

Clonagem, Expressão e Purificação das Enzimas do Metabolismo de Folatos em *X. albilineans*: Alvos Moleculares para o Desenvolvimento de Novos Agroquímicos

Fernando V. Maluf (PG), Rafael V. C. Guido* (PQ)

*rvcguido@ifsc.usp.br

¹Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC; Instituto de Física de São Carlos, IFSC – USP;

Palavras Chave: cana-de-açúcar, alvos moleculares, folatos, escaldadura das folhas, *Xanthomonas albilineans*

Introdução

A busca por um desenvolvimento sustentável tem determinado mudanças significativas na matriz energética dos países, com ênfase para os processos bioenergéticos. O Brasil, devido às características climáticas e territoriais, apresenta condições extremamente favoráveis para ocupar posição de destaque nesse novo paradigma energético. A indústria de cana-de-açúcar, um dos alicerces da economia brasileira, tem focado na produção em bioetanol, comprovado pela representatividade do setor sucroenergético no PIB nacional (~ 2%).¹ O aumento da produtividade do setor possui limitantes entre os quais se destacam as fitopatologias que diminuem significativamente o potencial energético dos canaviais. A escaldadura das folhas, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, determina perdas de produtividade, reforma precoce dos canaviais além da perda da qualidade do caldo extraído. No momento, não há alternativa química ou biológica para controle da fitopatologia, portanto, a seleção e identificação de alvos moleculares são de extremo valor para o desenvolvimento de novos agroquímicos.

A via de metabolismo e biossíntese dos folatos tem função chave na produção de metabólitos para diversas rotas biossintéticas (e.g., síntese de timidina, purinas, glicina, metionina, entre outras) sendo considerada atrativa para desenvolvimento de agentes antibacterianos. O objetivo desse trabalho consiste em obter e caracterizar estruturalmente as principais enzimas da via dos folatos como os alvos atrativos para desenvolvimento de novos agroquímicos para o controle da escaldadura das folhas.

Resultados e Discussão

Dentre as enzimas que integram a via dos folatos, 8 foram selecionadas para os estudos estruturais (Tabela1).

Tabela 1. Enzimas da via dos folatos selecionadas como alvos atrativos para o desenvolvimento de novos agroquímicos.

Enzima	Acrônimo	E.C.
Dihidrofolate redutase	FolA	1.5.1.3
Dihidroneopterin aldolase	FolB	4.1.2.25
Tetrahidrofolato sintase	FolC	6.3.2.17
Metilenotetrahidrofolato desidrogenase	FolD	1.5.1.5
GTP ciclohidrolase I	FolE	3.5.4.16
Hidroximetildihidropteridina pirofosfocinase	FolK	2.7.6.3
Dihidropteroato sintase	FolP	2.5.1.15
5,10-metilenotetrahidrofolato redutase	MTHFR	1.5.1.20

Os critérios para seleção incluíram massa molecular < 100 KDa e disponibilidade de dados estruturais de proteínas homólogas. Inicialmente, foram planejados oligonucleotídeos iniciadores otimizados para o sistema LIC (do inglês, *Ligation Independent Cloning*),² em seguida, os fragmentos codificantes foram amplificados por reação de PCR utilizando como molde DNA genômico de *X. albilineans* (extraído a partir de uma cultura líquida). Os fragmentos amplificados foram clonados nos vetores LIC pETM11, pETTrx-1a e pETNus-1a. Clones representativos para a FoD e FoE estão indicados na Figura 1.

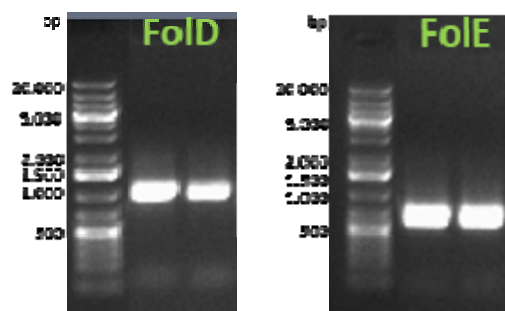


Figura 1. Confirmação da presença dos plasmídeos por PCR de colônia.

Os testes de expressão em sistema bacteriano (Rosetta DE3) revelaram expressão solúvel de todas as enzimas selecionadas. Métodos cromatográficos de afinidade e exclusão por tamanho foram empregados para a obtenção das enzimas FoD e FoE com elevado teor de pureza (confirmado por análise eletroforética SDS-PAGE). Ensaio iniciais de triagens por condições de cristalização revelaram condições promissoras que se encontram em fase de otimização.

Conclusões

A utilização de um protocolo de clonagem robusto e moderno permitiu a clonagem em paralelo de oito enzimas selecionadas da via dos folatos de *X. albilineans* diretamente nos vetores de expressão. Os testes de expressão revelaram que as enzimas são expressas de maneira solúvel e ensaios de cristalização estão sendo conduzidos. A elucidação das estruturas tridimensionais e o desenvolvimento de ensaios cinéticos e de inibição das enzimas dessa via fornecerão dados fundamentais para o planejamento de novos agroquímicos para o controle da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq

¹ Balanço Energético Nacional 2010: Ano base 2009. Empresa de Pesquisa Energética - EPE: Rio de Janeiro, 2010.

² Aslanidis, C.; De Jong, P.J. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 6069.