

Estudos Estruturais da Enzima Diidropteroato Sintase (FolP) de *Xanthomonas albilineans*: Alvo Molecular para o Desenvolvimento de Agroquímicos

Andrew A. Oliveira (PG), Gustavo M. A. de Lima (PG), Fernando V. Maluf (PG),
Glaucius Oliva (PQ), Rafael V. C. Guido*(PQ)
*rvguido@ifsc.usp.br

Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC), Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBFar-CEPID), Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP)

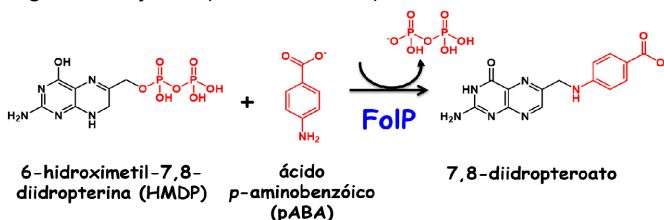
Palavras Chave: *Xanthomonas albilineans*, Diidropteroato Sintase, Cristalografia, Biologia molecular estrutural

Introdução

A bactéria gram-negativa *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson é causadora de uma das cinco principais fitopatologias encontradas em culturas de cana-de-açúcar: a escaldadura das folhas. A doença ocorre em todas as regiões onde há produção canavieira. Os sintomas variam desde diminuição da produtividade até a necessidade da reforma precoce dos canaviais, gerando prejuízos econômicos e sociais significativos. No Brasil, a importância e impacto econômico da escaldadura das folhas têm sido prejudicados devido a dificuldades no diagnóstico, uma vez que os sintomas se assemelham a outras fitopatologias (e.g., raquitismo das soqueiras).¹

Assim como em outros microorganismos, a *X. albilineans* produz ácido fólico via síntese *de novo* de folatos. Essa via, essencial e exclusiva para o desenvolvimento bacteriano, oferece oportunidade interessante para o planejamento de novas moléculas bioativas como agentes antibacterianos. Entre as biomoléculas da via de síntese de folatos destaca-se a enzima diidropteroato sintase (FolP). A FolP catalisa a formação do diidropteroato através da ligação do ácido 4-aminobenzóico ao 6-hidroximetil-7,8-diidropterina.

Figura 1. Reação bioquímica catalisada pela FolP.



Nesse trabalho foi empregada uma estratégia combinada de biologia molecular estrutural que inclui etapas de clonagem, expressão, purificação e cristalização da FolP. Os resultados obtidos permitiram a determinação da estrutura 3D inédita de um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de novos agroquímicos para culturas de cana-de-açúcar.

Resultados e Discussão

O gene *XalC_1165* foi clonado com sucesso em *E. coli* Rosetta2(DE3) utilizando o vetor pET-Trx que contém uma cauda de hexa-histidina no N-terminal da proteína fusionada tiorredoxina e um sítio de clivagem da enzima TEV protease.² Em seguida, a proteína recombinante foi expressa em larga escala e purificada por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que incluíram: cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) e cromatografia de exclusão molecular (coluna Superdex 200 XK16/100). Após aplicação das etapas cromatográficas obteve-se enzima pura (teor >95%) e

monodispersa apropriada para os ensaios de cristalização. Ensaios de triagem para identificação de condições de cristalização apropriadas para obtenção de cristais foram conduzidos com a FolP a 10 mg/mL. Em seguida, as condições iniciais promissoras foram variadas em função do pH, concentração de PEG, sal e agente tamponante. A enzima FolP foi cristalizada na condição: Bis-Tris pH 6,5, 20% PEG 3350, 0,2 M sulfato de lítio a 18 °C. Os dados da difração de raios-X foram coletados na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e processados com o programa XDS. O método de substituição molecular foi empregado para a determinação das fases iniciais. Em seguida diversos ciclos sucessivos de refinamento foram conduzidos para a determinação da estrutura 3D inédita da FolP na forma apo e resolução de 1,8 Å (Figura 2).

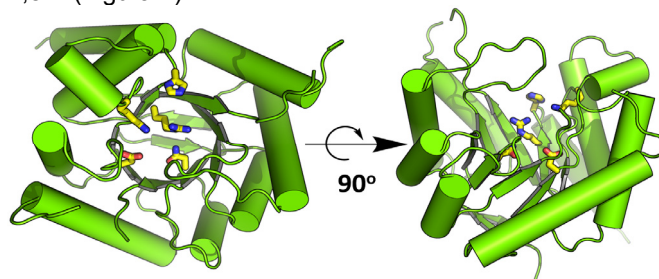


Figura 2. (A) Visão ortogonal da estrutura 3D da enzima FolP de *X. albilineans*. Os resíduos catalíticos estão indicados como bastões amarelos.

A análise estrutural da FolP de *X. albilineans* indica a presença de um barril TIM ($\beta\alpha$)₈, no qual unidades β/α se repetem paralelamente formando um barril- β de oito fitas cercado por oito hélices- α (Figura 2).³ O sítio de ligação ao substrato é formado pelos resíduos Asn120, Asp190, Lys226, Arg261 e His263.

Conclusões

Estudos integrados de biologia molecular e biologia estrutural foram empregados com sucesso na clonagem, expressão, purificação, cristalização e determinação a alta resolução da estrutura 3D da enzima FolP de *X. albilineans*. Os resultados deste trabalho permitirão que métodos de planejamento baseado na estrutura do alvo receptor (SBDD) possam ser aplicados para a identificação e desenvolvimento de novos compostos bioativos como candidatos a agroquímicos para cultura de cana-de-açúcar.

Agradecimentos

FAPESP (DD: 2013/17093-1 e BIOEN – JP: 2011/08042-9)

- Rott, P. et al. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* (2010) vol. 27.
- Aslanidis, C.; Jong, P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069–74 (1990).
- Achari A, Somers DO, Champness JN, Bryant PK, Rosemond J, Stammers DK. Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol.* **4**, 490-497 (1997).