

Gabriel Francisco Zaniboni; Daniela Paula de Toledo Thomazella; Odalys García Cabrebra; Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Depto. de Genética e Evolução e Bioagentes

Introdução e Objetivos

Moniliophthora perniciosa é um fungo basidiomiceto causador da doença vassoura-de-bruxa do cacauero. Desde o primeiro registro da doença, a produção nacional foi drasticamente reduzida. Um conjunto de técnicas para controle da doença vem sendo testada e aplicada, incluindo o uso de fungicidas a base de inibidores da cadeia respiratória principal específicos para fungos. No entanto, *Moniliophthora perniciosa* tem se mostrado resistente a estas drogas e uma possível explicação para tal resistência é a atividade de uma oxidase alternativa (AOX), cuja expressão e atividade já vêm sendo caracterizadas pelo nosso grupo. Oxidases alternativas são capazes de realizar o transporte de elétrons em situações em que a via principal encontra-se inibida, no entanto sem produção concomitante de ATP (Fig. 1). Estudos recentes mostraram que em *M. perniciosa* a AOX aparentemente possui um papel chave no desenvolvimento do patógeno. Uma análise funcional deste gene de *M. perniciosa* ainda não foi realizada e em vista disso, este projeto visa a caracterização do gene *aox* de *M. perniciosa* (*Mp-aox*) através da clonagem e expressão heteróloga do mesmo em *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras transformadas serão utilizadas em ensaios de consumo de oxigênio, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e avaliação da taxa de crescimento. Espera-se, com os resultados obtidos, verificar os efeitos da expressão heteróloga do gene *Mp-aox* em um sistema biológico, comparando as alterações observadas na levedura transformada com o desenvolvimento do fungo *M. perniciosa*.

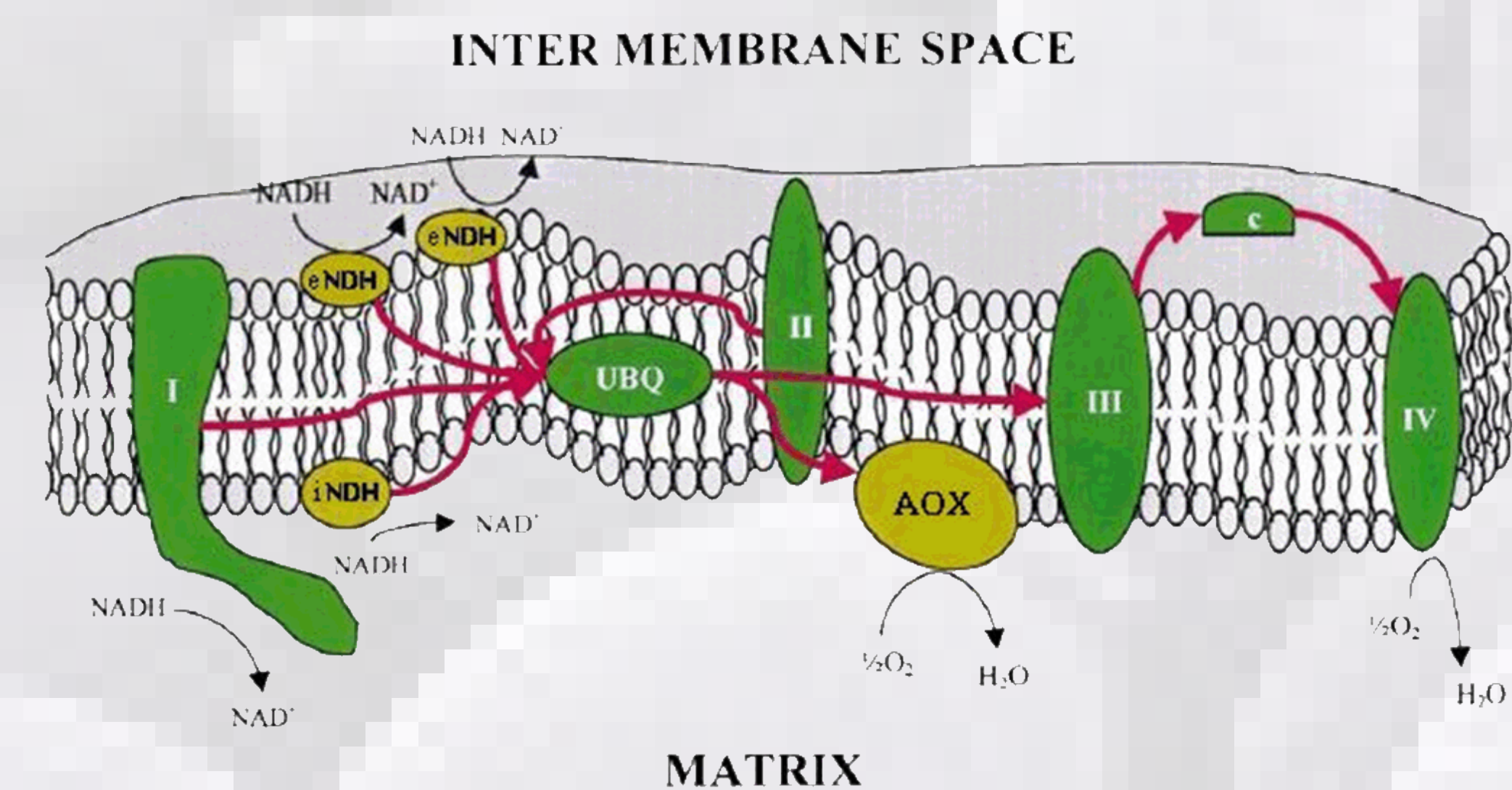


Figura 1 - Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons de fungos, destacando a existência de vias alternativas de transporte de elétrons, constituídas pelas enzimas NADH desidrogenase alternativas (iNDH e eNDH) e oxidase alternativa (AOX). A AOX atua em paralelo com os complexos III e IV da via principal, realizando a oxidação do ubiquinol e catalisando a redução dos quatro elétrons do dióxigênio (O_2) para água; localiza-se na região matricial da membrana interna da mitocôndria e o transporte de elétrons realizado por esta via não é acoplado ao translocamento de prótons para o espaço intermembranas mitocondrial, sendo a energia liberada na forma de calor. Figura modificada de Joseph-Horne et al. 2001.

Materiais e Métodos

O micélio saprotrófico do isolado FA553 de *M. Perniciosa* foi utilizado para a extração de RNA e síntese de cDNA. O gene *Mp-aox* foi amplificado com a utilização de um par de primers que amplificou apenas o gene de interesse, sem a adição de sítios de restrição, utilizando-se como temperatura de pareamento da reação de PCR 55° C (Fig. 2). Dois vetores de expressão foram escolhidos para a transformação na levedura, pYES2 (que possui promotor ativado por galactose) e pYADE4 (promotor ativado por álcool). O vetor pYES2 foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* (Fig. 3). Já com o vetor pYADE4 foram utilizadas as enzimas *EcoRI* e *SmaI* (Fig. 4). Antes da ligação do fragmento *Mp-aox* aos vetores de expressão, foram adicionados sítios de restrição correspondentes a cada um dos vetores de expressão. Os fragmentos foram então clonados em vetor de clonagem pGEM (tanto o fragmento com os sítios de restrição para ligação em pYES2 quanto aquele com sítios para ligação em pYADE4). Testes de PCR de colônia foram realizados para a verificação da correta transformação em pGEM (Fig. 5). Os fragmentos prontos (com sítio de restrição) foram então purificados a partir de PCR e ligados a seus respectivos vetores de expressão, sendo estocados até a transformação em *S. cerevisiae*.

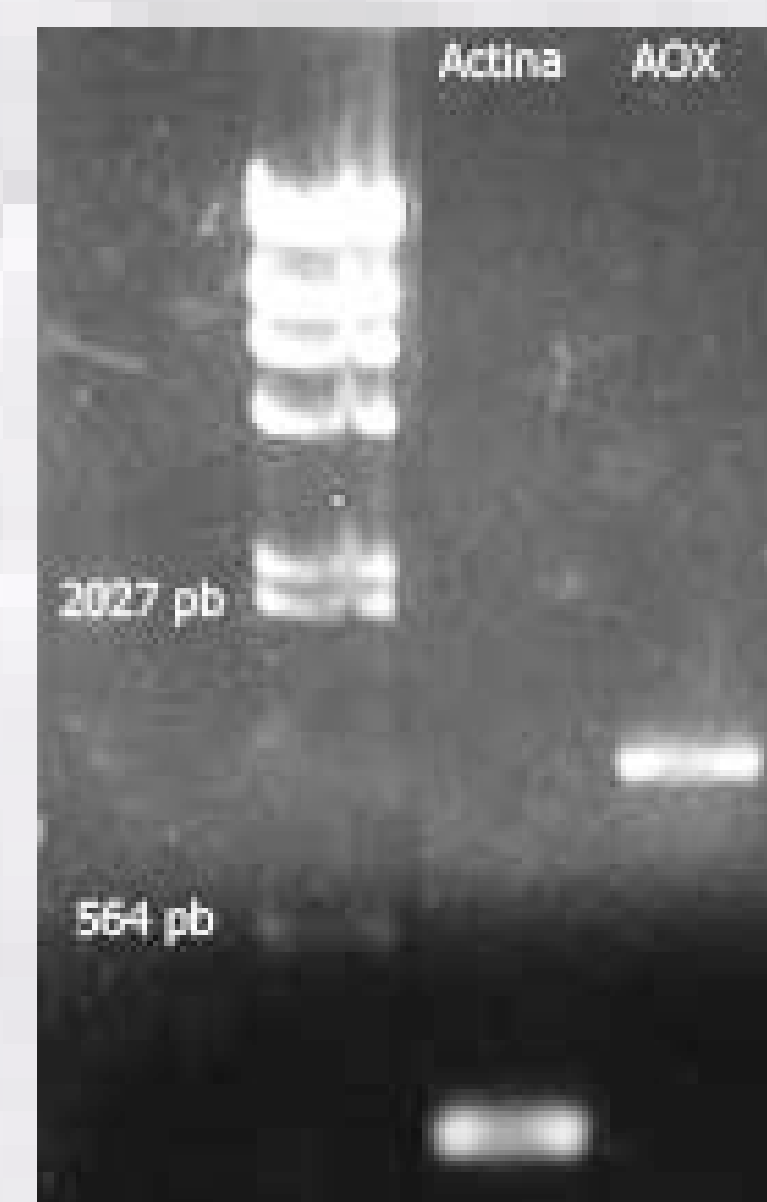


Figura 2 - Amplificação do gene *Mp-aox* a partir do cDNA obtido. O gene possui aproximadamente 1100 pb.

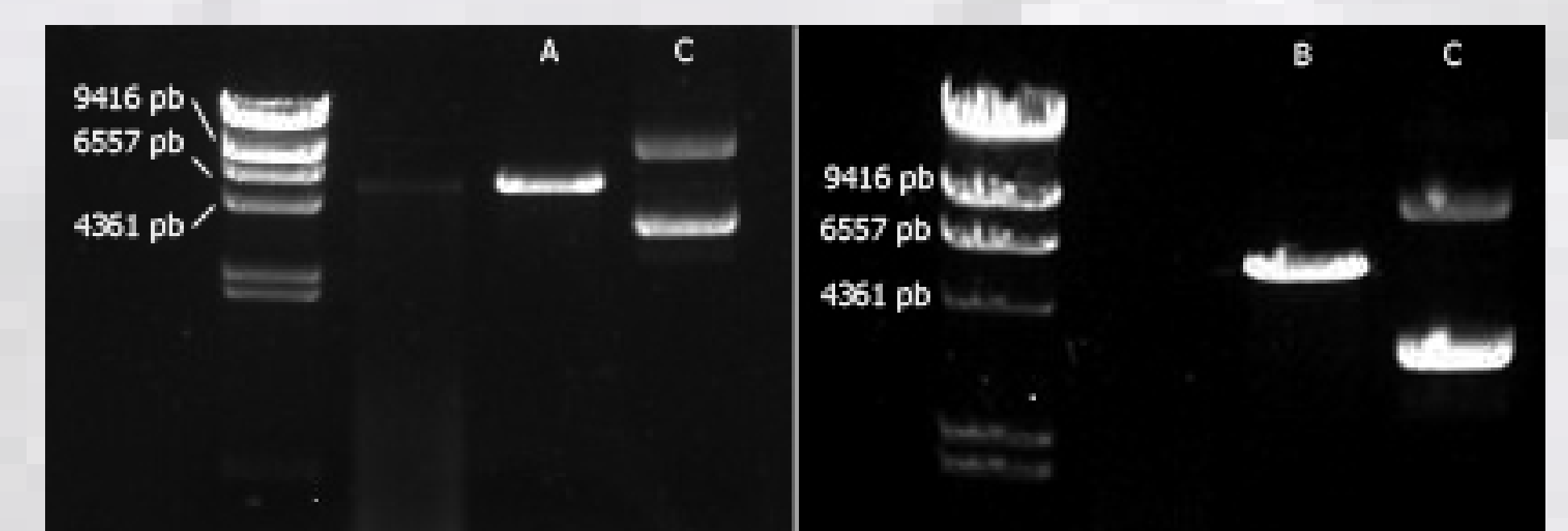


Figura 3 - Digestão do plasmídeo pYES2, que possui aproximadamente 5,9 kb. A. Digestão com a enzima *XbaI*. B. Digestão com *HindIII*. C. Plasmídeo pYES2 na conformação supercoiled (banda inferior, menor peso molecular) e conformação mais "frouxa" (banda superior, maior peso molecular).

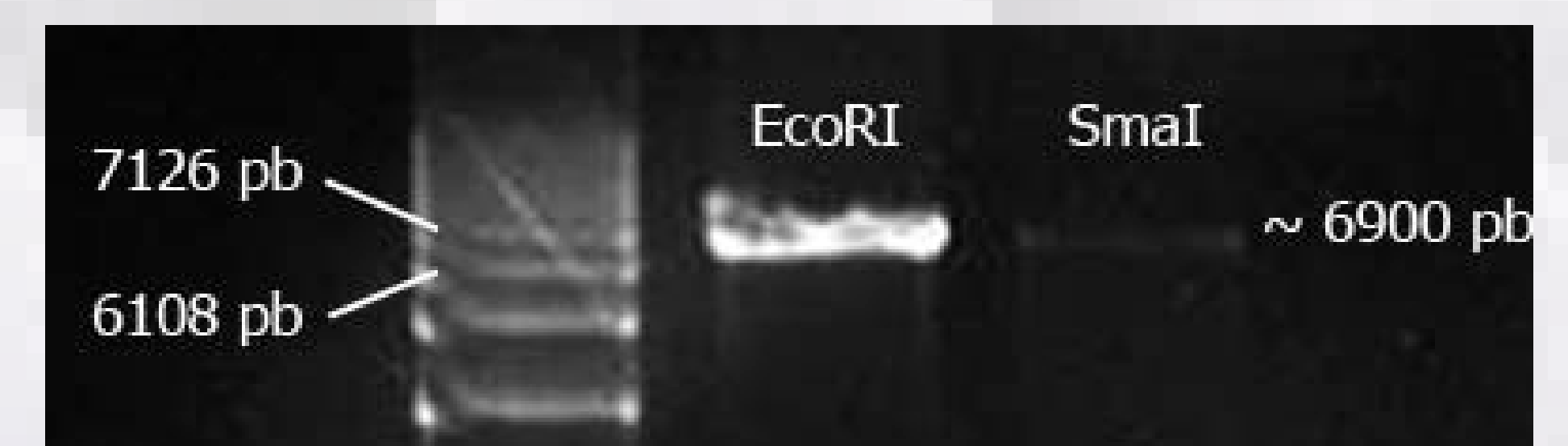


Figura 4 - Digestão do plasmídeo pYADE4 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SmaI*. O vetor possui aproximadamente 6,9 kb.

Resultados e Conclusão

Com a obtenção dos vetores de expressão pYES2 e pYADE4 prontos para a transformação, o próximo passo no desenvolvimento do projeto é a transformação da linhagem de *S. cerevisiae* selecionada, *INVSc1*. Após a transformação, serão realizados os ensaios mencionados na Introdução e Objetivos deste trabalho, como medição do consumo de oxigênio, produção de ROS e avaliação da taxa de crescimento. Paralelamente a esses ensaios, a levedura será utilizada como modelo no estudo de novas drogas que têm como alvo a AOX de fungos, que encontra-se em fase de desenvolvimento no laboratório do Dr. Ronaldo Aloíse Pilli, do Instituto de Química da Unicamp.

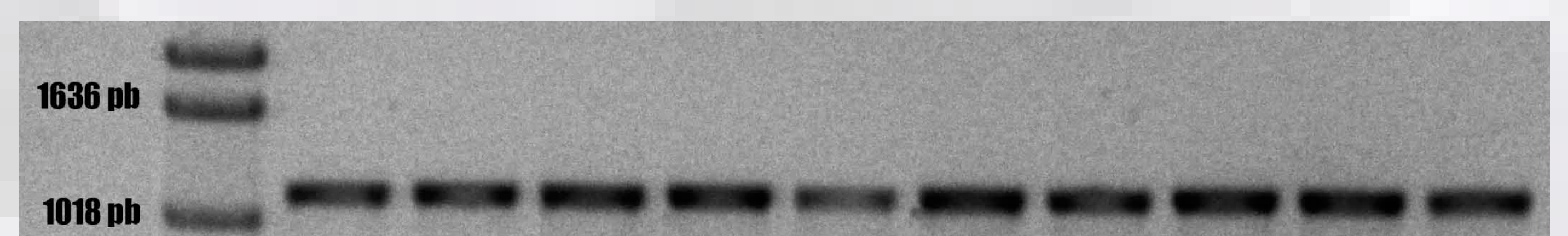


Figura 5 - PCR de colônia de células DH10B de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pGEM contendo o fragmento *Mp-aox* com sítios de restrição *EcoRI* e *SmaI*. Todas as 10 colônias testadas incorporaram o plasmídeo