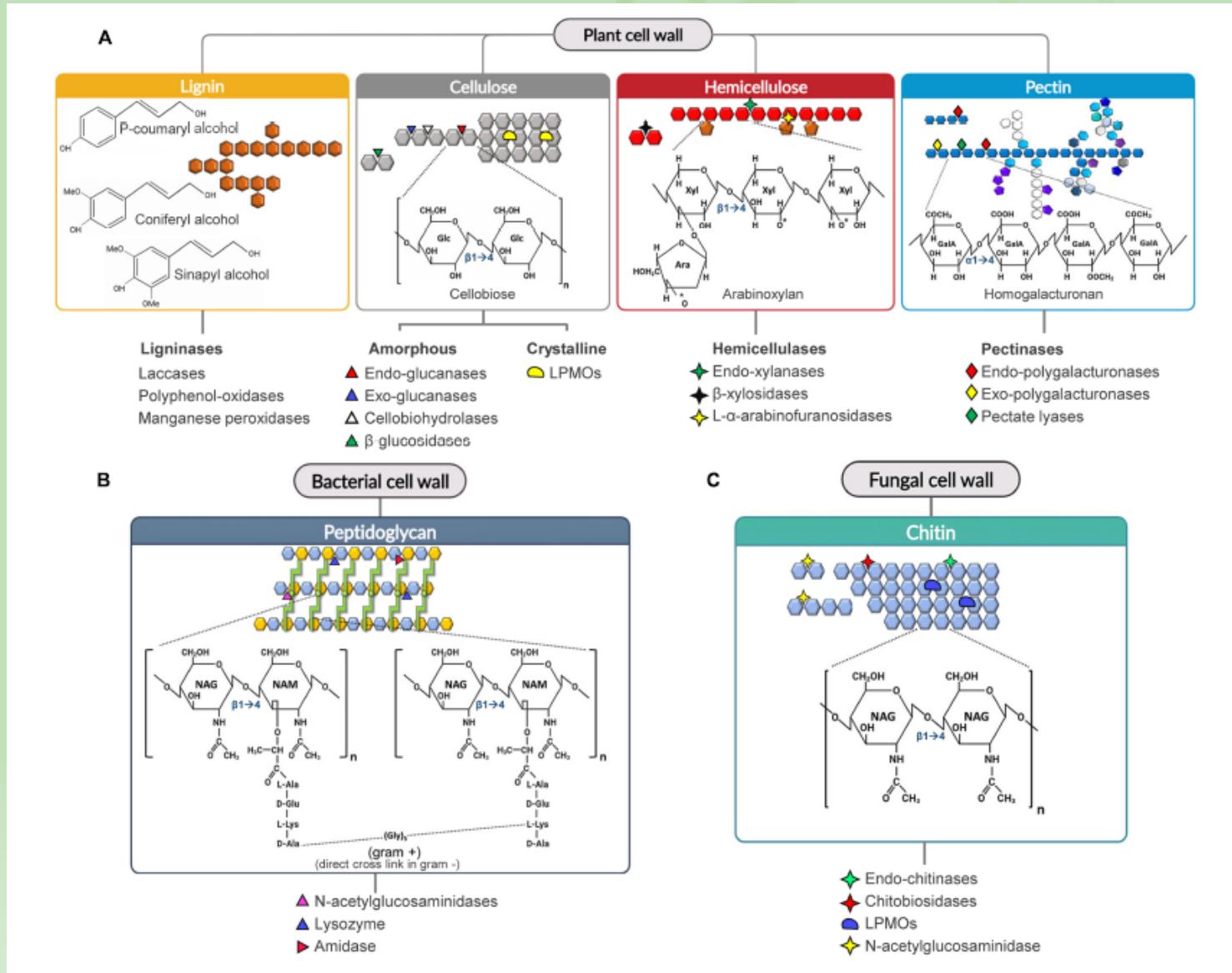
CAZymes

- Em fitopatógenos:
 - CAZymes envolvidas em:
 - Degradação da parede celular do hospedeiro (penetração e colonização)
 - Fonte de carboidratos para crescimento (nutrição do patógeno)

Classes de CAZymes

- glycosyltransferases (GTs)
- glycoside hydrolases (GHs)
- polysaccharide lyases (PLs)
- carbohydrate esterases (CEs)
- CAZymes do tipo cell wall degrading enzymes (CWDEs): degradação da parede celular vegetal por fungos e bactérias

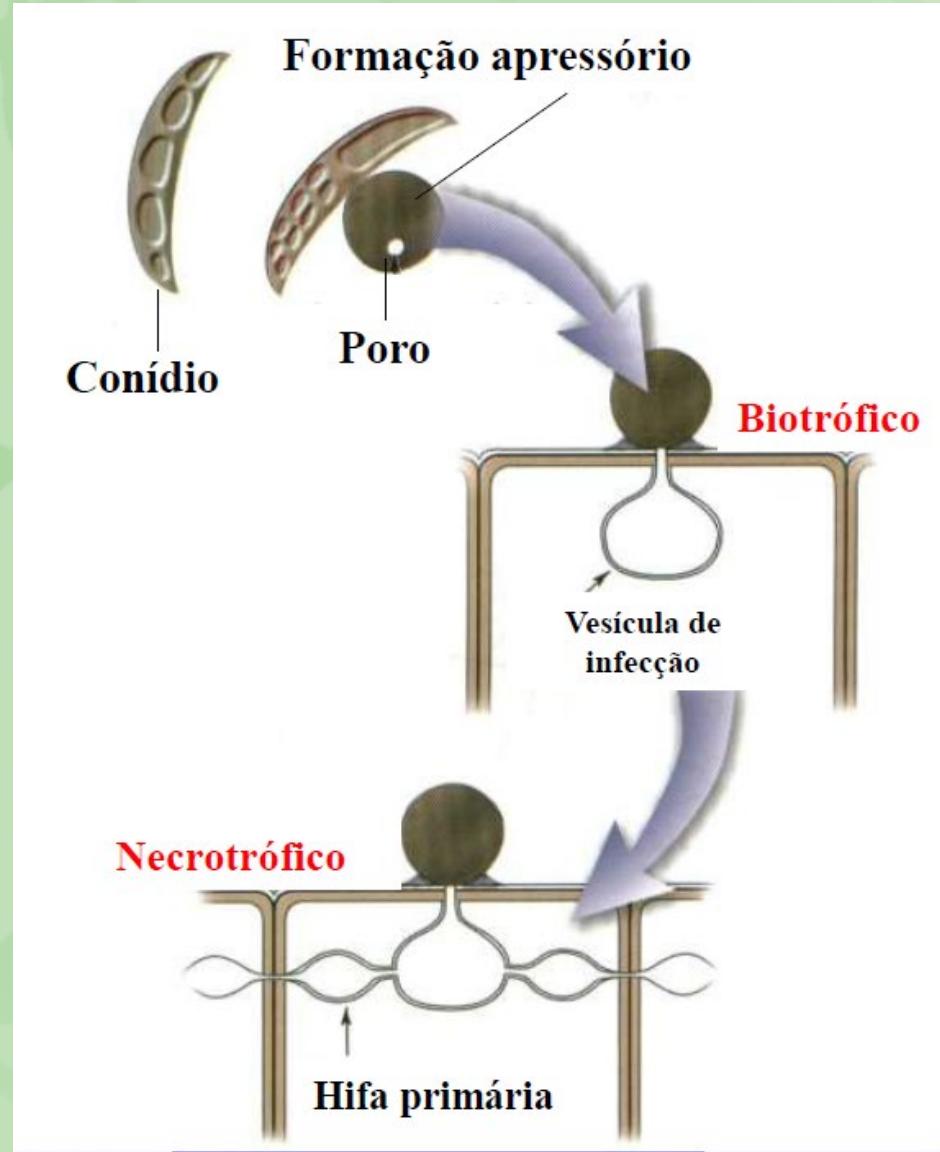
Principais CWDEs



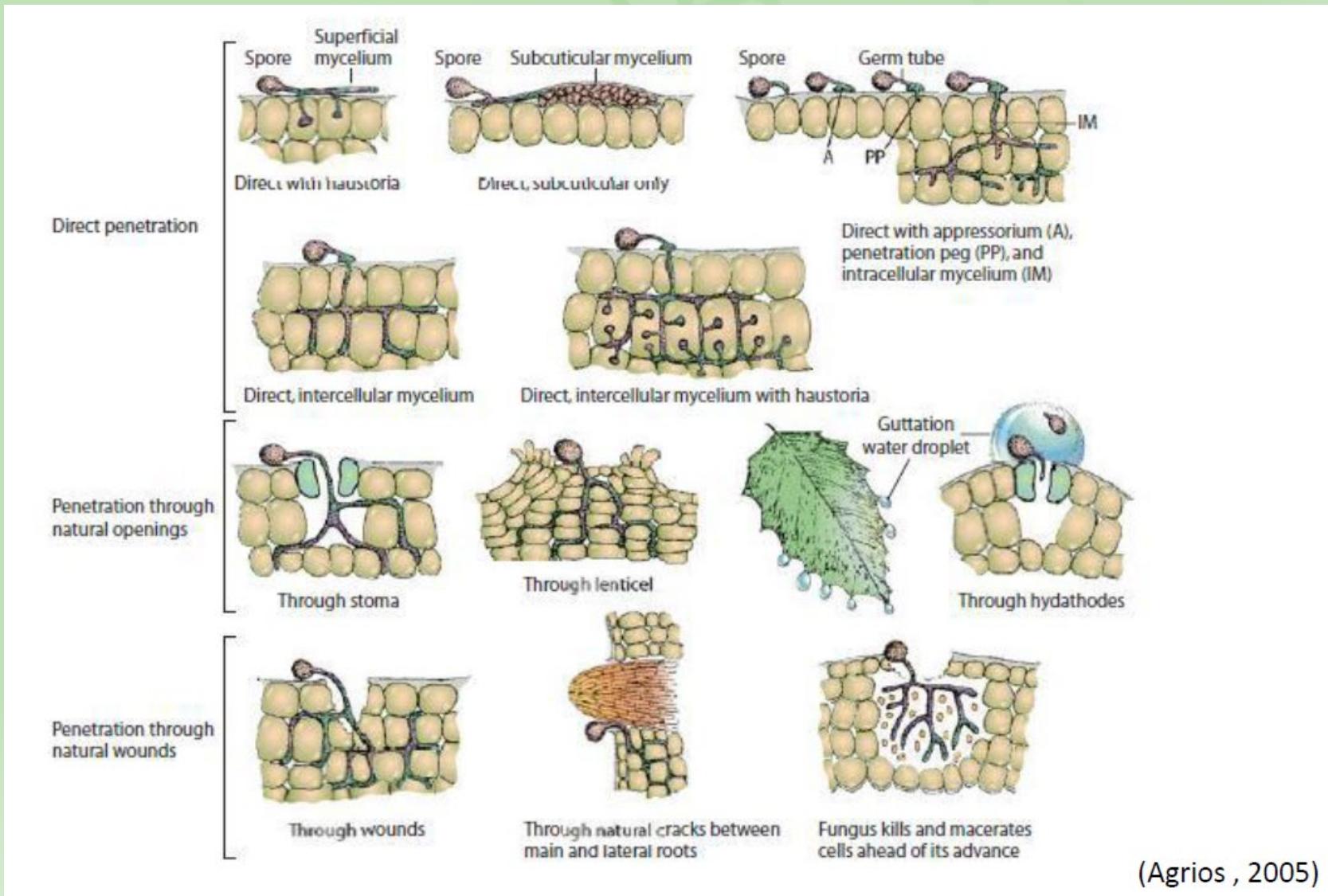
Processo de infecção fúngica

Mecanismos de ataque:

- Enzimas
- Toxinas
- Hormônios

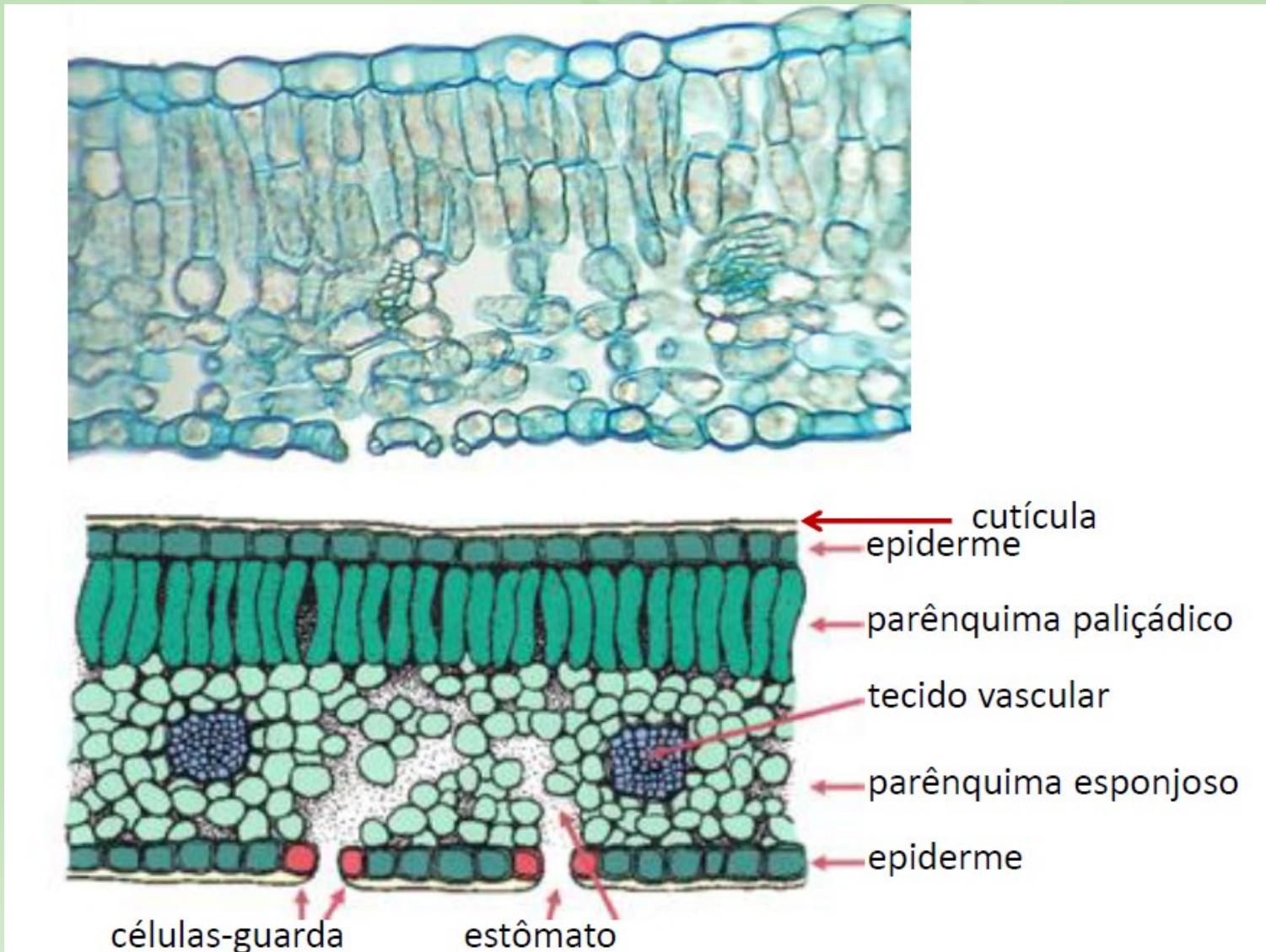


Vias de penetração pelos fungos

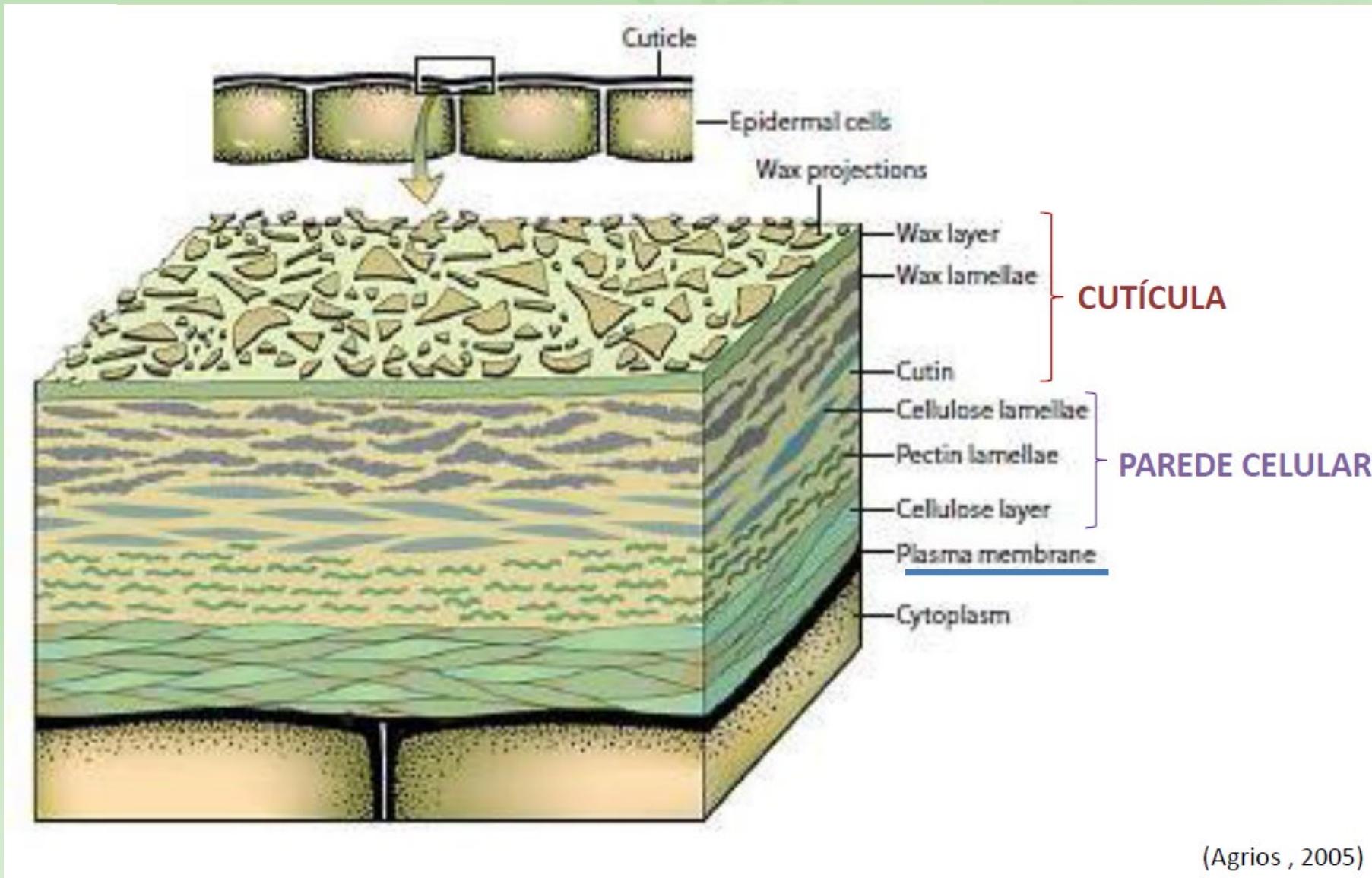


(Agrios , 2005)

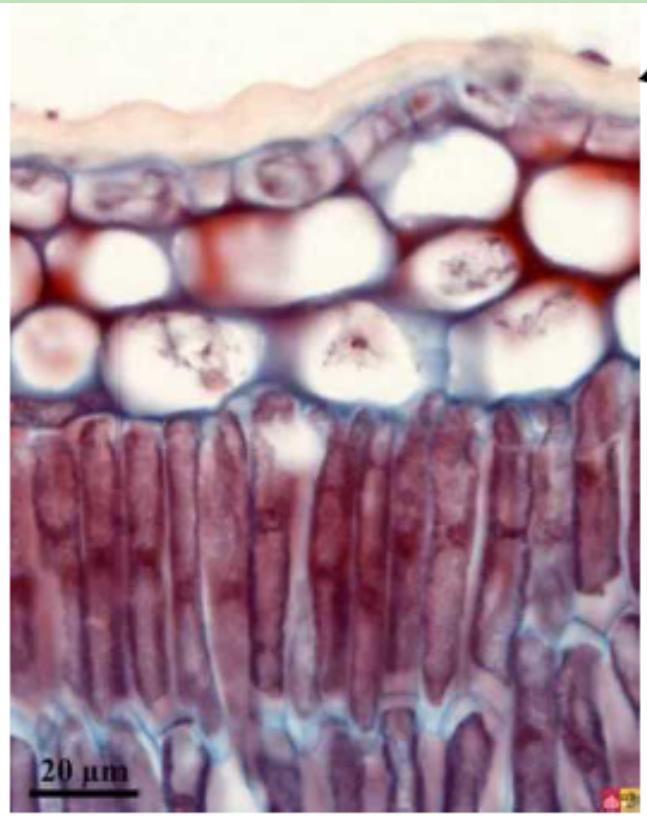
Tecido vegetal foliar



Estrutura da cutícula e da parede celular vegetal



Cutícula



CUTINASES

- Esterases que degradam a cutícula

- **Cutícula:** camada lipídica contínua, que recobre a *epiderme* de folhas, frutos e talos jovens.

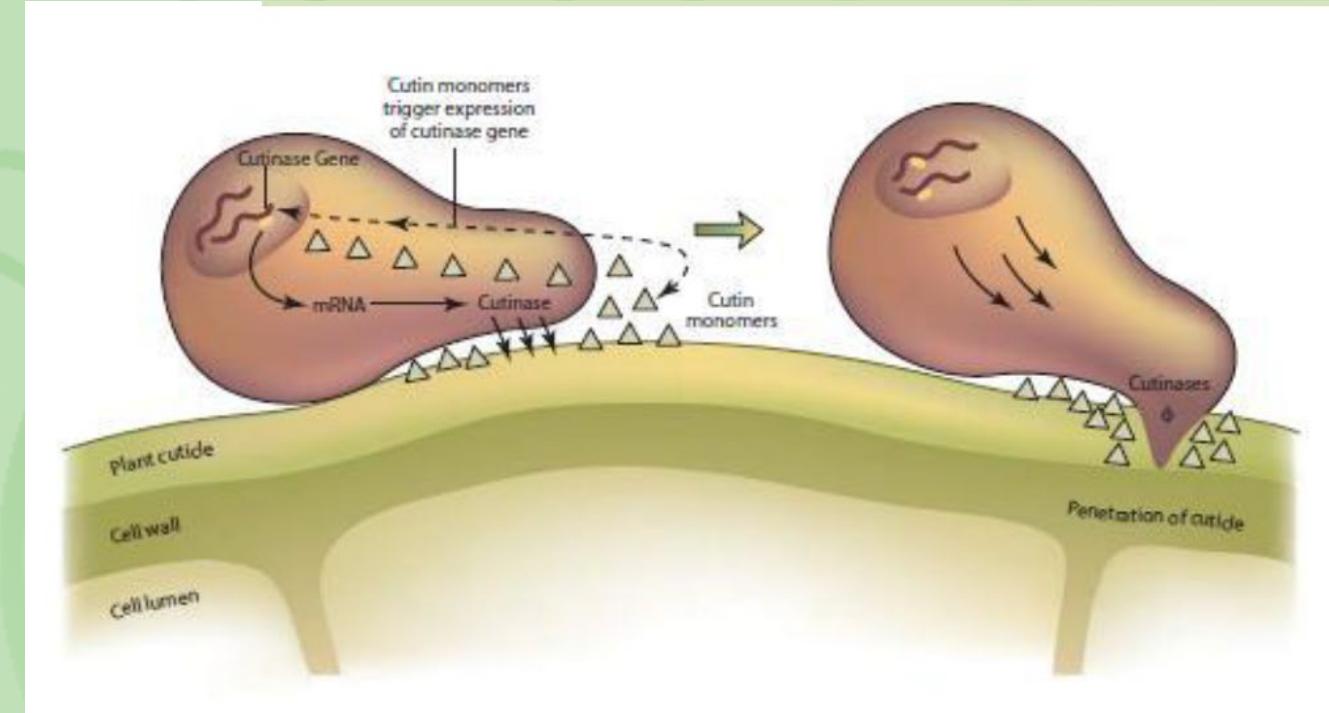
Função:

- evita a difusão de água e nutrientes para o ambiente externo
- protege a planta contra efeitos adversos e ataque de fitopatógenos.

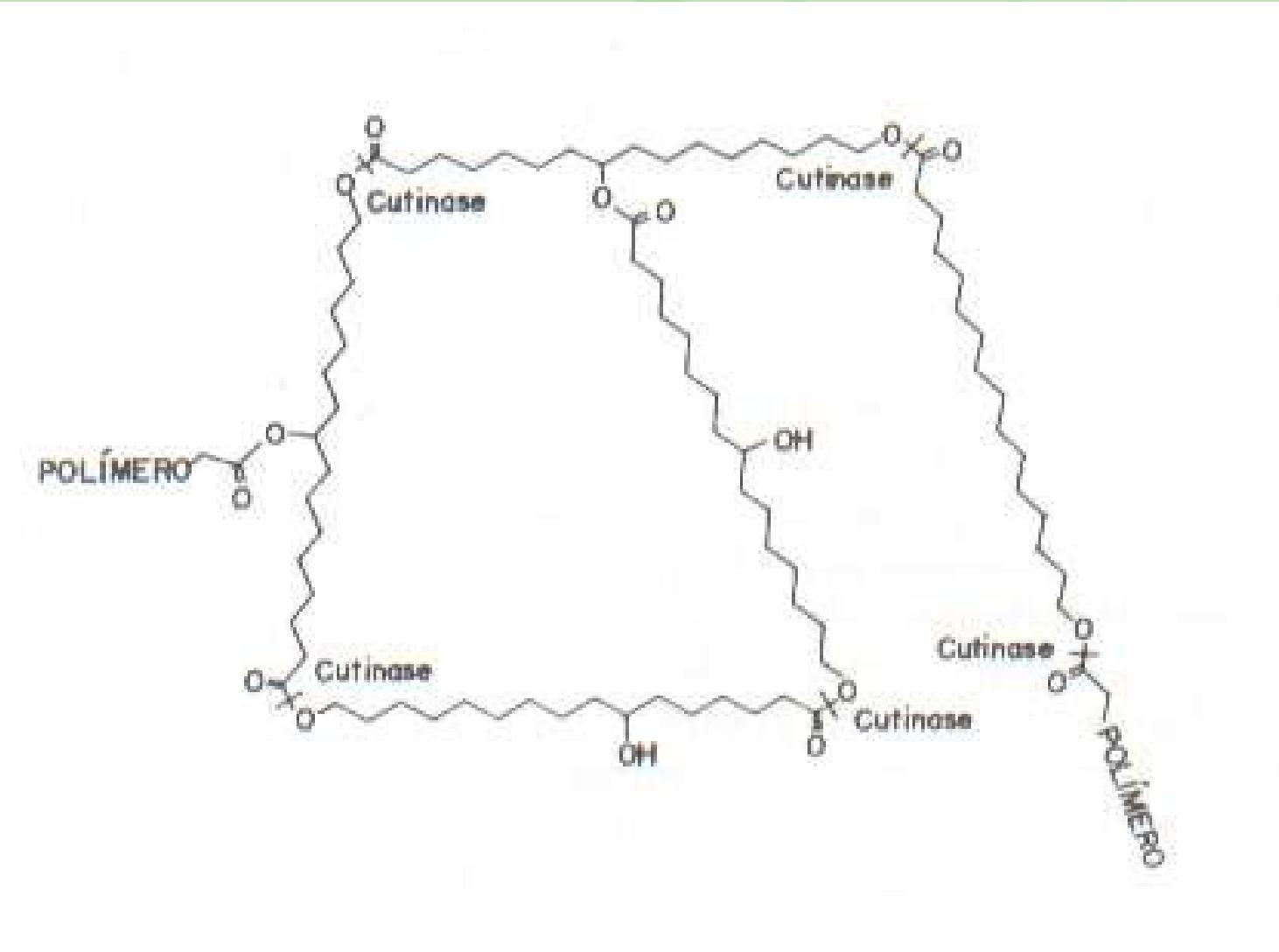
Componentes:

- compostos alifáticos (ceras)
- polímero insolúvel (**cutina**) +

Colletotrichum gloeosporioides

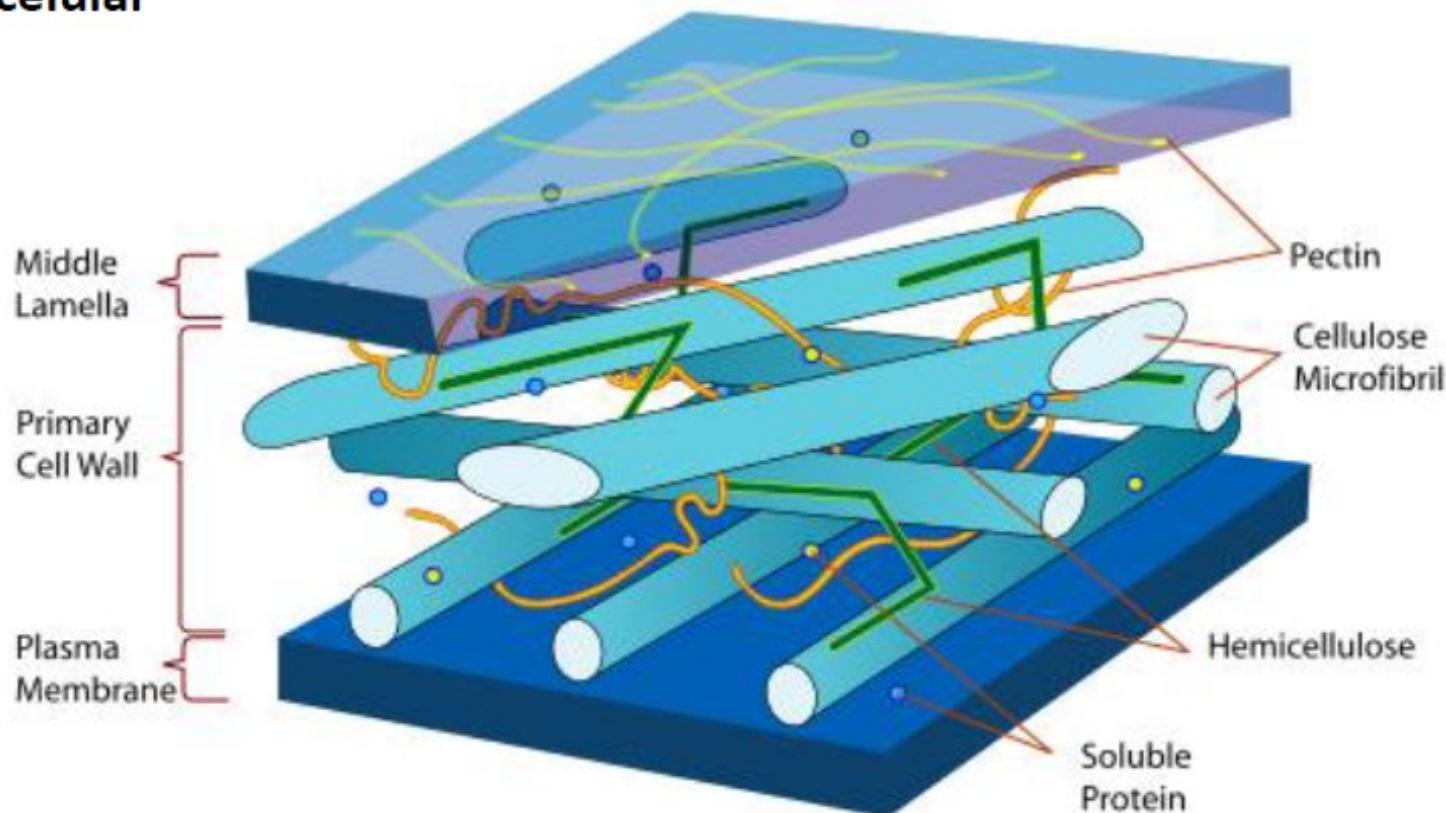


Cutinases



Parede celular

- Lamela média: entre as paredes celulares
- Parede primária: entre a membrana plasmática e a lamela média
 - somente em células em ativo processo de crescimento,
após a divisão celular ser completada
- Parede secundária: internamente à parede primária, formada após o término da expansão celular



LAMELA MÉDIA

Constituída por substâncias pécticas

- cimento intercelular
- gel amorfó composto por polissacarídeos (longas cadeias de ácido D-galacturônico)
- cadeias ligadas por íons de Cálcio
- 35% dicotiledôneas / 9% monocotiledôneas

PAREDE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

hemicelulose
celulose

HEMICELULOSE

- maior constituinte da parede vegetal primária
- misturas complexas de polissacarídeos:
Dicotiledôneas:

- **xiloglucana: parede primária**
– ligações glicosídicas β -1,4 e xilose β -1,6 com xilose
- **xilanás: parede secundária**
– xilose com ligações β -1,4

Monocotiledôneas:

- **arabinoxilanás: cadeias laterais de arabinose**
- **β -glucanas: glicose unidos por ligações β -1,3 e β -1,4**

CELULOSE

- Polissacarídeo (**glicose em ligações β -1,4**)
- 20-30% nas paredes primárias
- 40% parede secundária plantas lenhosas

Cell Wall Degrading Enzymes



CWDEs com atividade celulolítica

- Celulose:
 - β -1,4-homopolímero formado por unidades repetidas de celobiose (dissacarídeo de D-glicose)
- As enzimas celulolíticas:
 - Oxidorredutases (isto é, monooxigenases de polissacarídeo lítico,LPMOs)
 - Glicosil-hidrolases (ou seja, celulases)
 - três principais atividades:
 - endo-glucanase
 - exo-glucanase (ou seja, celodextrinase e celobiohidrolase)
 - β -glucosidase

CWDEs com atividade Hemicelulolítica

- Hemicelulose:
 - Polissacarídeo ramificado e altamente heterogêneo composto por: pentoses (por exemplo, xilose e arabinose), hexoses (por exemplo, manose, glicose e galactose) e açúcares ácidos (por exemplo, ácido galacturônico e glucurônico)
- Principalmente hidrolisada por glicosil-hidrolases
 - xilanases
 - Mananases
 - Galactanase
 - β -galactosidases
 - β -xilosidase
 - β -manosidasee
 - L-a-arabinofuranosidase

CWDEs com atividade Pectinolítica

- Pectina:
 - É um Ácido a- (1,4) -polissacarídeo ramificado que consiste principalmente de ácido D-galacturônico e de várias proporções de outros açúcares: L-ramnose, L-arabinose, D-galactosee D-xilose
 - Composta por diferentes domínios: homogalacturonan, xilogalacturonan, rhamnogalacturonanI e rhamnogalacturonan II
- É degradada por:
 - glicosil-hidrolases :
 - endo-poligalacturonases
 - exo-poligalacturonases
 - Liases:
 - pectato-liases

CWDEs com atividade ligninase

- Lignina:
 - é um polímero fenólico complexo derivado de monolignóis fenilpropanóides
 - conferem força e rigidez para a parede celular da planta
- Degradação principalmente catalisada por:
 - ligninases
 - lacases
 - polifenol-oxidases
 - (manganês) -peroxidases

CAZymes

- Enzimas degradativas:
 - 215 famílias com 680.000 sequências: glycoside hydrolases (GH), glycosyl transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), and carbohydrate esterases (CE)

Table 1

The families of degradative enzymes in the CAZy database as of January 2019

Category	Families	Number of sequences in families ^c	Number of PDB structures in families
Glycoside hydrolases (GHs) ^a	GH1 – GH156	593 529	1391
Polysaccharide lyases (PLs)	PL1 – PL29	17 249	77
Lytic polysaccharide mono-oxygenases (LPMOs) ^b	AA9, AA10, AA11, AA13 – AA15	5166	39

^a Glycoside phosphorylases are found either in GH or in GT families depending on their evolutionary history.

^b LPMOs are found in the auxiliary activity category of CAZy that also lists a number of lignolytic enzymes.

^c As of January 2019; note that the CAZy database only lists proteins that have been released as finished entries in the daily releases of GenBank [2].

Modelo de degradação da parede celular vegetal pelo fungo *Neurospora crassa*

Glicose

Xylose

Xylobiose

Cellobiose

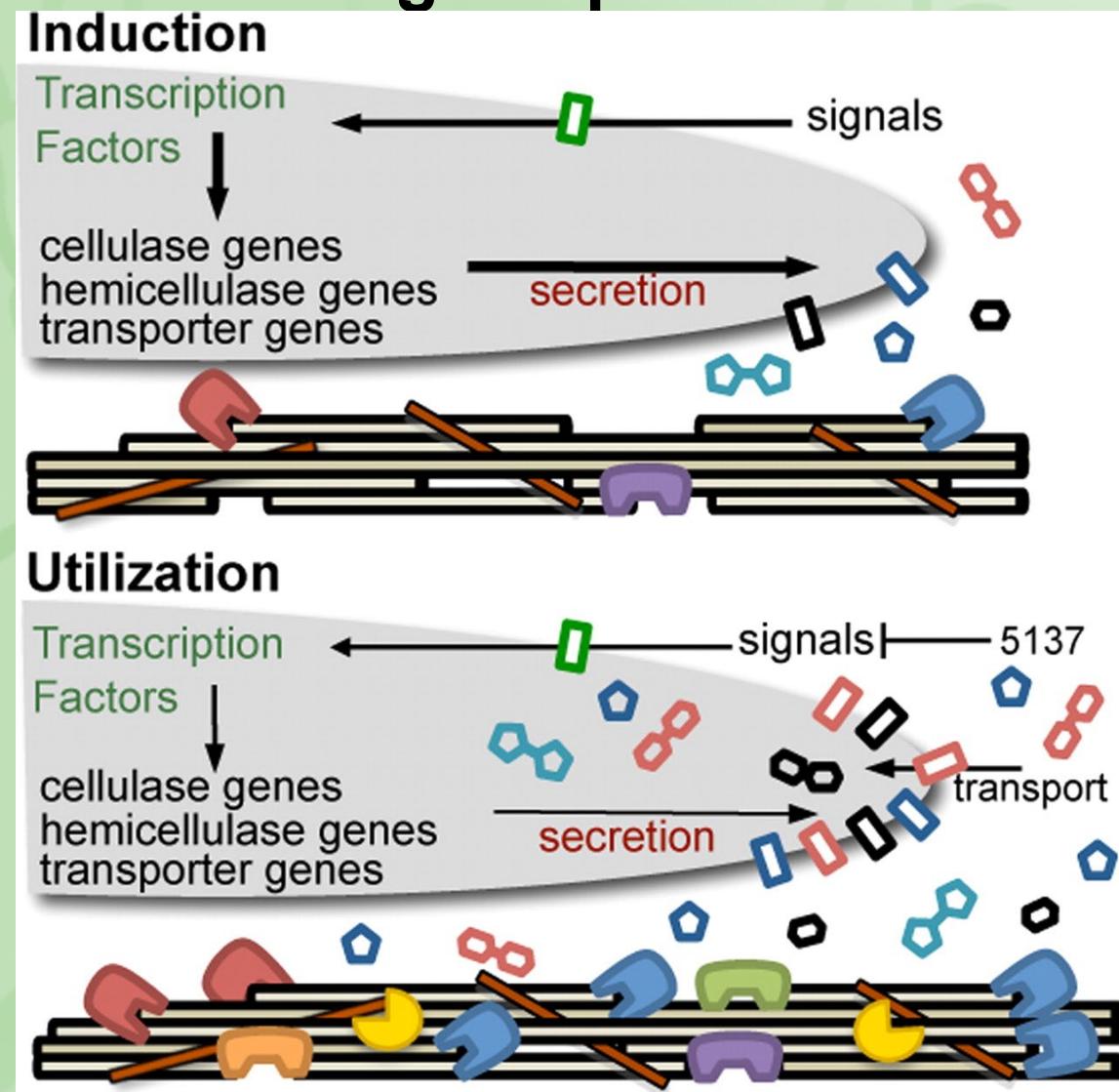
cellobiohydrolase(I) (CBHI)

cellobiohydrolase(II) (CBHII)

endoglucanases EG2

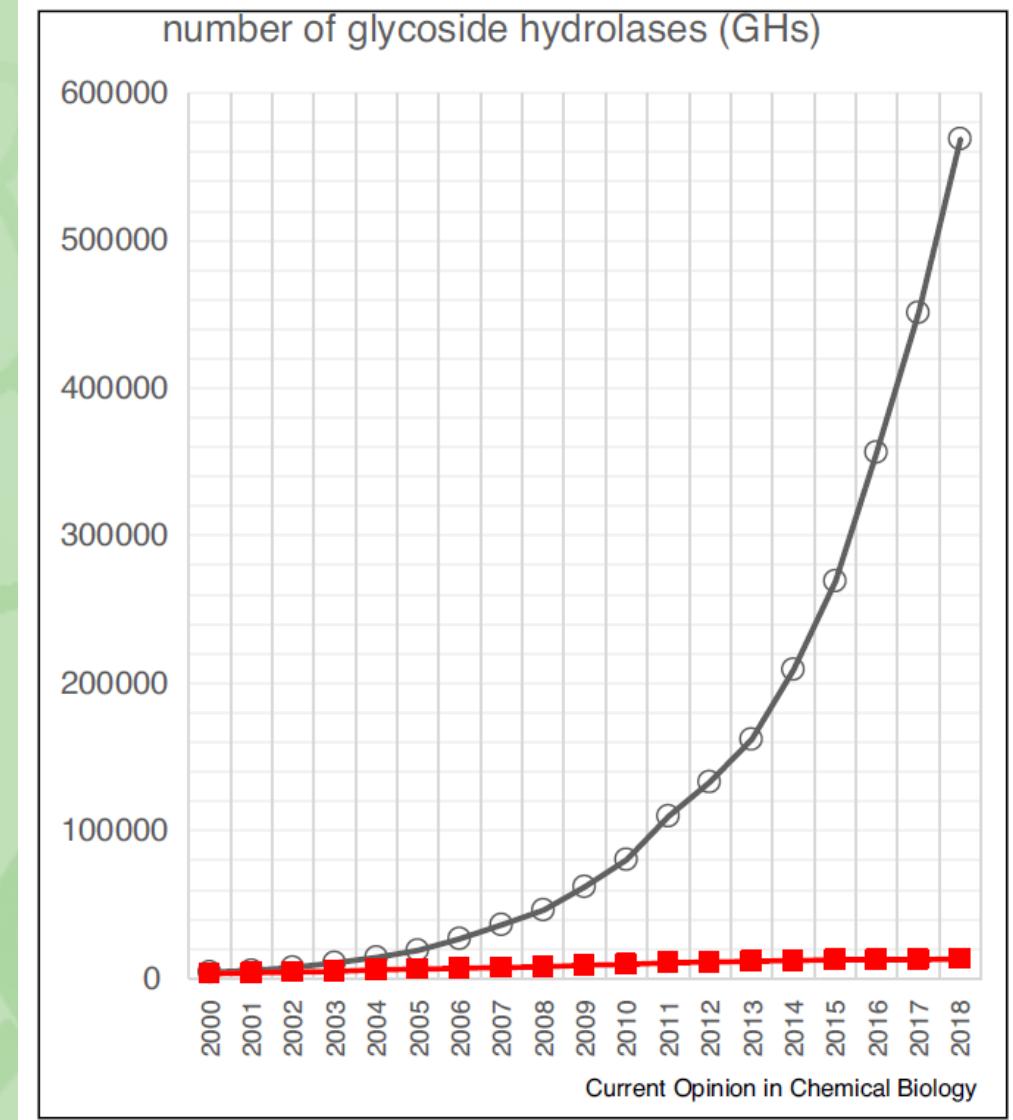
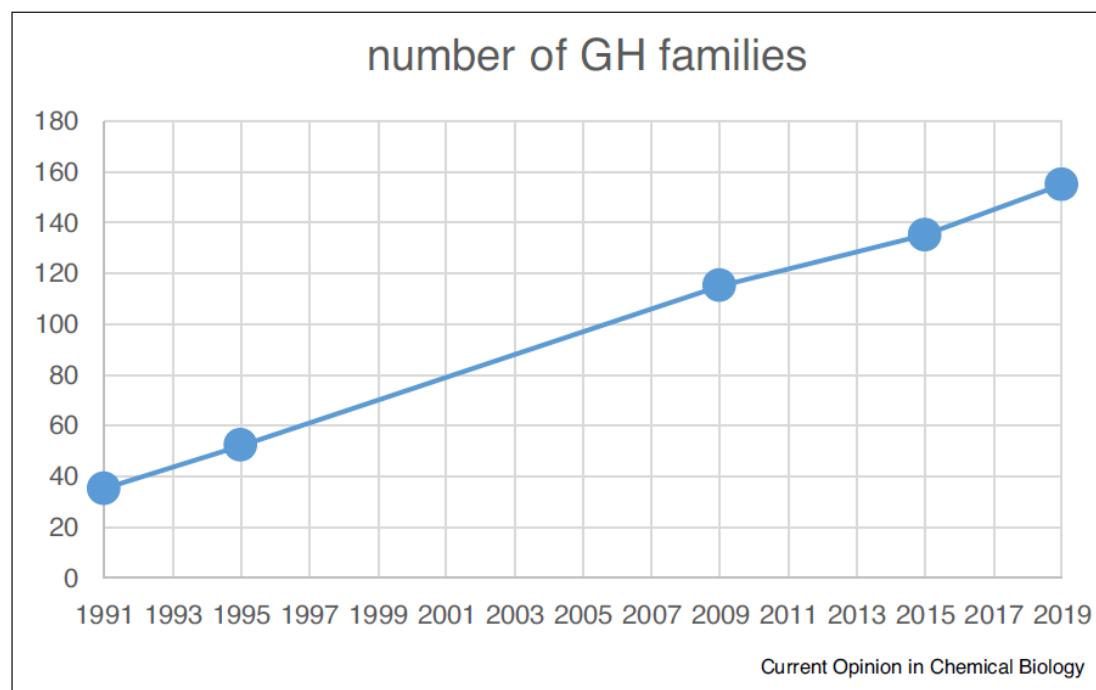
endoglucanases EG6

Xylanase



Glycoside hydrolases (GHs)

Crescimento de famílias GHs em função do sequenciamento de genomas

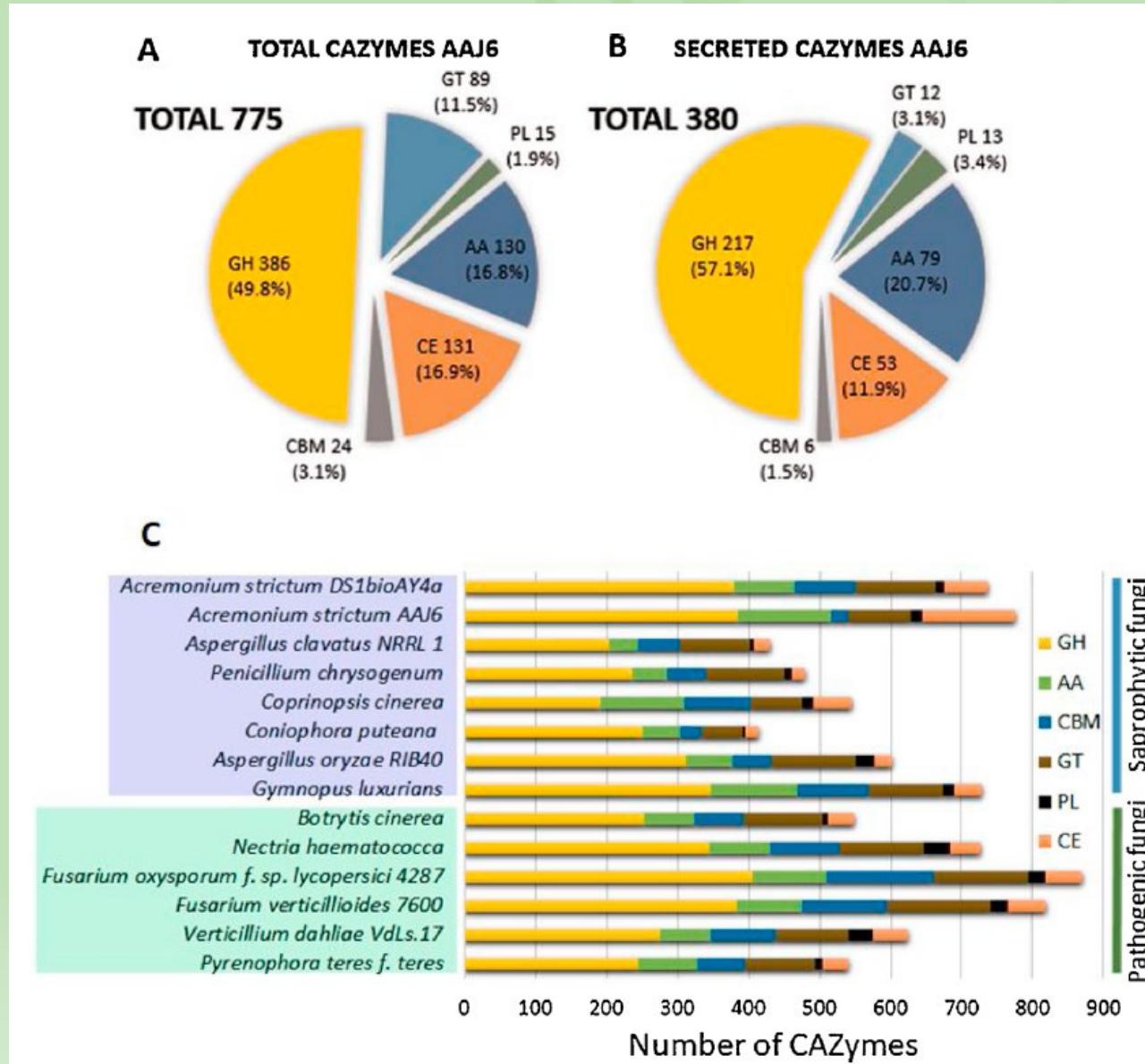


Growth of the number of GHs in the CAZy database. Black: number of sequences; red: number of biochemically characterized entries.

As 21 famílias de CAZymes degradativas descritas nos últimos 2 anos

Family	Mechanism	Activities	Fold	PDB	Clan
GH137	n.d.	β -L-arabinofuranosidase	β propeller (5 blades)	5MT2 [7 ^{**}]	
GH138	Retaining	α -galacturonidase	(β/α) ₈	6HZF [30]	
GH139	n.d.	α -2-O-Me-L-fucosidase			
GH140	Retaining	Apiosidase	(β/α) ₈	5MSY [7 ^{**}]	
GH141	n.d.	α -L-fucosidase, xylanase	β -helix	5MQP	
GH142	n.d.	β -L-arabinofuranosidase	(α/α) ₆	5MQR [7 ^{**}]	
GH143	Retaining (inferred)	2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid hydrolase	β propeller (5 blades)	5MQR [7 ^{**}]	
GH144	Inverting	Endo- β -1,2-glucanase	(α/α) ₆	5GZK [17 [*]]	
GH145	Retaining	L-Rha- α -1,4-GlcA α -L-rhamnohydrolase	β propeller (7 blades)	5MVH [9]	
GH146	Retaining	β -L-arabinofuranosidase	(α/α) ₆	5OPJ [8 [*]]	GH-P
GH147	Retaining (inferred)	β -galactosidase	(β/α) ₈ (inferred)		GH-A (inferred)
GH148	Retaining (inferred)	β -1,3-glucanase	(β/α) ₈ (inferred)		GH-A (inferred)
GH149	Inverting	β -1,3-glucan phosphorylase	(α/α) ₆	6HQ6 [31]	GH-Q
GH153	n.d.	poly- β -1,6-D-glucosamine hydrolase	(β/α) ₈	6AU1 [18 [*]]	
GH154	n.d.	β -glucuronidase			
GH156	Inverting	Exo- α -sialidase			
PL27	β -elimination	L-rhamnose- α -1,4-D-glucuronate lyase	(α/α) ₆	5NO8 [11]	
PL29	β -elimination	Hyaluronate lyase chondroitin-sulfate ABC endolyase dermatan sulfate lyase			
AA14	C-1 oxidation	Lytic xylan monooxygenase	Antiparallel β -sandwich	5NO7 [22 [*]]	
AA15	C-1 oxidation	Lytic cellulose monooxygenase lytic chitin monooxygenase	Antiparallel β -sandwich	5MSZ [23 [*]]	

CAZymes em *Acremonium strictum*



Efetores



Efetores

- Pequenas proteínas secretadas (<300aa), muitas vezes ricas em cisteína, que interferem na função de células hospedeiras – auxiliam o patógeno a escapar da defesa do hospedeiro
 - Além de efetores proteicos, hoje são conhecidos os efetores não proteicos (metabolismo secundário, Collemare et al. 2019)
- Fundamentais para a virulência dos patógenos
 - Modulam ou permitir a interação p-h
 - Muitas interagem com proteínas dos hospedeiros
- Altamente variáveis, rápida evolução acompanhando o rápido surgimento de defesa dos hospedeiros
- Muitos participam na adaptação e no salto do patógeno para novos hospedeiros – podem contribuir para a especiação

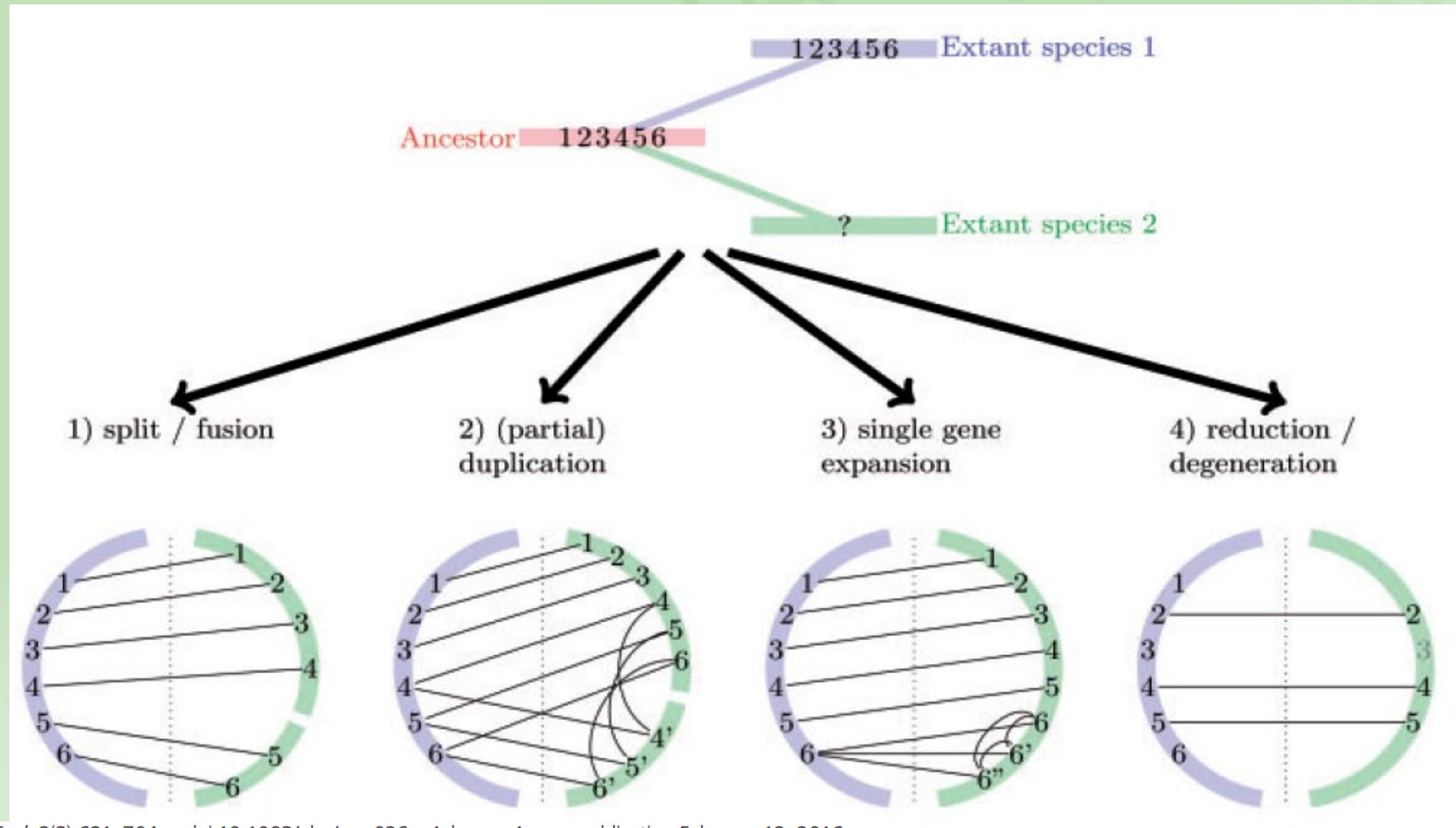
Efetores

- Alguns são espécie específicos, outros conservados (em espécies colonizando mesmos hospedeiros ou compartilhando lifestyle (modo de interação patógeno-hospedeiro))
- Em algumas espécies estão organizados em clusters no genoma
- Em outras espécies encontram-se dispersos no genoma – associação com elementos repetitivos
- Associação com elementos transponíveis

Evolução de efetores

- Surgimento de clusters:
 - Amplificação gênica (*in tandem*) seguida por rápida diversificação
- Associação de clusters com elementos transponíveis (ETs):
 - Efetores e ETs localizados em locais específicos do genoma
 - Compartimentalização de genomas
 - Rápida evolução
- Importância dos clusters para estudo da interação p-h
 - Estudo funcional de efetores: deleção de clusters:
 - linhagens menos virulentas
 - Pouco efeito em deleções individuais

Exemplo de evolução de cluster de efetores



Gene clusters associados ao metabolismo secundário

Biosynthetic Gene Clusters (BGCs)

Metabólitos secundários

- Pequenas moléculas bioativas
 - Toxinas (ex: aflatoxin em *Aspergillus* spp. trichothecene em *Fusarium* spp., estrobilurinas em *Strobilurus tenacellus*)
 - Antibióticos (ex: streptomicina – *Streptomyces*)
 - Outros:
 - imunossupressor (ciclosporina)
 - anticoletolêmico (pravastatina),
 - anticâncer (taxol)
 - corante (monascorubrina)

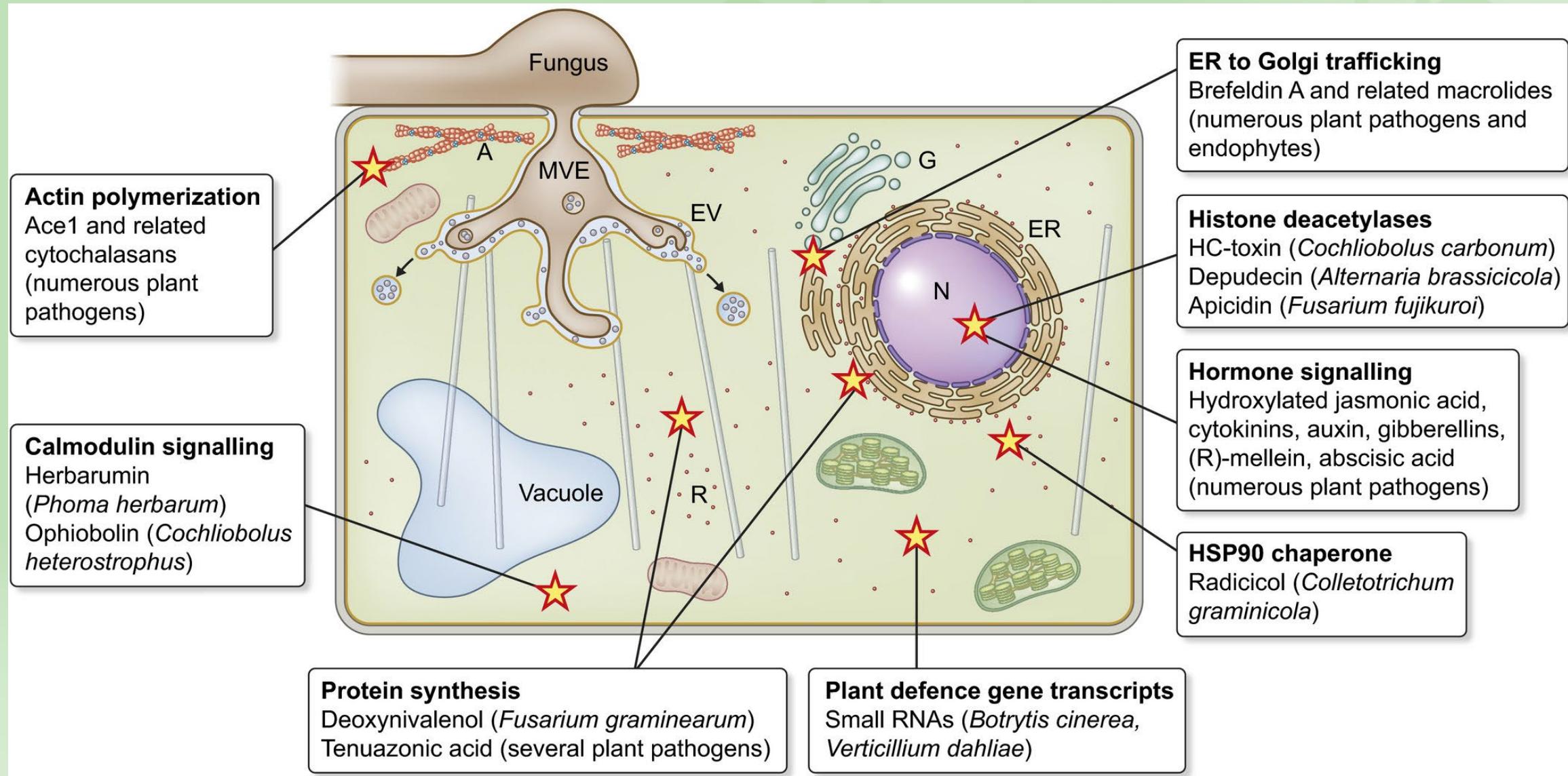
Metabólitos secundários

- Produzidos por fungos e bactérias
 - Gene clusters
 - grupos de genes co-regulados (mecanismos epigenéticos são importantes)

Metabólitos secundários

- Pequenas moléculas bioativas
 - toxinas
 - Antibióticos
- Desempenham outros papéis:
 - fatores de avirulência
 - supressores da defesa do hospedeiro
 - aumentam a rigidez das paredes celulares dos fungos
- Fungos patogênicos produzem uma grande variedade de SMs durante a infecção da planta
 - estágios iniciais biotróficos / assintomáticos (penetração e infecção primária)
 - improvável que esses SMs fúngicos sejam citotoxinas que matam as células hospedeiras

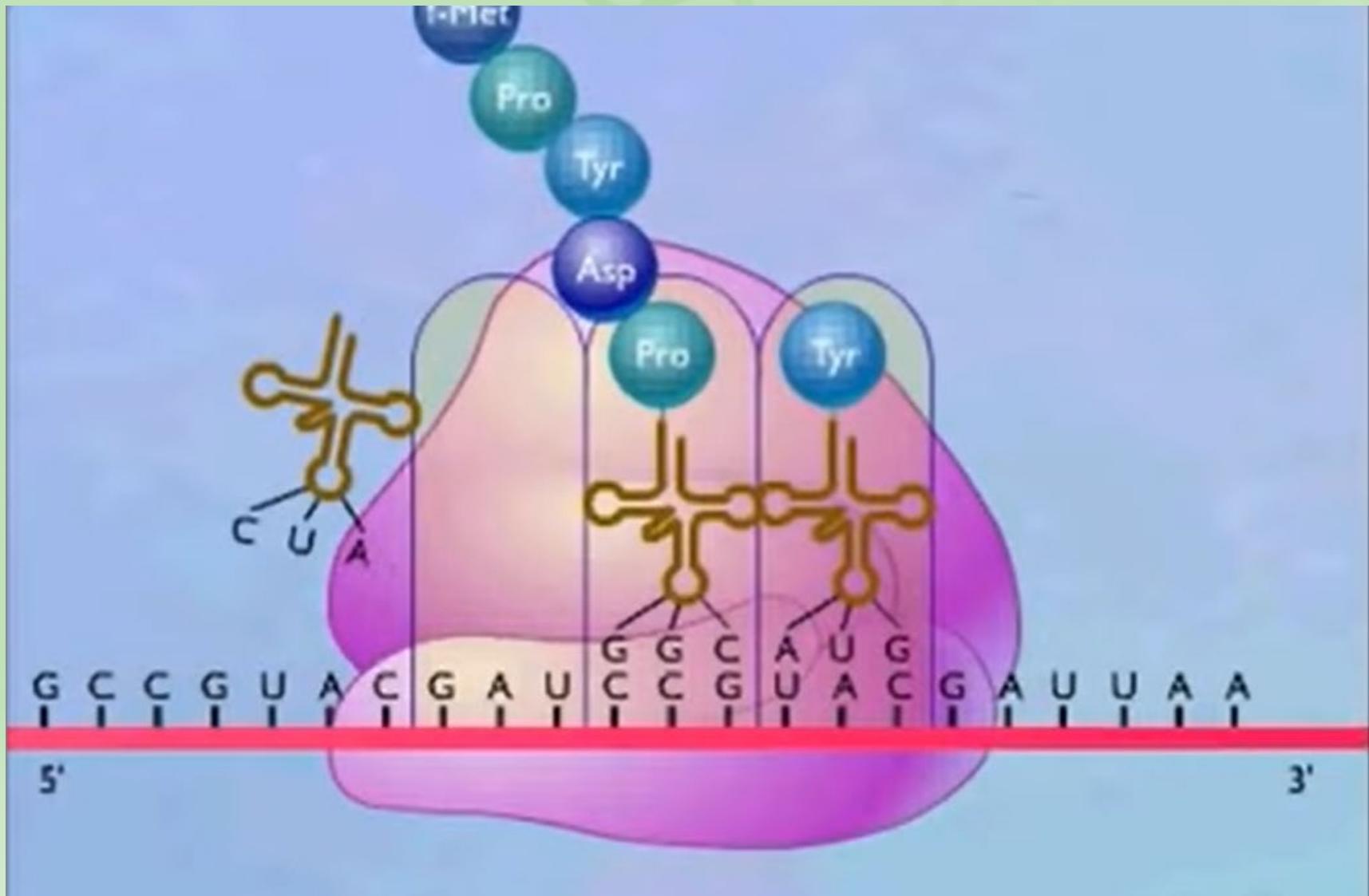
Nonproteinaceous effectors: the terra incognita of plant–fungal interactions

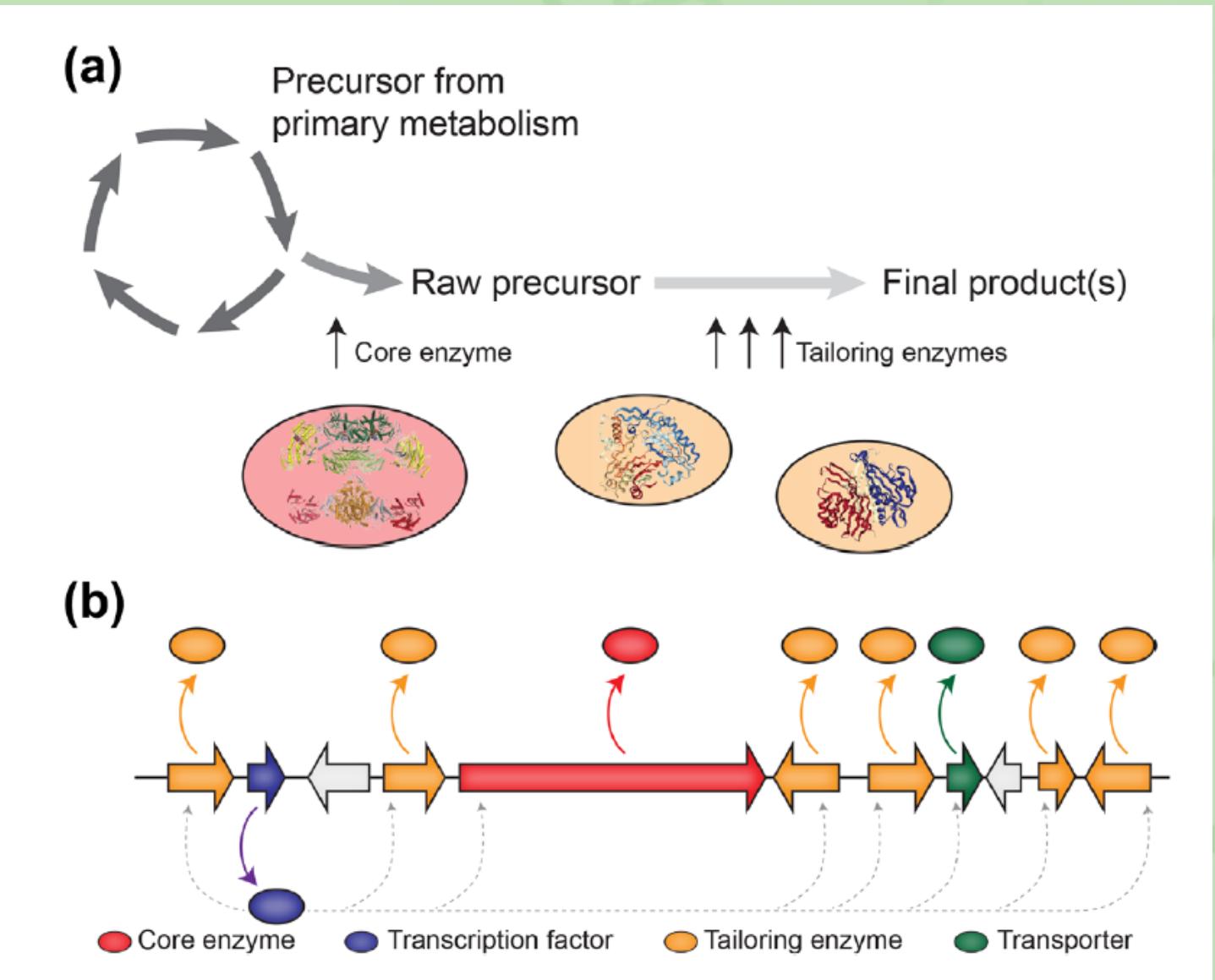


Metabólitos secundários

- geralmente sintetizados a partir de apenas alguns precursores originários do metabolismo primário por meio de vias bioquímicas
 - policetídeosintases (PKSs) - policetídeos
 - peptídeos sintetasas não ribossomais (NRPSs) - peptídeos não ribossomais
 - enzimas híbridas PKS-NRPS - híbridos PKS-NRPS
 - dimetilalil triptofano sintases – indol alcalóides
 - terpeno ciclases - terpenos

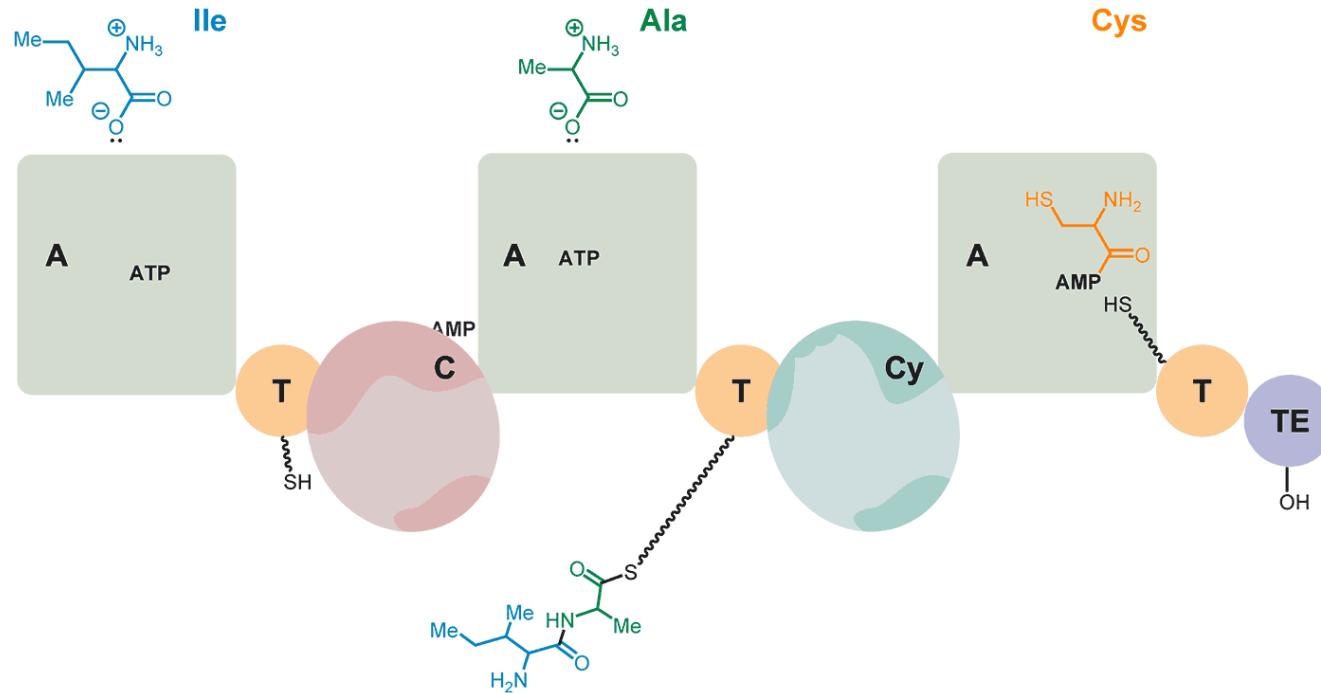
Síntese proteica ribosomal





Estrutura/organização das enzimas principais (“core enzymes”)

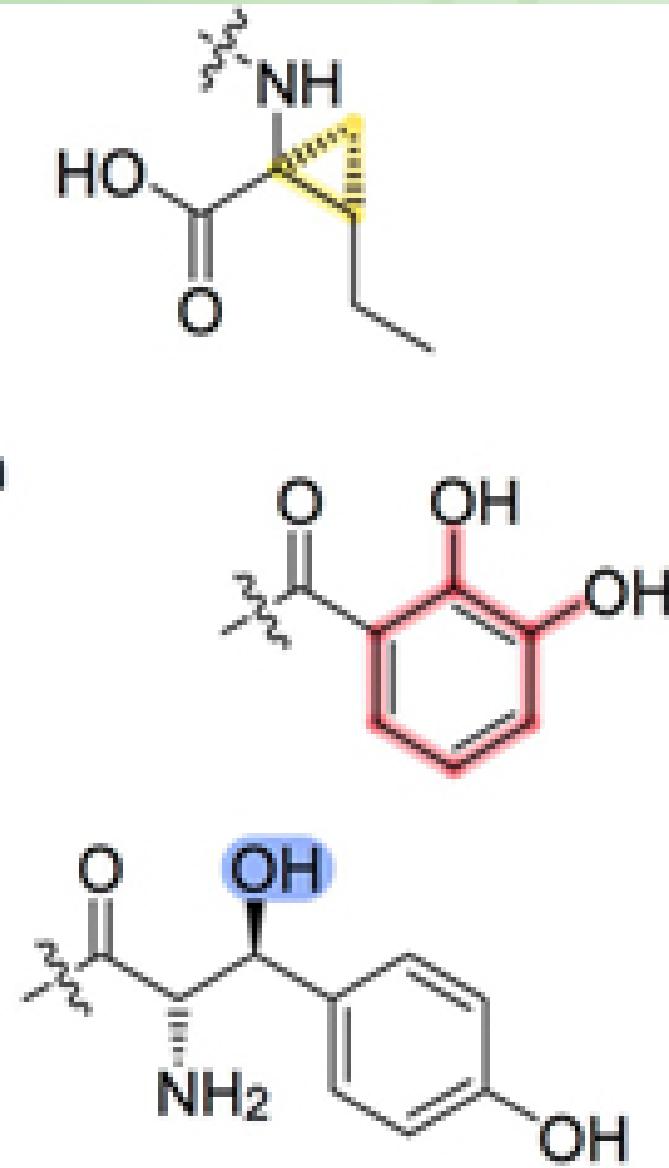
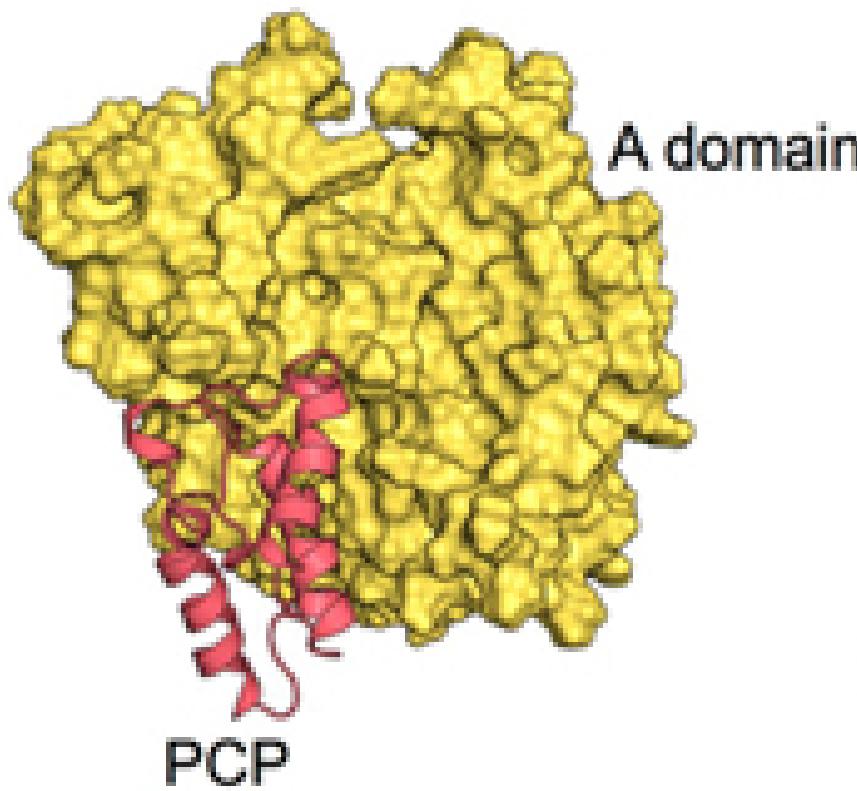
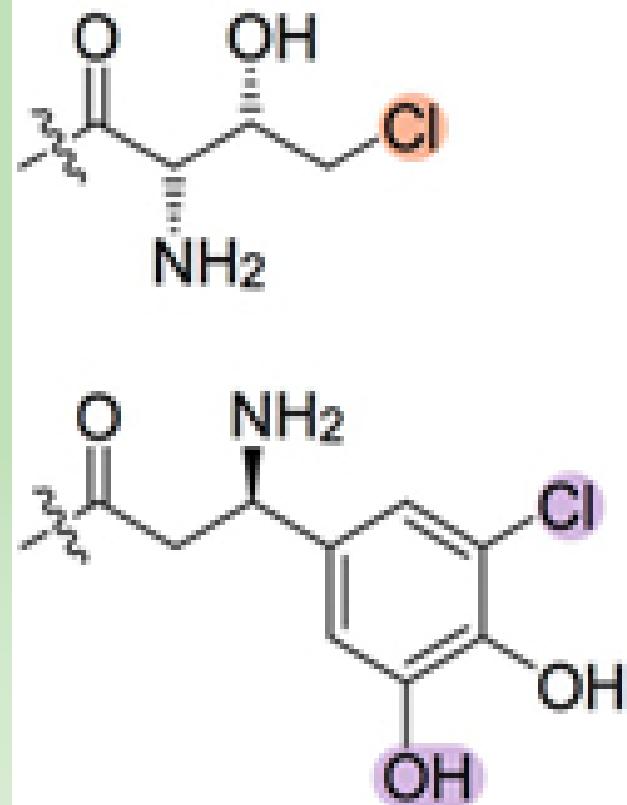
Nonribosomal peptide biosynthesis

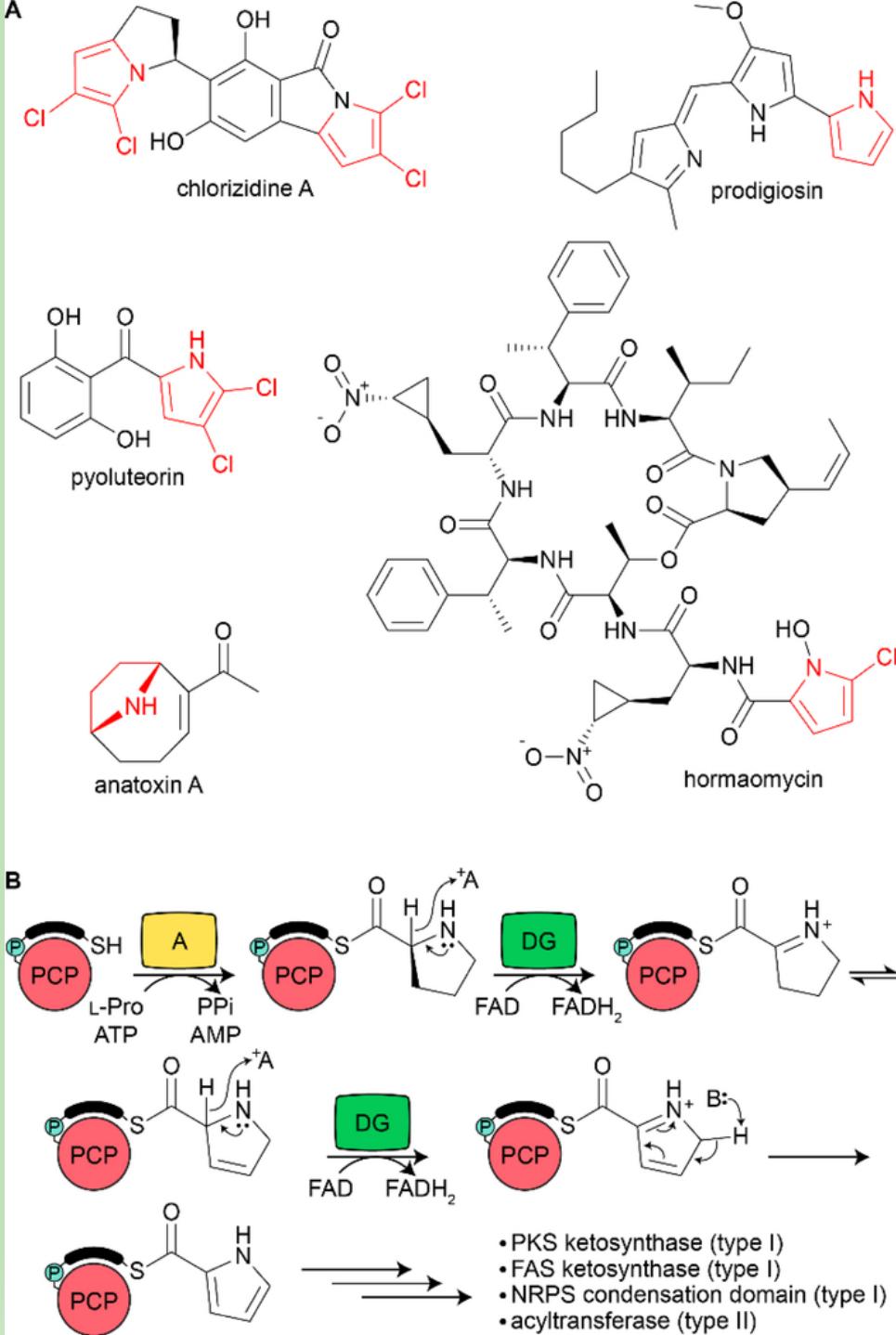


2020 Michael W. Mullowney | @MWMullowney | MichaelMullowney.com

http://www.michaelmullowney.com/images/NRPS-animation-Mullowney_16-9_0.08.gif

type II NRPS



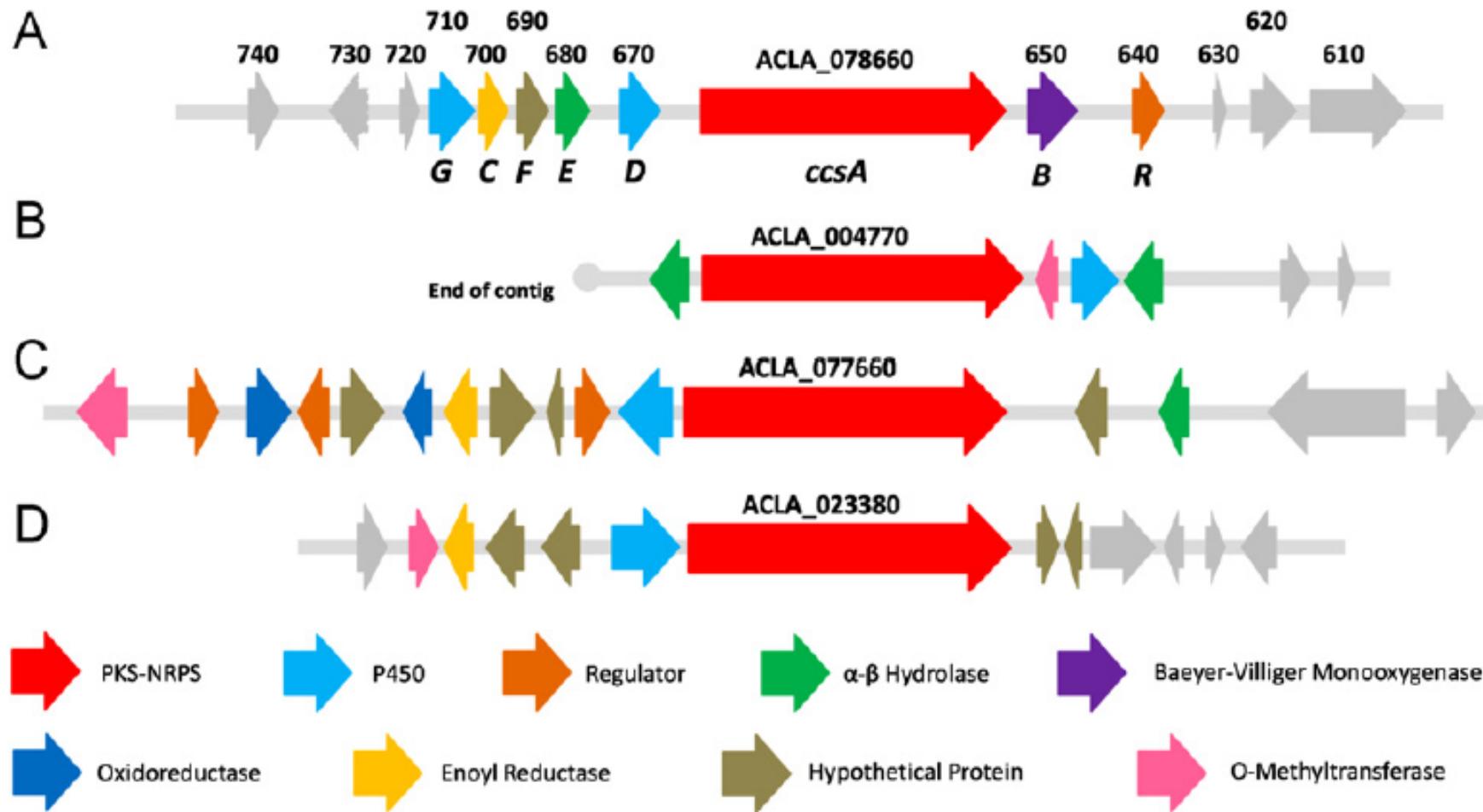


Metabólitos secundários fúngicos

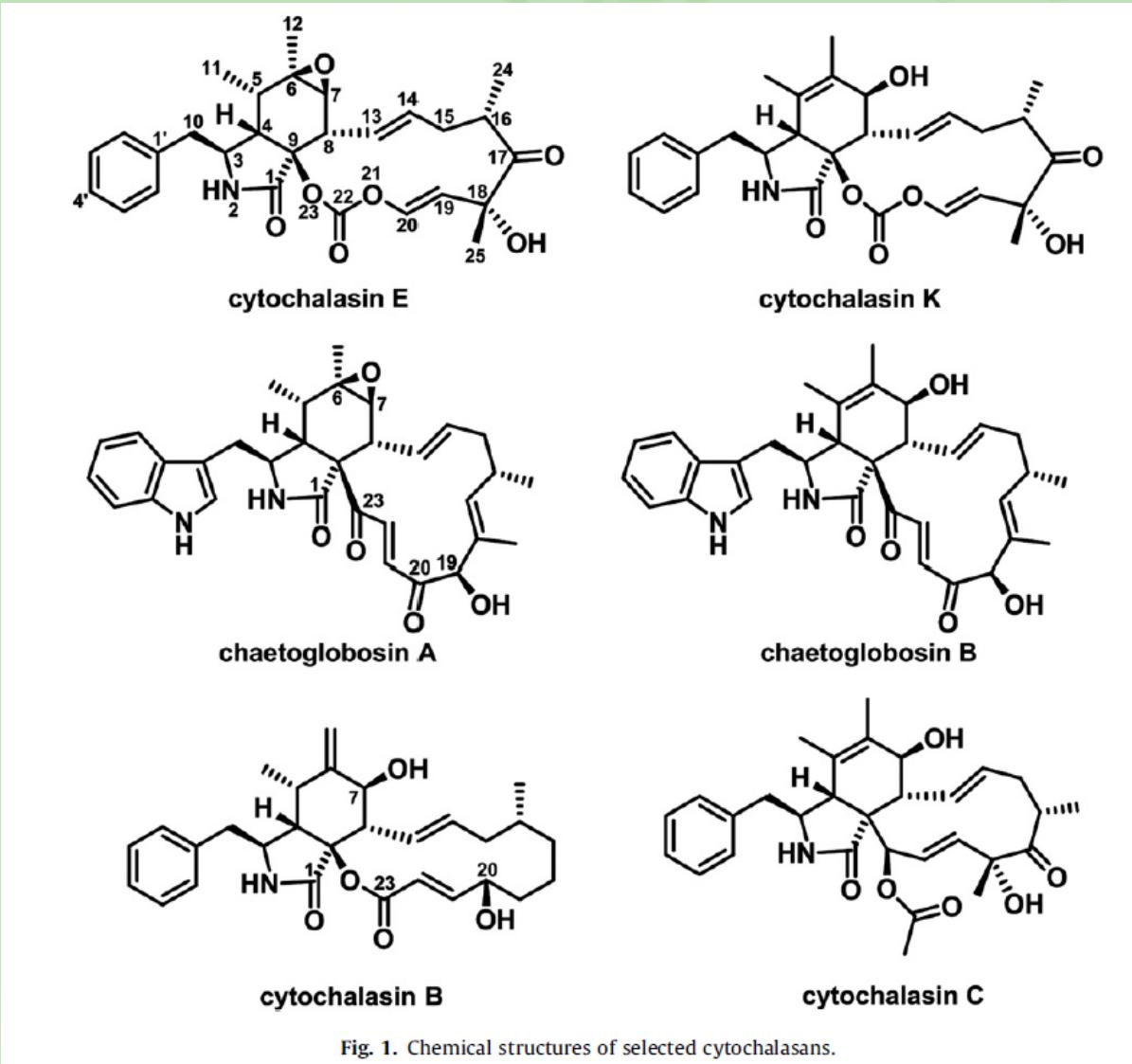
- Core enzymes PKSs e NRPSs:
 - são grandes proteínas de múltiplos domínios,
 - todos os domínios operam conjuntamente para apoiar a síntese de um intermediário crescente.
- produtos sintetizados por core enzymes são geralmente modificadas posteriormente por tailoring enzymes para produzir o (s) composto (s) ativo (s) final (is)

Organização do gene cluster ccs e outros PKS – NRPS gene loci no genoma de *Aspergillus clavatus*

K. Qiao et al. / Metabolic Engineering 13 (2011) 723–732



Cytochalasins



Via Biosintética proposta para cytochalasin E e K

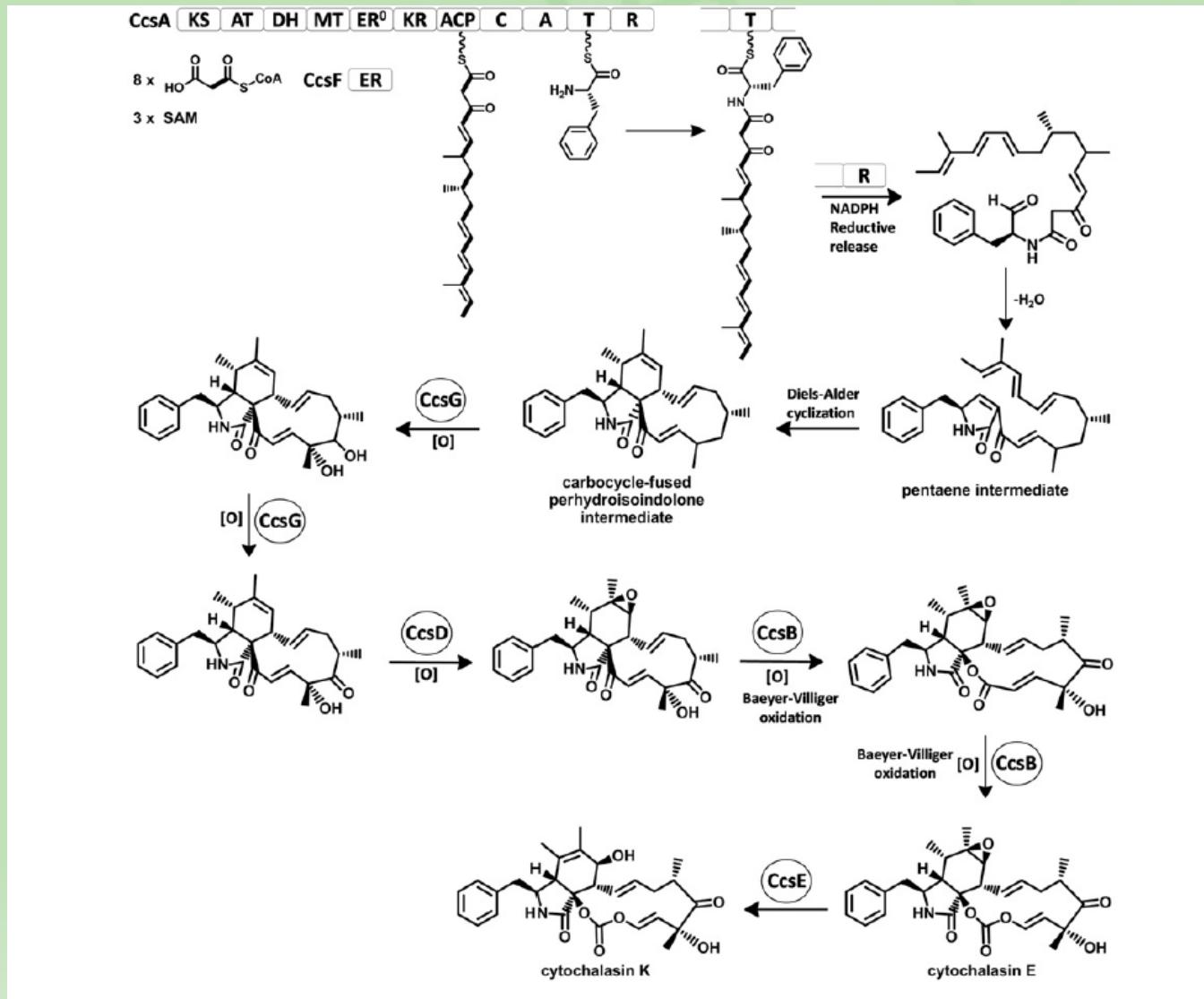
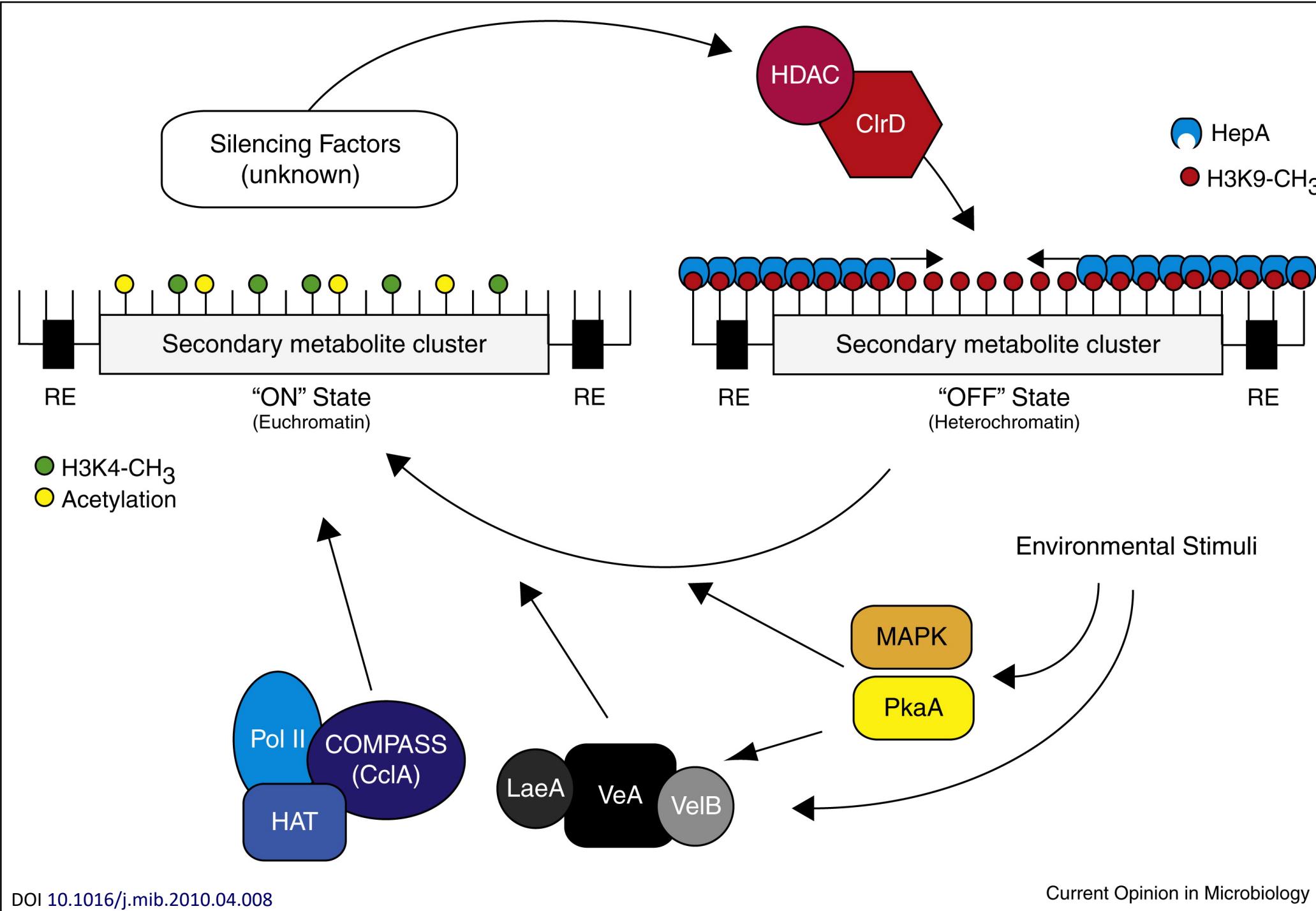


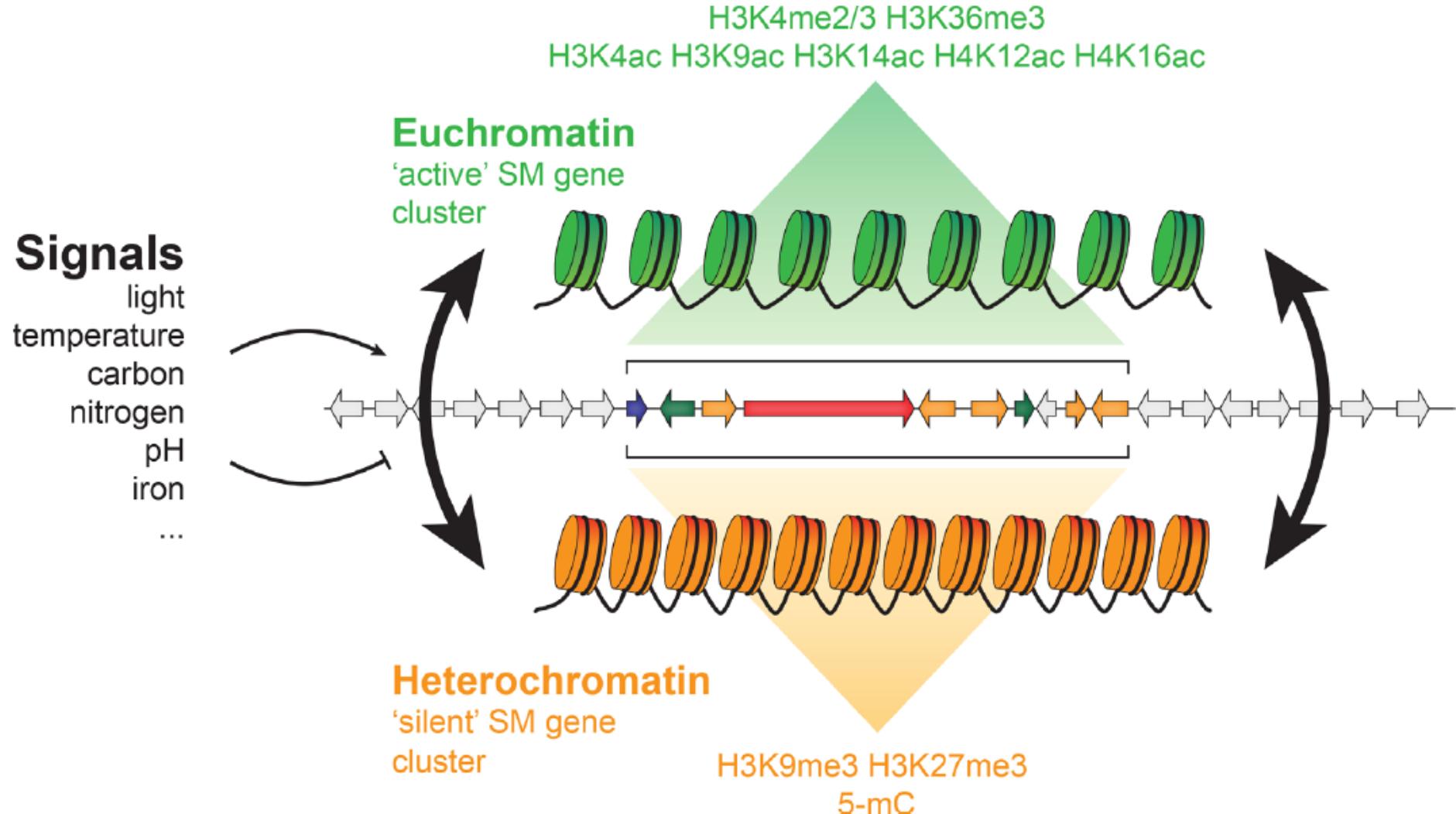
Fig. 5. Proposed biosynthetic pathway for cytochalasin E and K.

Metabólitos secundários

- Produzidos por fungos e bactérias
 - Gene clusters
 - grupos de genes co-regulados (mecanismos epigenéticos são importantes)
 - frequentemente localizados subtelomericamente ou em regiões de heterocromatina facultativa, que podem ser silenciadas e ativadas
 - proteínas envolvidas na remodelação da cromatina, como LaeA, CtrD, CclA e HepA atuam na sua regulação
 - frequentemente ladeado por elementos repetitivos (REs)
 - localizados a ordem e a localização dos genes dentro do cluster são importantes para sua regulação



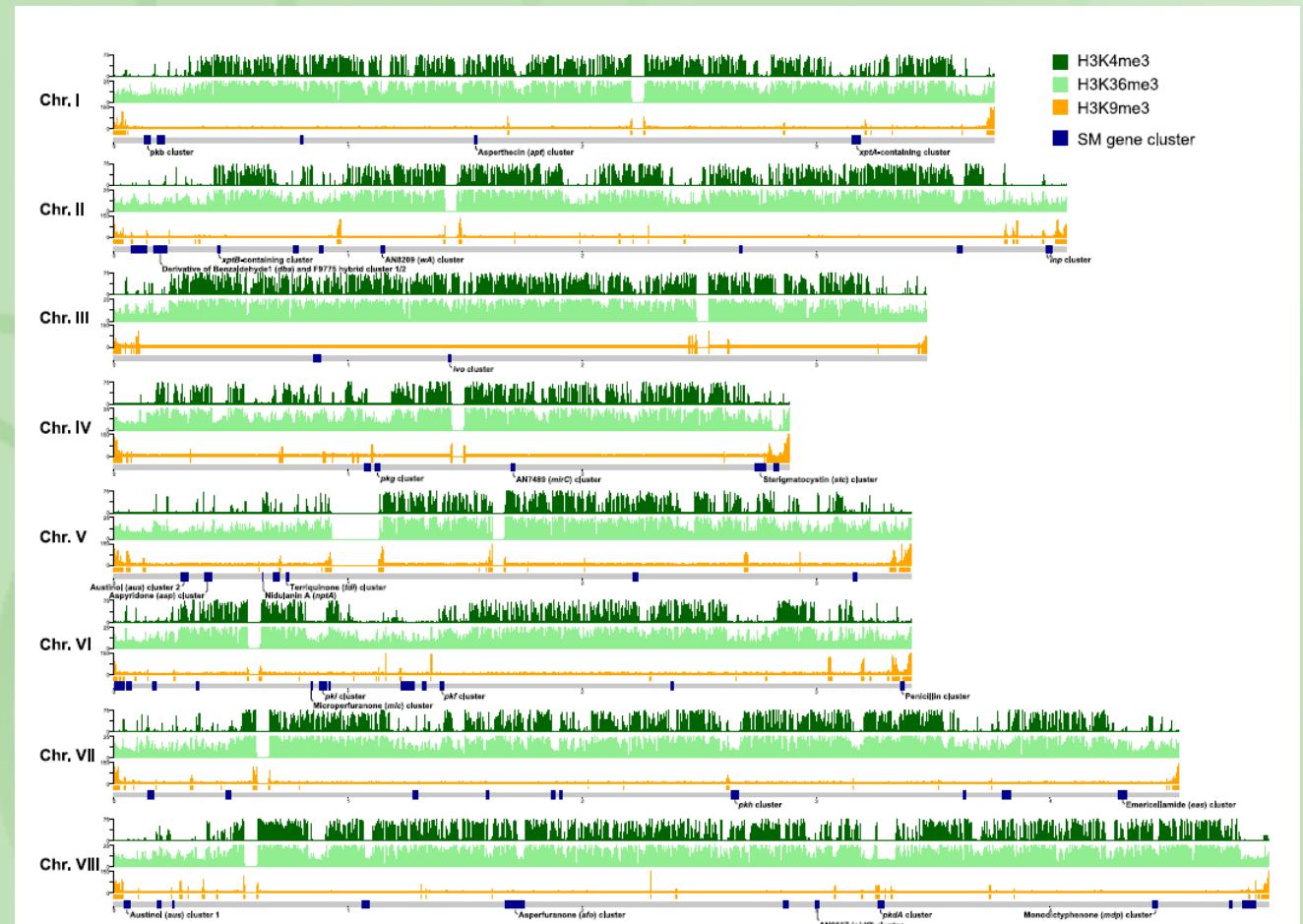
A cromatina impacta a regulação da transcrição de BGCs



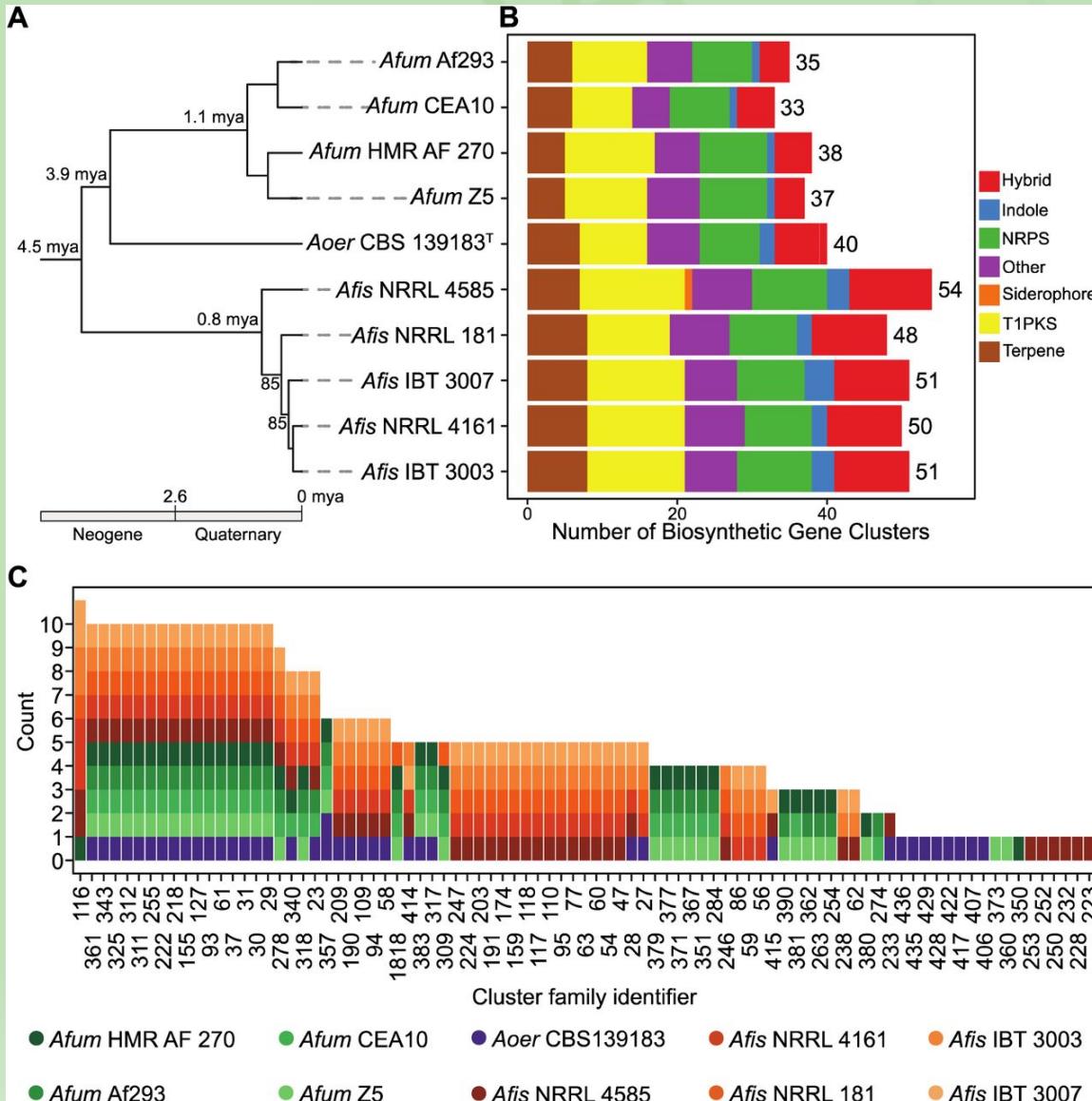
BGCs em *Aspergillus nidulans*

BGCs associados a diferentes tipos de cromatina:

- eucromáticas
(H3K4me3 verde-escuro e H3K36me3 verde-claro)
- heterocromáticas
(H3K9me3; laranja)



BCGs em 3 espécies de *Aspergillus*



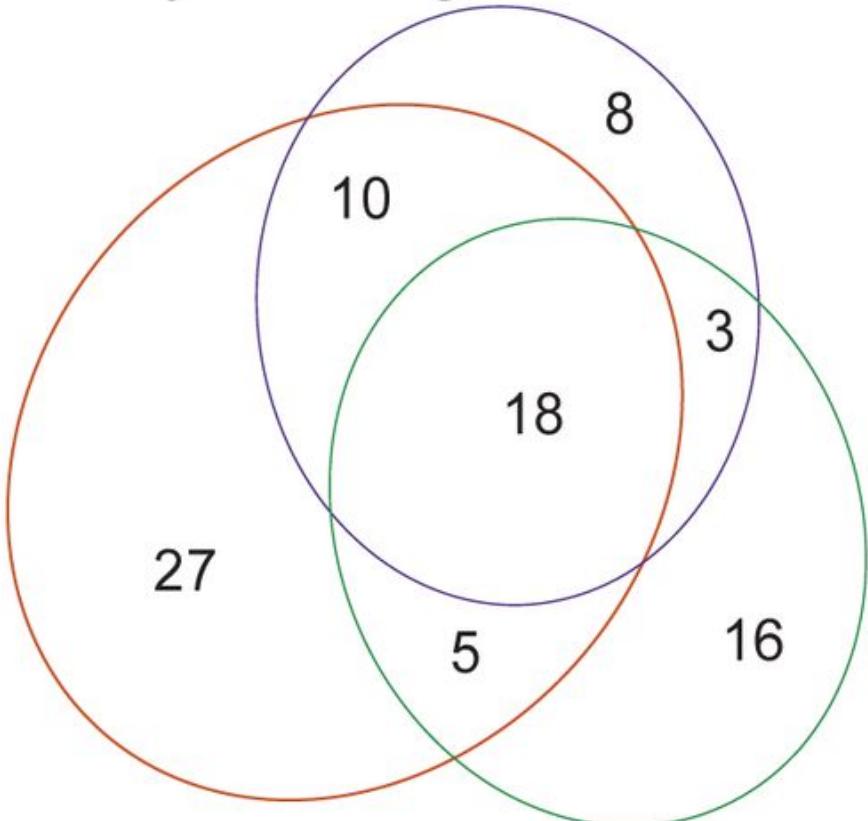
Afum: *A. fumigatus*;

Aoer: *A. oerlinghausenensis*;

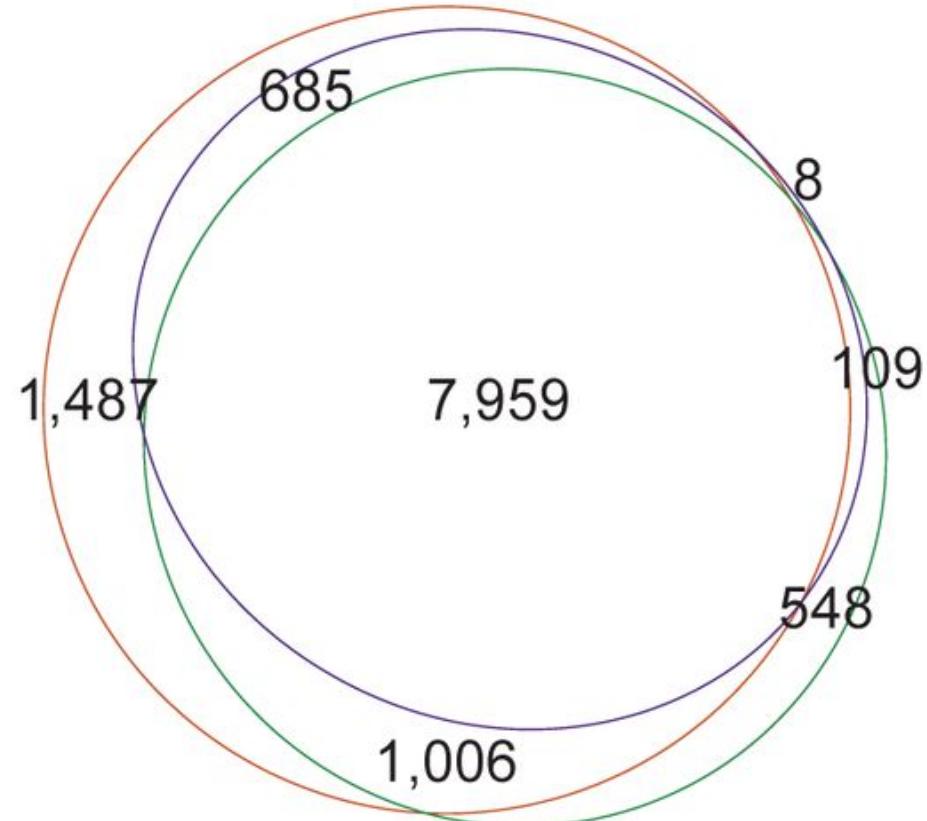
Afis: *A. fischeri*.

A

Biosynthetic gene clusters

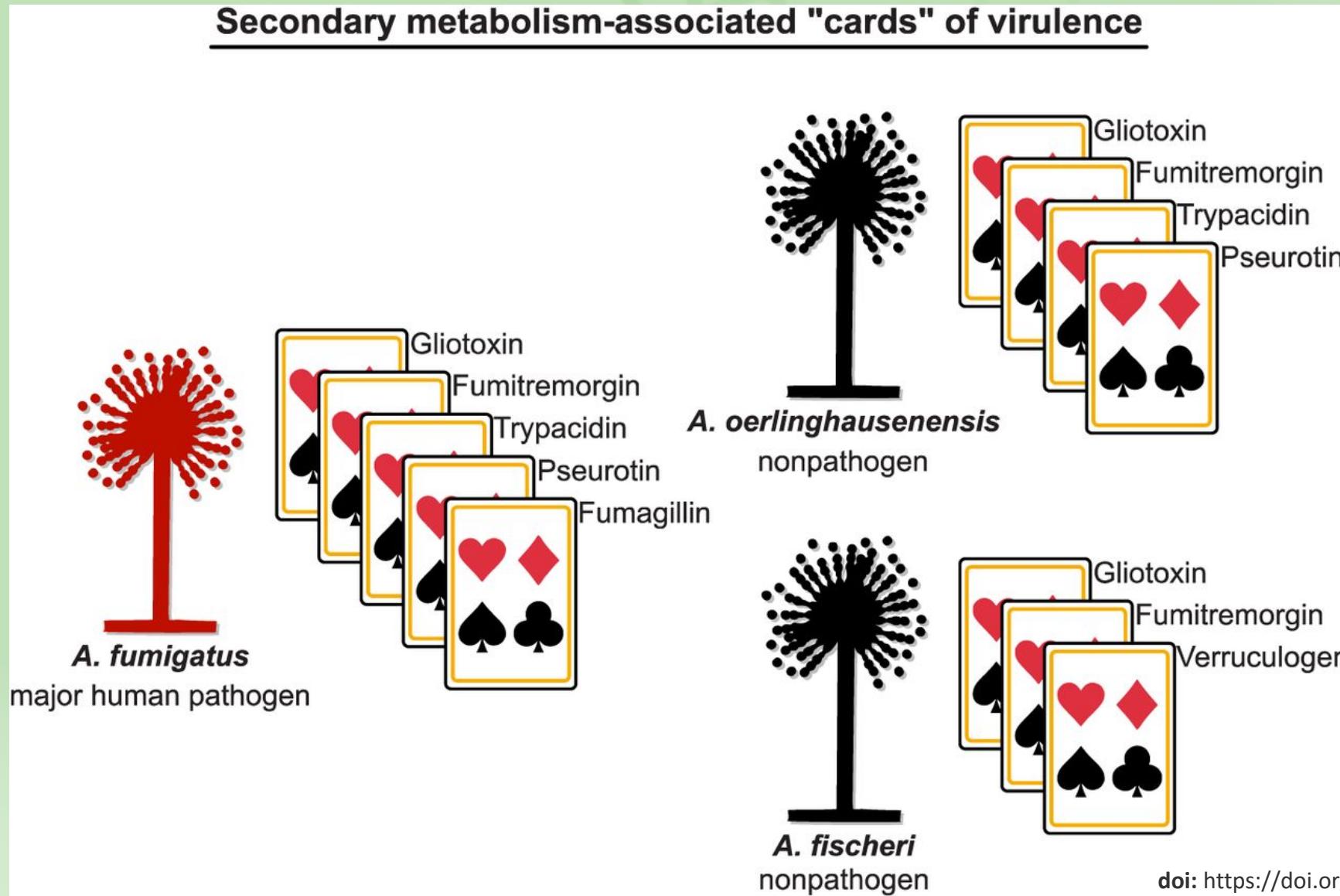
**B**

Gene families

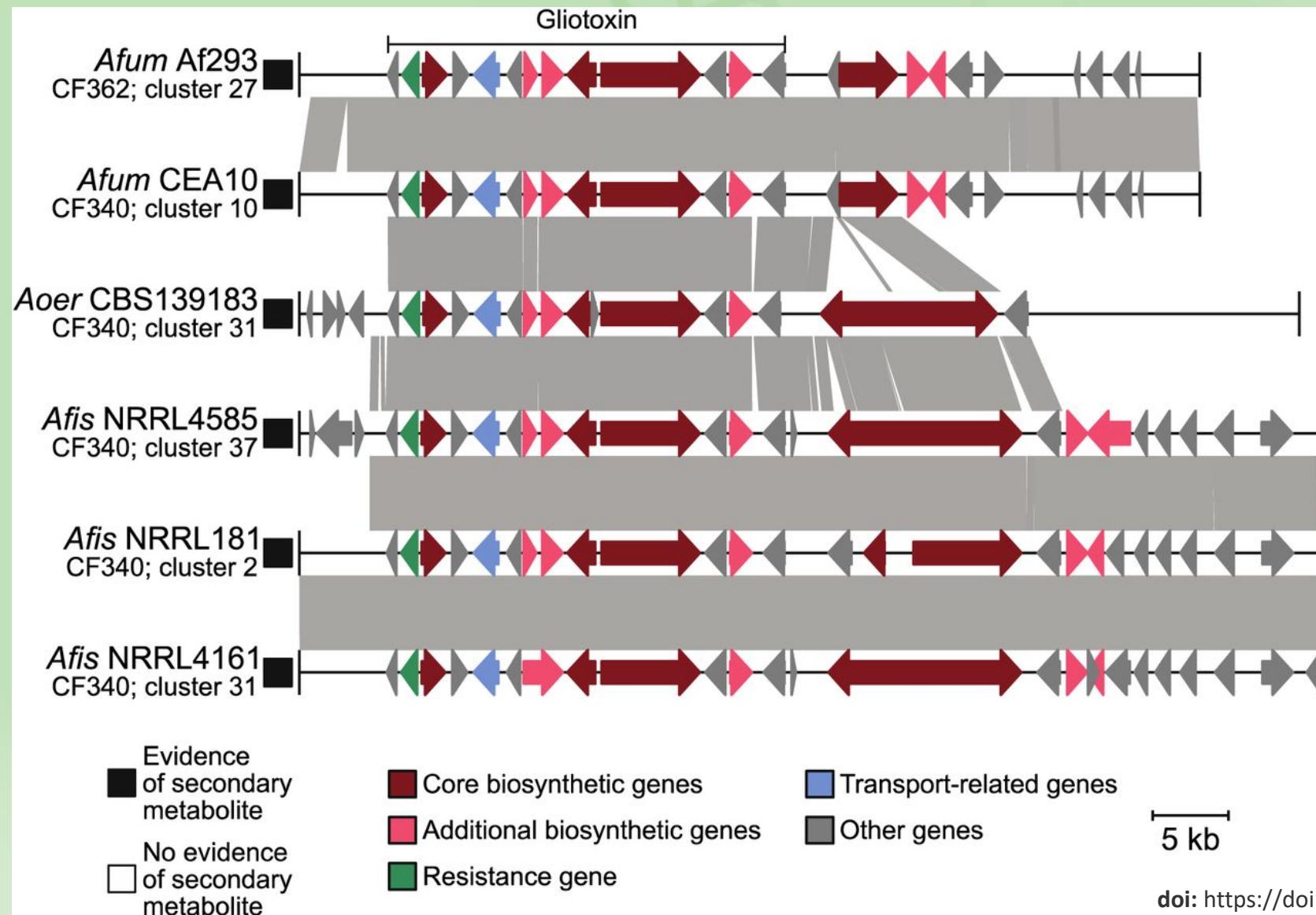
 *Aspergillus fischeri* *Aspergillus oerlinghausensis* *Aspergillus fumigatus*

BGCs em *Aspergillus* spp.

Secondary metabolism-associated "cards" of virulence



Gliotoxin BGC em *Aspergillus* spp.





OPEN

Phaeophleospora vochysiae Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites

Received: 14 June 2017

Accepted: 29 January 2018

Published online: 15 February 2018

Daiani C. Savi^{1,2}, Khaled A. Shaaban^{2,3}, Francielly Maria Wilke Ramos Gos¹, Larissa V. Ponomareva^{2,3}, Jon S. Thorson^{2,3}, Chirlei Glienke¹ & Jürgen Rohr²

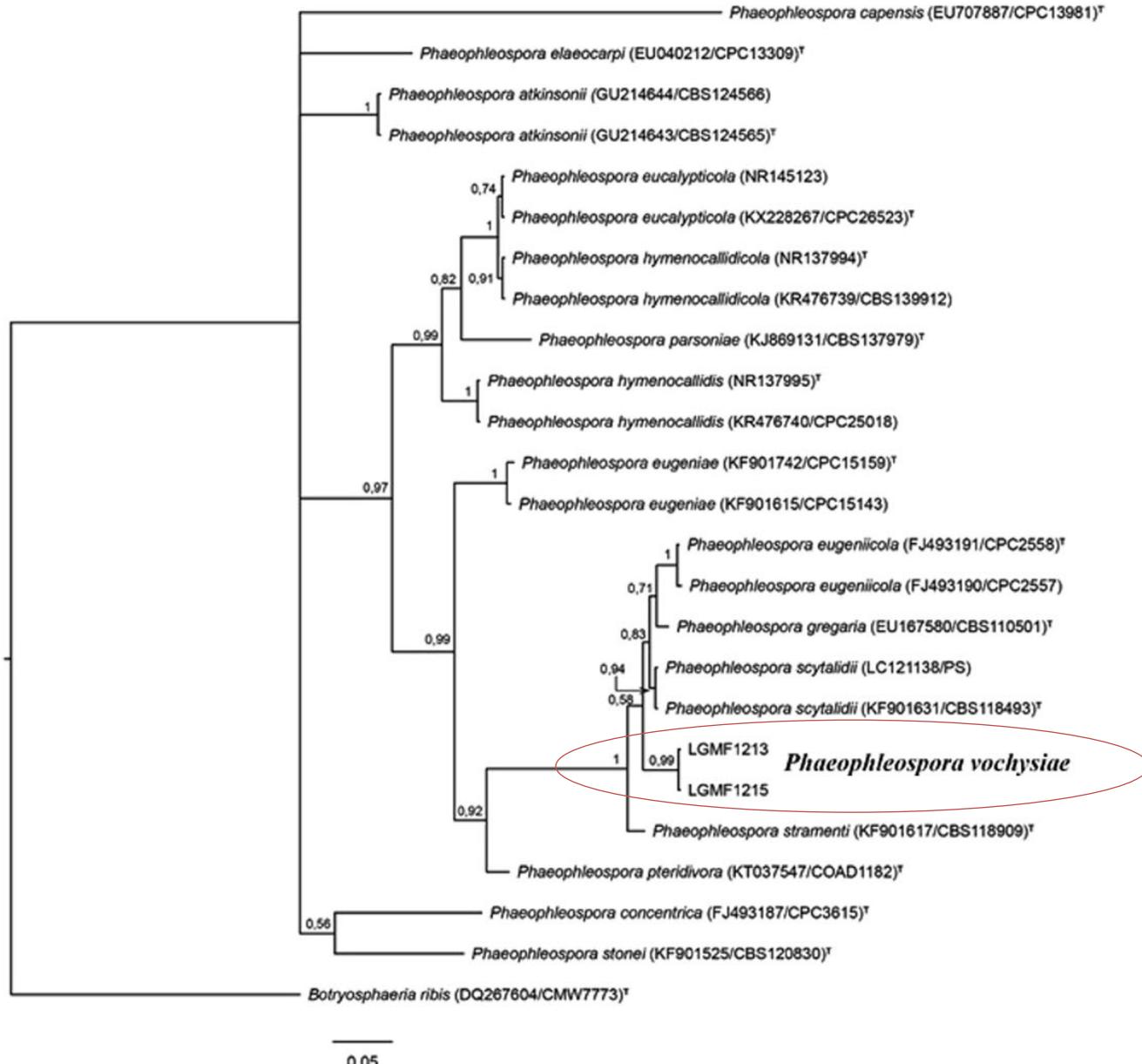


Figure 1. Bayesian phylogenetic tree based on ITS sequence of rRNA gene of LGMF1215 and LGMF1213 and 15 described species of *Phaeophleospora* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Botryosphaeria ribis* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site.

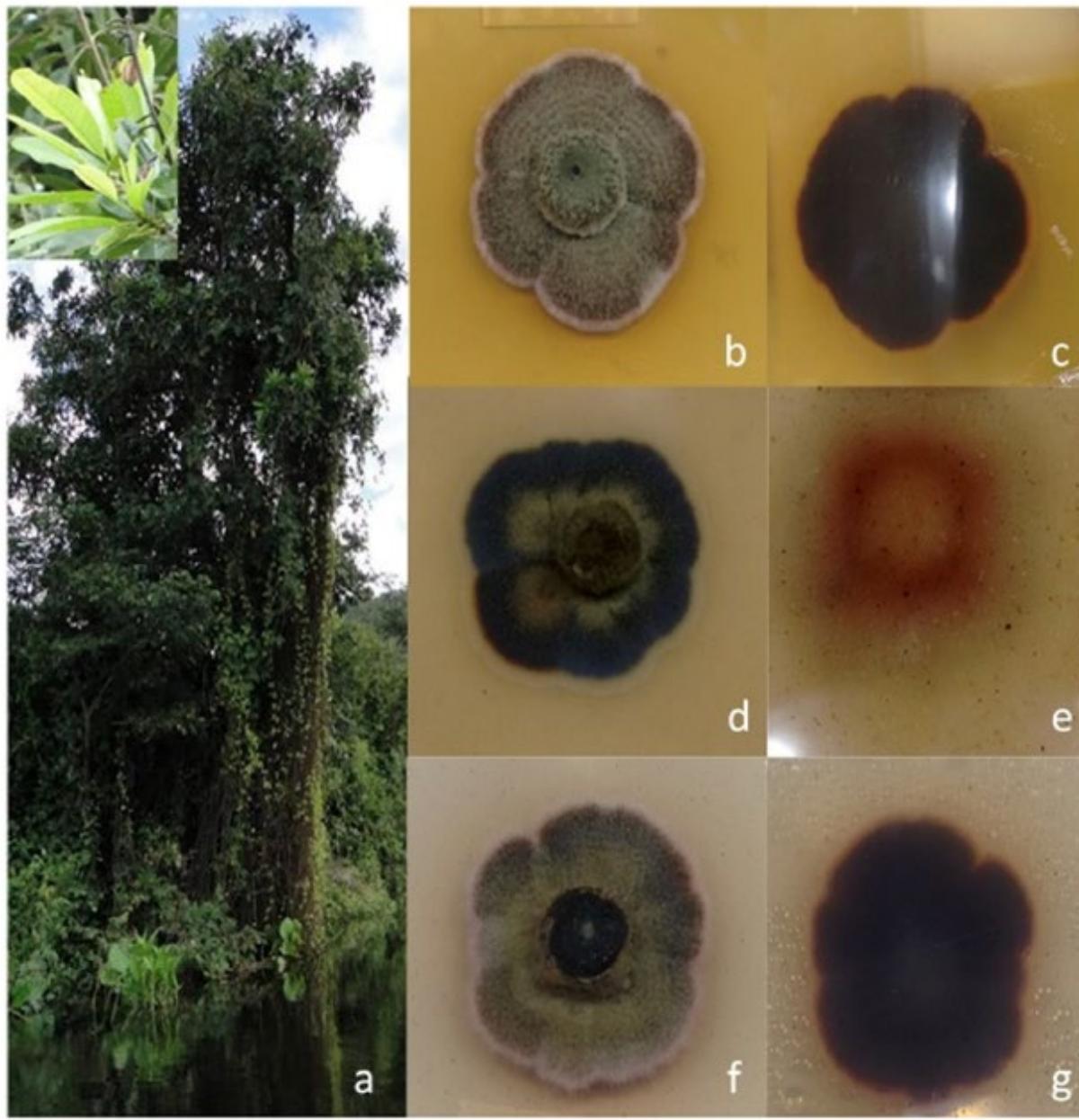


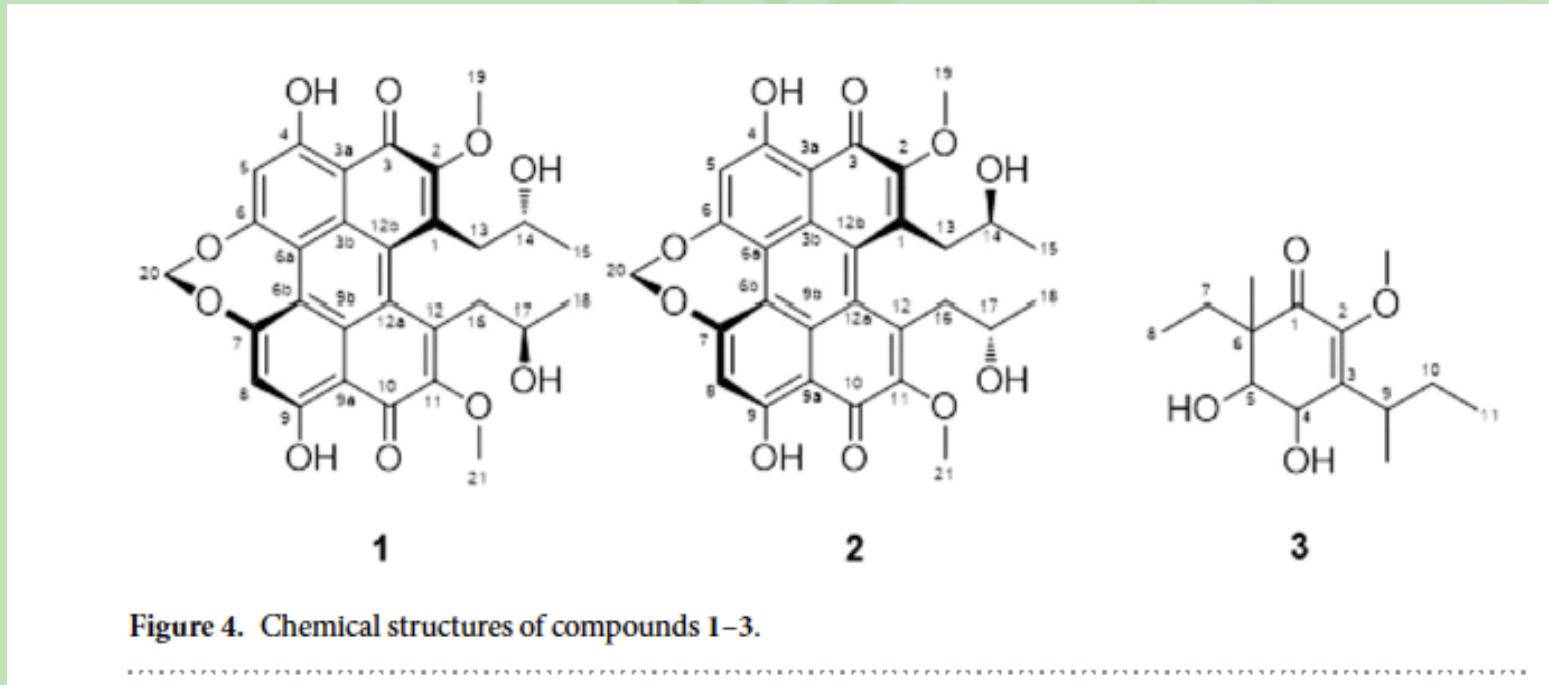
Figure 2. Host and morphology of *Phaeophleospora ochrysiae* LGMF1215 on Malt Extract Agar (MEA), Oatmeal Agar (OA) and Potato Dextrose Agar (PDA) at 28 °C after 14 days. (a) *Vochysia divergens* (b and c) Colony on MEA surface and reverse; (d and e) colony on OA surface and reverse; (f and g) colony on PDA surface and reverse.

Phaeophleospora ochysiae



Figure 3. Macro- and micro-morphology of *Phaeophleospora ochysiae* LGMF1215. (a) Colony with pycnidium (arrow). (b and c) Mycelium consisting of septate, branched, verruculose hyphae in some points with red pigment inside. (d) Conidiophore and conidium. (e-g) Conidia. (h) Conidiophore.

Three major compounds with high biological activity



Two known compounds:

cercosporin (1)

isocercosporin (2)

One new compound:

3-(sec-butyl)-6-ethyl-4,5-dihydroxy-2-methoxy-6-methylcyclohex-2-enone (3)

Extracts/compounds	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	<i>Colletotrichum abscissum</i>
Extract produced using PD	13	12	11	32	50
Extract produced using Czapeck	—	—	—	2	4
Extract produced using MEA	8	—	6	10	15
Cercosporin 1	46	45	28	30	Ne
Isocercosporin 2	35	27	20	28	Ne
3-(sec-butyl)-6-ethyl-4,5-dihydroxy-2-methoxy-6-methylcyclohex-2-enone 3	14	14	—	30	Ne
Control	30	0	35	37	82

Table 3. Inhibition zones (in millimeters) of LGMF1215 crude extracts of different culture media and compounds 1~3 tested antibacterial and antifungal assays at 100 µg/disc. —denotes no measurable halo, antibacterial control: Ampicillin (1 mg/disc), Antifungal control: Derosal (1 mg/disc), ne: not evaluated.

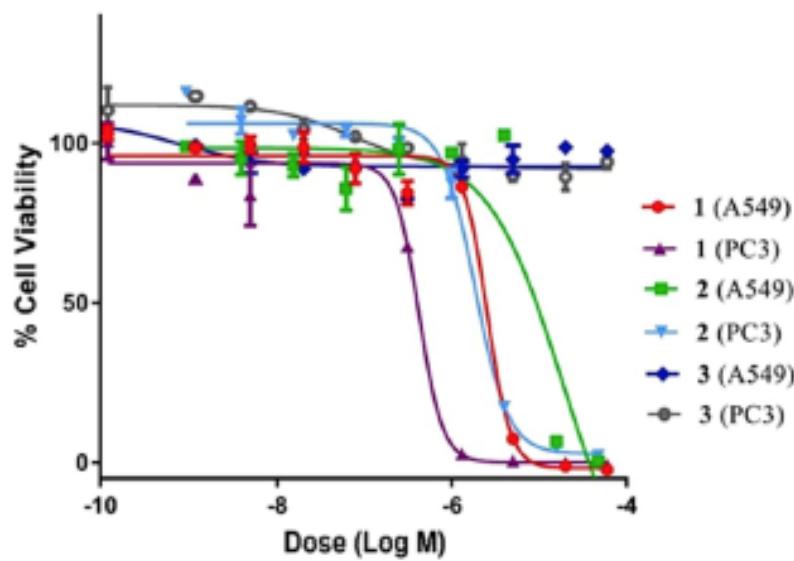


Figure 5. Dose-response viability assay of compounds 1–3 isolated from strain LGMF1215 against A549 (lung) and PC3 (prostate) human cancer cell lines for 72 hrs treatments. Note: each line represents a different treatment with a specific cell line and compound.

Abordagens integradas para elucidar as funções biológicas de efetores não proteicos fúngicos (NPEs) durante interações com plantas

