



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Autor: Odalys García Cabrera

“Caracterização funcional e estrutural de proteínas indutoras de necrose e etileno (NEPs) do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da Vassoura-de-bruxa do cacau”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Odalys García Cabrera e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo A. Guimarães Pereira

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Medrano Martín

Campinas 02 de março, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C112c	<p>Cabrera, Odalys García</p> <p>Caracterização funcional e estrutural de proteínas indutoras de necrose e etileno (NEPs) do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i>, causador da Vassoura-de-bruxa do cacau / Odalys García Cabrera. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Gonçalo Amarante Pereira, Francisco Javier Medrano Martín.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. NEP. 2. Proteínas. 3. <i>Moniliophthora perniciosa</i>. 4. Vassoura de bruxa (Fitopatologia). 5. <i>Theobroma cacao</i>. I. Pereira, Gonçalo Amarante. II. Martín, Francisco Javier Medrano. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(scs/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Functional and structural characterization of necrosis and ethylene inducing proteins (NEPs) in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao.

Palavras-chave em inglês: NEP; Proteins; *Moniliophthora perniciosa*; Witches broom disease (Phytopathology); *Theobroma cacao*.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Pereira, Antonio Vargas de Oliveira Figueira, José Camillo Novello, Juan Lucas Argueso de Almeida, Jorge Maurício Costa Mondego.

Data da defesa: 02/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Data da defesa: 02/03/2007

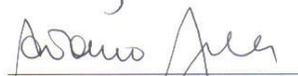
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

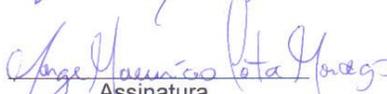
Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello



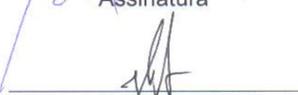
Assinatura

Prof. Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego



Assinatura

Prof. Dr. Juan Lucas Argueso de Almeida



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Julio Cezar Mattos Cascardo

Assinatura

*Dedico este trabajo a Roberto por
ser la fuerza que me guía y el amor
que me inspira;
A mi madre que aún en la distancia
está presente en cada instante de
mi vida;
A mi padre, a Ily y a mis hermanos
Eduar, Erik y Kelig por el cariño y
apoyo incondicional.*

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira por me acolher no seu laboratório permitindo a realização deste trabalho. Quando cheguei ao Brasil, o prof. Gonçalo começava a formar um grupo de Biologia Molecular no Depto. de Genética e Evolução e hoje conta com um sólido grupo de pesquisas com resultados importantes no estudo da Vassoura-de-bruxa. Isso sem dúvidas, é devido a seu profissionalismo e total dedicação. Obrigada por me permitir formar parte desse grupo e contar com a sua orientação.
- Ao Prof. Dr. Francisco Javier Medrano Martín pela ajuda incalculável no desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Lyndel Meinhardt por sua valiosa contribuição na iniciativa e desenvolvimento deste projeto.
- Ao Zapa e ao Danilo pela ajuda incondicional na realização deste trabalho.
- À Johana pela amizade e apoio.
- Ao pessoal do laboratório: Dani, Silvia, Carla, Eliane, Andréa, Carol, Sula, Micheli, Tiago, Bruno, Lucas, Thaís, pelo carinho e apoio.
- A Carol Scatolin pela ajuda na parte de microscopia.
- Ao pessoal de bioinformática: Marcelo, Gustavo, Jorge, Edu pela ajuda nas análises de seqüências.
- Ao Tiburcio pela ajuda nas análises filogenéticas.
- À professora Dra. Marlene A. Schiavinato pela ajuda nas medições de etileno.
- Ao professor Dr. Victor Vitorello por ceder as células de tabaco utilizadas para a realização deste trabalho.
- Ao professor Dr. Michel Vincentz pela ajuda com as plantas de tabaco.
- Aos professores Dra. Ione Salgado, Prof. Dr. Benedicto Vidal e ao Prof. Dr. Paulo Massafera pela cooperação na realização deste trabalho.
- Ao professor Julio Cascardo e o pessoal do seu laboratório da UESC pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.
- Ao Anders e a Naiara por ser meus anjos de guarda quando cheguei ao Brasil.

- Ao pessoal dos velhos tempos: Anderson, Victor, Marcão, Ana Paula, Raquel, Diana, Vitão e Camila pela ajuda e apoio na minha chegada ao laboratório.

- A Capes pelo financiamento do projeto.

Aos meus amigos Marta y Luis Mariano pelo apoio incondicional.

À Mônica por fazer a minha vida mais feliz.

À minha família pelo incentivo, carinho e apoio sempre.

À TODOS..... GRACIAS!

RESUMO

A doença Vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao*) é causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* e atualmente constitui um dos maiores problemas fitopatológicos do Brasil. Análises do genoma de *M. perniciosa* permitiram identificar três genes codificadores para proteínas indutoras de necrose e etileno (NEPs) descritas em oomicetos, bactérias e alguns fungos ascomicetos. Os genes codificadores das proteínas NEP de *M. perniciosa* (MpNEPs) parecem estar localizados no mesmo cromossomo e foram nomeados 1 e 2 (o terceiro gene está incompleto) segundo a descoberta no genoma (1) ou em uma biblioteca de cDNA de interação *M. perniciosa*-cacau (2). Os genes codificadores para estas proteínas foram clonados, e expressos usando um sistema de expressão heterólogo em *E. coli* produzindo proteínas de fusão a cauda de histidinas. As proteínas recombinantes foram purificadas usando colunas de afinidade a metais. MpNEP1 e MpNEP2 apresentam alta similaridade em sua seqüência de aminoácidos e são capazes de induzir necrose e síntese de etileno tanto em folhas de tabaco quanto em cacau. Ambas as MpNEPs apresentam perfis de expressão diferencial nas fases de vida do fungo: MpNEP1 é expressa de forma similar nas fases biotrófica e saprofítica enquanto que MpNEP2 é mais expressa na fase biotrófica. Importantes diferenças no comportamento físico das proteínas foram detectadas: MpNEP1 se comporta como um agregado (dímero ou trímero) em solução e é sensível a tratamento térmico enquanto que MpNEP2 se comporta como monômero e mantém a atividade de necrose depois de submetida a altas temperaturas. Estas diferenças sugerem que estas proteínas podem ter funções complementares durante o desenvolvimento da doença. Esta é a primeira vez que se descreve a presença desta família de proteínas em fungos basidiomicetos e seu estudo pode ser de grande importância para a compreensão dos mecanismos da doença Vassoura-de-bruxa.

ABSTRACT

The hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of Witches' broom disease of *Theobroma cacao*, which constitutes one of the main phytopathological problems of Brazil. An analysis of the *M. perniciosa* draft genome led to the identification of three putative genes encoding Necrosis and Ethylene inducing Proteins, which have been described in oomycetes, bacteria, and some species of ascomycetous fungi. The NEP proteins of *M. perniciosa* (MpNEPs) are apparently located on the same chromosome and were named 1 and 2 according to their discovery in the genome (1) or in a cDNA library containing transcripts from the interaction *M. perniciosa*-cacao (2). The genes codifying MpNEPs were cloned and expressed using a heterologous expression system in *E. coli* producing recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. MpNEPs were purified using nickel affinity columns. MpNEP1 and 2 have highly similar amino acid sequences and are able to induce necrosis and ethylene emission in both tobacco and cacao leaves. These MpNEPs showed different expression profiles according to the developmental stage of the fungus: MpNEP1 was expressed in a similar way in the biotrophic and saprotrophic mycelias, while MpNEP2 was preferentially expressed in the biotrophic phase. Furthermore, important differences were also detected in the physical properties of these two proteins. MpNEP1 in solution behaves as an oligomer (dimer or trimer) and is very sensitive to temperature. On the other hand, MpNEP2 in solution behaves as a monomer and is able of rapid renaturation after boiling, thus keeping its necrotic activity. These differences indicate that these highly similar NEPs may have complementary roles during disease development. This is the first report of NEP1-like proteins in basidiomycetes and their study will be of great importance in order to acquire a better understanding of the molecular mechanisms underlying Witches' broom disease.

Sumário

Introdução.....	1
Revisão Bibliográfica.....	3
Sintomatologia da doença Vassoura-de-bruxa.....	4
Agente causal da Vassoura-de-bruxa.....	5
Ciclo de vida de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	6
Estratégias de controle da Vassoura-de-bruxa.....	8
Projeto genoma Vassoura-de-bruxa.....	10
Modelo Vassoura-de-bruxa.....	11
Elictores e ativação de respostas de defesa das plantas.....	14
Necrosis and Ethylene inducing Proteins (NEP1).....	18
Atividades das NLPs nas células vegetais.....	20
NLPs são elicitores ou toxinas, ou ambos?.....	22
Relação NLPs e patogênese.....	23
Objetivos.....	25
Materiais e Métodos.....	26
Condições de crescimento de <i>Moniliophthora perniciosa</i> e <i>Phytophthora parasítica</i>	26
Análise de seqüências.....	26
<i>Southern Blot</i>	28
<i>Pulse Field</i>	30
Clonagem e expressão de genes MpNEPs e NPP1.....	31
Métodos para a obtenção de proteínas recombinantes puras.....	37
Experimentos de inoculação de proteínas em plantas para a avaliação da atividade biológica.....	42
Análise de expressão gênica de MpNEP1 e MpNEP2	44
Análise estrutural de proteínas.....	47
Imunolocalização de proteínas.....	50
Estudo da indução de peroxidases por MpNEPs em células de tabaco.	51
Resultados.....	54
Análise de seqüências das proteínas indutoras de necrose de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	54
Clonagem, expressão e purificação das MpNEPs e NPP1.....	64
MpNEPs causam necrose e induzem emissão de etileno.....	68
Análise de expressão gênica.....	72
Estudo das características estruturais das MpNEPs e NPP1.....	74
Imunolocalização.....	97
Atividade peroxidase em gel.....	98
Discussão.....	100
Conclusões	111
Perspectivas.....	113
Referências Bibliográficas.....	114
Anexo 1. Revisão das técnicas estruturais utilizadas.....	123
Anexo 2. Manuscrito aceito para publicação na revista <i>Mycological Research</i>	146

Lista de Figuras

<u>Figura 1.</u> Morfologia dos sintomas causados por <i>Moniliophthora perniciosa</i> em <i>Theobroma cacao</i>	5
<u>Figura 2.</u> Ciclo de vida de <i>M. perniciosa</i>	7
<u>Figura 3.</u> Mapa do vetor pET 15b.....	33
<u>Figura 4.</u> Mapa do vetor pET 28a.....	33
<u>Figura 5.</u> Inoculação em folhas de tabaco do sobrenadante de cultura de <i>M. perniciosa</i>	54
<u>Figura 6.</u> Primeiros resultados obtidos do blastp de MpNEP1 contra GenBank....	55
<u>Figura 7.</u> Caracterização do número de genes de MpNEPs e localização no genoma.....	57
<u>Figura 8.</u> Alinhamento de seqüências de aminoácidos das NLPs.....	60
<u>Figura 9.</u> Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de MpNEPs.....	61
<u>Figura 10.</u> Árvore Filogenética de evolução mínima das NEPs Tipo I e Tipo II....	62
<u>Figura 11.</u> Análise do uso de códons de MpNEPs.....	63
<u>Figura 12.</u> Diagrama de passos seguidos para a obtenção das proteínas recombinantes.....	65
<u>Figura 13.</u> Purificação das proteínas MpNEP2 e NPP1.....	66
<u>Figura 14.</u> Seqüência de NPP1 mostrando os peptídeos identificados por espectrometria de massas.....	67
<u>Figura 15.</u> Seqüência de MpNEP2 mostrando os peptídeos identificados por espectrometria de massas.....	68
<u>Figura 16.</u> Seqüência de MpNEP1 mostrando os peptídeos identificados por espectrometria de massas.....	68
<u>Figura 17.</u> Resultados dos testes de atividade necrótrófica de MpNEPs e NPP1 em folhas de tabaco.....	69
<u>Figura 18.</u> Resultados dos testes de atividade necrótrófica de MpNEPs e NPP1 em folas de cacau.....	69
<u>Figura 19.</u> Inoculação da MpNEP1 em meristemas de cacau.....	70
<u>Figura 20.</u> Gráficos de emissão de etileno em folhas de tabaco e cacau induzido pela inoculação das MpNEPs e NPP1.....	71
<u>Figura 21.</u> Análise de expressão gênica.....	73
<u>Figura 22.</u> Identificação da região do peptídeo sinal.....	75
<u>Figura 23.</u> Análise dos possíveis sítios de fosforilação em cada uma das proteínas MpNEPs e NPP1.....	76
<u>Figura 24.</u> Predição da formação de pontes dissulfeto nas proteínas MpNEPs e NPP1.....	78
<u>Figura 25.</u> Comparação de estrutura primária de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 usando o programa ClustalW.....	79
<u>Figura 26.</u> Predição de estrutura secundária de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 sem peptídeo sinal usando o programa PSIPRED.....	80
<u>Figura 27.</u> Espectros de CD obtidos para as três proteínas na região do UV-distante e UV-próximo.....	81
<u>Figura 28.</u> Análise do possível estado de agregação das MpNEPs e NPP1.....	85

<u>Figura 29.</u> Gráfico de intensidade de fluorescência direta das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1.....	86
<u>Figura 30.</u> Apagamento de fluorescência.....	88
<u>Figura 31.</u> Resultados obtidos mediante o programa GNOM a partir dos dados de SAXS.....	90
<u>Figura 32.</u> Modelo da estrutura, a baixa resolução, obtido para MpNEP1 a partir dos dados de SAXS.....	92
<u>Figura 33.</u> Modelo da estrutura, a baixa resolução, obtido para MpNEP2 a partir dos dados de SAXS.....	93
<u>Figura 34.</u> Modelo da estrutura, a baixa resolução, obtido para NPP1 a partir dos dados de SAXS.....	94
<u>Figura 35.</u> Atividade necrótica das MpNEPs e NPP1 após tratamento térmico	95
<u>Figura 36.</u> Estudos termodinâmicos das proteínas.....	96
<u>Figura 37.</u> Estudos de imunolocalização das MpNEPs em tecidos infectados da base do ramo de cacau.....	98
<u>Figura 38.</u> Detecção de atividade peroxidase em gel de poliacrilamida.....	99

Lista de Tabelas

<u>Tabela 1.</u> Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes de interesse.....	32
<u>Tabela 2.</u> Vetores e linhagens utilizadas para expressar as proteínas MpNEPs e NPP1.....	39
<u>Tabela 3.</u> Padrão de Peso Molecular de Proteínas.....	39
<u>Tabela 4.</u> Lista de organismos utilizados para filogenia dos genes NEP.....	59
<u>Tabela 5.</u> Conteúdo de estrutura secundária de MpNEP1 por CD.....	82
<u>Tabela 6.</u> Conteúdo de estrutura secundária de MpNEP2 por CD.....	82
<u>Tabela 7.</u> Conteúdo de estrutura secundária de NPP1 por CD.....	82
<u>Tabela 8.</u> Comparação do Raio de giro (R_g) de cada proteína analisado por DLS e SAXS.....	91

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae) é uma planta nativa da bacia Amazônica, portanto, o centro de origem e diversidade desta cultura se encontra nas Américas. No entanto, só veio a ser uma cultura de grande importância quando introduzida na Bahia em 1746. Por muitos anos, o Brasil foi um dos maiores produtores e exportadores de cacau até a introdução na Bahia em 1989 do fungo *Moniliophthora perniciosa* causador da doença Vassoura-de-bruxa (Stahel, 1915; Singer, 1942; Aime e Phillips-Mora, 2005). A partir dessa data a produção de cacau no Brasil começou a cair (Pereira, 1990).

O Brasil em apenas uma década, de 1991 a 2000, viu a produção anual de amêndoas de cacau despencar de 400.000 toneladas para 100.000 toneladas métricas. Atualmente, a doença Vassoura-de-bruxa, constitui um dos maiores problemas fitopatológicos do Brasil. Esse quadro, associado aos baixos preços do produto praticados no momento da introdução da doença, afetou consideravelmente a situação sócio-econômica e o equilíbrio ecológico das regiões produtoras do cacau, onde cerca de 2,5 milhões de pessoas dependem dessa atividade.

Durante anos foram desenvolvidas várias estratégias de combate com o intuito de controlar a progressão da doença. Esses esforços incluem tanto o controle da cultura quanto o controle biológico do fungo. No entanto, nenhuma das estratégias de controle adotadas tem revelado resultados satisfatórios.

Devido ao grande impacto econômico e a complexidade da doença Vassoura-de-bruxa, o Laboratório de Genômica e Expressão da UNICAMP começou, no ano 2001, o projeto genoma do fungo *M. perniciosa* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>). O objetivo do projeto foi caracterizar os mecanismos bioquímicos e moleculares responsáveis pelo estabelecimento e progressão da doença que possibilitem o desenvolvimento de estratégias eficientes de combate à Vassoura-de-bruxa. Atualmente, a iniciativa do projeto genoma tem gerado 75 milhões de pares de bases (pb) e 11.000 ESTs (Expressed Sequence Tags). Conjuntamente com a determinação da seqüência parcial do genoma do fungo, vários trabalhos foram realizados com o intuito de

interpretar esses dados e fornecer informações técnicas (Gesteira e col., 2003, Lima e col., 2003), biológicas (Rincones e col., 2003, Rincones e col., 2006), bioquímicas (Scarpari, e col., 2005) e citológicas (Meinhardt e col., 2006) que facilitem a compreensão do fungo *M. pernicioso* e a sua interação com o cacaueiro.

Análises do genoma de *M. pernicioso* mostraram a existência de genes codificadores para proteínas com similaridade à proteína indutora de necrose e etileno (NEP1) identificada inicialmente em filtrados de culturas do fungo *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995). Esta proteína tem sido descrita em bactérias, oomicetos e alguns fungos da classe ascomicetos formando uma família de proteínas denominada Necrosis Like Proteins (NLPs). Não existem descrições sobre a existência de NLPs em fungos basidiomicetos. Está descrito que NLPs têm a capacidade de ativar as respostas de defesa da planta levando a morte das células e necrose do tecido (Gijzen e Nurnberger, 2006).

O presente trabalho se insere dentro desse grande esforço por entender processos que acontecem durante a interação *M. pernicioso*-cacaueiro mediante a caracterização funcional e estrutural da proteína de necrose de *M. pernicioso* com o objetivo de determinar sua potencial relação com o desenvolvimento da doença. Proteínas-chaves envolvidas no desenvolvimento da doença poderiam se converter em alvos potenciais para o desenho de drogas capazes de bloquear a progressão da Vassoura-de-bruxa.

O fato de que o sintoma característico da Vassoura-de-bruxa em etapas avançadas da doença é a necrose dos tecidos e que o fungo *M. pernicioso* apresenta genes codificadores para proteínas indutoras de necrose sugere que estas proteínas podem ser pontos-chaves no desenvolvimento da doença. Propõe-se estudar os genes de *M. pernicioso* com similaridade a NEP1, caracterizar as proteínas codificadas por eles e relacionar o possível papel destas proteínas com a progressão da doença.

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Cacaueiro (*Theobroma cacao* L. -theo-broma significa alimento dos deuses-) é uma planta da família Sterculiaceae, gênero *Theobroma*, originária do continente Sul Americano, provavelmente das bacias dos rios Amazonas e Orinoco. É um arbusto de tronco liso, que pode atingir dez metros de altura, de folhas grandes, oblongas e membranáceas. Suas pequenas flores se inserem sobre o tronco e ramos, onde também surgem os frutos de tamanho e formato variáveis.

T. cacao só veio a ser cultivada passando a ser um produto de grande importância econômica quando introduzida na Bahia em 1746. Esta espécie é a única dentre as 22 espécies do gênero que é comercialmente explorada (Cuatrecasas, 1964) para a produção de sementes (amêndoas) destinadas ao preparo de derivados e subprodutos do cacau, principalmente na sua forma mais popular, o chocolate; podendo também ser transformado em cosméticos, bebidas finas, geléias, sorvetes e sucos (Nakayama, 1996). Durante a década dos 1970s, a cacauicultura foi considerada uma das fontes de divisas mais importantes do Brasil sendo que até 90% da produção era destinada à exportação (Bastos, 1987).

Novos pólos produtores de cacau foram surgindo. Costa do Marfim lidera, desde a década de 60, a produção mundial de cacau em amêndoas secas, seguida, na ordem, por Gana, Indonésia, Brasil, Nigéria, Camarões, Malásia e Equador. Este rol de oito países concentra mais de 90% da oferta mundial. O Brasil, que até a década de 80 ocupava o segundo lugar desse ranking produzindo 320,5 mil toneladas de cacau, caiu para o quarto lugar com 191,1 mil toneladas no ano 2000. A dramática diminuição da produção foi em razão da progressiva redução da área plantada, do padrão tecnológico adotado como resposta à queda dos preços internacionais, e do alastramento da doença Vassoura-de-bruxa nos cacaueiros da Bahia.

O Estado da Bahia é considerado o principal produtor de cacau em amêndoas sendo o responsável por 83% da oferta brasileira, especialmente nos municípios de Itabuna, Camacã e Ilhéus. Como decorrência da introdução nesta região em 1989 da doença Vassoura de bruxa, a década de 90 viu o Brasil se

transformar de exportador de cacau em importador do produto (Sumário, 2003). Esse quadro afetou consideravelmente a situação sócio-econômica e o equilíbrio ecológico das regiões produtoras do cacau no país, onde cerca de 2,5 milhões de pessoas dependem dessa atividade. Atualmente, a doença Vassoura-de-bruxa, constitui um dos maiores problemas fitopatológicos no Brasil.

Sintomatologia da doença Vassoura-de-bruxa

A doença Vassoura-de-bruxa foi descrita pela primeira vez por Went (1904) enquanto que o agente causal foi descoberto em 1915 pelo patologista alemão Gerald Stahel classificando-o como *Marasmius perniciosus* (Stahel, 1915). Existem dados da existência da doença na Amazônia desde 1785 (Purdy e Schmidt, 1996).

Existe considerável variação nos sintomas da Vassoura-de-bruxa em dependência do cultivar, do tipo de tecido infectado e da etapa de desenvolvimento do tecido (Pereira, 2000). *M. perniciosus* invade tecidos meristemáticos do hospedeiro provocando inchaço da parte afetada. Esse sintoma é produto da rápida divisão celular (hipertrofia) e incremento do tamanho das células (hiperplasia) que aparece acompanhado da proliferação de superbrotamentos devido à perda de dominância apical. Formam-se estruturas de folhas grandes, curvadas e retorcidas com aparência de vassouras, que dão o nome à doença (Griffith *e col.*, 2003). Quando jovens, as vassouras são de coloração verde intenso (Figura 1a), mas morrem em 1-2 meses (Figura 1b) dando uma cor marrom à copa das árvores infectadas.

Quando a infecção acontece nas flores e frutos jovens (até 12 semanas após a polinização), podem se formar vassouras e frutos deformados (Baker, 1957). A infecção de almofadas florais produz cachos de flores anormais que não produzem frutos ou que originam frutos que crescem com malformações morrendo prematuramente. Ovários não fertilizados e infestados podem continuar seu desenvolvimento e produzir frutos de até 5 cm de diâmetro chamados de “moranguinho” (Figura 1D). A infecção direta do fruto pode provocar o

desenvolvimento de uma forma típica de cenoura com sementes aquosas e posterior necrose causando a morte e mumificação do fruto (Pereira, 2000).

O desenvolvimento do fruto infestado gera grande variedade de sintomas. Podem se produzir infecções crípticas, só aparentes quando o fruto é aberto (1E). O fruto pode apresentar lesões necróticas escuras com bordas irregulares (Figura 1F).

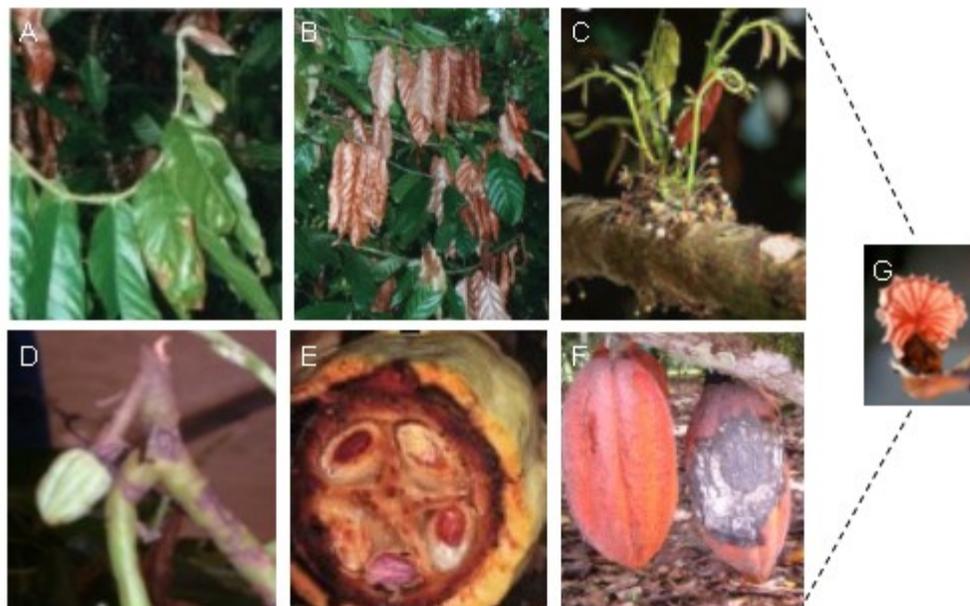


Figura 1. Morfologia dos sintomas causados por *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao*. (A) vassoura verde; (B) vassoura seca; (C) superbrotamento; (D) fruto deformado “moranguinho”; (E) fruto maduro aparentemente saudável na superfície e infestado internamente; (F) fruto infestado com lesões externas; (G) basidiocarpo de *M. perniciosa*. Figuras 1A, B, E do artigo (Griffith, 2004).

Agente causal da Vassoura-de-bruxa

O agente causal da vassoura de bruxa foi inicialmente classificado como *Marasmius pernicius* (Stahel, 1915) e reclassificado por Singer em 1942 (Singer, 1942) como *Crinipellis perniciosa*. Recentemente Aime & Phillips-Mora (2005) realizaram estudos tanto morfológicos quanto moleculares e colocaram o biótipo patogênico (C) dentro do gênero *Moniliophthora*, pertencente à família Tricholomataceae da ordem Agaricales.

As espécies do gênero *Crinipellis* apresentam uma ampla gama de hospedeiros. Devido a esta grande variabilidade de hospedeiros, os isolados do

fungo podem ser agrupados de acordo com o gênero que infectam, denominados biótipos (Griffith e Hedger, 1994a). A classificação de *C. pernicioso* em biótipos está baseada em dados de patogenicidade em relação à diversidade de hospedeiros (Wheeler, 1988). Podem-se diferenciar cinco biótipos: O biótipo cacau (biótipo C) que infecta fundamentalmente *Theobroma cacao* e *Herrania* spp. (Evans, 1978), o biótipo S que infecta Solanáceas (Bastos e Evans, 1985); o biótipo B que infecta espécies da família Bixaceae (Purdy e Schmidt, 1996), o biótipo H que infecta *Heteropterys acutifolia* A. Juss (Griffith e col., 2003) e o biótipo L que infecta lianas e cipós das famílias Malpighiaceae e Bignoneaceae; este último age como endofítico ou causando uma infecção latente sem formação de vassouras (Evans, 1977; Griffith e Hedger, 1994a; Griffith e col., 2003) O biótipo L, assim como a maioria dos basidiomicetos, apresenta uma estratégia reprodutiva auto-infértil. Os biótipos C, B, H e S causam os sintomas da Vassoura-de-bruxa nos seus respectivos hospedeiros e exibem uma estratégia reprodutiva autofértil. Estas diferenças entre os biótipos incentivaram a realização de estudos que permitiram a reclassificação destes fungos em diferentes espécies. Tal é o caso do biótipo C transferido para o gênero *Moniliophthora* (Aime e Philips-Mora, 2005). Mais recentemente, o biótipo H também foi descrito como uma nova espécie, *Crinipellis brasiliensis*, distinta dos biótipos C e S (de Arruda e col., 2005).

Ciclo de vida de *Moniliophthora pernicioso*

Moniliophthora pernicioso é um patógeno hemibiotrófico (Purdy e Schmidt, 1996) apresentando dois tipos de nutrição: biotrófica ou parasítica e saprofítica ou necrótrfica. Em *M. pernicioso*, as diferentes fases do crescimento do fungo podem ser associadas a mudanças na biologia do micélio vegetativo.

Inicialmente, os basidiósporos hialinos e uninucleados, que constituem a unidade infectiva do fungo, são dispersos pelo vento ou chuva durante a noite garantindo um tempo de sobrevivência maior já que são sensíveis à luz ultravioleta e à dessecação. O grau de dispersão dos basidiósporos determina a propagação da doença. Os basidiósporos formam tubos germinativos (um ou dois) e penetram pelos estômatos, por ferimentos ou diretamente pela epiderme sem

formação de haustórios (Sreenivasan, 1989). Os basidiósporos germinam em tecidos de crescimento rápido como o tecido meristemático (gemas vegetativas ou florais) ou frutos jovens induzindo a aparição dos sintomas. Durante esta fase, o fungo garante um suprimento de energia vivendo como um parasita intercelular obrigatório ou biotrófico. O fungo nesta fase está caracterizado por apresentar micélio monocariótico sem grampos de conexão. A Figura 2 apresenta o ciclo de vida do fungo associado ao desenvolvimento da doença.

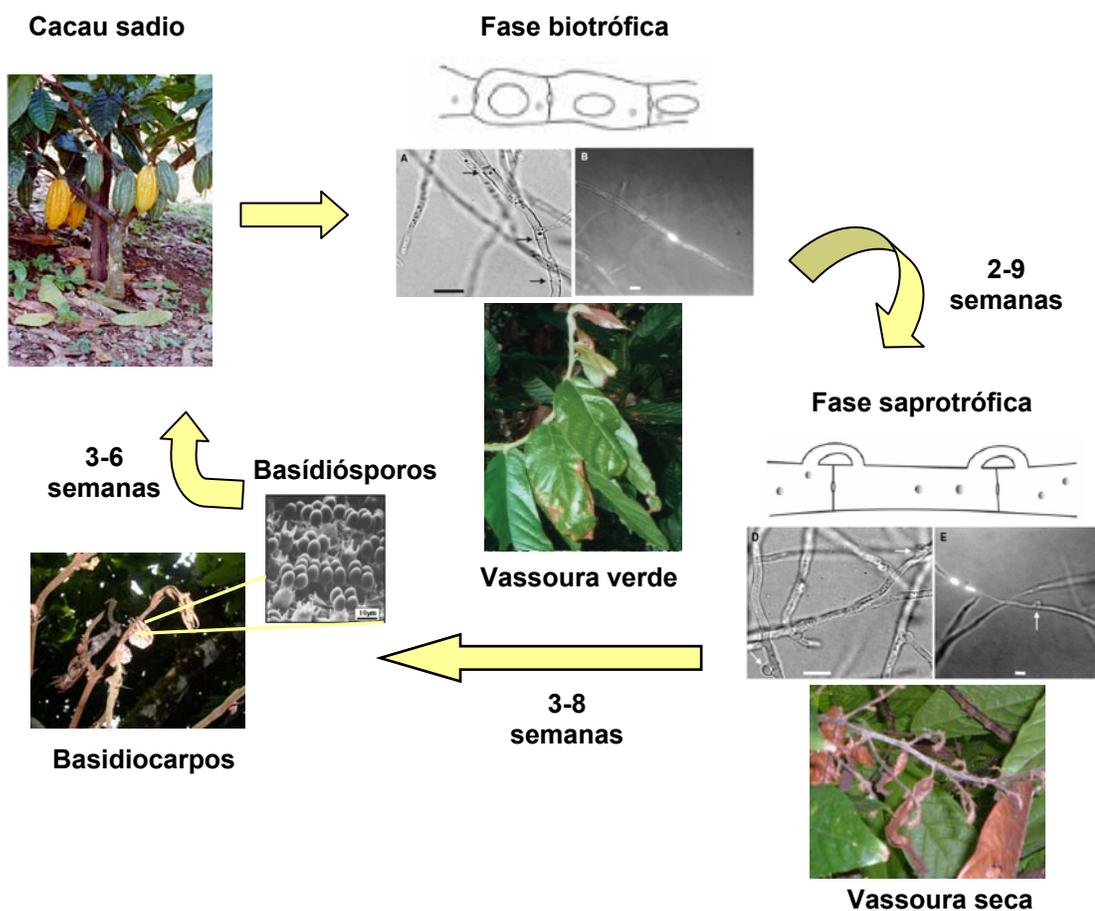


Figura 2. Ciclo de vida de *M. pernicioso*. Microscopia eletrônica de Meinhardt e col. 2005.

M. pernicioso tem caráter homotático. Esta natureza autofértil foi observada em estudos citológicos mediante a dicarionização de hifas monocarióticas derivadas de um único basidiósporo (Delgado e Cook, 1976). O fato de que o biótipo C seja capaz de formar basidiocarpos a partir de um único

basidiósporo sem cruzar com outro indivíduo é de vital importância para a epidemiologia da Vassoura-de-bruxa (Griffith *et al.*, 2003).

De oito até doze semanas depois de iniciada a infecção, os tecidos infectados começam um processo de senescência e são colonizados inter e intracelularmente pelas hifas saprofiticas do fungo. Estas hifas são dicarióticas e apresentam grampos de conexão, necessários para a manutenção de dois núcleos por célula (Delgado e Cook, 1976; Evans, 1980; Griffith e Hedger, 1994b) (Figura 2). A teoria existente é que as hifas saprofiticas se formam como resultado da fusão de hifas intercelulares, processo denominado plasmogamia (Delgado e Cook, 1976). As vassouras senescentes tornam-se marrons formando as estruturas chamadas de vassouras secas. Depois de um período latente de três a nove meses, as vassouras secas começam a produzir corpos de frutificação (basidiocarpos), completando um ciclo de vida de *M. pernicioso* (Wheeler e Suárez, 1993; Purdy e Schmidt, 1996).

Estratégias de Controle da Vassoura-de-bruxa

O possível espalhamento da doença Vassoura-de-bruxa pelo mundo é considerado uma séria ameaça à produção de cacau (Wood, 1985). No Estado da Bahia existem organizações governamentais (CEPLAC/CEPEC, Comissão executiva do Plano da Lavoura do Cacaueiro/Centro de pesquisas do cacau, e a FUNDECAU, Fundo Baiano de Defesa da Cacaucultura) desenvolvendo pesquisas na busca de soluções para o controle da doença.

As práticas da poda fitossanitária e a aplicação de fungicidas em frutos em desenvolvimento são as ferramentas mais utilizadas para o controle da doença (Bastos, 1996b). A utilização de fungicidas é quase impraticável para culturas de árvores tropicais e é ineficiente em áreas de alto índice de chuvas como acontece na região da Bahia. Vários compostos têm sido usados como fungicidas como é o caso do cobre triazol e do tebuconazol (Oliveira, 1999). Esta estratégia resulta muito onerosa porque depende dos preços dos fungicidas que sofrem um aumento contínuo, enquanto que os retornos gerados pelo cultivo do cacau não acompanham tal incremento (Pereira, 2000). A remoção de fontes de inoculo pela poda fitossanitária é efetiva para o controle da Vassoura-de-bruxa se for efetuada

antes do período de floração. Todos os tecidos infestados, vivos ou mortos, devem ser removidos.

Uma nova arma utilizada por agricultores contra a Vassoura-de-bruxa é o controle biológico mediante a utilização do fungo *Trichoderma* sp. como antagonista de *M. pernicioso* (Bastos, 1996a; Bastos, 1996b). Estudos comprovaram que as vassouras, uma vez colonizadas por *T. viride*, não produzem basidiocarpos (Bastos, 1996a). O mecanismo proposto para interação *M. pernicioso-T. viride* é o micoparasitismo. A morte do fungo *M. pernicioso* não é devido à produção de antibióticos ativos e sim pela ação de enzimas hidrolíticas da parede como proteases, amilases e celulasas (De Marco, 2003). Sanogo (2002) mostrou que *T. stromaticum* é um parasita de micélio e basidiocarpos de *M. pernicioso*. Estudos paralelos tentam explorar a possibilidade de utilizar fungos endofíticos de tecidos meristemáticos de cacau capazes de inibir o estabelecimento e colonização de *M. pernicioso* (Griffith, 2004; Rubini, 2005).

Uma abordagem mais promissora em longo prazo para o controle da doença é aumentar a resistência genética do cacau (Baker, 1957). Estudos realizados identificaram alguns clones de Scavina (Sca 6 e Sca 12) e o clone IMC 67 apresentando alto grau de resistência a *M. pernicioso*. Progênies desses clones deram origem ao híbrido TSH plantado em Trinidad, e ao qual se atribuem os baixos níveis de Vassoura-de-bruxa nesse país (Laker, 1989). Entretanto, Sca 6 plantada no Equador tornou-se susceptível (Bartley, 1986). No Brasil, a CEPLAC e a CEPEC têm fomentado um programa dirigido à busca por material resistente à Vassoura-de-bruxa (endêmico dos estados amazônicos) no banco de germoplasma mundial, com o objetivo de plantá-lo na Bahia. Apesar da existência de várias coleções de germoplasma geneticamente diversas, a identificação de genótipos resistentes gerados por via tanto natural quanto artificial tem fornecido resultados incongruentes (Andebrhan, 1987).

Apesar dos esforços destinados a esta área ainda não existe uma estratégia totalmente eficiente de controle para a Vassoura-de-bruxa.

Projeto Genoma Vassoura-de-bruxa

Devido à complexidade da doença Vassoura-de-bruxa, nosso laboratório começou no ano 2001 o projeto genoma de *M. pernicioso*, (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>) com o objetivo de identificar genes que codifiquem proteínas potencialmente relacionadas com o desenvolvimento da doença. Até o momento, a iniciativa do projeto genoma gerou 75 milhões de pares de bases e 11.000 ESTs. Considerando que o tamanho do genoma de *M. pernicioso* foi calculado entre 30-40 Mb (Rincones *et al.*, 2003), os nossos dados representam uma cobertura de aproximadamente duas vezes o tamanho do genoma haplóide do fungo com alta qualidade (phred>20).

Um problema para o estudo de fungos na fase biotrófica é a dificuldade de cultivar o fungo axenicamente (em ausência do hospedeiro). A caracterização das mudanças bioquímicas que acontecem na vassoura verde em comparação com tecidos sadios permitiu inferir a importância de alguns compostos na manutenção da fase biotrófica (Scarpari *et al.*, 2005). A partir desses resultados foi possível determinar um meio de cultivo para o fungo na fase biotrófica *ex planta* (Meinhardt *et al.*, 2006). Este foi um passo decisivo no desenvolvimento do projeto permitindo estudos de expressão gênica comparativos entre os micélios biotróficos e necrotróficos de *M. pernicioso* em presença de extratos do hospedeiro na tentativa de entender os processos que acontecem em ambas as fases do desenvolvimento do fungo e o significado que trazem para a progressão da doença (Rincones, Tese Doutorado 2006; Scarpari, Tese Doutorado 2006).

Análises do genoma de *M. pernicioso* têm direcionado vários trabalhos com o objetivo de caracterizar proteínas potencialmente relacionadas com o desenvolvimento da doença. Os resultados desses trabalhos permitiram a formulação de um modelo para o mecanismo de ação de *M. pernicioso* na tentativa de compreender a biologia do fungo assim como a natureza da interação com o seu hospedeiro natural (*Theobroma cacao*).

Modelo Vassoura-de-bruxa

O fungo *M. pernicioso* penetra nos tecidos em desenvolvimento mediante a germinação dos basidiósporos sobre a cutícula ou na base dos tricomas emitindo tubos germinativos que penetram nos tecidos (Evans, 1979). As hifas do fungo se desenvolvem no apoplasto onde provavelmente liberam uma série de elicitores que poderiam ativar respostas de defesa da planta; esses sinais poderiam ser traduzidos num aumento das espécies reativas de oxigênio.

A explosão oxidativa é uma característica inicial e rápida das respostas de defesa da planta ativada por elicitores (Wojtaszek, 1997; Diaz-Vivancos, 2006). Este aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) poderia ter a contribuição também da degradação de cristais de oxalato de cálcio realizado pela enzima oxalato oxidase ou germina do cacau. O gene que codifica para a enzima oxalato oxidase foi identificado na biblioteca de interação suscetível *M. pernicioso*-cacaueiro sugerindo que a degradação de oxalato de cálcio poderia trazer vantagens para o desenvolvimento do fungo. Um dado interessante é que plantas infectadas por *M. pernicioso* apresentam um aumento inicial no número de cristais de oxalato quando comparadas com plantas sadias. Em etapas mais avançadas da doença (36 dias), o número de cristais de oxalato mostrou uma redução drástica e após 45 dias os cristais desapareceram. Coloração com DAB mostrou que o peróxido de hidrogênio se concentra ao redor dos cristais de oxalato de cálcio sugerindo que é produto da degradação dos cristais (Ceita e col., submetido).

Observações em estudos de microscopia de varredura (Scatolin, projeto Pós-doutorado) sugerem que o fungo inicialmente poderia produzir cristais de oxalato de cálcio que posteriormente seriam degradados devido ao aumento dos níveis de oxalato oxidase produzida pela planta. Foi demonstrado que o fungo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* era capaz de formar cristais de oxalato de cálcio e que este composto está associado a sua patogenicidade (Maxwell, 1970; Noyes, 1981; Zhou, 1999). O mecanismo exato que explicaria o papel do oxalato de cálcio na patogenicidade é desconhecido. Porém, Dias (2006) fez um resumo das hipóteses que existem: A degradação do oxalato de cálcio pela enzima

oxalato oxidase diminuiria o pH do apoplasto criando um ambiente propício para a ação de enzimas celulolíticas e peptolíticas secretadas pelo fungo que estariam envolvidas na degradação da parede celular da planta. Além disso, poderia recrutar os íons de cálcio comprometendo a atividade das respostas de defesa dependentes de cálcio. Outra teoria levantada é que ou os altos níveis de peróxido de hidrogênio produzidos pela degradação do oxalato de cálcio poderiam resultar tóxicos para a planta. Um modelo similar explicaria os resultados obtidos nos estudos de *M. pernicioso*.

Pode-se pensar que os altos níveis de peróxido de hidrogênio gerados seriam também potencialmente tóxicos para o fungo. Estudos do genoma de *M. pernicioso* permitiram identificar a existência de genes codificadores para enzimas de detoxificação (Thomazella, Manuscrito em preparação). *M. pernicioso* durante a fase biotrófica poderia se proteger do “ataque oxidativo” mediante o desligamento da cadeia principal de transporte de elétrons e a ativação da oxidase alternativa (Thomazella, Manuscrito em preparação) e catalases para detoxificação. Durante a fase biotrófica a biomassa do fungo nos tecidos infestados é baixa (Penman e col., 2000). Este fato poderia estar relacionado com uma inibição da via principal da cadeia respiratória. Os baixos níveis energéticos explicariam a baixa taxa de crescimento do fungo durante esta fase do ciclo de vida do fungo.

Está bem documentado que muitos dos sintomas de doenças de plantas causados por microorganismos patogênicos parecem refletir a ação de fitohormônios (Jameson, 2000). O patógeno pode alterar diretamente o metabolismo dos fitohormônios produzidos pela planta ou pode ser capaz de ele mesmo secretar hormônios vegetais (Sequeira, 1973).

O papel de reguladores do crescimento de plantas (fitohormônios) durante o desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa não está totalmente claro. Estudos “*in vitro*” utilizando o micélio saprotrófico de *M. pernicioso* relataram que este tipo de micélio não produz quantidades significativas de auxina, citocininas (Krupasagar, 1969) ou giberelinas (Dudman and Nichols, 1959). Orchard (1994) realizou medições dos níveis de citocininas (zeatina, zeatina ribosídeo, isopenteniladenina e isopenteniladenosina) em plantas de cacau tanto saudáveis quanto doentes.

Analisando os resultados, das quatro citocininas estudadas, unicamente o composto zeatina ribosídeo aumentou os níveis significativamente nas plantas infectadas. Porém, nenhum estudo tem sido realizado com a fase biotrófica deste patógeno e nossos resultados de expressão gênica diferencial apontam para uma programação bem diferente entre ambos os tipos de micélio (Rincones, Tese Doutorado 2006; Scarpari, Tese Doutorado 2006).

Acreditamos que o fungo durante esta fase seja capaz de produzir fitohormônios ou induzir a planta a produzi-los. Estes hormônios poderiam provocar um desbalanço hormonal levando à hipertrofia e superbrotção já que os hormônios vegetais como a auxina e a giberelina ativam mecanismos de divisão e expansão celular, induzem a formação de frutos partenocárpicos, entre outros efeitos observados na progressão da Vassoura-de-bruxa (Taiz, 2006). Em vista de que alguns genes putativamente envolvidos nas vias de síntese de reguladores do crescimento de plantas foram identificados no genoma do fungo *M. pernicioso* sugere-se que o fungo poderia estar produzindo análogos a hormônios vegetais.

O aparecimento de lenticelas (Dabydeen, 1989) e o aumento da emissão de etileno observado por Scarpari (2005) levam-nos a formular a hipótese de que a vassoura verde estaria em estado de hipoxia. Este processo levaria ao esgotamento do tecido, hipótese sustentada pelo fato de que as células da vassoura estão desprovidas de grãos de amido (Scatolin, Manuscrito em preparação). Esta depleção de açúcar pode levar ao processo de apoptose (Hensel, 1993; Quirino, 2000; Wounter, 2004). Como resultado, o conteúdo celular ficaria disponível para remobilização levando à mudança de fase do fungo para a necrotrófica. Meinhardt (2006) conseguiu manter a fase biotrófica de *M. pernicioso ex planta* em condições de baixo conteúdo de nutrientes e contendo glicerol como única fonte de carbono. Tem sido descrito que entre os principais componentes dos estoques de reserva de esporos de fungo estão os lipídios (Voegelé, 2005). Divon (2007) reportou que a degradação dos ácidos graxos tem um papel crucial durante a fase de penetração de fungos facilitando a atividade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos através da produção de acetil-CoA em condições de escassez de nutrientes. O metabolismo dos ácidos graxos também tem um papel fundamental

na produção de glicerol que desempenha importante função durante o processo de penetração do fungo hemibiotrófico *Magnaporthe grisea* (Wang, 2003; Jin, 2007).

Na fase necrotrófica, *M. perniciosa* cresce rapidamente sugerindo uma restauração da cadeia de transporte de elétrons. Durante esta fase o fungo deve ter uma ativa produção de toxinas e elicitores (objeto de estudo deste trabalho), potencialmente causadores da necrose dos tecidos infectados, que culmina na aparência de vassoura seca. Na superfície destas vassouras se formam as estruturas reprodutivas (basidiocarpos), processo desencadeado possivelmente pela presença de receptores de luz e umidade.

O modelo proposto para o mecanismo de atuação do fungo *M. perniciosa*, que levaria à progressão da doença Vassoura-de-bruxa, precisa ser validado mediante o desenvolvimento de novas pesquisas para a melhor compreensão da interação *M. perniciosa*-cacaueiro. O presente projeto se insere nesses estudos.

Penman e colaboradores (2000) desenvolveram um método significativamente sensível para medir a biomassa do fungo *M. perniciosa* nos ramos de cacau infectado utilizando quitina como marcador. As vassouras verdes que correspondem a uma etapa inicial da infecção apresentaram 81 μg de biomassa do fungo por mg de peso seco⁻¹ enquanto as vassouras secas continham 161 μg de biomassa de fungo por mg peso seco⁻¹. Diferenças nos níveis de biomassa fúngica também foram analisadas em relação ao ponto de inoculação da infecção. Estudos revelaram que as maiores concentrações de fungo estão na base da vassoura (215 μg mg peso seco⁻¹) e vai declinando em direção ao topo (10 μg mg peso seco⁻¹). Estes estudos sugerem a possibilidade da existência de moléculas produzidas pelo fungo capazes de induzir a aparição de sintomas em sítios afastados da localização do patógeno e que seriam produto da ativação das respostas de defesa da planta (Penman e col., 2000).

Elicitores e ativação de respostas de defesa das plantas

A co-evolução de vegetais e microrganismos patogênicos tem resultado em mecanismos de comunicação mútua extremamente sensíveis e versáteis, que

começam logo depois do contato patógeno-hospedeiro. Nesta comunicação intervêm grande variedade de sinais físicos e químicos, que dão origem a uma série de eventos de transdução de sinais capazes de induzir a expressão de vários genes (tanto da planta quanto do patógeno), levando a uma resposta de resistência (ativa respostas de defesa) ou susceptibilidade (promove a infecção) (Kolattukudy, 1995).

Huitema *et al.* (2004) propuseram que a colonização parasítica de plantas por patógenos acontece através de uma reprogramação do sistema de defesa da planta mediante proteínas efetoras da doença que são secretadas pelo patógeno. Dependendo do alvo do efector, estes podem ser classificados em: efetores apoplásticos (são secretados no espaço extracelular da planta onde interagem com moléculas-alvo extracelulares e/ou receptores de superfície); ou efetores citoplasmáticos (são translocados dentro das células da planta mediante estruturas especializadas como vesículas e haustórios) (Kamoun, 2006). Os efetores capazes de manipular a estrutura e função da célula hospedeira ocasionando a ativação das respostas de defesa da planta são chamados de elicitores (Keen, 1975).

Os mecanismos de defesa das plantas podem agir através da presença de estruturas preformadas e/ou pela ocorrência de reações induzíveis. As reações de defesa induzíveis são as estimuladas por elicitores uma vez que acontece a interação patógeno-planta. Os elicitores podem ser classificados em três grupos: sinais químicos (hormônios e fitotoxinas), sinais físicos (luz) e sinais bióticos (elicitores) (Ebel, 1994).

Como uma medida defensiva, as células do hospedeiro podem reconhecer moléculas-chave do patógeno (elictor) e iniciar o processo de morte celular evitando a disseminação do patógeno e limitando a propagação da infecção, fenômeno chamado de resposta hipersensitiva (HR) (Nimchuk *et al.*, 2003). HR constitui a resposta local primária de plantas a patógenos biotróficos, geralmente associada com a resistência a doenças (incompatibilidade) (Staskawicz, 1995). O processo de morte celular programada pode estar relacionado também com

susceptibilidade a doenças promovendo a disseminação e agressividade de patógenos necrotróficos (Greenberg, 2004).

A caracterização de moléculas do patógeno que causam a morte das células da planta tem sido objeto de interesse de patologistas durante décadas. Existem evidências de que esse processo de morte celular programada pode ser comandado pelo patógeno durante a infecção e desviado de forma tal que atue contra o hospedeiro (Greenberg e Yao, 2004).

Um dos primeiros eventos detectáveis após a interação planta-patógeno é o fluxo de íons através da membrana plasmática provocando uma explosão do metabolismo oxidativo que produz espécies reativas de oxigênio (EROs) e que por sua vez é necessário para a ativação de genes de defesa e produção de metabólitos antimicrobianos (MacMillan, 2002). O Ácido salicílico (SA) e o óxido nítrico (NO) potencializam as repostas dependentes de EROs. Outros eventos iniciais descritos durante a interação planta-patógeno são o influxo de Ca^{2+} , a fosforilação/desfosforilação de proteínas e a síntese de proteínas relacionadas com patogenicidade (Mayer, 2001).

No caso de patógenos hemibiotróficos, o complexo ambiente molecular que se estabelece com o hospedeiro começa na superfície da folha, antes mesmo da penetração. Uma estratégia geral de fungos na fase biotrófica consiste em invadir tecidos do hospedeiro causando o mínimo de danos nas células da planta, gerando assim uma relação estável fungo-planta. Panstruga (2003) observou que na presença de um fungo biotrófico, as respostas de defesa induzidas são fracas ou transientes. Essa tolerância ao patógeno sugere que a entrada nos tecidos da planta está acompanhada por supressão microbiana das respostas de defesa do hospedeiro e/ou da morte da célula.

Durante as relações biotróficas fungo-planta e oomiceto-planta pode-se observar que em cada grupo existem grandes variações tanto no tempo de duração dessa relação biotrófica quanto na capacidade dos diferentes organismos para o crescimento saprotrófico. Estas diferenças sugerem que ambos os tipos de moléculas (as moléculas efetoras do patógeno e os fatores de compatibilidade da

planta) têm um papel fundamental na determinação do tipo de relação planta-patógeno que irá se estabelecer.

Organismos que permanecem na fase biotrófica durante longo tempo causam mudanças nos padrões de translocação de nutrientes dentro da planta tornando o sítio de infecção num dreno nutricional essencial para o fungo acessar às reservas da planta (Lewis, 1973). Mayer (1988) sugeriu que essa disponibilidade de nutrientes é o determinante fundamental na infecção patogênica.

Muitas proteínas secretadas por patógenos biotróficos tem sido isoladas e caracterizadas bioquimicamente levando à descoberta de vários polipeptídios localizados primeiramente no apoplasto, muitos deles inibidores enzimáticos ou proteases que funcionam provavelmente como contra-defesa microbiana à secreção de proteínas relacionadas com patogenicidade (O'Connell, 2006). Análises computacionais de vários genomas de *Phytophthora* spp e de *Magnaporthe grisea* revelaram que codificam mais de 100 e 700 proteínas putativas secretadas respectivamente, sugerindo que um considerável número de efetores pode estar agindo nas células do hospedeiro (Kamoun, 2006). O número de possíveis elicitores pode ser um reflexo da complexa interação que se estabelece entre o patógeno e a planta.

Bactérias, fungos e oomicetos produzem elicitores. Isso inclui substâncias secretadas como as elicinas de oomicetos, que são proteínas de 10 kDa relacionadas à resistência de varias plantas à infecção por fungos (Kamoun e col., 1998) e as enzimas capazes de degradar a parede vegetal produzidas por bactérias e fungos. Estas enzimas digerem a parede das células da planta liberando fragmentos que se comportam como elicitores. Podem-se citar vários exemplos deste tipo de elicitores, lipopolisacarídeo (LPS) da parede de bactérias gram-negativas; flagelo eubacteriano; derivados da parede das células de fungos como glicanos, quitinas, mananos e proteínas (Aderem, 2000).

Necrosis and Ethylene inducing Proteins (NEP1)

Bailey (1995) aplicou filtrado de cultura de um isolado patogênico de *Fusarium oxysporum* em folhas de *Erythroxylum coca* observando indução de necrose e emissão de etileno. A partir desse filtrado conseguiu purificar uma proteína de 24 kDa que uma vez pingada sobre pecíolo da folha de *E. coca* causava os mesmos sintomas observados (necrose e aumento da emissão de etileno). Bailey (1995) demonstrou que a proteína era capaz de induzir os mesmos sintomas em uma ampla variedade de plantas dicotiledôneas, mas não conseguiu mostrar atividade em plantas monocotiledôneas. Quando Nep1 foi seqüenciada se observou que não estava relacionada com nenhuma proteína ou domínio funcional conhecido (Nelson, 1998). A proteína foi nomeada Nep1 (Necrosis and Ethylene Inducing protein) e classificada como uma família nova de elicitores.

Com o desenvolvimento dos métodos de análises da genômica e proteômica, proteínas semelhantes a Nep1 (NEP Like Proteins: NLPs) têm sido descritas em grande variedade de organismos expandindo rapidamente esta família de proteínas tanto em tamanho quanto em distribuição.

Genes codificadores de NLPs foram detectados em organismos procariontes e eucariontes. Em procariontes foi detectada em bactérias gram-positivas (*Bacillus halodurans* e *Streptomyces coelicolor*) e gram-negativas (*Erwinia* spp. e *Vibrio pommerensis* sp). Em eucariontes ocorre em fungos (*Fusarium oxysporum* e *Neurospora crassa*) e oomicetos. Dentro dos oomicetos se encontram os gêneros *Phytium* e *Phytophthora*. Este último grupo contém 65 espécies descritas onde cada uma é um patógeno de plantas, ocasionando grandes perdas na agricultura mundial. Oomicetos são considerados entre os patógenos de plantas mais prejudiciais no globo terrestre (Kamoun, 2003). Todos os oomicetos descritos apresentam genes que codificam para NLPs. Estes fatos têm levado a um interesse cada vez mais crescente por determinar a função desta nova família de proteínas e seu papel durante a interação planta-patógeno (Pemberton e Salmond, 2004).

Existem espécies de bactérias e fungos que não são patógenos de plantas contendo genes que codificam para NLPs no genoma, como *B. halodurans* e *N.*

crassa, respectivamente. A maioria destes genes foi identificada por análise de predição de seqüências, sem que existam evidências experimentais sobre a funcionalidade da proteína, pelo que se sugere que alguns possam ser pseudogenes.

È interessante o fato de que NLPs apesar de existirem em grupos tão distantes filogeneticamente mantiveram algumas características conservadas ao longo da evolução (Pemberton e Salmond, 2004). Todas as NLPs se caracterizam por apresentar um domínio NPP1 (Necrosis-inducing Phytophthora protein) (Fellbrich e col., 2002). O domínio NPP1 possui dois ou quatro resíduos de cisteína conservados. Gijzen e Nurberger (2006) classificaram as NLPs em dois grupos em dependência do número de cisteínas presentes, tipo I (duas cisteínas) e tipo II (quatro cisteínas). Outra característica comum do domínio NPP1 (independente do Tipo I ou II) é uma seqüência conservada de sete aminoácidos (GHRHDWE) localizada na região central da proteína. Todas as NLPs apresentam um peptídeo sinal na região amino-terminal que sinaliza a proteína para secreção.

Recentemente os genomas de *P. sojae* e *P. ramorum* foram seqüenciados revelando tamanhos de genoma de 95 e 65 Mbp, respectivamente (<http://www.jgi.doe.gov>). Análises de seqüência revelaram que a família NLP em oomicetos é grande e diversa estando codificada por 50-60 genes em cada espécie embora mais da metade dos genes preditos devem ser pseudogenes (Gijzen e Nurnberger, 2006). Nestas espécies, as NLPs parecem evoluir rapidamente. O grande tamanho da família NLP em *Phytophthora* está em contraste com o número de cópias do gene em outros organismos. O seqüenciamento dos genomas completos de *Magnaporthe griseae* e *Gibberella zeae* indicam que cada um destes fungos patogênicos apresenta quatro genes que codificam NLPs em seus genomas. Os genomas de *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus* contêm dois genes e *Neurospora crassa* apresenta uma única cópia no genoma. Em algumas espécies de bactérias patogênicas foi encontrado o gene que codifica para NLP em cópia única no genoma, mas a presença de NLP não é uma característica comum em genomas bacterianos. Os organismos do gênero *Phytophthora* são patógenos fundamentalmente de plantas dicotiledôneas onde

NLPs tem mostrado atividade. Estas evidências sugerem que as NLPs devem ter um importante papel no ciclo de vida destes organismos e em sua patogenicidade.

Atividade das NLPs nas células da planta

Uma importante característica das NLPs é a capacidade de ativar numerosas respostas de defesa nas plantas como a morte celular programada e indução de genes relacionados com patogenicidade (Jennings *et al.*, 2001; Veit *et al.*, 2001; Fellbrich *et al.*, 2002; Keates *et al.*, 2003; Verica *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2005). Trabalhos realizados para testar a sensibilidade de células animais, bacterianas e de fungos à ação das NLPs sugeriram que as células destes organismos não são afetadas pela atividade da proteína NEP1. *Vibrio pommerensis* é uma possível exceção já que a atividade hemolítica de contra eritrócitos humanos e animais foi mapeada na região que contém o gene que codifica para uma NLP, mas se desconhece se esta proteína é necessária para a atividade hemolítica (Jores *et al.*, 2003).

Existem evidências de que diferentes NLPs podem variar na capacidade de causar necrose em uma determinada espécie de planta e é possível que algumas não tenham nenhuma atividade. Gijzen (2006) se referiu a experimentos desenvolvidos por Kamoun (não publicados) onde foram testadas quatro NLPs diferentes de *P. infestans*. Esses estudos mostraram que só uma delas (PiNPP1.1) tinha atividade de necrose quando expressa em plantas usando um sistema de expressão baseado num vetor binário do vírus X da batata (PVX).

Recentemente, foi identificado e expresso um gene que codifica para NLP de *Hyaloperonospora parasítica*, um oomiceto biotrófico. Esta proteína não mostrou atividade de necrose (Gijzen e Nurnberger, 2006). Qutob (2002) comparou a atividade de quatro NLPs, cada uma de uma espécie diferente (*P. sojae*, *F. oxysporum*, *B. halodurans* e *S. coelicolor*) utilizando dois métodos, expressão baseada em vetor binário (*A. tumefaciens*-PVX) em *N. benthamiana* e expressão transiente via bombardeamento de partículas em tecidos de soja. A proteína de *P. sojae* foi o mais potente indutor de necrose em ambos ensaios seguido da Nep1 de *F. oxysporum*. Os ortólogos bacterianos mostraram atividades

muito fracas ou não mostraram atividade. A observação de que NLPs de organismos patogênicos induzem uma necrose mais severa do que NLPs de organismos não patogênicos de plantas (bactérias testadas), sugere uma associação entre a atividade necrótica de NLPs e a patogênese. Entretanto resultados diferentes foram obtidos mediante bombardeamento de partículas sugerindo que devemos ter cautela na hora de comparar resultados de experimentos usando ensaios diferentes (Qutob *et al.*, 2002; Gijzen e Nurnberger, 2006).

Experimentos de expressão transiente de NLPs via bombardeamento de partículas em tecidos de plantas mostraram que estas proteínas precisam do peptídeo sinal para causar a morte das células. A exposição de protoplastos a NLPs puras também mostrou que as células, mesmo desprovidas de parede celular mantinham a sensibilidade a NLPs morrendo pouco tempo após o tratamento (Gijzen e Nurnberger, 2006). Estes experimentos sugerem que as NLPs devem ser secretadas e talvez interajam com moléculas da membrana para desencadear uma cascata de reações que leva à morte da célula.

Fellbrish, *et al.* (2002) realizaram estudos para tentar determinar os requerimentos estruturais necessários para a atividade de necrose das NLPs. Estes autores construíram mutantes de deleção e de sítio dirigido na seqüência da NPP1. Seus resultados ilustraram a importância das duas cisteínas nas NLPs do Tipo I. Também mostraram que a atividade da NPP1 não pode ser reduzida a peptídeos ou a alguns motivos dentro da proteína. A única alteração que foi tolerada sem perda da atividade foi uma pequena deleção na extremidade carboxiterminal da proteína. Observaram também que NPP1 é instável na presença de calor. Estes resultados sugerem que a estrutura terciária é responsável pela atividade necrótica.

O mecanismo exato pelo qual as NLPs causam necrose é desconhecido. Alguns autores sugerem que a atividade de necrose pode ser consequência do aumento dos níveis de etileno (Bailey *et al.*, 1997), mas existem relatos de necrose induzida por NLPs sem aumento nos níveis de etileno (Bailey, 1995; Bailey *et al.*, 1997) sugerindo que outro mecanismo deve estar envolvido. As

células da planta respondem ativamente as NLPs e parecem entrar num estado hiper-defensivo antes da morte. Estas células liberam etileno, ativam MAP quinases, sintetizam fitoalexinas, induzem a transcrição de genes PR, aumentam os níveis de cálcio citoplasmático e produzem outras numerosas mudanças fisiológicas e de expressão gênica. Estudos de expressão de genes de cacau após o tratamento de folhas com a proteína NEP1 mostraram a superexpressão de 106 genes sendo que 8% deles são genes relacionados com a defesa contra patógenos e uma outra fração importante de genes está relacionada com o metabolismo energético (Verica *et al.*, 2004).

O tratamento de células de tabaco com NPP1 induziu a produção de proteínas relacionadas com patogenicidade da família PR1 (Fellbrich *et al.*, 2002). Keates (2003) tratou três espécies de plantas dicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*, *Centaurea maculosa* e *Taraxacum officinale*) com Nep1 e observou indução de genes relacionados com fosforilação reversível mediada por proteínas quinases e proteínas fosfatases que agem como reguladores primários de muitas vias de transdução de sinais. Este autor observou a indução de outros genes também relacionados com o processo de sinalização como a calmodulina, assim como também detectou a ativação de genes relacionados com o metabolismo de lipídios e a biossíntese de fitoalexinas. Esses estudos sugeriram que os processos primários envolvidos na resposta necrótica de plantas dicotiledôneas induzida por NEP1 são similares entre espécies envolvendo muitos genes associados com as respostas ao estresse.

NLPs são elicitores ou toxinas, ou ambos?

Estas respostas de defesas ativadas por NLPs em plantas dicotiledôneas são comparáveis à atividade de elicitores bem caracterizados denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). PAMPs são definidos como moléculas derivadas da superfície do patógeno capazes de se ligar a receptores de reconhecimento padrão e iniciar a ativação transcricional de genes da resposta imune, com a subsequente produção de compostos antimicrobianos (Boman, 1998). Alguns exemplos bem conhecidos são a proteína flagelina de *E. coli* (Felix,

1999) e um peptídeo de 13 aa. (Pep-13) de uma transglutaminase de *P. sojae* que se mostrou indispensável para ativar respostas de defesa (função elicitora) e a atividade enzimática da proteína (Nurnberger, 1994)..

Algumas características das NLPs estão mais próximas de toxinas do que de elicitores ou PAMPs. A pergunta chave é se NLP interage com algum receptor na planta hospedeira. Muitos pesquisadores estão a favor do modo de ação de elicitor das NLPs, mas Gijzem (2006) sugeriu não descartarmos a possibilidade das NLPs se comportarem como toxinas para a célula da planta abrindo poros na membrana ou interagindo com moléculas na membrana plasmática.

Existem numerosas toxinas bacterianas bem caracterizadas que atuam em células animais. O modo de ação destas toxinas é diverso, mas estima-se que um terço de todas as toxinas descritas se dispõe como estruturas formadoras de poros nas membranas do hospedeiro (Parker, 2005). Até hoje todas as tentativas por mostrar se NLPs causam formação de poros na membrana, falharam. Porém, estes resultados não são conclusivos porque as condições ou o material biológico podem não ter sido os mais apropriados.

Fellbrich (2002) sugeriu que NPP1 poderia ativar as respostas de defesa de forma indireta, através de uma atividade enzimática intrínseca ou devido a uma atividade tóxica. Isso poderia facilitar a liberação de elicitores endógenos da membrana plasmática da planta que ativariam as respostas de defesa.

Relação NLPs e patogênese

A fim de verificar a função de uma NEP, Bailey (2002) realizou os primeiros experimentos de transformação de *F. oxysporum* mediante interrupção e superexpressão do gene *Nep1*. Os resultados sugeriram que a expressão de *Nep1* não influenciava a agressividade ou virulência deste patógeno. Embora atualmente existam muitas evidências indicando um papel positivo das NLPs na virulência.

Amsellen (2002) realizou experimentos de transformação do fungo *Colletitrichum coccodes* com *Nep1* de *F. oxysporum*. Os resultados mostraram que *Nep1* aumenta dramaticamente a virulência de *C. coccodes*. Este fungo (*C.*

coccodes) é um patógeno de *Abutilon theophrasti*, uma erva daninha que resiste ao controle químico e é quase impossível de controlar em plantações de algodão. Estas duas plantas (algodão e *A. Theophrasti*) são naturalmente resistentes aos mesmos herbicidas porque são capazes de degradá-los usando as mesmas vias metabólicas daí a importância de encontrar métodos de biocontrole específicos para *A. theophrasti*. Os autores concluíram que a expressão de Nep1 em *C. coccodes* criou uma nova forma hipervirulenta do patógeno que pode ser utilizado para o controle biológico.

Experimentos realizados onde Nep1 é aplicada com surfactantes em *spray* foliar mostraram que a proteína é capaz de matar as células da planta e aumentar os sintomas de necrose (Bailey, 2000b). Estes experimentos estimularam a utilização de Nep1 como agente de biocontrole efetivo e a inclusão em formulações desenhadas com essa finalidade (Bailey, 2000a).

A virulência de *Erwinia carotovora* (bactéria gram-negativa) que causa podridão-mole, também é afetada por expressão da NLP endógena. A expressão do gene NLP de *E. carotovora* (Nip) leva à aparição de lesões maiores e maior podridão dos tecidos comparado com cepas idênticas que têm perdido o gene (Mattinen, 2004). Pemberton (2005) mostrou que o gene Nip de *E. carotovora* está sob controle da molécula sinal N-3-(oxo-hexanoil)-L-homoserina lactona, característica do fenômeno chamado “quorum sensing”. Este é um tipo de mecanismo de regulação da expressão gênica comum em bactérias que se dá através de sinalização celular. Em *E. carotovora*, o sistema quorum sensing regula a expressão de múltiplos fatores de virulência. O fato de que a expressão de Nip esteja sob o mesmo controle sugere que desempenha algum papel na virulência.

Padrões de expressão de NLPs em oomicetos também sugerem que esta proteína facilita a infecção. Em *P. sojae* os maiores níveis de transcritos codificando PsojNip foram detectados após da transição da fase biotrófica para necrótrfica (Qutob e col., 2002).

Hipótese e Objetivos do trabalho

O grupo de evidências citado constitui um forte argumento para sugerir que NLPs tem um papel positivo como fatores de virulência durante a interação planta-patógeno.

A análise do genoma de *M. pernicioso* permitiu identificar genes codificadores de proteínas com similaridade à família de proteínas NLPs. A partir destes dados surge a nossa hipótese de trabalho: ***os genes mpneps codificam proteínas indutoras de necrose e etileno que podem estar relacionadas com o desenvolvimento dos sintomas na Vassoura-de-bruxa.*** A inativação desses genes poderia fornecer ferramentas úteis para o bloqueio da progressão da doença.

Para verificar se a hipótese anterior é válida, o trabalho se propõe os seguintes objetivos:

OBJETIVOS

1. Caracterização dos genes *mpneps* no genoma de *M. pernicioso*;
2. Clonagem e expressão dos genes *mpneps* em *E. coli*; purificação das MpNEPs de *M. pernicioso*;
3. Verificação da atividade biológica das MpNEPs em plantas;
4. Estudos de expressão gênica das MpNEPs *in planta* e *ex planta*;
5. Caracterização estrutural das NEPs de *M. pernicioso*;
6. Interpretação do possível papel das MpNEPs na interação *M. pernicioso*-cacaueiro.

Materiais e Métodos

Condições de crescimento de Moniliophthora perniciosa e Phytophthora parasítica

Moniliophthora perniciosa: a cepa usada foi derivada de uma cultura monospórica de *M. perniciosa* isolado CP02 do biótipo C. O isolado foi coletado no sudeste da Bahia pelo Prof. Julio Cascardo da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em Ilhéus, Bahia. Este isolado apresenta patogenicidade em plantas susceptíveis de cacau. A confirmação da patogenicidade é realizada a cada seis meses de manutenção da cultura em condições de laboratório.

Micélio biotrófico de *M. perniciosa*: O micélio biotrófico foi obtido a partir de esporos germinados em meio contendo 5 g L⁻¹ extrato de leveduras, 1 mL L⁻¹ MPR elementos traça, 50 mL L⁻¹ glicerol, 2,5 g L⁻¹ K₂HPO₄, ácido indol 3 acético (IAA) 10 µg mL⁻¹, cafeína 5µg mL⁻¹ (Meinhardt, *et al.*, 2006) permitindo o crescimento de hifas mononucleadas sem grampos de conexão.

Micélio necrotrófico de *M. perniciosa*: o micélio necrotrófico foi crescido em 50 ml de meio líquido contendo 1% glicose, 1% NH₄H₂PO₄, 0,2% KCl, 0,2% MgSO₄.7 H₂O, 0,5% extrato de leveduras, 0,05% CuSO₄.5H₂O e 0,001% ZnSO₄.7 H₂O e o pH ajustado a 6,8 com NaOH. As culturas foram colocadas em incubadora (BOD) a 28°C em condições estacionárias. Este micélio foi crescido também no meio de crescimento do micélio biotrófico para estudo comparativo da expressão gênica em ambas as fases.

Phytophthora parasítica: a linhagem utilizada foi crescida em placas. O micélio foi inoculado em meio líquido nas mesmas condições descritas para *M. perniciosa*.

Análise de seqüências das MpNEPs:

As seqüências dos genes codificadores das NLPs de *M. perniciosa* (denominados *MpNEPs*) foram identificados utilizando a seqüência de proteína de NPP1 (AAK19753) para a realização de tblastn contra o banco de dados do

genoma de *M. perniciosus*. A identificação das ORFs (*Open Reading Frame*) completas foi realizada utilizando a ferramenta ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Uma vez obtidas as possíveis ORFs codificadoras de MpNEPs, as similaridades destas proteínas com a família de proteínas NLPs foi verificada mediante análises de blastp contra banco de dados públicos (Nr).

Para realizar estudos de análise filogenética das MpNEPs foram utilizadas as ferramentas blastp e tblastn (Altschu e col., 1990; McGinnis e Madden, 2004) na busca de seqüências de proteínas pertencentes à família das NLPs publicadas em bancos de dados utilizando a seqüência do gene MpNEP1 como referência. As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Higgins e col., 1996). A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining*) usando a matriz de transição PAM (Dayhoff e col., 1972), e a robustez do ramo foi verificada usando 1000 bootstrap (Felsenstein, 1985). As inferências filogenéticas foram obtidas usando o programa MEGA 3 (Kumar e col., 2004). As NLPs são proteínas secretadas e por tanto possuem peptídeo sinal. Esta região das proteínas foi identificada mediante análises de predição usando o programa SignalP3 (Bendtsen e col., 2004). Para as análises filogenéticas a seqüência correspondente ao peptídeo sinal foi removida por causa da sua variabilidade de seqüências. O fato de remover o peptídeo sinal não afeta a topologia da árvore.

As ferramentas de blast (tblastn e tblastx) foram usadas para analisar a presença de genes homólogos de MpNEPs em outros basidiomicetos, particularmente aqueles com genoma quase ou totalmente seqüenciado: *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coprinus cinereus* e *Laccaria bicolor*.

Para estudar a possibilidade dos genes MpNEPs estarem envolvidos em eventos de Transferência Horizontal de Genes (HRT) foram analisados dois parâmetros fundamentalmente: uso de códons e conteúdo de GC dos genes MpNEPs em comparação com o uso de códons e conteúdo de GC característicos do genoma de *M. perniciosus*. O uso de códons de *M. perniciosus* foi determinado

usando o programa “CUSP” da EMBOSS (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/cusp.html>). O programa “SYco” foi utilizado para comparar o uso de códons de MpNEPs com o uso de códons da totalidade dos genes de *M. pernicioso* e de *Phytophthora infestans*. O conteúdo de GC dos genes MpNEPs foi calculado usando um algoritmo disponível no Laboratório de Bioinformática do LGE chamada de janela deslizante. Essa ferramenta permite percorrer uns 200pb do *contig* em busca de regiões codificantes determinando o conteúdo de GC desse gene ou fragmento de gene. Posteriormente a janela se desliza mais 200pb calculando os mesmos parâmetros e assim até percorrer o *contig* completo. Essa ferramenta é usada para todo o genoma estimando assim o conteúdo de GC do genoma.

Os dados obtidos mediante análises de seqüência do genoma de *M. pernicioso* em relação ao número de genes MpNEPs presentes foram confirmados experimentalmente mediante Southern Blot.

Southern blot

O primeiro passo para a realização do *Southern Blot* é a obtenção do DNA cromossomal do fungo *M. pernicioso*.

Extração de DNA cromossomal do fungo:

A extração de DNA genômico do fungo *M. pernicioso* na fase necrótrfica foi realizada utilizando o protocolo de CTAB (cetil-trimetil brometo de amônio) (Zolan, 1986). O micélio foi filtrado para a eliminação do meio de cultura e imediatamente foi macerado em nitrogênio líquido. O micélio macerado foi distribuído em tubos de microcentrifuga eppendorf e foram adicionados 500 µl de tampão de extração previamente aquecido a 65°C (3% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% PVP, 0,2% 2-mercaptoetanol). Os tubos foram submetidos a agitação vigorosa e incubados a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente adicionaram-se 500 µL de fenol:clorofórmio:isoamilalcol (25:24:1) e se agitou vigorosamente durante 1 min. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 5 min. A fase aquosa foi submetida ao mesmo procedimento até a interface não ficar turva. Para a precipitação do DNA genômico adicionaram-se 1/10 Vol de acetato de potássio 3M pH 8,0 e 2 Vol de etanol e se incubou em gelo durante 15 min. O

precipitado de DNA foi obtido por centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. Depois da lavagem com etanol 70%, o DNA foi resuspendido em 100 μ L TE (10 mM TrisCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). O DNA cromossomal foi estocado a 4°C.

Digestão do DNA cromossomal do fungo com enzimas de restrição:

Para realizar a técnica de hibridação de *Southern blot*, 10 μ g de DNA genômico do fungo foram digeridas com enzimas de restrição que não cortam o gene *MpNEP1* (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* e *BamHI*) e com enzimas de restrição que cortam a seqüência de nucleotídeos de *MpNEP1* em um sítio único (*BglII* e *ClaI*). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferidos para membrana de "náilon" (Amersham, EUA) por capilaridade usando o procedimento de transferência alcalina (Sambrook, 2002).

Obtenção do gene *MpNEP1* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a preparação da sonda:

A hibridação foi realizada utilizando como sonda o gene codificador da *MpNEP1* sem o peptídeo sinal, amplificado com oligonucleotídeos específicos (*MpNEP1-F* e *MpNEP1-R*) cujas seqüências se apresentam na Tabela 1. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20 μ l utilizando 15 pM de cada primer, 2 mM $MgCl_2$, 0,25 mM de cada dNTP, 1X tampão Taq Polimerase (Amersham, EUA), 1U de Taq Polimerase (Amersham, EUA) e como molde 0,2 μ g de DNA genômico do fungo. O tubo de microcentrifuga eppendorff (0,5 ml) com a mistura de reação foi colocado em termociclador (Peltier Thelmal Cycler PTC-225) programado da seguinte forma: Um passo inicial de 3 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 40 seg a 95°C, 40 seg 58°C e 1 min a 72°C. Finalmente a reação foi colocada a 72 °C por 5 min.

Purificação do gene *MpNEP1* para preparação da sonda:

O produto da reação de PCR foi submetido a um processo de purificação a partir de gel de agarose. Com essa finalidade, ao produto da reação de PCR foi adicionado 0,2 Vol de tampão de amostra 6x (2,5 mg mL⁻¹ bromofenol azul, 2,5 mg mL⁻¹ xilen cianol, 30% (v/v) glicerol, 60 mM EDTA pH 8,0) e a mistura foi aplicada em gel de agarose 0.8%. A eletroforese se realizou em TAE 1X (40 mM Tris - Acetato pH 7,8; 1 mM EDTA), a 60 Volts por 90 minutos aproximadamente. A

região do gel contendo o gene *MpNEP1* foi cortada e o DNA purificado usando o kit de purificação de fragmentos de DNA isolados de gel de agarose S.N.A.P.™ (Invitrogen, EUA).

Marcação da sonda para hibridação:

A marcação da sonda foi realizada com [α - 32 P] dATP (>3000Ci/mmol, Amersham Bioscience, EUA) utilizando oligonucleotídeos randômicos (pdN6). A reação foi realizada em 20 μ l de volume final. O primeiro passo consistiu em misturar 50 ng do gene *MpNEP1* purificado, 2 μ g de pdN6, 1,5 mM de dNTPs sem dATP e 1X tampão klenown. Esses componentes da reação foram colocados a 95°C durante 10 min. Posteriormente foram adicionados 1 μ l de [α - 32 P] dATP e 1U da enzima klenown (Promega). A reação foi incubada por 30 min a 37°C. O excesso de nucleotídeos radiativos foi descartado mediante purificação da sonda com colunas Sephadex G25 (Amersham, EUA) segundo recomendações do fabricante.

Hibridação da membrana com a sonda *MpNEP1* marcada:

A membrana foi pré-hibridada durante 6 horas a 65°C em uma solução contendo 2% SSPE, 1% SDS, 0,5% Blotto, 10% dextran sulfato e 0.5 mg mL⁻¹ de esperma de salmão e hibridada durante 16 horas nas mesmas condições com a adição da sonda marcada. A membrana foi lavada durante 15 min a 42°C com três soluções variando as concentrações de SSC (2X, 0,5X e 0,1X) e 0,1% SDS. A última lavagem foi realizada durante 15 min a 65°C. A auto-radiografia foi realizada a -70°C usando filmes Kodak X-ODAT durante 72 horas.

Eletroforese em gel de campo pulsado (Pulse Field):

Para determinar a localização dos genes *MpNEPs* nos cromossomos de *M. perniciosus* foi utilizada a técnica de Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulse field*). Os cromossomos de *M. perniciosus* foram separados mediante eletroforese em gel de campo pulsado, usando um aparelho de gel DRII CHEF (Bio Rad) e arbitrariamente numerados em ordem decrescente como descrito por Rincones e col. (2003). O gel foi transferido para membrana de “náilon” Hybond N+ utilizando o método de transferência alcalina (Sambrook, 2002). O gene

MpNEP1 foi utilizado como sonda. A obtenção e preparação da sonda, condições de pré-hibridação e hibridação foram semelhantes às descritas no protocolo de *Southern blot*.

Clonagem e expressão dos genes MpNEPs e NPP1

Para caracterizar tanto funcional quanto estruturalmente as proteínas MpNEPs (*MpNEP1* e *MpNEP2*), os genes codificadores para estas proteína foram clonados, expressos e as proteínas purificadas para posteriores ensaios de inoculação em plantas. O gene *npp1* (AF352031) de *Phytophthora parasitica* foi utilizado como controle já que codifica para uma proteína NPP1 (AAK19753) cuja função de indução de necrose fora comprovada (Fellbrish, 2002). Os três genes foram clonados em sistema de expressão de *E. coli* usando a série dos vetores pET.

Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos para amplificação dos genes MpNEPs de *M. pernicioso* foram desenhados baseado na seqüência dos genes sem incluir a região do peptídeo sinal e com temperaturas de melting (T_m) superiores a 55°C. O Prof. Julio Cascardo (UESC, Ilhéus, Bahia) desenhou oligonucleotídeos para a amplificação de um fragmento do gene de actina de *M. pernicioso*, e oligonucleotídeos para a amplificação de um fragmento do gene ribossomal de cacau 18S. O programa Primer3 (primer3_www.cgi v 0.2) foi utilizado para análise de autocomplementaridade dos oligonucleotídeos. A Tabela 1 mostra uma lista dos oligonucleotídeos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

Determinação da concentração de ácidos nucléicos:

A concentração de DNA ou RNA foi determinada por espectroscopia de absorção-UV. Foi medida a densidade ótica (OD) a 260 nm. As concentrações foram calculadas usando coeficiente de extinção molar $\epsilon = 0,03 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ mL}$ para DNA simples fita e $\epsilon = 0,02 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ mL}$ para DNA de dupla fita.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes de interesse. A região sublinhada corresponde com o sítio de restrição.

Gene	Seqüências 5' - 3'	Sítio de restrição
MpNEP1	F: GGAATTCCATATGGCTCCACATCAGCTTCC R: CGGGATCCTTACTACCACATCCAAGCCC	NdeI BamHI
MpNEP2	F: CGTCTCAGGATCCATTGCCGGC R: CCAAGCTTTCACTACTACCACATCCAAGCC	BamHI HindIII
NPP1 AF352031	F: GGAATTCCATATGGACGTGATCTCGCACGATGC R: CGGGATCCTTACTAAGCGTAGTAAGCGTTGCC	NdeI BamHI
Mp-actina EF066485	F: CCACAATGGAGGACGAAGTCG R: CCCGACATAGGAGTCCTTCTG	
TC-S18	F: CAAGCGATCTTTTCGTAGGC R: CGAAGATAAAATCCGAGCTTGT	

Estratégia de clonagem

Os genes MpNEP1 e MpNEP2 sem o peptídeo sinal foram amplificados a partir do DNA genômico utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). NPP1, (também sem peptídeo sinal), foi amplificada usando os oligonucleotídeos NPP1-F e NPP1-R (Tabela 1) a partir de DNA genômico de *Phytophthora parasítica*. As reações de amplificação por PCR foram realizadas segundo o protocolo descrito na seção de *Southern blot* (obtenção do gene MpNEP1 para preparação da sonda), utilizando o mesmo programa de amplificação.

Para a clonagem, os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição cujos sítios de reconhecimento foram inseridos nas seqüências dos oligonucleotídeos. Os vetores de expressão foram digeridos com as enzimas de restrição correspondentes. MpNEP1 foi clonada em *NdeI-BamHI* (Invitrogen, EUA) no pET15b (Figura 3), MpNEP2 foi clonada no laboratório do Prof. Dr. Julio Cascardo (UESC/Ilhéus, Bahia) utilizando o vetor pET28a (Figura 4) nos sítios *BamHI-HindIII* (Invitrogen, EUA) e NPP1 foi clonado no pET28a usando os sítios *NdeI-BamHI* (Invitrogen, EUA). Para a realização das reações de digestão dos plasmídeos e dos genes, assim como para as reações de ligação foram seguidas as recomendações dos fabricantes.

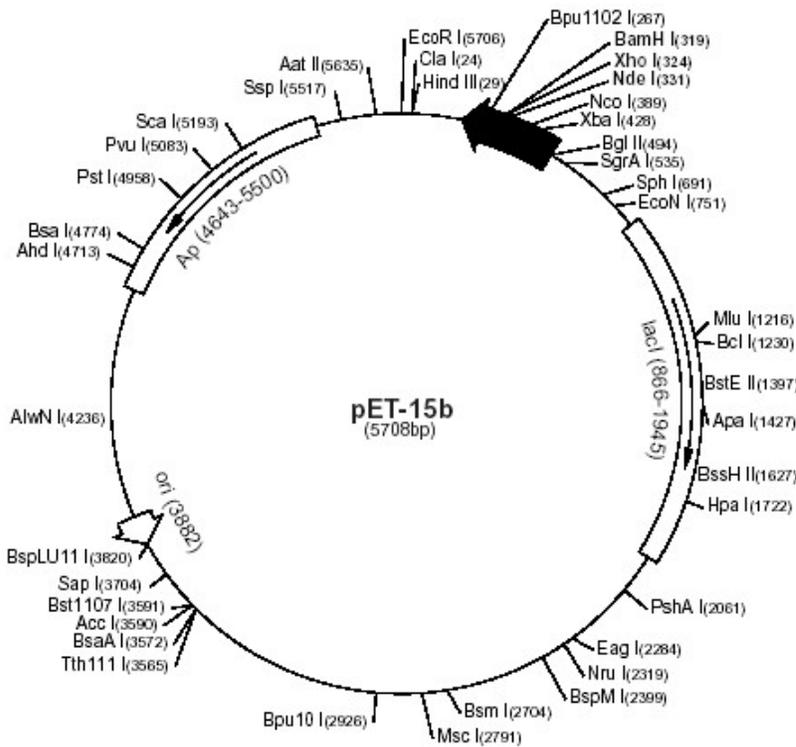


Figura 3. pET 15b (Invitrogen, EUA):

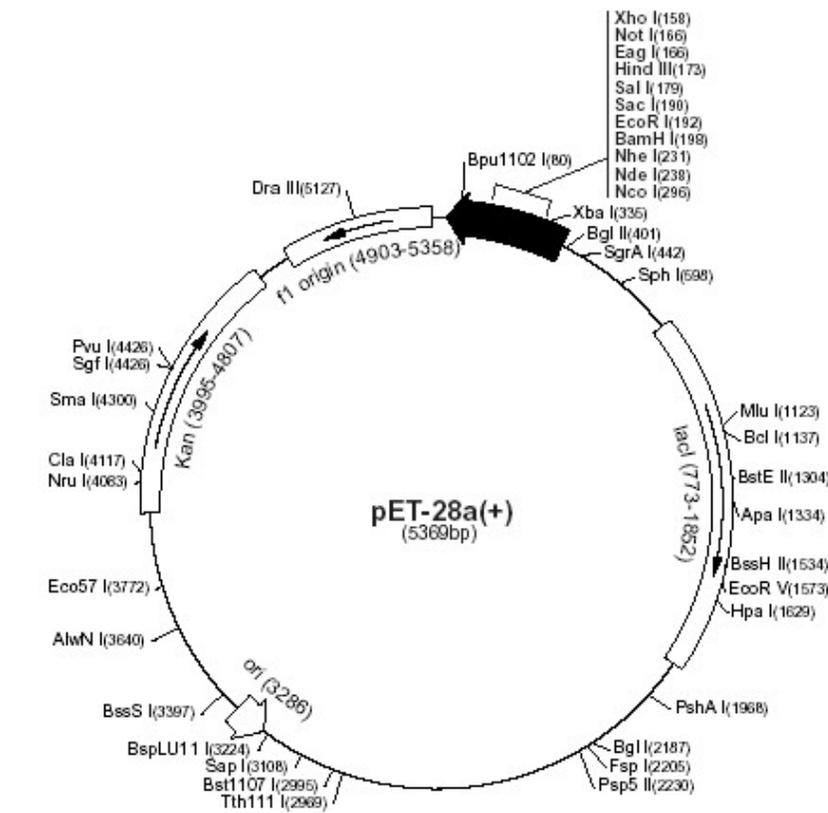


Figura 4. pET 28a (Novagem):

Uma vez realizada a reação de ligação se procedeu à transformação dos produtos da reação e à posterior seleção dos plasmídeos recombinantes. Foram utilizadas várias linhagens de bactérias *E. coli*:

- DH10b (Invitrogen, EUA); Genótipo: F^- endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL Δ lacX74 Φ 80lacZ Δ M15 araD139 Δ (ara,leu)7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ^- (Grant, 1990). No presente trabalho esta linhagem foi utilizada para a seleção de plasmídeos recombinantes durante a clonagem.
- BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen, EUA); Genótipo: F^- ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R). Linhagem utilizada para expressão de proteínas recombinantes. Esta linhagem é crescida em presença de cloramfenicol para manter o plasmídeo pLysS dentro da bactéria já que apresenta marcador de resistência para este antibiótico. O plasmídeo pLysS codifica a lisozima do fago T7 que forma um complexo com a T7 polimerase inibindo a transcrição. Esta interação reduz (quase elimina) o vazamento do promotor T7 (expressão em estado de não indução) permitindo um maior controle da expressão do gene recombinante (Moffatt, 1987).
- BL21 (DE3) pT-Trx: Genótipo: F^- ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pT-Trx (Cm^R). Linhagem utilizada para expressão de proteínas recombinantes. Esta linhagem é capaz de co-produzir a tioredoxina (Trx) de *E. Coli* aumentando as possibilidades de solubilidade da proteína recombinante.

As linhagens foram crescidas a 37°C em meio Luria Bertani (LB) (1% Triptona, 0,5% extrato de leveduras, 0,5% NaCl) com o cloramfenicol (no caso das linhagens derivadas de BL21 DE3) e em ausência de antibiótico (no caso da linhagem DH10b); para meio sólido utilizou-se 1,5% agar. Posteriormente se procedeu à preparação de células competentes destas linhagens.

Preparação de células competentes

As células competentes de todas as linhagens utilizadas foram preparadas segundo o protocolo descrito por Miller (1995). A partir de uma colônia nova da linhagem preparou-se um pré-inoculo em 50 ml de meio LB líquido. Incubou-se a 37°C em agitação (250 rpm) durante 12h. A partir desse pré-inoculo se preparou um novo inoculo em 500 mL de meio com uma absorbância inicial de OD_{600 nm} 0,1. O novo cultivo foi incubado a 37°C em agitação (250 rpm) até atingir OD_{600 nm} 0,6 - 0,8. Atingida a OD, as células foram incubadas em gelo por 20 min e posteriormente foram centrifugadas a 4000 g por 15 min. a 4°C. O sobrenadante é descartado e as células foram resuspendidas em igual volume (500 mL) de glicerol 10% gelado. Procedeu-se a centrifugação (nas condições anteriormente descritas). Posteriormente se realizaram dois passos consecutivos, idênticos ao descrito de resuspensão em 250 mL e 20 mL de glicerol 10% respectivamente. Finalmente as células foram resuspendidas em 2 mL de glicerol 10%, aliquotadas em alíquotas de 40 µL e congeladas em nitrogênio líquido. As células foram estocadas a -70°C.

Transformação de células competentes

A transformação das células competentes com os produtos das reações de ligação foi realizada por eletroporação utilizando cubetas de 0,1 cm (Bio Rad). As células competentes da linhagem DH10b foram descongeladas em gelo e adicionou-se o DNA (5µL da reação de ligação). Após 1 min de incubação a temperatura ambiente, a cubeta com a mistura foi colocada no *MicroPulser* (BioRad) e submetida a impulso elétrico de voltagem 1,8 kVolts. Imediatamente adicionou-se à cubeta 1 mL de meio de cultura LB. Depois de incubar 1h a 37°C sob leve agitação, colocou-se para crescer em placas contendo LB mais o antibiótico correspondente.

Seleção dos transformantes

A extração de DNA plasmidial das colônias contendo possíveis clones recombinantes foi realizada segundo Sambrook *e col.* (1989). A seleção dos transformantes foi realizada por análise de restrição usando as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL

utilizando 0,5 µg de DNA ou 5 µL da mini-preparação plasmidial misturado com 1X tampão correspondente (Invitrogen, EUA), 2U de cada enzima de restrição (Invitrogen, EUA). Depois de 2 h de incubação a 37°C, 2 µL de tampão de aplicação 6X foram adicionados à reação. Os resultados foram visualizados em gel de agarose mediante a liberação de um fragmento do tamanho esperado. Os possíveis clones positivos segundo as análises de restrição foram submetidos à amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 1).

Sequenciamento de DNA

Para a verificação das seqüências dos três genes clonados (MpNEP1, MpNEP2 e NPP1) se procedeu ao sequenciamento dos genes. Com estes fins foi utilizado o protocolo do *kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences) segundo recomendações do fabricante. O DNA (correspondente aos plasmídeos recombinantes (pET15b+MpNEp1; pET28a+MpNEP2; pET28a+NPP1) produto da mini-preparação plasmidial foi purificado usando colunas GFX (Amersham, EUA) segundo recomendações do fabricante. Para a reação de sequenciamento foram utilizados de 50 - 200 ng do plasmídeo e misturados com 1 µL de oligonucleotídeo específico para cada gene a uma concentração de 5 pM µL⁻¹ e 8 µL da mistura de reação (Amersham, EUA) em 20 µL de volume total. Para cada gene clonado foram realizadas duas reações de sequenciamento usando os oligonucleotídeos F e R de cada gene (Tabela 1). As reações foram colocadas em termociclador com o seguinte programa: desnaturaçãõ a 90°C por 20 seg., anelamento a 57°C por 15 seg. e extensão a 60°C por 60 seg. Esse ciclo foi repetido 25 vezes. Os produtos da reação foram purificados mediante precipitação com 95% etanol e 2 µL tampão 1,5 M acetato de sódio (pH > 8,0) /50 mM EDTA (Amersham, EUA) seguido por lavagem com 70% etanol. Depois dos precipitados de DNA estarem secos, foram resuspendidos em tampão de aplicação e aplicados no seqüenciador (ABI Prism 377 sequencer). Os cromatogramas resultantes foram analisados utilizando o programa Chromas.

Transformação em linhagens de expressão de *E. coli*

Os plasmídios recombinantes foram transformados em linhagens de *E. coli* derivadas de BL21 (DE3). Os plasmídios pET15-MpNEP1 e pET28-MpNEP2 foram transformados em células BL21 (DE3) pLysS enquanto pET28-NPP1 foi transformada em células de BL21 (DE3) pT-Trx. Foi utilizado o protocolo de eletroporação descrito anteriormente.

Métodos para a obtenção das proteínas recombinantes puras:

Expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão de proteínas, colônias das linhagens de expressão contendo cada uma das construções (pET15b+MpNEP1; pET28a+MpNEP2; pET28a+NPP1) foram crescidas em 50 mL de meio LB com os respectivos antibióticos (Tabela 2) durante 16 horas a 37°C, 250 rpm. Foi determinada a densidade óptica do pré-inóculo a OD₆₀₀ nm. A partir dessas medições, alíquotas dessas culturas foram adicionadas em 0,5 L de LB com antibióticos ficando a uma OD₆₀₀ nm de 0,1. Estas culturas foram crescidas em erlenmeyers de 3 L e agitação de 250 rpm garantindo uma correta aeração. Quando as culturas atingiram OD₆₀₀ nm de 0,8, a expressão de proteínas foi induzida nas três culturas mediante a adição de 1 mM isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG). A indução foi realizada a 28°C sob agitação de 250 rpm durante três horas. Ao término desse tempo, as células foram coletadas por centrifugação (10 min a 6.000 rpm). As células foram resuspendidas em 0,01 vol do tampão 10 mM Tris-HCL, pH 8,0; 500 mM NaCl, 5mM imidazol, 2% Tritón X-100 e um cocktail de inibidores de proteases (1 mM PMSF, 1 µg mL⁻¹ leupeptina, 1 µg mL⁻¹ pepstatina) e procedeu-se a lise das células.

Lise das células

As células contendo tanto MpNEP1 quanto MpNEP2 foram submetidas a dois passos de congelamento-descongelamento. Este procedimento contribui na lise das células de BL21 (DE3) pLysS por possuir o plasmídio que expressa lisozima, capaz de degradar a parede celular. Posteriormente se adicionam 0,01 Vol do mesmo tampão sem Tritón X-100 e se procede à sonicação das amostras

com 3 pulsos de 15 seg. alternados com o mesmo tempo de incubação em gelo. As células de NPP1 foram resuspendidas no mesmo tampão e sonicadas diretamente. Posteriormente, o produto da lise foi incubado com 2% de sulfato de estreptomicina durante 30 minutos a 4°C para precipitar o DNA. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 18.000 rpm durante 1h a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em géis de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE) para a determinação da presença da proteína solúvel. Posteriormente se procedeu à purificação das proteínas.

Purificação de proteínas

Para a purificação das proteínas se utiliza uma propriedade do vetor de produzir a proteína recombinante como uma proteína fusionada a uma cauda de histidinas. Esta característica permite utilizar cromatografia de afinidade a metais para a purificação. Com esses fins, colunas de 1 mL do tipo Hi-Trap chelating (Amersham, EUA) foram carregadas previamente com Ni²⁺ seguindo as recomendações do fabricante e equilibradas com o tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol) com fluxo de 1 mL min⁻¹. Posteriormente os sobrenadantes da lise foram aplicados. Lavagens sucessivas com o mesmo tampão, mas formando um gradiente de imidazol de 30 - 200 mM até a eluição da proteína. As frações contendo a proteína pura foram dializadas contra o tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl (tampão TNB). A pureza das proteínas foi confirmada por SDS-PAGE. A Tabela 2 mostra um resumo dos vetores, linhagens e marcadores de seleção usados para a clonagem dos plasmídeos de expressão recombinantes e o crescimento das bactérias transformadas. Apresenta também, os valores da massa molecular calculada para cada proteína usando o programa Peptide Property Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>).

Quantificação de proteínas

A concentração das proteínas foi determinada por espectroscopia de absorção de UV a OD₂₈₀ nm. A concentração das proteínas foi calculada utilizando o coeficiente de extinção (ϵ) e a massa molecular. A Tabela 2 mostra os

coeficientes de extinção molar calculados para as proteínas de fusão MpNEP1, MpNEP2 e NPP1.

Tabela 2. Vetores e linhagens utilizadas para expressar as proteínas MpNEPs e NPP1. Peso Molecular e coeficiente de extinção molar calculados para cada proteína.

Gene	Vetor de clonagem	Linhagem de expressão	Marcadores de seleção	PM Proteína de fusão (kDa)	Coefficiente de Extinção ($\epsilon = \text{cm}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
MpNEP1	pET15b	BL21(DE3)pLysS	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicilina 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cloranfenicol	25	54720
MpNEP2	pET28a	BL21(DE3)pLysS	30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamicina 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cloranfenicol	26	53440
NPP1	pET 28a	BL21(DE3)pT-Trx	30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamicina 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cloranfenicol	27	46610

SDS-PAGE

As proteínas foram analisadas usando géis descontínuos de 12,5 - 15% (29:1 acrilamida:bisacrilamida); 0,75 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS para separação das proteínas e um gel concentrador de 5% (29:1 acrilamida:bisacrilamida), 120 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS. O tamanho do gel foi de 10 cm x 10 cm x 0,75 mm (minigel). As amostras foram diluídas com igual volume do tampão 2X (0,4 mg mL^{-1} bromofenol azul; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% (v/v) glicerol; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) 2-mercaptoetanol) e fervidas durante 2 min. antes da aplicação no gel. A corrida foi realizada a 110 Volts usando como tampão de corrida 50 mM Tris, 0,38 M glicina, 0,1 % SDS. Depois da corrida, as proteínas foram visualizadas por tingimento com coomassie (Laemmli, 1970). Foram aplicadas 0,2 μM de cada proteína em estudo (MpNEP1, MpNEP2 e NPP1). O Padrão de Peso Molecular utilizado apresenta-se na Tabela 3.

Tabela 3. Padrão de Peso Molecular de Proteínas.

Marcador de baixo peso molecular (LMW, Amersham-Pharmacia, 17-0446-01):					
94 kDa	67 kDa	43 kDa	30 kDa	20 kDa	14.4 kDa

Eletroforese em gel nativo

Para realizar estudos sobre o estado de agregação das proteínas foi utilizada a eletroforese de proteína em condições não desnaturantes. A composição dos géis e dos tampões utilizados é a mesma já descrita para SDS-PAGE (Laemmli, 1970), mas sem a adição de SDS. Foram utilizadas as mesmas

concentrações de proteína que para SDS-PAGE e as amostras não foram fervidas antes da aplicação no gel. A corrida foi realizada a 80 Volts em câmara fria (4°C).

Coloração com coomassie blue

Após SDS-PAGE, as bandas de proteína foram visualizadas mediante a adição de solução de coomassie blue que contém (5 mg mL⁻¹ Coomassie Blue R; 45% (v/v) etanol; 5% (v/v) ácido acético) por 45 min e descorar com solução (40% (v/v) etanol absoluto; 10% (v/v) ácido acético) durante 30 min, repetindo este último passo várias vezes.

Produção de anticorpos policlonais em coelho

A proteína MpNEP2 pura foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais. Foram diluídos 300 µg de proteína em 350 µL de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄) e homogeneizadas com 500 µL de adjuvante completo de Freund (Sigma, São Paulo). O imunógeno foi inoculado por via subcutânea. Uma segunda dose foi administrada uma semana depois usando a mesma via de inoculação, porém a proteína foi homogeneizada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma, São Paulo). Dez dias após a segunda dose, o coelho foi sangrado e o soro obtido foi analisado por Western Blot.

Western Blot

Para realizar experimentos de *Western blot*, as proteínas foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas à membrana de nitrocelulose usando o *Western Blotting MiniProtean II* (Bio-Rad). A transferência foi realizada durante 1h a 400 mA em tampão de transferência (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM Glicina, 20% metanol). Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 1h a 37°C sob agitação com leite desnatado 5% em TBS (125 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8,0). Foram utilizados dois tipos de anticorpos primários: conjugado anticorpo monoclonal anti-His tag-peroxidase (Sigma) e anticorpo policlonal anti-MpNEP1 produzido em coelho. A membrana foi incubada durante 1h a 37°C sob agitação com o anticorpo primário diluído em TBS 1:2000. Foram realizadas lavagens sucessivas da membrana com TBS+0,05% Tween-20. No caso do conjugado anti-His tag-peroxidase, se procedeu ao revelado colocando o substrato da peroxidase diretamente. Para o anti-MpNEP2, a membrana foi incubada durante 1h a 37°C

sob agitação com o conjugado peroxidase-anticorpo anti-coelho (Promega) diluído em TBS 1:2500 segundo recomendações do fabricante. Para revelação foi utilizado como substrato da peroxidase o reagente AEC (3-amino-9-etilcarbazol) (Sigma) segundo as recomendações do fabricante.

Espectrometria de Massas

Para comprovar a identidade de cada uma das proteínas em estudo foi utilizada a técnica de Espectrometria de massas aproveitando os serviços oferecidos no laboratório de Espectrometria de massas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) dirigido pelo Prof. Dr. Fabio Gozzo.

A técnica de espectrometria de massas permite a identificação de uma proteína a través da estimativa das massas dos peptídeos que a compõem. Para isso as proteínas são submetidas à digestão com tripsina. Essa digestão pode ser com a proteína em solução ou a partir de amostras de gel de SDS-PAGE. Neste trabalho, 0,5 mg de cada proteína - MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 - foram submetidas a SDS-PAGE. O fragmento de gel contendo a banda de proteína (para cada caso) foi picotado em placa de vidro previamente limpa com acetona e etanol. Posteriormente foram lavados (3X de 15 min.) com 200 μL de 25 mM NH_4HCO_3 em 50% de ACN pH 8,0 e submetidos a agitação. A última lavagem foi realizada com 200 μL de água Milli-Q. Foram adicionados 25 μL de 10mM DTT em 25 mM NH_4HCO_3 e os tubos colocados a 56 °C por 1 hora. Após esse tempo se descartou o sobrenadante e se adicionaram 25 μL de 55 mM de iodoacetamida e se incubou a temperatura ambiente por 45 min no escuro. Posteriormente foi descartado o sobrenadante e os fragmentos de gel foram lavados (3X) com 200 μL de ACN 50% em 25 mM NH_4HCO_3 e uma lavagem final com 200 μL de água Milli-Q. Para a desidratação do gel foram adicionados 100 μL de ACN 100%. Posteriormente as amostras foram secas em *Speed Vac* por aproximadamente 20 min.

Para a digestão enzimática, os fragmentos de gel desidratados e secos foram cobertos com 15 μL de uma solução de tripsina (20 ng μL^{-1}) e se incubou 10 min a 4°C. Após esse tempo, foi adicionado NH_4CO_3 25 mM até cobrir os fragmentos de gel e incubados a 37°C por 16-24 horas.

Para a extração dos peptídeos, o sobrenadante contendo os produtos da digestão com tripsina (peptídeos da proteína de interesse) transferiu-se para outro tubo e adicionaram-se 50 µL de ACN 50% TFA 5%. Os tubos foram agitados (lentamente) durante 30 min. Esse tratamento com ACN 50% TFA 5% foi repetido duas vezes para uma eficiente extração. O volume se reduziu a 10 µL em *Speed Vac* ficando as amostras prontas para aplicar no espectrômetro de massas.

As amostras foram submetidas a espectrometria de massas utilizando a técnica de MS/MS e uma fonte de ionização do tipo ESI (eletro-spray). Foi utilizado um aparelho Micromass Q-ToF para realização da técnica ESI/Q-TOF/MS. Para a análise dos dados foi utilizado o programa Mascot 1.9.

Experimentos de inoculação de proteínas em plantas para avaliação da atividade biológica:

Plantas utilizadas:

- *Nicotiana tabacum*: sementes da variedade Petit Havana SR1 foram semeadas em terra com vermiculita (3:1) e colocadas a 4°C por 72 h para a quebra de dormência. Posteriormente foram colocadas em estufa com temperatura e iluminação controladas. Após três meses as plantas foram usadas para experimentos de inoculação.
- *Theobroma cacao*: As plântulas de cacau, da variedade “Catongo” foram cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Figueira, CENA/USP. As plântulas foram crescidas em casa de vegetação. Após 4 meses as plantas foram usadas para experimentos de inoculação.

Inoculação das proteínas recombinantes em folhas de tabaco:

As proteínas (1,0 µM de cada proteína) foram injetadas perto da veia central da folha usando seringas de plástico de 1 mL com agulha. Como controle negativo foi utilizado o tampão de diluição da enzima TNB. A atividade necrótica das proteínas foi verificada mediante observação macroscópica dos sintomas. Foram inoculadas três folhas para cada tratamento. Os experimentos foram repetidos três vezes.

Inoculação das proteínas recombinantes em folhas de cacau:

Não foi possível usar em cacau, o tratamento de inoculação seguido para folhas de tabaco devido às características da folha (fina e dura). Um método diferente foi utilizado. As proteínas (1,0 μ M) foram diluídas em volume final de 100 μ L em tampão TNB e colocadas no fundo de um tubo. O pecíolo da folha foi colocado em tampão TNB e cortado. Posteriormente foi imerso na solução de proteínas tentando não deixar secar o pecíolo. Os sintomas foram verificados visualmente por aparecimento de necrose. Foram inoculadas três folhas para cada tratamento. O experimento foi repetido três vezes.

Inoculação da proteína MpNEP1 em meristemas de cacau:

A proteína MpNEP1 foi inoculada em meristemas de cacau de plantas de 4 meses de idade. Foi utilizada seringa com agulha para a inoculação de 20 μ L de uma solução de MpNEP1 a 1,0 μ M. Como controle foi utilizado tampão TNB. Foram inoculados 10 meristemas. Estes experimentos foram realizados na UESC pela aluna de doutorado Joci A. N. Macedo sobre a orientação do prof. Dr. Julio Cascardo.

Medição de produção de etileno em plantas após a inoculação das proteínas recombinantes:

Folhas de tabaco e cacau de tamanhos comparáveis foram colocadas com o pecíolo imerso em 100 μ l de uma solução de proteína pura (1,0 μ M) para cada uma das três proteínas em estudo (MpNEP1, MpNEP2 e NPP1). Depois de 30 min de colocadas em contato folha-proteína, os frascos contendo as folhas foram fechados hermeticamente com tampas de borracha para evitar a saída de gases. A primeira meia hora sem fechamento permite a absorção da proteína pela folha. Amostras de gases (0,5 ml) foram retiradas dos frascos utilizando seringa em diferentes tempos após a inoculação (2h, 24h, 36h, 48h, 72h). Como controle folhas de cacau e etileno foram inoculadas com água e com tampão TNB seguindo o procedimento descrito As amostras foram analisadas para determinar a presença de etileno utilizando um Cromatógrafo Analítico de gás (Shimadzu GC-14B) equipado com coluna HayeSept e um detector *Flame-Ionization*. A coluna a

temperatura ambiente foi levada a 80°C e se utilizou o nitrogênio como gás carregador e um fluxo de 20 ml min⁻¹. Foi preparada uma curva padrão (1ppm) usando etileno puro e acetileno (White Martins). Os resultados foram analisados estatisticamente mediante análise de variância e significação entre os tratamentos pelo test Tukey (5%) utilizando o programa Origin.

Análise da expressão gênica de MpNEP1 e MpNEP2 ex planta:

Um dado importante para entender o possível papel destas proteínas no ciclo de vida do fungo era conhecer se os genes estavam sendo expressos e se existiam diferenças nos níveis de expressão destes genes em duas fases do ciclo de vida do fungo (biotrófica e necrotrófica). Com esta finalidade foi realizado um PCR semiquantitativo a partir de cDNA do fungo em duas fases do ciclo de vida (biotrófica e necrotrófica). Os resultados foram visualizados mediante *Dot blot*. Os procedimentos utilizados para estes estudos são detalhados a seguir.

Extração de RNA de M. perniciosa

O micélio do fungo *M. perniciosa* durante a fase biotrófica foi crescido em meio pobre com glicerol como única fonte de carbono, como descrito anteriormente. Com o objetivo de realizar estudos comparativos, micélio necrotrófico do fungo foi crescido em meio de cultura de igual composição. A extração de RNA dos micélios biotrófico e saprotrófico de fungo *M. perniciosa* foram realizados usando o método do Trizol (Ausubel e col., 1998) segundo recomendações do fabricante. O RNA foi resuspenso em água e mantido a -80°C.

Eletroforese de RNA

A integridade do RNA foi verificada mediante eletroforese em gel de 1% agarose com formaldeído. A vidraria utilizada foi queimada por 4 horas a 120°C e as soluções foram preparadas com água 0,01% DEPC. Para a preparação do gel de RNA dissolveu-se a agarose em água DEPC e se deixou esfriar até aproximadamente 60°C antes de adicionar 2,2 M de formaldeído e 1X Tampão de corrida (0,02 M MOPS, 8,0 mM NaAc, 1 mM EDTA pH 8,0). A amostra de RNA (1µg) foi misturada com tampão de desnaturação (95% formamida, 18 mM EDTA,

0,025% SDS, xilen cianol, e bromofenol azul) e desnaturada durante 15 min a 65°C. A corrida eletroforética foi realizada a 60 Volts.

Tratamento do RNA com DNase

Possíveis contaminações de DNA em amostras de RNA foram eliminadas mediante tratamento com DNase. 10 µg de RNA foram resuspendidos em tampão 1X Superscript e 10 U de DNase (Invitrogen, EUA). A reação foi incubada durante 15 min a 37°C. A inativação da enzima foi realizada incubando durante 10 min a 65°C.

Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o *kit* SMART da Clontech usando a transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, EUA) segundo recomendações do fabricante.

Estratégia para análise da expressão gênica de MpNEPs

Amostras de 1 µg de cDNA tratados com DNase da fase biotrófica e necrótrófica do fungo tanto *in planta* quanto *ex planta*, foram diluídas 10 e 50 vezes. 1 µL de cada amostra (cDNA puro e diluído) foi utilizado para a reação de PCR. A amplificação foi realizada em 50 µL de volume final contendo 15 pMol de cada primer (Tabela 1), 1 U de Taq polimerase (Invitrogen, EUA) em tampão PCR 1X (Invitrogen, EUA). Como controle do experimento foi amplificado um fragmento de 216 pb do gene de actina de *M. perniciososa* a partir de cDNA usando primers específicos (Tabela 1). Os primers de actina estão localizados em éxons diferentes permitindo seu uso para monitorar possíveis contaminações de amostras de cDNA com DNA genômico. A amplificação a partir do DNA genômico gera um fragmento de 384 pb.

A expressão relativa dos genes de actina, MpNEP1 e MpNEP2 *ex planta* foi avaliada mediante PCR semiquantitativo e visualizada mediante *Dot Blot*.

PCR semiquantitativo:

Para PCR semiquantitativo foram usadas diferentes diluições da primeira fita de cDNA dos micélios biotrófico e necrótrófico nas condições descritas acima. Alíquotas da reação foram analisadas a cada cinco ciclos a partir do ciclo 15 e até o ciclo 30. As análises dos resultados foram realizadas por dois métodos:

mediante visualização em gel de agarose para descartar a possibilidade de contaminação com DNA genômico e mediante hibridação usando a técnica de *Dot Blot*.

Dot Blot.

Alíquotas retiradas de cada ciclo (5 μ L) foram misturadas com 145 μ L de TE 1X (10 mM Tris-HCL pH 8,0/ 1 mM EDTA) filtrado, posteriormente desnaturadas mediante incubação por 10 min a 95°C. Finalmente se adicionou igual volume (150 μ L) de SSC 1X. As amostras foram transferidas para uma membrana de “Náilon” Hybond N+ (Amersham Biosciences, EUA) usando manifold (Progen). A membrana foi colocada sobre papel de filtro até secar totalmente a temperatura ambiente. Posteriormente se procedeu à fixação (*crosslink*) do DNA à membrana mediante incubação a 80°C por duas horas. A membrana foi dividida em três dependendo da localização das amostras correspondentes a cada gene (actina, MpNEP1 e MpNEP2). Como sonda foram usados os respectivos genes amplificados por PCR, purificados previamente utilizando o *kit* de purificação de produtos de PCR GFX (Amersham Biosciences, EUA) e marcados com [α -³²P] dATP (>3000 Ci/mmol, Amersham Bioscience, EUA) seguindo o método de oligonucleotídeos ramdomicos (hexâmeros) (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Para a obtenção das sondas (genes MpNEP1 e MpNEP2) marcadas assim como para a pré-hibridação e hibridação das membranas foram seguidos os protocolos descritos na seção de *Southern blot*.

Expressão gênica de MpNEP1 in planta:

Com o objetivo de determinar se o gene MpNEP1 estava sendo expresso *in planta* se fizeram experimentos de expressão gênica a partir tecidos de cacau infectados pelo fungo *M. pernicioso*. Os ensaios de expressão gênica da MpNEP1 *in planta* foram realizados pelo grupo do Prof. Julio Cascardo (UESC-Ilhéus, Bahia). A extração de RNA de cacau infestado (45, 60 e 90 dias) e sadio (controle) foi realizada mediante o protocolo descrito por Gesteira *et al.* (2003). 10 μ g de cada amostra de RNA foram utilizadas para a reação de reverso transcrição usando o *kit PCR-select cDNA subtraction* (Clontech) segundo recomendações do

fabricante. Reações de amplificação por PCR foram realizadas usando o protocolo anteriormente descrito para o gene MpNEP1. Como controle interno foi utilizado um fragmento do gene ribossomal 18S de cacau. Esse gene foi útil para quantificar o cDNA de *Theobroma cacao* utilizado para a amplificação do gene MpNEP1 em tecidos de cacau infestado. Os resultados foram verificados em gel de agarose.

Técnicas para análise estrutural de proteínas:

Conhecendo a seqüência primária de uma proteína pode ser inferida uma série de possíveis características dessa proteína como sítios putativos de glicosilação, fosforilação, tendência das cisteínas presentes na molécula de estarem formando pontes dissulfetos, predição da estrutura secundária, entre outras. No presente trabalho se avaliaram possíveis propriedades das MpNEPs usando programas disponíveis na Internet. Os programas utilizados foram: para determinação de possíveis sítios de fosforilação NetPhos 2.0 do pacote de programas ExPASy (<http://www.expasy.org>); para a determinação de possíveis sítios de glicosilação NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>); para analisar a possibilidade das cisteínas estarem formando pontes dissulfetos foi utilizado o programa DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it>); para a predição de estrutura secundária foi utilizado o programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>). O alinhamento múltiplo de seqüências foi realizado utilizando o programa clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Para estudar experimentalmente características importantes das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 em solução foram utilizadas diversas técnicas. Em anexo 1 apresenta-se uma revisão sobre os princípios teóricos de cada um dos métodos utilizados que pode ser muito útil para o melhor entendimento da metodologia empregada e dos resultados obtidos.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medições do espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas em condições de temperatura controlada utilizando um instrumento de espalhamento dinâmico de luz DynaPro (Protein Solutions) no Laboratório Nacional de Luz

Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil. Os dados foram analisados utilizando o programa DYNAMICS versão 6,0 da Protein Solutions. Cada medida consistiu de pelo menos 500 leituras independentes de 10 seg. cada uma. Alíquotas de 100 μL de cada proteína (0,8 mg mL^{-1} MpNEP1, 1,0 mg mL^{-1} MpNEP2 e 1,0 mg mL^{-1} NPP1) em tampão contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 180 mM KCl foram centrifugadas a 10 000g durante 1h a 4°C. Uma alíquota de 60 μL foi colocada em cubeta de quartzo para realizar as medições. Todos os dados foram coletados a 25°C.

Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram coletadas em um espectrofotômetro Aminco BOWMAN da serie 2. As bandas de excitação e emissão foram 8 e 16 nm respectivamente, As cubetas de fluorescência (1 x 0,4 cm) foram montadas em suporte termostatizado. Todas as medições foram realizadas a 25°C. A concentração de proteínas utilizada foi de 0,1 mg mL^{-1} para as três proteínas em estudo. A fluorescência dos triptofanos foi medida com uma excitação a um comprimento de onda de 295 nm e o espectro de emissão foi coletado entre 310 e 420 nm. Os dados de fluorescência medidos foram corrigidos segundo a contribuição do tampão e da diluição.

As medições de fluorescência dos triptofanos foram realizadas utilizando experimentos de apagamento de fluorescência com três moléculas apagadoras: acrilamida, CsCl e KI. Foram preparados gradientes de concentração crescentes (0 mM – 400 mM) para cada uma destas moléculas. Foi medida a intensidade de fluorescência para cada uma destas soluções (linha base). Soluções das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 (500 μL de uma solução e proteínas 0,04 mg mL^{-1}) foram misturadas com as soluções do gradiente de concentração das moléculas apagadoras. Intensidades de fluorescência foram medidas para soluções de proteína sem molécula apagadora e soluções de proteína com diferentes concentrações das moléculas apagadoras de fluorescência.

Dicroísmo circular (CD) e Desnaturação térmica

As medições de CD foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-810, equipado com um controlador de temperatura e um suporte da célula

termostatizado em interfase com um banho termostático. O espectro de UV-distante foi registrado em cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico com uma concentração de proteínas de 6 μM . Por outro lado, o espectro de UV-próximo foi registrado em uma cubeta de 1 cm e utilizando uma concentração de proteínas de 20 μM . As proteínas estavam diluídas em 5 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 50 mM NaCl. O espectro final é a média de cinco varreduras consecutivas. Os dados foram corrigidos com a contribuição do tampão. A estrutura secundária foi estimada mediante a análise do espectro de UV-distante usando os programas CDNN. Experimentos de desnaturação térmica foram realizados mediante o incremento da temperatura de 20°C a 95°C a 1°C por min, permitindo equilíbrio da temperatura durante cinco minutos antes de registrar os espectros cada 5°C.

Espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS)

As medições de espalhamento de raios X a baixo ângulo foram realizadas na Linha D11A-SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil. Os dados foram coletados usando um detector de área MAR CCD 165 (MAR Research) e 10 min de exposição para cada medição. O comprimento de onda utilizado foi de 1,488 Å. A distância entre a amostra e o detector foi de 1074,35 mm. As intensidades de espalhamento foram coletadas em uma faixa angular de $0,0494 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,3079 \text{ \AA}^{-1}$, onde q é o vetor de espalhamento ($4\pi\text{sen}\theta/\lambda$), e 2θ e λ são o ângulo de espalhamento e o comprimento de onda de raios X, respectivamente. As medições foram realizadas a temperatura ambiente. O tratamento dos dados foi realizado usando o programa FIT2D. A intensidade dos dados foi reduzida a $I(q)$ vs q usando protocolos padrões para a correta intensidade do raio incidente, absorção da amostra e subtração do branco.

O programa GNOM foi usado para análise dos dados experimentais e para calcular a função de distribuição de distâncias. Os modelos das proteínas a baixa resolução foram determinados *ab initio* a partir das curvas de espalhamento usando o programa DAMMIN em modo lento. Este programa determina a forma da proteína a baixa resolução. Calcula também o volume da partícula mediante o preenchimento o modelo calculado teoricamente com esferas densamente

empacotadas de forma que satisfaça a curva de espalhamento experimental. A forma mais provável para cada molécula foi obtida a partir da média de 10 modelos *ab initio*, usando o programa DAMAVER.

Cristalização de proteínas

As proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 em TNB foram concentradas até aproximadamente 10 mg mL^{-1} utilizando filtros Amicom YM-30 segundo recomendações do fabricante. Para os ensaios de cristalização foi utilizada a técnica de difusão de vapor mediante a metodologia da gota pendurada. Para estudos de cristalização é necessário testar grande variedade de condições de agente precipitante, sais e pH. Com essa finalidade utilizamos os kits de cristalização da Hampton Research (Crystal Screen I, Crystal Screen II, SaltRx, PEG/Ion Screen, Grid Screens) segundo recomendações do fabricante. Em cada poço da placa de cristalização foram colocados $200 \mu\text{L}$ de solução precipitante e na gota foram colocados $1,5 \mu\text{L}$ do agente precipitante e $1,5$ da proteína, em cada caso. Os poços foram vedados com graxa e colocados em sala de temperatura controlada (4°C). As gotas foram analisadas usando microscópio de polarização cada 24 h durante a primeira semana e posteriormente uma vez por semana.

Imunolocalização das proteínas em células de cacau:

Preparação de lâminas com tecidos de cacau

Para a preparação do tecido foram utilizados cortes de cacau obtidos a partir de material fixado em paraformaldeído 4% e em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%; 5:5:90, v/v/v) (Johansen, 1940). A região utilizada foi a base do ramo, tanto da planta sadia quanto da planta infectada na fase de vassoura seca. Os ramos foram enviados por Alan Pomella da fazenda Almirante Cacau, em Itajuípe.

O material fixado em paraformaldeído permaneceu por 2 horas sob vácuo, e posteriormente foi lavado com água destilada. O material fixado em FAA ficou 24h sob vácuo, e depois foi lavado com etanol 50% e etanol 70%. A partir daí, as regiões de interesse foram isoladas e desidratadas usando um

gradiente de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100; 30 minutos em cada).

A inclusão dos cortes em resina plástica (Gerrits, 1983) inclui os seguintes passos:

1. Pré-infiltração: resina:AE100 (1:1) por 2h;
- 2.. Infiltração: resina pura; durante 12 horas;
3. Polimerização: resina pura:polimerizador (15:1);
4. Secagem em capela e posteriormente em estufa (2-4 dias);

Uma vez polimerizadas as amostras, foram seccionadas em micrótomo rotativo com espessura de 10 μm e distendidas sobre lâminas com água destilada. Posteriormente foram colocadas sobre uma placa aquecedora a 37°C.

Imunolocalização das proteínas MpNEPs

Sobre os cortes de cacau, infestado e sadio, fixos nas lâminas, foram colocadas 2 gotas de 5% de leite desnatado em PBS. As lâminas foram incubadas a 37°C até secarem. Posteriormente foi adicionada uma solução de 3,7% Formaldeído, 50 mM K_2HPO_4 , 0,2% Tween-80 e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Passado esse tempo, as lâminas foram submetidas a várias lavagens com PBS. As lâminas foram incubadas a 4°C durante 12 horas com anticorpo anti-MpNEP2 produzido em coelho em uma diluição 1:5000. Depois de lavagens sucessivas com PBS, as lâminas foram incubadas a 37°C por uma hora com conjugado anti-coelho-FITC (Invitrogen, EUA) 1:4000. Posteriormente procedeu-se à secagem das lâminas a 37°C. Uma vez secas, foi adicionado VectaShield no escuro até cobrir os cortes. O material foi mantido a 4°C no escuro por uma semana. A indução de fluorescência foi observada sob luz fluorescente em microscópio de fluorescência.

Tratamento de suspensão de células de tabaco com MpNEP1 MpNEP2 e NPP1

Condições de crescimento de células de tabaco:

Células de tabaco BY-2 foram cedidas pelo Prof. Dr. Victor A. Vitorello do Laboratório de Pesquisa e desenvolvimento do Centro de Energia Nuclear na

Agricultura, Piracicaba. As células foram crescidas a 28°C, 160 rpm, no escuro em 50 mL de meio líquido contendo, 4,3 g L⁻¹ sais basais, 30 g L⁻¹ sacarose, 50 mL tampão MES 20X (11,92 g L⁻¹), 10 mL de uma solução B1-inositol (0,1 g L⁻¹ tiamina, 10 g L⁻¹ mio-inositol), 100 µL de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) 10 mM e 1,4 mM KH₂PO₄. A repicagem das células foi realizada cada 7 dias mediante transferência de 2 mL de cultura de uma semana de crescimento em 47 mL de meio fresco.

Inoculação de elicitores

Células de tabaco após três dias de repicadas foram transferidas para erlenmeyers com 10 mL de meio. Após 1h da transferência foram adicionados 0,2 mg mL⁻¹ de proteína (MpNEP1, MpNEP2 e NPP1, respectivamente). Como controle negativo foi usado tampão TNB para o tratamento de células de tabaco. Amostras de 0,5 mL foram retiradas de cada amostra após 5 min., 15 min., 30 min. e 60 min, respectivamente. A separação das células do sobrenadante da cultura foi realizada por filtração. Posteriormente as células foram congeladas em nitrogênio líquido para a lise e conservação.

Preparação de amostras

Para a preparação das amostras, as células de tabaco proveniente dos tratamentos nos diferentes tempos de coleta foram resuspendidas em 500 µL do tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% Tween-20; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1mM Vanadato (Na₂VO₄); 1mM fluoreto de sódio (NaF), 0,1 mM PMSF; 1 protinina; 1µg mL⁻¹ leupeptina. As células de tabaco utilizadas possuem parede que podem ser facilmente quebradas por procedimentos mecânicos como pipetar e centrifugar. Posteriormente as células foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C durante 30 min. As proteínas da fração solúvel foram quantificadas. Foi utilizado o mesmo tampão usado para resuspender às células para igualar as concentrações de proteínas totais das amostras (0,2 mg mL⁻¹).

Atividade peroxidase em gel de poliacrilamida

Para determinar a possível indução de peroxidases da parede celular após tratamento de células de tabaco com as proteínas MpNEPs e NPP1, foi usada a técnica de determinação de atividade de peroxidase em gel de poliacrilamida

descrita por Christensen (1998). Foi preparado um gel desnaturante de acrilamida:bisacrilamida 9% (soluções descritas na seção SDS-PAGE) 24 h antes de realizar o experimento e foi estocado a 4°C.

Para aplicar no gel de poliacrilamida 10 µl das amostras foram misturadas com igual volume de tampão de aplicação sem conter SDS ou 2-mercaptoetanol. As amostras também não foram esquentadas antes da aplicação. Como controle positivo foi utilizado peroxidase de rábano (Sigma, EUA). Foi realizada uma eletroforese a 4°C durante 1h a 120 Volts. Posteriormente o gel foi incubado em uma solução de diaminobenzidina (15 mg em 30 mL de 0,1 mM tampão acetato de sódio pH 4,5) e 1 mL de uma solução 3% peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A presença de peroxidases nas diferentes amostras foi verificada pela aparição de precipitado de cor marrom.

Resultados

Análise de seqüências das proteínas indutoras de necrose de Moniliophthora perniciosa

A doença Vassoura-de-bruxa se caracteriza pela hiperplasia e hipertrofia dos tecidos que levam à formação de ramos com folhas anormais chamadas de vassouras. Num estado inicial da doença as vassouras são verdes enquanto que numa fase avançada são chamadas de vassouras secas. Nesta última fase os tecidos infectados (vassouras) sofrem necrose levando à morte. Uma pergunta surge naturalmente: o fungo *M. perniciosa* causador de Vassoura-de-bruxa secreta alguma substância capaz de matar as células da planta ou de ativar respostas de defesa da planta capazes de produzir esse efeito?. Na tentativa de responder esta questão, o filtrado do meio extracelular da cultura de *M. perniciosa* na fase necrótrfica foi inoculado em folhas de tabaco (Figura 5). A região das folhas infiltradas sofreu necrose sugerindo que o fungo *M. perniciosa* estaria secretando fatores indutores de necrose.



Figura 5. Inoculação em folhas de tabaco do sobrenadante de cultura de *M. perniciosa* na fase necrótrfica. Seta indica sobrenadante inoculado depois de tratamento térmico; círculo vermelho indica necrose induzida pelo sobrenadante.

A partir dos resultados anteriores dedicamos esforços na busca de possíveis proteínas de *M. perniciosa* capazes de produzir ou induzir necrose. Para isso contávamos com a Base de Dados de seqüências de *M. perniciosa*, gerada durante o desenvolvimento do projeto genoma Vassoura-de-bruxa. Até o presente, o projeto genoma gerou aproximadamente 75 milhões de pb derivados de clones

genômicos usando a metodologia de shotgun e 11,000 ESTs (*Expression sequenced tags*).

Análises de seqüências preliminares (sem contar ainda com muitos dados de seqüenciamento) revelaram a existência de uma ORF de 696 pb sem íntrons com similaridade com genes codificadores de proteínas pertencentes à família das *Necrosis-like proteins* (Pemberton, 2004) que foi denominada MpNEP1 (EF109894).

```
> gb|AAK01636.1|AF320326 1 necrosis-inducing peptide [Phytophthora sojae]
gb|AAM48170.1|AF511649 1 necrosis-inducing protein [Phytophthora sojae]
Length=237

Score = 162 bits (409), Expect = 2e-38, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 88/215 (40%), Positives = 125/215 (58%), Gaps = 10/215 (4%)

Query 24  LPHDQIAKF--PKSGGLE---TQYQPALHIGNGCHSYPAVDVDGNWSGGLKPTGAPSAA 78
+ HDQ+ F P L+ +Y+P +HI NGCH YPAVD +GN SGGL PTG+ SA
Sbjct 22  INHDQVVPFTQPTPTTALQQAAVKYKPIIHISNGCHPYPAVDNNGNTSGGLNPTGSESAG 81

Query 79  CKDTSK-AQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRHDWEGAVVFLN---SDTQQ 134
CK + Q Y R+ +QG A +Y+WYMPKDE TG+GHRHDWE VV+++ + + +
Sbjct 82  CKGSGYGTQIYGRAVKYQGVYAFMYSWYMPKDETLTGLGHRHDWEACVVVWDDIAASSPK 141

Query 135 IDGVAASAHGKWRKYPNPGGANIDDTHVKLQYSAEPVINSHALDLTDKGGDLPTLASWEG 194
I ++ASAH + KY P + K+ YS+ V+ +HAL T G+ L W+
Sbjct 142 IVALSASAHSGYMKYYPSSSYFSGNSAKIDYSSSYVWINHALSATSTAGETQPLIMWDQ 201

Query 195 MGADARAAINERSHWGDANPPIADSLIDSSLSGAW 229
+ AR A+ E + +GDAN P D+ + L A+
Sbjct 202 LTDAARRAL-EDTDFGDANVFPKDFANFQTKLGNAY 235

> gb|AAM48171.1|AF511649 2 necrosis-inducing-like protein [Phytophthora sojae]
Length=236

Score = 156 bits (395), Expect = 9e-37, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 88/231 (38%), Positives = 129/231 (55%), Gaps = 11/231 (4%)

Query 8 IVVLFIVTRSMSAPHQLPHDQIAKFPK-----SGGPLETQYQPALHIGNGCHSYPAVDVD 62
+VV + + S + HDQ+ F + + +++P LHI NGCH YPAVD D
Sbjct 6 LVVAAVAFLTASHASVIDHDQVVPFAQPTPTSTSTQTAAVKFKPQLHITNGCHPYPAVDAD 65

Query 63 GNWSGGLKPTGAPSAACKDTSK-AQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRHDW 121
GN SGGL PTG+ SA CK + +Q Y RS + G A++Y+WY PKD ++G GHRHDW
Sbjct 66 GNTSGGLNPTGSSSAGCKGSGYGSQIYGRSTWYNGVWAIMYSWYFPKDSPASGF GHRHDW 125

Query 122 EGAVVFLNS---DTQQIDGVAASAHGKWRKYPNPGGANIDDTHVKLQYSAEPVINSHALD 178
E VV+LN+ + ++ V+ SAH + Y P + +D K+ Y +IN HA
Sbjct 126 EHIVVWLNMPAVTSPPELLAVSTSAHSGYTTTYPSSSYLDGNSAKIDYYNVLIN-HAFR 184

Query 179 LTDKGGDLPTLASWEGMGADARAAINERSHWGDANPPIADSLIDSSLSGAW 229
+T G+ L W+ + AR A+ E + +GDAN P D+ ++ L+ AW
Sbjct 185 MTSDSGETQDLIMWDQLTDAARTAL-ENTDFGDANVFPKDFANFETKLANAW 234
```

Figura 6. Primeiros resultados obtidos do blastp de MpNEP1 contra GenBank (NR). Círculo vermelho indica os valores de Evaluate; quadrado vermelho indica seqüência de 7 aminoácidos conservados em todas as NLPs.

A Figura 6 mostra os dois primeiros resultados obtidos quando comparamos a seqüência de proteína de MpNEP1 contra o GenBank (NR) usando Blastp. Pode-se observar que a seqüência de *M. pernicioso* apresenta uma alta similaridade com proteínas indutoras de necrose e etileno de *P. sojae*. Os valores de E-value resultantes indicam a baixa probabilidade de que o alinhamento obtido seja por acaso.

Com o objetivo de determinar o número de cópias de NEPs no genoma de *M. pernicioso* foram realizados experimentos de *Southern blot*. O DNA genômico do fungo foi digerido com enzimas de restrição incapazes de cortar dentro da seqüência do gene MpNEP1 (*EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* e *Hind III*) ou com um sítio de corte único dentro dele (*Clal*, *Bgl II* e *XhoI*). A hibridação foi realizada usando como sonda o gene da MpNEP1 completo. Os resultados são apresentados na Figura 7A. Pode-se observar que a hibridação da MpNEP1 com DNA genômico digerido com enzimas que não cortam dentro do gene gerou mais de uma banda, sugerindo a existência de mais de um gene codificador de NLPs no genoma de *M. pernicioso*.

A hibridação do DNA digerido com as enzimas *EcoRI* e *Hind III* que também não cortam o gene resultou em uma única banda de alto peso molecular. Este fato sugere uma proximidade física das cópias dos genes MpNEPs no genoma. Para testar essa hipótese, os cromossomos de *M. pernicioso* separados por eletroforese de campo pulsado (Rincones, 2003) foram hibridados com uma sonda construída com o gene MpNEP1. Se assumirmos que os possíveis genes codificadores de NEPs de *M. pernicioso* (parálogos) têm grande similaridade na seqüência de nucleotídeos, poderiam ser identificados por uma mesma sonda (MpNEP1). A Figura 7B mostra os resultados deste experimento. Pode-se observar o aparecimento de uma única banda correspondente ao cromossomo 6, segundo Rincones, *et al.* (2003). Esses dados sugerem que os genes codificadores para NEPs no genoma de *M. pernicioso* estariam localizados próximos no genoma, no mesmo cromossomo.

A progressão do projeto genoma reforçou estes resultados encontrando outras duas seqüências homólogas ao gene Nep. A Figura 7C apresenta um

esquema geral das ORFs encontradas sublinhando algumas características como tamanho da proteína, peptídeo sinal, sítio de corte do peptídeo sinal, Evaluate e percentagem de similaridade quando comparadas com o domínio (CD) NPP1. A seqüência do gene denominado MpNEP3 está incompleta ainda – faltando a região que codifica para a extremidade N-terminal da proteína incluindo o peptídeo sinal - e o gene se encontra localizado *in tandem* com o gene MpNEP1.

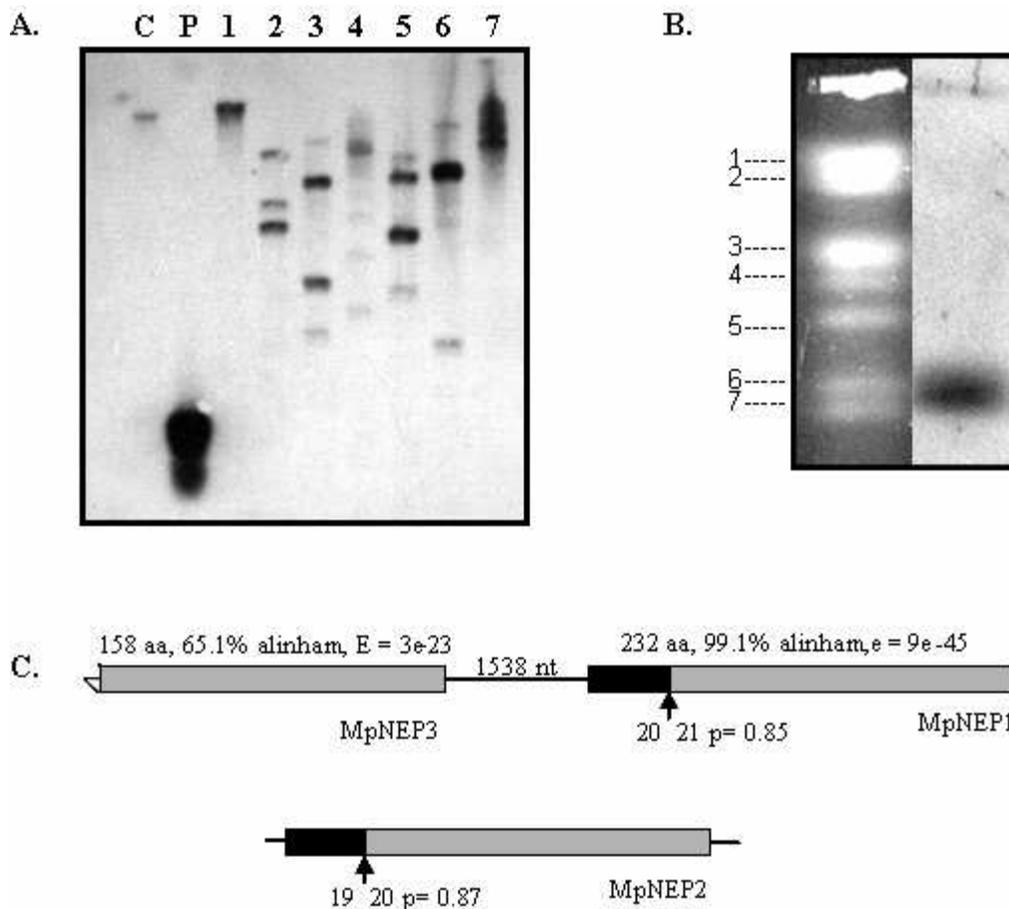


Figura 7. Caracterização do número de genes de MpNEPs e localização no genoma. (A) Resultados de hibridização de *Southern Blot* com o gene MpNEP1: C, DNA genômico de *M. perniciosus* sem digerir; P, 1 ng do gene MpNEP1; DNA genômico digerido com enzimas que cortam o gene MpNEP1 (1-EcoRI; 2-EcoRV; 3-Hind III; 4-Bam HI); enzimas que não cortam o gene (5-Bgl II; 6-ClaI; 7-XhoI) (B) Resultados da separação de cromossomos de *M. perniciosus* por *pulse field* e hibridização com o gene MpNEP1. Os números representam os cromossomos de *M. perniciosus*. (C) Esquema da disposição dos genes MpNEPs no genoma. MpNEP3 está incompleta e aparece *in tandem* com MpNEP1. Está representado o número de aminoácidos, e-value da comparação com o domínio NPP1. A seta representa o sítio de corte do peptídeo sinal (representado em preto) segundo SignalP3, p representa a probabilidade dessa predição estar correta.

O gene denominado MpNEP2 foi identificado como um *cluster* independente. Esta seqüência foi previamente encontrada em bibliotecas de cDNA derivadas da interação compatível cacau-*M. perniciosa* (GenBank EF114673) construídas na Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus - Bahia, pelo grupo de Genética e Biotecnologia liderado pelo Prof. Dr. Julio Cascardo. Comparação do gene amplificado a partir de cDNA e do DNA genômico do fungo *M. perniciosa* mostrou que o gene não tem íntrons, similar ao que acontece com MpNEP1.

Podemos concluir que ambos os estudos – análises de seqüências e *Southern blot* – sugerem a possibilidade de existirem pelo menos três genes codificadores para NLPs no genoma de *M. perniciosa*. Os genes foram numerados pela ordem de descoberta (MpNEP1 - MpNEP3).

Comparação de seqüência das MpNEPs

Uma vez encontrados diversos genes codificadores para NEPs no genoma de *M. perniciosa* se procedeu a realizar comparação entre as seqüências de proteínas codificadas por estes genes com outras NLPs depositadas em bancos de dados públicos com o objetivo de estudar a origem evolutiva destes genes e características provavelmente importantes na função.

Inicialmente, foram selecionadas todas as seqüências depositadas no GenBank que apresentavam similaridade significativa com o domínio conservado (CDD) NPP1 (pfam 05630) e com a seqüência MpNEP1. Estes resultados mostram-se na Tabela 4, em conjunto com dados sobre a existência ou não de evidências experimentais de atividade de indução de necrose de cada uma delas.

Os organismos na Tabela 4 (1 – 31) estão listados segundo a ordem em que as seqüências de proteínas aparecem alinhadas na Figura 8. Análise da lista de organismos contendo NLPs mostra que estas proteínas estão presentes em uma ampla gama de organismos –bactérias, fungos ascomicetos e oomicetos– sejam eles patogênicos ou não. Um dado muito interessante é que não foram encontradas NLPs em nenhum genoma de fungo basidiomiceto, provavelmente pela falta de seqüências de este tipo de fungos em bancos públicos. Este seria o primeiro dado de presença de NLPs em fungos basidiomicetos.

Tabela 4. Lista de organismos utilizados para filogenia do gene NEP. Número de acesso (no NCBI), Exp. Evidências experimentais da atividade necrótica da proteína. Numeração de 1 – 31 é a mesma ordem a ser utilizada no alinhamento de seqüências da Figura 8. Entre parêntesis número do gene no genoma desse organismo.

Organismo	Número Acesso	Exp.
1.- <i>Aspergillus nidulans</i> (2)	XP_660939	N
2.- <i>Aspergillus fumigatus</i> (2)	XP_748539	N
3.- <i>Gibberella zeae</i> (2)	XP_383570	N
4.- <i>Gibberella zeae</i> (3)	XP_387963	N
5.- <i>Streptomyces coelicolor</i>	NP_631398	N
6.- <i>Neurospora crassa</i>	XP_959764	N
7.- <i>Magnaporthe grisea</i> (3)	XP_365630	N
8.- <i>Erwinia carotovora</i>	YP_051177	N
9.- <i>Vibrio pommeresis</i>	CAC40975	S
10.- <i>Aspergillus nidulans</i> (1)	XP_660815	N
11.- <i>Aspergillus fumigatus</i> (1)	XP_748279	N
12.- <i>Magnaporthe grisea</i> (1)	XP_362983	N
13.- <i>Bacillus halodurans</i>	NP_241261	N
14.- <i>Bacillus licheniformis</i>	YP_078774	N
15.- <i>Pythium aphanidermatum</i>	AAD53944	S
16.- <i>Pythium affinis</i>	AAQ89595	N
17.- <i>Pythium monospermum</i>	AAQ89593	N
18.- <i>Phytophthora megakarya</i> (1)	AAX12401	N
19.- <i>Phytophthora megakarya</i> (2)	AAX12403	N
20.- <i>Phytophthora sojae</i> (1)	AAK01636	S
21.- <i>Phytophthora parasitica</i>	AAK19753	S
22.- <i>Phytophthora infestans</i>	AAK25828	S
23.- <i>Phytophthora sojae</i> (2)	AAM48172	S
24.- <i>Phytophthora sojae</i> (3)	AAM48171	S
25.- <i>Phytophthora megakarya</i> (3)	AAX12397	N
26.- <i>Moniliophthora perniciosa</i> (1)	EF109894	S
27.- <i>Moniliophthora perniciosa</i> (2)	EF109895	S
28.- <i>Fusarium oxysporum</i>	AAC97382	N
29.- <i>Verticillium dahliae</i>	AAS45247	S
30.- <i>Magnaporthe grisea</i> (2)	XP_366313	N
31.- <i>Gibberella zeae</i> (1)	XP_386193	N

Com o objetivo de fazer uma avaliação global da similaridade entre as proteínas da família NLPs, incluindo as proteínas de *M perniciosa*, realizou-se uma comparação de seqüências de aminoácidos mediante CLUSTALW. A Figura 8 apresenta o alinhamento entre estas seqüências usando o programa ClustalW.

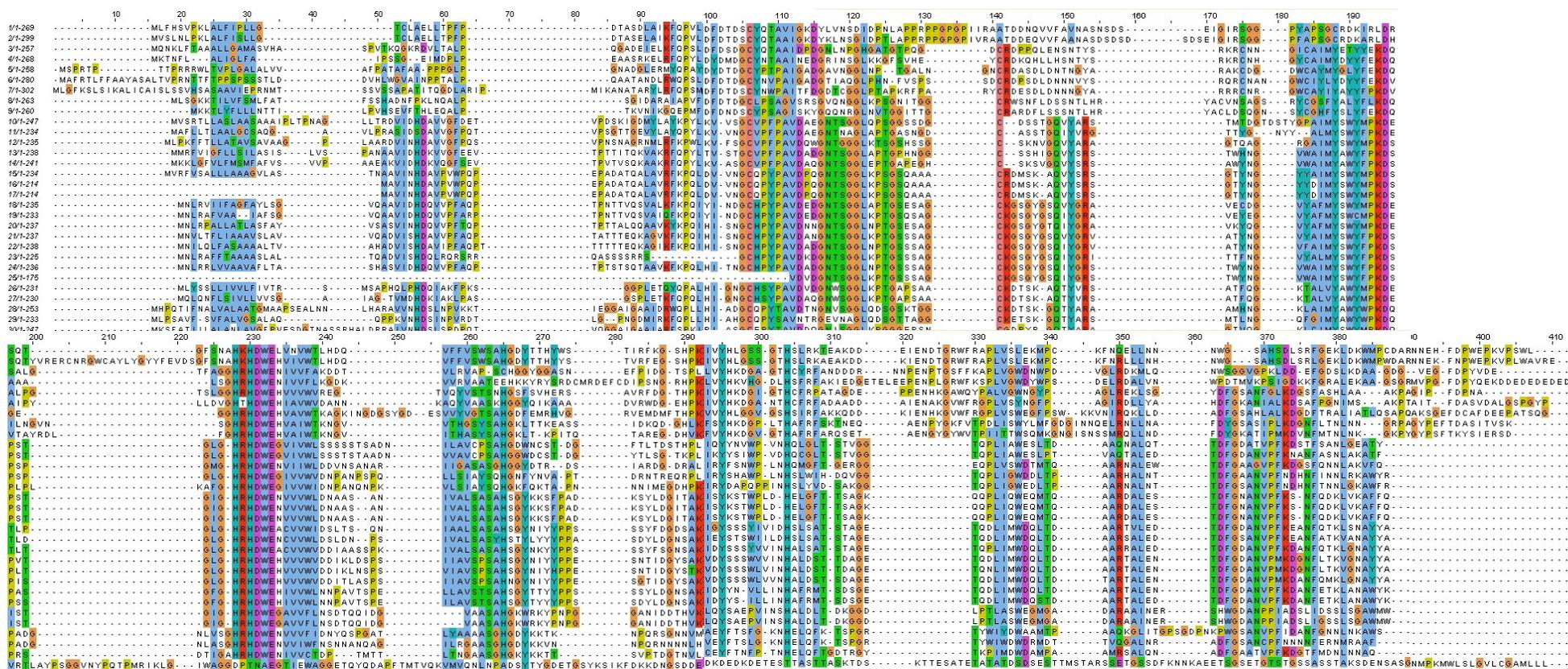


Figura 8: Alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas utilizadas para as análises filogenéticas. As seqüências aparecem na ordem da Tabela 4 (1-31) acompanhado do tamanho da proteína. As cores representam os diferentes aminoácidos conservados entre essas proteínas.

O alinhamento anterior mostra que apesar de que esta família de proteína esteja distribuída em grupos de organismos afastados filogeneticamente (bactérias, fungos, oomicetos), elas mantêm alto grau de conservação, sugerindo um papel importante no ciclo de vida destes organismos. A seqüência do gene de *Gibberella zeae* (1) apresenta grandes diferenças quando comparada com as outras proteínas. Estas mudanças podem ser erros de seqüenciamento.

Quando compararmos as seqüências das proteínas MpNEP1 e MpNEP2, excluindo a região codificadora do peptídeo sinal, verificamos a existência de 16 aminoácidos diferentes entre estas duas proteínas incluindo uma deleção e quatro substituições conservativas. Os resultados da comparação se observam na Figura 9. A maior parte das diferenças estão concentradas na região N-terminal.

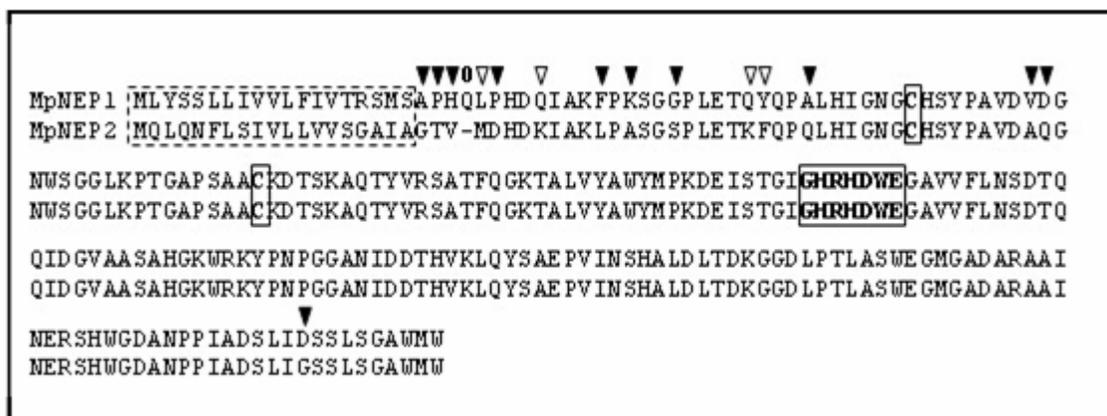


Figura 9. Alinhamento entre as seqüências MpNEP1 e MpNEP2. Em linha de pontos está marcado o peptídeo sinal de cada proteína. Em caixas estão marcados os resíduos de cisteínas e o heptapeptídeo, conservados. As setas pretas e brancas representam substituições não-conservativas e conservativas, respectivamente.

Gijzen (2006) a partir de análises filogenéticas, classificou as NLPs em dois grupos Tipo I e Tipo II em dependência da presença de dois ou quatro resíduos de cisteínas conservadas, respectivamente. Ambas as MpNEPs pertencem ao grupo I com resíduos de cisteína nas posições 53 e 79 em MpNEP1 e nas posições 52 e 78 na MpNEP2 (Figura 9).

As relações de filogenia entre as proteínas NLPs foram estimadas mediante a construção de uma árvore enraizada entre as NEPs Tipo I e NEPs

Tipo II. Para a análise foram utilizadas as seqüências apresentadas na Tabela 4. A Figura 10 mostra os resultados desta análise. Como era esperado MpNEPs aparecem agrupadas com outras NEPs do Tipo I.

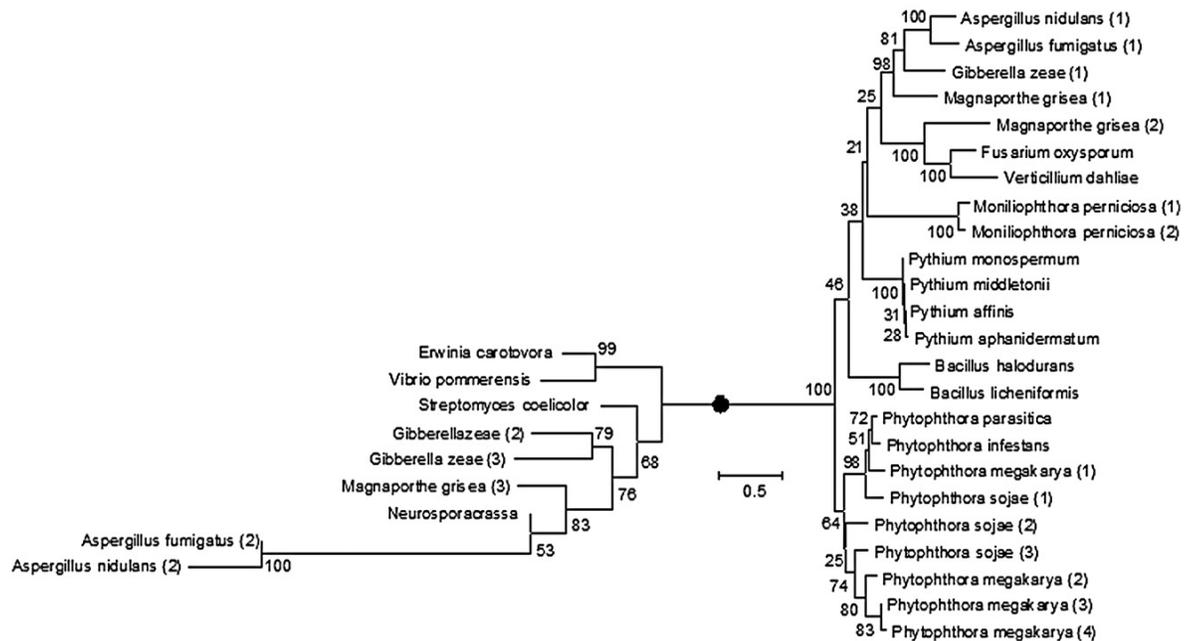


Figura 10. Árvore Filogenética de evolução mínima das NEPs Tipo I e Tipo II (listadas na Tabela 4) obtido mediante o método MEGA3. O ponto negro representa a raiz da árvore entre as NEPs Tipo I (direita) e Tipo II (esquerda). Os valores de robustez dos ramos são mostrados em cada ramo.

Um ponto interessante a ser notado é que na árvore filogenética as seqüências de fungos representadas pertencem a fungos ascomicetos. Na tentativa de analisar a ocorrência de NLPs em outras espécies de basidiomicetos, foi utilizada a ferramenta tblastn contra cinco espécies de fungos cujos genomas estão seqüenciados (*Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coprinus cinereus* e *Laccaria bicolor*). Um dado muito interessante é que não foi encontrado nenhum gene homólogo as NLPs nestes organismos. Este dado chamou nossa atenção sobre a possibilidade das MpNEPs serem produto de transferência horizontal (HGT) a partir de outros patógenos do cacau.

Com o objetivo de estudar esta hipótese (HGT das MpNEPs) foi determinado o conteúdo de GC e o uso de códons das MpNEPs. Posteriormente foi comparado com o conteúdo de GC de outras ORFs identificadas no genoma de *M. perniciosa*. Foi realizada a comparação do uso de códons das MpNEPs com o

uso de códons dos genes de *M. pernicioso* e de *Phytophthora infestans* utilizando o programa “SYco”. Os resultados são apresentados na Figura 11.

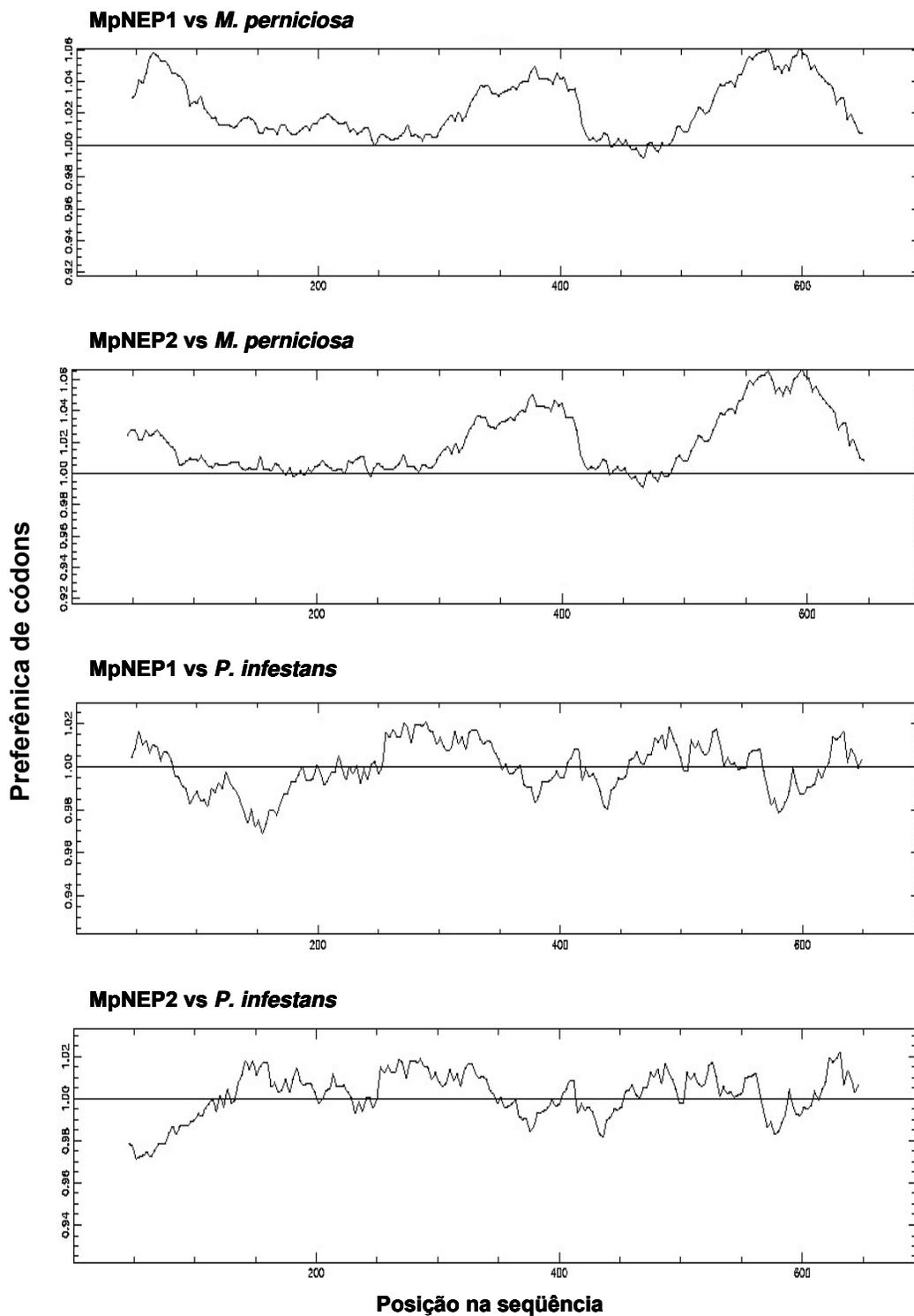


Figura 11. Análise do uso de códons de MpNEPs. Gráficos resultantes das análises de comparação do uso de códons de cada uma das proteínas comparado com o uso de códons de *M. pernicioso* e *P. infestans*.

A preferência de códons é uma medida estatística do uso desigual de códons sinônimos entre duas seqüências. Indica a verossimilhança de um determinado códon ter sido usado levando em conta o uso de códons do organismo em questão. A linha horizontal representa a preferência de códons dos genes de organismo utilizado para a comparação. A curva por cima dessa linha representa uma alta preferência de códons e valores por baixo da curva significam o uso de códons raros (Gribkov, 1984). Estas análises revelaram que MpNEPs têm o mesmo uso de códons de outros genes de *M. pernicioso*. Entretanto, análise do conteúdo de GC mostrou que MpNEPs apresentam um conteúdo de GC significativamente superior do que a media calculada para outras ORFs de *M. pernicioso* (56% versus 46% respectivamente).

Clonagem e Expressão de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 em *E. coli*. Purificação das proteínas

Para a caracterização das proteínas em estudo tanto funcional quanto molecularmente se precisam de quantidades relativamente grandes de proteínas difíceis de conseguir mediante purificação direta dos extratos do fungo. Por esse motivo foi escolhido um sistema de expressão das proteínas em *E. coli* possibilitando a produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes. A Figura 12 apresenta um diagrama geral dos passos seguidos para cada uma das proteínas e os resultados obtidos para a proteína MpNEP1.

A Figura 12A mostra uma eletroforese de DNA com os resultados da PCR realizada a partir dos possíveis clones recombinantes pET15-MpCP1 usando os oligonucleotídeos específicos para esse gene. Como se pode observar três dos plasmídeos testados produziram uma banda á altura esperada de 700 bp aproximadamente sugerindo que o gene de interesse foi clonado com sucesso. Resultados similares foram obtidos para plasmídeos pET28-MpCP2 (realizado no laboratório do Prof. Dr. Julio Cascardo) e pET28-NPP1. Foi selecionado um plasmídeo recombinante para cada gene e seqüenciado para confirmar a identidade do fragmento clonado. Nos três casos a reação de seqüenciamento confirmou que o gene clonado era o gene de interesse. A partir desses dados, o plasmídeo recombinante foi transformado em linhagens de expressão de *E. coli* e

foi induzida a expressão das proteínas com IPTG. As proteínas recombinantes foram produzidas em fusão a uma cauda de Histidinas facilitando a purificação mediante coluna de afinidade a metais.

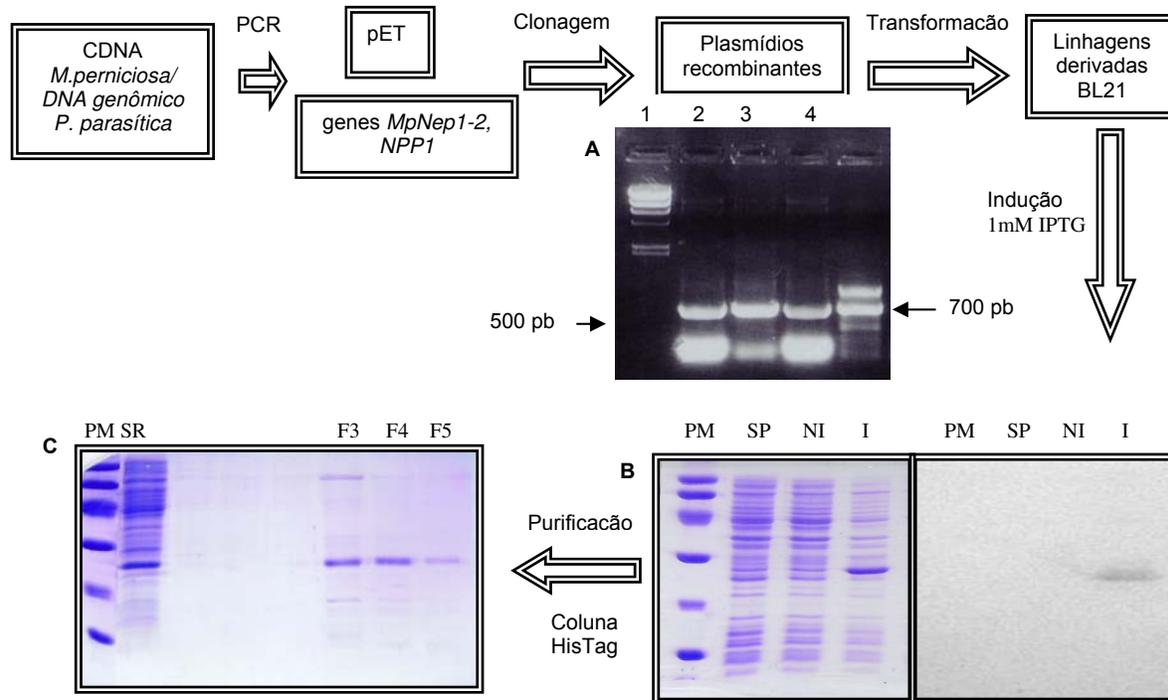


Figura 12: Diagrama de passos seguidos para a obtenção das proteínas recombinantes. Os resultados são referentes à *MpNEP1*. (A). Amplificação do gene *MpNEP1* a partir de plasmídeos recombinantes (linhas 2-5), 1: λ *Hind III*. (B). Indução e identificação por Western Blot com anticorpo anti-His tag. PM: peso molecular (14.4 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 43 kDa, 67 kDa, 94 kDa); SP: linhagem sem plasmídio recombinante; NI: linhagem com plasmídio recombinante não induzida; I: linhagem com plasmídio recombinante induzido. (C). Purificação da *MpNEP1*. SR: sobrenadante da ruptura após indução da proteína *MpNEP1*; F3-F5: frações da purificação de *MpNEP1*.

A Figura 12B (esquerda) mostra experimentos de indução da linhagem de *E. coli* BL21 pLysS transformada com plasmídio recombinante de *MpNEP1* (pET15-*MpNEP1*). Como controles foram utilizadas células de *E. coli* não transformadas com o plasmídio de interesse e induzidas com IPTG além de células de *E. coli* com o plasmídio recombinante, mas sem induzir. Na linha 4 pode-se observar uma banda de proteínas superexpressa á altura esperada (25 kDa aproximadamente). A Figura 12B (direita) mostra os resultados de *Western blot* da réplica do gel SDS-PAGE 12A. O gel foi transferido para membrana de nitrocelulosa, esta foi bloqueada com leite desnatado e incubada com anticorpo monoclonal anti-His tag (Sigma) fusionado à peroxidase. Pode-se observar que a

proteína produzida é reconhecida pelo anticorpo sugerindo que é a proteína de interesse. Foi produzido um soro policlonal anti-MpNEp1 para a identificação desta proteína em diferentes amostras. A Figura 12C mostra os resultados de SDS-PAGE da purificação da MpNEp1 usando coluna de ligação a metais. A proteína começou a eluir na fração 3 com grau de pureza aceitável para continuar os estudos.

A Figura 13 apresenta resultados de SDS-PAGE da purificação da MpNEP2 e identificação por *Western Blot* utilizando anticorpo mononal anti-His tag, assim como resultados da purificação de NPP1.

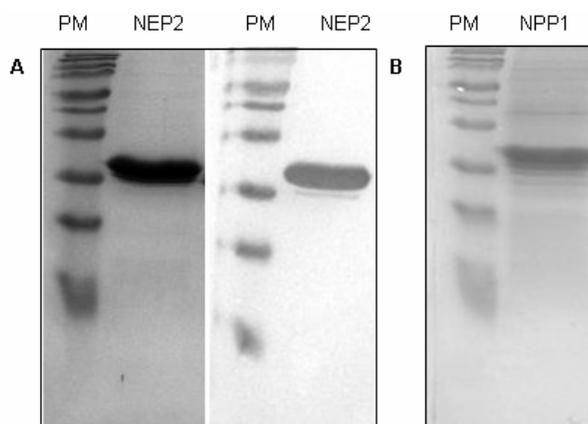


Figura 13: Purificação das proteínas MpNEP2 e NPP1. (A). Purificação da MpNEP2 e identificação utilizando anticorpo anti-His Tag. (B). Purificação da NPP1.

A figura 13A mostra uma banda de proteína pura à altura esperada (aproximadamente 26 kDa) correspondente à MpNEp2 e a identificação da proteína fusionada á cauda de Histidinas mediante *Western Blot* usando anticorpo anti-His tag. Esses experimentos foram realizados posteriormente com anticorpo anti-MpNEp1 sendo reconhecida a mesma banda. O anticorpo produzido em coelho contra MpNEP1 mostrou reação cruzada com MpNEP2, dado esperado pelo fato das proteínas compartilharem grande similaridade na seqüência de aminoácidos. A Figura 13B mostra a purificação de NPP1 dando uma banda na altura esperada (27 kDa aproximadamente).

As Figuras 12 e 13 mostram que conseguimos grandes quantidades das três proteínas recombinantes com um grau de purificação suficiente (> 75%) para continuarmos com a caracterização funcional e estrutural.

A seqüência de cada proteína foi confirmada por espectrometria de massas no LNLIS depois de isoladas de SDS-PAGE e digeridas com tripsina (Promega). Os resultados obtidos se apresentam a seguir. Peptídeos resultantes das análises da proteína NPP1 (de *P. parasítica*) foram submetidos a busca por similaridade contra o banco de dados do NCBI. Obtivemos similaridade com a proteína esperada. A cobertura foi de 8% com um erro de 45ppm. A percentagem de cobertura é muito baixa provavelmente pela contaminação da coluna de cromatografia acoplada ao espectrômetro estar contaminada com resíduos de corridas anteriores. No entanto, os resultados permitiram identificar peptídeos presentes nesta proteína confirmando que a proteína clonada e expressa é a NPP1. A Figura 14 mostra a seqüência da NPP1 e em vermelho aparecem os peptídeos identificados.

1	MNVLTFLIAA	AVSLAVVQAD	VISHDAVVPF	AQPTATTEQ	KAGVKFKPQI
51	HISNGCHPYP	AVDANGNTSG	GLKPTGSSSA	GCK GSGYGSQ	VYGR VATYNG
101	VYAIMYSWYF	PK DSPVTGLG	HR HDWEHVVV	WVDDIKLDSP	SIIAVSPSAH
151	SGYNIYYPPE	SNTIDGYSAK	VDYSSSWVVI	NHALDSTDA	GETQDLIMWD
201	QLTDAARTAL	ENTDFGDANV	PMKDGNFLTK	VGNAYYA	

Figura 14. Seqüência da NPP1. Em vermelho se representam os peptídeos identificados por Espectrometria de Massas.

As proteínas MpNEPs têm um grau de similaridade muito alto (86%) e 91% de identidade na seqüência de aminoácidos. Estes dados explicam o fato de peptídeos procedentes da digestão de MpNEP2 tem identidade com a seqüência da MpNEP1 e vice-versa. A cobertura da MpNEP2 foi de 60%, com um erro de 44ppm, com peptídeos de até 37 aminoácidos com erro de 30ppm (Figura 15). Os peptídeos resultantes da digestão de MpNEP2 tiveram uma cobertura de 46% da seqüência de MpNEP1. Explica-se pelo fato de que as diferenças entre estas proteínas estão no extremo N-terminal enquanto a maioria dos peptídeos obtidos cobre a região C-terminal que é idêntica entre ambas as proteínas MpNEPs.

1	MQLQNFLSIV	LLVVSgaiag	TVMDHDK	IAK	LPASGSPLET	KFQPQLHIGN
51	GCHSYPAVD	QGNWSGGLK	TGAPSAACKD	TSKAQTYVRS	ATFQGK	TALV
101	YAWYMPKDEI	STGIGHRHDW	EGAVVFLNSD	TQQIDGVAAS	AHGKWRKYPN	
151	PGGANIDDTH	VKLQYSAEPV	INSHALDLTD	KGGDLPTLAS	WEGMGADARA	
201	AINERSHWGD	ANPPIADSLI	GSSLSGAWMW			

Figura 15. Seqüência de MpNEP2. Em vermelho se representam os peptídeos identificados por Espectrometria de massas.

Os peptídeos obtidos da digestão da MpNEP1 permitiram uma cobertura de 21% quando comparados com a seqüência da MpNEP1 (Figura 16). A região identificada é idêntica a peptídeos da MpNEP2 por corresponder com a região C-terminal da proteína. Estas análises não permitiriam concluir que corresponde com MpNEP1, mas partindo da clonagem da seqüência correspondente com MpNEP1 podemos confirmar que é a proteína de interesse.

1	MLYSSLLIVV	LFIVTRMSA	PHQLPHDQIA	KFPKSGGPLE	TQYQPALHIG
51	NGCHSYPAVD	VDGNWSGGLK	PTGAPSAACK	DTSKAQTYVR	SATFQGTAL
101	VYAWYMPKDE	ISTGIGHRHD	WEGAVVFLNS	DTQQIDGVAA	SAHGKWRKYP
151	NPGGANIDDT	HVKLQYSAEP	VINSHALDLT	DKGGDLPTLA	SWEGMGADAR
201	AAINERSHWG	DANPPIADSL	IDSSLSGAWM	W	

Figura 16. Seqüência da MpNEP1. Em vermelho se representam os peptídeos identificados por Espectrometria de massas.

A técnica de espectrometria de massas permitiu identificar as três proteínas em estudo: MpNEP1, MpNEP2 e NPP1.

MpNEPs causam necrose

Uma vez confirmada a identidade das proteínas expressas foi conferida a atividade biológica que teoricamente seria indução de necrose em tecidos de plantas. Com esse fim, iguais concentrações de cada proteína (MpNEP1, MpNEP2 e NPP1) foram inoculadas em folhas de tabaco usando seringa hipodérmica. A Figura 17 mostra que MpNEPs foram capazes de produzir necrose em tabaco, igual a NPP1 cujo efeito fora previamente descrito por Fellbrish (2002). Os sintomas foram claramente observados 18 h após a infiltração nas condições testadas, com o máximo de necrose observado às 36 horas depois de começado o experimento. As três proteínas mostraram efeitos similares sem aparentes diferenças na eficiência da atividade necrótica. Como controle negativo, foi

infiltrado igual volume do tampão TNB em cada folha usado para testar as proteínas de interesse (na Figura 17, indicado por setas brancas).

Indução de Nerose em folhas de tabaco

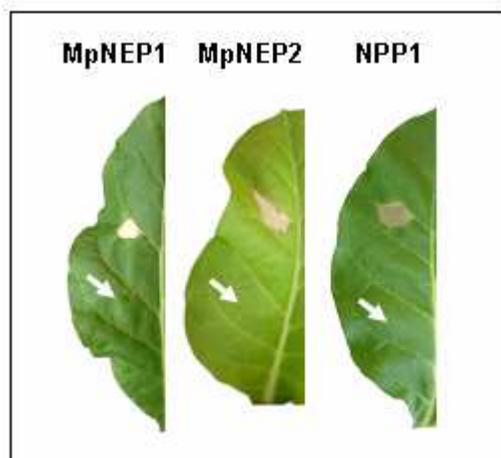


Figura 17: Resultados dos testes de atividade necrótica de MpNEPs e NPP1 em folas de tabaco. Folhas de tabaco inoculadas com tampão TNB (seta branca) e com as proteínas MpNEPs e NPP1. Foto 48 h após a inoculação.

Uma vez que o hospedeiro natural do fungo *M. pernicioso* é o cacau, se passou a determinar a atividade das proteínas em estudo em folhas de cacau da variedade “Catongo”. A Figura 18 mostra os resultados do experimento.

Indução de Nerose em folhas de cacau

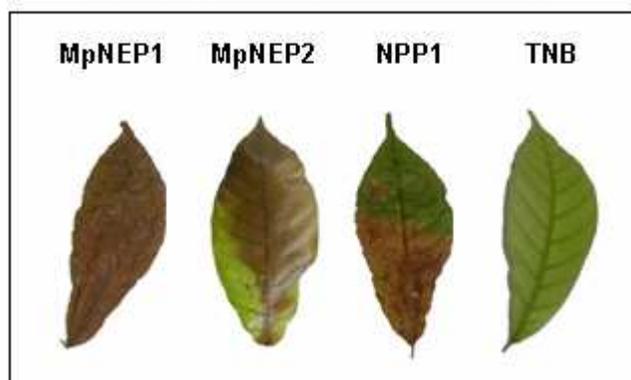


Figura 18. Resultados dos testes de atividade necrótica de MpNEPs e NPP1 em folas de cacau. Folhas de cacau inoculadas com cada uma das proteínas testadas usando o método da imersão do pecíolo na solução de proteínas e TNB como controle. Fotos tomadas após 20 dias da inoculação.

Inicialmente tentou-se usar o mesmo protocolo usado para tabaco. Entretanto, as folhas de cacau foram fisicamente resistentes à infiltração. Para

resolver este problema, foi usada uma metodologia diferente: O pecíolo recém cortado de folhas de cacau foi submerso em 100 μ l de uma solução de proteína (1 μ M).

As três proteínas causaram necrose em folhas de cacau mostrando um padrão similar (Figura 18): os sintomas foram evidentes após 15 dias de realizada a infiltração começando pela base da folha e propagando-se para as regiões superiores com o cursar dos dias. Após 20 dias, as folhas estavam totalmente necrosadas a diferencia do controle (folha inoculada com tampão TNB) que não necrosou durante o tempo do experimento. Os experimentos foram repetidos várias vezes usando em cada um deles três repetições de cada amostra para cada tratamento.

A proteína MpNEP1 foi também infiltrada em meristemas de cacau que a diferença das folhas, conseguiu-se inocular com seringa hipodérmica (Figura 19). Os sintomas de necrose foram verificados 4 h após a infiltração e 48 h depois os meristemas estavam totalmente necrosados. Como controle o tampão TNB foi inoculado nas mesmas condições das proteínas sem causar necrose.

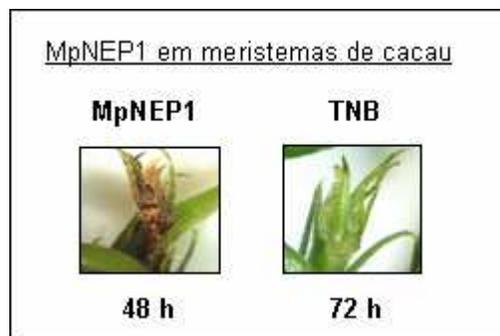


Figura 19. Inoculação da MpNEP1 em meristemas de cacau (esquerda) e como controle TNB (direita). Se indicam os tempos após inoculação que as fotos foram tomadas.

Os resultados anteriores permitem concluir que as três proteínas recombinantes produzidas estão ativas sendo capazes de induzir necrose em tecidos de plantas. Também confirma que as MpNEPs pertencem à família das NLPs.

Emissão de etileno

Para verificar se as MpNEPs eram capazes de induzir a síntese de etileno, outra função atribuída às NLPs, folhas de cacau e tabaco foram colocadas em

frascos e inoculadas usando a metodologia de submersão do pecíolo. Esperaram-se aproximadamente 30 minutos para permitir a transpiração e conseqüente absorção de parte da solução de proteína. Posteriormente os frascos foram selados. Duas horas depois foi possível detectar etileno em amostras retiradas das folhas de tabaco tratadas com MpNEP2 e NPP1. Após 28 h, emissões similares de etileno foram detectadas nos três tratamentos e se mantiveram estáveis pelo menos por 36 h. Os resultados se apresentam na Figura 20.

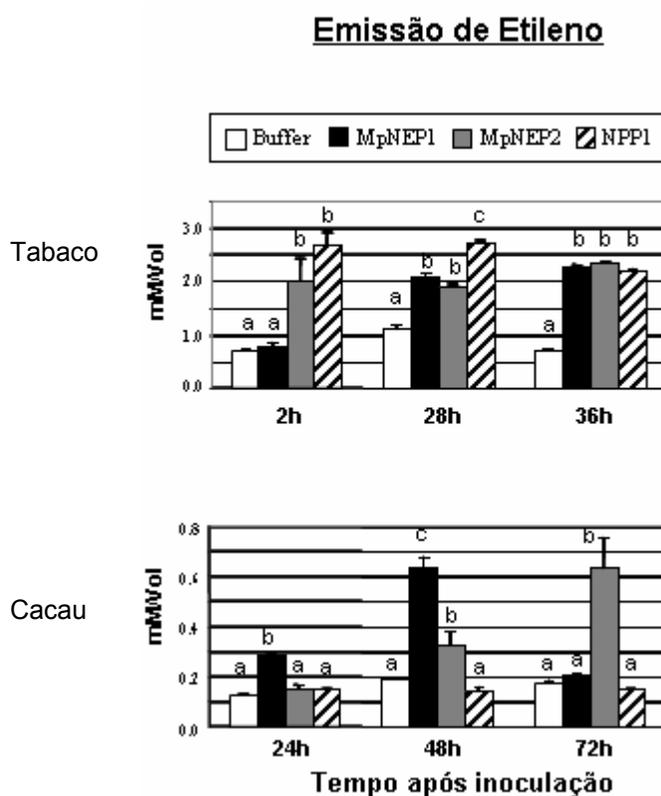


Figura 20. Gráficos de emissão de etileno em folhas de tabaco e cacau induzido pela inoculação das MpNEPs e NPP1. Resultados da emissão de etileno em folhas de tabaco. Cada barra representa a média de três repetições \pm desvio padrão. a, b, c representam diferenças significativas entre os tratamentos com $P < 0,05$.

No caso das folhas de cacau, a emissão de etileno foi menos intensa que as detectadas nas folhas de tabaco. Este fato fica evidente se analisarmos as escalas dos gráficos da Figura 20. O padrão de emissão também foi mais específico para cada proteína. A síntese de etileno induzida por MpNEP1 foi detectável após 24 h da inoculação, aumentando até as 48 h e diminuindo após as

72 h a níveis comparados com o controle. Os níveis de etileno em folhas inoculadas com MpNEP2 foram detectados após as 48 h, aumentando às 72 h. É interessante o fato de que os níveis de etileno induzidos por NPP1 em folhas de cacau foram muito baixos, sem mostrar diferenças significativas com o controle.

Análise de expressão gênica

Uma vez constatado que as MpNEPs recombinantes apresentavam atividade necrótica era preciso determinar se esses genes estavam sendo expressos nas diferentes fases do ciclo de vida do fungo. Com essa finalidade foram realizados experimentos de análise de expressão gênica *ex planta* (Figura 21A) e *in planta* (Figura 21B).

Para experimentos *ex planta* foi realizada a avaliação da expressão dos genes MpNEPs mediante PCR semiquantitativo e Dot Blot (Figura 21A). O RNA total de *M. pernicioso*, nas fases biotrófica e necrótrófica, foi extraído e quantificado por espectrofotometria. Concentrações iguais de RNA de cada amostra foram tratadas com DNase I e convertidas a cDNA utilizando Transcriptase Reversa. As amostras de cDNA foram quantificadas por espectrofotometria. Para garantir uma quantificação mais apurada das amostras de cDNA que seriam usadas como molde nas reações de PCR semiquantitativo decidiu-se utilizar a técnica de *Dot Blot*. Diluições seriadas das amostras de cDNA foram utilizadas para amplificar o gene de actina de *M. pernicioso* (MpActina). Amostras foram coletadas em diferentes ciclos da reação, transferidos a uma membrana e hibridados contra uma sonda de actina radioativa (Figura 21, esquerda). Concentrações de cDNA que produziram perfil similar de expressão do gene de actina em ambas as amostras foram consideradas equivalentes. Assumindo que o gene de actina é um gene constitutivo, deve ser similarmente expresso nas fases biotrófica e saprotrófica do fungo.

Amostras de cDNA foram então utilizadas para a amplificação dos genes MpNEP1 e MpNEP2 usando oligonucleotídeos específicos. Igualmente, alíquotas de diferentes ciclos de amplificação foram transferidas para uma membrana e hibridadas com sondas construídas a partir dos genes correspondentes.

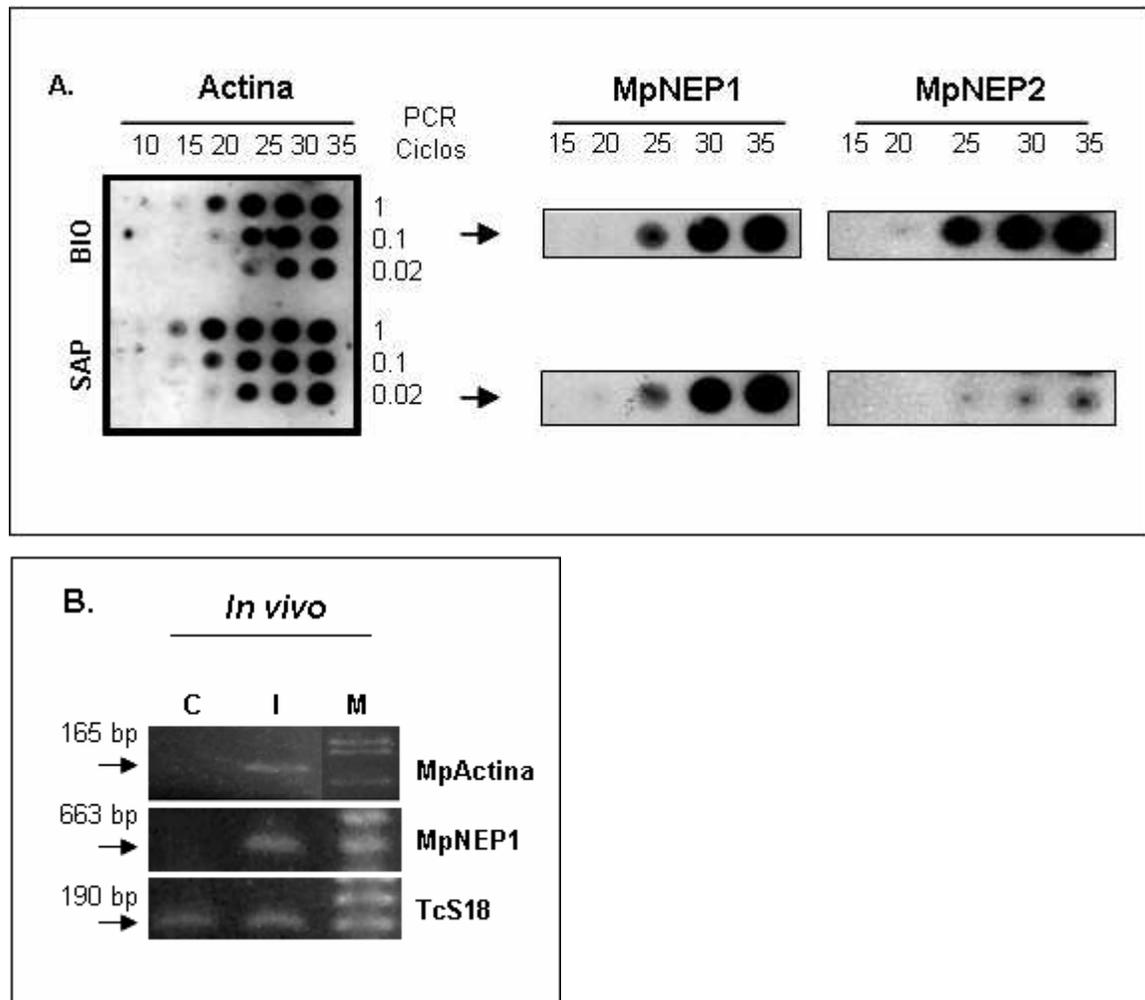


Figura 21. Análise de expressão gênica. (A) Dot Blot mostrando expressão *ex planta* das MpNEPs nas fases biotróficas (Bio) e necrotróficas (Sap) de *M. perniciosa*. Padronização da concentração de cDNA (diluídos 10 e 50 vezes) usando o gene de actina (esquerda); Resultados de expressão dos genes de MpNEPs usando as concentrações de cDNA que tinham igual sinal de amplificação (direito). B. Expressão do gene MpNEP1 a partir de biblioteca de interação fungo-cacau. TcS18 representa o gene ribossomal 18S de *T. cacao* usado como controle interno do cacau e o gene de actina de *M. Perniciosa* como controle do fungo.

Os resultados mostraram que MpNEP1 é similarmente expressa em ambos os micélios, biotrófico e saprotrófico, enquanto MpNEP2 é mais expressa na fase biotrófica.

A seqüência do gene MpNEP2, como foi explicado anteriormente, foi detectada em uma biblioteca de cDNA (GenBank EF114673) construída utilizando amostras de RNA total de tecidos de cacau infestado. Os tecidos da planta utilizados foram vassouras verdes na qual o fungo encontra-se na fase biotrófica.

Esse fato mostra que a proteína MpNEP2 está sendo expressa durante esta fase de crescimento do fungo *in planta*.

Para verificação da expressão *in planta* da MpNEP1, foi coletado o RNA total de ramos de cacau tanto infestado com *M.perniciosa* quanto sadios. Realizou-se a amplificação dos genes MpNEP1 e MpActina por PCR a partir do cDNA sintetizado. Como controle interno da quantidade de RNA do cacau foram usados primers que amplificam um fragmento do gene que codifica para a proteína ribossomal 18S. A figura 21B mostra que ambos MpNEP1 e MpActina foram expressos em tecidos de cacau infestados.

Os nossos resultados indicam que as MpNEPs apresentam diferentes perfís de expressão nas duas fases do ciclo de vida testadas e que ambos são expressos *in planta*.

Estudo de características estruturais das MpNEPs e NPP1

Com o objetivo de conhecer propriedades das proteínas em estudo que poderiam estar influenciando na função, assim como entender o fato das MpNE1 e MpNEP2 serem muito similares na seqüência de aminoácidos e apresentarem perfís de expressão diferencial sugerindo possíveis diferentes funções passamos a realizar estudos de caracterização estrutural.

A partir das análises de seqüência pode ser inferida uma série de características da estrutura, localização e enovelamento das proteínas. A continuação se descrevem os resultados obtidos tanto mediante análises de seqüência quanto por métodos experimentais.

Análise de modificações pos-traducionais baseados em análise de seqüência

Identificação e processamento do peptídeo sinal

Para a identificação da seqüência codificadora do peptídeo sinal foi utilizado o programa SignalP3. Os resultados se apresentam a seguir (Figura 22).

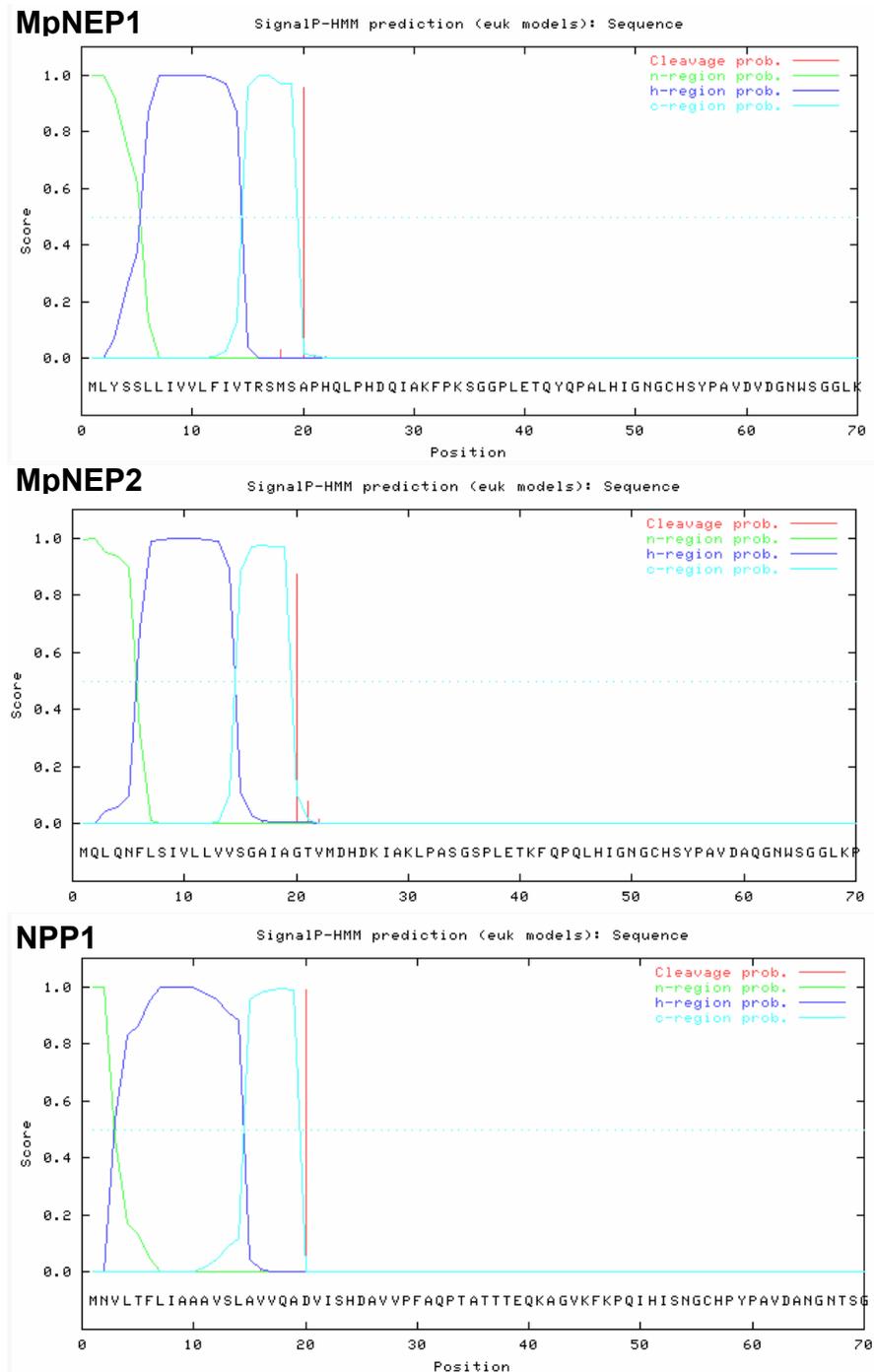


Figura 22. Identificação da região do peptídeo sinal. A linha vermelha representa o possível sítio de processamento para produzir a proteína madura.

Análise dos gráficos indica que a região do peptídeo sinal compreende até o resíduo 19. O processamento acontece entre os resíduos 19 e 20 nas três proteínas para dar origem à proteína nativa.

Identificação de sítios de fosforilação

Para a análise dos possíveis sítios de fosforilação foi utilizado o programa NetPhos 2.0 (ExpASY). Os resultados apresentam-se a continuação (Figura 23):

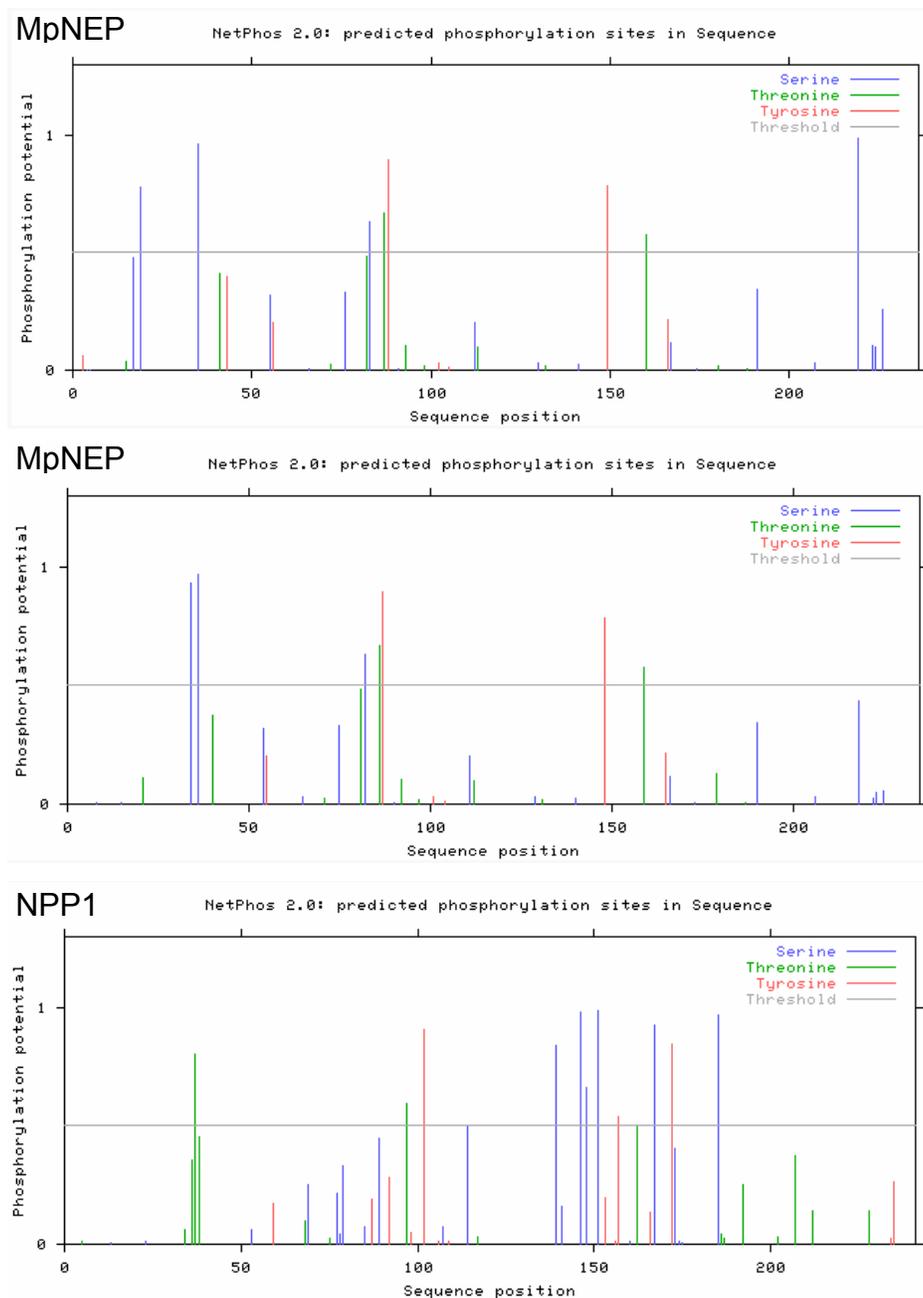


Figura 23. Análise dos possíveis sítios de fosforilação em cada uma das proteínas em estudo.

Segundo estes resultados, MpNEP1 apresenta possíveis sítios de fosforilação em quatro resíduos de serina (19, 35, 83 e 219), em dois resíduos de treonina (87 e 160) e em dois de tirosina (88 e 149). MpNEP2 pode ser fosforilada em três resíduos de serina (34, 36 e 82), dois de treonina (86 e 159) e dois de tirosina (87 e 148). Entretanto NPP1 apresenta um número maior de resíduos com alta probabilidade de fosforilação: sete resíduos de serina (114, 139, 146, 148, 151, 168 e 186), três resíduos de treonina (37, 97 e 163) e dois de tirosina (102 e 173). A confirmação experimental desses dados seria muito interessante já que sinais de fosforilação – desfosforilação são comuns na regulação da atividade de muitas proteínas.

Identificação de sítios de O-glicosilação

Para a identificação de possíveis sítios de O-glicosilação foi utilizada a ferramenta NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>). Não foi detectado nenhum sítio de potencial glicosilação em nenhuma das três proteínas.

Identificação de possíveis pontes dissulfeto

Com o objetivo de determinar a possibilidade dos resíduos de cisteínas presentes nas proteínas estarem formando pontes dissulfeto intracatenarios foi utilizada a ferramenta DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it>). Os resultados apresentam-se na Figura 24.

BDstate igual a 1 representa a máxima probabilidade desse resíduo estar formando uma ponte dissulfeto. *DB conf* representa o grau de confiabilidade dos dados relacionados com a predição do estado de ligação dos dissulfetos onde 0 é baixa e 9 é alta. As três proteínas em estudo apresentam dois resíduos de cisteína na seqüência nucleotídica. Segundo esses resultados as cisteínas nos três casos (MpNEP1, MpNEP2 e NPP1) podem estar formando pontes dissulfeto. Estes resultados são predições que devem ser confirmadas experimentalmente sendo um ponto muito importante já uma possível ponte dissulfeto poderia estar envolvida na estabilidade da estrutura terciária da proteína.

```

                MpNEP1
                +-----+
                |
                .....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....
AA      MLYSSLIVVLFIVTRSMSAPHQLPHDQIAKFKSGGPLETOYQPALHIGNGCHSYPAVDVGDNWSGGLKPTGAPSAAC
DB_state      1
DB_conf       4

                80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....
AA      KDTSKAQTIVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRHDWEGAVVFLNSDTQQIDGVAASAHGKWRKYPNPGGANID
DB_state
DB_conf

                .160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230
AA      DTHVKLQYSAEPVINSHALDLTDKGGDLPTLASWEGMGADARAAINERSHWGDANPPIADSLIDSSLGAWMW
DB_state
DB_conf

DB_bond      bond(53,79)

Conn_conf 1

                MpNEP2
                +-----+
                |
                .....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....
AA      MQLQNFLSIVLLVVSAGAIAGTVMDHDKIAKLPASGSPLETKFQQLHIGNGCHSYPAVDAQGNWSGGLKPTGAPSAACK
DB_state      1
DB_conf       4

                80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....
AA      DTSKAQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRHDWEGAVVFLNSDTQQIDGVAASAHGKWRKYPNPGGANIDD
DB_state
DB_conf

                .160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230
AA      THVKLQYSAEPVINSHALDLTDKGGDLPTLASWEGMGADARAAINERSHWGDANPPIADSLIGSSLGAWMW
DB_state
DB_conf

DB_bond      bond(52,78)

Conn_conf 1

                NPP1
                +-----+
                |
                .....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....
AA      MNVLTFLIAAAVSLAVVQADVISHD&AVVPP&AQP&TATTEQK&GVK&FKP&QI&HIS&NGCH&P&Y&PA&VD&ANG&NT&SG&GL&K&PT&G&SS&S
DB_state      1
DB_conf       4

                ---+
                |
                80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....
AA      AGCKRGSQYGSQVYGRVATYNGVY&AIMYS&WY&FPK&DSPVT&GL&GHR&H&D&EHV&V&V&W&V&D&D&IK&LD&SP&S&I&IA&V&SP&SA&H&SG&Y&NI&Y&P&P
DB_state      1
DB_conf       4

                .160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....
AA      PESNTIDGYS&AK&VD&Y&SS&S&W&V&V&IN&H&AL&D&S&T&D&A&G&E&T&Q&D&L&I&M&W&D&Q&L&T&D&A&A&R&T&A&L&E&N&T&D&F&G&D&A&N&V&P&M&K&D&G&N&F&L&T&K&V&G&N&A&Y&Y&A
DB_state
DB_conf

DB_bond      bond(56,82)

Conn_conf 1

```

Figura 24. Análise da possibilidade dos resíduos de cisteínas presentes nas proteínas estarem formando pontes dissulfeto. A linha de pontos representa a possível ponte dissulfeto.

Análise de estrutura das MpNEPs e NPP1

Comparação da estrutura primária das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 in silico.

Utilizando o programa clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) foi realizada a comparação entre as seqüências de aminoácidos das três proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1, a diferença da Figura 9 que mostrou a comparação de seqüências de aminoácidos entre MpNEPs. Os resultados se apresentam na Figura 25.

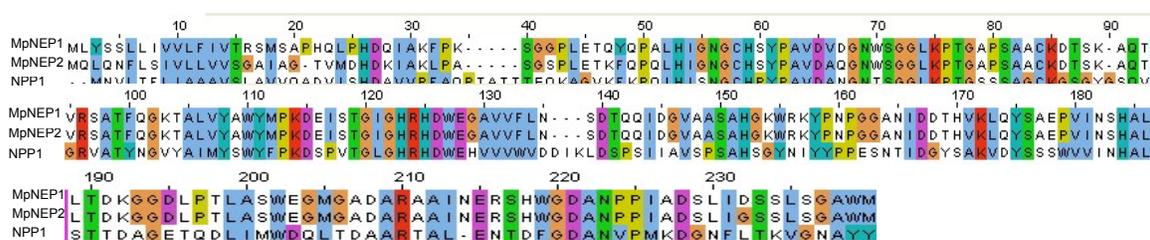


Figura 25. Comparação da seqüência de aminoácidos de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 usando o programa ClustalW. As cores representam propriedades químicas dos diferentes aminoácidos, muitos deles conservados entre as três proteínas.

Segundo esse alinhamento as proteínas MpNEP1 e MpNEP2 compartilham 86% de similaridade na seqüência de aminoácidos. NPP1 apresenta 38% de similaridade com MpNEP1 e 39% com MpNEP2.

Predição de estrutura secundária

A predição de estrutura secundária foi realizada utilizando o programa PSIPRED. A Figura 26 apresenta os resultados de predição de estrutura secundária para cada uma das proteínas.

A figura mostra que as três proteínas apresentam aproximadamente o mesmo conteúdo de alfa hélice. Nos três casos a distribuição de α -hélices (nos extremos N e C-terminal) e folhas β no (na parte interna da seqüência) é a mesma. Estes resultados são esperados fundamentalmente entre MpNEP1 e MpNEP2 devido à similaridade de seqüências. Nos três casos também a quantidade de α -hélices é menor que a quantidade de folhas β .

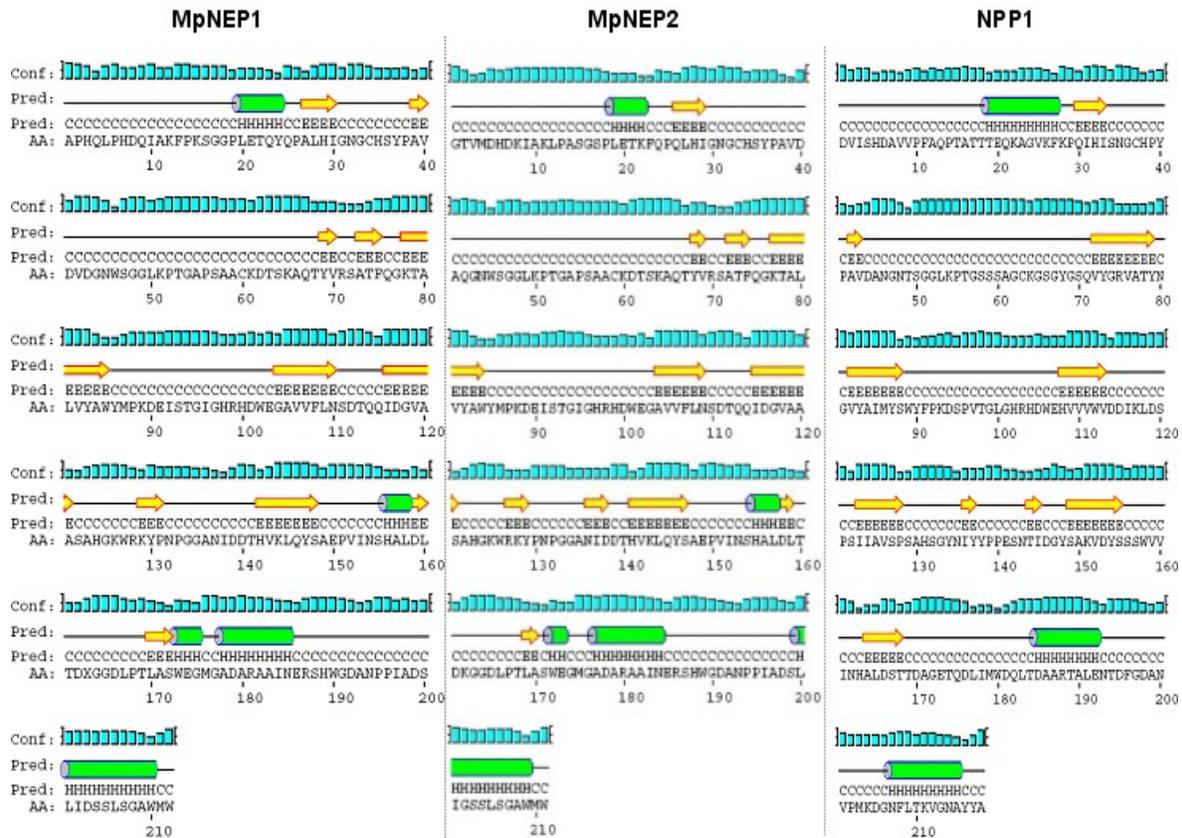


Figura 26. Predição de estrutura secundária de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 sem peptídeo sinal usando o programa PSIPRED.

Cálculo da composição de estrutura secundária por Dicroísmo Circular (CD)

Com o objetivo de determinar a composição de estrutura secundária experimentalmente utilizou-se a técnica espectroscópica de Dicroísmo Circular. A Figura 27 mostra os espectros de CD no UV-distante e UV-próximo para as três proteínas.

A Figura 27 mostra que os espectros de CD das proteínas MpNEP1 e MpNEP2 no UV distante (esquerdo) são semelhantes sugerindo que elas apresentam um conteúdo de estrutura secundária similar, já observado nas predições teóricas. No caso de NPP1 o espectro de UV distante sugere diferenças na estrutura secundária quando comparada com as duas proteínas de *M. pernicioso*. Estas observações serão detalhadas a seguir.

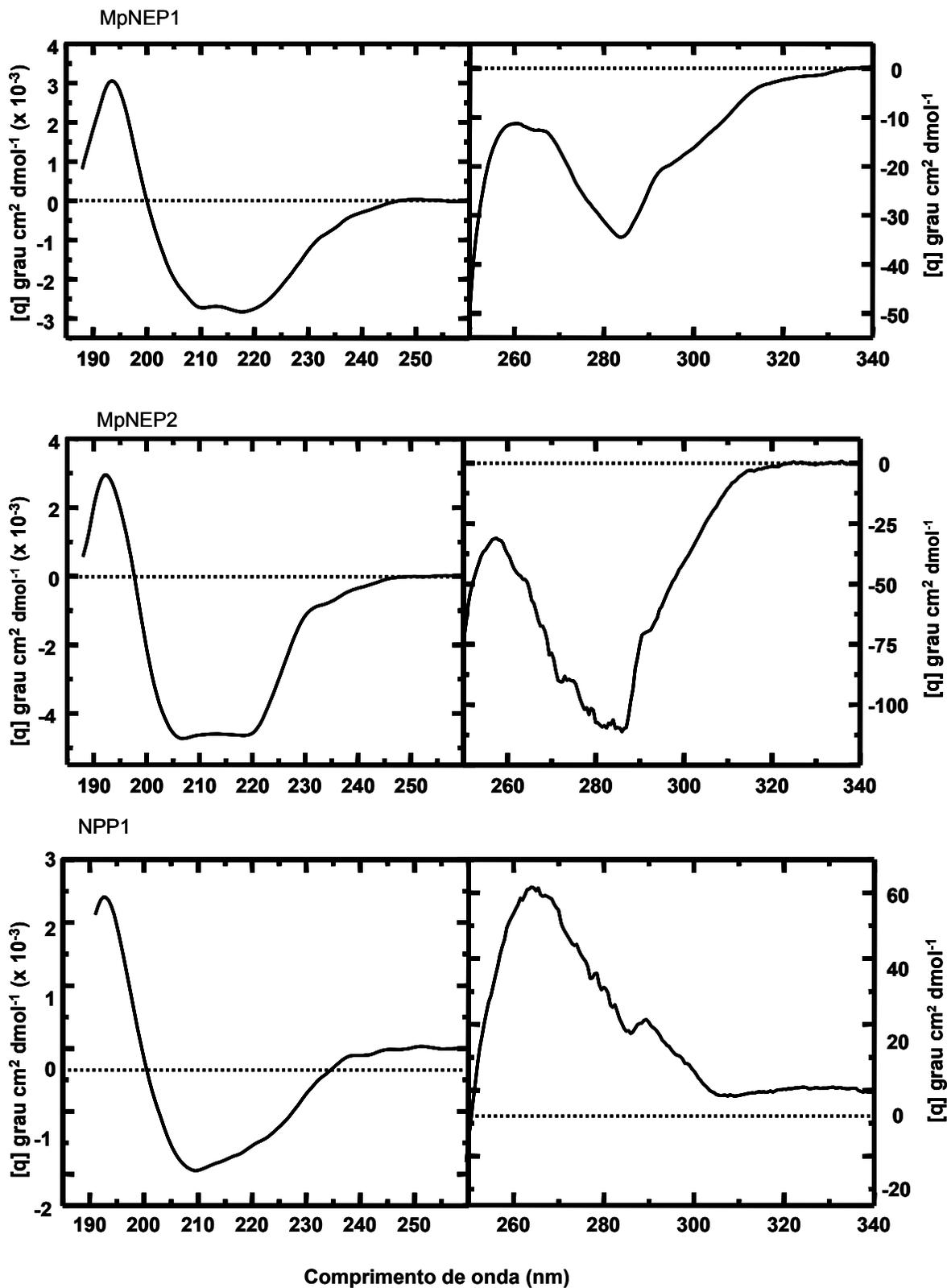


Figura 27. Espectros de CD obtidos para as três proteínas na região do UV-distante (esquerdo) e UV-próximo (direita).

A partir dos espectros mostrados na Figura 27 foi calculada a composição de estrutura secundária para cada uma das proteínas. Os resultados obtidos são resumidos nas Tabelas 5, 6 e 7 para MpNEP1, MpNEP2 e NPP1.

Tabela 5. Conteúdo de estrutura secundária de MpNEP1 por CD.

MpNEP1	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
α hélice	8.9 %	9.7 %	9.0 %	6.2 %	6.5 %
Folha β antiparalela	45.6 %	35.9 %	34.9 %	36.1 %	37.1 %
Folha β paralela	4.2 %	5.5 %	5.6 %	5.4 %	5.4 %
β -Turn	17.9 %	18.9 %	19.5 %	19.5 %	19.3 %
Random Coil	28.6 %	33.2 %	36.0 %	35.2 %	35.3 %
Total	105.2 %	103.3 %	105.0 %	102.4 %	103.6 %

Tabela 6. Conteúdo de estrutura secundária de MpNEP2 por CD.

MpNEP2	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
α hélice	10.1 %	10.8 %	10.4 %	8.5 %	9.0 %
Folha β antiparalela	38.9 %	30.8 %	29.9 %	30.5 %	31.6 %
Folha β paralela	4.2 %	5.3 %	5.4 %	5.4 %	5.5 %
β -Turn	19.9 %	20.3 %	20.9 %	20.6 %	19.3 %
Random Coil	30.5 %	34.3 %	36.2 %	35.3 %	35.2 %
Total	103.7 %	101.5 %	102.8 %	100.3 %	100.6 %

Tabela 7. Conteúdo de estrutura secundária de NPP1 por CD.

NPP1	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
α hélice	8.8 %	7.9 %	4.9 %	5.2 %
Folha β antiparalela	38.7 %	37.9 %	39.5 %	40.8 %
Folha β paralela	5.4 %	5.6 %	5.3 %	5.4 %
β -Turn	18.8 %	19.6 %	19.6 %	19.4 %
Random Coil		36.2 %	35.1 %	35.4 %
Total	104.5 %	107.2 %	104.4 %	106.1 %

As tabelas mostram similaridade no conteúdo de estrutura secundária. Podemos observar que nos três casos as proteínas apresentam entre 45 - 50% de folhas β e entre 8 - 10% de α -hélice. Estes resultados corroboram com as análises *in silico*.

Análises dos espectros de CD em comprimentos de onda do UV-distante permitem estimar o conteúdo de estrutura secundária. A análise da Figura 27 mostra que os espectros de CD em comprimentos de onda do UV-distante (170-260 nm). No caso de MpNEP1 a curva apresenta um pico positivo aproximadamente entre 190 - 195 nm e dois picos negativos, um aproximadamente a 210 nm e outro a 218 nm. MpNEP2 apresenta um pico positivo também entre 190 - 195 nm e dois negativos a 207 e 220 nm, aproximadamente. Ambos os espectros são similares sugerindo que estas proteínas apresentam estrutura secundária parecida. Estes dados experimentais corroboram as análises *in silico*. Os valores de elipticidade de MpNEP1 são discretamente menores que no espectro de MpNEP2.

Analisando o espectro de NPP1 podemos observar a existência de diferenças mais evidentes, com respeito aos espectros de MpNEP1 e MpNEP2. O espectro de NPP1 apresenta um pico positivo entre 190 - 195 nm com valores de elipticidade menores que para as outras duas proteínas e apresenta um único pico aproximadamente a 210 nm. Tendo em consideração que o espectro característico de uma proteína resulta da somatória das contribuições dos espectros individuais das α -hélice e folha β presentes, as pequenas diferenças observadas nos espectros de CD entre as três proteínas podem revelar pequenas variações na composição de estrutura secundária ou no tamanho desses componentes.

Análises do espectro de CD no UV-próximo podem ser relacionadas com a estrutura terciária das proteínas já que os aminoácidos aromáticos e as pontes dissulfetos são os máximos responsáveis pela absorção nestes comprimentos de onda. MpNEP1 tem oito triptofanos (Trp), seis tirosinas (Tyr) e três fenilalaninas (Phe); MpNEP2 apresenta 8 Trp, 5 Tyr e 3 Phe enquanto NPP1 apresenta 5 Trp, 14 Tyr e 6 Phe. Na faixa de comprimento de onda estudada, a fenilalanina não contribui ao espectro de absorção e pode-se desconsiderá-la. O máximo de absorção da tirosina está entre 270-290 nm e a cadeia lateral do triptofano tem o máximo de absorção entre 280-300 nm.

Os espectros das MpNEPs são muito parecidos apresentando um máximo na região de 260-270 nm aparentemente relacionado com o sinal da tirosina e apresentam um mínimo na faixa de 280-290 nm relacionados com o sinal dos triptofanos. Em ambos os espectros os valores de elipticidade são negativos. As pequenas diferenças entre ambos os espectros pode revelar diferenças na estrutura terciária das proteínas. Na análise do espectro de NPP1 pode-se observar que os valores de elipticidade são positivos indicando uma maior intensidade do sinal, provavelmente pelo grande número de aminoácidos aromáticos fundamentalmente tirosinas. Observa-se um pico grande na faixa de 260-270 nm correspondente ao sinal da tirosina e um pico menor entre 280-290 nm correspondendo com a faixa de absorção do triptofano.

O espectro de NPP1 mostra diferenças comparado com os espectros das MpNEPs. Essas diferenças podem estar relacionadas com a diferença no número de aminoácidos aromáticos ou pela interação entre eles ou por diferenças no ambiente dos aminoácidos aromáticos.

Formação de oligômeros

Foi realizada a análise eletroforética das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 sob condições não desnaturantes. Os resultados destes experimentos mostraram que MpNEP2 produz uma única banda enquanto as outras duas proteínas produziram três bandas (Figura 28A). Experimento similar foi realizado em condições desnaturantes onde as três proteínas apresentaram uma única banda com peso molecular correspondente ao monômero (Figura 28B). Estes resultados sugerem que MpNEP1 e NPP1 existem como oligômeros em solução enquanto MpNEP2 apresenta um tamanho menor.

Com o objetivo de analisar o estado de oligomerização das três proteínas foram realizados experimentos utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, Dynamic Light Scattering). Mediante esta técnica pode-se obter o Raio de Giro (R_g) das moléculas e uma estimação do peso molecular em solução. O raio de giro obtido para MpNEP2 foi de 2,4 nm, que é compatível com o peso molecular do monômero (26 kDa). MpNEP1 e NPP1 apresentaram raios de giro

semelhantes de 3,7 nm, correspondendo com um peso molecular de 74 kDa (Tabela adjunta à Figura 28A).

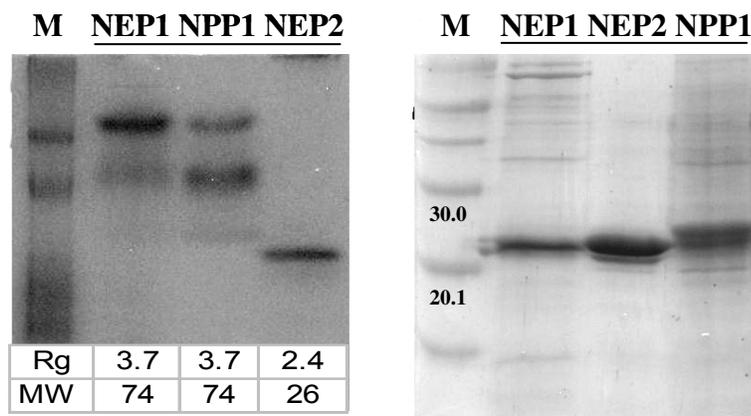


Figura 28. Análise do possível estado de agregação das MpNEPs e NPP1 usando eletroforese em gel nativo (A) em comparação com SDS-PAGE (B). A tabela adjunta à Figura A mostra os resultados de predição do raio de giro (Rg) e a estimativa do peso molecular (PM) de cada uma das proteína por DLS. M mostra o padrão de peso molecular para gel desnaturante.

Conhecendo que as formas monoméricas de MpNEP1 e NPP1 têm cada uma um peso molecular calculado teoricamente de 26 kDa, os resultados sugerem que estas duas proteínas estão presentes em forma de trímeros. A técnica de DLS calcula o peso molecular a partir da determinação do raio de giro da molécula assumindo que a proteína é uma esfera. Este tipo de inferência pode estar associada a erros na interpretação dos resultados em caso da proteína analisada apresentar uma forma diferente de uma esfera. A característica da técnica nos permite concluir então que aparentemente a proteína MpNEP2 aparece como monômero e que MpNEP1 e NPP1 como oligômeros nas condições testadas.

Fluorescência

Foram medidos dados de fluorescência direta para cada proteína e o máximo de absorção em cada caso. Estes experimentos sugerem se os aminoácidos aromáticos – fundamentalmente o Triptofano - estão mais ou menos expostos na proteína permitindo inferir alguns comportamentos das proteínas. A Figura 29 apresenta os resultados obtidos.

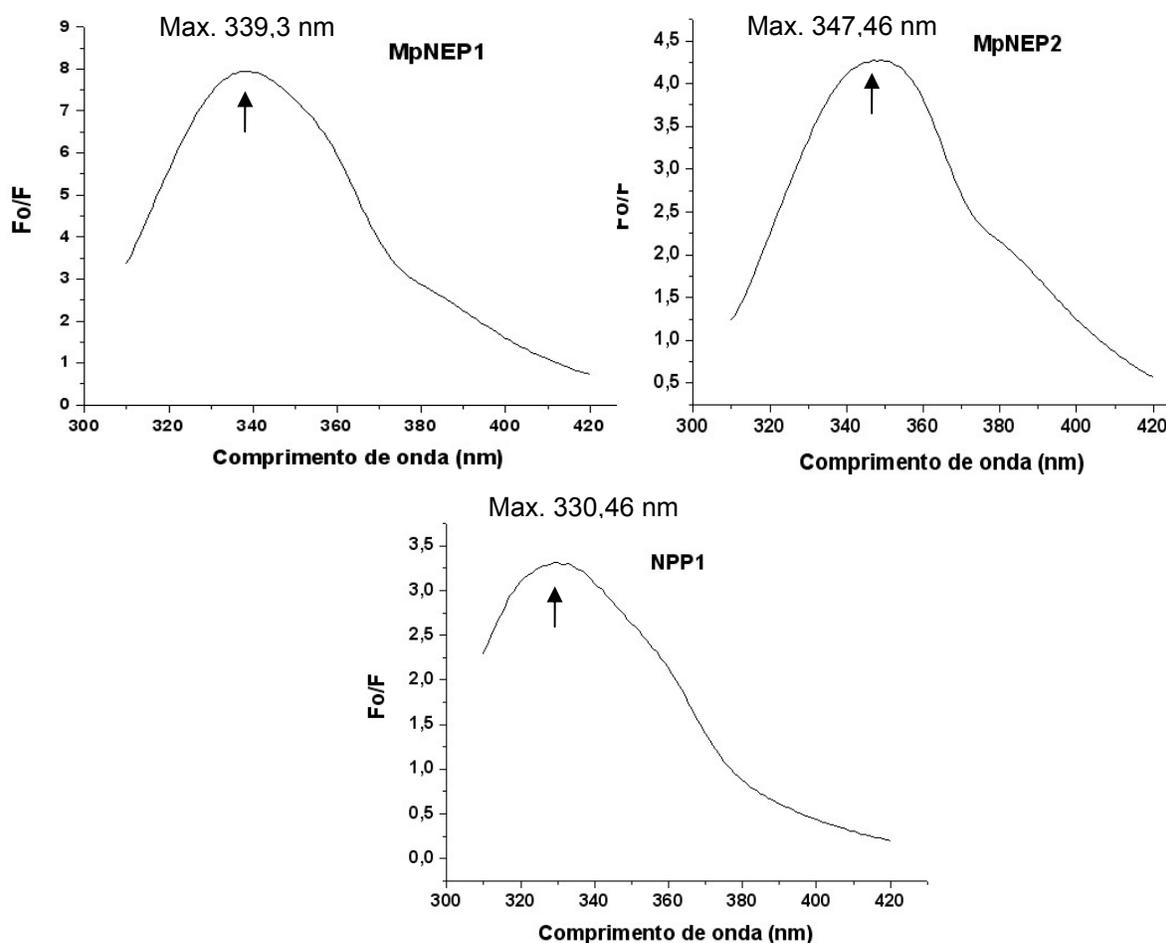


Figura 29. Gráfico de intensidade de fluorescência direta das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1. A seta indica o comprimento máximo de emissão de cada proteína.

Os gráficos mostram os máximos de fluorescência para cada uma das proteínas em estudo. O máximo de MpNEP1 é 339 nm. Considerando que o máximo de absorção de triptofanos livres é de 350 nm, as medições de fluorescência de MpNEP1 sugerem que é apresentada duas populações de aminoácidos aromáticos, uma parte onde os aminoácidos estão enterrados na proteína e outra parte onde estão expostos. O máximo de absorção de MpNEP2 é de 347 nm que é típico de triptofanos expostos já que está muito próximo do máximo de absorção dos triptofanos livres. O gráfico que mostra os resultados

com NPP1 apresenta um máximo de absorção a 330 nm que é típico do comportamento de aminoácidos pouco expostos na proteína ou enterrados.

Estas diferenças poderiam ser relacionadas com o estado de agregação das proteínas. Considerando que das três proteínas, a MpNEP1 que aparentemente está em forma de monômero, apresenta os triptofanos muito expostos enquanto MpNEP2 e NPP1 apresentam triptofanos menos expostos, poderia se sugerir que os triptofanos teriam algum papel na formação do oligômero. Estes resultados sugerem que podem existir diferenças no enovelamento destas proteínas.

Foi medida a intensidade de fluorescência das proteínas MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 em presença de três moléculas diferentes usadas como apagadores de fluorescência. Foi utilizada a acrilamida que é uma molécula neutra e pode ter uma relativa penetração na proteína, cloreto de césio (CsCl) que tem carga negativa e não penetra na proteína e iodeto de potássio (KI) que tem carga positiva. Devido a diferença de tamanho e carga destas moléculas, o apagamento da fluorescência intrínseca de proteínas pode ser usado para diferenciar a localização de resíduos de triptofano e também estudar mudanças conformacionais das proteínas. Neste caso especificamente a acessibilidade do triptofano, porque foi realizada a excitação seletiva a 295 nm.

A diminuição da intensidade, produto da presença do apagador, descreve-se mediante o diagrama de Stern-Volmer (F_0/F vs Q); sendo F_0 a intensidade de fluorescência sem apagador, F a intensidade de fluorescência em presença da molécula apagadora e Q a concentração do apagador.

A Figura 30 apresenta os diagramas de Stern-Volmer da MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 com cada uma das moléculas apagadoras utilizadas. Pode-se observar na Figura 30 que de forma geral nos diagramas de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 o valor de F_0/F aumenta com o incremento da concentração da molécula apagadora indicando que a intensidade de emissão em presença do apagador vai diminuindo. Em baixas concentrações de apagador começam um aumento da fração F_0/F sugerindo que existe uma população de triptofanos facilmente acessíveis pelo apagador. O fato de que com concentrações altas do apagador

(200-450 mM em dependência do apagador) existe uma redução de F sugere que existe uma outra população de triptofanos enterrados na proteína, de difícil acesso. Não se evidenciaram diferenças na emissão de fluorescência com a molécula apagadora em relação com as propriedades químicas destas moléculas.

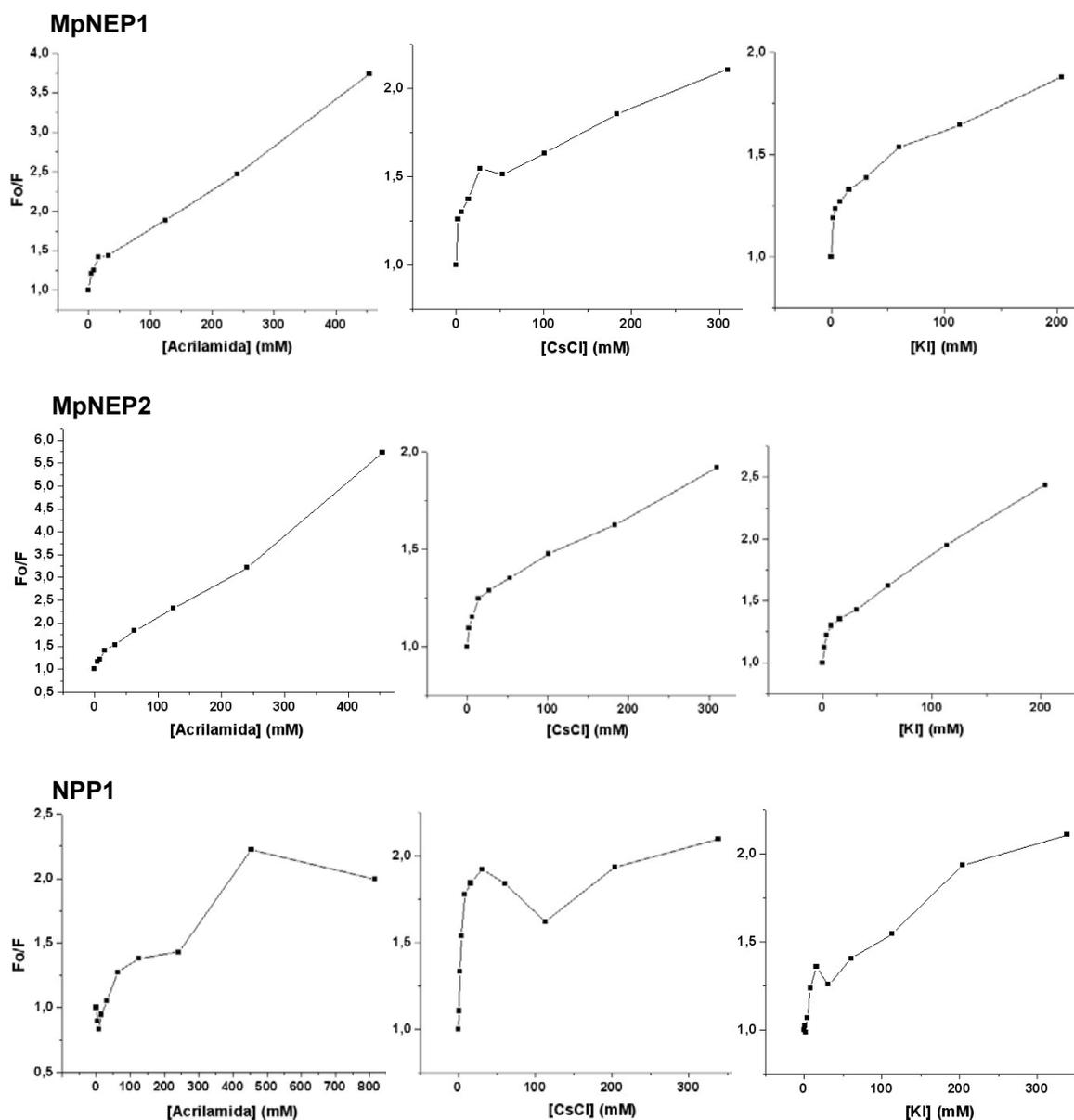


Figura 30. Apagamento de fluorescência. Gráficos obtidos no programa ORIGIN dos dados de fluorescência de cada uma das proteínas em estudo, usando diferentes moléculas apagadoras.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (Small angle X-ray Scattering, SAXS)

Com o objetivo de obter informações sobre a forma das moléculas assim como determinar o tamanho mediante uma metodologia mais confiável foi utilizada a técnica de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS). Inicialmente foram realizadas medições com concentrações baixas de cada proteína ($< 2 \text{ mg ml}^{-1}$). Como conseqüência da baixa intensidade dos padrões de difração obtidos, as proteínas foram concentradas 10X. Os dados experimentais foram processados mediante o programa GNOM que permite a redução e manipulação dos dados fornecendo alguns parâmetros hidrodinâmicos como o radio de giro (R_g). Os resultados obtidos se apresentam na figura 31.

Os gráficos (A) para cada proteína (intensidade vs vetor de espalhamento q) representam as curvas de otimização teórica da função de espalhamento. Baseado nos dados de intensidade calcula-se uma curva teórica da função de espalhamento (curva vermelha) enquanto os pontos negros representam os dados experimentais. A curva correspondente a MpNEP2 ($1,3 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentou uma maior dispersão dos dados experimentais respeito do teórico. Mediante esta curva pode ser calculado o radio de giro da molécula para valores de q pequenos ($q < 1/R$) já que nessa região da curva $I(q)$ é proporcional com $\exp(-R_g^2 q^2/3)$. Observando os gráficos pode-se notar que os valores de intensidade de espalhamento são pequenos podendo introduzir erros nos cálculos do R_g . A partir deste gráfico pode-se calcular a resolução (R) utilizando a fórmula $R = 2\pi/q_{\text{max}}$. Os dados indicam que a resolução dos dados nos três casos está aproximadamente entre 20 - 22 Å.

Os gráficos (B) mostram a função de distribuição de distancias $P(r)$ obtida a partir da inversa da Transformada de Fourier do perfil de intensidade $I(q)$ vs r (gráfico A). $P(r)$ tem um máximo à distância mais provável na proteína e é zero na máxima dimensão da partícula (D_{max}). Podemos observar que os valores de D_{max} para MpNEP1, NPP1 e MpNEP2 concentradas são muito maiores (115 - 130 Å) do que no caso de D_{max} da MpNEP2 diluída ($\sim 70 \text{ Å}$).

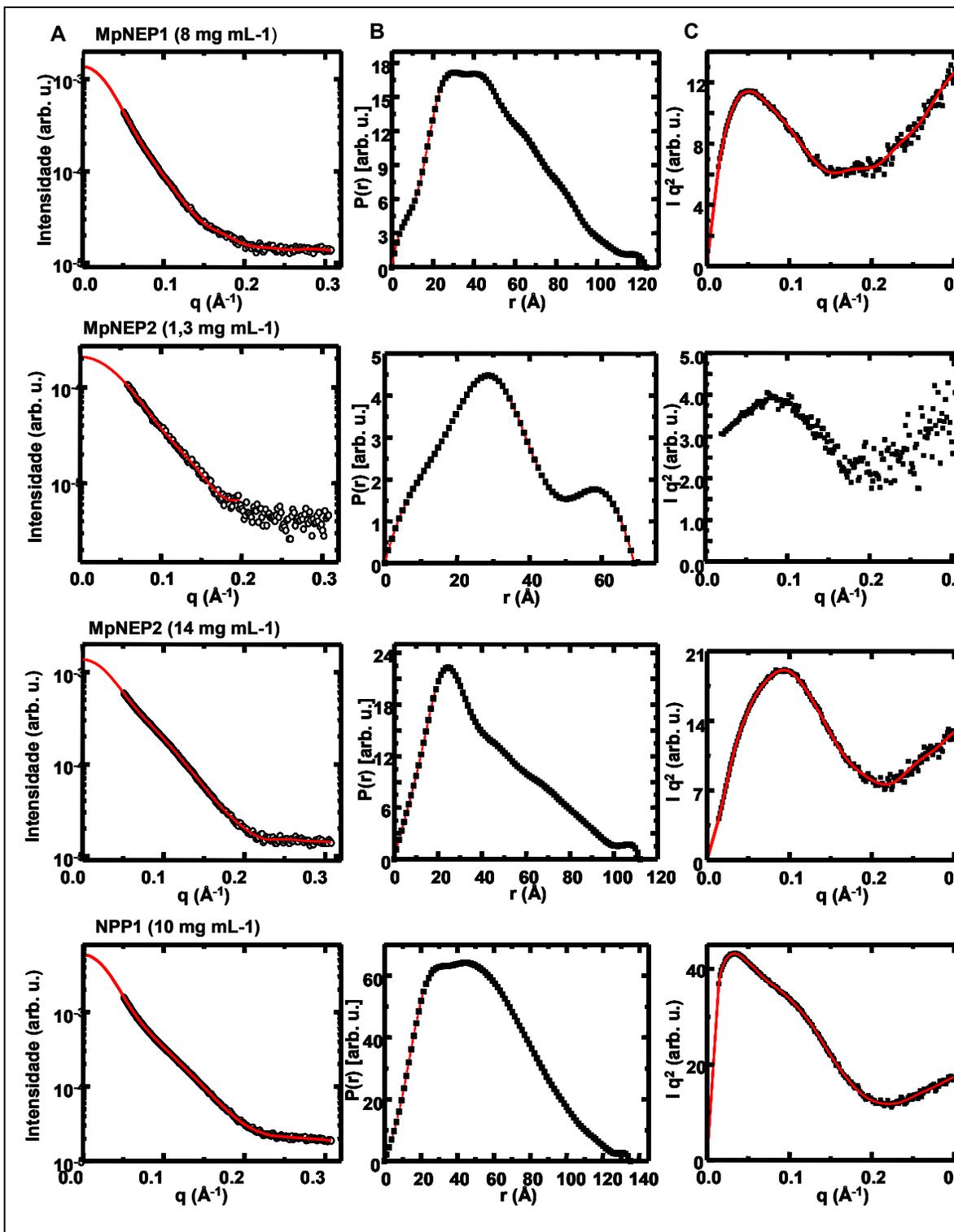


Figura 31. Resultados obtidos mediante o programa GNOM a partir dos dados de SAXS das proteínas MpNEP1, MpNEP2 (diferentes concentrações) e NPP1. (A) Otimização teórica da função de espalhamento; q - vetor de espalhamento; (B) Gráfico da função de distribuição de distâncias. $P(r)$ -distribuição de distância. O valor onde a curva r do eixo X é zero corresponde com o valor de D_{max} ou dimensão da molécula; (C) Diagrama de Kratky.

Estes dados sugerem que a MpNEP2 tem um tamanho menor do que as outras proteínas testadas ou está menos estendida, mas que uma vez que aumenta a concentração o tamanho aumenta provavelmente pela formação de agregados.

No caso de MpNEP2 diluída também se observa que a curva de $P(r)$ apresenta um máximo aproximadamente a 30 Å, posteriormente a curva faz um ombro a 58 Å e atinge zero nos 70 Å. No caso das outras proteínas incluindo a MpNEP2 concentrada não se observa ombro na curva.

O gráfico C corresponde com o diagrama de Kratky. Proteínas enoveladas geralmente exibem um pico no diagrama de Kratky e posteriormente decaem com o aumento de q . Analisando os gráficos resultantes pode-se sugerir que as três proteínas estão enoveladas nas condições ensaiadas.

A Tabela 8 mostra os resultados dos R_g e o peso molecular calculados por SAXS em comparação com os resultados obtidos utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz DLS.

Tabela 8: Comparação do Raio de giro (R_g) de cada proteína analisado por DLS e SAXS.

Concentração de Proteínas (SAXS)	R_g por DLS (nm) (1 mg mL^{-1})	R_g por SAXS (Å)	Estado de agregação
MpNEP1			
0,8 mg mL^{-1}	3,7	$39,11 \pm 1,45$	Dímero
8,0 mg mL^{-1}	---	$38,64 \pm 0,38$	Dímero
MpNEP2			
1,3 mg mL^{-1}	2,4	$25,06 \pm 0,21$	Monômero
14 mg mL^{-1}	---	$34,03 \pm 0,2$	Dímero
NPP1			
1 mg mL^{-1}	3,7	Não realizado	Dímero
10 mg mL^{-1}	---	$41,86 \pm 0,1$	Dímero

Segundo os resultados apresentados na Tabela 8, o R_g da MpNEP1 calculado por SAXS é semelhante ao obtido por DLS (~ 39 Å e 37 Å, respectivamente). Mediante SAXS foi calculado o R_g da proteína concentrada (~ 38 Å) e não houve mudanças significativas quando foi comparado com o R_g da

proteína menos concentrada. No caso de MpNEP2 o Rg calculado por SAXS foi semelhante ao calculado por DLS correspondendo com um monômero (~ 25 Å), mas o Rg da proteína concentrada coincide com o tamanho de um dímero (~ 34 Å). Estes dados sugerem que a MpNEP2 aparentemente agrega em função da concentração. No caso de NPP1 só foi medido o Rg da proteína concentrada mediante SAXS (~ 41 Å) coincidindo com o Rg calculado para a NPP1 diluída por DLS (~ 37 Å). Esses valores de Rg da NPP1 correspondem com um dímero.

Mediante a utilização do programa DAMMIN foram gerados modelos de baixa resolução para cada uma das proteínas a partir dos dados gerados por GNOM. Foram calculados 10 modelos para cada amostra e foi calculado o modelo médio para cada uma delas. Os resultados são apresentados a seguir:

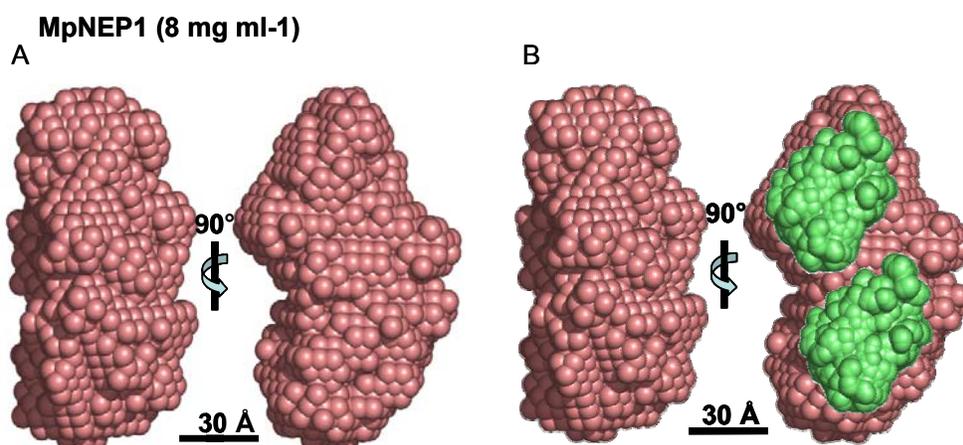


Figura 32. Modelo da estrutura a baixa resolução (~ 20 Å) da MpNEP1 utilizando o programa DAMMIN (A); mesmo modelo com uma rotação de 90° (B). Sobreposição no modelo de dois monômeros da proteína fosfoglicose isomerase (B). 30 Å é uma referência de tamanho da figura.

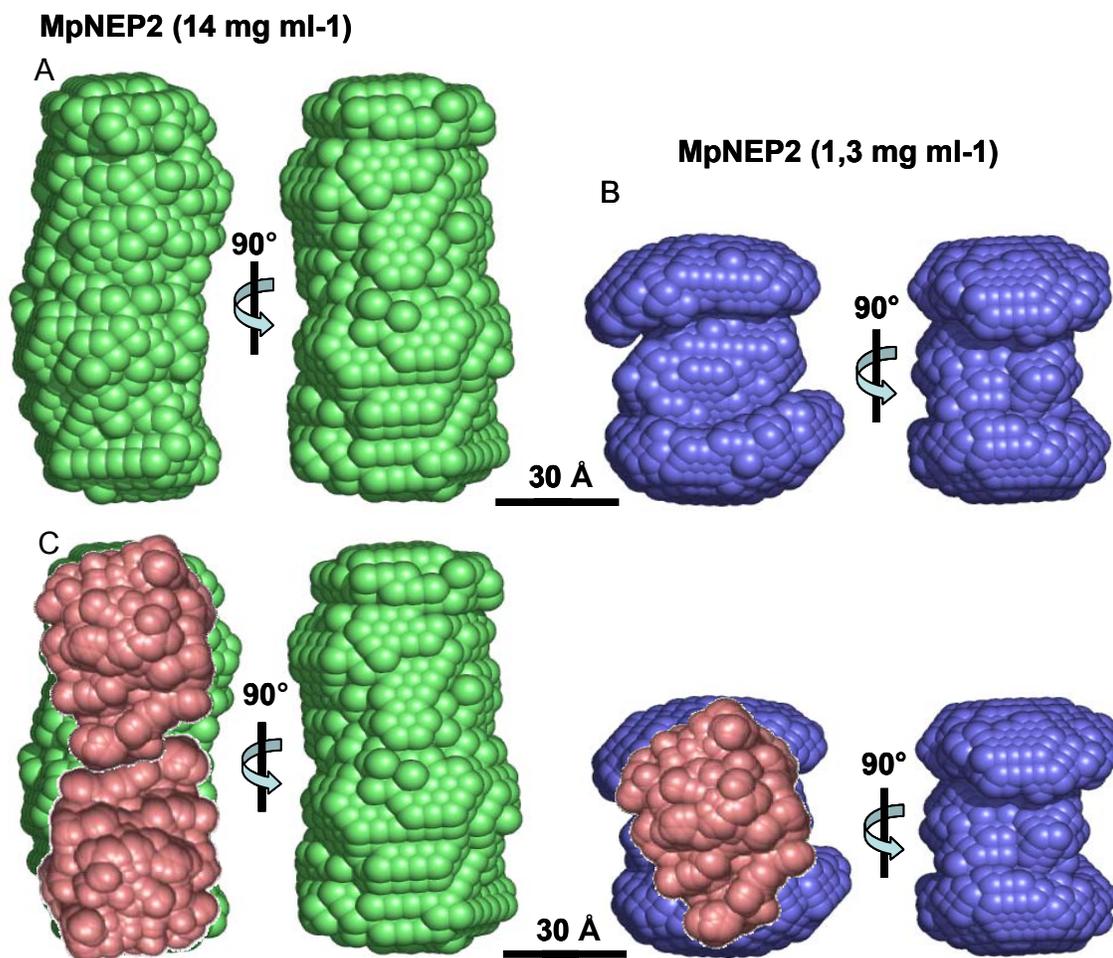


Figura 33. Modelo da estrutura a baixa resolução (~ 20 Å) obtido para MpNEP2 mediante utilização do programa DAMMIN e com giro de 90° . (A) Modelo da MpNEP2 concentrada; (B) Modelo da MpNEP2 a baixa concentração; (C) Sobreposição no modelo de dois e um monômeros (respectivamente) da proteína fosfoglicose isomerase tanto no modelo da MpNEP2 concentrada (esquerda) quanto diluída (direita). 30 Å é uma referência de tamanho da figura.

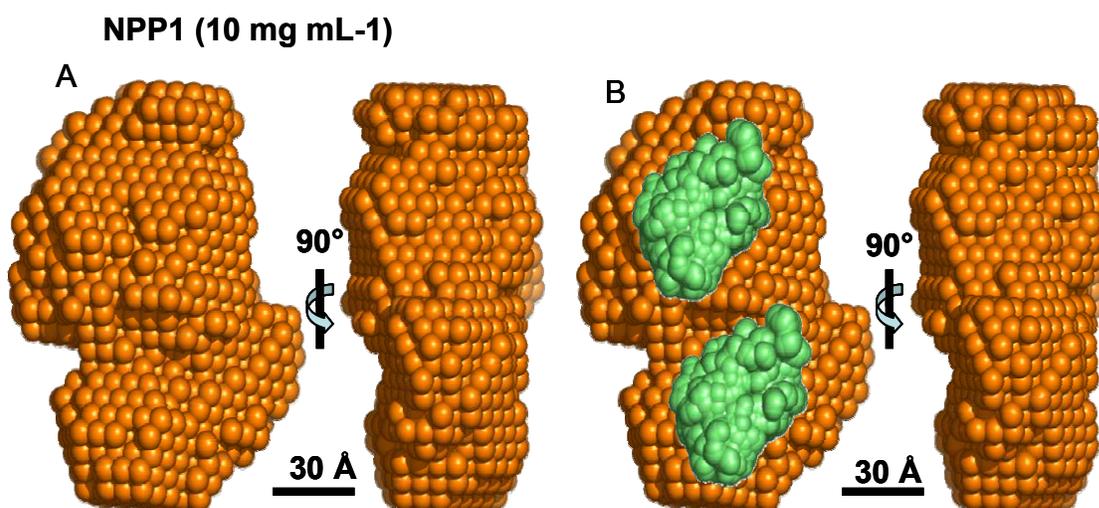


Figura 34. Modelo da estrutura a baixa resolução (~ 20 Å) obtida para NPP1 mediante utilização do programa DAMMIN e o mesmo modelo com uma rotação de 90° (A). Sobreposição no modelo de dois monômeros da proteína fosfoglicose isomerase (B). 30 Å é uma referência de tamanho da figura.

Segundo os modelos gerados, MpNEP1 (Figura 32A), MpNEP2 concentrada (Figura 33A) e NPP1 (Figura 34A) apresentam formas semelhantes, alongadas e simétricas horizontalmente sugerindo a formação de homodímeros. No caso de MpNEP2 menos concentrada (Figura 33B) o modelo proposto aparentemente é um monômero. A Figura 32B, 33C e 34B mostram a sobreposição de um monômero da molécula de fosfoglicose isomerase de *Pyrococcus furiosus* (PDB: 1X82) que tem um peso molecular aproximado com o das proteínas em estudo (190 aminoácidos). Com a sobreposição de uma molécula monomérica de peso molecular semelhante com as proteínas em estudo observou-se que os modelos de maior peso molecular (MpNEP1, MpNEP2 concentrada e NPP1) suportam a sobreposição de duas moléculas de fosfoglicose isomerase sugerindo que as proteínas podem estar formando dímeros. No caso da MpNEP2 diluída o modelo proposto suportou a sobreposição de uma molécula de fosfoglicose isomerase sugerindo que pode estar em forma de dímero a partir dos dados de SAXS.

Efeitos da temperatura no enovelamento da proteína medida pela atividade necrótica. Relação com a estrutura.

Estudos previamente publicados revelaram que a atividade necrótica das NLPs é susceptível a altas temperaturas (Fellbrish, 2002; Gijzen, 2006). As proteínas NEPs de *M. pernicioso* foram submetidas a tratamento térmico com o objetivo de determinar se apresentavam sensibilidade térmica. MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 foram incubadas a 100°C durante 30 minutos, posteriormente incubadas a temperatura ambiente por dois minutos e inoculadas em folhas de tabaco. A proteína MpNEP2 manteve a atividade biológica após o tratamento causando uma necrose similar à proteína não tratada (Figura 35). As proteínas MpNEP1 e NPP1 precipitaram durante o tratamento térmico e não foram capazes de induzir necrose das folhas de tabaco (Figura 35).

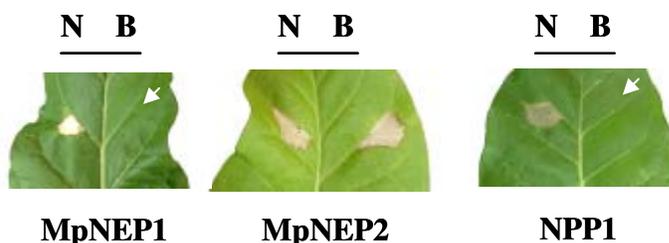


Figura 35. Inoculação em folhas de tabaco de MpNEP1, MpNEP2 e NPP1 antes (N) e depois (B) do tratamento térmico. A seta branca representa o sítio de inoculação do tampão TNB.

Com o objetivo de analisar os efeitos da temperatura no processo de desnaturação das proteínas e a aparente resistência da MpNEP2 foram realizados experimentos utilizando Dicroísmo Circular (CD). Foi monitorado o sinal de dicroísmo das três proteínas no UV-distante a diferentes temperaturas (20°C - 95°C). A Figura 36 mostra os espectros de dicroísmo obtidos para cada uma das proteínas a duas das temperaturas testadas na faixa do UV-distante.

Mudanças no sinal de CD tanto no UV-distante quanto no UV-próximo podem ser utilizados para monitorar a perda de estrutura durante a desnaturação (Pelton, 2000). No espectro correspondente a MpNEP1 pode-se observar que a 20°C a curva é muito parecida à apresentada na Figura 27 para esta mesma

proteína com um pico positivo próximo de 190 - 195 nm e dois picos negativos na faixa entre 205 - 220 nm correspondendo com o espectro da proteína nativa em solução. Se observarmos a curva obtida a 80°C pode-se observar que houve perda do sinal de CD. Este comportamento foi acompanhado pelo aparecimento na cubeta de turbidez relacionada com a precipitação da proteína.

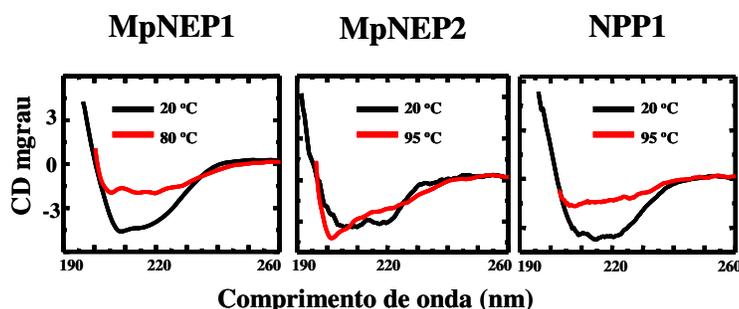


Figura 36. Estudos termodinâmicos das proteínas. Espectros de CD de cada uma das proteínas em estudo na região do UV_distante a duas temperaturas diferentes.

No espectro correspondente à MpNEP2, a curva de 20°C coincide com o espectro mostrado na Figura 27, obtido da proteína nativa em solução. A 95°C o espectro tem variações produzindo um pico negativo a 200nm típico de proteínas não enveladas, mas não há perda do sinal. Esses resultados revelam que existe provavelmente a desnaturação da proteína ou mudanças na estabilidade das diferentes estruturas secundárias, mas que não levam à precipitação. No caso de NPP1 observou-se um comportamento similar a MpNEP1 tanto na perda do sinal de CD quanto na aparição de precipitados.

Estes dados sustentam os resultados de atividade necrótica de MpNEP2 e a perda de atividade de MpNEP1 e NPP1 após o tratamento térmico. Os resultados sugerem que MpNEP2 é capaz de renaturar em condições fisiológicas já que o espectro mostra que sob tratamento térmico, MpNEP2 desnatura, mas uma vez inoculada é capaz de ter atividade.

Os resultados demonstram diferenças físicas importantes entre MpNEP1 e MpNEP2. Pode-se concluir que aparentemente MpNEP1 e NPP1 estão presentes em forma de dímeros independentemente da concentração. Entretanto MpNEP2 é capaz de formar agregados em dependência da concentração.

Cristalografia de proteínas

Foram ensaiadas várias condições de cristalização mediante a utilização dos kits Hampton, várias concentrações de proteína, várias proporções de proteína: precipitante nas gotas de cristalização. Não conseguimos obter cristais de nenhuma das três proteínas em estudo. As proteínas formam agregados amorfos em presença de muitas das soluções precipitantes testadas. Duas gotas de cristalização formaram cristais. Estas gotas foram testadas mediante a adição de azul de metileno, corante de peso molecular grande incapaz de penetrar em cristais de sais, mas pode ter um relativo acesso a cristais protéicos. Os resultados mostraram que os cristais formados eram de sais. Placas de cristalização estão montadas e são monitoradas periodicamente.

Imunolocalização das MpNEPs em tecidos de cacau infectados

Para determinar a localização celular das MpNEPs durante a infecção foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Para os ensaios foram utilizados cortes de cacau sadio e infectado na fase de vassoura verde. Para a detecção das proteínas foi utilizado um anticorpo anti-MpNEP2 produzido em coelho. Como anticorpo secundário foi usado um conjugado anti-coelho-FITC que é um fluoróforo que emite luz verde no comprimento de onda de 525 nm. Os resultados obtidos se apresentam na Figura 37.

A Figura 37 apresenta cortes seriados da mesma região da planta de cacau infestada com *M. pernicioso*, vistos em aumentos diferentes (20X, 80X e 100X). A Figura 37 (A) mostra um corte de cacau infectado na fase de vassoura verde corado com azul de toluidina. Pode-se detectar a presença do fungo na fase biotrófica e necrótrfica. Na região de maior concentração das hifas pode-se observar que as células da planta foram totalmente destruídas (Figura 37). A Figura 37(B) mostra um corte consecutivo do anterior corado também com azul de toluidina com um aumento maior (80X). Pode-se observar que as células envoltas das hifas estão totalmente destruídas. A Figura 37 (C) representa a mesma região submetida à imunofluorescência. Pode-se observar um sinal verde fluorescente na parte externa de células mortas. O aumento foi de 100X para conseguir observar a fluorescência. Segundo os resultados, aparentemente as MpNEPs estão

presentes no apoplasto dos tecidos de cacau infectado, acumulando-se na parte externa da parede das células mortas.

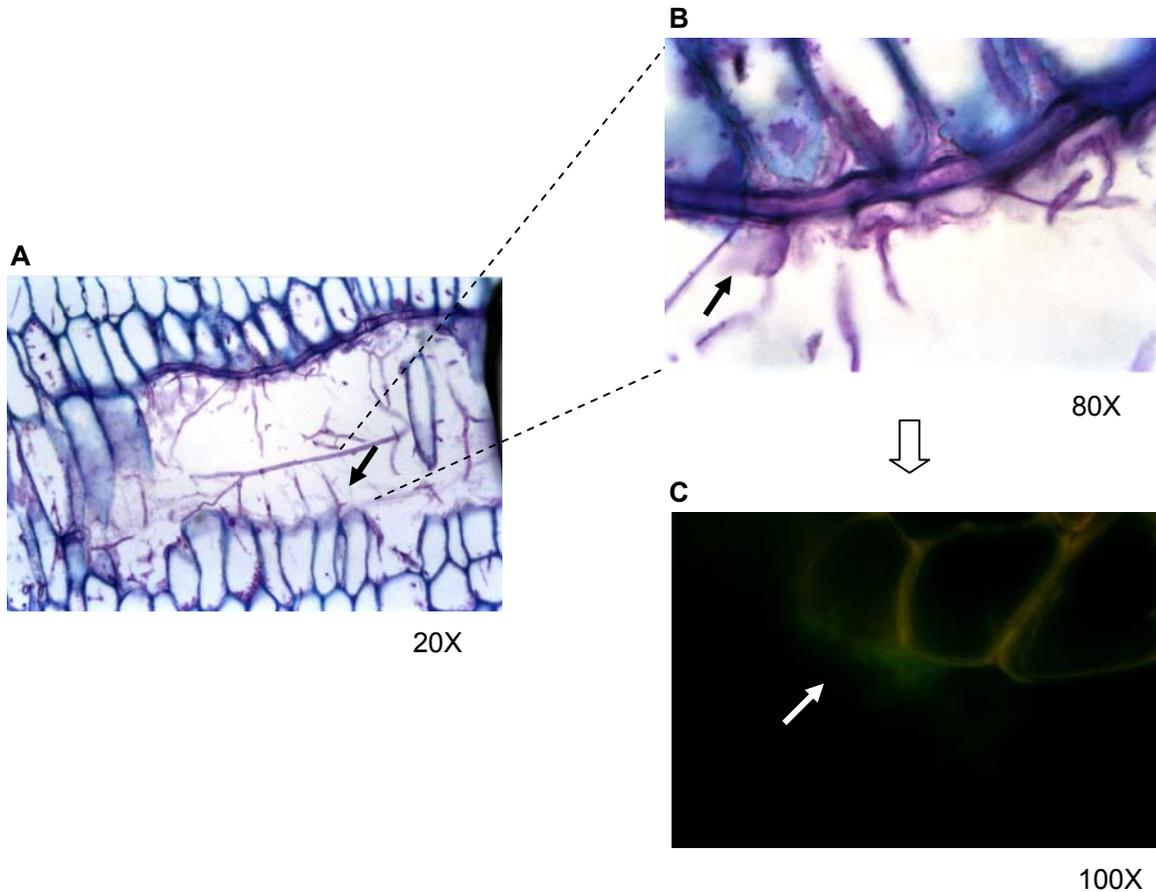


Figura 37. Estudos de imunolocalização das MpNEPs em tecidos infectados da base do ramo de cacau. (A) Corte de vassoura verde corado com azul de toluidina, aumento de 20X (Scatolin, projeto de Pós-doutoramento). (B) Corte consecutivo ao corte A corado com azul de toluidina e visto com aumento de 80X. (C) Corte consecutivo ao B após incubação com anticorpo policlonal anti-MpNEP2 e conjugado anti-coelho-FITC, visto com aumento de 100X. As setas mostram a região que mostrou fluorescência nos diferentes cortes.

Atividade peroxidase em gel

As NLPs são consideradas elicitoras das repostas de defesa das plantas. Uma característica conhecida deste tipo de respostas é a indução de peroxidases logo após início da infecção. Com o objetivo de determinar se as MpNEPs induziam a expressão de peroxidases, a MpNEP2 e o tampão TNB foram

inoculados em cultura de células de tabaco da linhagem Y2. Foram coletadas por filtração amostras de células 5, 15, 30 e 60 minutos após o tratamento com cada proteína. As amostras não desnaturadas foram aplicadas num gel SDS-PAGE 9% que foi posteriormente tratado com DAB. Os resultados são apresentados na Figura 38.

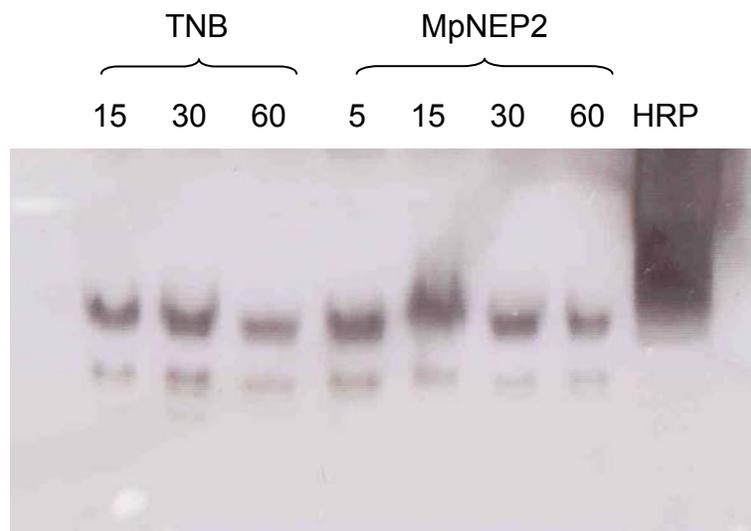


Figura 38. Atividade peroxidase em gel de células tratadas com MpNEP2. (TNB) Atividade peroxidase em células tratadas com tampão aos 15, 30 e 60 min depois de começado o experimento. (MpNEP2) Atividade peroxidase em células tratadas com MpNEP2 aos 5, 15, 30 e 60 min depois de começado o experimento. (HRP) peroxidase de rábano utilizada como controle positivo.

Pode-se observar que todas as amostras apresentam aproximadamente a mesma intensidade de bandas. MpNEP2 aparentemente mostrou um aumento do sinal, mas foi conferido que este aumento se deve a maior concentração de proteínas na amostra. Segundo estes resultados, a MpNEP2 não produz indução da expressão de peroxidases em células de tabaco durante a primeira hora de tratamento. Medições de pH também não mostraram diferenças entre os tratamentos e o controle (pH 5,0-6,0).

Discussão

Durante as análises do projeto genoma Vassoura-de-bruxa foram identificados pela primeira vez genes codificadores de proteínas representativas da família NLP-Like Proteins (NLPs) em um basidiomiceto. Estes estudos foram acompanhados pela aparição de necrose em folhas de tabaco inoculadas com filtrados de culturas do fungo *M. pernicioso* na fase necrotrófica (resultados não mostrados). Com o objetivo de determinar se a atividade necrótica estava sendo causada por proteínas, o filtrado de cultura de *M. pernicioso* foi inoculado em folhas de tabaco após ser submetido a tratamento térmico. Os resultados mostraram perda da atividade sugerindo que proteínas secretadas pelo fungo estariam produzindo a atividade de necrose.

Considerando a descoberta dos genes no genoma e a atividade necrótica do sobrenadante de cultura do fungo, concentramos os esforços em caracterizar os genes codificadores de MpNEPs e os seus produtos gênicos. A Figura 6 mostra resultados de blastp da MpNEP1 contra o GenBank. O e-value indica que o gene identificado pertence à família NLP. Os genes MpNEPs estão presentes em múltiplas cópias, pelo menos três, não possuem introns e parecem estar fisicamente próximos no genoma. MpNEP1 e MpNEP3 estão localizadas “in tandem” (Figura 7). A existência de famílias multigênicas de NLPs tem sido descrita em numerosos organismos entre eles *Phytophthora* spp (Bae, *et al.*, 2005; Gijzen and Nurnberger, 2006) e fungos ascomicetos (Staats, 2006). Em *Phytophthora* spp os genes NLPs mostram características gerais do genoma destes organismos: genes clusterizados com pequena distância entre as ORFs, sem íntrons (Bae, *et al.*, 2005). Pode-se observar que os genes MpNEPs também compartilham estas características (Figura 7).

A Figura 8 mostra a comparação de seqüências das NLPs selecionadas para a análise filogenética (Tabela 4). Se analisarmos essa figura podemos observar que as NLPs estão presentes em uma grande variedade de organismos desde bactérias de vida livre até oomicetos (Staats, 2006). Entretanto, as NLPs mostram grande conservação de seqüências de aminoácidos. As cores da Figura 8 representam diferentes propriedades químicas dos aminoácidos indicando que a

região N-terminal (peptídeo sinal) e C-terminal concentram as maiores divergências; enquanto que o resto da proteína, em geral, é conservada. Um dos parálogos de *Magnaporthe griseae* apresenta características diferentes das outras NLPs utilizadas para a comparação, incluindo outros parálogos desse organismo. A presença de NEPs diferentes num mesmo organismo pode explicar-se pela teoria evolutiva chamada “ modelo de radiação adaptativa” (Staats, 2006). Este modelo postula que sob certa pressão seletiva podem evoluir novas funções para um gene após sua amplificação com algum nível de pré-adaptação para esta nova cópia do gene (Francino, 2005). Posteriormente, a competição entre cópias do gene para esta nova função (mutações deletérias e adaptativas) poderia influenciar nos parálogos. Esta teoria também poderia explicar a origem de pseudogenes já que aqueles parálogos com uma função menos vantajosa para o organismo poderia sofrer mutações até perder a funcionalidade.

A Figura 9 mostra que as proteínas MpNEP1 e MpNEP2 têm grande similaridade de seqüências concentrando as diferenças na região N-terminal fundamentalmente na seqüência que codifica para o peptídeo sinal. Considerando que essa região é removida na proteína madura podemos concluir que essas discrepâncias na seqüência não devem influenciar na atividade.

A comparação filogenética das MpNEPs com outras seqüências de NLPs publicadas agrupou MpNEP1 e MpNEP2 muito próximas, mas as colocou num ramo junto a seqüências de um diverso grupo de organismos como oomicetos e bactérias (Figura 10). Não se formou um grupo monofilético de seqüências de fungos. A única separação evidente foi entre as seqüências que apresentam 2 ou 4 cisteínas, definidos por Gijzem (2006) como seqüências Tipol e Tipoll, respectivamente. A árvore apresenta uma dicotomia clara entre estes dois grupos de seqüências. As MpNEPs pertencem ao Tipo I junto com todas as seqüências de oomicetos.

A peculiar distribuição filogenética das seqüências da família NLP já foi descrita por vários autores. Existem várias hipóteses tentando explicar a complexa evolução deste gene. Uma primeira possível explicação pode ser que tenha acontecido Transferência Horizontal de Genes (THG) (Pemberton and Salmond,

2004; Gijzen and Nurnberger, 2006). Uma característica comum entre os diversos organismos que apresentam o gene que codifica para NLPs é o fato de que, exceto *V. pommerensis*, esses organismos são capazes de degradar a parede das células da planta (Pemberton and Salmond, 2004). Significa que em casos de co-infecção, onde dois organismos estão presentes dentro dos tecidos do hospedeiro, DNA livre pode estar em contato com células intactas, sugerindo a possibilidade de que as células possam englobar o material genético favorecendo a ocorrência de Transferência Horizontal de Genes.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram analisadas algumas características da seqüência que são úteis para encontrar possíveis indicadores de THG. Um fato que chamou a atenção desde o início do projeto foi que esta família de proteínas nunca tinha sido descrita em fungos basidiomicetos, o qual poderia ser por a escassez de seqüências de este tipo de fungos em bancos de dados públicos. Embora hoje, existam ainda poucos genomas de basidiomicetos seqüenciados, esse número aumentou permitindo realizar algumas análises.

Foram analisados os genomas de cinco fungos basidiomicetos cujos genomas estão total (*Cryptococcus neoformans*) ou parcialmente seqüenciados (*Coprinus cinerea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ustilago maydis* e *Laccaria bicolor*). Não foi possível detectar genes homólogos a NEP, indicando descontinuidade na evolução destas seqüências. Ferramentas utilizadas para avaliar possível THG são a comparação do uso de códons do gene em relação com o uso de códons dos outros genes do organismo (Gribkov, 1984) e a comparação do conteúdo de GC do gene em relação ao do genoma. Análise do uso de códons das MpNEPs mostrou que este é similar ao dos outros genes de *M. perniciosus* e diferente do uso de códons dos genes de *P. infestans* (Figura 11).

O conteúdo de GC dos genes das MpNEPs foi maior quando comparado com o conteúdo de GC médio dos genes de *M. perniciosus* (56% versus 46%) sugerindo que estas seqüências foram recentemente introduzidas na espécie e não estão totalmente adaptadas. Por outro lado, as NEPs de *Phytophthora* spp têm um conteúdo de GC de 56%, interessante o mesmo de *M. perniciosus*. O

uso de códon das NLPs de *Phytophthora* spp coincide com o dos outros genes do genoma desse organismo. Estas características sugerem que a seqüência codificante das NLPs tem uma origem muito antiga em esta espécie. Estes dados sugerem que a presença de MpNEPs em *M. perniciosa* pode ter sido por transferência horizontal de Genes.

Esta possibilidade é muito atrativa em caso de patógenos de cacau. É comum que frutos de cacau sejam infectados simultaneamente por *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão parda (Flament, Kebe *et al.*, 2001), e *M. perniciosa*. Ambos patógenos produzem sintomas similares na planta levando a um aumento da necrose do tecido. A necrose produzida por estes organismos pode ser diferenciada unicamente pela origem: a necrose causada por *M. perniciosa* começa desde dentro do fruto enquanto a necrose produzida por *P. palmivora* começa de fora para dentro. Finalmente, o fruto está totalmente necrótico e cada microorganismo pode ser isolado independentemente. Esta co-infecção junto à degradação geral dos tecidos infestados abre a possibilidade de que DNA livre e células intactas poderiam entrar em contato permitindo um processo de transformação natural e provavelmente a THG.

Arnold (2003) reportou que organismos endofíticos de cacau parecem limitar os efeitos daninhos de patógenos. Significa que patógenos e endofíticos co-habitam as plantas de cacau. Considerando que *M. perniciosa* e cacau evoluíram na mesma região geográfica e que existem vários biótipos de *M. perniciosa*, alguns deles não patogênicos de cacau, se poderia sugerir que *M. perniciosa* pode ter adquirido genes de patogenicidade em cacau de outros microorganismos, sendo *Phytophthora* spp candidatos sugestivos.

Uma explicação alternativa poderia ser que NLPs sejam genes muito antigos, cuja seqüência duplicou-se e evoluiu em dois Tipos (I e II) antes da divisão das células eucarióticas e procarióticas. Segundo Pemberton *et al.* (2004) a função das NLPs está determinada aparentemente por poucos resíduos de aminoácidos em posições conservadas sendo estes responsáveis pela manutenção da estrutura. Sendo assim, o resto da seqüência poderia estar submetida a uma rápida evolução. Por outro lado, Fellbrish (2002) mostrou que

mutações em uns poucos resíduos de aminoácidos podem causar a perda da função. Estes resultados associados à análise evolutiva sugerem que organismos que não utilizam esta proteína como protozoários, plantas e animais, podem ter sofrido uma rápida erosão na seqüência codificante para esta proteína. O evento descrito pode ainda ter acontecido em organismos que se beneficiam das funções de NLPs sofrendo perda da atividade de um dos Tipos de NLPs e cuja função é assumida pelo tipo restante. Este fato poderia explicar a expansão deste gene no genoma de muitas espécies, particularmente *Phytophthora* spp onde algumas espécies podem chegar a ter 40 cópias de NEP no genoma (Tyler, *et al.*, 2006). A aparição de pelo menos três cópias no genoma de *M. pernicioso* também sugere a importância desta proteína para a espécie. O efeito da dosagem gênica pode ser vantajoso no caso de genes pouco expressos (Hooper, 2003); característica aparentemente dos genes NLPs já que não têm sido detectados por *Northern blot in planta*, se não por técnicas mais sensíveis como RT-PCR (Bae, *et al.*, 2005; Gijzen and Nurnberger, 2006).

A recorrência das duplicações e a rápida evolução das cópias dos genes de NLPs sugerem que seqüências individuais deste gene poderiam codificar para proteínas com propriedades adicionais. Durante o desenvolvimento deste trabalho foram analisadas as características de MpNEP1 e MpNEP2 na tentativa de verificar esta possibilidade. Mostrou-se a capacidade das MpNEPs de causar necrose dos tecidos em plantas de tabaco (Figura 17) e cacau (Figuras 18 e 19), assim como a indução de etileno em tecidos vegetais (Figura 20). Um fato interessante é que apesar de que ambas as proteínas, quando aplicadas em igual concentração, induzem necrose em tempos comparáveis após a inoculação (ambas causam necrose após 18h em tabaco e 15 dias em cacau), a indução da emissão de etileno mostrou padrões diferentes.

Está bem documentado que o desafio de plantas com patógenos, em muitos casos aumenta a produção de etileno (Mauch, 1984; Broekaert, 2006). Em tabaco, MpNEP2 induziu emissão de etileno muito rapidamente, comparável com os efeitos causados por NPP1. Entretanto, essa situação foi invertida em caso das folhas de cacau onde a indução de etileno foi muito baixa e em alguns

dos experimentos não detectáveis. Outra diferença detectada foi que o aparecimento dos sintomas de necrose observados em cacau foram evidentes unicamente vários dias após a parada da emissão de etileno. Estes resultados sugerem que MpNEPs provavelmente induzem a emissão de etileno e que este hormônio poderia preparar os tecidos para a posterior necrose. Jennings (2001) mostrou que NEP1 induz acumulação de transcritos de 1-Aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC oxidase) e ACC sintase (enzimas envolvidas na síntese de etileno) em células de tabaco. Diferentes patógenos produzem autonomamente etileno, seja *in vitro* ou *in planta* como *Botrytis cinerea* (Cristescu, 2002) e a bactéria *P. syringae* (Nagahama K, 1991). Não se conhece a significação da possível produção de etileno pelo patógeno. No genoma do fungo *M. perniciosa* identificou-se o gene que codifica para a ACC sintase sugerindo que poderia estar produzindo etileno. Entretanto, outros estudos estão sendo desenvolvidos no nosso laboratório na tentativa de avaliar a produção de fitohormônios (entre eles etileno) por *M. perniciosa*. O etileno tem sido relacionado a processos como hipertrofia (Orchard, *et al.*, 1994), degradação de clorofilas (Trebitsh, *et al.*, 1993), epinastia de folhas, pecíolo e tronco (Woodrow, *et al.*, 1989), sintomas presentes durante a interação *M. perniciosa*-cacaueiro e que foram relacionados com o aumento na emissão de etileno (Scarpari, *et al.*, 2005). A diferença nos perfis de emissão de etileno de MpNEP1 e MpNEP2 sugerem que estas duas proteínas apesar da grande similaridade de seqüências podem ter diferenças na forma de ação.

Neste trabalho foram realizadas análises *in silico* utilizando programas de predição de modificações postraducionais e outras características estruturais. Segundo os resultados podemos concluir que as proteínas em estudo são proteínas secretadas apresentando um peptídeo sinal (Figura 22) possuindo vários sítios de potencial fosforilação (Figura 23). Staats (2006) identificou possíveis sítios de fosforilação em duas NEPs de *Botrytis* spp. A fosforilação de proteínas é um importante mecanismo regulatório que pode estar envolvido na transdução de sinais (Ganguly, 1999).

A predição de possíveis fontes dissulfeto é apresentada na Figura 24. Os resultados mostraram que as duas cisteínas presentes nas proteínas em estudo podem estar formando uma ponte dissulfeto interna. Essa possibilidade foi levantada também por Staats (2006) para NEPs de *Botrytis* spp. Fellbrish (2002) mostrou que os resíduos de cisteína são essenciais para a atividade biológica da proteína. As análises filogenéticas também apontam para a importância dos resíduos de cisteína já que tanto os resíduos quanto a distância entre eles são conservados entre organismos distantes filogeneticamente.

Foram utilizadas várias ferramentas para o estudo da estrutura secundária das MpNEPs e da NPP1. Primeiramente foi realizada comparação de seqüência entre as três proteínas em estudo. A Figura 25 mostra que estas proteínas compartilham alto grau de similaridade de seqüências. Posteriormente foi realizada a predição de estrutura secundária das proteínas sem o peptídeo sinal. Os resultados (Figura 26) mostram que as estruturas secundárias são muito parecidas. As regiões de α -hélice são menos abundantes e estão nas extremidades N e C-terminal das proteínas enquanto que as estruturas de folha- β estão em maior número e distribuídas no meio das proteínas. Esta distribuição também foi descrita por Staats (2006) para proteínas NEPs de *Botrytis* spp e por Qutob (2002). Estas semelhanças nos componentes estruturais entre NEPs de diversos organismos sugerem uma função comum para estas proteínas (Bae, 2006). Os dados do conteúdo de estrutura secundária foram confirmados por estudos de dicroísmo circular (Tabelas 5, 6 e 7; Figura 27). Estudos da fluorescência direta das proteínas (Figura 29) e com apagadores de fluorescência (Figura 30) mostraram que as três proteínas em estudo parecem apresentar um grau de enovelamento similar embora NPP1 tenha algumas diferenças na acessibilidade dos triptofanos quando comparado com MpNEPs.

Resultados dos experimentos de eletroforese em gel nativo (Figura 28), SAXS (Figura 31) e estudos termodinâmicos por CD (Figura 36) revelaram diferenças nas propriedades físicas das proteínas MpNEPs que poderiam sugerir diferenças no modo de ação. Resultados de DLS sugerem que MpNEP1 e NPP1 estariam formando trímeros enquanto que MpNEP2 formaria monômeros.

Utilizando a técnica de SAXS determinou-se que MpNEP2 é predominantemente um monômero em solução enquanto MpNEP1 está presente como um dímero, similar a NPP1. As Figuras 32, 33 e 34 mostram a forma de cada uma das três proteínas inferida a partir dos dados de SAXS. Estas figuras explicam o porquê da discrepância entre os resultados obtidos por DLS e SAXS. Para o cálculo do raio de giro da molécula por DLS considera-se que a proteína é uma esfera. Segundo os modelos gerados por SAXS, a forma das proteínas se afasta do conceito de esfera, tendo uma forma mais expandida, e portanto os dados de DLS não são precisos.

As proteínas MpNEP1 e NPP1 precipitam com o aumento da temperatura resultando na perda da atividade necrótica, enquanto MpNEP2 permanece em solução recobrando a atividade ainda depois de uma provável desnaturação transiente causada no prolongado período de fervura (Figura 35 e Figura 36). Bailey (1995) detectou a resistência de NEP1 ao calor, mas é a primeira vez que tais variações são descritas em NLPs de um mesmo organismo sugerindo que MpNEPs poderiam ter especificidades que eventualmente levariam estas proteínas a terem atividades complementares na célula.

Em correspondência com esta hipótese, foi detectado que MpNEP2 é expressa fundamentalmente no micélio biotrófico (Figura 21A), o qual está presente em pouca densidade na planta em etapas iniciais da doença Vassoura-de-bruxa. Durante esta fase é provável que o fungo esteja submetido a grande estresse oxidativo pela planta (Low and Merida, 1996; McDowell and Dangl, 2000). Se esta hipótese estiver correta, é possível que a expressão de uma isoforma ativa em forma de monômero seja mais resistente a estresse, permitindo à proteína realizar a função em baixas concentrações. A fase saprofítica está acompanhada por um incremento na biomassa do micélio. Considerando que a MpNEP1 é expressa de forma constitutiva nas fases biotrófica e necrotrófica, pode-se inferir que a concentração de esta proteína aumenta na fase saprofítica em congruência com o aumento da densidade de hifas. Esta condição seria favorável para a oligomerização da proteína MpNEP1. O fato de que MpNEP2 que é a isoforma resistente ao calor é menos expressa na fase necrotrófica explica

o porquê a inoculação de filtrados de fungo (na fase necrótrófica) sob tratamento térmico não causa necrose.

Experimentos *ex planta* podem fornecer algumas evidências do mecanismo de ação do fungo durante a infecção, mas essas condições não conseguem reproduzir exatamente o que acontece na planta durante a interação com o fungo. Portanto para conseguir relacionar os perfis de expressão dos genes com a progressão da doença é necessário determinar a expressão destes genes *in planta*. MpNEP2 foi isolada de uma biblioteca de cDNA produzida a partir de RNA total de tecidos de cacau infestados com *M. pernicioso* na fase biotrófica, mostrando que a proteína está sendo expressa durante essa fase. Por outro lado, MpNEP1 foi detectada por RT-PCR em tecidos de cacau também infectados com *M. pernicioso* na fase biotrófica (Figura 21B). Estes dados sugerem que ambas as proteínas estão sendo expressas na fase biotrófica do fungo confirmando os dados de expressão obtidos *ex planta*.

Como foi explicado na introdução, NLPs são geralmente consideradas elicitores, capazes de induzir o processo de morte celular (Gijzen and Nurnberger, 2006). Entretanto, apesar de que as NLPs devem ter um mecanismo de ação comum, foram observadas significativas diferenças no tempo de necrose em relação a idade e estado nutricional da folha (Bailey, 1995). De fato, é interessante que MpNEPs são expressas no micélio biotrófico que permanece nos tecidos do cacau durante semanas antes de aparecerem os sintomas de necrose (Purdy and Schmidt, 1996). Essas observações sugerem que a proteína deve ser acumulada ou atingir uma concentração determinada para realizar a função nos tecidos de cacau.

MpNEP2 também mostrou grande estabilidade já que alíquotas de proteína causaram necrose em folhas de tabaco um ano após a purificação (resultados não mostrados). Estes dados junto à resistência à altas temperaturas sugerem que estas proteínas podem se manter ativas em ambientes desfavoráveis por muito tempo.

Uma das características iniciais da interação elicitor-célula da planta é o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) entre elas o peróxido de

hidrogênio (Hammond-Kosack, 1996). A planta tem duas vias para a geração de EROs, uma é mediante a enzima germina ou oxalato oxidase e outra mediante a ativação de peroxidases da parede celular. Baseado nesses conhecimentos decidimos estudar se as MpNEPs induziam a ativação de peroxidases em uma suspensão de células de tabaco. A Figura 38 mostra os resultados. Nas condições testadas, as MpNEPs e NPP1 não parecem induzir a expressão de peroxidases da parede celular já que apresentam a mesma intensidade do sinal que o controle. As deferências de MpNEP2 parecem relacionados com aumento da concentração de proteínas na amostra.

Estudos preliminares de imunolocalização das MpNEPs também mostraram que estas proteínas estão presentes nos tecidos infestados, no apoplasto. Por outra parte, elas parecem ser acumuladas na parte externa da parede celular da planta sendo observadas fundamentalmente nas paredes das células mortas (Figura 37). Estes estudos sugerem que as MpNEPs poderiam desempenhar algum papel neste processo. Keates (2003) observou que em plantas que respondem rapidamente a NEP1 ocorrem mudanças estruturais da célula muito antes do aparecimento da necrose. Entre essas alterações estruturais se encontra a diminuição da espessura da cutícula sugerindo a possibilidade de que esta proteína age diretamente sobre esta estrutura.

Outra hipótese proposta para o mecanismo de ação das NLPs é que essas proteínas poderiam degradar componentes da parede celular e que a necrose seria uma consequência deste processo. Está comprovado que NEP1 altera rapidamente a membrana das células sugerindo que poderia estar interagindo com compostos lipolíticos (Jennings, *et al.*, 2001); uma característica de toxinas e elicitores. Está demonstrado que a degradação da parede celular pode liberar moléculas de sinalização tais como oligogalacturonidos que atuam como elicitores das respostas de defesa das plantas (Ridley, *et al.*, 2001; Boudart, *et al.*, 2003). Atualmente estamos trabalhando com essa hipótese.

Resumindo, durante o desenvolvimento deste trabalho se identificou pela primeira vez que NLPs estão presentes em um basidiomiceto, *Moniliophthora perniciosa*, e que estas proteínas parálogas podem ter propriedades físicas e

perfis de expressão diferentes. É provável que MpNEPs tenham um papel importante no desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa visto que são expressos *in planta* e que as proteínas foram detectadas em tecidos de cacau infestados.

Conclusões

1. Foram identificados pela primeira vez genes codificadores de proteínas da família NLP em fungos basidiomicetos, especificamente no genoma de *Moniliophthora perniciosa*. Este fungo apresenta pelo menos três genes localizados no mesmo cromossomo.
2. Os genes codificadores de NLPs de *Moniliophthora perniciosa* e NPP1 de *Phytophthora parasítica* foram clonados, expressos usando sistemas de expressão em *E. coli*. Os respectivos produtos gênicos foram purificados mediante coluna de afinidade a metais por possuírem fusão á cauda de histidinas.
3. As proteínas MpNEPs e NPP1 induziram a aparição de necrose e emissão de etileno em folhas de tabaco e cacau. Não foram detectadas diferenças na cinética de indução de necrose, mas as proteínas apresentaram diferentes perfis de indução de emissão de etileno.
4. As proteínas indutoras de necrose e etileno de *M. perniciosa* mostraram diferentes padrões de expressão nas diferentes fases do ciclo de vida do fungo. Em estudos *ex planta*, MpNEP1 foi expressa constitutivamente enquanto MpNEP2 está mais expressa na fase biotrófica do fungo. Estas diferenças sugerem que as proteínas poderiam estar desempenhando papéis complementares na célula.
5. MpNEP1 e MpNEP2 apresentam diferentes propriedades físicas. MpNEP1 precipita e perde a atividade necrótica após tratamento térmico enquanto MpNEP2 desnatura com calor, mas induz necrose após o tratamento sugerindo que é capaz de renaturar em condições fisiológicas. Estas divergências estão acompanhadas por aparentes diferenças nos estados de agregação destas proteínas. MpNEP1 aparece em forma de dímero independente da concentração de proteína enquanto MpNEP2 parece estar em forma de monômero em baixas concentrações e é capaz de agregar com o aumento da concentração.

6. MpNEPs foram localizadas na superfície externa de células mortas de cacau na fase de vassoura seca sugerindo que poderiam ter alguma função no processo de degradação da parede celular. O modo de ação das MpNEPs e NPP1 não mostrou envolvimento com a indução de peroxidases da parede celular até uma hora após o tratamento. Ambos resultados sugerem que estas proteínas poderiam ter um papel de toxina ou de fator de virulência mais do que de um elicitor.

Perspectivas

1. Continuar na tentativa de obter a estrutura ao nível atômico das proteínas MpNEPs mediante cristalografia de raios X. Estes estudos auxiliariam na busca por uma função para estas proteínas.
2. Silenciamento gênico na tentativa de determinar a função destas proteínas e a importância na interação *M. pernicioso*-cacaueiro.
3. Estudar o possível papel enzimático das MpNEPs dirigido fundamentalmente à interação com componentes da parede celular das plantas.

Referências Bibliográficas

- Aderem, A. a. U., R. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.
- Aime, M. C. and W. Phillips-Mora (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97(5): 1012-22.
- Allen, R. L., P. D. Bittner-Eddy, et al. (2004). Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 306(5703): 1957-60.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- Amsellem, Z., Cohen, B.A. & Gressel, J. (2002). Engineering hypervirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. *Nat. Biotechnol.* 20: 1035-1039.
- Anderbrhan, T. (1987). Rain-water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa* on cocoa seedlings. In: Disease Management in Cocoa. Comparative epidemiology of witches' broom. Eds. S. A. Rudgard, A. C. Maddison and T. Anderbrhan, Chapman & Hall, London.: 157-164.
- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20): 15649-54.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1998). Current Protocols in Molecular Biology. New York-USA, Wiley & Sons Inc.
- Bae, H., J. H. Bowers, et al. (2005). NEP1 orthologs encoding necrosis and ethylene inducing proteins exist as a multigene family in *Phytophthora megakarya*, causal agent of black pod disease on cacao. *Mycol Res* 109(Pt 12): 1373-85.
- Bae, H., Kim, M. S., Sicher, R. C., Bae, H. J. & Bailey, B. A. (2006). Necrosis- and Ethylene-Inducing Peptide from *Fusarium oxysporum* Induces a Complex Cascade of Transcripts Associated with Signal Transduction and Cell Death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141: 1056-1067.
- Bailey, B. A. (1995). Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium-oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum-Coca*. *Phytopathology* 85(10): 1250-1255.
- Bailey, B. A., Apel-Birkhold, P.C., Akingbe, O.O., Ryan, J.L., O'Neill, N.R. & Anderson, J.D. (2000a). Nep1 protein from *Fusarium oxysporum* enhances biological control of opium poppy by *Pleospora papaveracea*. *Phytopathology* 90: 812-818.
- Bailey, B. A., H. Bae, et al. (2005). Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. *Plant Physiol Biochem* 43(6): 611-22.
- Bailey, B. A., Collins, R. & Anderson, J.D., (2000b). Factors influencing the herbicidal activity of Nep1, a fungal protein that induces the hypersensitive response in *Centaurea maculosa*. *Weed Science* 48: 776-785.

- Bailey, B. A., J. C. Jennings, et al. (1997). The 24-kDa protein from *Fusarium oxysporum f.sp. erythroxyli*: occurrence in related fungi and the effect of growth medium on its production. *Can J Microbiol* 43(1): 45-55.
- Bailey, B. A. (1995). Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium-oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum-Coca*. *Phytopathology* 85(10): 1250-1255.
- Baker, R. E. H., P. (1957). Witches' broom disease of cocoa (*Marasmius perniciosus* Stahel). *Phytopathological paper. Commonwealth Mycological Institute, Kew.*(2): 42pp.
- Bartley, B. G. D. (1986). Cacao, *Theobroma cacao*. In: Breeding for durable resistance in perennial crops. *Plant Production Papers, 70.* Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: 25-42.
- Bastos, C. N. (1996a). Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis perniciosus*. *Fitopatologia Brasileira* 21(1): 50-54.
- Bastos, C. N. (1996b). Potential of *Trichoderma viride* for the control of cocoa witches' broom (*Crinipellis perniciosus*). *Fitopatologia Brasileira* 21(1): 50-54.
- Bastos, C. N. and H. C. Evans (1985). A New Pathotype of *Crinipellis perniciosus* (Witches Broom Disease) on Solanaceous Hosts. *Plant Pathology* 34(2): 306-312.
- Bastos, E. (1987). Cacau: a riqueza agrícola da América. São Paulo: ícone: 130.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, et al. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340(4): 783-95.
- Boman, H. G. (1998). Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* 48(1): 15-25.
- Boudart, G., M. Charpentier, et al. (2003). Elicitor activity of a fungal endopolygalacturonase in tobacco requires a functional catalytic site and cell wall localization. *Plant Physiol* 131(1): 93-101.
- Broekaert, W. F., Delaur, S. L., De Bolle, M. F. C. & Cammue, B. P. A. (2006). The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. *Annu Rev Phytopathol* 44: 393-416.
- Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K, G., Van Montagu, M. & Boerjan, W. (1998). Purification and characterization of peroxidase correlated with lignification in polar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.
- Cristescu, S. M., De Martinis, D., te Lintel Hekkert, S., Parker, D.H., Harren, F.J.M. (2002). Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5342-50.
- Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contributions from the United States National Herbarium* 35: 379-614.
- Dabydeen, S. a. S., T. N (1989). Occurrence, anatomy, and morphology of "blisters" on cocoa seedlings inoculated with *Crinipellis perniciosus*. *Plant Disease* 73(6): 481-484.
- Dayhoff, M. O., R. V. Eck, et al. (1972). A model of evolutionary change in proteins. *Atlas of Protein Sequence and Structure.* M. O. Dayhoff. Washington, D.C., National Biomedical Research Foundation. 5: 89-99.

- de Arruda, M. C., G. F. Sepulveda, et al. (2005). *Crinipellis brasiliensis*, a new species based on morphological and molecular data. *Mycologia* 97(6): 1348-61.
- De Marco, J. L., Vladares, M. C & Felix, C. R. (2003). Production of hydrolytic enzymes by trichoderma isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 33-38.
- Delgado, J. C. and A. A. Cook (1976). Nuclear Condition of Basidia, Basidiospores, and Mycelium of *Marasmius perniciosus*. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* 54(1-2): 66-72.
- Dias, B. B. A., Cunha, W.G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., de Capdeville, G. & Aragão, F. J. L. (2006). Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina sp.* in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*. 55: 187-193.
- Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P & Hernández, J. A. (2006). The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3813–3824.
- Divon, H.,H. & Fluhr, R. (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters* 266(1): 65-74.
- Dudman, W. F. and R. Nichols (1959). Absence of gibberellin-like substances in filtrates of *Marasmius perniciosus* Stahel (witch broom disease of cacao). *Nature* 183(4665): 899-900.
- Ebel, J. C., E.G. (1994). Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev Cytol* 148: 1-33.
- Evans, H. C. (1977). The occurrence of pathotypes of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in the tropical forest ecosystem. Proceedings of the 6th International Cocoa Research Conference, Caracas, Venezuela. Cocoa Producers Alliance, Lagos, Nigeria.: 166-170.
- Evans, H. C. (1978). Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. *The fungus. Ann. Appl. Biol* 89(2): 185-192.
- Evans, H. C. (1980). Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* 74(JUN): 515-523.
- Evans, H. C. B., C. N (1979). Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacau. *Fitopatologia Brasileira* 4: 104.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18(265-276).
- Fellbrich, G., A. Romanski, et al. (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J* 32(3): 375-90.

- Felsenstein, J. (1985). Confidence-Limits on Phylogenies with a Molecular Clock. Systematic Zoology 34(2): 152-161.
- Flament, M. H., I. Kebe, et al. (2001). Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. Genome 44(1): 79-85.
- Francino, M. P. (2005). An adaptive radiation model for the origin of new gene functions. Nature Genet. 37: 573-577.
- Ganguly, S. S., M. (1999). Purification and characterization of a protein phosphatase from winged bean. Phytochemistry 52: 239-246.
- Gerrits, P. O. S., L. (1983). A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft-tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. Journal of Microscopy-Oxford 132: 81-85.
- Gesteira Ada, S., F. Micheli, et al. (2003). Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. Biotechniques 35(3): 494-6, 498-500.
- Gijzen, M. and T. Nurnberger (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. Phytochemistry 67(16): 1800-7.
- Greenberg, J. T. and N. Yao (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cell Microbiol 6(3): 201-11.
- Greenberg, J. T. Y., N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology 6(3): 201-211.
- Gribskov, M., Devereuxl, J. & Burgess, R. R. (1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. Nucleic Acids Research 12(1): 539-549.
- Griffith, G. W. (2004). Witches' broom and frosty pod: threats to world cacao production. Biologist 51(2): 71-75.
- Griffith, G. W. and J. N. Hedger (1994a). The Breeding Biology of Biotypes of the Witches-Broom Pathogen of Cocoa, *Crinipellis pernicioso*. Heredity 72: 278-289.
- Griffith, G. W. and J. N. Hedger (1994b). Dual Culture of *Crinipellis pernicioso* and Potato Callus. European Journal of Plant Pathology 100(6): 371-379.
- Griffith, G. W., J. Nicholson, et al. (2003). Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. New Zealand Journal of Botany 41(3): 423-435.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., sack, W.R., & Schmelzer, E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4150-4157.
- Hammond-Kosack, K. E. J., J. D. G. (1996). Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. The Plant Cell 8: 1773-1791.
- Hensel, L. L., Grbic, V., Baumgarten, D. A. & Bleecker, A.B. (1993). Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. Plant Cell 5: 553-564.
- Higgins, D. G., J. D. Thompson, et al. (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. Methods Enzymol 266: 383-402.
- Hooper, S. D. B., O. G. (2003). On the nature of gene innovation: duplication patterns in microbial genomes. Molecular Biology and Evolution 20: 945-954.

- Huitema, E., Bos, J. I. B., Tian, M. Y., Win, J., Waugh, M. E. S. (2004). Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. *Trends in Microbiology* 12(4): 196 -
- Jameson, P. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regulation* 32: 369–380.
- Jennings, J. C., P. C. Apel-Birkhold, et al. (2001). Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Science* 161(5): 891-899.
- Jin, Q. C., Dong, H. T., Peng, Y. L., Chen, B. S., Shao, J., Deng, Y., Dai, C. E., Fang, Y. Q., Lou, Y. C., Li, Y. Z. & Li, D. B. (2007). Application of cDNA array for studying the gene expression profile of mature appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Journal of Zhejiang University - Science B* 8(2): 88-97.
- Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Jores, J., B. Appel, et al. (2003). Cloning and molecular characterization of a unique hemolysin gene of *Vibrio pommerensis* sp. nov.: development of a DNA probe for the detection of the hemolysin gene and its use in identification of related *Vibrio* spp. from the Baltic Sea. *FEMS Microbiol Lett* 229(2): 223-9.
- Kamoun, S. (2003). Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell* 2(2): 191-199.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44: 41-60.
- Kamoun, S., P. van West, et al. (1998). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* 10(9): 1413-26.
- Keates, S. E., T. A. Kostman, et al. (2003). Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol* 132(3): 1610-22.
- Keen, N. T. (1975). Specific elicitors of plant phtoalexin production: determinant of race specificity in pathogens? *Science* 187: 74-75.
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. & Flaishman, M. A. (1995). Surface Signaling in Pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4080-4087.
- Krupasagar, V. S. (1969). Auxin destruction by *Marasmius perniciosus*. *American Journal of Botany* 56: 390-397.
- Kumar, S., K. Tamura, et al. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5(2): 150-63.
- Laker, H. R., S. A. (1989). A review of the research on chemical control of witches' broom disease of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 42: 5-16.
- Lewis, D. H. (1973). Concepts in fungal nutrition and the origin of hiotrophy. *Biol. Rev.* 48: 261-.
- Lima, J. O., J. K. dos Santos, et al. (2003). Development of a transformation system for *Crinipellis perniciososa*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Curr Genet* 42(4): 236-40.
- Low, P. S. and J. R. Merida (1996). The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 96(3): 533-542.

- MacMillan, J. (2002). Ocurrence of gibberelin in vascular plants, fungi, and bacteria. Journal of Plant Growth Regulation 20: 387-442.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mae, A. & Pirhonen, M. (2004). Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. Mol. Plant Microbe Interact.: 1366–1375.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A. & Boller, T. (1984). Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and α -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. Plan Physiol. 76: 607-611.
- Maxwell, D. P. L., R.D. (1970). Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. Phytopathology 70: 1395–1398.
- Mayer, A. M. (1988). A plant physiologist looks at plant-fungal interactions. Phytoparasitica 16: 179.
- McDowell, J. M. and J. L. Dangl (2000). Signal transduction in the plant immune response. Trends in Biochemical Sciences 25(2): 79-82.
- McGinnis, S. and T. L. Madden (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res 32 (Web Server issue): W20-5.
- Meinhardt, L. W., M. Bellato Cde, et al. (2006). In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Curr Microbiol 52(3): 191-6.
- Miller, E. M. & Nickolof. (1995). Electroporation Protocols for Microorganisms 47.
- Nagahama K, O. T., Fujii T, Tazaki M, Tanase S, et al. (1991). Purification and properties of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* PK2. Gen. Microbiol. 137: 2281–86.
- Nakayama, L. H. I., Soares, M. K. M. & Appezzato-da-Glória, B. (1996). Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauero (*Theobroma cacao* L.). Scientia Agricola 53(1): 73-73.
- Nelson, A. J., Apel-Birkhold, P.C. and Bailey, B.A. (1998). Sequence announcements. Plant Mol. Biol. 38: 911-912.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, et al. (2003). Recognition and response in the plant immune system. Annu Rev Genet 37: 579-609.
- Noyes, R. D., and Hancock, J.G. (1981). Role of oxalic acid in the sclerotinia wilt of sunflower. Physiol. Plant Pathol. 18: 123-132.
- Nurnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. Cell 78: 449-460.
- O'Connell, R. J. P., R. (2006). Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. New Phytologist. 171: 699–718.
- Oliveira, J. E. H., K (1999). Determinação de dosagens efetivas de tebuconazole na redução de alguns sintomas associados à vssoura-de-bruxa do cacauero. In Informe Técnico 1992-1997, CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, Brasil.
- Orchard, J., H. A. Collin, et al. (1994). Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches-brooms on cocoa. Plant Pathology 43(1): 65-72.
- Parker, M. W., Feil, S.C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog. Biophys. Mol. Biol. 88: 91-142.

- Panstruga, R. (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 320-326.
- Pelton, J. T. M., L. R. (2000). Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Analytical Biochemistry* 277: 167–176.
- Pemberton, C. L. and G. P. C. Salmond (2004). The Nep1-like proteins - a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology* 5(4): 353-359.
- Pemberton, C. L., Whitehead, N. A., Sebahia, M., Bell, K. S., Hyman, L. J., Harris, S. J., Matlin, A. J., Robson, N. D., Birch, P. R., Carr, J. P., Toth, I. K. & Salmond, G. P. (2005). Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(4): 343-53.
- Penman, D., G. Britton, et al. (2000). Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research* 104: 671-675.
- Pereira, J. L. (2000). Management of Witches' Broom disease of cocoa: a contemporary retrospective. *Cocoa Produces's Alliance, Lagos, Nigeria*: 41p.
- Pereira, J. L., Ram, A., Figueiredo, J.M & Almeida, L.C.C (1990). The first occurrence of Withches' broom disease in the principal cocoa growing region of Brazil. *Tropical Agriculture* 67(2): 188-189.
- Purdy, L. H. and R. A. Schmidt (1996). Status of cacao Withches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annu Rev Phytopathol* 34: 573-94.
- Quirino, B. F., Noh, Y. S., Himelblau, E. & Amasino, R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Science* 5: 278-282.
- Qutob, D., S. Kamoun, et al. (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant Journal* 32(3): 361-373.
- Ridley, B. L., M. A. O'Neill, et al. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(6): 929-67.
- Rincones, J. (2006). Campinas.
- Rincones, J., G. D. Mazotti, et al. (2006). Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicios*a from various plant hosts in South America. *Mycol Res* 110(Pt 7): 821-32.
- Rincones, J., L. W. Meinhardt, et al. (2003). Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicios*a, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycol Res* 107(Pt 4): 452-8.
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. B., Maki, C. S., Araújo, W. L., dos Santos, D. R., & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1(1): 24-33.
- Ryals, J., Ukues, S. & ward, E (1994). Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 104: 1109-1112.
- Sambrook, J. R. (2002). Molecular cloning. A laboratory manual.
- Sambrook, J. R. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 3v.

- Sanogo, S., Pomella, A., Hebbar, P. K., Bailey, B., Costa, J. C. B., Samuels, G. J. & Lumsden, R. D. (2002). Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. *Phytopathology* 92(10): 1032-1037.
- Scarpari, L. M. (2006). Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- Scarpari, L. M., L. W. Meinhardt, et al. (2005). Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *J Exp Bot* 56(413): 865-77.
- Scatolin, C. M. (2006). Unicamp.
- Sequeira, L. (1973). Hormone Metabolism in Diseased Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 353-380.
- Singer, R. (1942). A monographic study of the genera "Crinipellis" and "Chaetocalathus.". *Lilloa* 8: 441-534.
- Sreenivasan, T. N. D., S (1989). Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* 73(6): 478-481.
- Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J. A. L. & Bakker, F. T. (2006). Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology* doi:10.1016/j.fgb.2006.07.003.
- Stahel, G. (1915). *Marasmius perniciosus* nov. spec. *Dept Landbouw in Suriname Bull* 33: 1-27.
- Staskawicz, B. J., Asubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. E. & Jones, J. D. G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Sumário, e. (2003). Potencialidades regionais. estudo da viabilidade econômica do cacao. www.suframa.gov.br.
- Taiz, L. a. Z., Eduardo (2006). Plant Physiology, Sinaur Associates, Inc.
- Trebitsh, T., E. E. Goldschmidt, et al. (1993). Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in Citrus fruit peel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9441-5.
- Tyler, B. M., S. Tripathy, et al. (2006). Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313(5791): 1261-6.
- Veit, S., J. M. Worle, et al. (2001). A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, Arabidopsis, and tobacco. *Plant Physiol* 127(3): 832-41.
- Verica, J. A., S. N. Maximova, et al. (2004). Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Reports* 23(6): 404-413.
- Voegelé, R. T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I. & Mendgen, K. (2005). Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiology* 137: 190-198.
- Wang, Z. Y., Thornton, C.R., Kershaw, M.J., Debaio, L. & Talbot, N.J. (2003). The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology* 47: 1601-1612.

- Went, F. A. F. C. (1904). Witches' broom disease in various types of cacao in Surinam. *Verhandelingen der Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam, Afdeeling Natuurkunde* 10(3): 40 pp
- Wheeler, B. E. J. and C. Suarez (1993). The Pathosystem. Disease Management in Cocoa: Comparative Epidemiology of Witches' Broom. S. A. Rudgardet al. London, Chapman & Hall: 9-19.
- Wheeler, B. E. J. M., R. (1988). Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology* 37(4): 475-488.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J* 322: 681-692.
- Wood, G. A. R. L., R. A (1985). *Cocoa*. 4th ed. Longman Group Limited, New York.
- Woodrow, L., J. Jiao, et al. (1989). Whole Plant and Leaf Steady State Gas Exchange during Ethylene Exposure in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol* 90(1): 85-90.
- Wounter, G. D. (2004). Is Petal Senescence Due to Sugar Starvation? *Plant Physiology* 134: 35-42.
- Zhou, T., and Boland, G.J. (1999). Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 93-99.
- ZOLAN, M. E. P. P. J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cineris*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.

ANEXO 1

Revisão sobre técnicas de caracterização estrutural utilizadas no presente trabalho.

As radiações eletromagnéticas são utilizadas para o estudo da estrutura de muitos materiais. O espectro de radiação utilizado se estende desde as radiações de alta energia até às ondas longas (de baixa energia).

A cristalografia de raios X precisa de cristais de proteínas que difratem a uma resolução suficientemente alta. Em caso de proteínas que não tenham estrutura de proteínas homólogas resolvidas, precisa-se também de derivados isomorfos de átomos pesados. Esta técnica permite uma resolução a nível atômico, mas é essencialmente uma “imagem” estática da proteína contribuindo limitadamente a compreender os aspetos dinâmicos da estrutura da proteína que podem ser cruciais para a função. O estudo de proteínas por NMR precisa de grandes concentrações de proteínas (10-40 mg/ml para uma proteína de 20 kDa) e muitas proteínas não são suficientemente solúveis nestas condições com tendência a agregação. A determinação da estrutura usando este método se limita a proteínas de massa molecular menor do que 30 kDa. A técnica de MNR pode dar informação estrutural e sobre a dinâmica da proteína em solução.

A técnica de Dicroísmo circular (CD) tem a vantagem de ser rápida quando comparada com cristalografia ou NMR. Precisa de poucas quantidades de amostra e é uma técnica não-destrutiva permitindo recobrar e utilizar a amostra de proteína para múltiplas análises. Esta técnica da informação sobre o conteúdo de estrutura secundária (α -hélice e folha β) da proteína em estudo.

A técnica de Espalhamento de raio X a baixo ângulo (SAXS) constitui uma importante ferramenta nos estudos estruturais de proteínas. Devido às restrições das técnicas de alta resolução como são a cristalografia de raios X (precisa de cristais de qualidade) e NMR (proteínas de baixo peso molecular), SAXS é muito utilizada porque tem a vantagem de caracterizar proteínas em solução. Esta técnica permite estudar processos dinâmicos que contribuem a explicar o

comportamento de moléculas biológicas em condições muito próximas das encontradas *in situ*.

Espalhamento dinâmico de Luz (DLS: Dynamic Light Scattering)

DLS, também conhecido como Espectroscopia de correlação de fótons é um dos métodos mais populares usados para determinar o tamanho de partículas. Segundo a teoria de espalhamento de luz semi-clássica (Wiley, 1975) quando a luz incide na matéria, o campo elétrico da luz induz polarização oscilante dos elétrons na molécula convertendo-a em uma fonte de luz secundária com o subsequente espalhamento de luz. A frequência, a distribuição angular, a polarização, e a intensidade de espalhamento de luz estão determinados pelo tamanho, forma e interações com a molécula ou material espalhador. Graças a essa propriedade é possível com ajuda da eletrodinâmica, ter informação sobre a estrutura e a dinâmica da molécula espalhadora a través das características da luz de espalhamento do sistema (Wiley, 1975).

Quando uma luz monocromática polarizada (como o laser) passa a través de um solvente que contém biomoléculas ou nanopartículas (partículas menores que o comprimento de onda da luz incidente), a quantidade de luz espalhada em uma direção particular está determinada por as interferências (construtivas ou destrutivas) de todas as partículas que estão distribuídas aleatoriamente na amostra em um momento de tempo particular. Um detector muito sensível pode registrar os sinais de variações de tempo causados pelo espalhamento de luz em comparação com um sinal constante emitido quando não existem moléculas presentes. As proteínas em suspensão estão em movimento Browniano que está relacionado com o raio hidrodinâmico da molécula e pode ser expresso por a equação de Stokes-Einstein (Wiley, 1975).

DLS representa um caminho para calcular o raio hidrodinâmico de uma molécula. Mede-se uma função de correlação e os parâmetros são ajustados aos dados. O resultado é apresentado como uma curva Gaussiana, expressando a distribuição de probabilidade, cuja amplitude está relacionada com a polidispersão que é uma medida da heterogeneidade no raio hidrodinâmico. Várias medidas

devem ser realizadas para a obtenção de resultados estatisticamente válidos. Calcula-se a media das diferentes medidas, rejeitando aquelas muito diferentes, se for necessário. Se a polidispersão é menor de 25% desse valor para o raio hidrodinâmico, a amostra é considerada monodispersa e o centro da curva corresponde com o raio hidrodinâmico. Isso torna possível o cálculo do peso molecular aparente em caso de proteínas globulares. Uma aproximação usada na técnica é que as moléculas são partículas esféricas, por tanto o valor do raio hidrodinâmico resultante pode ser sobreestimado se a forma da proteína se desvia muito de uma esfera (Wiley, 1975).

As vantagens desta técnica de espalhamento de luz não invasiva, além de fornecer informações estruturais, são o curto tempo necessário para a obtenção dos dados, a modesta quantidade de proteína utilizada (de 1 a 10 mg/mL) e os pequenos volumes de amostra requeridos (60 mL), além da relativa simplicidade de manipulação. Podem se obter informações estruturais sobre partículas de 1-1000 nm de tamanho (Murphy, 1992). Esta técnica, em princípio, é capaz de distinguir se uma proteína é um monômero ou um dímero, sendo extremamente sensível a pequenas quantidades de agregados (Papish, 2002).

Devido à velocidade na obtenção de dados, o DLS permite o estudo de mudanças conformacionais de proteínas ou complexos de proteínas em solução. Esta técnica tem diversas aplicações como: caracterização de proteínas incluindo agregação, conformação, estabilidade estrutural, desnaturação e estabilidade térmica; complexos macromoleculares; polímeros biológicos e sintéticos. No DLS, um feixe de luz monocromático de 827,6 nm incide sobre a amostra e a flutuação da intensidade de luz espalhada (escala de tempo em microsegundos) é detectada por um fotodiodo a 90° (Murphy, 1992).

Dicroísmo circular (CD)

CD é um tipo de absorção espectroscópica que pode dar informação sobre a estrutura de muitos tipos de macromoléculas biológicas. A luz polarizada é obtida ao passar a través de um polarizador que transmite luz num único plano de

polarização. A luz circularmente polarizada ocorre em duas formas que não se superpõem, onde uma das formas é a imagem especular da outra (Figura 1).

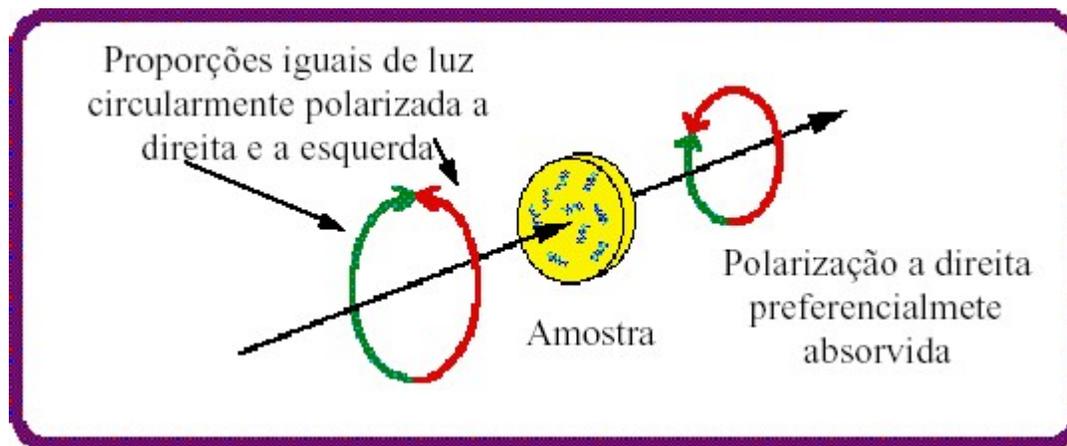


Figura 1. Representação da luz circularmente polarizada.

Na prática, a radiação é dividida nos dois componentes da luz circularmente polarizada mediante a passagem a través de um modulador (geralmente quartzo) submetido a campo elétrico alternado (50 KHz). O modulador pode transmitir cada um destes componentes (esquerdo e direito). Se depois da passagem a través da amostra, os componentes não são absorvidos (ou são absorvidos na mesma proporção) a combinação dos componentes pode regenerar a radiação polarizada original. Se um dos componentes é absorvido pela amostra em maior grau do que o outro, a radiação resultante (combinação dos componentes) seria então polarizada elipticamente. Os resultados de CD podem ser mostrados em função das diferenças em absorbância dos componentes ($\Delta A = A_E - A_D$) ou como elipticidade em graus (θ) sendo $\theta = \tan^{-1}(b/a)$, onde b e a são os eixos maiores e menores da elipse formada, respectivamente. Existe uma relação numérica simples entre ΔA e θ (θ em graus) que é $\theta = 32.98 \Delta A$.

Um espectro de CD se obtém quando o dicroísmo é medido como uma função do comprimento de onda. O sinal de CD será positivo ou negativo dependendo da absorção preferencial da luz polarizada à direita ou à esquerda.

Uma molécula é “CD ativa” se é estruturalmente assimétrica e exibe absorbância. A assimetria resulta de moléculas quirais que são denominadas cromóforos. Proteínas e peptídeos têm grupos que apresentam bandas de absorção características em áreas do espectro das regiões visível e ultravioleta.

Um incremento na absorção relativa da luz polarizada à esquerda resulta em um sinal de CD positivo enquanto que o sinal negativo de CD é devido a que a luz circularmente polarizada à direita foi mais absorvida. Os cromóforos mais numerosos e característicos que proteínas e peptídeos possuem na faixa do UV-distante (170 a 260 nm) são as ligações peptídicas (Kelly, 2005). Os espectros de CD produzidos por esses cromóforos são característicos para os diversos tipos de estrutura secundária. As faixas de absorção dos resíduos aromáticos no UV-distante são pequenas quando comparadas às das ligações peptídicas. Contudo, no UV-próximo (250 a 300 nm), o espectro de CD passa a ser dominado pela contribuição das cadeias laterais aromáticas, juntamente com as pontes dissulfeto e grupamentos prostéticos. Assim, enquanto o UV-distante detecta estrutura secundária, o UV-próximo é sensível à estrutura terciária, o que constitui a base para a análise da conformação de proteínas através de dicroísmo circular (Kelly, 2005). Esta técnica serve como um *fingerprints* da estrutura nativa para comparação de estrutura terciária de proteínas relacionadas como isoformas, mutantes e selvagem, etc. Pode-se concluir que mudanças no sinal de CD refletem mudanças na estrutura das proteínas.

Os tipos mais comuns de estrutura secundária adotadas por proteínas e peptídeos têm espectros de CD característicos no UV-distante (Figura 2). O espectro mais forte é característico de α hélice apresentando duas bandas negativas de magnitude comparáveis entre 222 e 208 nm e uma banda positiva forte perto de 190 nm. Grande quantidade de peptídeos e polipeptídeos apresentam este tipo de espectro. Os peptídeos que adotam uma conformação de folha β mostram um espectro de CD mais simples e menos intenso com uma banda negativa perto de 217 nm, uma banda positiva ao redor de 195 nm e outra banda negativa perto de 180 nm. Esses dados são muito mais variáveis entre os espectros de CD publicados para estruturas β modelos que para estruturas de α hélice (Kelly, 2005). A distribuição das bandas e a proporção entre elas pode variar em dependência das cadeias laterais e de fatores ambientais.

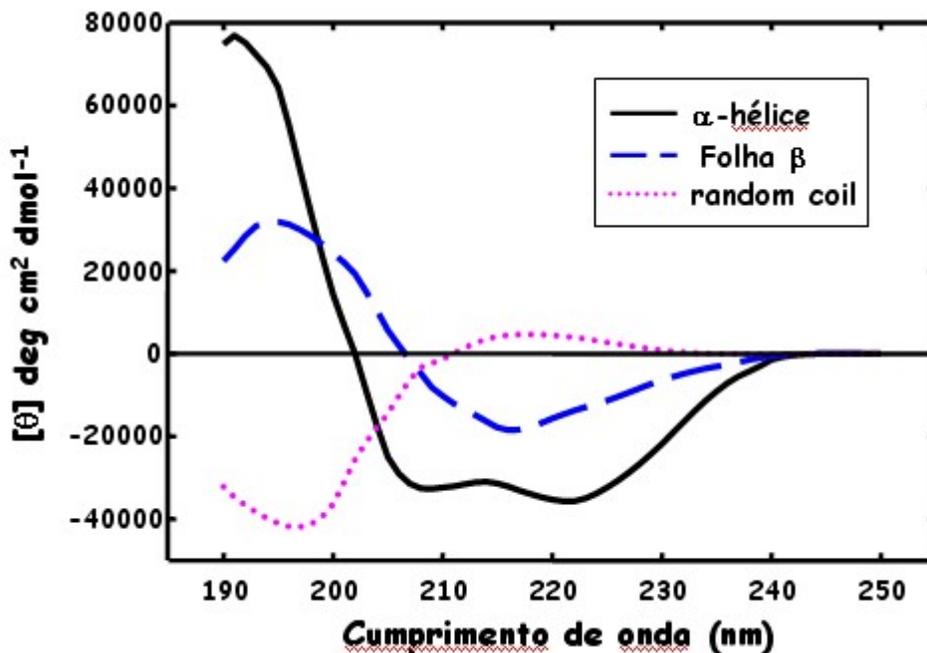


Figura 2. Espectro de CD característico de cada tipo de estrutura secundária.

Podemos concluir que o sinal de CD de uma proteína depende da estrutura secundária. A Figura 3 apresenta o espectro de CD de diferentes proteínas com variado conteúdo de estrutura secundária.

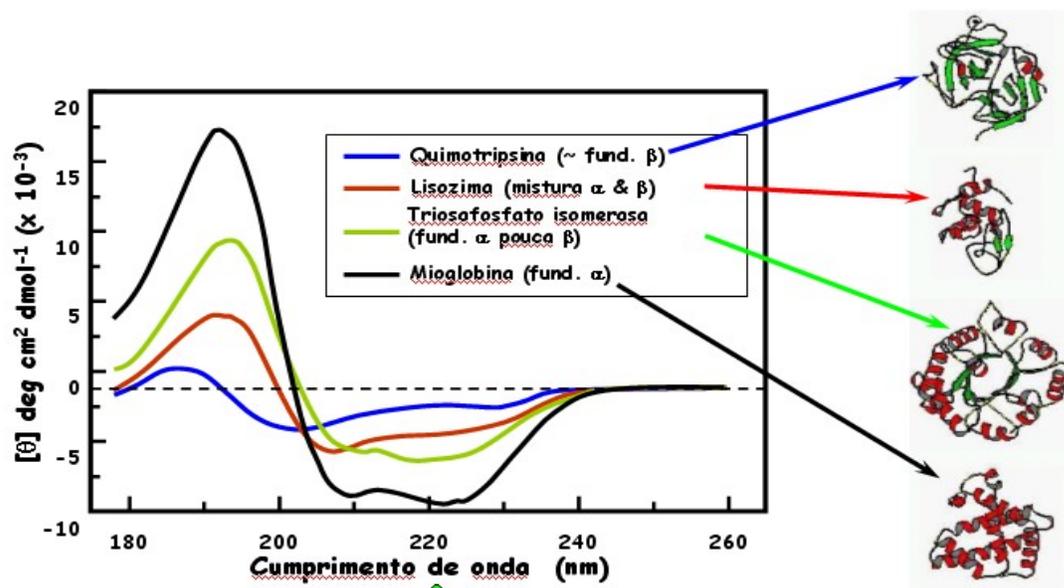


Figura 3. Espectro de CD de diversas proteínas mostrando variações no conteúdo de estrutura secundária.

Em termos práticos, a fonte de luz circularmente polarizada da maioria dos instrumentos de CD é um arco de xenón que permite obter comprimentos de onda entre 178- 1000 nm. É necessário passar nitrogênio no instrumento para remover o oxigênio e evitar a formação de ozônio minimizando assim prejuízos ao sistema ótico e permitindo realizar medições a comprimentos de onda menores de 200nm. Em atmosferas de nitrogênio, o menor comprimento de onda que pode ser medido é a 180 nm. Para realizar medições a comprimentos de ondas menores devem ser usadas técnicas de UV em vácuo ou utilizar radiação síncrotron (Kelly, 2005).

CD é reportado em unidades de absorbância ou elipticidade (θ). A elipticidade molar $[\theta]$ é o CD corrigido pela concentração. As unidades de elipticidade molar são (deg x cm²/dmol). A conversão da extinção molar (absorbância corrigida pela concentração) em elipticidade molar utiliza-se $[\theta] = 3298 \Delta\epsilon$.

A propriedade das estruturas secundárias mais comuns das proteínas apresentarem espectros de CD característico é utilizada em muitos algoritmos para determinar a estrutura secundária de proteínas. O algoritmo baseado em *Analytical Biochemistry* (1) utiliza 16 modelos de estrutura de proteínas. A forma do espectro é comparada com cada um deles e são extraídas cinco contribuições estruturais (α -hélice, folha- β paralela, folha β antiparalela; alças (β -turns) e estrutura aleatória). Os dados devem começar a serem coletados a 260 nm e em intervalos de 2 nm. Se os dados são medidos em elipticidade molar, o conteúdo de α -hélice pode ser estimado como: % α -hélice = $(-[\theta]_{222\text{nm}} + 3000)/39000$.

Estudos termodinâmicos

Consiste no monitoramento da desnaturação térmica por espectroscopia e é muito utilizada para estudos de estabilidade de proteínas (Benjwal, 2006). Constitui uma das aplicações mais utilizadas do dicroísmo circular. A análise do equilíbrio termodinâmico é geralmente obstaculizada pelo caráter irreversível da desnaturação que resulta usualmente em agregação das proteínas desnaturadas termicamente. Esta aplicação do dicroísmo circular baseia-se no fato de que esta técnica não se limita a medir as diferenças de absorção entre a luz circularmente

polarizada à esquerda e à direita se não também mede a absorção regular ou turbidez. Estas medições se realizam mediante as medições da Voltagem dinodo que é uma alta voltagem aplicada ao fotomultiplicador do detector de UV para compensar a redução da intensidade da luz resultante da absorção e/ou do espalhamento. A formação de agregados pode causar um incremento no espalhamento e na voltagem dinodo. Benjwal (2006) mostrou que o monitoramento de mudanças na turbidez induzidas por altas temperaturas pode dar informação valiosa sobre a perda de enovelamento das proteínas como é o caso da formação de agregados; se o processo de agregação acontece durante ou depois da perda de enovelamento; facilita estabelecer uma correlação entre as mudanças conformacionais da proteína e a agregação.

Os dados de CD são coletados como uma função da temperatura resultando em uma curva de desnaturação bidimensional CD versus temperatura. As curvas são ajustadas por modelos de desnaturação conhecidos para dar informação sobre a estrutura e estabilidade da proteína.

Fluorescência

A fluorescência é um dos métodos espectroscópicos mais utilizados na bioquímica e na biofísica molecular atualmente. As medidas de fluorescência não dão detalhes estruturais, mas são muito sensíveis na detecção de mudanças nas propriedades estruturais e dinâmicas de biomoléculas (Chattopadhyay, 2004).

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética (na região do ultravioleta próximo-visível) proveniente de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental. Esse fenômeno é denominado de fotoluminescência, quando a absorção de fótons de luz ($h\nu_{ex}$) é o responsável pela excitação da molécula pela elevação de elétrons de valência de um orbital menos energético (S_0) para um orbital de maior energia (S_1'). A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, ocorre a fluorescência (Figura 4). Por outro lado, na

fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida constituindo um processo menos comum.

Após a absorção de radiação de comprimento de onda característico, a população de moléculas é promovida para um estado excitado singleto, S_1' (Figura 4). A desexcitação pode acontecer mediante dois processos: Processos radiativos, onde a energia é perdida devido à emissão de radiação; e processos não radiativos, em que a energia é dissipada sob a forma de calor. Uma molécula no estado excitado pode perder energia por emissão de radiação, através de um processo de luminescência. Neste processo, há emissão de fótons na região do ultravioleta, visível ou infravermelho, a partir dos estados eletrônicos excitados mais baixos.

Segundo a regra de Kasha, a molécula se desativa por relaxamento através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado singleto de menor energia (S_1). A partir de S_1 , se a multiplicidade da população molecular não mudar, ela pode seguir dois caminhos para retornar ao estado fundamental. Primeiro, se a diferença de energia entre S_1 e S_0 (estado fundamental) não for muito grande (2) e existir a possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada ao mais baixo nível vibracional de S_1 por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética. Se, no entanto, a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental se dá com emissão de radiação na forma de fluorescência. Este processo pode ser observado no diagrama de Jablonski (Figura 4).

A espectroscopia de fluorescência é a técnica que detecta o espectro de radiação emitido para um átomo ou molécula, quando relaxa do estado excitado para o estado fundamental. Dois importantes parâmetros são obtidos do espectro de fluorescência: o comprimento de onda de máxima emissão (λ_{max}), e a intensidade.

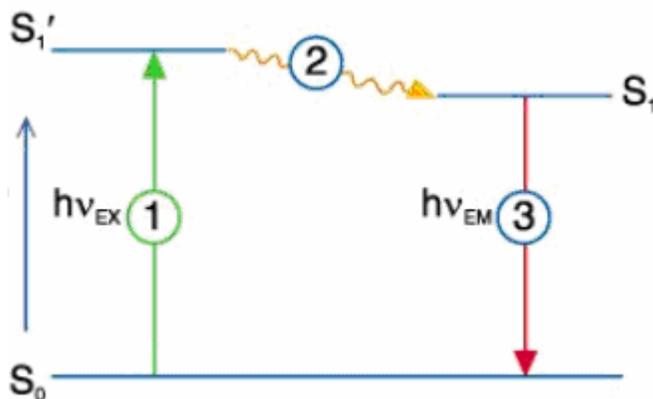


Figura 4. Esquema de Jablonski. S_0 estado energético basal; S_1 estado excitado.

Os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina são capazes de contribuir à fluorescência intrínseca das proteínas. Quando os três resíduos estão presentes em uma proteína (denominadas proteína de classe B), a emissão pura do triptofano pode ser obtida por fotoexcitação seletiva a 295 nm (Chattopadhyay, 2004). Embora os resíduos de tirosina e fenilalanina são fluoróforos naturais das proteínas, o triptofano é o aminoácido mais utilizado para os estudos de fluorescência de proteínas. Em proteínas que contém os três aminoácidos, a observação da fluorescência da tirosina e fenilalanina é geralmente complicada devido às interferências do triptofano. Por tanto, o termo “fluorescência natural das proteínas” está associado geralmente à fluorescência do triptofano. Os resíduos de triptofano servem como sondas intrínsecas e específicas para estudar a dinâmica e estrutura das proteínas. Estes resíduos geralmente estão em 1% nas proteínas. A fluorescência pura do triptofano pode ser medida por excitação a 295 nm porque a tirosina não absorve em este comprimento de onda (Chattopadhyay, 2004).

O resíduo de triptofano tem uma cadeia lateral indólica grande composta de dois anéis aromáticos. De fato, a cadeia lateral do triptofano é a de maior volume quando comparada com a cadeia lateral de todos os outros aminoácidos, com um volume de 228\AA^3 . Em termos moleculares o triptofano é o único aminoácido capaz de estabelecer ambos os tipos de interações polares e hidrofóbicas. Esse comportamento é devido a que possui um grupo polar $-\text{NH}$

capaz de formar ligações de hidrogênio, mas apresenta também a maior área de superfície não-polar disponível entre todos os aminoácidos. A fluorescência do triptofano é altamente sensível à polaridade do ambiente, e mudanças no espectro de emissão a comprimentos de ondas mais baixos podem ser relacionados com aumento da hidrofobicidade. Mudanças no espectro de emissão do triptofano podem ser em resposta a transições conformacionais das proteínas, associação de subunidades, presença de ligantes ou desnaturação, sendo que todos estes processos afetam o ambiente que está em volta do anel indólico.

O apagamento de fluorescência é operacionalmente definido como a redução da intensidade de fluorescência medida quando um fluoróforo interage com outra molécula ou grupo chamada apagador (Moller, 2002). Depois da absorção de um fóton e antes da emissão de radiação, a molécula fluorescente permanece em estado excitado por um curto período de tempo (Moller, 2002). Se acontecer uma interação no estado excitado entre o fluoróforo e o apagador, o fluoróforo excitado pode ser desativado antes que aconteça a emissão de luz. A magnitude do apagamento depende das concentrações da molécula apagadora nas proximidades do fluoróforo (Chattopadhyay, 2004). O fato de que o apagamento de fluorescência depende da proximidade (acessibilidade) do fluoróforo à molécula apagadora tem sido muito utilizado para estudar a topologia (na superfície ou enterrados) dos resíduos de triptofano em proteínas e peptídeos solúveis. Moléculas de iodo, oxigênio e acrilamida podem ser usadas como apagadores da fluorescência do triptofano. Devido a diferença de tamanho e carga de estas moléculas, o apagamento da fluorescência intrínseca de proteínas pode ser usado para diferenciar a localização de resíduos de triptofano e também estudar mudanças conformacionais das proteínas (Moller, 2002).

A intensidade de emissão de resíduos de triptofano localizados na superfície da proteína deve diminuir fortemente em presença de um apagador carregado e solúvel em água como o iodo. Por outro lado, a emissão de resíduos de triptofano enterrados na proteína será menos afetada. A determinação de λ_{\max} de emissão e o apagamento por iodo de triptofano tanto em solução quanto

formando parte de uma proteína permitem estudar a acessibilidade diferencial dos resíduos de triptofano.

O apagamento é determinado mediante a relação entre a fluorescência da amostra contendo o apagador (definido como F) e a fluorescência da mesma amostra sem a molécula apagador (F_0). O padrão de variação entre F/F_0 como uma função da profundidade do apagador é utilizada para calcular a profundidade do fluoróforo.

A detecção de fluorescência é realizada em um espectrofluorímetro que permite selecionar o comprimento de onda de excitação da amostra, e varrer o espectro de emissão a 90° em relação ao feixe de excitação.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Muitos trabalhos de caracterização estrutural de macromoléculas são realizados mediante difração de raios X de amostras formando cristais. Entretanto, muitas proteínas não podem ser cristalizadas. Técnicas baseadas na análise do espalhamento de radiação de amostras solúveis em solução são ferramentas úteis para estudar a estrutura e forma de estas macromoléculas.

Na técnica de SAXS a radiação X é espalhada por uma amostra e o padrão de espalhamento resultante é analisado fornecendo informações estruturais dos componentes da amostra. O espalhamento de luz a baixo ângulo é uma técnica poderosa na determinação de tamanho, forma e estrutura interna de partículas poliméricas na faixa de tamanho entre poucos nm e aproximadamente 200 nm (Guinier, 1939); (Glatter, 1982). SAXS é fundamentalmente aplicado em sistemas de estruturas orientadas randomicamente de dimensões coloidais tais como látex, agregações supramoleculares como as micelas, proteínas, polímeros naturais ou sintéticos dispersos em solução ou precipitados em materiais amorfos.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo de macromoléculas biológicas fornece informação sobre a forma geral da molécula mediante a interpretação de parâmetros como o radio de giro, peso molecular e volume. A maior vantagem desta técnica está na capacidade de fornecer informações estruturais sobre sistemas parciais ou completamente desordenados. O SAXS permite estudar a

estrutura de partículas nativas em ambientes próximos ao fisiológico e analisar mudanças estruturais em resposta a variações nas condições externas.

A técnica de espalhamento de raios X cumpre os mesmos princípios físicos que o espalhamento estático de luz. O campo elétrico da onda incidente induz oscilações dipolo no átomo. As cargas aceleradas geram ondas secundárias que se somam à longa distância à amplitude de espalhamento total. Todas as ondas secundárias têm a mesma frequência, mas diferentes fases causadas pela diferença de trajetória.

A Figura 5 mostra uma representação esquemática sobre o princípio de espalhamento. O raios-X produzido pela fonte T, incide na amostra e pequena fração desse feixe é espalhado em outras direções (ângulo θ representa a direção) e o detector D mede a intensidade de espalhamento (quadrado da amplitude de espalhamento) e é dependente do ângulo de espalhamento.

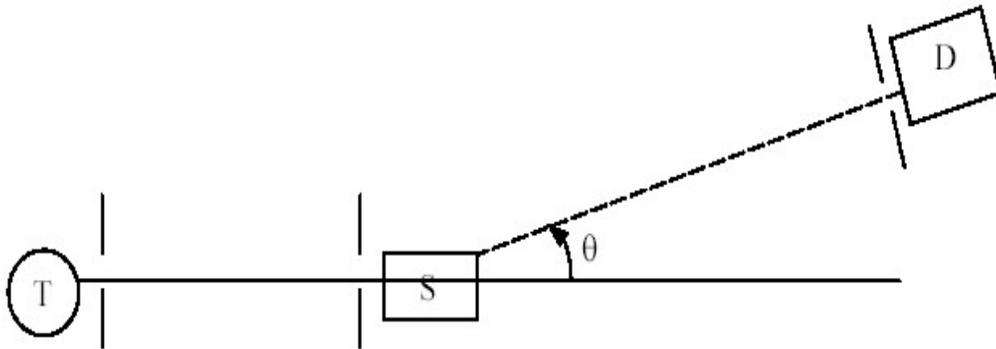


Figura 5. Princípio de espalhamento. (T) origem do feixe de raios X; (S) centro espalhador; (D) detector.

A Figura 6 mostra o cálculo da diferença de fases entre duas ondas secundárias espalhadas pelos centros O e P da molécula. Esta figura ilustra como a diferença de fases δ entre as ondas de espalhamento nos pontos O e P na partícula pode ser calculada. A diferença de fases entre as duas ondas espalhadas pelos dois pontos espalhadores poderia ser $q \cdot r$, onde λ é o comprimento de onda.

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2)$$

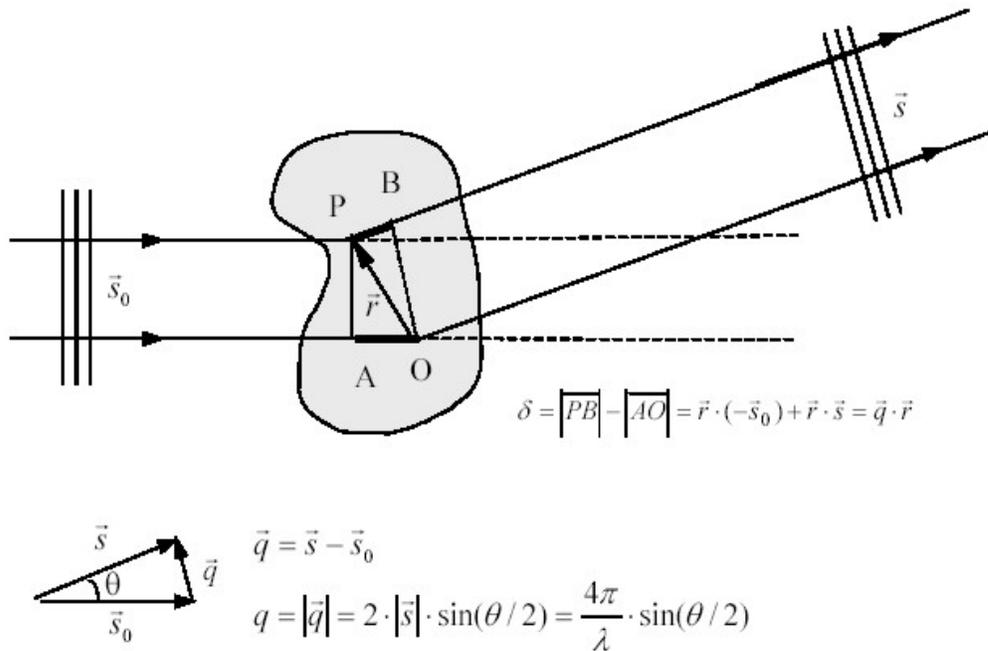


Figura 6. Cálculo das diferentes fases δ entre as ondas desde a fonte até os pontos O e P na partícula. No esquema S e S_0 são vetores unitários nas direções de espalhamento e do feixe incidente, respectivamente, e P é separado de O pelo vetor r, θ representa o ângulo de espalhamento e q o vetor de espalhamento

Em experimentos de SAXS, os raios X espalhados a partir de uma solução de uma macromolécula pura são de alta energia e não espalham muito, por tanto o espalhamento acontece a baixo ângulo. Os dados de espalhamento de raios X são coletados em 15 graus. O espalhamento cumpre com a Lei de Bragg ($\sin \theta = \lambda / 2d$, onde θ é o ângulo de espalhamento e da distância entre os planos espalhadores. Enquanto menor é o ângulo, maior é a distância entre os pontos espalhadores. Isso explica a menor resolução da técnica de SAXS.

A partir da análise da intensidade do espalhamento nos diferentes ângulos de espalhamento pode ser obtida informação sobre a estrutura da amostra. A intensidade espalhada (I) é registrada como uma função do ângulo de espalhamento (Glatter, 1982). A baixos ângulos (resolução de 2 a 3 nm), os raios-X são insensíveis à estrutura interna e o espalhamento é essencialmente dado pela forma da partícula. A intenção da análise *ab initio* obtida através dos dados

de SAXS é recuperar a estrutura tridimensional através do padrão de espalhamento unidimensional.

A amplitude de espalhamento dependente do ângulo e está relacionada com a distribuição da densidade eletrônica $\rho(r)$ do espalhador por uma transformada de Fourier. $\rho(r)$ é o número de elétrons por unidade de volume na posição r . O elemento volume dV em r contém $\rho(r)dV$ elétrons. A amplitude de espalhamento de todo o volume irradiado V está determinado por:

$$A(\vec{q}) = A_e \cdot \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r}$$

Onde A_e representa a amplitude de espalhamento de um elétron.

Quando as partículas estão no vácuo, a amplitude de luz espalhada é proporcional à densidade eletrônica das partículas. Porém, quando as partículas analisadas estão dispersas em uma matriz, a diferença entre a densidade eletrônica da partícula e da matriz é que influencia na amplitude de luz espalhada. Essa diferença é chamada de contraste de densidade eletrônica e é um dos principais parâmetros da amostra quando a técnica de SAXS é utilizada.

Para os cálculos anteriores assume-se que a amostra é anisotrópica quando na realidade as partículas são estatisticamente isotrópicas sem que exista ordem quer dizer, sem que exista uma correlação entre as partículas a grandes distâncias. Outra aproximação é que se considera que as partículas estão embebidas em uma matriz homogênea com uma densidade $\rho(r)$ quando na realidade não são homogêneas. A densidade eletrônica pode ser descrita como a diferença da densidade eletrônica $\Delta\rho = \rho - \rho_0$, que pode ter valores negativos ou positivos. As proteínas podem estar muito diluídas ou não na solução, possuindo assim certa correlação espacial que influencia a intensidade espalhada.

A fórmula geral que descreve o padrão de espalhamento de qualquer sistema é:

$$I_0(q) = 4\pi \int_0^\infty \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr$$

Onde $\gamma(r)$ é chamado função de correlação ou função característica.

Quando $q = 0$, todas as ondas secundárias estão em fase, então pode-se esperar que $I_0(0)$ seja igual ao quadrado do número total de elétrons no volume espalhado V_p . Entretanto, esta quantidade não está disponível experimentalmente. S_0 , pode ser estimada mediante a aproximação de Guinier.

A lei de Guinier é a relação mais útil em análise de SAXS porque permite obter a R_g^2 e $I_0(0)$ a partir dos dados de espalhamento na região de menor ângulo de espalhamento:

$$I_0(q) \cong I_0(0) \exp\left[-\frac{R_g^2 q^2}{3}\right]$$

A função de espalhamento de uma cadeia polipeptídica em diferentes regiões de q pode ser relacionada esquematicamente à resolução espacial: para regiões baixas de q ($q < 1 / R_g$), o espalhamento do polímero se estuda como um objeto na totalidade e podem ser calculados parâmetros estruturais como tamanho e peso molecular. A intensidade de espalhamento obedece à lei de Guinier. A Figura 7 apresenta as funções de espalhamento correspondente com as diferentes regiões válidas de q :

O experimento para obtenção dos dados consiste em direcionar um feixe de radiação para a amostra e medir a variação de intensidade espalhada em função do ângulo de espalhamento. Essa radiação deve possuir comprimento de onda bem definido na faixa de raios-X, entre 0,5 e 2 Å, ter uma boa colimação e alta intensidade. Esta técnica fornece informações estruturais de flutuações ou heterogeneidades da densidade eletrônica com dimensões características da ordem de 10 a 1000 Å. O espalhamento de raios-X a baixos ângulos somente é observado, quando as amostras analisadas apresentam heterogeneidade em sua densidade eletrônica (Glatter, 1982).

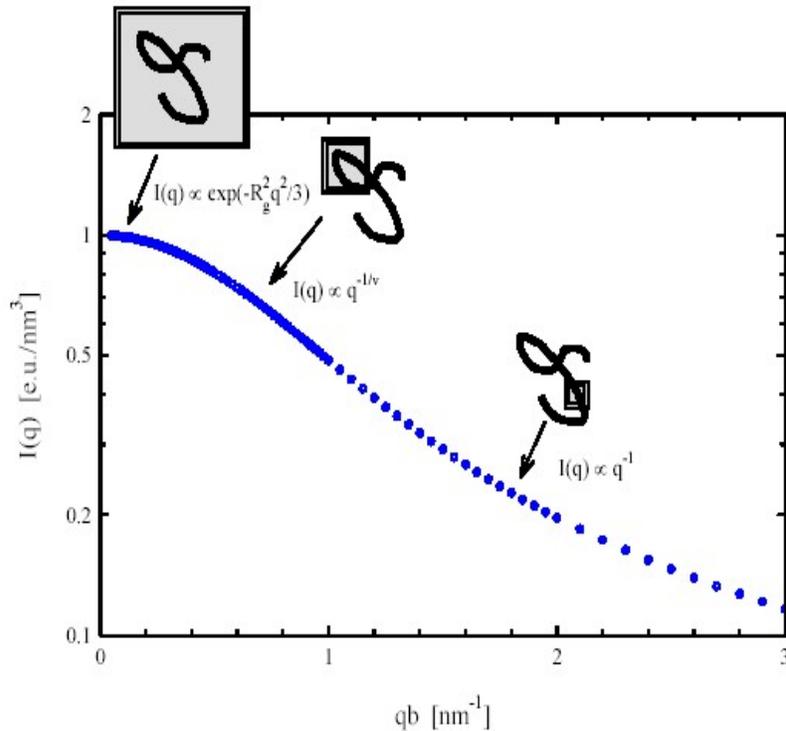


Figura 7: Função de espalhamento nas diferentes regiões de q.

Variações na forma, tamanho e estrutura das partículas do sistema analisado, são refletidas na função de espalhamento $I(q)$ (a intensidade de onda espalhada em função do espaço recíproco) e na função de distribuição de distâncias $p(r)$.

Qualquer efeito de concentração pode levar a erros indesejáveis nas determinação dos parâmetros das partículas em análise. O problema pode ser solucionado através de medidas de funções de espalhamento $I(q)$ para amostras em diferentes concentrações, normalmente de 1-2 mg/mL até 50 mg/mL. O efeito da concentração pode então ser representado num gráfico das curvas de espalhamento divididas pela concentração utilizada em cada determinação. Em alguns casos pode ser impossível fazer experimentos variando-se a concentração das amostras, já que a estrutura de algumas partículas pode ser dependente de sua concentração. A visualização e manipulação de estruturas atômicas e modelos de baixa resolução, a partir de modelos de alta resolução, é obtida através de programas como, por exemplo, o CRY SOL e o GNOM entre outros. Quando não se têm modelos de alta resolução para comparação, parte-se para

uma análise mais cuidadosa, utilizando-se a função $p(r)$ para inferir a curva experimental dada pelos programas CREDO, DAMAVER, DAMIM, entre outros.

Durante os experimentos de SAXS, um raio X de alta intensidade, monocromático e colimado é espalhado por um capilar de 1 mm que contém uma solução de proteínas. O detector está no final de uma câmara de vácuo. Se os raios X passarem a través do ar, poderiam ser espalhados por as moléculas de gás criando erro nos dados coletados. Para evitar este fenômeno são usadas duas câmaras, uma câmara grande (2 m de comprimento) para medir ângulos de espalhamento até 1 grau; e uma câmara pequena (30 cm) para medir ângulos de espalhamento de 15 graus. Um para-raio de chumbo é colocado enfrente do feixe para evitar que raios de alta intensidade cheguem ao detector. A intensidade dos raios X é medida antes e depois da passagem por a amostra. As imagens são armazenadas num computador.

A análise das imagens envolve vários passos. Primeiramente, deve ser determinado o centro do feixe. Uma vez determinado, o para-raio deve ser retirado da imagem. O centro do feixe é uma fonte importante de informação já que a quantidade de raio X espalhado depende do ângulo do raio X. Esse ângulo está determinado pelo comprimento do tubo e pela distância afastada do centro do feixe. Se os dados são analisados sem tirar os efeitos do para-raio, a sombra do para-raio pode diminuir artificialmente a média de intensidade nos anéis que estão parcialmente cobertos pelo para-raio. Posteriormente o sinal produzido por o tampão da proteína (*background*) deve ser subtraído da imagem. O tampão (que contém a solução de proteína) apresenta moléculas que equilibram as proteínas mantendo-as na forma estável.

Entretanto, as moléculas do tampão também espalham raios X. Essa é a razão pela qual se deve subtrair a contribuição do espalhamento do tampão do espalhamento da amostra. Calcula-se a média dos dados da imagem circular da amostra resultando em um gráfico de intensidade versus distância do centro do feixe. A distância do centro do feixe é convertida em q , uma dimensão no espaço recíproco. Um gráfico de q^2 versus log natural da intensidade pode ser usado para determinar a forma da molécula.

Depois destes tratamentos dos dados, pode-se calcular a média dos valores de espalhamento. A média é calculada em círculos equidistantes do centro do feixe. Cada círculo está a diferente ângulo de espalhamento. Isso reduz o objeto tridimensional a uma dimensão. A molécula está em movimento na solução espalhando em qualquer orientação. Este fato sugere que os dados podem ser utilizados para determinar o raio de giro e o espaço que a molécula ocupa. Esses cálculos podem ser feitos mediante a conversão da distância do centro do feixe a q , onde q é uma medida da resolução do espalhamento medida em Å^{-1} . Um gráfico de q^2 versus log natural da intensidade determina a região de Guinier. A inclinação da região de Guinier está relacionada com o raio de giro mediante a seguinte relação chamada Lei de Guinier:

$$I(h) = I(0) \cdot e^{-R^2 q^2 / 3}. \text{ A região de Guinier está limitada a } q < 1/R.$$

Entretanto, antes de determinar o raio de giro, a intensidade deve ser checada. A intensidade do raio durante uma imagem é comparada com a intensidade de outra e escalada criando um fator de correção. A média das intensidades é multiplicada por esse fator de correção. A partir daí todos os espalhamentos de uma mesma amostra podem ser corrigidos. Posteriormente pode ser calculado o raio de giro.

Cristalografia de proteínas

A cristalização de moléculas em solução é um fenômeno reversível cuja cinética específica e parâmetros termodinâmicos dependerão das propriedades físico-químicas do solvente e do soluto envolvidos. Sob condições de supersaturação o sistema é dirigido para um estado de equilíbrio em que o soluto é dividido entre uma fase solúvel e uma fase sólida. As moléculas individuais perdem a liberdade de translação e de rotação, diminuindo assim a entropia do sistema. Simultaneamente, essas moléculas formam novas interações químicas estáveis reduzindo assim a energia livre do sistema e fornecendo a força motriz para o processo de ordenação das moléculas.

A estratégia usada para induzir a cristalização de macromoléculas é levar o sistema vagarosamente a um estado de solubilidade mínima alcançando um

limitado grau de supersaturação. Ao mesmo tempo, os componentes variáveis do sistema devem ser gradualmente ajustados para propiciar condições nas quais a interações de macromoléculas com as vizinhas seja o evento mais favorável. Como em todo sistema termodinâmico, durante a cristalização, o equilíbrio é atingido mediante a minimização da energia livre. Em um processo de cristalização, a mínima energia livre é atingida quando as moléculas são organizadas num motivo simétrico e periodicamente repetitivo no estado sólido: um cristal.

Para a formação de um cristal, o número de interações de carga (atração), estéricas, de hidrofobicidade e interações hidrofílicas, são maximizados enquanto as interações repulsivas são minimizadas. Para macromoléculas biológicas, que existem predominantemente em meio aquoso, um mínimo de energia livre é alcançado quando elas estão totalmente solvatadas. Em soluções extremamente concentradas, onde não existe água suficiente para manter a hidratação, as moléculas podem-se agregar em precipitados amorfos ou podem cristalizar.

O processo de cristalização pode ser dividido em duas fases, uma primeira fase de nucleação e uma segunda fase de crescimento. Durante a nucleação, as moléculas de proteína devem ultrapassar uma barreira de energia para formar um agregado periodicamente ordenado de tamanho crítico que possa sobreviver no sentido termodinâmico. A fase de crescimento é atingida quando o estado sólido se torna mais atrativo termodinamicamente para as moléculas individuais que estão solúveis. Para promover qualquer um dos estados, uma condição de supersaturação deve ser criada na solução mãe ou meio de cristalização. A supersaturação é um estado de não equilíbrio caracterizado por uma tendência para formar uma fase sólida. Durante esta fase, aumenta a proporção de material neste estado até ser restaurado o equilíbrio, isto é, até a saturação (ou equilíbrio de concentração).

A formação de um cristal depende de propriedades químicas da proteína bem como de suas interações num dado solvente. Assim uma caracterização físico-química das condições de cristalização de uma proteína requer uma extensa

lista dos constituintes químicos da solução e o conhecimento de como eles mudam com a temperatura e o pH da solução.

Existem vários parâmetros durante o processo de cristalização que afetam a solubilidade das proteínas como são a temperatura, a carga líquida da proteína, a força iônica da solução, a natureza do agente precipitante, a constante dielétrica, etc.

Um fator determinante no processo de cristalização é a concentração da proteína, a escala mais comum é entre 5 – 30 mg/ml. Quanto maior for a concentração de proteínas, maior porcentagem de supersaturação possibilitando a nucleação e a formação de cristais. Esta condição de supersaturação pode levar também a formação de agregados amorfos.

Existem vários métodos de cristalização, entre eles cristalização em Batch, diálise, difusão líquido- líquido, cristalização induzida por temperatura, cristalização induzida por pH e difusão de Vapor.

O método de cristalização por difusão de vapor consiste em colocar concentrações de um agente cristalizante no reservatório duas vezes maior que na gota contendo a proteína. Em estas condições, a proteína começará o processo de cristalização em um estado insaturado. O sistema é fechado, de forma tal que equilíbrio é atingido por a difusão de espécimes voláteis (água ou solventes orgânicos) até a pressão de vapor da gota se igualar com a do reservatório. Se o equilíbrio é alcançado por a saída de água da gota para o reservatório, o volume da gota diminui e conseqüentemente, a concentração de todos os constituintes da gota aumenta. Estas condições podem facilitar o processo de supersaturação.

O método de difusão de vapor requer de pouca quantidade de proteína e é ideal para a varredura de diferentes condições.

Uma vez cristalizada a proteína procede-se à difração de raios X. O padrão de raios X fornece informação sobre a intensidade das ondas espalhadas a partir dos diferentes planos do cristal. A amplitude da onda é proporcional ao quadrado da intensidade medida no detector. Para calcular a densidade eletrônica na posição (xyz) da célula unitária do cristal precisa-se determinar a contribuição

de todos os planos hkl , que pode ser expresso como: densidade eletrônica em $(xyz) =$ a somatória das contribuições no ponto (xyz) de todas as ondas espalhadas a partir dos planos (hkl) cujas amplitudes dependem do número de elétrons no plano, além da correta relação de fases:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp(-2\pi ihx + ky + lz),$$

onde V é o volume da célula unitária e α_{hkl} é a fase associada com a amplitude do fator de estrutura. Experimentalmente podemos medir as amplitudes, mas as fases são perdidas no experimento (Figura 35). Esse constitui o problema das fases.

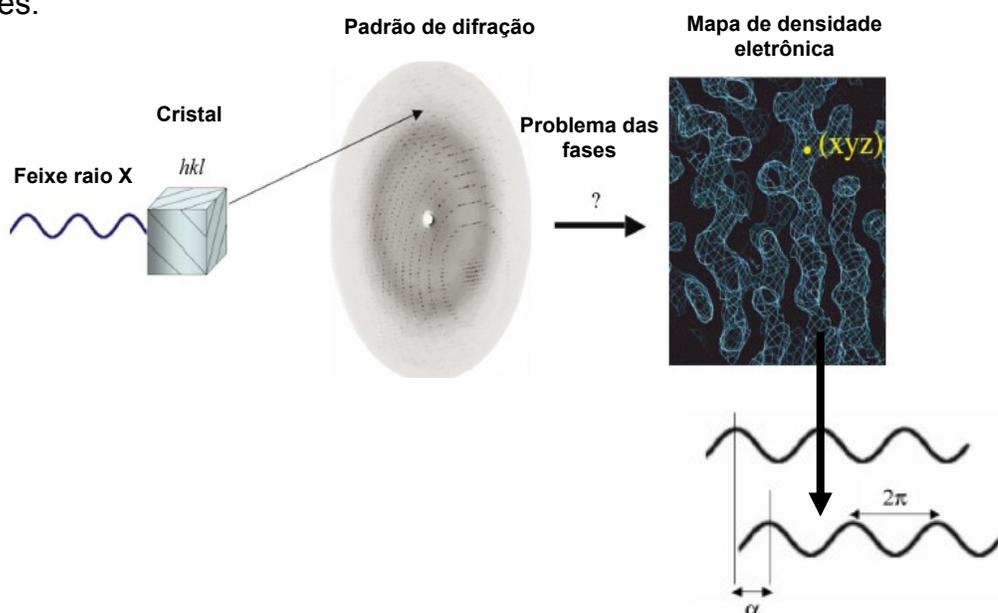


Figura 8. Esquema do processo de resolução de estruturas por cristalografia de raios X.

Existem vários métodos para resolver o problema das fases: Substituição Molecular que é utilizado quando existe uma a estrutura resolvida de uma proteína homóloga; Substituição Isomórfica Múltipla (MIR) e Dispersão Anômala de Múltiplos Comprimentos de Onda (MAD). Estes dois últimos precisam da inclusão no cristal de átomos pesados. Os métodos de MIR e MAD utilizam diferentes propriedades dos átomos pesados.

MIR baseia-se no aumento da intensidade das reflexões difratadas pelo átomo pesado. Coletam-se dados de difração a partir do cristal nativo e do cristal derivado (contendo o átomo pesado). A partir desses dados pode ser calculada a

posição dos átomos pesados na célula unitária mediante a função de Patterson e calcular o fator de estrutura. Com essas informações pode ser calculado o fator de estrutura da proteína nativa e posteriormente o mapa de densidade eletrônica.

MAD utiliza a capacidade dos átomos pesados de absorver raios X de comprimentos de ondas específicos. Os átomos pesados apresentam espalhamento anômalo quando o comprimento de onda está perto da borda de absorção. Primeiramente é obtido o padrão de difração do cristal nativo que posteriormente é submetido a diferentes métodos para a inclusão de átomos pesados. Uma vez obtido o cristal derivado são obtidos padrões de difração a diferentes comprimentos de onda incluindo comprimentos de onda próximos a borda de absorção. O sinal anômalo é utilizado para calcular as fases do cristal derivado e com isso podem ser calculadas as fases do cristal nativo. Com a estimativa das fases pode ser calculado o mapa de densidade eletrônica.

Uma vez calculado o mapa de densidade eletrônica pode ser construído o modelo e posteriormente passar ao processo de refinamento desse modelo.

Referências Bibliográficas

- Benjwal, S., Verma, S., Röhm, K. H. & Gursky, O. (2006). Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. Protein Science **15**: 635-639.
- Chattopadhyay, A. R., H. (2004). Application of fluorescence spectroscopy to membrane protein structure and dynamics. CURRENT SCIENCE **87**(2): 175-180.
- Glatter, O., & Kratky, O. (1982). Small-Angle X-ray Scattering. Academic Press, New York.
- Guinier, A. (1939). Ann. Phys. (Paris) **12**,: 61–237.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta. **1751**: 119-139.
- Moller, M. D., A. (2002). Protein Tryptophan Accessibility Studied by Fluorescence Quenching.
- Murphy, K. P. a. F., E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. Adv. Protein Chem. **43**: 313-361.
- Papish, A., Tari, L. and Vogel, H.J. (2002). A dynamic light scattering study of calmodulin target peptide interactions. Biophys. J. **83**: 1455-1464.
- Wiley, J. (1975). Berne and Pecora, "Dynamic Light scattering.

Anexo 2

Capa da publicação dos resultados apresentados no trabalho na revista *Mycological Research*:

available at www.sciencedirect.com

 ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mycres

Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*

Odalys GARCIA^{a,1}, Joci A. N. MACEDO^{b,1}, Ricardo TIBÚRCIO^a, Gustavo ZAPAROLI^a, Johana RINCONES^a, Livia M. C. BITTENCOURT^b, Geruza O. CEITA^b, Fabienne MICHELI^b, Abelmon GESTEIRA^b, Andréa C. MARIANO^b, Marlene A. SCHIAVINATO^c, Francisco J. MEDRANO^c, Lyndel W. MEINHARDT^d, Gonçalo A. G. PEREIRA^{a,*}, Júlio C. M. CASCARDO^b

^aDepartamento de Genética e Evolução, IB/UNICAMP, CP 6109, 13083-970, Campinas-SP, Brazil
^bDepartamento de Ciências Biológicas, UESC, 45662-000, Ilhéus, BA, Brazil
^cDepartamento de Fisiologia Vegetal, IB/UNICAMP, CP 6109, 13083-970, Campinas-SP, Brazil
^dSustainable Perennial Crops Laboratory, USDA/ARS, 10300 Baltimore Av., Beltsville, MD 20705, USA

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article history: Received 30 November 2006 Accepted 16 January 2007 Published online 11 February 2007</p> <p>Corresponding Editor: Gareth W. Griffith</p> <p>Keywords: Basidiomycota Cacao Plant pathology WBD</p>	<p>The hemibiotrophic basidiomycete <i>Moniliophthora perniciosa</i> causes witches' broom disease of <i>Theobroma cacao</i>. Analysis of the <i>M. perniciosa</i> draft genome led to the identification of three putative genes encoding necrosis and ethylene-inducing proteins (MpNEPs), which are apparently located on the same chromosome. MpNEP1 and 2 have highly similar sequences and are able to induce necrosis and ethylene emission in tobacco and cacao leaves. MpNEP1 is expressed in both biotrophic and saprotrophic mycelia, the protein behaves as an oligomer in solution and is very sensitive to temperature. MpNEP2 is expressed mainly in biotrophic mycelia, is present as a monomer in solution at low concentrations (<40 μM) and is able to recover necrosis activity after boiling. These differences indicate that similar NEPs can have distinct physical characteristics and suggest possible complementary roles during the disease development for both proteins. This is the first report of NEP1-like proteins in a basidiomycete.</p> <p>© 2007 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>

Introduction

Witches' broom disease (WBD) of cacao (*Theobroma cacao*) is one of the most important phytopathological problems to afflict the Southern Hemisphere in recent decades (Griffith et al. 2003). In Brazil, the disease is endemic in the Amazon region, and in 1989 was introduced into southern Bahia, the largest area of cacao production in the country (Pereira et al. 1996). This resulted in a severe drop in the production of this commodity and Brazil shifted from the second largest cacao exporter to a cacao importer.

Moniliophthora perniciosa, the causal agent of WBD, is a basidiomycete and has a hemibiotrophic life cycle (Aime & Phillips-Mora 2006; Purdy & Schmidt 1996). Initially, uninucleated basidiospores,

* Corresponding author.

E-mail address: goncalo@unicamp.br

¹ Authors have made equal contributions to this work.

0953-7562/\$ – see front matter © 2007 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mycres.2007.01.017