

Prado, P.F.V.^{1*}; Teixeira, P.J.P.L.¹; Thomazella, D.T.P.¹; Oliveira, J.F.²; Ambrosio, A.L.B.²; Dias, S.M.G.²(co-orientadora) e Pereira, G.A.G.¹ (orientador)

¹LABORATÓRIO DE GENÔMICA E EXPRESSÃO - DEPARTAMENTO DE GENÉTICA EVOLUÇÃO E BIOAGENTES - INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP. ²LN Bio – CNPEM

*paula@lge.ibi.unicamp.br

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa* - oxidase alternativa - resolução estrutural

INTRODUÇÃO

O fungo *Moniliophthora perniciosa* é o agente etiológico da doença vassoura de bruxa do cacauieiro. A aplicação de fungicidas não se mostra efetiva como método de controle desta doença, devido à existência de inúmeros mecanismos de resistência do patógeno. Dentre estes, está a oxidase alternativa (AOX), enzima mitocondrial que permite que a respiração celular continue perante a inibição da cadeia respiratória principal (Figura 1), a qual é um conhecido alvo de fungicidas da classe das estrobilurinas. *M. perniciosa* mostrou-se resistente à ação dessas drogas e a inibição total de seu crescimento foi alcançada quando uma estrobilurina foi combinada com um inibidor da AOX, sugerindo, portanto, uma estratégia para controle da doença. Neste sentido, a fim de direcionar o desenvolvimento de drogas e que mesquem as propriedades fungicidas de ambos os inibidores, este trabalho tem como objetivo a purificação da AOX e a realização de ensaios de cristalização, que serão seguidos pela resolução estrutural da proteína.

Esta será a primeira estrutura resolvida da AOX de fungos, a qual será bastante importante para direcionar a síntese de inibidores específicos para a enzima. Adicionalmente, o sistema desenvolvido de expressão heteróloga em *Escherichia coli* será utilizado como plataforma de testes para verificar a eficiência de drogas recém sintetizadas (Figura 2). Testes de consumo de oxigênio com inibidores clássicos revelaram que bactérias expressando a AOX de *M. perniciosa* se mostram insensíveis ao cianeto (KCN - inibidor da cadeia principal) e a inibição completa do consumo de oxigênio é apenas alcançada com a adição de um inibidor da via alternativa (n-propil-galato).

METODOLOGIA



• Clonagem do gene Mp-aox e expressão da proteína recombinante

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído do micélio de *M. perniciosa* utilizando-se a enzima Superscript (Invitrogen). Em seguida, o isolamento do gene *Mp-aox* foi realizado através de PCR com uma DNA polimerase de alta fidelidade Pfu (Promega). O gene foi finalmente clonado no vetor de expressão pET28a (Novagen), sob comando do operador lac. Para os ensaios de superexpressão em *E. coli*, foram testadas as cepas Rosetta, BL21, C41, Origami e pLysS, previamente transformadas com o plasmídeo. A expressão foi induzida com IPTG e foi confirmada nas quatro primeiras cepas. Os testes de expressão foram realizados a 18 °C e 37 °C. Após crescimento a 37°C, a indução foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG por 3 horas. Os experimentos apresentados foram realizados com a cepa Rosetta.

• Teste funcional de consumo de oxigênio

Bactérias da cepa Rosetta transformadas com o plasmídeo pET28a contendo o gene *Mp-aox* foram crescidas em meio LB e induzidas com a adição de 1mM de IPTG. Os padrões de consumo de oxigênio foram comparados entre bactérias induzidas e não induzidas (portanto sem expressão da proteína AOX) submetidas à adição de KCN e n-propil-galato. Os consumos foram medidos polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo Clark acoplado a um oxígrafo Hansatech. A expressão da proteína foi confirmada por western blotting.

• Solubilização e purificação da proteína

Foi realizado um *screening* de detergentes, acompanhado por variações nos valores de pH e concentração de sais, a fim de se determinar as condições em que a proteína se encontra solúvel. A proteína solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade à metal (resina Talon-Cobalto) e filtração em gel.

CONCLUSÃO

O teste funcional releva que a bactéria de expressão constitui uma eficiente plataforma para a realização de testes de inibidores que tenham como alvo a enzima oxidase alternativa. Assim, novas drogas, específicas para a AOX, poderão ser buscadas, sendo sua capacidade inibitória facilmente verificada e mensurada no sistema desenvolvido. Adicionalmente, este trabalho contribui para o entendimento da enzima AOX, uma vez que servirá de base para a obtenção da estrutura da proteína de fungos, a qual ainda não foi resolvida.

BIBLIOGRAFIA

[1] Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM (2001): **Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components.** *Biochim Biophys Acta.*

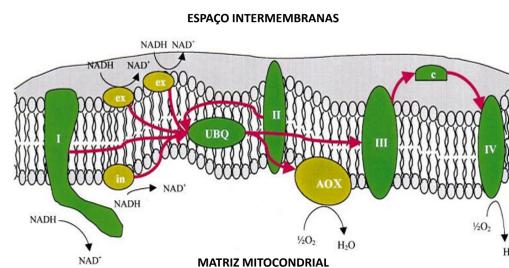


Figura 1. Esquema da membrana mitocondrial interna - A AOX se ancora a parte interna da bicamada lipídica da membrana mitocondrial por duas regiões hidrofóbicas (predição). A AOX permite a continuação do transporte de elétrons mesmo quando a via principal (verde) se encontra bloqueada. (Figura modificada de Joseph-Horne *et al.* 2001) [1]

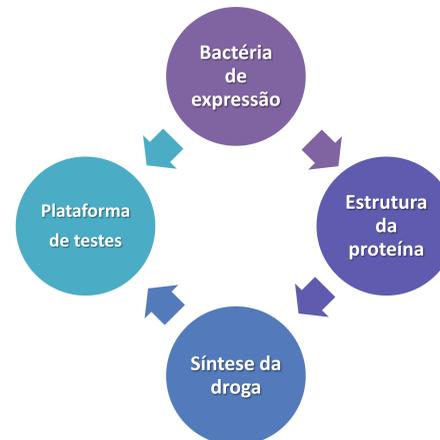


Figura 2. A cepa Rosetta de *E. coli* foi transformada com o gene *aox* de *M. perniciosa* (*Mp-AOX*) para expressão da proteína recombinante em larga escala. A posterior purificação da proteína permitirá a realização de ensaios de cristalização como também futura resolução estrutural. A estrutura da proteína será utilizada no direcionamento da síntese de moléculas inibitórias específicas, cujos intermediários ou molécula final poderão ter sua eficiência testada na própria bactéria de expressão, através de ensaios de consumo de oxigênio.

RESULTADOS

A proteína Mp-AOX é produzida com sucesso em *E. coli*

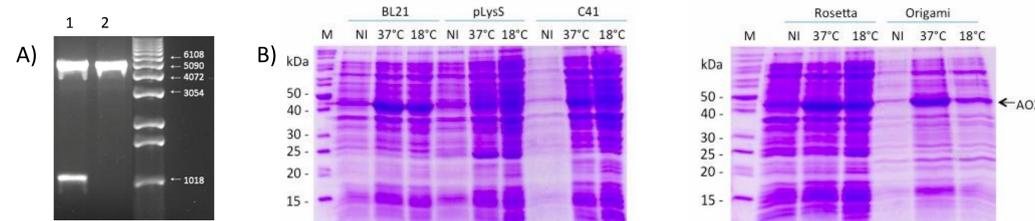


Figura 3. Clonagem e expressão do gene *Mp-AOX* – A) Confirmação da inserção do gene no vetor pET28a através de digestão com enzimas de restrição. 1- clone positivo, 2- clone negativo. B) SDS-PAGE 12.5% mostrando o extrato de proteína proveniente do teste de expressão, em duas temperaturas. O tamanho predito da proteína recombinante é 45 kDa. NI – não induzido.

A atividade da proteína Mp-AOX pode ser detectada em bactérias transformadas

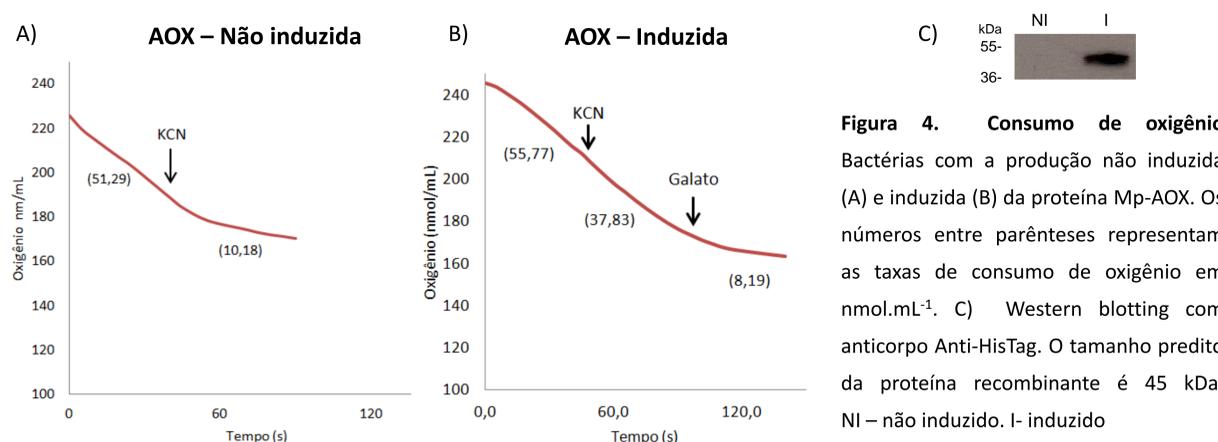


Figura 4. Consumo de oxigênio Bactérias com a produção não induzida (A) e induzida (B) da proteína Mp-AOX. Os números entre parênteses representam as taxas de consumo de oxigênio em nmol.mL⁻¹. C) Western blotting com anticorpo Anti-HisTag. O tamanho predito da proteína recombinante é 45 kDa. NI – não induzido. I- induzido

A observação dos perfis de consumo de oxigênio mostrou que a indução da AOX tornou a bactéria resistente ao KCN. Na bactéria, cuja expressão da AOX não se encontra induzida, a respiração é totalmente inibida por KCN. Por outro lado, na bactéria em que a AOX está induzida, o KCN tem efeito reduzido, sendo que a inibição completa da respiração só é alcançada pela adição de n-propil-galato (inibidor da AOX).