

Maria Lucila Hernández Macedo

**PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
REGULADAS POR FERRO EM FUNGOS QUE DEGRADAM MADEIRA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Maria Lucila Hernández Macedo</i>

_____ e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>16/01/01 Maricilda Palandi de Mello</i>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural na área de
Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

200114363

IDADE	30
CHAMADA	T7 UNICAMP
	M151p
Ex.	
IMBO BC/	44790
IOC.	16-392101
C	☐
D	☒
IEC	R\$ 11,00
ITA	21106101
CPD	

CM00158111-0

Macedo, Maria Lucila Hernández

M151p Produção de sideróforos e identificação de proteínas reguladas por ferro em fungos que degradam madeira/Maria Lucila Hernández Macedo. - - Campinas, SP.[s.n.], 2001.
93 f:ilus.

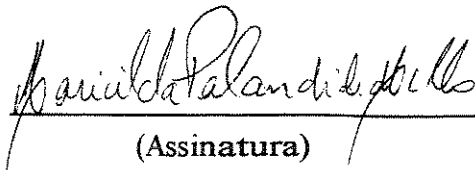
Orientadora: Maricilda Palandi de Mello
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

- 1. Sideróforos. 2. Fungos degradadores de madeira. 3. Proteínas reguladas por ferro. I. Mello, Maricilda Palandi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título
-

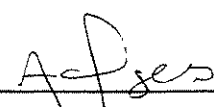
Data da defesa: 16/01/ 2001

Banca Examinadora:

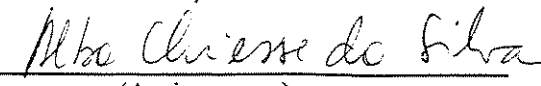
Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)


(Assinatura)

Profa. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres


(Assinatura)

Profa. Dra. Alba Chiesse da Silva


(Assinatura)

Prfa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

(Assinatura)

Dedico este trabalho aos meus pais Maria
e Tito, irmãos Sonia e Miguel pelo amor,
carinho e apoio.

Caminante son tus huellas el camino y
nada más, caminante no hay camino,
se hace camino al andar, al andar se
hace camino y al volver la vista atrás
se vé las sendas que nunca has de
volver a pisar. Caminante no hay
camino sino estelas en la mar.
Antonio Machado.

Meus agradecimentos

A Deus, que me deu Seu sopro e todas as ferramentas necessárias para ser feliz.

À Profa. Maricilda, pela orientação, compreensão e paciência durante estes anos.

À Profa. Laura Ottoboni pela co- orientação deste trabalho.

Aos componentes da banca: Profa. Dra. Adriane Milagres e Dra. Alba Chiesse da Silva.

Aos professores, Yoko Bomura Rosato, Edson Rosa Pimentel e Gonçalo Amarante Guimarães Pereira pelas sugestões e críticas na pré-banca deste trabalho.

Ao Prof. André Ferraz ajuda na aplicação de algumas técnicas deste trabalho.

Às amigas e “orientadoras”, Teresa e Claudete por terem me ensinado a dar os primeiros passos no laboratório e pela amizade brindada.

Aos amigos do Lab. Marcela, Eliana, Daniela, Fernanda, Junia, Madalena, Heloisa, Camila, Marcelo, Fabiana, Fernanda II, Osmar, André, Hamilton, Sandrinha, Ceni pela amizade, carinho, convivência e inúmeros bons momentos compartilhados.

Aos amigos CBMEGuianos, Renata, Rogério, Edna, Jorge, Sílvia, Márcio, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos- irmãos- família, Edinho, Juliana, Alberto, Lúcio, Stela, Juliano e Maria Isabel por sempre haver podido contar com a ajuda, compreensão, carinho e alegria de uma família.

Aos amigos- irmãos, do grupo Charolais e pré-CVX, Flavinha, Andrés, Serginho, Silvinha, Chris, Gustavo, Cléo, Cintia, Analí, Mariana, Alysson, Sakai, Hugo, Elcio, Rafael e Angelita, por serem manifestação viva e concreta de Deus na minha vida e pelo amor que sempre recebo deles.

Aos sempre queridos, Maria Elena, Toninho e Walter por ser intercessores e guias na minha busca de Deus e por terem me mostrado que a vida é bem mais do que o mundo ensina.

Aos amigos de Lorena, Angela, Mauro, Ana Maria, Zé Moreira, Zé Carlos e Jussara por ter me acolhido e ajudado a desenvolver parte dos experimentos desta tese na FAENQUIL.

E a todos aqueles que sempre me incentivaram a ir em frente mesmo estando longe.
À Fapesp e meus pais pelo apoio financeiro.

Agradecimentos especiais

A meus pais, irmãos, tios Chalo e Eliza, Lucho e Mayra, todo meu carinho e amor.

SUMÁRIO

Abreviaturas	9
Summary	11
Resumo	13
Introdução	16
Revisão Bibliográfica	20
Sideróforos.....	21
As espécies <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Lentinula edodes</i>	24
Sideróforos e a degradação da madeira.....	24
Biossíntese e regulação de sideróforos.....	26
Transporte de ferro através da membrana citoplasmática.....	28
Objetivos	31
Artigo 1 – “IRON-REGULATED PROTEINS IN <i>Phanerochaete chrysosporium</i> AND <i>Lentinula edodes</i>: DIFFERENTIAL ANALYSIS BY SDS-PAGE AND TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROFILES”	33
Artigo 2 – “PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> E <i>Lentinula edodes</i> E PROTEÍNAS INDUZIDAS POR RESTRIÇÃO DE FERRO”	59
Referências Bibliográficas	82
Conclusões	92

ABREVIATURAS

mM – Milimolar

mL – Mililitro

kDa – Kilodalton

rpm – Rotações por minutos

SDS-PAGE – do inglês Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

MEA – do inglês Malt-Extract-Agar

ME – do inglês Malt-Extract

μ M- Micromolar

mg – Miligramas

CAS – Cromo azurol- S

Tris- Tris (hidroximetil) - Aminometano

PBS – do inglês Phosphate- Buffered Saline

PMSF – do inglês Phenylmethylsulfonyl Fluoride

2-DE – 2- Dimension Electrophoresis

1-D – Primeira dimensão

EDTA – do inglês Ethylenediaminetetracetic Acid

M - Molar

MW – do inglês Molecular Weigh

LiPs – Lignina peroxidase.

OMP- do inglês Outer Membrane Protein

PI- Ponto isoeletrico

HDTMA – Hexadeciltrimetil- amônio

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

μ g – Micrograma

SUMMARY

Low molecular mass compounds (LMMC) with high affinity constant for iron III (siderophore), are synthesized and secreted by bacteria and fungi under iron restriction conditions to scavenge the ion from the environment. Their biosynthesis is iron-regulated and they form stable iron-siderophore complexes which are transported back into the cell via specific membrane receptor proteins located on the cell envelope. Although there are several studies on siderophore biochemistry, biosynthesis and capture by fungi, the progress toward the molecular biology of these processes is very recent and limited when compared to bacterial siderophore systems. In contrast to bacteria, the study with filamentous fungi is more difficult because fungal cytoplasmic membranes and bacterial cytoplasmic membranes are not alike. There are evidences that LMMC, like siderophores, synthesized by fungi are involved as mediators in the ligninolytic processes. They have been postulated as responsible for the increase in the pore size of wood cell walls, which would permit the penetration of oxydative enzymes in the wood matrix. Therefore, the objective of this study was to identify iron-responsive proteins probably involved either in the biosynthesis of iron chelants responsible for the iron uptake or in the iron-complex transport in the ligninolytic fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Through the analysis of SDS-PAGE and 2-DE of total protein, of plasma membrane and of outer membrane protein silver-stained profiles obtained from the mycelia grown for 11 days in each following of the differential conditions: iron-sufficient (90 μ M FeCl₃) and iron-deficient cultivated in liquid (ME) and in solid (MEA) media. The universal chrome azurol S (CAS) assay was used for siderophore detection. A positive reaction was observed in each fungal species only in the iron-deficient agar plate cultures. Protein analysis in silver-stained SDS-PAGE showed differential expression of proteins in the total and in the outer membrane protein profiles. Six and thirteen cellular proteins induced by iron restriction have been observed in SDS-PAGE for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. In 2-DE, the numbers of induced proteins were 12 and 8, respectively, in ranges of 15-60 kDa and pI 4.5-8.1. SDS-PAGE for the plasma membrane proteins did not show differences, whereas the outer-membrane protein profiles showed 6 and 4 proteins induced by iron depletion in *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. The results presented here are important data to unravel mechanisms of biosynthesis and/or transport of the iron-complexing agents in ligninolytic fungi and to further correlate them to the ligninolytic processes.

RESUMO

Compostos de baixa massa molecular com alta afinidade para ferro (sideróforos) são sintetizados por bactérias e fungos em situação de carência deste metal. No meio extracelular, acoplam-se ao ferro formando complexos ferro-sideróforo. A captação e o transporte destes compostos são realizados por receptores específicos localizados na membrana celular. Apesar de se ter registro de estudos já há várias décadas sobre a bioquímica, biossíntese e captação de sideróforos em fungos, os progressos no campo da biologia molecular desses processos são muito recentes e limitados em relação aos inúmeros trabalhos que têm sido publicados sobre os mecanismos moleculares da produção de sideróforos em bactérias. Além disso, a caracterização de proteínas de membrana cuja expressão seja regulada por ferro em fungos filamentosos tem sido mais difícil, ao contrário do que acontece em bactérias. Uma das principais razões é que as membranas citoplasmáticas de fungos não são equivalentes às de bactérias.

Atualmente, as evidências de que compostos de baixa massa molecular produzidos por fungos lignino-celulolíticos estejam envolvidos no processo de biodegradação da madeira vêm sendo mais contundentes, principalmente daqueles com características quelantes de metais. Estes compostos de baixa massa molecular, por exemplo, sideróforos, participariam no processo inicial da degradação de lignina, já que o pequeno tamanho dos poros da madeira limitariam a ação das enzimas ligninolíticas e celulolíticas, portanto acredita-se que estas não seriam capazes de iniciar a decomposição da madeira, e haveria a necessidade de moléculas menores para desencadear o processo.

Dada a crescente atenção que os quelantes de ferro produzidos por fungos lignino-celulolíticos vêm recebendo, este trabalho busca dar sua contribuição na caracterização genética de duas espécies de fungos degradadores de madeira, *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*, quanto à produção de proteínas induzidas em resposta à concentração de ferro no meio. Estas espécies foram crescidas em ausência e em presença de ferro (90 μM FeCl_3) por 11 dias, tanto em meio extrato de malte líquido como em meio sólido extrato de malte – agar. Para se verificar a produção de sideróforos durante o cultivo, foram realizados testes utilizando o reagente Cromo Azurol S (CAS). Reações positivas para CAS foram observadas em ambas espécies de fungos crescidos em meio sólido em ausência de ferro, porém o método não se mostrou adequado para o meio líquido. A partir dos micélios coletados após 11 dias de cultivo, foram obtidos os extratos protéicos total, de membrana plasmática e de

membrana externa para serem analisados em géis SDS-PAGE e 2-DE. Os resultados em géis SDS-PAGE de proteínas totais, mostraram 6 e 13 proteínas induzidas ou com a expressão aumentada na ausência de ferro em *Phanerochaete chrysosporium* e em *Lentinula edodes*, respectivamente. Além disso, foram observadas 3 proteínas induzidas ou com a expressão aumentada em condições de presença de íons férricos para as duas espécies. Já os resultados obtidos a partir de géis SDS-PAGE de proteínas membrana plasmática extraídas de micélios crescidos em ausência e presença de ferro, não mostraram nenhum polipeptídeo com expressão diferencial. Por outro lado, a análise dos extratos de proteínas de membrana externa mostraram a indução de bandas protéicas em ambas condições de cultivo para as duas espécies. Seis proteínas ($M_r = 20, 30, 38, 55, 58, 65$) mostram intensidade aumentada em ausência de ferro no gel SDS-PAGE, enquanto que somente uma proteína com intensidade aumentada foi observada em presença de ferro ($M_r 50$), para *P. chrysosporium*. Para o fungo *L. edodes*, os números de proteínas diferenciais em ausência e em presença de ferro foram 4 ($M_r = 38, 42, 48, 55$) e 2 ($M_r = 34, 39$), respectivamente.

Os padrões de proteínas totais de micélios crescidos na ausência de ferro, obtidos em géis 2-DE, mostraram 17 e 10 proteínas induzidas ou com intensidades aumentadas para *P. chrysosporium* e *L. edodes*, respectivamente, numa faixa de resolução de 15-60 kDa e pI 4,5-8,1. Os géis com micélios crescidos na presença de ferro também apresentaram proteínas induzidas ou com intensidades aumentadas nas duas espécies.

Os resultados aqui apresentados contribuem para a identificação de proteínas que são ferro-sensíveis em fungos ligninolíticos, as quais indicam que vários mecanismos celulares estão envolvidos na resposta ao metal.

INTRODUÇÃO

O ferro, é um dos micronutrientes inorgânicos mais importantes e necessários para a vida pois participa nas mais diversas funções biológicas, como por exemplo no transporte de oxigênio, fixação de nitrogênio e nas reações de fotossíntese (Crichton & Ward, 1992). Apesar de ser abundante na natureza na forma Fe^{+3} , esta é altamente insolúvel em pHs fisiológicos, resultando em uma concentração de íons férricos dissolvidos relativamente baixa, insuficiente para manter o metabolismo celular de muitos microrganismos (Hartwig & Loepper, 1993). Consequentemente, estes desenvolveram mecanismos eficientes de captação de ferro do meio, sintetizando compostos de baixa massa molecular específicos para quelar o íon Fe^{+3} , denominados sideróforos (Weinberg, 1978; Messenger & Barclay, 1983; Bullen, 1981; Winkelmann, 1992).

A biossíntese de sideróforos e sua regulação têm sido estudadas em várias espécies de bactérias e fungos, porém é na bactéria entérica *Escherichia coli* que se tem uma quantidade maior de informações a esse respeito. Este microrganismo sintetiza a aerobactina (Williams, 1979), um sideróforo do tipo hidroxamato, e a enterobactina (Greenwood & Luke, 1980), um sideróforo do tipo catecolato. A biossíntese destes sideróforos é dada por um conjunto de genes codificados em um operon constituído por três regiões denominadas respectivamente de reguladora, de biossíntese e de transporte, a partir de um plasmídio no caso da aerobactina ou, do DNA genômico, no caso da enterobactina (Bagg & Neilands, 1987 b; Nahlik *et al.*, 1987). A expressão dos genes para a produção dos sideróforos em *E. coli* é regulada pela proteína FUR (“ferric uptake regulation”) a qual atua como repressora transcricional da síntese quando se liga ao Fe^{2+} (Bagg & Neilands, 1987 a, b). Quando a concentração do ferro celular diminui para níveis críticos, a repressão é cancelada e a síntese do sistema de captação do ferro é liberada. Paralelamente à síntese de sideróforos, são sintetizadas proteínas de membranas envolvidas na captação do complexo ferro-sideróforo formado no meio extracelular (Braun & Hantke 1991). Acredita-se que este sistema de regulação e de transporte seja semelhante em outras espécies e gêneros de microrganismos. Em fungos, pouco se sabe sobre a síntese e a regulação de sideróforos. No fungo fitopatogênico filamentoso *Ustilago maydis*, agente causador de manchas no milho, foram identificados três genes denominados *sid1*, *sid2* e *urbs1* envolvidos na biossíntese dos sideróforos ferricromo e ferricromo A (Mei *et al.*, 1993; An 1997 a, b; Leong & Winkelmann, 1998; Heymann *et al.*, 2000 a). Por outro lado, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora não sintetize sideróforos, existem mecanismos de captação

para complexos ferro-sideróforos na membrana celular (De Silva *et al.*, 1997). Recentemente, vários genes envolvidos na captação de complexos ferro-sideróforos heterólogos foram isolados e caracterizados em *S. cerevisiae*. Por exemplo, os genes *SIT1* e *TAF1* codificam, respectivamente, os transportadores dos hidroxamatos ferroxaminas e triacetil-fusarinina férrica C (Heymann *et al.*, 1999; Lesuisse *et al.*, 1998). Outros três genes codificando proteínas pertencentes à classe principal de transportadores envolvidas na captação de sideróforos também do tipo hidroxamato produzidos por fungos filamentosos foram isolados em levedura, são eles o *ARN1* e o *ARN3* que promovem a internalização de sideróforos do tipo ferricromo e, o *ARN2*, de fusarininas (Heymann *et al.*, 2000 b; Yun *et al.*, 2000 b). No entanto, foi também identificado em levedura, um gene, o *ENB 1*, que codifica um receptor para enterobactina, um sideróforo do tipo catecolato (Heymann *et al.*, 2000 a).

A teoria de que compostos de baixa massa molecular produzidos por fungos estejam envolvidos na degradação de madeira vem ganhando espaço, principalmente aqueles com características quelantes de metais e, especialmente os de ferro (Jellison *et al.*, 1990, 1991; Enoki *et al.*, 1990, 1997; Tanaka *et al.*, 1996; Durán & Machuca, 1996; Goodell *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1997). Estudos nesta área ainda estão sendo realizados, pois não existem resultados contundentes que expliquem a participação direta dos sideróforos na biodecomposição da madeira, sabe-se porém que estes compostos de baixa massa molecular são sintetizados por fungos degradadores de madeira (Milagres *et al.*, 1999; Machuca *et al.*, 1999) e podem efetivamente participar do processo de degradação uma vez que estudos com compostos modelos de hidroxamatos e catecolatos comprovaram a ação oxidativa de sideróforos sobre a lignina e clorolignina (Parra *et al.*, 1998 a, b). Propõe-se que agentes não enzimáticos de baixa massa molecular, onde se incluem os sideróforos, participem no início do processo de modificação de lignina, pois se acredita que o tamanho do poro da parede celular vegetal seja pequeno demais para que as enzimas lignocelulolíticas possam penetrar na parede durante o processo inicial da biodegradação (Carpita *et al.*, 1979; Tepfer & Taylor, 1981; Flournoy *et al.*, 1991). Vários estudos contribuem para a elucidação das vias ligninolíticas através de enzimas, e a proposta de que compostos de baixa massa molecular como os do tipo sideróforos possam atuar como agentes ligninolíticos é recente (Goodell *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1997; Machuca *et al.*, 1999). Nesse sentido, a contribuição deste trabalho é dar início a um melhor conhecimento às vias biossintéticas, e de transporte de compostos sequestradores de

ferro produzidos por fungos que degradam madeira, obtendo padrões de proteínas estruturais induzidas em resposta à presença ou à ausência de ferro no meio de crescimento.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sideróforos

Os sideróforos são definidos como moléculas quelantes de baixo peso molecular específicas para o íon férrico. São geralmente sintetizados por bactérias e fungos quando se encontram em meios onde há baixa concentração deste elemento, inclusive em meio de cultura em laboratório (Winkelmann, 1992; Neilands, 1995). Quimicamente, podem ser classificados em hidroxamatos, produzidos por fungos e bactérias e, fenolatos, que são encontrados principalmente em bactérias. No grupo dos hidroxamatos o ferricromo é o sideróforo mais típico, já dos fenolatos a enterobactina é o principal representante (Neilands, 1993).

As pesquisas nessa área começaram há cerca de cinco décadas, mas o interesse por esses compostos se intensificou com a constatação de que a maioria dos microorganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, incluindo bactérias e fungos, sintetizam pelo menos um tipo de sideróforo (Ecker *et al.*, 1982; Emery, 1980 a, b). No caso de fungos em geral, os sideróforos foram encontrados e caracterizados em muitos fungos filamentosos (Winkelmann, 1974; Ernst & Winkelmann, 1974; Konetschny-Rapp *et al.*, 1988; Huschka *et al.*, 1986; Jalal *et al.*, 1984; Berner *et al.*, 1991).

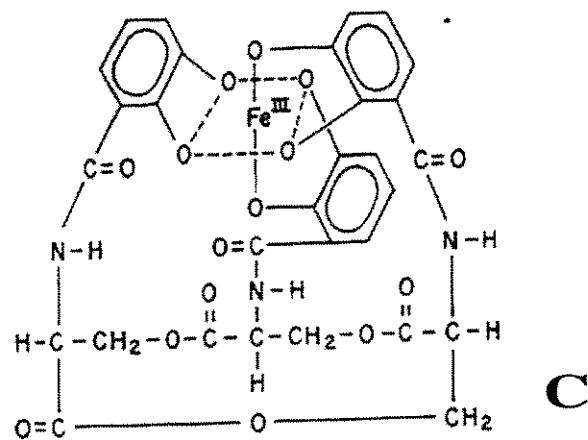
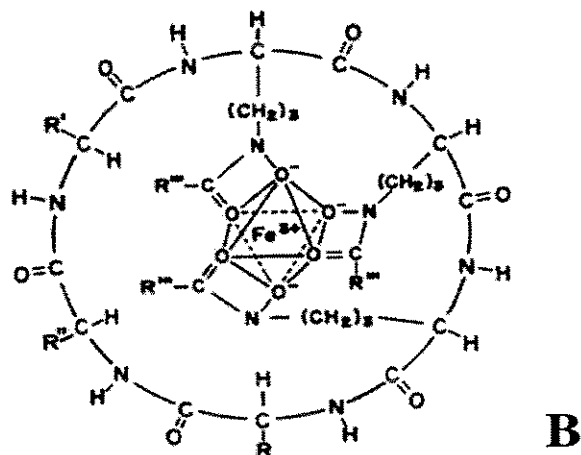
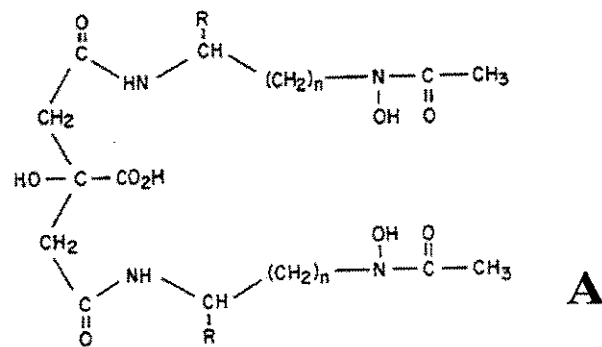
O primeiro sideróforo a ser descrito em fungos, foi o ferricromo, isolado de *Ustilago sphaerogena* que pertence ao tipo hidroxamato (Neilands, 1952). O bloco construtivo dos sideróforos hidroxamatos de fungos é a N6-hidroxiornitina, porém os resíduos N6-acilas podem variar dentro das diferentes classes de sideróforos. Distingue-se 4 classes principais: os ferricromos, as fusarininas, os coprogenes e os ácidos rodoturíficos, às vezes considerados uma sub-classe dos coprogenes (Winkelmann, 1992).

Os ferricromos apresentam vários derivados estruturais tais como, ferricrocina, ferricrisina, ferricromo C, ferrirubina, ferrirodina, ferricromo A e triacetilfusarina que foram detectados em muitos fungos Basidiomicetos e Ascomicetos (Anke *et al.*, 1991, Heymann *et al.*, 1999). A comparação entre Ascomicetos e Basidiomicetos, mostrou a diversidade das variações estruturais do protótipo da molécula do ferricromo. Estas variações são devidas a que o ciclo formado por -Orn-Orn-Orn-Gly-Gly-Gly da molécula pode ser alterado originando outros tipos de sideróforos hexapeptídicos cíclicos. As variações dos aminoácidos na cadeia e das ligações dos resíduos N-acil têm um papel importante no reconhecimento da molécula de

ferricromo pela membrana, como também no transporte do sideróforo através dela (Leong & Winkelmann, 1998).

Embora os sideróforos tivessem sido descobertos como agentes transportadores de ferro, há evidências de que eles possam ter outras funções. Em *Neurospora crassa*, identificaram-se dois sideróforos, a ferricrocina que atua como fator de germinação em conídias e o coprogene que é excretado para o meio com fins de capturar ferro (Horowitz *et al.* 1976). Já nos Basidiomicetos *Rhodotorula minuta* e *Ustilago sphaerogena* detectaram-se sideróforos funcionando como compostos para armazenamento de ferro (Matzanke *et al.*, 1988; 1990).

Considerava-se que os sideróforos produzidos por fungos eram unicamente do tipo hidroxamato porém sideróforos do tipo fenolatos foram encontrados em fungos que promovem degradação de madeira (Jellison *et al.*, 1991 a, b; Godell *et al.*, 1997; Paszczynski *et al.*, 1999) quando crescidos em meio contendo sais básicos e concentração reduzida ferro. Com a caracterização dos fenolatos produzidos pelos fungos degradadores de madeira entende-se que estes em geral podem produzir hidroxamatos e fenolatos como sideróforos.



Estruturas típicas de sideróforos: Hidroxamatos: Aerobactina (A), Ferricromo (B).

Catecolato: Enterobactina (C).

As espécies *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*

Phanerochaete chrysosporium e *Lentinula edodes* são fungos filamentosos que pertencem à classe Basidiomycotina. *P. chrysosporium* é amplamente conhecido como sendo um fungo de degradação branca (white-rot), esta denominação é dada devido à capacidade do fungo em degradar e metabolizar polímeros de lignina, assim como recalceitrar organopoluentes (Ander & Eriksson, 1977; Blanchete, 1991; Zacchi *et al.*, 2000). A descoberta da enzima lignina peroxidase em *P. chrysosporium* (Glend *et al.*, 1983; Tien & Kirk, 1983), incentivou os estudos dos sistemas ligninolíticos em outros fungos de degradação branca como *Lentinula* (= *Lentinula*) *edodes*. Pesquisas envolvendo este tipo de sistemas, permitiu a descoberta da alta homologia dos amino ácidos da sequência N-terminal da enzima manganês-peroxidase (MnP1) deste fungo com a lignina peroxidase e manganês peroxidase de *P. chrysosporium* (Forrester *et al.*, 1990), isto despertou interesse para o estudo dos processos de bioconversão da madeira utilizando *L. edodes* nos últimos anos (Zhao & Kwan, 1999). *L. edodes* também é conhecido pelo alto valor comercial no hemisfério oriental por produzir o cogumelo comestível shiitake (D'Souza *et al.*, 1996; Chang & Buswell, 1996).

Os Basidiomicetos de degradação branca, degradam lignina de forma mais extensiva e mais rápida que outros grupos de organismos conhecidos. Em contraposição a outros microrganismos, estes fungos são capazes de degradar completamente a lignina para dióxido de carbono e água. Estas espécies de fungos encontram-se amplamente distribuídas nas diversas regiões, e tem principal ocorrência em climas tropicais e temperados (Cullen, 1997).

Sideróforos e a degradação de madeira

Na natureza, a degradação da madeira é um processo bastante lento e complicado, possivelmente devido à estrutura e ao arranjo do seus componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Acredita-se que compostos de baixa massa molecular do tipo sideróforos sejam produzidos por fungos que degradam madeira em condições naturais visto a baixa disponibilidade de íons férricos na madeira (Jellison *et al.*, 1990). Esses participariam na degradação de lignina, já que o tamanho dos poros da madeira são relativamente pequenos, o que impede a ação direta das enzimas ligninolíticas e celulolíticas envolvidas no processo de

degradação, portanto se acredita que estas não poderiam dar início ao processo degradativo, e haveria a necessidade de moléculas menores para promoverem a abertura dos poros (Carpita *et al.*, 1979; Tepfer e Taylor, 1981; Flournoy *et al.*, 1991; Fekete *et al.*, 1989; Jellison *et al.*, 1991 a, b).

A lignina é um biopolímero aromático complexo abundante e essencial que confere rigidez à madeira, portanto extremamente resistente à degradação pela maioria dos microorganismos. Porém uma estreita gama de organismos mostram-se eficientes na sua degradação, dentre estes os fungos Basidiomicetos são os que estão melhor caracterizados (Crawford, 1981; Enoki *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1996). Um desses fungos, *Phanerochaete chrysosporium* tem sido usado amplamente nos estudos de biodegradação de lignina. Em contraste aos outros fungos e bactérias, os fungos de degradação branca como *P. chrysosporium* são capazes de degradar completamente a lignina a CO₂ e água numa intensidade e velocidade muito maior que qualquer outro grupo de organismos (Kirk & Farrell, 1987; Rodríguez & Durán, 1988, Tuor *et al.*, 1995).

A degradação microbiana de lignina exerce um papel essencial na ciclagem do carbono e a função dos microorganismos, que são em sua maioria os fungos (Basidiomicetos) superiores que habitam a madeira e o solo, é fundamental para as biotecnologias emergentes tal como a polpagem biomecânica, o branqueamento enzimático de polpas e a degradação de poluentes orgânicos (Tien & Kirk, 1983; Glenn *et al.*, 1983; Cullen, 1997; Durán & Esposito, 1997).

Porém, a ligninólise coloca um problema mecanístico para a ação fúngica porque a lignina, que é um polímero heterogêneo e amorfo, não é susceptível aos mecanismos hidrolíticos normais (Hammel *et al.*, 1993). Pensou-se que os mecanismos básicos estivessem esclarecidos com a descoberta das ligninas peroxidases (LiPs) que tinham a propriedade de quebrar ligações Carbono-Carbono nos compostos modelo de lignina (Tien & Kirk, 1983, 1984; Glen *et al.*, 1983; Renganathan *et al.*, 1985). Porém, muitos esforços foram, e ainda são dirigidos para a elucidação dos mecanismos pelos quais as ligninases atuam na biodegradação. Esses mecanismos despertam o interesse de pesquisadores por serem de grande significado ecológico e porque ao lado da celulose, a lignina é o polímero renovável mais abundante sobre a Terra e a madeira um dos recursos naturais de grande importância econômica.

Dada à complexidade e heterogeneidade da molécula de lignina, desde os primeiros trabalhos que estudaram sua degradação por microorganismos se propôs que deva existir um

mecanismo extracelular oxidativo e relativamente inespecífico (Paszczyński *et al.* 1988; Daniel, 1994). Na verdade, apesar dos muitos trabalhos para se entender os mecanismos de reação das LiPs (ligninas peroxidase), há poucas evidências de que elas possam realmente quebrar a lignina polimérica por ação direta (Haemmerli *et al.*, 1986; Odier *et al.*, 1988; Sarkanen *et al.*, 1991). Uma das questões que se levantou contra a ação direta de enzimas foi quanto ao tamanho dos poros da madeira que não permitiria a difusão das LiPs (Carpita *et al.*, 1979; Tepfer & Taylor, 1981; Flournoy *et al.*, 1991). Somado a isso, o fato de outras enzimas apresentarem atividade degradativa frente à lignina, entre outras as manganês peroxidases (MnPs), sugere que a biodegradação da matriz lignocelulósica da madeira não seja um processo simples envolvendo atividades enzimáticas únicas, reforçando a tese de que esse processo deva ser resultado de uma ação conjunta entre enzimas e compostos de baixa massa molecular (Paszczyński *et al.* 1988; Daniel, 1994; Machuca, 1999), principalmente aqueles com capacidade de quelar metais (Enoki *et al.*, 1989; Hirano *et al.*, 1995; Goodell *et al.*, 1997). Dentre os vários compostos desse tipo, foi proposto que os sideróforos exerçam algum papel na biodegradação de lignina (Paszczyński *et al.* 1999; Jellison *et al.*, 1990, 1991 a; Rodríguez *et al.*, 1997).

Os trabalhos recentes permitem supor que agentes quelantes de baixo peso molecular, notadamente os sideróforos, exerçam papel importante na biodegradação da lignina uma vez que os estudos com compostos modelos de hidroxamatos e catecolatos comprovaram a ação oxidativa de sideróforos sobre a lignina e clorolignina (Parra *et al.*, 1998 a, b; Machuca *et al.*, 1999). Isso faz com que estudos mais minuciosos referentes ao isolamento e caracterização dos genes e das proteínas participantes tanto na regulação como na biossíntese dos compostos envolvidos na produção e transporte de sideróforos neste tipo de fungos sejam básicos para se tentar entender o envolvimento dos compostos de baixa massa nos mecanismos de biodegradação da lignina.

Biossíntese e regulação de sideróforos

A biossíntese de sideróforos e sua regulação têm sido intensamente estudadas na bactéria entérica *Escherichia coli* que sintetiza os sideróforos aerobactina e enterobactina cujas biossínteses são dadas por um conjunto de genes codificados em um operon, formado pelas

regiões reguladoras, de biossíntese e de transporte (Bagg & Neilands, 1987; Nahlik *et al.*, 1987; Williams, 1979; Greenwood & Luke, 1980).

O transporte de ferro mediado por quelantes em bactérias e fungos regulado pela disponibilidade do íon foi sugerida pela primeira vez em 1956 (Garibaldi & Neilands 1956 *apud* Bagg & Neilands, 1987 a, b); em seguida, sugeriu-se que deveria existir uma proteína repressora a qual inibiria a expressão de "clusters" gênicos requeridos para a biossíntese de sideróforos quando as concentrações intracelulares do elemento fossem altas. As primeiras indicações da viabilidade dessa hipótese não chegaram senão em 1978 quando Ernst *et al.* (1978) isolaram fortuitamente um mutante *fur* ("ferric uptake regulation") de *Salmonella typhimurium* que expressava constitutivamente uma proteína de membrana normalmente regulada por ferro. Algum tempo mais tarde o gene *fur* foi clonado e constatou-se que codifica uma proteína de 17 kDa que foi denominada Fur (Saito *et al.*, 1991 b). Esta proteína é rica em histidina e apresenta uma região que está envolvida na ligação do íon ferroso, um correpressor (Saito *et al.*, 1991 a, b) que quando ligado, converte-a em repressora transcricional formando um dímero metal-proteico.

Em *E. coli* a região de ligação ao DNA da proteína Fur acoplada ao ferro foi identificada e corresponde a 19 nucleotídeos cuja sequência é 5' - GATAATGATAATCATTATC-3' (Neilands, 1993). Essa sequência tem sido encontrada na região promotora de todos os genes que são negativamente regulados por ferro, inclusive em outras espécies e gêneros de microrganismos (Serino *et al.*, 1995; Rombel & Lamont, 1992; Marugg *et al.*, 1988). As sequências deduzidas das proteínas apresentam uma similaridade bastante significativa com as enzimas que participam da biossíntese da maioria dos sideróforos conhecidos, indicando uma conservação de sequências e de funções entre essas enzimas embora as estruturas dos sideróforos variem consideravelmente entre os organismos.

Poucos estudos relacionados à biossíntese e transporte de sideróforos em fungos foram conduzidos até o momento. Em *Ustilago maydis*, três genes denominados *sid1*, *sid2* e *urbs1* envolvidos na biossíntese dos sideróforos ferricromo e ferricromo A, têm sido estudados e caracterizados (Leong & Winkelmann, 1998; An *et al.*, 1997 a, b). O *sid1* codifica uma enzima, a L-ornitina N⁵-oxigenase, envolvida na hidroxilação de um composto precursor dos sideróforos, o gene *sid2* possivelmente tenha a função de síntese do anel peptídico do sideróforo, e o gene *urbs1* ("*U. maydis* regulator of biosynthesis of siderophores") que é

regulado por ferro, codifica um fator de transcrição da família GATA que regula negativamente a expressão do gene *sid1* (Heymann *et al.*, 2000 a). Genes homólogos ao gene *Urbs1*, codificando fatores de transcrição da família GATA, foram isolados em diversos fungos filamentosos. Os genes *SRE* (“siderophore regulator element”), *SREP* e *SREA* foram caracterizados respectivamente em *Neurospora crassa* (Zhou *et al.*, 1998), *Penicillium chrysogenum* (Haas *et al.*, 1997) e *Aspergillus nidulans* (Haas *et al.*, 1999). No entanto, a expressão da proteína SRE codificada pelo gene *SRE* é constitutiva, o que indica que um evento pós-traducional deve modular a atividade destes fatores transcricionais para biossíntese de sideróforos (Zhou *et al.*, 1998).

O mecanismo real da regulação da biossíntese de sideróforos em fungos em geral está ainda sob investigação. Apesar de se ter registro de estudos sobre a bioquímica de biossíntese e captação de sideróforos nestes microorganismos já há algum tempo, progressos na biologia molecular são muito recentes e limitados quando comparados com os trabalhos que tem sido reportados sobre os sistemas sideróforos em bactérias (Leong & Winkelmann, 1998).

Transporte de ferro através da Membrana Citoplasmática

Existem vários meios de aquisição de ferro em fungos, um deles é que, em situação de baixa concentração de ferro extracelular, o sideróforo é utilizado para o transporte do metal. Em condições de alta concentração, o transporte em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, é feito ou por outros quelantes de Fe^{3+} , que não sideróforos, ou por transportadores de Fe^{2+} , após a redução por enzimas ligadas à membrana, e nesta situação também há o transporte de magnésio e cálcio. A acidificação do meio e a deposição do ferro na parede celular com subsequente mobilização de hidróxi-ácidos é um outro mecanismo de captação de ferro neste microorganismo (Howard, 1999).

O transporte de Fe^{2+} é diferente ao do Fe^{3+} , no primeiro há necessidade da hidrólise de ATP e pode ser feito pelo sistema de transporte para Mg^{2+} (Braun & Killmann, 1999). Para o transporte de Fe^{3+} é requerido algum tipo de quelante. No caso de baixa disponibilidade de Fe^{3+} , quelantes altamente específicos como os sideróforos são necessários para captar o íon do meio externo e o levar para dentro da célula. Paralelamente à síntese de sideróforos pelos microorganismos, são sintetizadas proteínas de membranas envolvidas na captação do complexo ferro-sideróforo formado no meio extracelular. Segundo a revisão de Braun & Hantke (1991), o

transporte deste complexo para dentro da célula segue os seguintes passos: 1) o complexo ferro-sideróforo liga-se à membrana externa da célula via receptores específicos, 2) o ferro-sideróforo é transferido da membrana externa para uma proteína carregadora no periplasma, 3) liberação do ferro-sideróforo da proteína carregadora para a membrana citoplasmática, 4) liberação do complexo ferro-sideróforo para dentro da célula, onde o ferro é descomplexado provavelmente por um mecanismo redutivo (Crichton & Ward, 1992).

Embora haja receptores específicos para o transporte de sideróforos sintetizados pelos microrganismos, há a possibilidade de que estes tenham receptores para sideróforos produzidos por outras espécies, é o caso de *E. coli* cujos sideróforos são a aerobactina e a enterobactina, porém utiliza avidamente o ferricromo, que é produzido por fungos, para captação do ferro. O receptor específico para este sideróforo nesta bactéria é uma proteína denominada FhuA, localizada na membrana externa, e o transporte do ferricromo através do periplasma até a membrana citoplasmática é feita pela proteína FhuD. O complexo ferricromo-FhuD é levado até o receptor na membrana citoplasmática FhuB que transporta o sideróforo até o citoplasma onde o receptor FhuC se liga ao ferricromo para a liberação do ferro. Três proteínas, TonB, ExbB e ExbD que interagem diretamente com os receptores estão envolvidas na transferência de energia a partir da membrana citoplasmática até a membrana externa, porém não é conhecido como é realizada essa transferência (Postle, 1990 a, b; Braun & Killmann, 1999).

Ao contrário de bactérias, a caracterização de proteínas de membrana cuja expressão seja regulada por ferro em fungos filamentosos tem sido mais difícil (Ernst & Winkelmann, 1977). Uma das razões apresentadas é que as membranas citoplasmáticas de fungos não são equivalentes às de bactérias, entretanto deve-se considerar também a possibilidade de que as proteínas de membranas de fungos envolvidas no transporte de sideróforos sejam expressas constitutivamente após a germinação (Huschka & Winkelmann, 1989).

Nos últimos anos têm sido feitos estudos relacionados à captação de ferro na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com o intuito de entender melhor os mecanismos relacionados a este processo (Andrews *et al.*, 1999). Neste fungo, a captação de ferro é mediada por dois tipos de sistemas de transporte: o sistema de baixa afinidade, que é responsável pela acumulação de ferro em meios de alta concentração do metal, e o sistema de alta afinidade, que é induzido quando concentração do metal diminui (Askwith & Kaplan, 1997; Andrews *et al.*, 1999). Sabe-se que *S. cerevisiae* não sintetiza sideróforos, porém este fungo apresenta receptores para

sideróforos sintetizados por outros microrganismos. Recentemente, foram identificados genes relacionados ao transporte de sideróforos do tipo ferricromo e fusarininas em leveduras, os genes que codificam as proteínas para transporte de ferricromo são *ARN1* e *ARN3*, já para as fusarininas o principal facilitador para o transporte é o *ARN2* (Yun *et al.*, 2000 b).

Em *Saccharomyces cerevisiae* o transporte de ferro é estreitamente relacionado ao transporte de cobre. Tanto para o transporte do ferro como do cobre no sistema alta afinidade, duas metal-redutases estão envolvidas, a Fre1p e Fre2p, porém estas proteínas são reguladas de forma distinta, o gene *FRE1* é regulado tanto pela falta de ferro como pela de cobre, já o gene *FRE2* é unicamente regulado pela falta de ferro. Ambos genes têm como fator de regulação transcricional o Aft1 (Radiski & Kaplan, 1999). No sistema de alta afinidade também são sintetizados complexos permease-oxidases, codificados pelos genes *FTR1* e *FET3*, o primeiro codifica para uma permease enquanto que o segundo codifica uma enzima que catalisa a oxidação do Fe^{+2} . Genes homólogos a *FTR1* e *FET3* foram identificados em *Schizosaccharomyces pombe* a *fiol*⁺ (ferri ferro oxidase) e *fip1*⁺ (ferri ferro permease) (Radiski & Kaplan, 1999). O passo inicial da captação de ferro em leveduras é a redução do Fe (III) para Fe (II) por *FRE1*, o Fe (II) serve como substrato para Fet3 que reoxida para Fe (III) para ser transportada para o interior da célula via Ftr1 (Hassett *et al.*, 1998).

No sistema de baixa afinidade foi identificado o gene *FET4* que codifica a proteína FET4 que realiza o transporte de ferro utilizando o íon ferroso de forma similar que *FTR1* e *FET3*, essa proteína não apresenta homologia com as proteínas conhecidas para este tipo de transporte (Dix *et al.*, 1997).

Estudos envolvendo transporte de ferro via sideróforo ou não, ainda são insipientes em fungos, contudo nos últimos anos tem-se dado ênfase nesta área com a identificação de receptores para sideróforos e outras proteínas de transporte para ferro em *Saccharomyces cerevisiae* (Heymann *et al.*, 2000 a, b; Andrews *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

- Verificar a produção de sideróforos dentro do período de cultivo de 11 dias em duas espécies de fungos que degradam madeira: *P. chrysosporium* e *L. edodes*.
- Estudar o padrão de proteínas reguladas por ferro que podem estar envolvidas nas vias biossintéticas e de transporte de sideróforos em fungos que degradam madeira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificação da produção de sideróforos pelo corante CAS (cromo azurol S) em cultivos em meio sólido e líquido de *P. chrysosporium* e *L. edodes*.
- Avaliação do padrão de proteínas expressas diferencialmente em condições de crescimento em meio com e sem ferro através do estudo do:

1. Perfil de proteínas totais em gel SDS-PAGE.
2. Perfil de proteínas totais em gel de duas dimensões.
3. Perfil de proteínas de membrana e de membrana externa em géis SDS-PAGE.

PRIMEIRO ARTIGO:

“IRON-REGULATED PROTEINS IN *Phanerochaete chrysosporium* AND *Lentinula edodes*: DIFFERENTIAL ANALYSIS BY SDS-PAGE AND TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROFILES”

Submetido em novembro/2000 para publicação à revista:

Electrophoresis

IRON-REGULATED PROTEINS IN *Phanerochaete chrysosporium* AND *Lentinula edodes*: DIFFERENTIAL ANALYSIS BY SDS-PAGE AND TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROFILES

Maria Lucila Hernández-Macedo¹, André Ferraz², Jaime Rodríguez³, Laura Maria Mariscal Ottoboni¹, Maricilda Palandi De Mello¹ - ¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil. ²Departamento de Biotecnologia (DEBIC), Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), Lorena, SP, Brasil. ³Laboratório de Recursos Renovables, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Running title: Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*

Corresponding author:

Maricilda Palandi de Mello, Ph.D. - CBMEG-UNICAMP - Caixa Postal 6010 - 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Phone # (55-19) 3788-1146. Fax # (55-19) 3788-1089. e-mail: mmello@obelix.unicamp.br

Abbreviations: 2-DE -two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-sodium dodecyl sulfate; PMSF-phenylmethanesulfonyl fluoride; kDa-kilodalton (molecular mass).

Key words: iron responsive proteins; white-rot fungi; white-rot iron responsive fungal proteins.

ABSTRACT

Phanerochaete chrysosporium and *Lentinula edodes* are white rot basidiomycetes bearing different degrees of ligninolytic activity depending on the substrate. Lignin biodegradation has been considered to occur through enzymatic processes mediated by extracellular oxidative enzymes produced by white-rot fungi. However, iron-complexing compounds have been postulated to play an important role in the wood decay process as well. Siderophores are high affinity iron-chelating compounds produced by most fungi and bacteria under iron restriction conditions. SDS-PAGE and 2-DE were used to identify iron responsive proteins in the two white-rot species, by comparing the differential patterns of cellular and membrane proteins obtained from iron-sufficient and iron-deficient mycelia. Six and thirteen cellular proteins induced by iron restriction have been observed in SDS-PAGE for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. In 2-DE, the numbers of induced proteins were 17 and 10, respectively, in a resolution range of 15-60 kDa and pI 4.5-8.1. SDS-PAGE for the plasma membrane protein did not show differences, whereas the outer-membrane protein profile showed 6 and 4 proteins induced by iron depletion in *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. The results presented here are important data to unravel mechanisms of biosynthesis and/or transport of the iron-complexing agents in ligninolytic fungi and to further correlate them to the ligninolytic processes.

INTRODUCTION

The technological application of wood biodelignification represents a process of potential importance for the economy especially for cellulose pulp industries. Due to the environmental pollution generated by chemical processes, nowadays, researchers have pursued less polluting biological pretreated pulp and biobleaching processes that still produce good quality cellulose pulp. Within this context, the understanding of the lignin microbiological degradation promoted by fungi (Basidiomycetes) which inhabit the wood plays an essential role.

P. chrysosporium and *L. edodes* are white rot basidiomycetes bearing different degrees of ligninolytic activity depending on the substrate [1]. Several extracellular oxidative enzymes (Lignin-peroxidases (Lips), Mn-Peroxidases (MnPs), Laccases, and others) produced by different species of white rot fungi have been characterized and tested for lignin biodegradation activity [2, 3]. Nonetheless, the lignin biodegradation places a mechanistic problem to the fungal action because in nature this polymer is not susceptible to normal hydrolytic mechanisms [4]. The main question that has been arisen against the direct action of enzymes is related to the small sized wood pore that would prevent the diffusion of LiPs [5, 6]. Therefore, the process should be a result of combined action between ligninolytic enzymes and low molecular mass compounds - LMMC [7, 8]. Several papers describing the participation LMMC iron chelating and iron reducing compounds produced by fungi in the wood degradation have been published [9-14]. Among LMMC, it has been proposed that the iron-chelating compounds (like siderophores) play an important role in lignin biodegradation [15-18].

High affinity iron-chelating compounds, normally called siderophores, are produced by bacteria and fungi under conditions of iron-deficiency [19]. Depending on the strain, the

medium and the cultivation conditions, generally, fungi synthesize a variety of hydroxamate siderophores with different structural backbones such as ferrichromes, coprogens, and fusigens (fusarinins) [20]. Unlike most fungi, the wood degrading species, those for which some study has already been accomplished, seem to produce phenolate-catecholate siderophores [12, 14, 21]. Conversely, as well as *E. coli*, which produces enterobactin, a catecholate, and aerobactin, a hydroxamate, there are evidences that ligninolytic fungi produce iron-chelating compounds with different siderophore structures (Rodríguez J, personal communication). In different bacteria, several operons have been characterized coding proteins involved in the biosynthesis and transport of siderophores [22]. The characterization of proteins and their respective genes which participate on the siderophore production and transport in fungi has become more intensive during the last ten years [23-29]. In *Ustilago maydis*, a basidiomycete, the production of ferrichrome depends on the expression of two genes, *sid1* and *sid2*, of which *sid1* represents the ornithine- N^5 -oxygenase and *sid2* possibly has a function in the biosynthesis of the peptide ring [30]. Regulating the whole biosynthesis appears the protein URBS1 which is a GATA-type transcription factor containing two putative zinc finger motifs [31]. Ascomycetous fungi such as *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum* and *Neurospora crassa* produce respectively the SREA, SREP and SRE proteins, which are iron-regulated GATA-type transcription factors that regulate siderophore biosynthesis [25-27].

As a first approach to the study of siderophore biosynthesis and transport in white rot fungi, this report describes the iron-regulated protein profiles in SDS-PAGE and 2-DE produced by two species of wood degrading fungi. Cellular as well as membrane proteins were induced as a response to different iron concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Fungal species and growth conditions

Wood degradation fungi *P. chrysosporium*, strain BKM-1767, and *L. edodes*, strain UEC-2019, were maintained in cultures on 2% malt-extract-agar (MEA) plates grown at 28°C and stored at 5°C. Cultures to obtain fungal mycelia were made by inoculating several 250 mL Erlenmeyer flasks containing 75 mL of 2% malt-extract-liquid broth (ME). To remove iron traces, all glass flasks were dipped in 10% HCl for 48 hours, autoclaved at 1 atm for 15 minutes with 10 mM EDTA, and rinsed with deionized sterile water. Differential mycelial growth conditions were: 1) ME medium (iron-deficient); 2) ME medium containing 90 µM FeCl₃.6H₂O (iron-sufficient). Cultures were incubated at 28°C under agitation at 120 rpm for 11 days. Mycelia were recovered by vacuum filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until use.

Cellular protein extraction, SDS-PAGE and 2-DE analysis

Cellular proteins were extracted from each growth condition by grounding mycelia to a fine powder in liquid nitrogen with a pestle and a mortar. The protein extraction procedure was according De Mot & Vanderleyden [32]. Originally, the method was described for *Azospirillum* species; recently, it had been used for *Thiobacillus ferrooxidans* [33] and for plant tissues [34]. This method was adapted here for fungal mycelia. In the finish growth, the powdered mycelia from each experimental condition were transferred to 2 mL Eppendorf tubes and weighted. To

the powdered mycelia it was added a weight-equivalent volume of the extraction buffer containing 0.7 M sucrose, 0.5 M Tris, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, and 40 mM dithiothreitol. The samples were incubated on ice for 15 min. Before eliminating cellular debris by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at room temperature in a microfuge, the suspension was homogenized in a glass tissue grind tube. After centrifugation, supernatants were transferred to a new 2.0 mL Eppendorf tube and homogenized with an equal volume phenol, pH 8.0 (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) which was agitated in a Vortex-Gen 2 for 10 min at room temperature. After centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, the extraction procedure was repeated three times by adding the extraction buffer (equal v/v) to the phenolic phase. The precipitation of the cellular proteins had been made by the addition to the phenolic phase of five volumes of 0.1 M ammonium acetate dissolved in methanol, the mixture was then incubated at -20°C for 2 h. After centrifugation at 14,000 rpm for 10 min the pellet was washed twice with 0.1 M ammonium acetate and twice with ice-cold 80% acetone. For SDS-PAGE the pellet was air-dried and dissolved in 30-50 μL lysis buffer (9.8 M urea, 2% (v/v) Nonidet P-40, 100 mM dithiothreitol). For 2-DE experiments the lysis buffer was 9.8 M urea, 2% (v/v) Nonidet P-40, 100 mM dithiothreitol and 2% (v/v) carrier ampholytes (Amersham-Pharmacia Biotech., Upsala, Sweden), pH 5-7 and pH 3-10 (5:1). In all cases protein concentration was determined by the Bradford method. Samples were stored at -70°C until loaded in a gel. Approximately 40 μg of cellular proteins were loaded in 15% SDS-PAGE according to Laemmli [35]. The 10 kDa Protein Ladder (Gibco-BRL, Bethesda, USA) was used as molecular weight standard to estimate differential expressed mycelial protein molecular weights. The protein profiles were visualized by silver staining. The 2-DE experiments were conducted according to De Mot & Vanderleyden [32]. Approximately 360 μg of cellular

proteins were loaded in the isoelectric focusing gel. The upper reservoir was loaded with 20 mM NaOH and lower reservoir with 10 mM H₃PO₄. Pre-running conditions were 15 min at 200 V, 30 min at 300 V and 60 min at 400 V. The first dimension gels were run at 400 V for 18 h. Second-dimensional analysis were performed according to Laemmli [35] on 12% polyacrylamide gels. The 10 kDa Protein Ladder was loaded together with the 1-D separated proteins strips in the second-dimensional gels to estimate the relative molecular weights of differential expressed mycelial proteins. After electrophoresis, the second dimension gels were silver stained. The pIs of the protein spots were estimated based on the pH gradient formed in one unloaded first dimension gel, which ran simultaneously, and calculated by measuring the pH of every 1 cm sliced gel strips.

Plasma membrane protein extraction

The protocol described by Bowman *et al.* [36] for extraction of *Neurospora crassa* plasma membrane proteins was used to isolate the mycelial membrane proteins of the two white rot species. After grounded to a fine powder in liquid nitrogen, mycelia were suspended in solution A (0.59 M sucrose, 5 mM EDTA, 50 mM NaH₂PO₄, 70 µl β-mercaptoethanol, 133 mg/ml *Helix pomatia* β-glucuronidase type H-1 enzyme (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) and incubated for 1 h at 30°C. The suspension was homogenized in a glass tissue grind tube before centrifugation at 4,000 x g for 10 min at 4°C. The pellet was washed with 0.68 M sucrose and re-centrifuged. The pellet was suspended in solution B (0.33 M sucrose, 1 mM EGTA, 0.3% bovine serum albumin, pH adjusted to 7.1 with KOH), homogenized as described above, and centrifuged at 1,000 x g for 10 min. The resulting pellet was suspended in solution

B and submitted to a third round of homogenization and centrifugation. The supernatant was centrifuged in a Beckman JA 20 rotor for 30 min at 11,700 x g and the supernatant was re-centrifuged for 40 min at 39,400x g. Finally, the pellet was suspended in 6 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol. The membrane protein profiles were observed in silver stained 10% SDS-PAGE as mentioned above.

Outer membrane protein extraction

Mycelia obtained from iron-sufficient and iron-deficient cultures were grounded in liquid nitrogen and washed twice and resuspended in 1.5 mL PBS containing 1 mM PMSF. The procedure described by Mezence and Borion [37] was used for outer membrane protein extraction with some modifications. The cell suspensions were homogenized in tissue glass grinder for 10 min at 4°C. Undisrupted cells and large fragments were removed by centrifugation at 9,000 x g for 10 min at 4°C. The centrifugation procedure was repeated five times, finally the supernatant was centrifuged at 53,000 x g for 60 min at 4°C in a Beckman L8 80M ultra-centrifuge using the SW50 rotor. The pellet (outer membrane proteins) was suspended in Laemmli solubilization buffer [35] and heated at 100°C for 5 min. Prior to load the SDS-PAGE, the samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min. The proteins were visualized by silver staining.

RESULTS AND DISCUSSION

SDS-PAGE cellular protein differential profiles

A large number of proteins with MW ranging from 10-220 kDa can be observed in all SDS-PAGE of *P. chrysosporium* and *L. edodes* cellular protein extracts (Fig. 1). For a better visualization, panels A and B show the two differential SDS-PAGE separation profiles in the range 30-220 kDa and panels C and D, in the range 10-40 kDa for each fungal species. When grown under conditions of iron limitation, both species synthesized several cellular proteins which are repressed in mycelia grown in iron-sufficient culture medium. Six differential proteins were distinguished for *P. chrysosporium* in preparations from iron-deficient mycelia, whereas for *L. edodes* this number was 13. On repeated protein preparations and SDS-PAGE runs, the apparent MW for the proteins that markedly had an increased expression in *P. chrysosporium* iron-deficient mycelia corresponded to I-P = 18 kDa; II-P = 21 kDa; III-P = 27 kDa; IV-P = 37 kDa; V-P = 48 kDa and VI-P > 120 kDa (Fig. 1, A and C). For *L. edodes* iron-deficient mycelia, the apparent MW for the proteins that markedly have an increased expression were: I-L = 13 kDa; II-L = 18 kDa; III-L = 24 kDa; IV-L = 29 kDa; V-L = 30 kDa; VI-L = 37 kDa; VII-L = 39 kDa; VIII-L = 61 kDa; IX-L = 68 kDa; X-L = 90 kDa; XI-L = 100 kDa; XII-L = 105 kDa and XIII-L > 120 kDa (Fig. 1, B and D). A comparison between *P. chrysosporium* and *L. edodes* protein patterns is difficult since they are different species, but it is clear that the 18 kDa, the 37 kDa and the >120 kDa polypeptides were induced by iron restriction in both fungi, indicating that a common molecular mechanism is probably activated in both fungi under this condition. A 61 kDa polypeptide (VIII-L) is observed in the iron-deficient gel for *L. edodes* (Fig. 1, B). Although, a corresponding polypeptide is not visualized

on the *P. chrysosporium* gel shown in Fig. 1-A, it was observed in other running condition gel (data not shown). The smut fungus L-Ornithine N5-oxygenase protein is a protein that initiates siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis* [30]. The MW for this protein, deduced from the aminoacid sequence of the putative enzyme, is 62 kDa, therefore the 61 kDa iron-limited induced polypeptide observed for *P. chrysosporium* and *L. edodes* could be the L-Ornithine N5-oxygenase protein homolog. Additionally, the great majority of peroxidases, including LiPs, have MW ranging from 35 to 40 kDa. It is well known that several LiPs are differently regulated under limitation for either carbon or nitrogen nutrients [38, 40], nonetheless iron limitation may also regulate some LiPs since a GLG5 LiP-homolog transcript induced under iron restricted conditions was identified in an ongoing parallel research project (Assmann EM, personal communication). Therefore, it can be supposed that, apart of proteins involved in siderophore biosynthesis and transport, those fungi may produce other iron-deficiency responsive polypeptide. It is interesting to point out that iron-deficient *L. edodes* presented four proteins between 65 and 105 kDa, in a range where *P. chrysosporium* did not show any induced proteins (Fig. 1, C and D). Those proteins in *L. edodes* might be related to specie-specific iron-limited regulated mechanisms. Conversely, three proteins with increased expression can be observed in iron-sufficient profiles, which are repressed in conditions of low iron for both *P. chrysosporium* (VII-P = 46 kDa; VIII-P = 53 kDa; IX-P = 62kDa) and *L. edodes* (XIV-L = 10 kDa; XV-L = 25 kDa; XVI-L = 70 kDa). Those polypeptides are probably produced in the presence of iron due to a mechanism of iron positive regulation. They might not be involved in siderophore production, but they can be responsible for non-siderophore mediated iron capture processes. They can also be proteins involved in defense mechanisms induced for cell protection against the free radicals usually produced in iron-mediated oxidative processes. This possibility is supported by the recent publication by Dubrac & Touati [41] where they describe

the positive regulation of the FUR protein (M_r varying in a range of 14-17 kDa) in the expression of an iron-superoxide dismutase in *E. coli*. It is also known that the FUR protein is a global regulator that responds to iron concentrations and was characterized initially as transcriptional repressor of the siderophore biosynthesis. Proteins homologous to FUR have been found in several fungi as well. The MW of those proteins deduced from the putative aminoacid sequence vary from 55 to 104 kDa [30, 25, 27]. Therefore, we could suppose that among the proteins with increased expression in the presence of iron it can be included a FUR-like protein.

2-DE cellular protein differential profiles

A careful analysis of the proteins separated in 2-DE led to the identification of spots with different apparent molecular weights (M_r) whose silver stained intensity varied when iron-deficient and iron-sufficient mycelium extract were compared. Different protein extractions and 2-DE runs were compared. For *P. chrysosporium*, in the MW range of 15-50 kDa and pI 4.5-8.0, twelve spots could be identified only in extracts from iron-deficient mycelia (Table 1, P1-P12; Fig. 2A). At least 5 polypeptides were present in extracts from both culture conditions but presented more intensely stained spots in iron-deficient mycelia (Table 1, P13-P17; Fig. 2A). The P13 spot of 16 kDa has a markedly enhanced intensity clearly indicating a desrepressed expression under iron deficiency. Other six highly intense spots were verified only in iron-deficient conditions (P2, P3, P5, P6, P10, P11) Nonetheless, eleven polypeptides have also been observed only in extracts from iron-sufficient mycelia indicating that some proteins are iron inducible, and three, although visualized in both culture conditions, presented higher intensity spots in mycelia grown in the presence of Fe^{3+} . For iron-sufficient conditions fourteen

differential spots could be visualized (Fig. 2B; Table 1, P17-P31), most of them were markedly positive iron-regulated polypeptides.

Table 2 describes the apparent molecular weight and the estimated pIs of differential polypeptides for *L. edodes*. Eight spot are only observed on the iron-deficient mycelia extract gel (Fig. 2C; Table 2, L1-L8) whereas two had clearly an increased expression (Fig. 2C; Table 2, L9-L10). Additionally, two polypeptide spots appear only on the iron-sufficient mycelia extract gel (Fig. 2D; Table 2, L11, L12) and other two had an increased expression (Fig. 2D; Table 2, L13, L14). In SDS-PAGE, *L. edodes* iron-deficient mycelium exhibited a higher number of induced proteins than *P. chrysosporium*. Conversely, fewer differential spots were observed in 2-DE when the iron-deficient profiles were compared. A possible explanation is that the majority of differential proteins present in the SDS-PAGE profile, specially those with M_r ranging from 20 to 40, have pIs out of resolution range used.

Plasma and outer membrane protein profiles

Plasma membrane proteins of *P. chrysosporium* and *L. edodes* mycelia that had been grown in iron-sufficient or iron-deficient media were compared. There were no significant difference in SDS-PAGE profile (data not shown). A similar result was reported before for *Neurospora crassa* by Van der Helm & Winkelmann [42]. It seems that, like *Neurospora*, the wood degrading species constitutively express proteins involved in the membrane iron transport. Conversely, the *P. chrysosporium* and *L. edodes* outer membrane protein (OMP) profiles for mycelia grown in iron-deficient medium presented significant differences when compared to iron-sufficient OMP mycelium extract (Fig. 3). Six proteins (M_r = 20, 30, 38, 55, 58, 65) showed higher silver staining intensity in the iron-deficient *P. chrysosporium* profile,

whereas one polypeptide (M_r 50) was expressed only in iron-sufficient mycelia. For *L. edodes*, the numbers of iron-limited and iron-sufficient proteins were 4 (M_r = 38, 42, 48, 55) and 2 (M_r = 34, 39), respectively. Those proteins induced under iron-deficient conditions and repressed under iron-sufficient condition may represent surface receptors which participate in iron-siderophore complexes translocation through the outer membrane.

CONCLUDING REMARKS

To our knowledge there is no published information about iron uptake (free or siderophore-chelated) mechanisms in wood degrading fungi. In general, many fungi secrete hydroxamate-like siderophores under iron-deficiency. Normally, fungal siderophore biosynthesis involves an ornithine N⁵-hydroxylation and acylation followed by the action of a non-ribosomal peptide synthetase [30]. Most detailed studies related to iron transport are on *Saccharomyces cerevisiae* which does not synthesize siderophores, but exhibits two mechanisms of iron capture that respond to the iron concentration [20, 43]. A mechanism of low affinity is activated when a high concentration of the metal exists. This mechanism involves the action of an iron-reductase that reduces Fe³⁺ to Fe²⁺ in the external membrane and, the reduced iron is internalized, in this case a low affinity transporter (FET4, ~ 60 kDa) is induced. The mechanism of high affinity expresses when the concentration of iron is low, and it is mediated by two iron reductases (FRE1 and 2, with molecular weights between 71 and 80 kDa). The Fe²⁺ ions are oxidized by a multicopper oxidase (FET3, with molecular weight of approximately 70 kDa), whose expression is regulated by AFT1 (75.8 kDa), a transcription factor regulated by iron. The transport is effectuated by a permease FTR1 (44 kDa). However, the yeast is capable to assimilate iron-siderophore complexes which are produced by other microorganisms. It means that iron-siderophore complex receptors exists in different organisms and can be induced by iron-chelating compounds produced by other species. Recently, as a result of the *S. cerevisiae* genome sequencing there were identified genes coding for proteins belonging to the main superfamily of membrane facilitators that are capable to transport iron-siderophore complexes of either hydroxamate or catecholate structures. The estimated sizes of these facilitator proteins vary between 60 and 70 kDa [28, 29, 44, 45]. The iron-deficient or

iron-sufficient regulated proteins identified in SDS-PAGE and 2-DE profiles of *P. chrysosporium* and *L. edodes* are important results to further understanding the complex mechanisms of iron uptake in these wood degrading species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brasil, (research grant n°. 98/00548-4 to MPdeM and Graduation grant n°. 98/04519-9 to MLHM). We are specially indepted to Dr. Márcio J. da Silva for helpful collaboration on art work. We also thank Maria Madalena Vasconcelos Rosa for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A., *J. Biotechnol.* 1995, 41, 1-17.
- [2] Blanchete, R. A., Abad, A. R., Farrell, R. L., Leathers, T. D., *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 1457-1465.
- [3] Cullen, D., *J. Biotechnol.* 1997, 53: 273-289.
- [4] Hammel, K. E., Jensen, K. A., JR., Mozuch, M. D., Landucci, L. L., Tien, M., Pease, E. A., *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 12274-12281
- [5] Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., Delmer, D. P., *Science* 1979, 205, 1144-1147.
- [6] Flournoy, D. S., Kirk, T. K., Highley, T., *Holzforsch* 1991, 45, 383-388.
- [7] Paszczynski, A., Crawford, R. L., Blanchete, R. A., *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54, 62-68.
- [8] Daniel, G., *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 13, 199-233.
- [9] Duran, N.. In: 4th. *Brazilian Symposium on Chemistry of Lignin and other Wood Components*, Recife, Brazil, 1996, Proceedings, v.5 , pp.164-169.
- [10] Duran, N., Machuca, A., *Holz Roh Werkstoff* 1995, 53, 346.
- [11] Tanaka, H., Itakura, S., Hirano, T., Enoki, A., *Holzforschung* 1996, 50, 541-548.
- [12] Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., Xu, G., *J. Biotechnol.* 1997, 53, 133-162.
- [13] Kerem, Z., Hammel, K. E., *FEBS Lett.* 1999, 446, 49-54.
- [14] Paszczynski, A., Crawford, R., Funk, D., Goodell, B., *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 674-9.
- [15] Rodríguez, J., Oses, R., Parra, C., Freer, J., Baeza, J.. In: 5th. *Brazilian Symposium on Chemistry of Lignin and other Wood Components*, Curitiba, Brazil, 1997, Proceedings, v.6,

pp. 601-604.

- [16] Parra, C., Rodriguez, J., Baeza, J., Freer, J., Duran, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 251, 399-402.
- [17] Parra, C., Santiago, M. F., Rodriguez, J., Duran, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 249, 719-22 .
- [18] Machuca, A., Hiroshi, A., Duran, N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999, 256, 20-26.
- [19] Neilands, J.B., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26723-26726.
- [20] Howard, D. H., *Clin. Microbiol. Ver.* 1999, 12, 394-404.
- [21] Fekete, F.A., Chandhoke, V., Jellison, J., *Appl. Enviro. Microbiol.* 1989, 55, 2720-2722.
- [22] Bagg, A., Neilands, J. B., *Biochemistry* 1987, 26, 5471-5477.
- [23] Mei, B., Budde, A. D., Leong, A. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993, 90, 903-907.
- [24] Voisard, C., Wang, J., Mcevoy, J. L., Xu, P., Leong, A. S., *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 7091-7100.
- [25] Haas, H., Angermayr, K., Stoffler, G., *Gene* 1997, 184, 33-37.
- [26] Zhou, L. W., Haas, H., Marzluf, G. A., *Mol. Gen. Genet.* 1998, 259, 532-40.
- [27] Haas, H., Zadra, I., Stöffler, G., Angermayr, K., *The J. Biol. Chem.* 1999, 274, 4613-4619.
- [28] Heymann, P., Ernst, J. F., Winkelmann G., *Biometals* 1999, 12, 301-306.
- [29] Heymann, P., Ernst, J. F., Winkelmann, G., *Biometals* 2000, 13, 65-72.
- [30] Leong, S. A., Winkelmann, G., *Met. Ions. Biol. Syst.* 1998, 35, 147-186.
- [31] An, Z., Zhao, Q., Mcevoy, J., Yuan, W. M., Markley, J.L., Leong, A. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 5882-5887.
- [32] De Mot, R., Vanderleyden, J., *Can. J. Microbiol.* 1989, 35, 960-967 ().
- [33] Novo, M. M.T., Da Silva, C. A., Moreto, R., Cabral, P. C. P., Costacurta, A., Garcia Jr, O., Ottoboni, L. M. M., *Antonie van Leeuwenhoek* 2000, 77, 187-195.

- [34] Mangolin, A. C., Ottoboni, L. M. M., Machado, M. F. P. S., *Electrophoresis* 1999, 20, 626-629.
- [35] Laemmli, V. K., *Nature* 1970, 247, 37.
- [36] Bowman, E. J., Bowman, B. J., Slayman, C., *J. Biol. Chem.* 1981, 253, 12336-12342.
- [37] Mezence- Baquero, M. I., Boiron, P., *Current Microbiology* 1995, 31, 220-223.
- [38] Leisola, M. S., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., Fiechter, A., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 419-424.
- [39] Stewart, P., Kersten, P., Vanden Wymelenber, G. A., Gaskell, J., Cullen, D., *J. Bacteriol.* 1992, 174, 5036-5042.
- [40] Stewart, P., Cullen, D., *J. Bacteriol.* 1999, 181, 3427-3432.
- [41] Dubrac, S., Touati, D., *J. Bacteriol.* 2000, 182, 3802-3808.
- [42] Van Der Helm, D., Winkelmann, G., (Eds.), *Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi*, Marcel Dekker. Inc., New York. 1994, pp.38-98.
- [43] Andrews, N. C., Fleming, M. D., Gunshin, H., *Nutr. Ver.* 1999, 57, 114-123.
- [44] Yun, C.W., Tiedeman, J. S., Moore, R. E., Philpott, C. C., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 16354-16359.
- [45] Yun, C. W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein, D., Kaplan, J., Philpott, C. C., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 10709-10715.

Table 1: Estimated Molecular Weights and pIs of differential spots in 2-DE gels for *Phanerochaete chrysosporium*.

Protein	M _r (kDa)	pI	ID ^(b)	IS ^(c)	Protein	M _r (kDa)	pI	ID ^(b)	IS ^(c)
P1 ^(a)	16.5	4.8	+(d)	-(e)	P18	17	5.53	-	+
P2	16.7	6.0	+	-	P19	20.5	5.85	-	+
P3	19	5.87	+	-	P20	22	5.88	-	+
P4	26.3	5.85	+	-	P21	30	5.7	-	+
P5	35	6.0	+	-	P22	30	5.85	-	+
P6	35.5	4.6	+	-	P23	31	5.53	-	+
P7	35.5	5.86	+	-	P24	35	5.2	-	+
P8	35.7	5.84	+	-	P25	39	4.95	-	+
P9	35.9	5.84	+	-	P26	40	4.0	-	+
P10	38	6.0	+	-	P27	41	5.6	-	+
P11	41	4.65	+	-	P28	41	6.2	-	+
P12	48	4.65	+	-	P29	17	4.5	+	++
P13	16	5.65	++ ^(f)	+	P30	38	4.9	+	++
P14	20	6.0	++	+	P31	58	6.0	+	++
P15	20.5	5.86	++	+					
P16	28	5.86	++	+					
P17	42	5.85	++	+					

(a) P before protein numbers are for *P. chrysosporium*; (b) ID = iron-deficiency; (c) IS = iron-sufficiency; (d) the signs (+) are for presence; (e) the signs (-) are for absence; (f) the signs (++) are for increased intensity.

Table 2: Estimated Molecular Weights and pIs of differential spots in 2-DE gels for *Lentinula edodes*.

Protein	M _r (kDa)	pI	ID ^(b)	IS ^(c)
L1 ^(a)	18	5.5	+ ^(d)	- ^(e)
L2	18	6.0	+	-
L3	19	5.8	+	-
L4	19	5.9	+	-
L5	29	5.87	+	-
L6	38	5.9	+	-
L7	38.5	6.0	+	-
L8	40	5.9	+	-
L9	18	5.87	++ ^(f)	+
L10	20	5.7	++	+
L11	19.5	6.1	-	+
L12	28	5.65	-	+
L13	30	5.7	+	++
L14	26	7.0	+	++

(a) L before protein numbers are for *L. edodes*; (b)

ID = iron-deficiency; (c) IS = iron-sufficiency;

(d) the signs (+) are for presence; (e) the signs

(-) are for absence; (f) the signs (++) are for

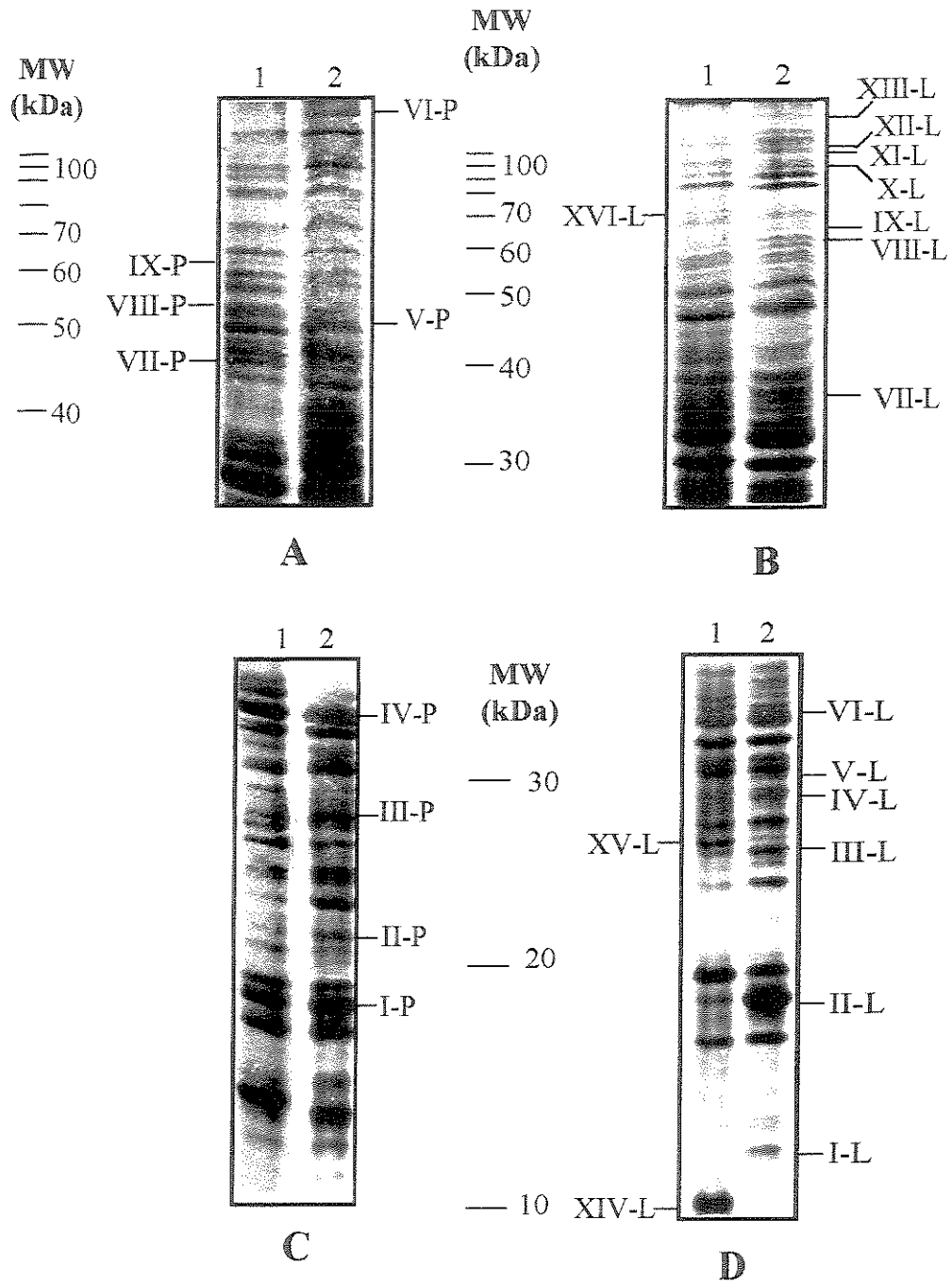
increased intensity.

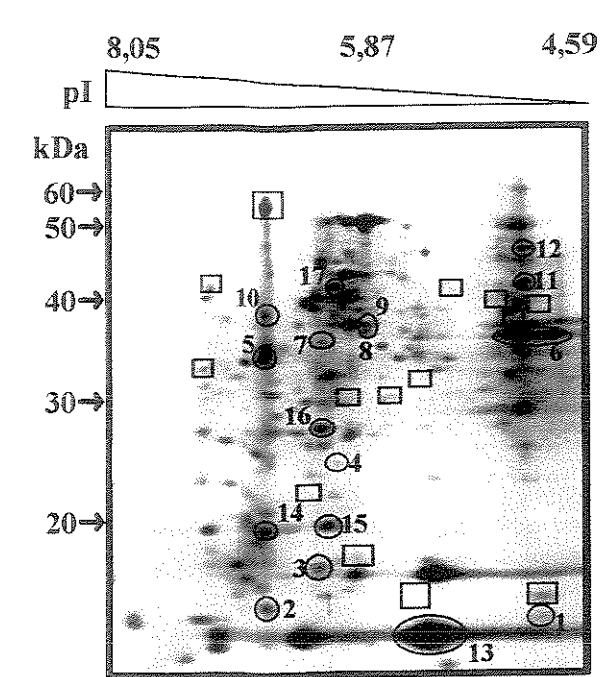
FIGURE LEGENDS

Figure 1: SDS-PAGE profiles of iron-responsive total proteins in the white-rot wood degrading fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Panels A and B show the resolution range from 40-200 kDa for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. Panels C and D show the resolution range from 10-40 kDa for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. Lane 1 on all panels are iron-sufficient mycelium extracts; lane 2, are iron-deficient mycelium extracts. Induced proteins in each differential growth condition are denoted with a trace and identified with a number beside them. Molecular weight standard (10 kDa Ladder, Gibco-BRL, Bethesda, USA) used to estimate the apparent MW of induced proteins is shown for the corresponding gel.

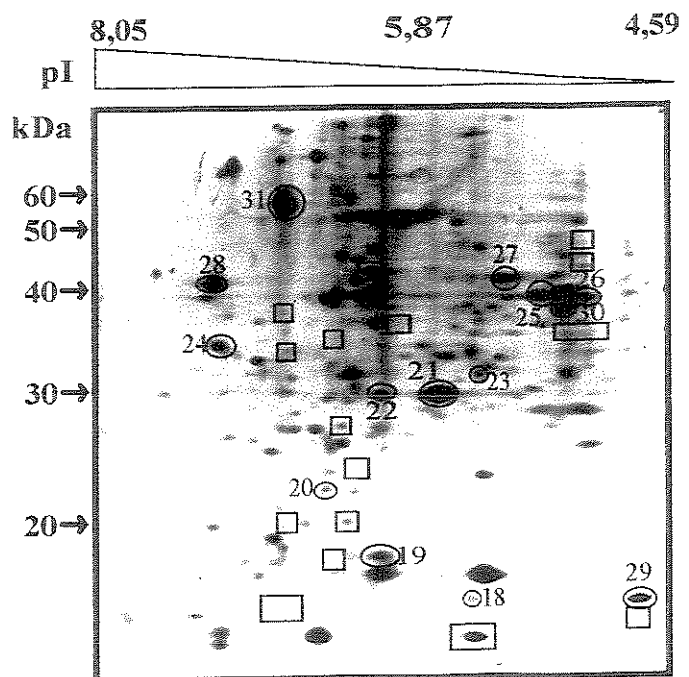
Figure 2: 2-DE analysis of iron-responsive total proteins in the white-rot wood degrading fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Iron-deficient mycelium extracts are shown on panels A and C for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. Iron-sufficient mycelium extracts are shown on panels B and D for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively. All proteins that had their synthesis affected by differential growth conditions were numbered and denoted by a circle. Squares represent either the absence or the diminished expression of the induced proteins on the opposite growth condition. The pH of the isoelectric focusing gel ranging from 4.6 to 8.0 is shown on the top of each gel. Molecular weight standard (10 kDa Ladder, Gibco-BRL, Bethesda, USA) used to estimate the apparent MW of induced proteins is shown on the left of the gels.

Figure 3: The effect of iron-deficient (lane 1) and iron-sufficient (lane 2) growth conditions on out-membrane protein synthesis. Panel A: *Phanerochaete chrysosporium*. Panel B: *Lentinula edodes*. Traces indicate the induced proteins and the numbers correspond to the estimated MW. Molecular weight standard (10 kDa Ladder, Gibco-BRL, Bethesda, USA) is shown on the left of the gels.

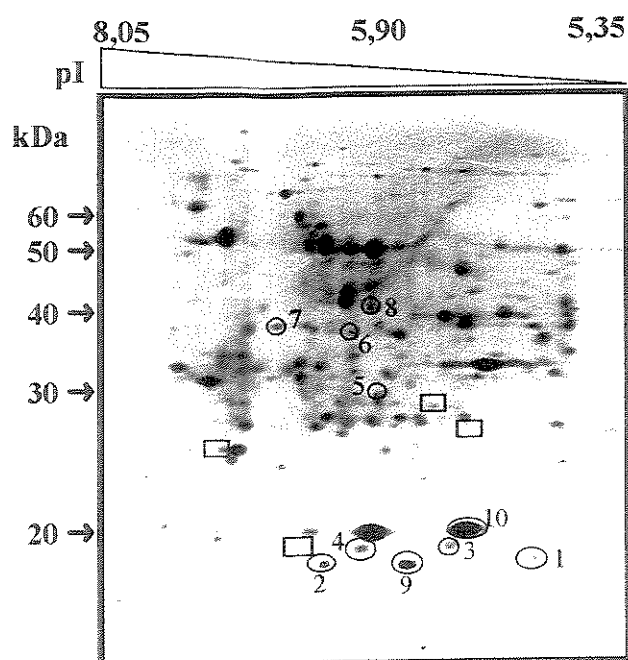




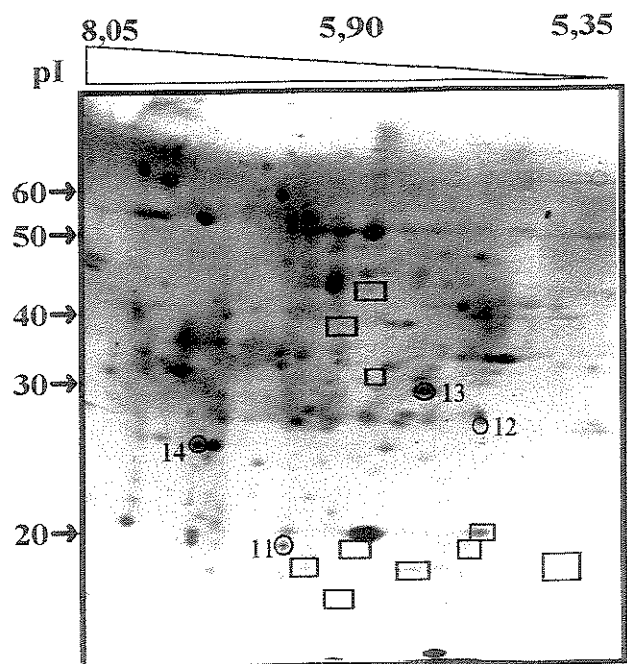
A



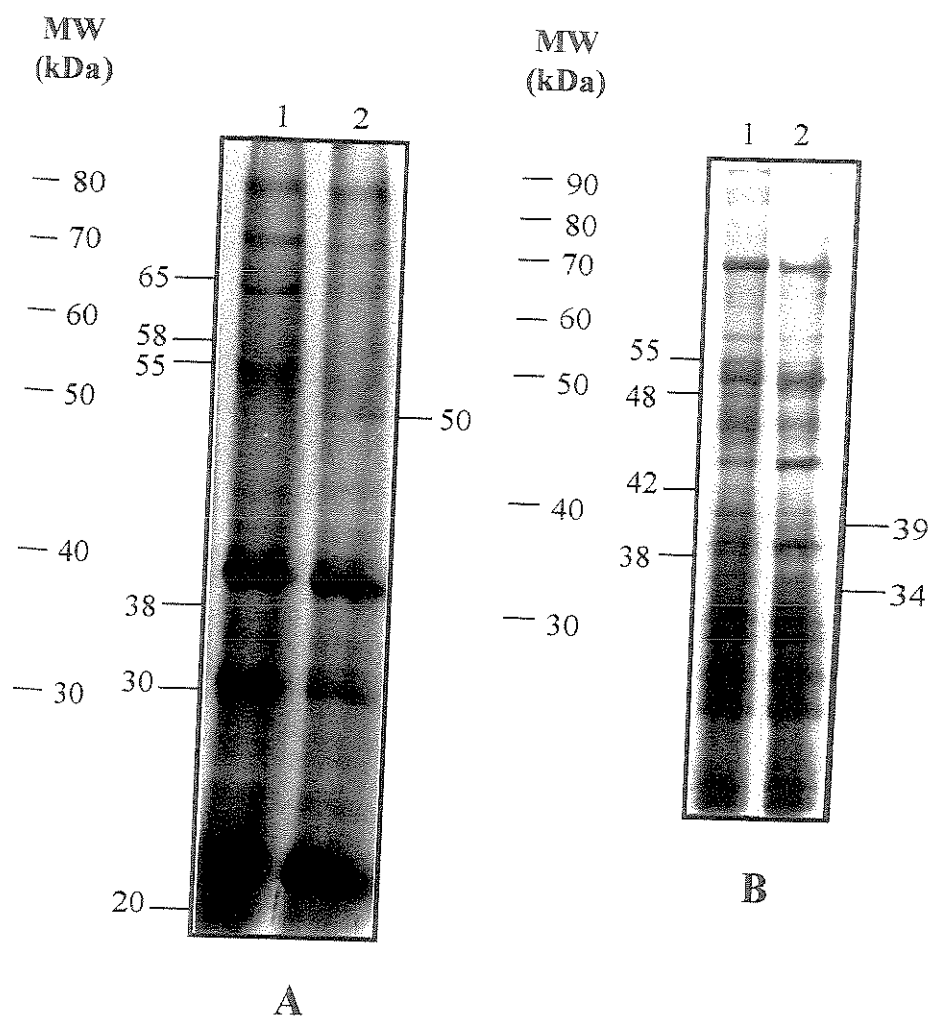
B



C



D



Segundo Artigo:

PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *Phanerochaete chrysosporium* E *Lentinula edodes* E PROTEÍNAS INDUZIDAS POR RESTRIÇÃO DE FERRO

A ser submetido para publicação na revista:

Applied Microbiology and Biotechnology

PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *Phanerochaete chrysosporium* E *Lentinula edodes* E PROTEÍNAS INDUZIDAS POR RESTRIÇÃO DE FERRO

Maria Lucila Hernandez-Macedo¹; Eliana Maria Assmann¹; Laura Maria Mariscal Ottoboni¹; André Ferraz²; Jaime Rodríguez³; Maricilda Palandi De Mello¹.

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil. ²Departamento de Biotecnologia (DEBIC), Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), Lorena, SP, Brasil. ³Laboratório de Recursos Renovables, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Correspondência para:

Maricilda Palandi de Mello, Ph.D. - CBMEG-UNICAMP - Caixa Postal 6010 - 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Phone # (55-19) 3788-1146. Fax # (55-19) 3788-1089. e-mail: mmello@obelix.unicamp.br

Palavras chaves: sideróforos, fungos ligninolíticos, proteínas reguladas por ferro.

RESUMO

Considera-se que a biodegradação da lignina seja um processo enzimático promovido por enzimas oxidativas. No entanto, mediadores de baixa massa molecular participam provavelmente para propiciar o aumento dos poros na parede celular facilitando a penetração das enzimas na matrix da madeira. Portanto, agentes complexantes de baixa massa molecular produzidos por fungos, incluindo sideróforos, são considerados como mediadores da biodegradação da madeira. Um método bastante conhecido e muito empregado para a detecção de sideróforos em vários microorganismos é o ensaio com o reagente cromo azuro I S (CAS). Neste trabalho empregamos este método para detecção da produção de sideróforos em meio com restrição de ferro e, repressão, em meio com adição de ferro, pelos fungos degradadores de madeira *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*, ambas espécies de degradação branca. A reação CAS-positiva foi somente observada nas culturas em meio sólido com restrição de ferro. Por outro lado, observou-se a indução de proteínas por carência de ferro tanto nas culturas em meio sólido como nas do meio líquido.

INTRODUÇÃO

Os fungos que degradam madeira são basicamente divididos em três categorias principais definidas de acordo com a característica dada à madeira durante o processo de degradação. Os de degradação branda (“soft-rot”), que agrupam espécies pertencentes às classes Ascomycotina e Deuteromycotina, recebem essa denominação por produzirem um amolecimento nas camadas superficiais da parede da célula vegetal (Kirk & Farrel, 1987; Blanchete, 1991). Os fungos de degradação parda (“brown-rot”) são da classe Basidiomycotina e degradam principalmente os polissacarídeos da parede celular com limitada degradação da lignina (Crowling, 1961). Finalmente, os fungos de degradação branca (“white-rot”) que pertencem às classes Basidiomycotina e Ascomycotina os quais apresentam uma grande capacidade de degradar todos os componentes da madeira, inclusive a lignina (Ander & Eriksson, 1977) através da produção de enzimas e/ou compostos não enzimáticos que oxidam compostos fenólicos (Leonowicz *et al.*, 1999).

A degradação biológica da madeira envolve enzimas específicas que são excretadas pelos microorganismos e que reagem com os componentes da parede celular das fibras vegetais. A lignina é um biopolímero aromático complexo, um componente abundante e essencial no tecido da madeira ao qual se deve sua rigidez. É extremamente resistente à degradação pela maioria dos microorganismos, no entanto uma estreita gama de organismos, os fungos de degradação branca, mostram-se eficientes na sua decomposição (Hammel, 1997; Leonowicz *et al.*, 1999). A produção de compostos quelantes de ferro por algumas espécies dessa classe de fungos e a capacidade destes de oxidar compostos fenólicos, lignina e clorolignina têm sido descritas por vários grupos (Tanaka *et al.*, 1999; Parra *et al.*, 1998 a, b).

O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre e é essencial para o

metabolismo dos seres vivos, porém sua disponibilidade é baixa em meios aeróbicos naturais, como por exemplo na madeira, por se encontrar na forma Fe^{+3} que é altamente insolúvel (Bagg & Neilands, 1987a, b). Em fungos degradadores de madeira, participa como componente do grupo heme de enzimas oxidativas extracelulares envolvidas no processo de degradação (Jellison *et al.*, 1991). Para seqüestrar e tornar o Fe^{+3} solúvel, muitos microrganismos apresentam um eficiente sistema de captação do metal através da produção de compostos quelantes de baixa massa molecular (< 1000 Da) com alta afinidade para o íon férrico denominados sideróforos (Hider, 1984; Neilands, 1984, 1995). Quimicamente, os sideróforos podem ser classificados em hidroxamatos, produzidos por fungos e bactérias e, fenolatos (ou catecolatos) que são encontrados principalmente em bactérias (Neilands, 1993), mas também são encontrados em fungos que degradam madeira (Enoki *et al.*, 1989; Goodell *et al.*, 1997; Paszczynski *et al.*, 1999). De uma maneira geral, para a captação do ferro, este é quelado por um complexo invariável e termodinamicamente estável possuindo seis átomos de oxigênio que fazem parte da estrutura química dos diversos tipos de sideróforos passando a formar uma associação denominada complexo ferro-sideróforo (Neilands, 1995). Propõe-se que compostos de baixa massa molecular, principalmente aqueles com características quelantes de metais especialmente os de ferro (sideróforos) produzidos por fungos estejam envolvidos na degradação de madeira (Tanaka *et al.*, 1996, 1999; Goodell *et al.*, 1997; Paszczynski *et al.*, 1999). Estes compostos poderiam atuar diretamente no início do processo de modificação da lignina, para que as enzimas lignino-celulolíticas possam penetrar na parede da madeira (Murmanis *et al.* 1988; Evans *et al.*, 1994; Flournoy *et al.*, 1991, 1993). Estudos nesta área ainda estão sendo realizados, pois ainda não existem resultados contundentes que expliquem a participação direta dos sideróforos na biodecomposição da madeira, porém sabe-se que estes compostos de baixa massa molecular são sintetizados por vários fungos degradadores de

madeira (Fekete *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1997; Milagres *et al.*, 1999; Machuca *et al.*, 1999; Paszczynski *et al.*, 1999) e que são capazes de oxidar lignina e clorolignina (Parra *et al.*, 1998 a, b).

O método mais comum utilizado para a detecção de produção de sideróforos é o método descrito por Schwyn & Neilands (1987). O método se baseia no deslocamento do ferro complexado ao reagente cromo azurol S (CAS) pelo sideróforo produzido por microrganismos, que normalmente apresentam uma maior constante de afinidade por ferro (III). A remoção do ferro pelo sideróforo é acompanhada por uma mudança de cor do reagente CAS, que é azul quando quelado ao ferro e muda para alaranjado quando livre. O método foi originalmente descrito para ser aplicado no líquido de cultura após o crescimento dos microrganismos ou, alternativamente o reagente CAS poderia ser incorporado ao meio de cultura para o crescimento em placas (Schwyn & Neilands, 1987). Porém, nesse último caso o detergente brometo de hexadeciltrimetil-amônio (HDTMA), que é usado na preparação do meio CAS, pode ser tóxico para alguns microrganismos (Schwyn & Neilands, 1987). O método foi modificado por Milagres *et al.*, (1999) e mostrou-se mais adequado para a detecção de sideróforos produzidos por fungos degradadores de madeira em placas usando o reagente CAS.

Neste trabalho, foram estudadas duas espécies de fungos de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*, com o intuito de detectar a produção e a repressão de sideróforos com concomitante expressão de forma diferencial de proteínas de acordo com a disponibilidade de ferro no meio de cultivo, utilizando o ensaio CAS para micélios crescidos nos meios sólido e líquido, na presença e na ausência de ferro.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Duas espécies de fungos degradadores de madeira foram utilizados neste trabalho: *Phanerochaete chrysosporium* BKM-1767 e *Lentinula edodes* UEC-2019. Estas linhagens foram obtidas da coleção do laboratório do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena. As culturas foram mantidas em 2% de extrato de malte (MEA) a 28°C e estocado a 5°C.

Curvas de crescimento e reação CAS em meio líquido

Os fungos foram crescidos em duas situações diferenciais: a) com disponibilidade de ferro no meio para repressão da produção de sideróforos e, b) com concentração de ferro reduzido para indução dos sideróforos. Para estabelecer uma condição diferencial de crescimento foi necessário eliminar traços de ferro (III) de toda vidraria utilizada e padronizar as condições de cultura tendo como única variável a quantidade de íons férricos adicionados à solução de cultura para repressão de sideróforos. Assim, todo material de vidro utilizado nas culturas foi tratado deixando-se pelo menos 48 horas imerso em uma solução de HCl 1,2 M, em seguida lavado em água bidestilada em abundância, logo após foi autoclavado com uma solução de EDTA 0,1% e, finalmente, foi lavado novamente com água bidestilada em abundância.

Os fungos foram crescidos em meio 2% de extrato de malte líquido, ou no mesmo meio contendo 90 µM de FeCl₃. As culturas foram incubadas a 27°C sob agitação em um agitador

orbital (Digital Refrigerated Incubator Shaker, Model C25-KC, New Brunswick) a 120 rpm. Para se proceder a inoculação destas culturas foi preparada uma suspensão, a partir de um pré-inóculo, para cada uma das espécies de fungo, tendo-se colocado em 25 ml do meio de extrato de malte uma quantidade de micélio equivalente a um quarto do contido na placa. Agitou-se a suspensão para se obter o máximo de homogeneidade. Em seguida, inoculou-se 1 ml desta suspensão em Erlenmeyers contendo 25 ml de meio, num total de 12 Erlenmeyers por espécie. Para a obtenção das curvas de crescimento os micélios foram coletados por filtração e os pesos secos foram medidos (em triplicatas) a cada 3 dias durante o período de 12 dias. O meio de cultivo, após a filtração dos micélios, foi coletado para a reação com o corante CAS. Uma alíquota de 0,5 mL deste meio foi adicionada a 0,5 mL do reagente CAS. Após 1 hora de reação, a absorbância foi medida a 630 nm. O reagente CAS foi preparado utilizando água destilada e desionizada segundo Schwyn & Neilands (1987).

Crescimento em placas

Para o crescimento de micélios em placas, utilizou-se o método CAS de detecção de sideróforo modificado por Milagres *et al.*, (1999). Foram distribuídos em placas de Petri o meio ágar extrato de malte a 2% (MEA) ou o mesmo meio contendo 90 μM FeCl_3 . Após a solidificação cortou-se a metade substituindo-se pelo meio ágar-CAS preparado adicionando-se 10 mL de uma solução contendo 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 mM HCl a 60,5 mg do reagente CAS dissolvido em 50 mL de água destilada e desionizada. A esta mistura foram adicionados, sob agitação, 72,9 mg de HDTMA dissolvidos em 40 ml água destilada e desionizada. A solução azul escura obtida foi autoclavada a 121°C por 15 min. Ao mesmo tempo foi autoclavada uma

mistura de 750 mL de água, 15 g de agar, 30,24 g de Pipes, e 2 g da solução de NaOH 50% (w/w) para obter o pH 6.8. Após autoclavadas as duas soluções foram misturadas e a mistura, distribuída nas metades das placas de Petri.

No centro do meio MEA ou MEA contendo 90 μ M FeCl₃, foram inoculados os fungos *P. chrysosporium*, e *L. edodes* a partir das culturas estoques e as placas foram incubadas a 28°C. A reação CAS-positiva ou CAS-negativa foi verificada pela observação da mudança ou não da cor azul do reagente.

Extração de proteínas totais

Proteínas totais foram extraídas dos micélios de *P. chrysosporium* e *L. edodes* crescidos em meios tanto líquido como sólido na ausência e presença de ferro no final do cultivo. Após a coleta dos micélios, estes foram macerados em nitrogênio líquido, e colocados em tubos Eppendorf de 2 mL para iniciar o isolamento das proteínas segundo De Mot & Vanderleyden (1989) e adaptado para fungos. Em cada tubo Eppendorf contendo os micélios macerados foi adicionado um volume de tampão de extração (0,7 M sacarose, 0,5 M Tris, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl, e 40 mM dithiothreitol) equivalente ao peso dos micélios. Esta mistura foi homogeneizada por 10 min em tubo de vidro para homogeneização de tecido e incubados em agitador Vortex-Gen2 por 15 min e em seguida centrifugados a 9.000xg por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado em tubos Eppendorf 2 mL e adicionado igual volume de fenol pH 8,0 (Sigma Chem. Co.) e incubados em agitação por 15 min novamente. Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado igual volume de tampão de extração, este

procedimento se repetiu por duas vezes. Finalmente, ao sobrenadante adicionou-se acetato de amônio 1 M dissolvido em metanol em quantidade equivalente a cinco vezes o volume. Para a precipitação das proteínas a mistura foi colocada a -20°C onde permaneceu durante a noite. Para a obtenção das proteínas, os tubos foram centrifugados a $9.000\times g$. Por último, os “pellets” obtidos foram lavados e centrifugados em acetona 80 % por duas vezes. As proteínas foram ressuspensas em tampão de lise contendo 9,8 M uréia, 2% (v/v) Nonidet P-40, 100mM dithiothreitol. As amostras foram estocadas a -70°C .

As proteínas foram quantificadas pelo método Bradford (Bradford, 1976). Aproximadamente 40 μg de amostras de proteínas totais foram submetidas para separação em gel SDS-PAGE a 15% de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram corados com prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho procurou-se adaptar o método diferencial de cultura de fungos que degradam madeira descrito por Fekete *et al.* (1989) para condições de expressão e repressão de sideróforos nos fungos *P. chrysosporium* e *L. edodes* para verificarmos a concomitante produção de proteínas específicas para cada condição de crescimento. Assim sendo utilizamos o FeCl_3 em uma concentração de 90 μM determinada pelos autores como a concentração mínima necessária para que a inibição de sideróforo atinja o “plateau” máximo.

Além disso, alguns parâmetros foram considerados para proceder a padronização da cultura dos micélios, tais como: tratamento da vidraria e do meio para eliminação de traços de ferro; rendimento do crescimento, pois necessitaríamos de uma quantidade grande de micélios para extração de proteínas; e, tempo de cultivo (não muito longo). As curvas de crescimento obtidas em meio líquido de extrato de malte (Fig. 1) para as duas espécies demonstraram que em 11 dias de cultivo o crescimento dos micélios atingia o “plateau”. Porém, dentro deste período, no meio líquido não se verificou a produção de sideróforos, medida com o reagente CAS (Fig. 1). Por outro lado, quando o cultivo foi realizado em meio extrato de malte - agar, seguindo método descrito por Schwyn & Neilands (1987) e modificado por Milagres *et al.*, (1999) para detecção de sideróforos em placas, verificou-se a mudança de cor do reagente CAS nas placas com restrição de ferro tanto para o *P. chrysosporium* como para o *L. edodes* dentro dos 11 dias de cultivo (Fig. 2). Nas culturas em placas, para os dois fungos, em 4 dias observou-se completo crescimento dos micélios sobre a metade do meio extrato de malte-agar com ou sem ferro, indicando que as condições diferenciais não influenciaram no crescimento em nenhuma das espécies. A partir do quarto dia de cultivo foi também verificado o início da mudança gradativa de cor do CAS de azul para vermelho púrpura em *P. chrysosporium* nas placas sem

ferro (Fig. 2A). No 11º dia de cultivo, a metade azul da placa contendo o reagente CAS já havia mudado totalmente de cor. A mudança de cor das placas com extrato de malte-ágar sem ferro que continham *L. edodes* iniciou-se também a partir do 4º dia (Fig. 2C), porém o azul foi lentamente modificado para um rosa claro, bastante diferente do observado nas placas de *P. chrysosporium*. A diferença de cor entre as duas espécies deve-se provavelmente a quelantes estruturalmente diferentes que podem estar sendo produzidos em cada espécie. A mudança de cor para os dois fungos foi totalmente reprimida pela presença de 90 µM FeCl₃ no meio extrato de malte-ágar (Fig. 2B e D).

Portanto, o meio líquido de cultivo não se mostrou adequado para se medir a produção de sideróforos após 11 dias de crescimento. O estudos anteriores de detecção de sideróforos produzidos por fungos de degradação parda e branca mostraram reação positiva para CAS em meio líquido somente após de 4 semanas de cultura (Fekete *et al.*, 1989; Jellison *et al.*, 1991). Rodríguez *et al.* (1997) verificaram a produção máxima de sideróforos para os fungos de degradação branca *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* crescidos em meio malte-agar-CAS e em madeira após um período de 90 dias. Assim, durante os primeiros 11 dias de cultivo, provavelmente, a quantidade de sideróforo produzida frente às condições de restrição de ferro não foi suficiente para a reação positiva com CAS em meio líquido. O método descrito por Milagres *et al.* (1999) mostrou-se mais sensível para a detecção de reação positiva com CAS em fungos que degradam madeira dentro do curto período de 11 dias. Sua eficiência provavelmente se deve ao fato de seu princípio envolver o crescimento de micélios em meio sólido, sendo preparado com metade da placa contendo meio extrato de malte/agar e a outra metade com agar/CAS. Isso faz com que à medida que a cultura atinge as proximidades do meio da placa já se observe a mudança de cor no meio contendo o reagente

CAS. O crescimento em meio sólido permite a reação localizada com o CAS sem que o quelante produzido se dilua no meio, há apenas a difusão do quelante no meio sólido.

A análise de proteínas celulares dos micélios crescidos em meio líquido para os dois fungos nos meios diferenciais com e sem ferro, foi efetuada por Hernandez-Macedo *et al.* (2001). Em condições de restrição de ferro, *P. chrysosporium* apresentou seis proteínas que foram induzidas ou tiveram o nível de expressão aumentado (M_r 18, 21, 27, 37, 48, 61 e > 120), enquanto que para o *L. edodes*, 13 proteínas com expressão diferencial foram observadas (M_r 13, 18, 24, 29, 30, 37, 39, 61, 68, 90, 100, 105 e > 120). Os géis SDS-PAGE obtidos com proteínas celulares de micélios crescidos em placas mostraram padrões de proteínas induzidas semelhantes aos obtidos com micélios crescidos em meio líquido. Para *P. chrysosporium*, foram observadas proteínas diferenciais de 21 kDa, 27 kDa, 37 kDa, 48 kDa e 61 kDa (Fig. 3A). Para *L. edodes*, foram observadas as proteínas 13 kDa, 18 kDa, 22 kDa, 24 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 37 kDa, 61 kDa, 68 kDa e 90 kDa crescidos em meio MEA sem ferro (Fig. 3B e C). O menor número de proteínas observado para os micélios do meio sólido pode ser devido a uma diferença na resolução dos géis. Por outro lado, observou-se um polipeptídeo de 20 kDa não visualizado no extrato de micélio crescido em meio líquido.

Os resultados apresentados neste trabalho comprovam a formação de sideróforos na ausência de ferro em meio sólido com a concomitante expressão de proteínas induzidas para esta condição de crescimento em micélios de *P. chrysosporium* e *L. edodes*, no período de 11 dias. Portanto, as proteínas que foram induzidas por carência de ferro no meio de cultivo podem estar relacionadas com biossíntese de sideróforos e transporte dos complexos ferro-sideróforos nesses fungos. A proteína de 61 kDa por exemplo, que é induzida nas duas espécies (Fig. 3A e B), pode corresponder à proteína L-Ornitina N5-oxigenase que em fungos é responsável pela catálise do primeiro passo de biossíntese de sideróforos e apresenta peso

molecular de 62 kDa (Leong & Wilkemann, 1998). Nos experimentos com micélios crescidos em meio líquido, foram observadas proteínas induzidas em meio contendo ferro o que indica que existe uma regulação positiva pelo metal, no entanto essas proteínas não foram observadas nos extratos dos micélios cultivados em meio sólido. Há a possibilidade de que algumas proteínas sejam positivamente reguladas pelo metal para a captação de ferro sem envolver os sideróforos. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo existe um mecanismo de baixa afinidade para captação de ferro, onde o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} por ferro-redutases de membrana plasmática (FRE1 e FRE2) e em seguida é transportado para o interior da célula pela proteína FET4, cujo peso molecular estimado é de 63 kDa (Dix *et al.*, 1997). Outra possibilidade é que estas proteínas reguladas positivamente por ferro sejam sintetizadas como mecanismo de defesa da célula aos radicais livres produzidos nos processos oxidativos mediados por ferro. Esta possibilidade foi demonstrada em *E. coli*, onde a proteína FUR (ferric uptake regulation), que também atua como repressora da síntese de sideróforos, exerce regulação positiva sobre a expressão da enzima ferro superóxido dismutase que atua sobre o superóxido ânion produzido nos processos oxidativos (Dubrac & Touati, 2000). Proteínas homólogas à FUR foram encontradas em outros microrganismos inclusive em fungos filamentosos. As proteínas identificadas neste estudo devem participar em mecanismos similares de captação de ferro e de defesa celular nos fungos degradadores de madeira *P. chrysosporium* e *L. edodes*.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brasil, pelo apoio financeiro (auxílio individual n°. 98/00548-4 para MPdeM e as bolsas de Mestrado e Doutorado (processo n°. 98/04519-9 para MLHM e processo n°. 97/14314-2 para EMA). Nós gostaríamos de agradecer especialmente à Profa. Dra. Adriane Milagres (DEBIC-FAENQUIL, Lorena, SP, Brasil) pelo auxílio no cultivo em placas. À Maria Madalena Vasconcelos Rosa e à equipe técnica do DEBIC-FAENQUIL, Lorena, SP, Brasil, nossos sinceros agradecimentos pelo valioso apoio técnico.

REFERÊNCIAS

- ANDER P, ERIKSSON KE. "Selective degradation of wood components by white-rot fungi". *Physiol. Plant.* 41: 239-248 (1977).
- BAGG A, NEILANDS JB. "Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation". *Microbiol. Ver.* 51: 509-518 (1987a).
- BAGG A, NEILANDS JB. "Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II). as a cofactor to bind the operator of na iron transport operon in *Escherichia coli*". *Biochemistry* 26: 5471-5477 (1987b).
- BLANCHETE RA. "Delignification by wood-decay fungi". *Annu. Ver. Phytopathol.* 29: 381-398 (1991).
- BLANCHETTE R A. " Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl.1): S999-S1010 (1995).
- BRADFORD, M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein dye utilizing". *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).
- CROWLING EB. "Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi". *Tech Bull* 1258. USDA Washington, DC, p.79.
- DE MOT R, VANDERLEYDEN J. "Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species". *Can. J. Microbiol.* 35: 960-967 (1989).
- DIX D, BRIDGHAM J, BRODERIUS M, EIDE D. "Characterization of the FET4 protein of yeast: evidence for a direct role in the transport of iron". *J. Biol. Chem.* 272: 11770-11777 (1997).

- DUBRAC S, TOUATI D. "Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter". *J. Bacteriol.* 182: 3802-3808 (2000).
- ENOKI A, TANAKA H, FUSE G. "Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂-producing one-electron oxidases in brown-rot fungi". *Wood. Sci. Technol.* 23: 1-12 (1989).
- EVANS CS, DUTTON MV, GULLPN F, VENESS RG. "Enzymes and small molecular agents involved with lignocellulose degradation" *FEMS Microbiol.* 13: 235-240 (1994).
- FEKETE FA, CHANDHOKE V, JELLISON J. "Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes". *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2720-2722 (1989).
- FLOURNOY DS, PAUL JÁ, KIRK TK, HIGHLEY TL. "Changes in the size and volume of pores in sweetgum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium* burts" *Holzforschung* 47: 297-301 (1993).
- FLOURNOY DS, KIRK TK, HIGHLEY T. "Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume". *Holzforsch* 45: 383-388 (1991).
- GOODELL B, JELLISON J, LUI J, DANIEL G, PASZCYNski A, FEKETE F, KRISHNAMURTHY S, JUN L, XU G. "Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood". *J. Biotechnol.* 53: 133-162 (1997).
- HAMMEL KE (1997), Fungal degradations of lignin, In: CABS INTERNATIONAL Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Eds, . adish and k. e. Giller. pp 33-45.
- HERNÁNDEZ-MACEDO ML, FERRAZ A, RODRÍGUEZ J, OTTOBONI LMM, DE MELLO MP. Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: differential analysis by sds-page and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles, submetido.

- HIDER, RC. "Siderophore mediated absorption of iron". *Struct. Bond.* 58: 25-87 (1984).
- JELLISON J, CHANDHOKE V, GOODELL B, FEKETE F A. "The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabum*". *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 805- 809 (1991).
- KIRK, TK, FARRELL, RL. "Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin". *Annual Rev. Microbiol.* 41: 465-505 (1987).
- LAEMMLI V K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 247: 37 (1970).
- LEONG S. A., WINKELMANN G. "Molecular Biology of Iron Transport in Fungi". *Met. Ions Bol. Syst.* 35: 147-186 (1998).
- LEONOWICZ A, MATUSZEWSKA A, LUTEREC J, ZIEGENHAGEN D, WASILEWSKA-WOJTAS M, CHOMNS, HOFRICHTER M, ROGALSKI J. "Biodegradation of lignin white rot fungi" *Fungal Gen. Biol.* 27: 175-185 (1999).
- MACHUCA A, HIROSHI A, DURAN N. "Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256: 20-26 (1999).
- MILAGRES A M AF, MACHUCA A, NAPOLEAO D. "Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay". *J. Microbiol. Meth.* 37: 1-6 (1999).
- MURMANIS L, HIGHLEY TL, PALMER JG. "The action of isolated brown-rot cell-free culture filtrate, H_2O_2 - Fe^{++} , and the combination of both on wood". *Wood Sci. Technol.* 22: 59-66 (1988).
- NEILANDS JB. "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds". *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726 (1995).

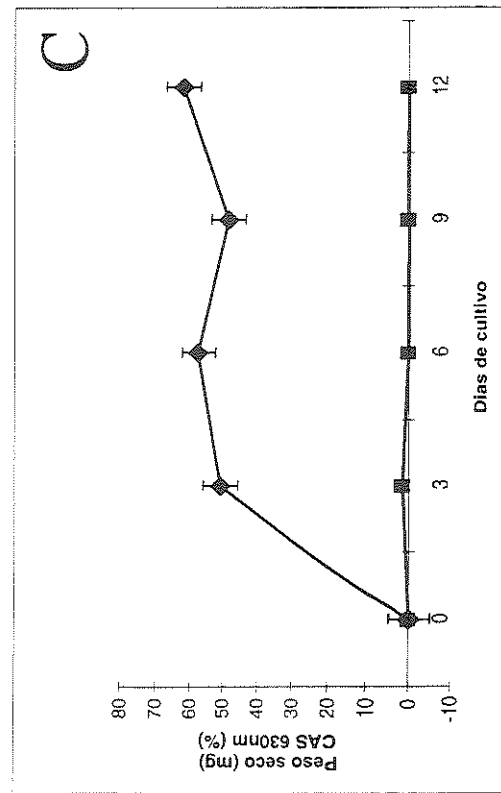
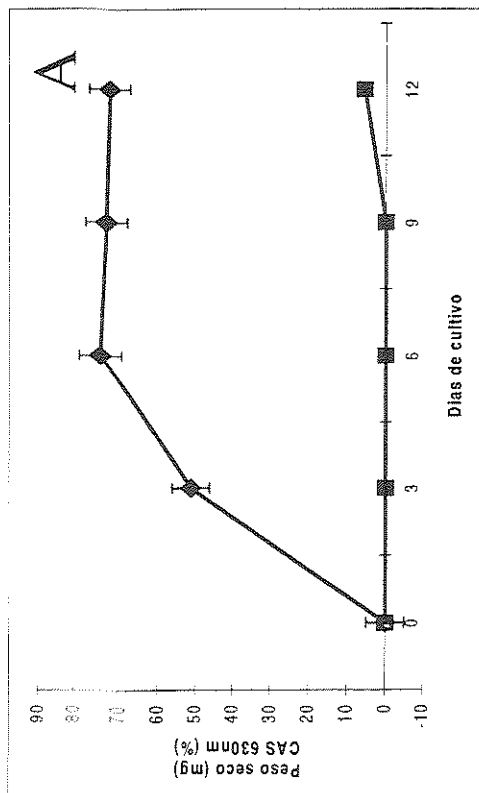
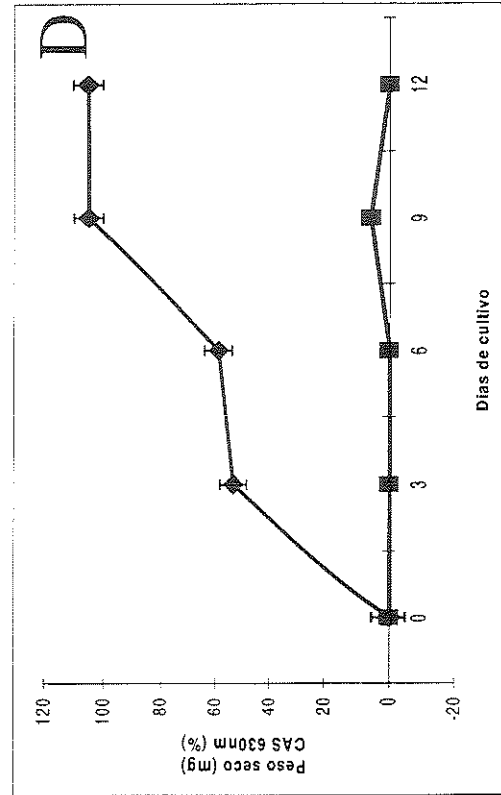
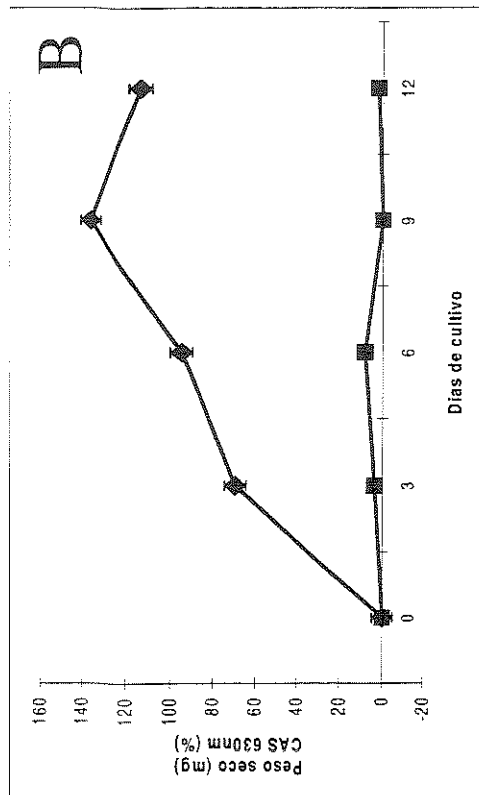
- NEILANDS JB. "Siderophores". *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 1-3 (1993).
- NEILANDS JB. "Methodology of siderophore". *Struct. Bond.* 58: 1-24 (1984).
- PARRA C, RODRIGUEZ J, BAEZA J, FREER J, DURAN N. "Iron-binding catechols oxidating lignin and chlorolignin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 399-402 (1998a).
- PARRA C, SANTIAGO MF, RODRIGUEZ J, DURAN N. "Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 719-722 (1998b).
- PASZCZYNSKI A, CRAWFORD R, FUNK D, GOODELL B. "De novo synthesis of brown rot 4,5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the fungus *gloeophyllum trabeum*". *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 674-679 (1999).
- RODRÍGUEZ J, OSES R, PARRA C, FREER J, BAEZA J. "Siderophore Production by Lignin Degrading Fungi". *Proceedings of the Symposium of Chemistry of Lignins and Other Wood Components (Curitiba, Brazil)* 5: 601-604 (1997).
- SCHWYN B, NEILANDS JB. "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores". *Anal. Biochem.* 160: 46-56, 1987.
- TANAKA H, ITAKURA S, HIRANO T, ENOKI A. "An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron". *Holzforschung* 50: 541-548 (1996).
- TANAKA H, ITAKURA S, ENOKI A. "Hidroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*" *J. Biotech.* 75: 57-70 (1999).

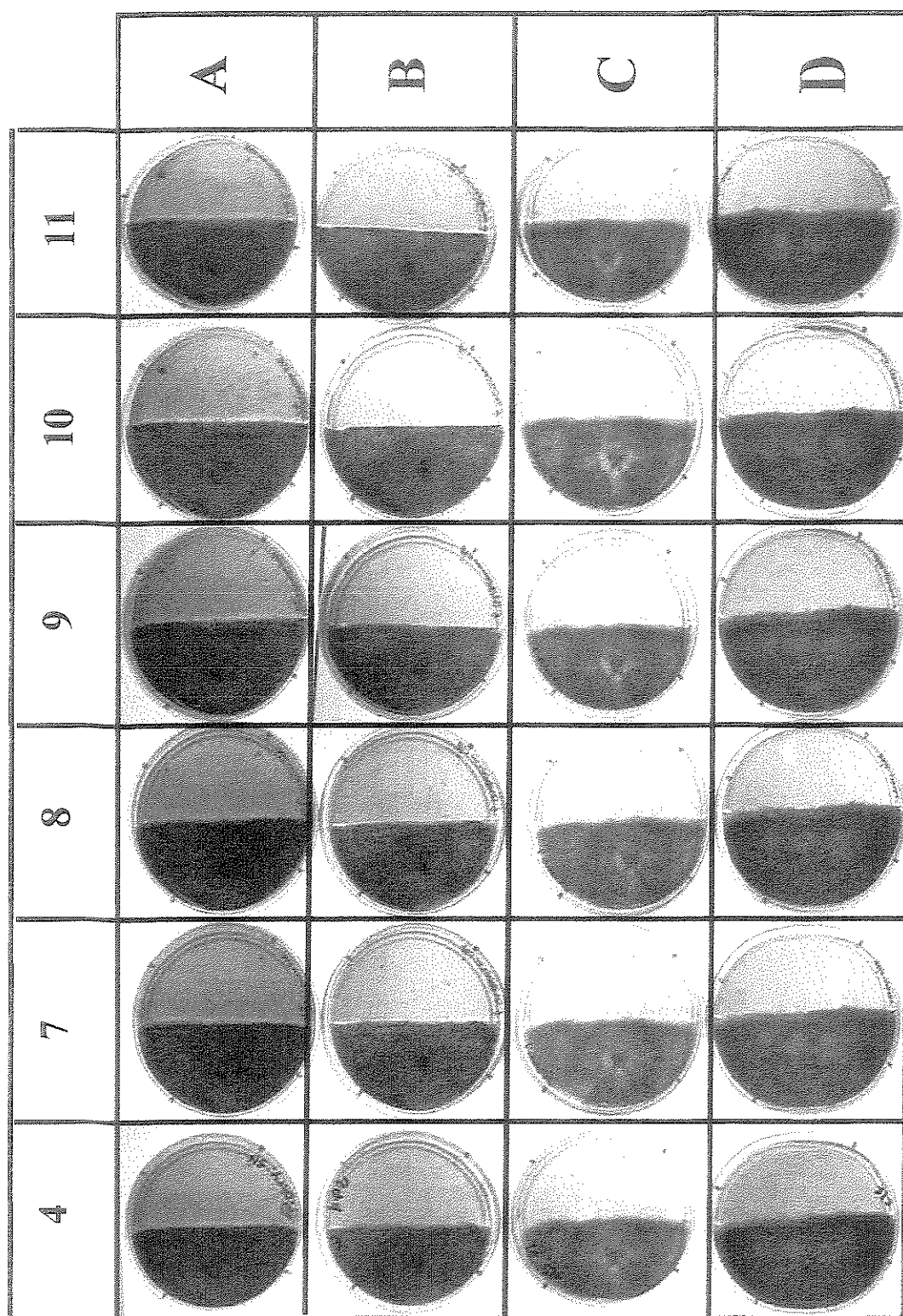
LEGENDAS DAS FIGURAS

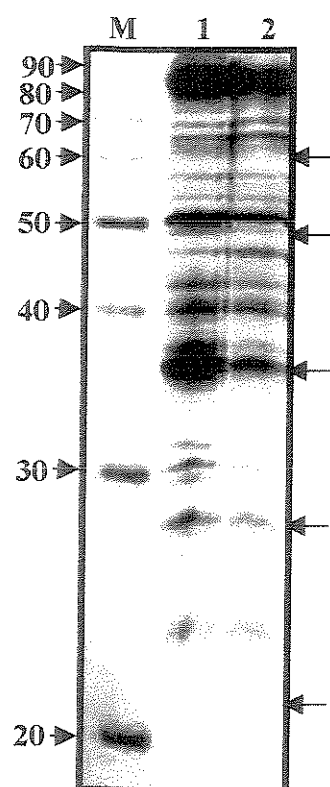
Figura 1. Curvas contendo os resultados: de crescimento medido em peso seco de micélio (◆); de produção de sideróforos, medida em porcentagem (%) de reação do líquido de cultivo com o reagente cromo azurol S CAS (■). (A) Curvas para o fungo *P. chrysosporium* cultivado em meio extrato de malte líquido com adição de FeCl_3 90 μM e (B) e sem adição FeCl_3 ao meio. (C) Curvas para o fungo *L. edodes* cultivado em meio extrato de malte líquido com adição de FeCl_3 90 μM e (D) e sem adição FeCl_3 ao meio.

Figura 2: Produção de sideróforos em placas usando o método de Milagres *et al.* (1999). Placas de *Phanerochaete chrysosporium* (A e B) e *Lentinula edodes* (C e D) em meio extrato de malte/agar e agar/CAS em cada metade da placa. (A) e (C) Placas com deficiência de ferro. Às metades extrato de malte/agar da série de placas mostradas em (B) e (D) foi adicionado FeCl_3 numa concentração de 90 μM . Os números acima das placas indicam o dias de cultivo. A produção gradativa de sideróforos pode ser observada através da mudança de cor do meio agar/CAS de azul para rosa intenso no caso de *P. chrysosporium* (A) e para um rosa claro, no caso de *L. edodes*.

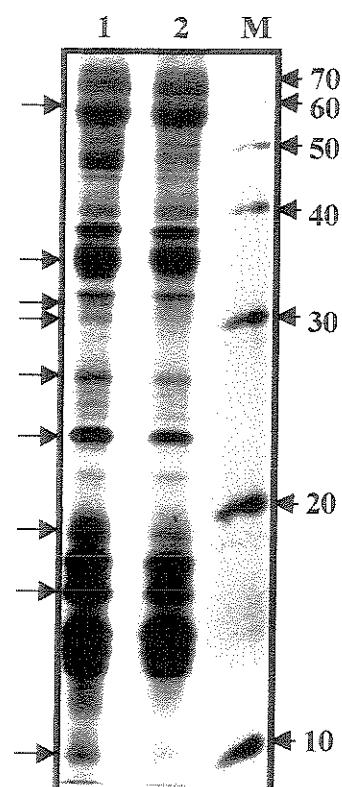
Figure 3: Efeito de deficiência (1) e suficiência (2) de ferro no padrão SDS-PAGE de proteínas totais de micélio crescido em meio sólido MEA. Painel A: *Phanerochaete chrysosporium*. Painéis B e C: *Lentinula edodes*. As SETAS indicam proteínas induzidas. Os números ao lado dos géis são valores em kDa indicando as bandas do padrão de peso molecular M (10 kDa Ladder, Gibco-BRL, Bethesda, USA).



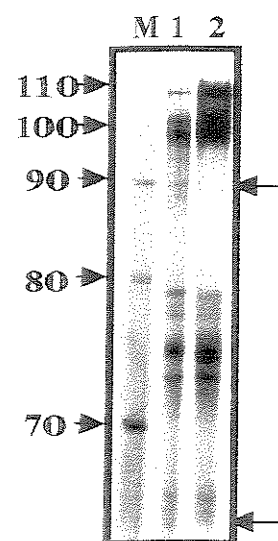




A



B



C

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN Z, ZHAO Q, MCEVOY J, YUAN WM, MARKLEY JL, LEONG AS, "The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of sid1 in *Ustilago maydis*" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 5882-5887 (1997 a).
- AN Z, MEI B, YUAN WM, LEONG SA. "The distal GATA sequences of the sid1 promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor " *EMBO J.* 16, 1742-1750 (1997 b).
- ANDER P, ERIKSSON KE, "Selective degradation of wood components by white-rot fungi". *Physiol Plant* 41: 239-248 (1977).
- ANDREWS N, FLEMING M, GUNSHIN H "Iron transport across biologic membranes" *Nutri. Rev.* 57: 114-123 (1999).
- ANKE H, KINN J, BERGQUIST K, STENER O, "Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*". *Biol Met* 4: 176-180 (1991).
- ASKWITH C, KAPLAN J, "An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* 272: 401-405 (1997).
- BAGG A, NEILANDS JB, "Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation". *Microbiol Rev* 51: 509-518 (1987 a).
- BAGG A, NEILANDS JB, "Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II). as a cofactor to bind the operator of na iron transport operon in *Escherichia coli*". *Biochemistry* 26: 5471-5477 (1987 b).
- BERNER I, GREINER M, METZGER J, JUNG G, WINKELMANN G, "Identification of enterobactin and linear dihydroxybenzoylserine compounds by HPLC and ion spray mass spectrometry (LC/MS and MS/MS)." *Biol Met* 4: 113-118 (1991).
- BLANCHETE RA, "Delignification by wood-decay fungi". *Annu Rev Phytopathol* 29: 381-398 (1991).
- BRAUN V, HANTKE K, "Genetics of bacterial iron transport". In: **Handbook of Microbial Chelates** (ed, G Winkelmann), pp.107-138 (1991).
- BRAUN V, KILLMANN H, "Bacterial solutions to the iron-supply problem" *TIBS* 24: 104-109 (1999).
- BULLEN JJ, "The significance of iron in infection". *Rev Infect Dis* 3: 1127-1138 (1981).

- CARPITA N, SABULARSE D, MONTEZINOS D, DELMER DP, "Determination of the pore size of cell walls of living plant cells" *Science* 205: 1144-1147 (1979).
- CHANG ST, BUSWELL J A "Mushroom nutraceutical" *World J. Microbiol. Biotechnol.* 53: 163-202 (1996).
- CRICHTON RR, WARD RJ, "Iron Metabolism – New Perspectives in View". *Biochemistry* 31: 11255-11264 (1992).
- CRAWFORD RL, Lignin-degrading microorganisms. In; Lignin biodegradation and Transformation. Wiley, New York, pp. 38-60, 1981.
- CULLEN D, "Recent advances on the molecular genetics of lignolytic fungi". *J Bacteriol* 53: 273-289 (1997).
- DANIEL G, "Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation". *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 199-233 (1994).
- DE SILVA D, DAVIS-KAPLAN S, FERGESTAD J, KAPLAN J, " Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin" *J. Biol. Chem.* 272: 14208-14213 (1997)
- D'SOUZA TM, BOOMINATHAN K, REDDY CA. "Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR". *Appl Environ Microbiol.* 62: 3739-3744 (1996).
- DIX D, BRIDGHAM J, BRODERIUS M, EIDE D "Characterization of the FET4 protein of yeast: evidence for a direct role in the transport of iron" *J. Biol. Chem.* 272: 11770-11777 (1997).
- DURÁN N, MACHUCA A, "Kraft pulp bleaching by an extracellular low molecular weight metabolite from the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*". *Holz Roh Werkstoff*, 53: 346 (1995).
- DURAN N, ESPOSITO E, "Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos". *Microbiologia Ambiental.*, Embrapa-CNPMA, p. 269-292, 1997.
- ECKER DJ, PASSAVANT CW, EMERY T, "Role of two siderophores in *Ustilago sphaerogena*. Regulation of biosynthesis and uptake mechanisms". *Biochim Biophys Acta* 720: 242-249 (1982).
- EMERY T, "Iron deprivation as a biological defence mechanism". *Nature* 287: 776-777 (1980 a).

- EMERY T, "Malonichrome, a new iron chelate from *Fusarium roseum*" *Biochim. Biophys. Acta* 629: 382-390 (1980 b).
- ENOKI A, TANAKA H, FUSE G, "Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂-producing one-electron oxidases in brown-rot fungi" *Wood. Sci. Technol.* 23: 1-12 (1989).
- ENOKI A, YOSHIOKA S, , TANAKA H, FUSE G. Extracellular H₂O₂-producing and one electron oxidation system of brown-rot fungi. S. C.; International Research Group on Wood Preservation, 1990. (IRG/WP Document, 1445).
- ENOKI A, ITAKURA S, TANAKA H, "The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi". *J Biotechnol* 53: 265-272 (1997).
- ERNST J, WINKELMANN G, "Metabolic products of microorganisms. 135. Uptake of iron by *Neurospora crassa*. IV. Iron transport properties of semisynthetic coprogen derivatives" *Arch. Microbiol.* 100: 271-282 (1974).
- ERNST J, WINKELMANN G, "An attempt to localize iron-chelate binding sites on cytoplasmic membranes of fungi". *FEBS Lett* 76: 71-76 (1977).
- ERNST JF, BENNETT RL, ROTHFIELD LI, "Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*", *J Bacteriol* 135: 928-934 (1978).
- FEKETE FA, CHANDHOKE V, JELLISON J, "Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes". *Appl Environ Microbiol* 55: 2720-2722 (1989).
- FLOURNOY DS, KIRK TK, HIGHLEY T, "Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume". *Holzforsch* 45: 383-388 (1991).
- FORRESTER IT, GRABSKI AC, MISHRA C, KELLEY BD, STRICKLAND WN, LEATHAM GF, BURGESS RR "Characteristics and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 359-65 (1990).
- GLENN JK, MORGAN MA, MAYFIELD MB, KUWAHARA M, GOLD MH, "Na extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 1077-1083 (1983).

- GOODELL B, JELLISON J, LIU J, DANIEL G, PASZCZYNSKI A, FEKETE F, KRISHNAMURTHY S, JUN L, XU G, "Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood" *J. Biotechnol.* 53: 133-162 (1997).
- GREENWOOD KT, LUKE RK "Studies on the enzymatic synthesis of enterochelin in *Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. Physical association of enterochelin synthesis" *Biochim. Biophys. Acta* 614: 185-195 (1980).
- HAEMMERLI SD, LEISOLA MS, SANGLARD D, FIECHTER A, "Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase". *J Biol Chem* 261: 6900-6903 (1986).
- HAMMEL KE, JENSEN KA JR, MOZUCH MD, LANDUCCI LL, TIEN M, PEASE EA, "Ligninolysis by a purified lignin peroxidase". *J Biol Chem* 268: 12274-12281 (1993).
- HARTWIG RC, LOEPPER RH, "Evaluation of soil iron". In: Barton, LL e Hemming, BC (Eds.), *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. Academic Press, NY, pp 465-482, 1993.
- HASS H, ANGERMAYR K, STOFFLER G, "molecular analysis of a *Penicillium Chrysogenum* GATA encoding gene (sreP) exhibiting significant homology to the *Ustilago Maydis* urbs1 gene" *Gene* 184: 33-37 (1997).
- HASS H, ZADRA I, STOFFLER G, ANGERMAYR K, "The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake" *J. Biol. Chem.* 274: 4613-4619 (1999)
- HASSETT R, ROMEO A, KOSMAN D "Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of dioxygen and Fe (II)" *J. Biol. Chem.* 273: 7628-7636 (1998).
- Hernández-Macedo ML, Ferraz A, Rodríguez J, Ottoboni LMM, "Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: differential analysis by sds-page and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles", *Electrophoresis*, 2001, submetido.
- aria ucila ¹, ndré ², aime ³, aura aria ariscal ¹, Maricilda Palandi De Mello ¹
- HEYMANN P, ERNEST JF, WINKELMANN G "Identification of fungal triacetylufusarinine C siderophore transport gene (*TAF 1*) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily" *BioMetal* 12: 301-306 (1999).

- HEYMANN P, ERNEST JF, WINKELMAN "Identification and substrate specificity of a ferrichromo-type siderophore transporter (Arm 1p) in *Saccharomyces cerevisiae*" *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 221-227 (2000 a).
- HEYMANN P, ERNEST JF, WINKELMANN G "A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb 1p) in *Saccharomyces cerevisiae*" *BioMetal.* 13: 65-72 (2000 b).
- HIRANO T, TANAKA H, ENOKI A, "Extracellular substance from the brown-rot fungus *Tyromyces palustris* that reduces molecular oxygen to hydroxyl radicals and ferric iron to ferrous iron". *Mokuzai Gak.* 41: 334-341 (1995).
- HOROWITZ NH, CHARLANG G, HORN G, WILLIAMS NP, "Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*" *J. Bacteriol.* 127: 135-140 (1976).
- HUSCHKA HG, JALAL MA, VAN DER HELM D, WINKELMANN G, "Molecular recognition of siderophores in fungi: role of iron-surrounding N-acyl residues and the peptide backbone during membrane transport in *Neurospora crassa*" *J. Bacteriol.* 167: 1020-1024 (1986).
- HUSCHKA HG, WINKELMANN G, "Iron limitation and its effect on membrane proteins and siderophore transport in *Neurospora crassa*" *Biol. Met.* 2: 108-113 (1989).
- JALAL MA, MOCHARLA R, VAN DER HELM D, "Separation of ferrichromes and other hydroxamate siderophores of fungal origin by reversed-phase chromatography". *J Chromatogr* 301: 247-252 (1984).
- JELLISON J, GOODELL B, FEKETE F, CHANDHOKE V, "Fungal siderophores and their role in wood biodegradation". The International Research Group on Wood Preservation, Suécia. Documento nº. IRG/WP/1442 (1990).
- JELLISON J, CHANDHOKE V, GOODELL B, FEKETE F, "The isolation and immunology of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 805-809 (1991 a).
- JELLISON J, CHANDHOKE V, GOODELL B, FEKETE F, HAYASHI N, ISHIHARA M, YAMAMOTO K, "The action of siderophores isolated from *Gloeophyllum trabeum* on the structure and crystallinity of cellulose". International Research Group on Wood Preservation Series. Box 5607, S-114 86. Stockholm, Sweden. Document IRG/WP 1479 (1991 b).

- KONETSCHNY-RAPP S, HUSCHKA HG, WINKELMANN G, JUNG G, "High-performance liquid chromatography of siderophores from fungi". *Biol Met* 1: 9-17 (1988).
- KIRK, TK, FARRELL, RL, "Ezymatic combustion: the microbial degradation of lignin" *Annual Rev. Microbiol.* 41: 465-505 (1987).
- LEATHAM G F "Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium" *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3447-3449 (1985).
- LEONG J, NEILANDS JB, "Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria". *J. Bacteriol.* 126: 823-830 (1976).
- LEONG S. A., WINKELMANN G, "Molecular Biology of Iron Transport in Fungi" *Met. Ions Bol. Syst.* 35: 147-186 (1998).
- LESUISSE E, SIMON-CASTERAS M, LABBE P, "Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily" *Microbiol.* 144: 3455-3462 (1998).
- MACHUCA A, HIROSHI A, DURAN N, "Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*" *Biochem. Biop. Res. Comm.* 256: 20-26 (1999).
- MARUGG JD, NIELANDER HB, HORREVOETS AJ, VAN MEGEN I, VAN GENDEREN I, WEISBEEK PJ, "Genetic organization and transcriptional analysis of a major gene cluster involved in siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* WCS358" *J. Bacteriol.* 170: 1812-1819 (1988).
- MATZANKE BF, BILL E, TRAUTWEIN AX, WINKELMANN G, "Ferriicrocin functions as the main intracellular iron-storage compound in mycelia of *Neurospora crassa*". *Biol. Met.* 1: 18-25 (1988).
- MATZANKE BF, BILL E, TRAUTWEIN AX, WINKELMANN G, "Siderophores as iron storage compounds in yeasts *Rhodotorula minuta* and *Ustilago sphaerogena* detected by in vivo Mössbauer spectroscopy" *Hyperfine Interactions* 58: 2359-2364 (1990).
- MEI B, BUDDE AD, LEONG AS, "Sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 903-907 (1993).

-
- MESSENGER AJM, BARCLAY R, "Bacteria, iron and pathogenicity" *Biochem Educ* 11: 54-64 (1983).
- MILAGRES A M AF, MACHUCA A, NAPOLEAO D, "Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay" *Jour. Microbiol. Meth.* 37: 1-6 (1999).
- NAHLIK MS, LEMING TP, MCINTOSH MA, "Cluster of genes controlling synthesis and activation of 2,3-digydroxybenzoic acid in production of enterobactin in *Escherichia coli*" *J. Bacteriol.* 169: 4163-4170 (1987).
- NEILANDS JB, "A crystalline organo-iron pigment from the smut fungus *Ustilago sphaerogena*" *J. Am. Chem. Soc.* 74: 4846-4847 (1952).
- NEILANDS JB, "Siderophores". *Arch Biochem Biophys* 302(1): 1-3 (1993).
- NEILANDS JB, "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds" *J Biol Chem* 270(45): 26723-26726 (1995).
- ODIER E, MOZUCH MD, KALYANARAMAN B, KIRK TK, "Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose:quinone oxidoreductase" *Biochimie.* 70: 847-852 (1988).
- PARRA C, RODRIGUEZ J, BAEZA J, FREER J, DURAN N, "Iron-binding catechols oxidating lignin and chlorolignin" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 399-402 (1998 a).
- PARRA C, SANTIAGO MF, RODRIGUEZ J, DURAN N, "Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 719-22 (1998 b).
- PASZCZYNSKI A, CRAWFORD R, FUNK D, GOODELL B. "De novo synthesis of brown rot 4,5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the fungus *gloeophyllum trabeum*" *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 674-9 (1999).
- PASZCZYNSKI A, CRAWFORD RL, BLANCHETE, RA, "Delignification of wood chips and pulps using natural and synthetic porphyrins: models of fungal decay" *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 62-68 (1988).
- POSTLE K, SKARE JT, "*Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus" *J. Biol. Chem.* 263: 11000-11007 (1988).

- RADISKY D, KAPLAN J “Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membraned” *J. Biol. Chem.* 274: 4481-4484 (1999).
- RENGANATHAN V, MIKI K, GOLD MH, “Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, na H₂O₂-requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*” *Arch. Biochem. Biophys.* 241: 304-314 (1985).
- RODRÍGUEZ J, DURÁN N, “ Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation” *Brasilian Journal and Medical and Biological Research* 21: 411-422 (1988).
- RODRÍGUEZ J, OSES R, PARRA C, FREER J, BAEZA J, “Siderophore Production by Lignin Degrading Fungi”. Proceeding of the 5th Symposium of Chemistry of Lignins and Other Wood Components (Curitiba, Brazil): 601-604 (1997).
- ROMBEL IT, LAMONT IL, “DNA homology between siderophore genes from fluorescent Pseudomonads”. *J Gen Microbiol* 138(Pt 1): 181-187 (1992).
- SAITO T, WORMALD MR, WILLIAMS RJ, “Some structural features of the iron-uptake regulation protein” *Eur. J. Biochem.* 197: 29-38 (1991 a).
- SAITO T, DULY D, WILLIAMS RJ, “The histidines of the iron-uptake regulation protein, Fur” *Eur. J. Biochem.* 197: 39-42 (1991 b).
- SARKANEN S, RAZAL RA, PICCARIELLO T, YAMAMOTO E, LEWIS NG, “Lignin peroxidase: toward a clarification of its role in vivo” *J. Biol. Chem.* 266: 3636-3643 (1991).
- SERINO L, REIMMANN C, BAUR H, BEYELER M, VISCA P, HAAS D, “Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*” *Mol. Gen. Genet.* 249: 217-228 (1995).
- TANAKA H, ITAKURA S, HIRANO T, ENOKI A, “An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron” *Holzforschung* 50: 541-548 (1996).
- TEPFER M, TAYLOR IEP, “The permeability of plant cell walls as measured by gel filtration chromatography” *Science* 213: 761-763 (1981).
- TIEN M, KIRK TK, “Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds” *Science* 221: 661-663 (1983).
- TIEN M, KIRK TK, “Lignin-degrading enzyme from the *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2280-2284 (1984).

- TUOR U, WINTERHALTER K, FIECHTER A, "Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants of wood decay" *J. Biotechnol.* 41: 1-17 (1995).
- WEINBERG ED, "Iron and Infection" *Microbiol. Rev.* 42: 45-66 (1978).
- WILLIAMS PH, "Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*" *Infect. Immun.* 26: 925-932 (1979).
- WINKELMANN G, "Metabolic products of microorganisms. 132. Uptake of iron by *Neurospora crassa*. 3. Iron transport studies with ferrichrome-type compounds" *Arch. Mikrobiol.* 98: 39-50 (1974).
- WINKELMANN G, "Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands" *Mycol. Res.* 96: 529-234 (1992).
- YUN C, FEREA T, RASHFORD J, ARDON O, BROWN P, BOSTSTEIN D, KAPLAN J, PHILPOTT C "Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for two pathways of uptake" *J. Biol. Chem.* 275: 10709-10715 (2000 a)
- YUN C, TIEDEMAN J, MOORE R, PHILPOTT C "Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of ferrichrome and fusarinine transporters" *J. Biol. Chem.* 275: 16354- 163559 (2000 b).
- ZACCHI L, BURLA G, ZUOLONG D, HARVEY PJ "Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase" *J. Biotechnol.* 78: 185-192 (2000).
- ZHOU LW, HAAS H, MARZLUF GA." Isolation and characterization of a new gene, sre, which encodes a GATA-type regulatory protein that controls iron transport in *Neurospora crassa*" *Mol. Gen. Genet.* 259: 532-40 (1998).
- ZHAO J, SWAN HS, "Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*" *Appli. Environ. Microbiol.* 65: 4908-4913 (1999).

CONCLUSÕES

Análise de proteínas em géis SDS-PAGE e 2-DE

- A análise de proteínas totais em géis SDS-PAGE e 2-D possibilitou a identificação de proteínas expressas diferencialmente nas condições de ausência e presença de ferro no meio, reconhecendo-as como proteínas reguladas por ferro. Os resultados indicaram proteínas de tamanhos e pIs semelhantes que foram induzidas em ambas espécies em carência de ferro.
- Os extratos de proteínas de membrana analisados em géis SDS-PAGE não apresentaram proteínas expressas diferencialmente, indicando que provavelmente as proteínas envolvidas no transporte de ferro (complexado ou não) podem se expressar constitutivamente ou o método utilizado não apresentou um nível de resolução adequado para detectar as diferenças.
- Através dos géis SDS-PAGE dos extratos de proteínas de membrana externa foi possível identificar 4 proteínas expressas diferencialmente no meio sem ferro e 1 em meio com ferro de *P. chrysosporium*. Em *L. edodes* foram observadas 5 proteínas no meio sem ferro e 1 no meio com ferro, evidenciando seu possível papel nos mecanismos de captação de ferro pela célula.

Análise de produção de sideróforos pelo reagente CAS

- Através na análise com reagente CAS nos meios de cultura constatou-se que os fungos degradadores de madeira *P. chrysosporium* e *L. edodes* produzem sideróforos em meio sólido nas condições de carência de ferro dentro do período de cultivo utilizado para obtenção dos micélios.
- Em meio líquido não foi possível observar reação positiva com o reagente CAS. Supõe-se que o método CAS de detecção de sideróforos no meio líquido não foi adequado provavelmente devido à baixa concentração do quelante produzido no período de cultivo utilizado para obtenção dos micélios.