

Expressão, Purificação e Cristalização da Enzima XaFOLD: Alvo Molecular para o Desenvolvimento de Novos Agroquímicos

Renata V. Bueno* (PG), Fernando V. Maluf (PG), Rafael V. C. Guido (PQ)
*renata.bueno@usp.br

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

Palavras Chave: escaldadura das folhas, *Xanthomonas albilineans*, XaFOLD, agroquímicos.

Introdução

A escaldadura das folhas, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, é uma das cinco fitopatologias mais importantes que atingem a cana-de-açúcar, resultando em significativa diminuição da produtividade, necessidade de reforma precoce dos canaviais e queda na qualidade do caldo extraído.¹ O impacto dessa fitopatia somado à ausência de agentes químicos ou biológicos para controlá-la estimula a pesquisa de moléculas bioativas candidatas a novos agroquímicos. A enzima N^6,N^{10} -metilenotetrafolato desidrogenase-ciclohidrolase de *X. albilineans* (XaFOLD), integrante da via de biossíntese de folatos - componentes essenciais à síntese de purinas, pirimidinas e metabolismo de aminoácidos - constitui um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas. No presente trabalho foram realizadas a expressão, purificação e triagem de condições de cristalização da XaFOLD, com o objetivo de integrar informações estruturais ao planejamento racional de novos inibidores da biossíntese de folatos, candidatos a agroquímicos para a cana-de-açúcar.

Resultados e Discussão

A sequência codificante de XaFOLD foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de *X. albilineans*. O fragmento amplificado foi clonado em três diferentes vetores de expressão (pETM11, pETTrx-1a e pETNus-1a) empregando o sistema de Clonagem Independente de Ligação (LIC).² Após avaliação do perfil de expressão das frações solúveis de XaFOLD para os diferentes vetores, a construção fusionada com hexahistidina e tiorredoxina (XaFOLD-6xHisTrx) foi selecionada para expressão em maior escala. A XaFOLD foi purificada em etapas sequenciais de cromatografia por afinidade e gel filtração (Figuras 1 e 2). No total foram obtidos 60 mg/L de proteína com elevado teor de pureza (> 95%). Após a purificação, foi realizada a concentração da proteína em dispositivo Amicon Ultra-15 10 KDa (Millipore). A triagem de condições de cristalização foi realizada a partir de três concentrações de XaFOLD (5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL) empregando-se a técnica de difusão de vapor e matriz esparsa, com quatro kits comerciais, totalizando cerca de 1.500 experimentos. A condição de cristalização composta por 0,2M MgCl₂, 0,1 Tris-HCl (pH 8,5) e 30% PEG 4000 foi identificada como promissora. Experimentos de cristalização para otimização dos *hits* iniciais encontram-se em

andamento para obtenção de cristais de elevada qualidade e apropriados para os estudos de difração de raios-X.

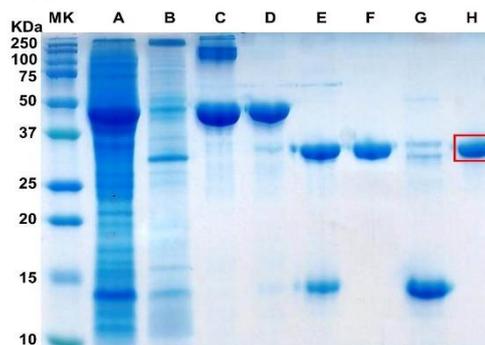


Figura 1. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15%. Marcador de massa molecular (MK), frações solúvel (A) e insolúvel (B) do lisado celular e frações obtidas por cromatografia de afinidade (C-D) e de gel filtração (E-H), com a banda de XaFOLD purificada destacada.

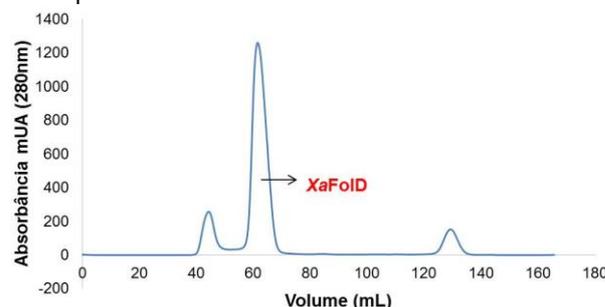


Figura 2. Cromatograma da purificação da enzima XaFOLD por gel filtração.

Conclusões

A expressão e a purificação de XaFOLD foram realizadas com sucesso, fornecendo proteína com rendimento adequado e elevado teor de pureza. Ensaio de cristalização estão sendo conduzidos, para a determinação da estrutura 3D da enzima por difração de raios-X. Além disso, encontra-se em andamento estudos de cinética enzimática e ensaios de inibição da XaFOLD, para possibilitar o desenvolvimento de novos inibidores da biossíntese de folatos candidatos a novos agroquímicos para a cultura da cana-de-açúcar.

Agradecimentos

FAPESP (Bolsa Doutorado # 2013/04737-8 e BIOEN - Jovem Pesquisador #2011/08042-9)

¹ Birch, R. G. *Mol. Plant. Pathol.* **2001**, *2*, 1.

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