

# Clonagem, Expressão e Purificação da Fosfopanteitenil Transferase de *X. albilineans*: Alvo Molecular Atrativo para o Planejamento de Novos Agroquímicos

Gustavo M. A. de Lima\* (PG), Marina S. Carneiro (IC), Dayane E. B. Reis (IC), Rafael V. C. Guido (PQ)  
\*gustavo.machado.lima@usp.br

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

Palavras Chave: albicidina, escaldadura das folhas, cristalização, purificação de proteínas, agroquímicos

## Introdução

A análise da variação da oferta interna de energia no Brasil durante a década de 2000 indica a substituição de fontes não renováveis de energia por fontes renováveis, com destaque para a substituição dos derivados de petróleo por derivados de cana-de-açúcar.<sup>1</sup> Essa tendência é enfatizada pela utilização de etanol em combustíveis fósseis na União Europeia.<sup>2</sup>

O aumento da produção sustentável de bioenergia derivada da cana-de-açúcar geram benefícios ambientais significativos.<sup>3</sup> Contudo, a ocorrência e a severidade de fitopatologias estão entre os principais limitantes do aumento de produção da cana-de-açúcar. A escaldadura das folhas é uma fitopatia causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, sendo encontrada em praticamente todas as regiões do mundo onde a planta é cultivada. A necessidade de reforma precoce no canavial, perda de produtividade pela diminuição da qualidade do caldo extraído da planta estão entre os principais prejuízos causados pela fitopatia. A ausência de um tratamento químico ou biológico eficaz torna urgente a seleção e identificação de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de agroquímicos para a cultura de cana-de-açúcar.

O processo de planejamento de substâncias bioativas baseia-se, principalmente, na investigação de vias bioquímicas essenciais do patógeno em estudo. A via de produção das fitotoxinas albicidinas foi identificada em estudos de inibição como essencial para o desenvolvimento da fitopatogenia.<sup>4</sup> Entre as enzimas envolvidas na via de albicidinas destaca-se fosfopanteteinil transferase (XaPPT) que exerce função central na ativação de outras proteínas dessa via. Nesse trabalho, estudos integrados de biologia estrutural foram empregados para a clonagem, expressão e purificação do alvo molecular. A informação estrutural detalhada dessa enzima é fundamental para o desenvolvimento de novos agroquímicos através de métodos de planejamento baseado em estrutura.

## Resultados e Discussão

A cultura de *X. albilineans* foi adquirida da coleção de fitopatógenos do Instituto Biológico (IBSBF 724) e validadas por PCR (Figura 1A). A clonagem do gene *xabA* (EMBL-Bank acesso n. AF191324) codificante para a proteína XaPPT foi realizada em diferentes vetores (e.g., pET-SUMO, pET-M11 LIC, pET-Trx LIC e pET-NusA LIC) visando-se avaliar a melhor condição de expressão (Figura 1B). A clonagem do gene *xabA* foi bem sucedida nos vetores pET-SUMO e pET-M11 (Figura 2).

Testes de expressão em sistema bacteriano (Rosetta DE3) revelaram expressão solúvel da enzima XaPPT.

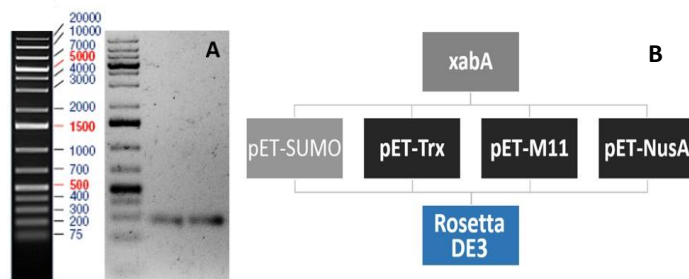


Figura 1. (A) PCR do gene PGBL, identificador de *X. albilineans* (350pb); (B) Estratégia de clonagem e expressão do gene *xabA* (XaPPT) em diferentes vetores.

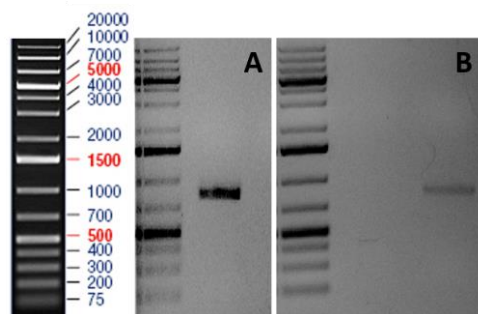


Figura 2. (A) PCR de colônia da XaPPT em vetor pET-SUMO (896pb); (B) PCR de colônia da XaPPT em vetor pET-M11 (896pb).

Métodos cromatográficos de afinidade e exclusão por tamanho foram empregados para a obtenção da enzima com elevado teor de pureza (confirmado por análise eletroforética SDS-PAGE). Ensaios iniciais de triagens por condições de cristalização revelaram condições promissoras que se encontram em fase de otimização.

## Conclusões

Os desafios do desenvolvimento de novos candidatos a agroquímicos criaram oportunidades para integração de técnicas avançadas de biologia molecular e estrutural. Uma metodologia prática e reprodutiva como a clonagem em sistema LIC possibilita a otimização da expressão e purificação de proteínas, aspectos fundamentais para estudos cristalográficos por difração de raios X. Os resultados desse trabalho possibilitarão que novos estudos em biologia molecular estrutural sejam realizados para determinação estrutural que guiarão o planejamento de novos agentes antimicrobianos candidatos a novos defensivos agrícolas para culturas de cana-de-açúcar.

## Agradecimentos

CAPES, FAPESP

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

<sup>2</sup> FERES, P.F.D. Os biocombustíveis na matriz energética alemã: possibilidades de cooperação com o Brasil. FUNAG, 2010. 300 p. : il.

<sup>3</sup> Bioetanol combustível: Uma oportunidade para o Brasil; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE: Brasília, 2009.

<sup>4</sup> Birch, R. G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathology*, 2001, 2, 1-11.