

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**SULAMITA DE FREITAS FRANCO**

**Caracterização de um gene similar a taumatina expresso  
pelo fungo causador da Vassoura de bruxa,  
*Moniliophthora perniciosa***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Sulamita de Freitas Franco  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

**Orientação: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira**  
**Co-orientação: Dr. Jorge Maurício Costa Mondego**

Campinas, 2008

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

**F848c**

Franco, Sulamita de Freitas

Caracterização de um gene similar a taumatina expresso pelo fungo causador da Vassoura de bruxa, *Moniliophthora perniciosa* / Sulamita de Freitas Franco. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

Co-orientador: Jorge Maurício Costa Mondego.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Taumatina. 2. *Moniliophthora perniciosa*. 3. Vassoura-de-bruxa (fitopatologia). I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Mondego, Jorge Maurício Costa. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(pbg/ib)

**Título em inglês:** Characterization of a thaumatin-like gene expressed by *Moniliophthora Perniciosa* fungus, the causative agent of cacao Whiches Broom disease.

**Palavras-chave em inglês:** Thaumatin; *Moniliophthora perniciosa*; Whiches broom disease.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Celso Eduardo Benedetti, Carlos Augusto Colombo.

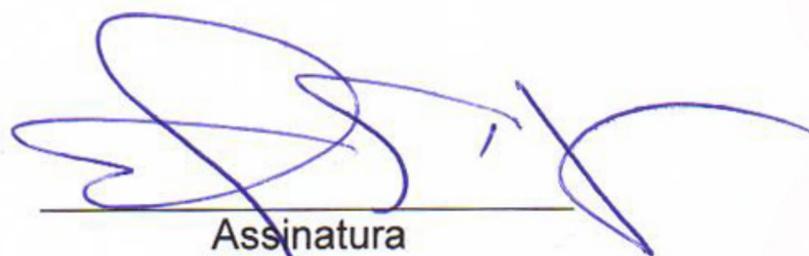
**Data da defesa:** 04/12/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 04 de dezembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

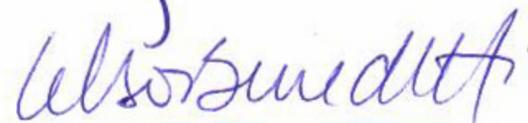
Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira  
(Orientador)



---

Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti



---

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo



---

Assinatura

Prof. Dr. Jorg Kobarg

---

Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

---

Assinatura

**Dedico,**

**A minha família (meu pai, minha mãe e minha irmã), e a as pessoas que escolhi para fazer parte dela: meu amor Marcos, e os amigos Diego, Vanessa, Douglas e Maurício.**

## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, pela oportunidade que me foi dada e pela confiança depositada em meu trabalho;

Ao Dr. Jorge M. C. Mondego, pela orientação efetiva e por toda ajuda;

Ao Dr. Javier Medrano, por toda a ajuda com a expressão e tentativa de renaturação da proteína, e por tudo que me ensinou durante o mestrado;

A professora Dr. Luciana Gonzaga de Oliveira, por ceder os fungos utilizados no estudo;

Ao Anderson Cunha, por um dia ter me aceitado como estagiária;

A Eliane, que mantém em ordem o laboratório e torna possíveis nossas reuniões com orientador, e torna muito mais fáceis os envios de relatórios e documentações;

A Andréia Aparecida Vigilato, por cuidar tão bem de toda a parte burocrática da pós-graduação, especialmente nessa última fase de preparação para defesa;

As amigas e primeiras companheiras de bancada Diana Queiroz e Raquel Bertolin pela amizade e por tudo que me ensinaram no laboratório;

Ao companheiro de bancada Paulo Jose Teixeira, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e discussões recheadas de boas idéias para o trabalho;

Aos amigos e companheiros de bancada do LGE: Ana, Daniela, Sílvia, Alinne, Marcela, Jorge, Eduardo, Zapa, Gleidson, Bruno, Marcelo e todos do laboratório pela participação no trabalho e também pelos momentos de apoio e descontração, indispensáveis para a manutenção da sanidade... ou não...

As minhas amigas Angélica e Fabiana, por compreender o sumiço e por toda torcida e confiança;

Aos Amigos Vanessa, Douglas e Maurício, por acompanharem de perto todo o período de estudo, em especial a finalização do trabalho, foi muito importante estar perto de vocês;

A minha tia Rosane e Sarinha, minha priminha, pelo presente que esteve comigo e me ajudou em relatórios e também para a escrita da dissertação, e também por todo o carinho, visitas e viagem inesquecíveis;

A Truffa, por toda alegria e momentos de descontração proporcionados, que me ajudaram nos momentos tensos;

Ao meu amor, Marcos Padovani, por estar sempre ao meu lado, suportando insônias, choros e euforias inexplicáveis, por ter dado ouvido a meus assuntos, mesmo sem fazer muito sentido a ele, e também por todo apoio;

A minha família: meu pai Roberto, minha mãe Euza e minha irmã Roberta, que me deram todo o apoio que uma família poderia dar, e me deram condições para que fosse possível a realização desse trabalho;

A FAPESP, pelo financiamento do projeto;

**RESUMO**

*Moniliophthora perniciosa* é um fitopatógeno de grande importância econômica no Brasil, em especial na região do sul da Bahia, por causar a doença do cacauero conhecida como Vassoura de Bruxa. Esse fungo possui um ciclo de vida hemibiotrófico, apresentando duas fases distintas: a primeira biotrófica/parasítica e a segunda saprotrófica/necrotrófica.

O banco de dados gerados pelo projeto genoma Vassoura de Bruxa vem sendo estudado com o intuito de desvendar as vias metabólicas utilizadas pelo patógeno na colonização do cacauero. Curiosamente, foi verificada a expressão de um gene similar a taumatina pelo fungo. As taumatinas de plantas são expressas durante a resposta hipersensitiva (HR) em interações planta-patógeno, sendo classificadas como PR-5 (*pathogenesis related protein*). Taumatinas possuem atividade antifúngica e são capazes de clivar  $\beta$ -glucanas. Uma nova função foi descrita para uma taumatina de trigo: a de inibição de xilanase. Recentemente, as taumatinas vêm sendo estudadas também em nematódeos, artrópodos e fungos.

O trabalho aqui descrito visou à clonagem do gene de *M. perniciosa* similar a taumatinas *MpTLP1* e a expressão da proteína recombinante MpTLP1, bem como o estudo da expressão desse gene durante o desenvolvimento de *M. perniciosa*. Análises de *Northern blot* mostram que esse gene é induzido quando o fungo é incubado com extrato de cacau e ácido salicílico. Dados de *Real time* PCR mostram que esse gene é mais expresso na fase biotrófica do fungo. Esses resultados sugerem a participação de *MpTLP1* na interação planta-patógeno.

MpTLP1 foi expressa em *E.coli* e renaturada a partir de corpos de inclusão. A proteína renaturada não apresentou atividades antifúngica e  $\beta$ -glucanolítica. Esses resultados podem ser atribuídos a sua renaturação ineficiente, ou pelas suas diferenças estruturais com relação a outras TLPs com atividade antifúngica e  $\beta$ -glucanolítica. Algumas características de MpTLP1 podem indicar que essa proteína possa ser um inibidor de xilanase ou de outras enzimas que clivam parede celular.

**ABSTRACT**

*Moniliophthora perniciosa* is a phytopathogen that has economical importance in Brazil, particularly in the south of Bahia, because this fungus causes the disease in cacao known as Witches' Broom disease. This fungus is a hemibiotrophic pathogen that has two distinct stages: a biotrophic (or parasitic) and a necrotrophic (or saprotrophic).

The database generated by the Witches' Broom genome project has been studied in order to unravel the metabolic pathways used by the pathogen during the colonization of cacao. Curiously, it was detected the expression of a gene similar to thaumatins in *M. perniciosa*. Plant thaumatins are expressed during hypersensitive response (HR) in plant pathogen interactions, being classified as PR-5 (pathogenicity related protein class-5). Thaumatins have antifungal and  $\beta$ -glucanolytic activities. Recently, a new wheat thaumatin-like protein was described as a xylanase inhibitor. Thaumatins from nematodes, arthropods and fungi have also been characterized.

This work aimed the cloning of the *M. perniciosa* thaumatin like-gene *MpTLP1*, the expression of the recombinant protein MpTLP1, as well as at the characterization of its gene expression during the development of *M. perniciosa*. Northern blot analysis shows that *MpTLP1* expression is induced when the fungus is incubated with cacao extract and salicylic acid. Real time-PCR data show that *MpTLP1* is more expressed in the biotrophic stage of the fungus. These results suggest the participation of *MpTLP1* in plant-pathogen interaction.

MpTLP1 was expressed in *E. coli* and refolded from inclusion bodies. The refolded protein did not have antifungal or  $\beta$ -glucanolytic activity. These results can be attributed to an inefficient refolding or to structural differences in relation to other TLPs that have antifungal and  $\beta$ -glucanolytic activity. Some MpTLP1 features may indicate that this protein inhibits xylanases or other enzymes that cleave cell walls.

---

**SUMÁRIO**

|  |    |
|--|----|
| 1- INTRODUÇÃO.....   | 1  |
| 1.1 – O cacaueteiro .....  | 1  |
| 1.2- <i>Moniliophthora perniciosa</i> e a Vassoura de bruxa.....   | 2  |
| 1.3- Impacto socioeconômico da doença e o projeto Genoma Vassoura de Bruxa: .....  | 5  |
| 1.4- Mecanismos de interação planta-patógeno e <i>M. perniciosa</i> .....  | 10 |
| 1.5 – Proteínas do tipo taumatina .....  | 12 |
| 2- OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....   | 16 |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 17 |
| 3.1- Isolados de <i>M. perniciosa</i> .....  | 17 |
| 3.2- Análise do gene <i>MpTLP1</i> .....   | 17 |
| 3.2.1- Seqüenciamento de <i>MpTLP1</i> .....   | 17 |
| 3.2.2- Southern blot: .....  | 17 |
| 3.3- Alinhamentos de seqüências e Filogenia de <i>MpTLPs</i> .....   | 19 |
| 3.4- Clonagem do gene <i>MpTLP1</i> .....  | 19 |
| 3.4.1- Organismos hospedeiros.....   | 19 |
| 3.4.2- Plasmídeos e oligonucleotídeos.....   | 19 |
| 3.4.4 - Digestão de <i>MpTLP1</i> e clonagem em vetores de expressão .....   | 21 |
| 3.5- Superexpressão da proteína <i>MpTLP1</i> .....  | 21 |
| 3.5.1- Transformação .....   | 21 |
| 3.5.2- Teste de indução da proteína recombinante em pequena escala.....  | 21 |
| 3.5.3- Indução de <i>MpTLP1</i> em larga escala .....  | 22 |
| 3.6- Purificação de <i>MpTLP1</i> .....  | 23 |
| 3.6.1- Lise celular em larga escala .....  | 23 |
| 3.6.2- Choque osmótico.....  | 23 |
| 3.6.3- Cromatografia de afinidade .....  | 24 |
| 3.7- <i>Western blot</i> .....   | 24 |
| 3.8- Desnaturação e renaturação de <i>MpTLP1</i> : .....   | 25 |
| 3.8.1- Desnaturação utilizando uréia 8M e solubilização com utilização de DTT.....   | 25 |
| 3.8.2- Desnaturação utilizando uréia 8M e solubilização com utilização do sistema de Glutathione oxidada e Glutathione reduzida..... | 26 |
| 3.8.3- Desnaturação utilizando uréia 8M e solubilização com utilização de tampão Tris-HCl.....                                       | 26 |
| 3.9- Expressão de <i>MpTLP1</i> em <i>Pichia pastoris</i> .....  | 27 |
| 3.9.1- Transformação: .....  | 27 |
| 3.9.2- Expressão de <i>MpTLP1</i> em pequena escala:.....  | 27 |

---

|   |     |
|---|-----|
| 3.10- Quantificação de MpTLP1 .....   | 28  |
| 3.11- Teste de atividade antifúngica de MpTLP1 .....  | 29  |
| 3.12- Teste de atividade $\beta$ -glucanase.....  | 30  |
| 3.13- Dicroísmo Circular (CD).....  | 30  |
| 3.14- Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....  | 31  |
| 3.15- Predição da estrutura secundária.....   | 31  |
| 3.16- Predição da estrutura terciária .....   | 31  |
| 3.17- Análise de indução da expressão gênica de MpTLP1 através do método de Northern blot: .....  | 31  |
| 3.18- Cultivo de basidiocarpos de <i>M. perniciosa</i> .....  | 33  |
| 3.19- Análise da expressão gênica de <i>MpTLP1</i> ao longo do ciclo de vida de <i>M. perniciosa</i> através do método de <i>Real time</i> RT-PCR ..... | 35  |
| 3.20- Clonagem e estudo do promotor do gene <i>MpTLP1</i> .....   | 36  |
| 4- RESULTADOS.....  | 39  |
| 4.1- Análise do gene <i>MpTLP1</i> .....  | 39  |
| 4.2- Análise de taumatinas em <i>M. perniciosa</i> e filogenia de <i>MpTLP1</i> .....   | 43  |
| 4.3- Clonagem do gene <i>MpTLP1</i> .....   | 50  |
| 4.4- Superexpressão da proteína MpTLP1.....   | 51  |
| 4.5- Desnaturação e renaturação de MpTLP1 .....   | 56  |
| 4.6- Teste de atividade antifúngica de MpTLP1 .....   | 60  |
| 4.7- Análise de indução da expressão gênica de <i>MpTLP1</i> .....  | 68  |
| 4.8- Análise da expressão do gene <i>MpTLP1</i> ao longo do ciclo de vida de <i>M. perniciosa</i> ..  | 73  |
| 4.9- Clonagem e estudo do promotor do gene <i>MpTLP1</i> .....  | 76  |
| 5- DISCUSSÃO.....   | 81  |
| 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 93  |
| ANEXO 1 .....   | 100 |

---

**Lista de meios de cultura e soluções**

**BMGY:** extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio pH6.0 100mM, YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %, glicerol 1%

**BMMY:** extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio pH 6.0 100mM, YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %, metanol 0,5%

**CTAB:** CTAB 5%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris- HCl pH 8,0 100 mM; PVP 1%

**Drop out:** 0,5g Adenina, 0,24g L- arginina, 1,2g ácido L- aspártico, 1.2g ácido L- glutâmico, 0,36g L- lisina, 0,24g L- metionina, 0,6g L- fenillananina, 4,5g L- serina, 2,4g L- teotronina, 0,18g L-tirosina, 1,8g L-valina, H<sub>2</sub>O qsp 100 ml.

**LB:** Triptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l, NaCl 5g/l (15 g/l ágar para meio sólido)

**MD:** YNB 1,34%, Biotina  $4 \times 10^{-5}$ %, dextrose 2%.

**Meio biotrófico de manutenção:** 5 g/l extrato de levedura, 1 ml/l MPR trace minerals, 50 ml/l glicerol, 2,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**Meio Malte:** 5 g/l de extrato de levedura, 17 g/l de extrato de malte. Para meio sólido adicionar 2% de Agar

**Meio mínimo de crescimento de micélios necrotróficos de *M. pernicioso*:** 0,05% KCl +0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> (traços) + 1% Glicose e 0,6% NaNO<sub>3</sub>)

**Meio para bolacha:** 1% glicose; 1% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,02% KCl, 0,02% MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O; 0,5% extrato de levedura, 0,005% CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O; 0,001% ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O e 1,5% agar

**Meio SC:** 6,7 g/l YNB; 30 g/l glicose, 10 ml/l solução de triptofano 100x, 10 ml/l de solução de histidina 100x, 10 ml/l de solução de leucina 100x, 30 ml/l de Drop out. Para meio sólido, adiciona 30 g/l de Agar

**MPR trace minerals:** 500mg FeSO<sub>4</sub>, 156mg MnSO<sub>4</sub>, 167mg ZnCl<sub>2</sub>, 200mg CoCL<sub>2</sub>, 1ml HCl 19%, H<sub>2</sub>O qsp 100 ml.

**MM:** YNB 1,34%, Biotina  $4 \times 10^{-5}$ %, metanol 0,5%

**Reagente A (Somogyi):** 4 g/l CuSO<sub>4</sub>, 24 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro, 16 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 12 g/l Tartarato de Na e K, 18 g/l Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro

**Reagente B (Nelson):** 50 g/l de molibdato de amônio anidro, 42 ml/l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 60 g/l de NA<sub>2</sub>HASO<sub>4</sub>

**Solução de bloqueio (*Western blot*):** 5% leite em pó, TBS 1X, pH7,4

**Solução de depuração (*Southern blot*):** HCl 0,25 M

**Solução de desnaturação (*Southern blot*):** NaOH 0,4 M; NaCl 0,6 M

**Solução de neutralização (*Southern blot*):** NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M pH 7,5

**Solução reveladora (*Western blot*):** 1 tablete de 3-amino-9-ethycarbazole diluído em 2,5 ml de dimetilformamida, água qsp 50ml + 25µl de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Solução Z:** 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> contendo 5mg/ ml de X-gal

**SSC 20X:** 175 g/l NaCl, 88 g/l citrato de sódio, pH7,0

**SSPE 20X:** 204,4 g/l NaCl; 40 ml/l EDTA 0,5M; 27,6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, ajustar pH a 7,7

**TAE (50x):** 242 g Tris base, 57.1 ml ácido acético, 100 ml 0.5M EDTA, H<sub>2</sub>O qsp 1l, pH to 8.5.

**TBS (*Western blot*):**10mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl

**Tampão de hibridação (*Northern blot*):** 50% de formamida; 0,12M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2); 7% SDS; 0,25 M NaCl; 1 mM EDTA; 10% PEG (8000 kDa) de DNA de esperma de salmão (10mg/ml)

**Tampão de hibridação (*Southern blot*):** 2X SSPE; 1X SDS; 0,5% Blotto, 10% Dextran Sulfato, 200µl de esperma de salmão (100 µg/µL)

**Tampão de lise:** 0,1M NaPI + 1% triton X100

**Tampão de transferência para *Western blot*:** 3 g/l Tris base, 14.5 g/l glicina, 200 ml/l metanol.

**Tampão para MpTLP1:** solução em que ela se apresenta em forma solúvel, utilizada em todos os testes: 50 mM Tris pH 8,0; 19 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>

**YPD:** 10 g/l extrato de levedura; 20 g/l peptona, 20 g/l dextrose (20 g/l ágar para meio sólido)

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b>  | O cacau e seu principal produto   | 2  |
| <b>Figura 2:</b>  | Esquema representativo do ciclo de vida do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i>                 | 4  |
| <b>Figura 3:</b>  | Principais países produtores de cacau   | 6  |
| <b>Figura 4:</b>  | Participação da produção brasileira de cacau na produção mundial                                  | 7  |
| <b>Figura 5:</b>  | Seqüência do gene <i>MpTLP1</i> presente no EST CP02-EC-001-001-E11-UE                            | 39 |
| <b>Figura 6:</b>  | BlastX da seqüência do EST referente ao gene <i>MpTLP1</i> de <i>M. perniciosa</i>                | 40 |
| <b>Figura 7:</b>  | Seqüência de aminoácidos de <i>MpTLP1</i>   | 41 |
| <b>Figura 8:</b>  | Análise de <i>Southern blot</i> do gene   | 42 |
| <b>Figura 9:</b>  | Análise do gene <i>MpTLP1</i> em gel de <i>Pulse-field</i>  | 42 |
| <b>Figura 10:</b> | Sequências de nucleotídeos e aminoácidos de <i>MpTLP1</i> alinhadas com contig genômico 5418      | 44 |
| <b>Figura 11:</b> | tBlastN da seqüência de <i>MpTLP1</i> contra os <i>contigs</i> genômicos de <i>M. perniciosa</i>  | 45 |
| <b>Figura 12:</b> | Alinhamento das <i>MpTLPs</i> com a taumatina de <i>L. edodes</i>                                 | 46 |
| <b>Figura 13:</b> | Cladograma das taumatinas de <i>M. perniciosa</i>   | 46 |
| <b>Figura 14:</b> | Alinhamento de <i>TLP1</i> com outras <i>TLPs</i>   | 47 |
| <b>Figura 15:</b> | Árvore filogenética das <i>TLPs</i>   | 49 |
| <b>Figura 16:</b> | Predição da estrutura secundária de <i>MpTLP1</i>   | 50 |
| <b>Figura 17:</b> | PCR do gene <i>MpTLP1</i>   | 51 |
| <b>Figura 18:</b> | Digestão de <i>MpTLP1</i> clonada em pGEM-T Easy  | 51 |
| <b>Figura 19:</b> | Experimento de indução em pequena escala de <i>MpTLP1</i>   | 52 |
| <b>Figura 20:</b> | Purificação por afinidade a His-Tag da proteína <i>MpTLP1</i> e <i>Western blot</i>               | 53 |
| <b>Figura 21:</b> | Purificação por afinidade a His-Tag da proteína <i>MpTLP1</i> e <i>Western blot</i>               | 54 |
| <b>Figura 22:</b> | Indução de <i>MpTLP1</i> em pET28a <i>E. coli</i> BI21-C41  | 54 |
| <b>Figura 23:</b> | Fração intracelular da indução de <i>P. pastoris</i> contendo <i>MpTLP1</i>                       | 55 |
| <b>Figura 24:</b> | Fração extracelular da indução de <i>P. pastoris</i> contendo <i>MpTLP1</i>                       | 55 |
| <b>Figura 25:</b> | Teste de confirmação de transformante em <i>P. pastoris</i> GS115                                 | 56 |
| <b>Figura 26:</b> | Desnaturação de <i>MpTLP1</i> pela metodologia descrita em 3.8.1                                  | 57 |
| <b>Figura 27:</b> | Renaturação de <i>MpTLP1</i> pela metodologia descrita em 3.8.1                                   | 58 |
| <b>Figura 28:</b> | Teste de renaturação de <i>MpTLP1</i> em pET29a   | 58 |
| <b>Figura 29:</b> | Purificação de <i>MpTLP1</i> desnaturada em 8M de Uréia, purificado em coluna de afinidade Ni-NTA | 59 |
| <b>Figura 30:</b> | Obtenção de <i>MpTLP1</i> solúvel   | 59 |
| <b>Figura 31:</b> | Teste de atividade antifúngica de <i>MpTLP1</i> em fungos filamentosos                            | 61 |
| <b>Figura 32:</b> | Curva de crescimento de leveduras   | 62 |
| <b>Figura 33:</b> | Teste Somogyi- Nelson para atividade $\beta$ -glucanólítica de <i>MpTLP1</i>                      | 63 |

---

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 34:</b> | Dicroísmo circular (CD) de MpTLP1   | 63 |
| <b>Figura 35:</b> | Espalhamento dinâmico de luz (DLS) de MpTLP1  | 64 |
| <b>Figura 36:</b> | Alinhamento de TLPs que possuem estrutura terciária resolvida e MpTLP1  | 65 |
| <b>Figura 37:</b> | Estrutura terciária de MpTLP1   | 66 |
| <b>Figura 38:</b> | Comparação da estrutura terciária de MpTLP1 com outras TLPs   | 67 |
| <b>Figura 39:</b> | comparação da superfície eletrostática de MpTLP1 com outras TLPs  | 67 |
| <b>Figura 40:</b> | Alinhamento de MpTLP1 com outras TLPs   | 68 |
| <b>Figura 41:</b> | <i>Northern blot</i> do gene <i>MpTLP1</i> em micélios necrotróficos crescidos em presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio                               | 70 |
| <b>Figura 42:</b> | <i>Northern blot</i> do gene <i>MpTLP1</i> em micélios necrotróficos crescidos em presença de moléculas sinalizadoras de defesa em plantas                            | 70 |
| <b>Figura 43:</b> | <i>Northern blot</i> do gene <i>MpTLP1</i> em micélios necrotróficos de <i>M. pernicios</i> crescido com extrato de cacau como fonte de carbono, induzido com glicose | 71 |
| <b>Figura 44:</b> | <i>Northern blot</i> do gene <i>MpTLP1</i> em micélios necrotróficos de <i>M. pernicios</i> em estágios jovem (N) e senescente(V)                                     | 71 |
| <b>Figura 45:</b> | Cultivo de bolachas de <i>M. pernicios</i>  | 73 |
| <b>Figura 46:</b> | Expressão diferencial do gene <i>MpTLP1</i> no ciclo de vida de <i>M. pernicios</i>   | 75 |
| <b>Figura 47:</b> | Expressão diferencial do gene <i>MpTLP</i> em micélios necrotróficos novo e senescente  | 76 |
| <b>Figura 48:</b> | Seqüência hipotética do promotor <i>MpTLP1</i>  | 78 |
| <b>Figura 49:</b> | Análise de <i>cis</i> -elementos na seqüência de 829 pb a montante do EST CP02-EC-001-001-E11-UE.F  | 79 |
| <b>Figura 50:</b> | Amplificação por PCR da seqüência do promotor hipotético de <i>MpTLP1</i>   | 79 |
| <b>Figura 51:</b> | Indução do gene LacZ através da seqüência promotora de <i>MpTLP</i>   | 80 |
| <b>Figura 52:</b> | Desenho esquemático comparativo de xilana e $\beta$ -glucana  | 90 |

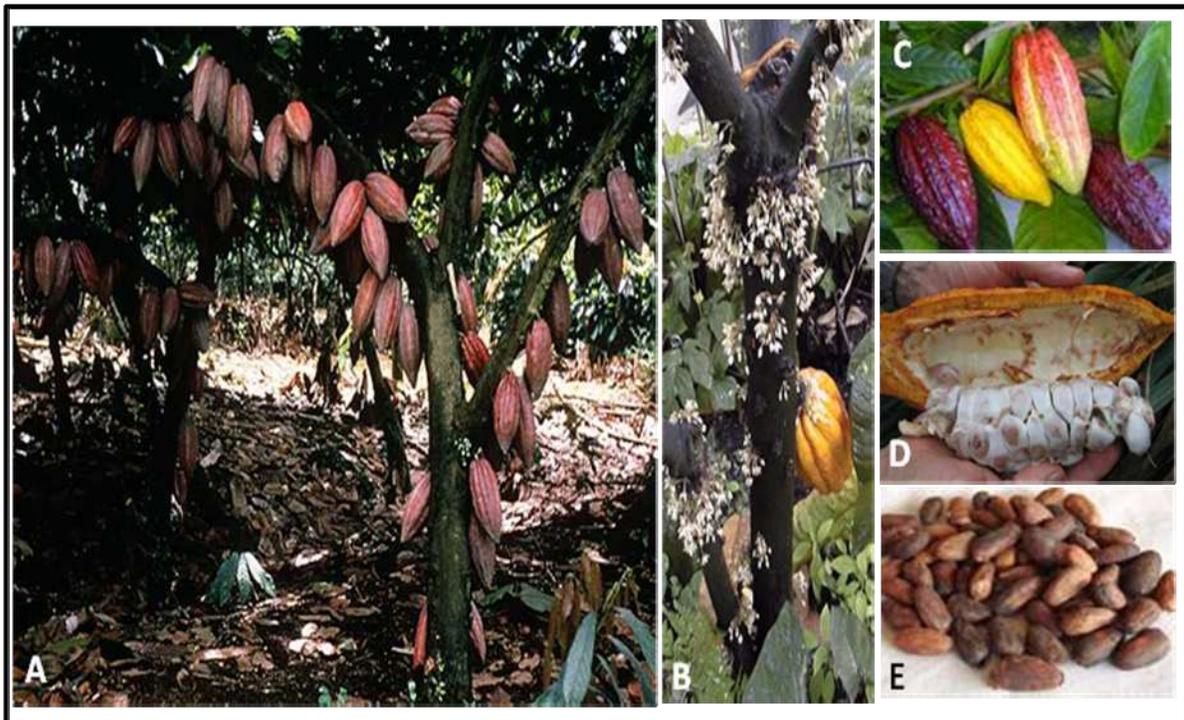
---

## INTRODUÇÃO

### 1.1 – O cacauero

O cacauero (*Theobroma cacao* L) é uma árvore perene de pequeno porte (4 a 8m de altura), pertencente à família Malvaceae, originária da região da bacia do Rio Amazonas e Orinoco (Purdy e Schmidt,1996) que também está presente na região dos Andes e em países da América do Sul e Central. Essa planta possui um caule liso e folhas grandes produzindo muitas flores pequenas que surgem em seu caule e ramos. Após serem polinizadas, as flores dão origem a um fruto grande e alongado, que carrega em seu interior cerca de 30 sementes envoltas por uma mucilagem doce (figura 1). As amêndoas são a principal matéria prima para a produção do chocolate e outros produtos, como a manteiga de cacau e o licor de cacau. Da polpa produzem-se sucos, cosméticos, bebidas finas, geléias e extrai-se a pectina.

O cacauero é uma planta diplóide que contém 20 cromossomos. Existem duas variedades de cacauero originais: a *Crioulo*, que está presente a oeste dos Andes e México, e *Forasteiro*, presente no Brasil, leste da cordilheira dos Andes e Guianas. Um híbrido dessas duas espécies originou a variedade conhecida como Trinitário (Motamayor *et al.*, 2002). Por ser uma cultura que necessita de solo fértil, umidade e de sombra oriunda de árvores mais altas, as lavouras de cacau são plantadas em meio a florestas nativas. As características de cultivo do cacauero fizeram com que ele se adaptasse bem na região sul da Bahia, transformando essa região na principal produtora brasileira, respondendo a 75% da produção nacional (Purdy e Schmidt,1996; Evans e Prior, 1987). Porém, essa cultura não está imune a doenças que prejudicam a sua produção. Dentre as principais doenças do cacauero destacam-se: (a) “podridão parda”, causada por oomicetos do gênero *Phytophthora sp*, (b) Monilíase, causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora roreri*, doença que ainda não atinge o Brasil, mas sim alguns países próximos, como Peru, Colômbia, leva à perda de 25% da produção total nesses países, (c) “mal do facão”, causado pelo fungo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta* e (d) “vassoura de bruxa”, causado pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, considerada a principal doença do cacauero.



**Figura 1: O cacaeiro e seu principal produto.** A- árvores de cacau com frutos, B- destaque para as flores no cacaeiro, C- frutos de cacau, D- fruto de cacau cortado longitudinalmente, E- Sementes (amêndoas) do cacau.

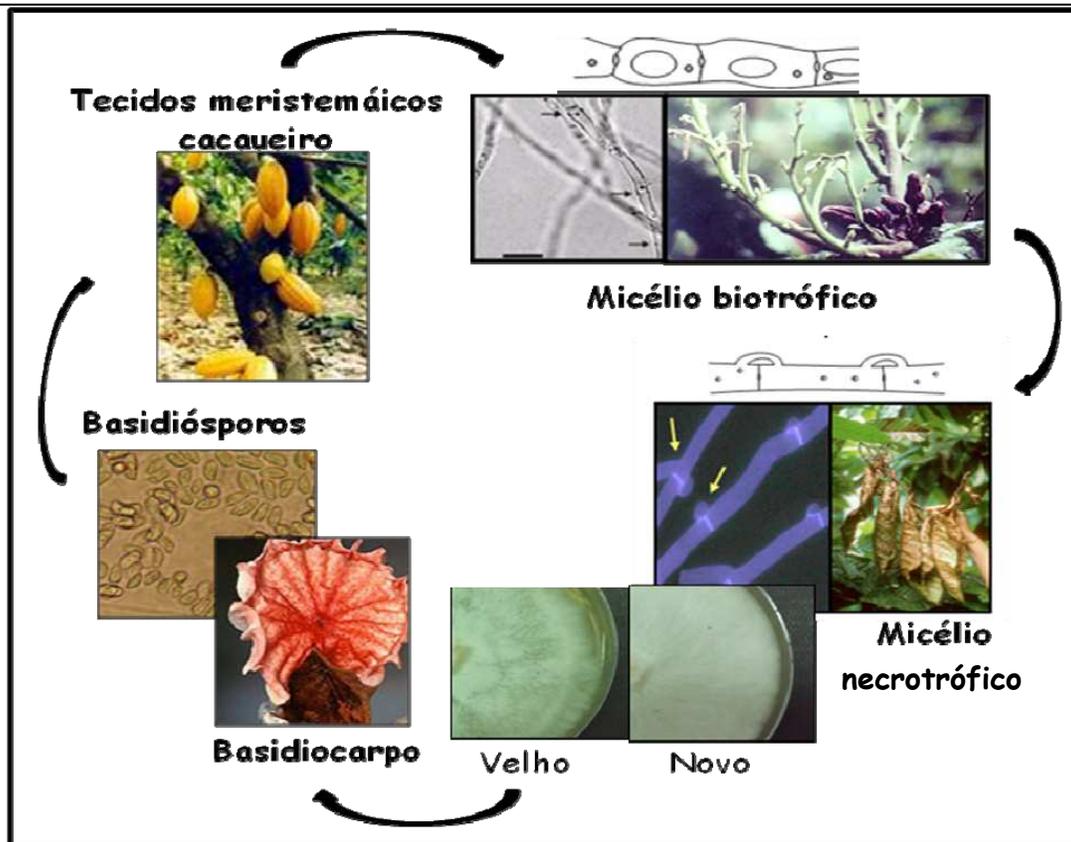
### 1.2- *Moniliophthora perniciosa* e a Vassoura de bruxa

*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Sing. é um fungo endêmico originário da região amazônica responsável pela principal doença do cacau, conhecida como vassoura de bruxa (*Witch's broom disease*, WBD). Este fungo foi descrito por Stahel em 1915 como *Marasmius pernicius*. Em 1942, o fungo foi reclassificado sendo transferido para o gênero *Crinipellis*, e renomeado para *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Sing. O fungo pertence à família Tricholomataceae, ordem Agaricales, divisão Basidiomycota, e apresenta diferentes biótipos: o biótipo C, que infecta principalmente *Theobroma* sp e *Herrania* sp; o biótipo S, que infecta plantas da família Solanaceae; o biótipo B, que infecta Bixaceae; e o biótipo L ou liana saprotrófico, que coloniza uma variedade de substratos. Em 2005, o biótipo C sofreu uma reclassificação devido a estudos morfológicos e moleculares, passando a ser incluído no gênero *Moniliophthora*, sendo renomeado como *Moniliophthora perniciosa* (Aime e Phillips-Mora, 2005). Desde o início do século passado, o fungo tornou-se a principal limitação à produção de cacau na América

do Sul, parte da América Central e do Caribe. No final da década de 1980 detectou-se a presença do fungo no Sul da Bahia, aonde encontrou condições favoráveis para seu desenvolvimento através da infecção do cacauzeiro. *M. pernicioso* foi responsável pela perda de 70% da produtividade na cacauicultura brasileira, fazendo com que o Brasil passasse de exportador para importador de amêndoas de cacau. Atualmente, o Brasil é o quinto produtor mundial, já tendo ocupado a segunda posição.

*M. pernicioso* possui um ciclo de vida hemibiotrófico (figura 2). Em um estágio o fungo é biotrófico (ou parasítico), com hifas monocarióticas, sem grampos de conexão, que se desenvolvem lentamente no apoplasto vegetal. O outro estágio é saprotrófico ou (necrotrófico), apresentando hifas dicarióticas com grampos de conexão, tendo desenvolvimento acelerado em tecidos necrosados ou mortos (Hedger *et al.*, 1987).

Seu ciclo infectivo se inicia quando esporos do fungo dispersos pela água ou ar encontram tecidos meristemáticos, almofadas florais ou frutos em desenvolvimento (Evans e Bastos, 1979). Ao atingirem a superfície da cutícula ou base de tricomas, os basidiósporos germinam, emitindo tubos germinativos que invadem os tecidos através dos estômatos ou de lesões na cutícula (Silva e Matsuoka, 1999). Os micélios biotróficos crescem intercelularmente no fluido apoplástico, um meio considerado pobre em nutrientes (Pirovani *et al.*, 2005). Esta colonização desencadeia alterações fenotípicas no hospedeiro que são os sintomas característicos da doença: clorose, crescimento hiperplásico e hipertrófico dos tecidos meristemáticos e perda da dominância apical que resulta em superbrotações e desenvolvimento anormal da planta. Esses ramos anômalos derivados dessa infecção são conhecidos como “vassouras verdes”. Tal aspecto está provavelmente associado a um desequilíbrio hormonal causado pelo patógeno na planta, mais especificamente a uma alteração da relação citocinina/auxina após a infecção. Quando a infecção se dá através dos pontos de inserção das flores ou inflorescências, ocorre a formação de frutos partenocárpicos que apresentam aspecto deformado (coloração negra e petrificação).



**Figura 2: Esquema representativo do ciclo de vida do fungo *Moniliophthora perniciosa*:** Os basidiomas produzem basidiósporos, que são transportados até os tecidos meristemáticos do cacaueteiro e ali germinam. Na primeira fase da doença, o micélio biotrófico (monocariótico) infecta os tecidos vivos do hospedeiro. Após 6 a 9 semanas o fungo passa para a fase necrotrófica, com formação do micélio dicariótico (com grampos de conexão). O fungo permanece no tecido necrosado do hospedeiro, onde ocorre a formação dos basidiomas. Detalhe para diferenças morfológicas entre micélio necrotrófico novo e velho em crescimento *in vitro*. O micélio novo tem crescimento com aspecto cotonoso, enquanto em placas de micélio velho podemos observar a formação de anéis de crescimento, além de uma posterior secreção de um pigmento escuro.

Após o início da necrose dos ramos infectados (denominados de vassouras secas), em torno de dois meses após a infecção, ocorre a mudança de fase de vida do fungo (de biotrófico para necrotrófico), quando se dá a dicarionização dos micélios. Por ser um fungo homotálico, essa transição ocorre sem a necessidade do cruzamento entre indivíduos. Depois da completa colonização nos tecidos mortos, o micélio necrotrófico dá origem aos basidiocarpos, que após períodos de seca e chuva, produzem basidiósporos, que ao serem levados pela água ou vento, reiniciam o ciclo de vida do fungo. A liberação dos basidiósporos acontece durante a noite, provavelmente pela sensibilidade dos esporos à luz ultravioleta. Somente

---

na fase necrotrófica do fungo, e em condições de alta umidade, os basidiósporos podem ser produzidos. Já que a proliferação do fungo depende de períodos alternados de seca e umidade, esse fungo se estabeleceu muito bem no estado da Bahia, que possui condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento de basidiósporos durante o ano todo.

Quando cultivado *in vitro*, o micélio necrotrófico de *M. pernicioso* apresenta duas fases distintas. A primeira, que chamamos de micélio novo, caracteriza-se pelo crescimento de hifas claras com aspecto homogêneo, sem formação de anéis de crescimento. A segunda fase chamada de micélio senescente, ou velho, tem como características o crescimento mais lento quando comparado ao estado anterior, apresentando a formação de anéis de crescimento, além da secreção de um pigmento escuro ao meio de cultura.

### **1.3- Impacto socioeconômico da doença e o projeto Genoma Vassoura de Bruxa:**

Nos últimos anos, a produção mundial de cacau vem aumentando, e esse aumento representou um crescimento da produção em 38,86% entre 1993/94 e 2003/04. O país que mais contribuiu para esse crescimento foi a Costa do Marfim que responde por 56% da produção de cacau africana e 46% da produção mundial. Entretanto, o perfil da produção brasileira não acompanha esse crescimento (figura 3).

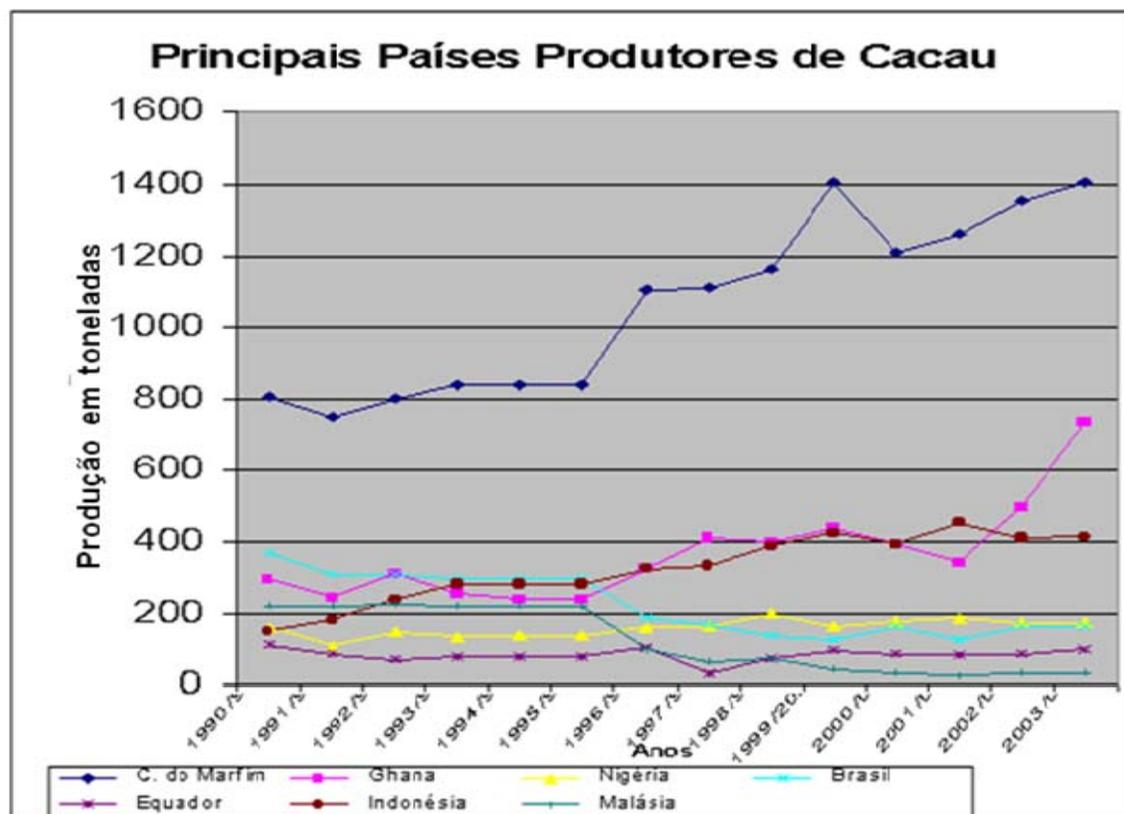
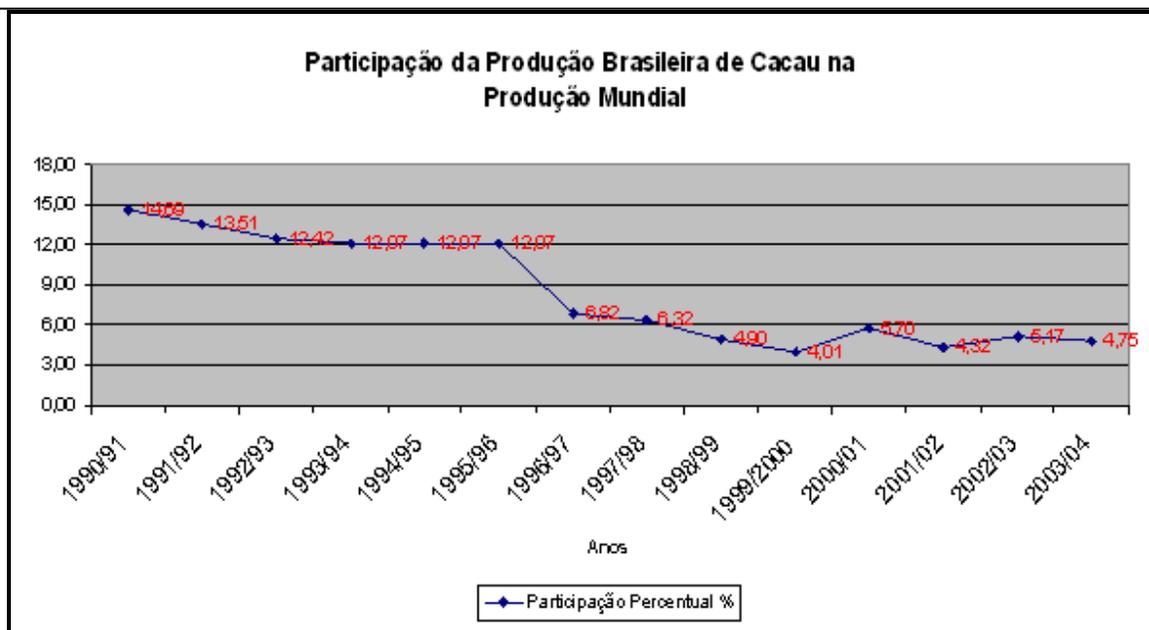


Figura 3 : Principais países produtores de cacau.(CEPLAC)

Como mencionado anteriormente, a vassoura de bruxa trouxe grandes problemas para os países produtores de cacau da América do Sul e das ilhas do Caribe (Evans, 1980; Purdy e Schmidt, 1996). A doença é originária da região amazônica e foi detectada no sul da Bahia em 1989 (Pereira *et al.*, 1990). A partir de então, o Brasil teve sua produção anual de cacau drasticamente reduzida e sua participação no mercado mundial caiu drasticamente em poucos anos. Em 1993/94 sua produção estava em 300 mil toneladas e a sua participação na produção mundial estava em 12,07% (figura 4). A produção atingiu seu menor índice em 1999/2000 com 123,5 mil toneladas participando com 4,01% da produção mundial.



**Figura 4.** Participação da produção brasileira de cacau na produção mundial (CEPLAC)

Diante desta queda produtiva o Brasil passou de exportador a importador de cacau, o que refletiu também nos custos aumentados da produção nacional de chocolate. Além disso, com a produção comprometida, milhares de empregos diretos e indiretos deixaram de existir, causando sérios danos sociais na região sul da Bahia, afetando cerca de três milhões de pessoas. Muitos fazendeiros transformaram suas roças de cacau em pastos, o que contribuiu para a devastação da mata de cobertura dos cacauzeiros.

Os problemas sócio-econômicos e ecológicos causados pela vassoura de bruxa levaram à busca de estratégias de combate e controle da doença, destacando-se a utilização de técnicas de manejo, como a poda fitossanitária (Lima *et al.*, 1991), o uso de fungicidas (Bastos, 1989), o controle biológico (Bastos, 1992) e o desenvolvimento de variedades de cacau resistentes (Pires, 1995). Porém, nenhuma técnica conhecida até então se mostrou eficaz ao combate da doença.

Os grandes produtores de cacau mundial vêm incentivando o desenvolvimento de métodos de manejo economicamente viáveis e ecologicamente corretos, como a adoção de recursos eficientes no controle de

---

pragas e doenças e a identificação de variedades resistentes. Dentre as organizações envolvidas estão: *American Cocoa Research Institute*, *International Office of Cocoa and Chocolate* - EUA, *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza* (CATIE) - Costa Rica, *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique* (CIRAD) - França, *Institut Scientifique de Recherche Agronomique* (INRA) - França e *Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira* (CEPLAC) - Brasil. Além disso, as grandes indústrias produtoras de chocolate possuem grupos de pesquisa que buscam uma melhor compreensão sobre a fisiologia do cacaueiro e soluções para o melhoramento da qualidade das sementes. Dentre estas indústrias destacamos as multinacionais Mars & Mars (EUA), Kraft Foods (EUA), Nestlé (Suíça), Hershey's (EUA) e a indústria nacional Garoto (Brasil), que foi recentemente adquirida pela Nestlé.

Apesar dos grandes esforços no combate à vassoura de bruxa, havia pouca informação sobre os mecanismos dessa doença, até que no ano de 2000 foi lançado o Projeto Genoma Vassoura de Bruxa ([www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura](http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura)), sob coordenação do Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. A partir da aprovação desse projeto, o biótipo infectivo do cacaueiro (biótipo C, hoje *Moniliophthora perniciosa*) foi seqüenciado. O projeto vem fornecendo dados importantes sobre o tamanho do genoma (Rincones *et al.*, 2003), sobre a diversidade genética do fungo (Rincones *et al.*, 2006), sobre os mecanismos de ação do fungo durante a doença (Garcia *et al.*, 2007; Ceita *et al.*, 2007) e da bioquímica do cacaueiro durante a infecção (Scarpari *et al.*, 2005). Estudos bioquímicos demonstraram que a vassoura verde apresenta uma grande quantidade de glicerol, o qual pode estar associado aos estágios iniciais do desenvolvimento da doença, já que esta fonte de carbono é praticamente ausente na vassoura seca (Scarpari *et al.*, 2005). Meinhardt *et al.* (2006) desenvolveram um método de cultivo do fungo em seu estágio biotrófico, o que permitiu ao laboratório analisar a expressão de diversos genes durante essa etapa de desenvolvimento do fungo. Além disso, estudos demonstraram a produção de oxalato de cálcio (Rio *et al.*, 2008) e de proteínas indutoras de necrose (García *et al.*, 2007; Zaparoli *et al.*, 2008) pelo fungo. Recentemente, dois artigos forneceram

---

dados importantes sobre as diferenças de expressão gênica entre os micélios biotróficos e necrotróficos de *M. pernicioso* (Rincones *et al.*, 2008) e sobre a constituição do genoma deste patógeno (Mondego *et al.*, 2008). A partir do uso dessas ferramentas e do conhecimento acumulado na execução do referido projeto, poderemos então criar estratégias de combate efetivas seja através de síntese de drogas inibitórias de proteínas patogênicas ou então pela manipulação genética do patógeno e da planta.

Recentemente, o agrônomo Edvaldo Sampaio desenvolveu um conjunto de técnicas de manejo que reduziram consideravelmente a incidência da vassoura-de-bruxa e aumentaram a produção de cacau nos locais em que o método foi implementado. Dentre as técnicas desenvolvidas incluem-se o método denominado por Edvaldo de roletamento (corte da casca do caule), a adubação com uréia e a poda antecipada do cacauzeiro (realizada nos meses de outubro a dezembro). Este procedimento leva à dessincronização do ciclo de vida do fungo em relação ao ciclo da planta, ou seja, na época de maior esporulação do fungo não há flores para infecção, pois estas já se desenvolveram em frutos. Outra importante técnica é a poda fitossanitária antecipada que impede a exposição dos tecidos meristemáticos (ramos em crescimento) ao período de intensa esporulação do fungo no campo. Convencionalmente, a poda é realizada na Bahia no período de janeiro a março, o que levava à produção de ramos em crescimento (tecido meristemático) justamente na principal época de produção de esporos de *M. pernicioso* (2º semestre). A adubação com uréia, além de fortalecer a planta, provavelmente induz a mudança precipitada do fungo para a fase saprotrofica impedindo que o patógeno complete seu ciclo de vida adequadamente e prejudicando assim o desenvolvimento da doença. Essas técnicas estão trazendo um efeito positivo na produção de cacau. Entretanto, como foi verificado que o fungo possui uma alta plasticidade transcricional (Rincones *et al.*, 2008), devemos continuar nossas buscas para um controle eficiente da doença.

---

#### 1.4- Mecanismos de interação planta-patógeno e *M. pernicioso*

A interação planta-patógeno *T. cacao*- *M. pernicioso* vem sendo estudada para o esclarecimento da ação de proteínas efetoras de patogenicidade do fungo, assim como para a caracterização dos mecanismos de defesa da planta. Ceita e colaboradores (2007) relataram um aumento excessivo na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas de cacau suscetíveis inoculadas com esporos de *M. pernicioso*, produção esta que pode ser causada pela ativação de uma proteína da família das germinas (Oxalato Oxidase). Os autores também sugerem que este aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> excedeu a concentração necessária para a indução da resposta de hipersensibilidade da planta caracterizada pela ocorrência de uma morte celular localizada, o que pode ter cooperado para o aumento da disponibilidade de nutrientes no meio, induzindo a passagem do fungo para a fase necrotrófica.

Rincones *et al.* (2008) descrevem a expressão diferencial de genes relacionados à patogenicidade durante o desenvolvimento de *M. pernicioso*, verificando uma maior expressão de proteinases e lipases no estágio biotrófico do fungo. Mondego *et al.* (2008) verificaram a presença de genes que codificam proteínas secretadas ricas em cisteínas no genoma de *M. pernicioso*. Curiosamente, proteínas com essas características vêm sendo descritas como proteínas do tipo avr (avirulência) (Van den Ackerveken *et al.*, 1993). Proteínas Avr podem sinalizar para a defesa da planta, caso interajam com proteínas produzidas por genes de resistência (R) do hospedeiro (Pinheiro *et al.*, 1999). Essa interação é caracterizada como incompatível, indicando que a planta é capaz de resistir ao ataque do fungo. Por outro lado, se o patógeno não apresentar o gene *avr*, ou se a planta não possuir o gene *R*, ocorre uma interação compatível que significa que a planta está susceptível ao ataque do patógeno (Knogge, 1996; Nimchuck *et al.*, 2003). Esse mecanismo conhecido como interação gene-a-gene, vem sendo suplantado pela “teoria do guarda”. Nesse caso, as proteínas sintetizadas por genes *avr* interagem com “proteínas-guarda”, que a partir dessa interação são reconhecidas pelas proteínas R, que então induzem a resposta de defesa. Assim sendo, a interação entre proteínas R e *avr* seria indireta (Dangl e Jones, 2001; Marathe e Dinesh-Kumar, 2003).

---

Durante uma interação incompatível, ocorre morte celular programada nas células do hospedeiro que é desencadeada pela resposta hipersensitiva (HR). Essa resposta gera lesões necróticas próximas ao sítio de infecção que impedem que o patógeno se prolifere. A ativação da resposta da planta para o combate ao patógeno depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do organismo invasor através de mecanismos de percepção de transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico (NO). A partir dessa cadeia de transdução de sinal ocorrem mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas e que tem como consequência a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com subsequente expressão de genes de defesa da planta. Após a infecção pelos patógenos, ocorre a sinalização de defesa sistêmica conhecida como SAR (*Systemic acquired resistance*) que confere uma resistência de longa duração e em alguns casos de amplo espectro, sendo efetiva contra doenças causadas por vírus, bactérias e fungos (Ryals *et al.*, 1996). SAR é uma das vias de defesa da planta que pode ter sua origem sinalizada pela HR, que cria várias rotas de defesa da planta, pois induz a uma rede de sinalizações celulares e à ativação de uma cascata de sinalização dependente de SA. O aumento do ácido salicílico pode ser notado de 4 a 6 horas após o inóculo de patógeno na planta, sendo detectado no floema após 8 horas de inoculação (Agrios, 1997).

Algumas proteínas Avr são efetoras de patogenicidade podendo suprimir a ação de proteínas de defesa vegetal. A fim de que o patógeno obtenha sucesso na colonização do hospedeiro, ele precisa quebrar a barreira física para a colonização, e produzir proteínas e fitotoxinas que inativam ou bloqueiam a defesa da planta. Alguns exemplos são AVR2 e AVR4 de *Cladosporium fulvum* e AvrBs3 de *Xanthomonas* sp e coronatina de *Pseudomonas syringae*. AVR4 é produzido pelo patógeno *C.fulvum* no momento que ocorre sua interação com a planta. Essa molécula se liga à quitina da parede celular do fungo protegendo-a contra ação de quitinases produzidas pelo hospedeiro, garantindo assim sua integridade celular e aumentando sua virulência contra o hospedeiro (van Esse *et al.*, 2007). Esse

mesmo organismo produz AVR2, que inibe PLCPs (papaína-like cisteína proteases), especificamente PIP1 e RCR3, que participam do sistema de defesa do tomateiro regulado por ácido salicílico (SA) (Shabab *et al.*, 2008). Ainda em interações de tomateiro, *Pseudomonas syringae* produz uma fitotoxina chamada coronatina (COR), que é um análogo estrutural e funcional de jasmonato, suprimindo a defesa mediada por ácido salicílico (Uppalapati *et al.*, 2007). E ainda, AvrBs3, uma família de genes efetores de *Xanthomonas* spp, que são capazes de suprimir HR e a expressão de proteínas de defesa (Fujikawa *et al.*, 2006).

As cascatas de sinalização via HR e SAR ativam a expressão de várias proteínas PRs (*pathogenicity related proteins*) que agem no combate contra os patógenos. As PRs são classificadas em 17 famílias, as quais podemos destacar a PR-1 (função desconhecida), PR-2 ( $\beta$ -glucanases), PR-3 (quitinases classe I) e PR5 (Taumatina) (Stinzi *et al.*, 1993). Surpreendentemente, análise das seqüências de ESTs de *M. pernicioso* demonstraram que o fungo expressa um gene que codifica uma proteína similar a proteínas da família PR-5, as proteínas do tipo taumatina.

### 1.5 – Proteínas do tipo taumatina

A taumatina é uma proteína monomérica de aproximadamente 22 kDa que contém oito pontes dissulfeto (Grenier *et al.*, 1999). Essa proteína foi isolada de *Thaumatococcus danielli*, uma planta nativa da África. Atualmente, a taumatina é utilizada como adoçante industrializado e realçador de sabores, em alimentos e medicamentos no Japão, Inglaterra, Estados Unidos (Masuda *et al.*, 2004; Hagiwara *et al.*, 2005). No Brasil é utilizada na indústria animal como palatilizante, para estimular o consumo do alimento (ração), principalmente para suínos. No dia 25 de fevereiro de 2008, foi publicado no Diário Oficial da União, a autorização da Anvisa para o uso de mais três edulcorantes em alimentos no Brasil, entre eles, a taumatina. A empresa NutraMax já possui um produto apresentado ao mercado brasileiro, o edulcorante natural de taumatina DietMax, e em sua propaganda garante que se trata de um produto 100% natural (FiSA – Food ingredients South America, 2008).

---

As proteínas vegetais similares à taumatina (TLPs) pertencem à classe de proteínas de defesa de plantas denominadas PR-5. Entretanto, em sua maioria as TLPs não apresentam sabor adocicado (Benko-Iseppon *et al.*, 2003). Segundo Kaneko e Kitabatake (2001), a característica doce apresentada pela taumatina tem uma forte relação com seus resíduos de lisina. Neste trabalho, foram efetuadas modificações gradativas em resíduos de lisina por fosfopirodoxilação. Essas proteínas modificadas foram submetidas a análises sensoriais, sendo verificada a perda do sabor doce. Após o reestabelecimento dos resíduos de lisina pela desfosforilação das fosfopirodoxilações, o sabor doce foi restabelecido. Foi sugerido também que a estrutura secundária da taumatina não está relacionada com o sabor doce, já que alterações em grupos carboxílicos da proteína não diminuiriam seu sabor doce.

As TLPs podem ser induzidas por vários fatores de estresse, como infecção por fungos (Pritsch *et al.*, 2000), ferimentos (Ruperti *et al.*, 2002) e estresse por seca (Jung *et al.*, 2005). Recentemente, Colditz *et al.* (2002) relataram em seus trabalhos que o silenciamento da PR-10 causou o aumento da expressão de outras PRs, incluindo PR-5, aumentando a tolerância de *Medicago truncatula* a infecção do oomiceto *Aphanomyces euteiches*.

Recentemente, TLPs foram encontradas em outros organismos que não plantas. A expressão de TLPs foi verificada em fungos (Sakamoto *et al.*, 2006; Wang e Ng, 2004) e em animais (Brandazza *et al.*, 2004; Wang e Duman, 2006). Alguns estudos demonstram que TLPs exibem atividade anticongelante, como as AFPs (*antifreeze proteins*). Isso foi demonstrado através do isolamento de TLPs de centeio durante aclimação ao frio (Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999; Yu e Griffith, 1999). Outros experimentos demonstraram que uma TLP da larva do besouro *Dendroides canadensis* agiria como realçadora da atividade de AFPs, interagindo com estas, formando complexos maiores que as AFPs sozinhas (Wang e Duman, 2006)

Estudos demonstram que as TLPs possuem atividade antifúngica (Hu e Reddy, 1997, Ye *et al.*, 1999, Lam e Ng, 2001). Alguns relatos sugerem que esta atividade pode estar ligada a sua capacidade de hidrolisar  $\beta$  1-6 glucanas (Grenier

*et al.*, 1999). Porém, a atividade antifúngica pode não estar ligada à atividade hidrolítica, já que nem todas as TLPs capazes de inibir o desenvolvimento fúngico possuem a capacidade de hidrolisar glucanas (Van damme *et al.*, 2002). Curiosamente, Narasimhan *et al.* (2005) verificaram que a proteína TLP de tabaco conhecida como osmotina se liga a receptores da família GPCR (G-Protein Coupled Receptors), induzindo morte celular programada em uma cepa de levedura. Recentemente, foi encontrada uma TLP que apresenta atividade inibidora de xilanase (*Thaumatococcus-like xylanase inhibitor* - TLXI) (Fierens *et al.*, 2007). Os autores atribuem essa nova atividade de uma TLP a um resíduo de histidina presente na posição 22 da proteína, já que ao sofrer mutação nesse resíduo de histidina, a proteína resultante não foi capaz de formar complexo com GH11- xilanase, o que ocorre normalmente na proteína não mutada (Rombouts *et al.*, 2008). Além disso, foi verificado que TLXI é um inibidor não competitivo (não se liga ao sítio ativo da enzima inibida) e que é capaz de se ligar ao substrato da reação (Fierens *et al.*, 2008).

Xilanases são glicosidases (O-glycoside hydrolases) que catalizam a hidrólise das ligações 1,4-b-D-xilosídicas em xilanas. Xilanases vegetais estão envolvidas na produção de xilose, uma fonte de carbono essencial para o metabolismo celular e na infecção de patógenos, sendo produzidas por bactérias, fungos e insetos (Collins *et al.*, 2005). Xilanases vegetais foram relacionadas ao amadurecimento de frutos e na germinação de sementes (Manenoi e Paull, 2007; Caspers *et al.*, 2001). Além disso, *A. thaliana* possui xilanases expressas no sistema vascular (Suzuki *et al.*, 2002). Fitopatógenos também produzem xilanases que são capazes de degradar a parede celular vegetal agindo como enzimas que ajudam na sua infecção (Brutus *et al.*, 2005).

Outras enzimas hidrolíticas produzidas pelos vegetais são as  $\beta$  1-3 glucanases (PR-2). Essas enzimas clivam a parede celular fúngica inibindo o crescimento do patógeno. Além disso, essa clivagem gera açúcares livres (beta-glucanas) que são sinalizadores de defesa vegetal (York *et al.*, 2003).

A atividade  $\beta$ -Glucanase exibida por algumas TLPs foi verificada em alguns estágios de desenvolvimento do corpo de frutificação do fungo shitake *Lentinula*

---

*edodes* (Sakamoto *et al.*; 2006). Observou-se que em primórdios jovens do corpo de frutificação ocorre um aumento de atividade  $\beta$ -Glucanase. Porém, em tecidos maduros essa atividade é diminuída. Sakamoto *et al.* (2006) ainda citaram que essa atividade pode estar relacionada à lise da parede das células do fungo para que ocorra a formação dos primórdios de basidiocarpo e ainda que essa atividade pode ser derivada da ação de uma TLP.

Em *Aspergillus nidulans*, o gene *CetA*, similar à taumatina teve sua expressão reprimida em presença de glicose no meio, repressão essa dependente da presença de proteína kinase A (Greenstein *et al.*, 2006). Esse estudo ainda cita que o gene *CetA* não está presente em conídios, mas é altamente expresso nas primeiras 6 horas de germinação, e que sua deleção acarreta em diminuição de germinação, crescimento lento e anormal das hifas e defeitos na parede celular.

A estrutura secundária de TLP é muito rica em folhas  $\beta$  pregueadas (cerca de 13), apresentando cerca de duas a quatro alfa hélices ao final da proteína. Estudos cristalográficos da estrutura terciária de TLPs (Ghosh e Chakrabarti, 2008, Leone *et al.*, 2006 ) indicam que a molécula possui 3 domínios distintos, e que o *acidic cleft* (região responsável pela atividade enzimática das proteínas) está situado entre os domínios 1 e 2 da proteína.

A produção de proteínas TLPs recombinantes tem sido obtida através da superexpressão em *E. coli*. Entretanto, na maioria das vezes TLPs são armazenadas em corpos de inclusão, caracterizando sua insolubilidade, provavelmente derivada da incapacidade de formação de pontes dissulfeto no citoplasma de *E. coli*. Porém, é possível que essa proteína mal estruturada seja renaturada utilizando um sistema de glutathione oxidada (Daniell *et al.*, 2002) e por renaturação por uréia/guanidina combinada a glutathione (Hu e Reddy, 1997). Outra técnica utilizando tampão redox de glutathione oxidada/reduzida foi utilizada para a renaturação de uma osmotina de *Solanum nigrum* (Campos *et al.*, 2008).

Outro método de superexpressão de proteínas utiliza a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Sendo um modelo eucariótico de expressão, esse microorganismo é capaz de formar pontes dissulfeto no citoplasma, assim como propiciar outras modificações pós-traducionais, como glicosilação. Masuda *et al.*

---

(2004) produziram grande quantidade de taumatina solúvel e ativa utilizando um plasmídeo de expressão em *P. pastoris* contendo um peptídeo sinal para o meio extracelular.

## 2- OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS:

Na biblioteca de EST construída a partir de micélio biotrófico de *M. pernicioso* crescido em meio contendo extrato de cacau, foi encontrada uma seqüência com alta similaridade a taumatinas. Tendo em vista que essas proteínas podem apresentar atividade antifúngica, podem participar da interação planta-patógeno e que o fungo possivelmente enfrenta competidores durante sua interação com cacau, decidimos então caracterizar o gene MpTLP1. Traçamos como objetivos conhecer a expressão desse gene nas diferentes fases de vida do fungo e na presença de compostos relacionados com a interação planta-patógeno, a fim de inferirmos se TLPs expressas por um fitopatógeno também estariam sendo expressas durante uma interação fitopatológica. Para descobrir de que forma esta participação ocorre, traçamos metas para obtenção da proteína MpTLP1 em sua forma nativa a fim de executarmos testes de atividade proteica, de acordo com o que foi descrito na literatura.

Assim sendo, esse trabalho teve como objetivos principais:

- 1) Clonagem e superexpressão da proteína similar a taumatina (*Thaumatococcus*-like protein) de *Moniliophthora pernicioso* (MpTLP1) com o intuito de verificarmos sua possível atividade antifúngica e gluconolítica;
- 2) Análise da expressão gênica de *MpTLP1* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *M. pernicioso*;
- 3) Clonagem e análise do promotor do gene *MpTLP1*, visando ao entendimento da regulação da expressão gênica do gene *MpTLP1* sob diferentes condições de crescimento.

---

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1- Isolados de *M. pernicioso*

Foram utilizados dois isolados de *M. pernicioso* coletados em Ilhéus, BA: FA553 (referente ao genoma) e BP10, ambos apresentando patogenicidade ao cacauzeiro.

#### 3.2- Análise do gene *MpTLP1*

##### 3.2.1- Seqüenciamento de *MpTLP1*

As bibliotecas de ESTs existentes no Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) foram construídas a partir de clonagens no plasmídeo pDNRLib (Clontech, EUA). Para o seqüenciamento do gene *MpTLP1* foram utilizados os oligonucleotídeos M13F e M13R alinhados no plasmídeo pDNRLib. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador AbiPrism 377 (Perkin Elmer-Biosystems) segundo protocolo padrão para seqüenciamento pelo método dideoxi do Laboratório de Genômica e Expressão (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/bib>).

##### 3.2.2- Southern blot:

O DNA genômico do fungo foi extraído através do método CTAB com modificações (Sambrook *et al.*, 2001). Os micélios foram macerados em nitrogênio líquido, e em seguida foi adicionado ao macerado o tampão CTAB aquecido previamente a 65°C. Em seguida, adicionou-se β-mercaptoetanol (2% do volume final) e o volume total foi dividido em microtubos de 1,5 ml. Foram adicionados mais 500µl de tampão CTAB nas amostras, que foram então incubadas a 65°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 300µl de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) e 300ul de fenol equilibrado, agitando vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi recuperada e foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. Após agitação, os tubos foram incubados em banho de gelo por 15 minutos e submetidos à nova centrifugação (1.200 rpm por 2 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi ressuspenso em 100µl de água MiliQ estéril.

Após a extração, o DNA genômico foi submetido a digestões com enzimas de restrição de DNA (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* e *BamHI*) seguindo orientações dos fabricantes quanto ao tampão apropriado para cada enzima. Os tubos contendo DNA genômico, enzimas e tampão foram incubados a 37°C por 16 horas. As digestões foram aplicadas em gel de agarose 1%, TAE 1X, e submetido à eletroforese em voltagem constante. Em seguida, o gel foi tratado em agitação moderada nas seguintes condições: 15 min em solução de depurinação, 1 hora em solução de desnaturação e 1 hora em solução de neutralização. Posteriormente, o gel foi colocado em um aparato de transferência contendo SSC 10X. Após 16 h, o DNA foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond N+, GE Healthcare, EUA) e fixado a esta através de incubação a 80°C.

A pré-hibridação, hibridação e lavagem das membranas contendo o DNA digerido foram feitas segundo as instruções do fabricante. A membrana foi incubada a 65°C durante 16h para pré-hibridação em tampão de hibridação. A sonda específica para o gene *MpTLP1* foi preparada a partir de um fragmento de 700 pb derivado de digestão de DNA plasmidial extraído do clone de EST CP02-EC-001-001-E11-UE. Este produto foi marcado radioativamente com [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP (10mCi/ml, GE Healthcare, EUA) seguindo a técnica de *random primers* (Feinberg e Volgenstein, 1983).

Após a marcação radioativa, a sonda foi purificada em coluna *Microspin* HS300 (GE Healthcare, EUA) para retirada dos nucleotídeos não incorporados. A sonda marcada foi então desnaturada (95°C por 5 min) e adicionada à solução de pré-hibridação. A hibridação permaneceu a 65°C por 16 horas sob rotação constante em forno de hibridação. Em seguida, a membrana foi lavada em alta estringência (2X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos temperatura ambiente; 0,5X SSC, por 15 minutos, temperatura ambiente e 0,1X SSC, 0,1% SDS, por 15 minutos a 65°), selada e exposta a uma auto-radiografia em filme IBF–Medix (IBF) durante 5 dias a -70°C. O mesmo protocolo foi utilizado com uma membrana de Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), cedida pela pesquisadora Johana Rincones.

### **3.3- Alinhamentos de seqüências e Filogenia de *MpTLPs***

Os alinhamentos foram executados utilizando o programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw)) e editados manualmente através do programa GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). O dendograma das 9 TLPs de *M. pernicioso* foi feito pelo método de *Neighbor joining*. As distâncias entre seqüências foram calculadas pelo modelo de distância p. Os números nos ramos indicam as porcentagens do teste de confiança de *Bootstrap* (5000 réplicas). Para a filogenia de 41 TLPs descritas em plantas, nematódeos, artrópodes, ascomicetos e basidiomicetos, incluindo *MpTLPs*, foram utilizados os mesmos parâmetros com exceção do número de réplicas de *Bootstrap* (10000).

### **3.4- Clonagem do gene *MpTLP1***

#### **3.4.1- Organismos hospedeiros**

As células competentes de *E. coli* utilizadas nas subclonagens eram das cepas DH10B e GM2163. As cepas de *E. coli* utilizadas para expressão da proteína recombinante foram BL21-trxB(DE3), BL21-pRIL, BL21-C41 e BL21-C43. As linhagens de *Pichia pastoris* utilizadas foram KM71 e GS115.

#### **3.4.2- Plasmídeos e oligonucleotídeos**

Para subclonagem dos fragmentos amplificados por PCR foi utilizado o plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, EUA). Para a superexpressão de proteínas recombinantes em bactéria foram usados os plasmídeos pET28a, pET29a (Novagen, EUA), pMal-p2X, (New England Biolabs, EUA), pSW202 (cedido pelo Dr. Winfried Wels, Frankfurt University, Alemanha). Para expressão em *P. pastoris* foi utilizado o plasmídeo pPIC9K (Invitrogen, EUA). Para os experimentos de análise do promotor de *MpTLP* foi utilizado o plasmídeo YEP358 (Myers *et al.*, 1996).

Oligonucleotídeos foram desenhados conforme a estratégia de clonagem em vetor de expressão. As seqüências em negrito correspondem ao sítio de restrição das enzimas presentes em cada oligonucleotídeo.

pET28a: **NdeI\_D\_Thau: 5'CATATGGCTCGTACCTTCACGGTCT3'**

**HindIII\_R\_Thau: 5'AAGCTTTCAGGGACAGAATGTCAAAGTAT 3'**

pSW202: **HindIII\_D\_Thau: 5'AAGCTTGCTCGTACCTTCACGGTCT 3'**

**XbaI\_R\_Thau: 5'TCTAGATCAGGGACAGAATGTCAAAGTAT 3'**

pMalP2X: **EcoRI\_D\_Thau: 5'GAATTCGCTCGTACCTTCACGGTCT 3'**

**HindIII\_R\_Thau: 5'AAGCTTTCAGGGACAGAATGTCAAAGTAT 3'**

pPIC9K: **EcoRI\_D\_Thau: 5'GAATTCGCTCGTACCTTCACGGTCT 3'**

**AvrII\_R\_Thau: 5'CCTAGGTCAGGGACAGAATGTCAAAGTAT 3'**

O gene *MpTLP1* foi amplificado utilizando os pares de oligonucleotídeos construídos com sítios de enzimas de restrição para as estratégias de expressão de proteína, utilizando como molde a seqüência de EST CP02-EC-001-001-E11-UE. Os fragmentos obtidos por PCR foram clonados em pGEM-T Easy e transformados em *E. coli* DH10b eletrocompetentes através da técnica de eletroporação. Para a construção voltada para a expressão no plasmídeo pSW202, o plasmídeo pGEM-T Easy ligado a seqüência da proteína foi transformado em *E.coli* GM2163 (Promega, EUA), adicionando 10µl de produto de PCR e 80µl de tampão a 100µl de bactéria quimiocompetente, incubando-a em banho de gelo durante 30 minutos. Em seguida, o tubo contendo as células competentes juntamente com o produto de PCR foi incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Logo após, foi adicionado 1ml de meio LB ao tubo que em seguida foi incubado a 37°C durante uma hora.

Os transformantes foram selecionados em meio de cultura seletivos, contendo o antibiótico ampicilina (100µg/ml) e X-gal (30 µg/ml) (técnica de α-complementação). Esses clones foram crescidos em meio de cultura LB contendo ampicilina (100µg/ml) e em seguida submetidos à extração de DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1996).

#### **3.4.4 - Digestão de *MpTLP* e clonagem em vetores de expressão**

Os plasmídeos obtidos foram digeridos com as enzimas de restrições específicas para cada estratégia de clonagem: *EcoRI* + *HindIII* (para pMALp2X); *HindIII* + *XbaI* (para pSW202), *NdeI* + *HindIII* (para pET28a) e *EcoRI* + *AvrII* (para pPIC9K). As digestões foram aplicadas em gel de agarose 0,8% em TAE 1X e os fragmentos referentes à seqüência do gene *MpTLP1* foram purificadas do gel através do *Kit* PureLink (Invitrogen, EUA), e utilizadas para ligação aos plasmídeos de expressão de proteína. Após a ligação, os plasmídeos foram novamente transformados em *E.coli* DH10B e os transformantes foram selecionados através de plaqueamento em meio de cultura LB contendo antibiótico (canamicina 25µg/ml para construções em pET28a, e ampicilina 100 µg/ml para as demais construções) e posteriormente através da técnica de PCR. Confirmados os clones, uma nova purificação de DNA plasmidial por lise alcalina foi realizada, e assim obtivemos o gene ligado nos plasmídeos de expressão.

### **3.5- Superexpressão da proteína *MpTLP1***

#### **3.5.1- Transformação**

As construções pMAL-p2X-*MpTLP1* e psw202-*MpTLP1* foram introduzidas nas linhagens de *E.coli* e BL21-pRIL através de eletroporação (Sambrook *et al*, 1996). A construção pET28a-*MpTLP1* foi inserida em *E.coli* BL21-TRX-B através de eletroporação e em BL21-C41 e BL21-C43 através do método de transformação por choque térmico (Sambrook *et al*, 1996). Os transformantes foram selecionados através de plaqueamento em meio LB seletivo (contendo antibiótico cuja construção apresenta resistência) e confirmados através de PCR.

#### **3.5.2- Teste de indução da proteína recombinante em pequena escala:**

Para a construção em plasmídeo da família pMAL (New England Biolabs, EUA) a expressão em pequena escala foi feita seguindo orientações do fabricante. Utilizamos um volume de 50ml de meio LB+glicose para inocular 0,8ml de um pré inóculo crescido durante a noite contendo o plasmídeo de fusão, e também o plasmídeo vazio (utilizado como controle de indução). A cultura foi incubada em

temperatura de 37°C a 250 rpm até atingir  $A_{600} = 0,7$ . Foi retirado 1 ml dessa cultura (amostra sem indução) e adicionado IPTG (concentração final 0,3 mM) e mantidas nas mesmas condições de temperatura e rotação. Dessa cultura, foram retiradas amostras após 1, 2 e 3 horas de indução. As células colhidas da indução foram precipitadas por centrifugação, ressuspensas em tampão de lise, desnaturadas a 95°C por 5 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% para verificar a presença da proteína recombinante. O marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, EUA) foi usado como referência. Com o volume restante dessa indução, seguimos com uma lise celular em pequena escala, precipitando as células por centrifugação e ressuspendendo em tampão de lise gelado e mantido em banho de gelo. As células foram quebradas usando um sonicador (Sonics Vibra-cell) a 30% da intensidade máxima (20 vezes por 15 segundos). Em seguida as células foram centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante equivalente à fração solúvel das proteínas totais foi coletado, e o sedimento foi ressuspendido em 5ml de tampão de coluna. Essa amostra corresponde à fração insolúvel de proteínas totais. Foi recolhido 1 ml de amostra das frações solúveis e insolúveis, e incubadas com resina de amilose (50 µl) durante 15 minutos. As amostras foram centrifugadas durante 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. A amostra resultante compreende a resina ligada às proteínas recombinantes das frações solúvel e insolúvel.

Para as construções em plasmídeo pET28a e pSW202, seguimos orientações do fabricante da família pET (Novagen, EUA). A indução foi feita em LB, e os passos seguintes executados conforme descrito anteriormente. Entretanto, o tampão utilizado para ressuspender o sedimento celular foi o tampão de lise e como controle negativo foi utilizada como referência uma amostra sem indução.

### **3.5.3- Indução de MpTLP1 em larga escala**

A expressão em larga escala foi feita com células de *E.coli* BL21-TRXB contendo construções em pET28a e pSW202. Um pré-inóculo foi crescido

*overnight* a 37°C a 250 rpm, em 50 ml de meio LB contendo antibióticos correspondentes nas concentrações já citadas (ver tópico 3.5.2). A  $DO_{600}$  obtida nesse inóculo foi medida, e o volume correspondente a  $A_{600}$  final 0.1 foram transferidos para o volume de 500 ml de meio LB, e incubados a 37°C, 250 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado até atingir o valor de  $A_{600}$  entre 0,6 – 0,8. Cinco ml do inóculo foi retirado e precipitado por centrifugação. Esse sedimento corresponde à amostra não induzida. Foi adicionado IPTG na concentração de 0,1 mM ao inóculo que foi incubado a 30°C, na velocidade de 250 rpm durante 6 horas. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação e estocadas a -20°C. Essa indução foi repetida conforme descrito acima, porém induzindo com IPTG durante a noite na temperatura de 24°C a velocidade de 200 rpm.

### **3.6- Purificação de MpTLP1**

#### **3.6.1- Lise celular em larga escala:**

As células estocadas após indução em larga escala foram ressuspensas em tampão de lise e submetidas à sonicação a 30% da intensidade máxima (8 pulsos de 30 segundos) em banho de gelo. Feito isso, as amostras foram sedimentadas por centrifugação (45 minutos a 9000 rpm). Esse sedimento correspondia aos corpos de inclusão (fração insolúvel das proteínas totais celulares). O sobrenadante foi utilizado para a cromatografia de afinidade.

#### **3.6.2- Choque osmótico**

Para construção em pSW202, realizamos a extração do conteúdo periplasmático celular. Após indução em larga escala as células foram sedimentadas por centrifugação a 4000 X g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspensas em 200 ml de uma solução contendo Tris-HCl pH 8,0 30 mM, sacarose 20%, e EDTA 1 mM. As amostras foram incubadas sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, as células foram novamente sedimentadas por centrifugação a 8000 X g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, e o sedimento ressuspensas em 200 ml de  $MgSO_4$  5 mM gelado. As células foram então

incubadas em banho de gelo por 10 minutos com agitação. Essa amostra foi centrifugada a 8000 X g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante correspondia ao líquido periplasmático celular. Foi adicionado 8ml de Tris-HCl 1M, pH 7,4 ao periplasma que então foi estocado em geladeira até o dia seguinte. A fração periplasmática foi submetida à diálise reversa com PEG 8000, para que seu volume fosse diminuído para ¼ do incubado (volume final= 50 ml). Verificou-se uma sedimentação formada no líquido, que foi então submetido à nova centrifugação a 9000 X g por 20 minutos. O sedimento formado, assim como o sobrenadante, foi aplicado em gel SDS-PAGE. Esse experimento foi repetido, mudando apenas o volume final da solução de MgSO<sub>4</sub> (50ml). Novamente, ocorreu a formação de sedimento. O sedimento celular que foi gerado no ensaio de choque osmótico foi submetido aos procedimentos citados no item 3.6.3 e 3.7.

### 3.6.3- Cromatografia de afinidade

As proteínas recombinantes contendo etiqueta de 6 histidinas foram purificadas através de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), usando Ni<sup>2+</sup> como metal de afinidade. Os sobrenadantes obtidos a partir das lises celulares foram aplicados em coluna de 5 ml Ni-NTA (GE Healthcare, EUA). O primeiro eluato foi recolhido e denominado *flow through*. Em seguida foram passados pela coluna 50 ml dos tampões contendo concentrações crescentes de Imidazol (5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM). Os eluatos foram coletados e armazenados a -20°C. Para as frações de 100mM, o eluato foi recolhido de 10 em 10 ml, formando um total de 5 amostras, e para a concentração de 200mM de imidazol, o eluato foi colhido em duas frações. Foi retirada uma alíquota de cada fração dos eluatos, e também uma alíquota do sedimento (fração insolúvel), que foram então aplicados em gel SDS-PAGE.

### 3.7- Western blot

Os experimentos de *Western blot* foram realizados com as frações solúveis e insolúveis das tentativas de expressão da proteína recombinante MpTLP1. Géis de SDS-PAGE foram preparados, e as amostras das frações obtidas nos

experimentos citados acima foram carregadas no gel feito em duplicata, utilizando como referência um marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, EUA). Em seguida, um dos géis foi corado com Comassie Blue R-250, e o outro foi utilizado para transferência de seu conteúdo para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C Extra; GE Healthcare) utilizando o aparato de transferência por eletroforese (BioRad, EUA) em tampão de transferência para *Western Blot*. Logo após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio a 4°C por 16 horas. Após bloqueio, a membrana foi lavada com TBS 1X durante 10 minutos, por três vezes. Foi feita então a incubação da membrana com solução TBS 1X contendo anticorpo monoclonal Anti-His (Novagen, EUA) na diluição de 1:2000, durante duas horas. Logo após, a membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente, e então submetida à incubação com solução reveladora até que o sinal fosse visualizado. A membrana foi então lavada com água e seca à temperatura ambiente.

### **3.8- Desnaturação e renaturação de MpTLP1:**

Algumas tentativas de solubilização de MpTLP1 foram executadas conforme descrito a seguir:

#### **3.8.1- Desnaturação utilizando uréia 8M e solubilização com utilização de DTT:**

Após lise celular, a fração insolúvel foi ressuspendida em tampão de desnaturação contendo uréia 8M; 50 mM Tris pH 8,0; 19 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT; 0,2 M arginina e incubado em temperatura ambiente sob agitação moderada. A proteína desnaturada foi novamente submetida à centrifugação (4000 rpm, 1 hora) para separação de proteínas desnaturadas de fração insolúvel. O material resultante foi submetido a sucessivas diálises em 1L de tampão de desnaturação, contendo concentrações decrescentes de uréia (6M, 4M, 2M, 1M, 0,5M, 0M). A proteína permaneceu em diálise durante 16 horas, a 4°C e a cada mudança de tampão, a solução contendo a proteína foi submetida à centrifugação para retirada de frações precipitadas.

### **3.8.2- Desnaturação utilizando uréia 8M e solubilização com utilização do sistema de Glutathione oxidada e Glutathione reduzida**

Após lise celular, a fração insolúvel foi ressuspendida em tampão de desnaturação contendo uréia 8M, 50 mM Tris pH 8,0; 19 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM glutathione; 0.5 mM glutathione oxidada (Hu e Reddy, 1997) e incubado em temperatura ambiente sob agitação moderada. A proteína desnaturada foi novamente submetida à centrifugação (4000 rpm por 1 hora) para separação de proteínas desnaturadas de fração insolúvel. A solução resultante teve a concentração de uréia ajustada a 6M e submetida à purificação em coluna de afinidade Ni-NTA (GE Healthcare, EUA). Foram colhidos eluatos com diferentes concentrações de Imidazol (25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM). A presença de MpTLP1 foi confirmada em gel SDS-PAGE, e as frações que continham a maior concentração da proteína pura foram unidas e submetidas a uma série de diálise utilizando tampão de desnaturação, porém contendo concentrações decrescentes de uréia (4M, 2M, 1M, 0,5M, 0M). O tempo e condições de diálise estão descritas no item 3.8.1.

Também foi feita uma tentativa de obtenção de MpTLP1 solúvel a partir de desnaturação com uréia 8M e renaturação utilizando glutathione reduzida/oxidada segundo o trabalho de Campos *et al.* (2008). Dez ml de solução contendo MpTLP1 desnaturada com uréia 8M e purificada foram gotejadas lentamente em uma solução contendo 200 mM de Tris-HCl, pH7,5; 500 mM NaCl, 10 mM glutathione reduzida, 5 mM glutathione oxidada; em agitação constante. Em seguida, a solução resultante foi submetida a sucessivas diálises em 2L de solução contendo 200 mM Tris-HCl, pH7,5; e 500 mM NaCl, para total retirada da uréia e glutathione. A solução resultante foi concentrada utilizando PEG 8000, até o volume de 5 ml. A integridade das proteínas foi conferida em gel SDS-PAGE.

### **3.8.3- Desnaturação utilizando uréia 8M e solubilização com utilização de tampão Tris- HCl.**

A desnaturação e purificação de MpTLP1 foi feita como descrito no item 3.8.2, porém, a retirada de uréia da amostra não foi feita de maneira gradativa. A diálise foi feita em solução que continha 50 mM Tris pH 8,0; 19 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM

MgCl<sub>2</sub>, sendo que para cada 10ml de suspensão protéica desnaturada foi utilizado 1L de solução para diálise. Esta solução foi substituída a cada 24 horas durante 4 dias. A solução dialisada resultante foi submetida à centrifugação (3000 rpm, 40 minutos). Alíquotas do sedimento e sobrenadante foram conferidas em gel SDS-PAGE. A solução resultante das diálises contendo MpTLP1 foi concentrada utilizando PEG 8000, e logo após, submetida a novas diálises utilizando o mesmo tampão da diálise anterior. Essa diálise foi repetida 3 vezes, e a proteína obtida foi quantificada, para ser utilizada em testes de atividade.

### **3.9- Expressão de MpTLP1 em *Pichia pastoris***

#### **3.9.1- Transformação:**

As linhagens KM-71 e GS-115 de *Pichia pastoris* foram transformadas através do método de Cloreto de Lítio, descrito no protocolo do fabricante (Invitrogen). A seleção dos transformantes foi feita primeiramente através de plaqueamento em meio seletivo deficiente em histidina. As colônias foram submetidas a PCR de colônia, descrito no manual do fabricante, para a eliminação de clones falso-positivos. Posteriormente, foi feito uma busca por selecionar clones contendo múltiplas cópias do inserto através de plaqueamento das colônias positivas em meio YPD contendo concentração crescente de geneticina (G418), (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 1.75; 2,0 e 3 mg/ml), conforme descrito pelo fabricante.

As colônias que cresceram em maior concentração de G418 foram submetidas a testes Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>S</sup>, conforme protocolo do fabricante (Invitrogen). As colônias selecionadas em maior concentração de geneticina foram inoculadas em placas contendo MM e MD, sendo que, primeiro foram riscadas em MM. As placas foram incubadas a 30°C por dois dias e verificado em qual meio de cultura as colônias cresceram mais vigorosamente. Foram inoculadas ao todo 100 colônias.

#### **3.9.2- Expressão de MpTLP1 em pequena escala:**

Uma colônia da linhagem GS115 selecionada como Mut<sup>S</sup> foi inoculada em 100 ml de meio BMGY e incubada a 30°C 250 rpm até A<sub>600</sub>= 2-6 (aproximadamente 18 horas). As células foram coletadas por centrifugação (3000g

por 5 min) e ressuspensas em 20 ml de meio de BMMY. O inóculo foi incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação. Amostras de 1 ml foram coletadas a cada 24 horas durante 6 dias, acrescentado diariamente metanol ao inóculo na concentração final de 0,5%. As amostras coletadas foram centrifugadas, sobrenadante e células reservadas congeladas em nitrogênio líquido e estocados a -80°C. Ao final de seis dias, o sedimento de células e o meio de cultura foram analisados em gel SDS PAGE.

Para a colônia selecionada como Mut<sup>+</sup>, foi feito um inóculo em 25 ml de meio BMGY, até A<sub>600</sub>= 2-6, nas mesmas condições de temperatura e agitação citadas anteriormente. As células foram coletadas por centrifugação (3000g por 5 min) e ressuspensas em 200 ml de BMMY, em erlenmeyer de 1 L, sob as mesmas condições de agitação e temperatura. Amostras de 1 mL foram coletadas a cada 24 horas durante 6 dias, sendo acrescentado diariamente metanol ao inóculo na concentração final de 0,5%. As amostras coletadas foram centrifugadas, os sobrenadantes e células foram reservados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C. Após seis dias, o sedimento das células e o meio de cultura foram analisados em gel SDS-PAGE.

### 3.10- Quantificação de MpTLP1

A proteína obtida através da renaturação descrita no item 3.8.3 foi quantificada através de leitura em espectrometria

Absorbância 280 nm = caminho ótico (1 cm) X Coeficiente de extinção X  
Concentração

Concentração = Absorbância 280 nm/ Coeficiente de extinção = 1.769

### 3.11- Teste de atividade antifúngica de MpTLP1

A proteína obtida através da renaturação descrita no item 3.8.3 foi quantificada através de leitura em espectrometria, e em seguida foi utilizada para testes de atividade.

Os fungos utilizados para o teste foram os leveduriformes *Saccharomyces cerevisiae* e *P. pastoris*, e os filamentosos *Alternaria alternata*, *Curvilaria eragrostides*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspegillus fumigatus* e *Moniliophthora perniciosa*.

Os fungos filamentosos foram inoculados em placas contendo YPD e juntamente com o fungo, foram colocados discos de papel de filtro estéreis nas placas em torno do inóculo, onde foram adicionadas quantidades crescentes de MpTLP1 (10 µg, 20 µg e 30 µg). Foram utilizados ainda, como controle negativo, a solução onde MpTLP1 foi renaturada (tampão para MpTLP1) e como controle positivo, 5000 U de Nistatina (Pharma Nostra). As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 20 dias e observadas diariamente.

Os fungos com crescimento menos expansivos (*Alternaria alternata*, *Curvilaria eragrostides*) foram inoculados da seguinte forma: discos de tamanho padronizado dos fungos foram inoculados em cinco pontos da placa (para testes controle -, controle +, e MpTLP1 10 µg, 20 µg e 30 µg). Os discos contendo a solução a ser testada foram colocados a uma distancia de 1cm do inóculo. Esses inóculos foram medidos para verificar atividade antifúngica. Testes similares, com as mesmas concentrações de MpTLP1 e controles (+ e -) também foram feitos a fim de verificar se MpTLP1 possui atividade fungicida (se MpTLP1 é capaz de matar os fungos após seu crescimento em placa). Para tal, os fungos foram inoculados em YPD. Após seu crescimento completo foram adicionados os discos estéreis com a proteína a ser testada e os controles, como já descrito. As placas foram mantidas a 30°C durante uma semana e observadas diariamente.

No caso das leveduras *S. cerevisiae* e *P. pastoris* KM71 e GS115 foi feita uma curva de inibição de crescimento utilizando MpTLP1 como inibidor. Um pré-inóculo das leveduras foi feito em 10ml de YEPD, e incubado a 30°C durante a noite. A  $A_{600}$  do pré-inóculo foi medida para calcular a quantidade utilizada deste

para inóculos em 50ml de YEPD, YEPD+60ug de MpTLP1 e YEPD+ 5000u Nistatina, todos com  $A_{600}$  inicial de 0,005. As células foram incubadas a 30°C a rotação de 200 rpm, e a absorbância medida a cada 2 horas a 600 nm.

### 3.12- Teste de atividade $\beta$ -glucanase

Para testar a atividade  $\beta$ -glucanase de MpTLP1, utilizamos metodologia descrita por Gorjanovic *et al* (2007) baseada no método de Somogyi-Nelson. 5 $\mu$ g de MpTLP1 purificada foi adicionada a 40  $\mu$ L do substrato laminarina (2.5% m/v) em acetato de amônio 10  $\mu$ M pH 6.0, e DTT 1 mM. Para um controle positivo da reação, MpTLP1 foi substituído por Glucanex,  $\beta$ -glucanase de *Trichoderma* sp. comercial (Novozymes) na mesma concentração. Após 12 horas de incubação a 30°C, a amostra foi submetida a medição de açúcar reduzido. Em cada tubo foram adicionados 50  $\mu$ L da amostra e 1mL do reagente A. Os tubos foram fechados com papel alumínio e incubados a 100 °C por 10 min. Após resfriamento dos tubos até a temperatura ambiente, foram adicionados 1 mL do reagente B aos tubos. Os tubos foram agitados vigorosamente e em seguida foram adicionados 8 mL de água destilada, homogeneizando a solução. A leitura de absorbância foi feita a 540 nm no espectrofotômetro.

### 3.13- Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro JASCO J-810, com a temperatura controlada a 20 °C através de um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier type control system* PFD 425S, JASCO). Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (250-190 nm) foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, e 0,2 mg/mL de proteína solução para MpTLP1.

Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos com a subtração dos espectros dos tampões utilizados e os dados gerados com a subtração desses espectros foram convertidos em elipticidade molar por resíduo,  $[\theta]$ , dado em graus  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ , calculado de acordo com a equação:

$$[\theta] = (\phi \text{ MRW}) / (10 c l)$$

onde  $\phi$  é a elipticidade (em graus), MRW é o peso médio do resíduo,  $c$  é a concentração da proteína em g/mL e  $l$  é o caminho óptico em cm.

### 3.14- Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz foram realizados com o equipamento DynaPro-99-E-15 (Protein Solutions). Uma concentração de 0,2 mg/mL de proteína foi utilizada para os experimentos. A temperatura foi mantida a 25 °C durante todo o experimento. Foram realizadas 300 medidas com o objetivo de melhorar a estatística dos resultados. Os dados foram tratados com o programa fornecido pelo fabricante.

### 3.15- Predição da estrutura secundária

O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado a partir da seqüência de aminoácidos da proteína, utilizando o programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Este programa utiliza cinco componentes de estrutura secundária ( $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  antiparalela, folha- $\beta$  paralela, *Random coil* e estrutura irregular).

### 3.16- Predição da estrutura terciária

Estrutura terciária de MpTLP1 foi modelada pelo programa *CPHmodels-2.0 Server - prediction results* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) utilizando como base a seqüência de Pru Av2, TLP de ameixa que possui estrutura resolvida através de cristalografia (Dall'Antonia *et al.*, 2005). Em seguida, a predição da estrutura eletrostática da proteína foi feita através do software *PyMOL*.

### 3.17- Análise de indução da expressão gênica de MpTLP1 através do método de Northern blot:

Para realização dos experimentos de análise de expressão gênica foram utilizadas linhagens de *M. perniciosus* FA553 (referente ao genoma). Os micélios foram mantidos em cultura sólida de meio malte. Dessa cultura foram retirados cubos e transferidos para 50ml de meio mínimo de crescimento de micélios

necrotróficos de *M. pernicioso* durante três semanas a 25°C sob agitação (150 rpm). Após esse período, os micélios foram colhidos e o meio trocado por um novo meio contendo os mesmo componentes do meio mínimo, porém com algumas substituições quanto às fontes de carbono (glicose, glicerol ou extrato de cacau) e nitrogênio (NaNO<sub>3</sub> ou BSA): [1: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> (controle1) ; 2: 2% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 3: 3% glicerol + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 4 : extrato de cacau suscetível + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 5: extrato de cacau resistente + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 6: 1% glicose + 2% BSA]. Os micélios foram mantidos nesse meio por 24 horas. Logo após, foram coletados, congelados em N<sub>2</sub> líquido e mantidos a -80°C.

Um experimento similar foi efetuado, porém foram adicionadas ao meio substâncias relacionadas a mecanismos de defesa/fitopatogenicidade (ácido salicílico/SA ou peróxido de hidrogênio/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) : 7: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> (controle2); 8: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + 2,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 9: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 11: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + 1mM ácido salicílico, 12: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + 2mM ácido salicílico. Os micélios foram mantidos nesse meio por 4 horas. Em seguida foram coletados, congelados em N<sub>2</sub> líquido e mantidos a -80°C.

Em outro experimento micélios foram inoculados em meio mínimo (0,05% KCl +0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> (traços) + 1% extrato de cacau e 0,6% NaNO<sub>3</sub>) e incubados a 28°C, 150 rpm. Após 3 semanas de crescimento, o meio foi trocado por meio mínimo contendo: 1) controle: 0,05% KCl +0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> (traços) + 1% extrato de cacau e 0,6% NaNO<sub>3</sub>, e 2) Indução por glicose: 0,05% KCl +0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> (traços) + 1% glicose e 0,6% NaNO<sub>3</sub> e mantido nesse meio nas mesmas condições de temperatura e agitação por 24 horas. Após esse período os micélios foram coletados, congelados em N<sub>2</sub> líquido e mantidos a -80°C.

Para análise de expressão gênica dos micélios novos e senescentes, foram inoculados micélios referentes a cada condição em meio malte (5 g/l de extrato de levedura, 17 g/l de extrato de malte) durante 15 dias a 28°C com rotação de 200 rpm. Em seguida os micélios foram coletados para extração de RNA.

O RNA total dos micélios foi extraído através do método do fenol quente (Hegde et al, 2000). Os micélios foram macerados em nitrogênio líquido e alíquotados em tubos de 2 ml. Em seguida, adicionou-se tampão de extração de RNA, fenol ácido e os tubos foram agitados vigorosamente. Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C durante 30 a 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Após incubação, os tubos foram submetidos a banho de gelo por 5 minutos e centrifugados a 14000 rpm durante 5 minutos. A fase aquosa foi recolhida a qual adicionou-se clorofórmio. Após uma nova centrifugação (14000 rpm, 5 minutos) a fase aquosa foi recuperada e o RNA contido foi precipitado com acetato de sódio (0,2 Volumes) e etanol absoluto (2 volumes), centrifugando por mais 10 minutos a 14000 rpm. O precipitado foi então lavado com etanol 70% e depois de seco, ressuspendido com H<sub>2</sub>O. O RNA foi em seguida quantificado pela análise da intensidade das bandas de RNA ribossomal em gel de agarose - formaldeído (1% agarose - 6% formaldeído; Sambrook et al 2001). Após eletroforese, as amostras contidas no gel foram transferidas para membrana de náilon (Hybond N<sup>+</sup>, GE Healthcare, EUA) por transferência em solução salina (20X SSC), segundo protocolo descrito por Sambrook *et al*, (2001). A membrana foi então incubada a 80°C por 2 horas para a fixação do ácido nucléico.

A pré-hibridação, hibridação e lavagem das membranas contendo o RNA foram feitas segundo as instruções do fabricante. Em virtude da presença da formamida, a pré-hibridação e hibridação foram conduzidas a 43°C (Sambrook *et al.*, 2001) A preparação da sonda específica para o gene *MpTLP1*, lavagens e exposição da membrana foram feitas conforme o descrito no tópico 3.2.2.

### **3.18- Cultivo de basidiocarpos de *M. pernicioso***

Para dar continuidade aos experimentos de expressão gênica, implantamos em nosso laboratório uma metodologia de produção de esporos de *M. pernicioso* (Acássia Pires, comunicação verbal). Inicialmente, inoculamos micélios do fungo em meio para bolacha, durante cerca de 20 dias. Em seguida, cubos dessa cultura foram transferidos para um triturado contendo galhos e folhas de cacaueteiro (77% p/v), misturadas com aveia (20% p/v), CaSO<sub>4</sub> (3% p/v) e um

pouco de água. Os triturados foram colocados em placas de petri de vidro e autoclavados 2 vezes durante 1 hora com intervalo de uma noite entre as autoclavagens, a fim de que organismos contaminantes e esporos fossem eliminados. Esse preparado foi denominado de “bolacha” pela sua forma arredondada. Após o inóculo dos micélios nas bolachas, estas foram mantidas ainda dentro das placas de petri em estufa a 25°C, até que o micélio colonizasse todo o meio (aproximadamente 1 mês). Após a colonização, as bolachas foram transferidas para potes de vidro, sendo penduradas por um arame. Os potes de vidro foram tampados, formando um sistema estéril isolado. Esses potes foram mantidos em estufa BOD, à temperatura constante a 25°C, com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. As bolachas foram submetidas a regas diárias para manutenção da umidade até começarem a apresentar coloração rosada, momento em que sofreram um estresse de seca, no qual a rega foi cessada durante 7 dias. Esse estresse é dado aproximadamente 45 dias após a transferência das bolachas para os potes. Após o estresse de seca, as bolachas voltaram a ser regadas, porém em menor frequência até que aparecessem os primórdios de basidiocarpos (o que pode acontecer em um período aproximado entre 20 dias ou mais após estresse). Quando os basidiocarpos se abriram, esses foram colhidos para a coleta dos esporos. Os basidiocarpos foram retirados das bolachas e lavados com uma solução aquosa contendo antibiótico (rifamicina 10µg/ml). Depois, foram fixados pelos estipes em placas de petri, e essas foram emborcadas em *bechers* contendo uma solução de glicerol 16% e MES (10 mM). Os esporos resultantes foram inoculados em meio de crescimento da fase biotrófica de *M. pernicioso* (Meinhardt *et al.*, 2006). Esse trabalho foi desenvolvido em parceria com o aluno de Iniciação científica Paulo Jose Teixeira, que aprimorou a técnica de produção de basidiocarpos, inoculando micélio necrotrófico do fungo em galhos de cacau seco, em frascos contendo meio de cultura para bolacha. Os frascos foram mantidos na BOD por volta de dois meses, até que o basidiocarpo se desenvolvesse. Esses foram coletados e tratados como descrito anteriormente para coleta de esporos. Adicionalmente, basidiocarpos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C para extração de RNA.

### 3.19- Análise da expressão gênica de *MpTLP1* ao longo do ciclo de vida de *M. pernicioso* através do método de *Real time* RT-PCR

Para as análises por *Real-Time* PCR, foi utilizado RNA de *M. pernicioso* nas seguintes condições: micélio necrotrófico crescido em meio biotrófico de manutenção, micélio necrotrófico novo em meio malte (5 g/l de extrato de levedura, 17 g/l de extrato de malte) e micélio necrotrófico senescente em meio malte extraídos pelo método de fenol quente. Os RNAs do micélio biotrófico crescido em meio biotrófico de manutenção, do primórdio do basidiocarpo e do basidiocarpo foram extraídos com o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase I (0,5 U) (Invitrogen, EUA), e quantificados. Um  $\mu\text{g}$  de RNA de cada condição foi utilizado para a síntese de cDNA com o sistema de transcrição reversa *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, EUA), utilizando-se *random primers* como iniciadores para a transcrição. O cDNA de cada condição foi utilizado para as reações de *Real time* RT-PCR.

As seqüências dos oligonucleotídeos desenhados para amplificação do gene *MpTLP1* foram: MpRetTLP\_For 5'-CGGTCTATAACGCGTGTC C-3' e MpRetTLP\_Rev 5'-TTGGAGAAGTCGTAACG -3' com temperatura de anelamento de 55°C. O desenho dos oligonucleotídeos foi feito com o auxílio do programa *GenScript online Real-Time Primer Design tool* ([www.genscript.com/ssl-bin/app/primer](http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer)).

O *Real time* foi realizado com o kit *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) para detecção da fluorescência durante a amplificação no aparelho ABI PRISM 7500 *Sequence Detection System* (SDS) acoplado ao software ABI PRISM 7500 SDS. As reações foram padronizadas do seguinte modo: 8 $\mu\text{l}$  de *Sybr Green PCR Master Mix*, 1 $\mu\text{l}$  de oligonucleotídeo *forward* a 5  $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{l}$  de oligonucleotídeo *reverse* a 5 $\mu\text{M}$  e aproximadamente 25 ng de cDNA num volume final de 16 $\mu\text{l}$ . As reações foram preparadas em placas de 96 poços e cada placa possuía dois conjuntos de reações: A) reações da curva padrão do gene composta por uma diluição seriada de 40ng/ $\mu\text{l}$  de cDNA (de  $10^0$  a  $10^{-7}$ ) para análise de regressão e B) as diferentes condições nas quais a expressão gênica seria avaliada. O cDNA utilizado para a confecção da curva padrão foi um *pool*

dos cDNAs de todas as condições analisadas. Todas as condições e pontos da curva padrão foram feitos em triplicata. As condições utilizadas na reação PCR foram: incubação a 50°C por 2min, incubação a 95°C por 10min e, finalmente, 40 ciclos de 95°C por 15 seg; 53°C por 30 seg e 60°C por 1min. Uma análise da curva de dissociação foi conduzida para verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos e ampliações inespecíficas. O método da eficiência descrito por PffafI (2001) foi utilizado para tratamento dos dados de expressão gênica obtidos. Este método se baseia na eficiência dos oligonucleotídeos na reação e na variação de Ct (*cycle threshold*) entre as amostras (PffafI, 2001). Um fator de normalização para cada condição analisada foi obtido a partir dos níveis de expressão dos genes escolhidos como controles endógenos através da utilização do programa *geNORM* para *Microsoft Excel* (Vandesompele *et al.*, 2002). Este fator de normalização corrigiu os níveis de expressão de cada gene em cada condição. A amostra do micélio necrotrófico em meio biotrófico foi utilizada como amostra-referência, ou seja, após a normalização da expressão em cada condição pelos controles endógenos, os valores obtidos foram divididos pelos valores de expressão do micélio necrotrófico em meio biotrófico para que assim pudesse ser obtido o *fold* de expressão das demais condições em relação a esta amostra.

### 3.20- Clonagem e estudo do promotor do gene *MpTLP1*

Para avaliação do promotor do gene *MpTLP1*, a seqüência do EST CP02-EC-001-001-E11-UE foi lançada contra as seqüências de DNA genômico de *M. pernicioso*. Através de análises de bioinformática (ver detalhes em resultados) foi detectada uma seqüência contendo aproximadamente 829 pb a montante ao códon de início da tradução do gene. Esta seqüência foi amplificada através de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos contendo sítios de restrição, destacados em itálico: (ThauProBamDir: 5'-GGATCCCCCGTTAATATCTCTCCTCAA-3'; ThauProHindRev: 5'-AAGCTTTTCATGTTGAGAATTCAGAAGG - 3'). A seqüência promotora obtida foi analisada nos programas MATCH (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>; Kel e Goessling, 2003), Neural Network

Promoter Prediction (Reese *et al.*, 2001) e HcTATA ([http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC\\_tata.html](http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html); Milanese *et al.*, 1996) em busca pelo TATA box, início de transcrição e seqüências *cis* hipotéticas. Após amplificação da seqüência, esta foi clonada em pGEM-T Easy (Promega, EUA) e inserida em *E.coli* DH10B através de transformação por eletroporação. As células resultantes foram plaqueadas em meio seletivo contendo X-gal. As colônias positivas foram inoculadas em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial através de lise alcalina. O plasmídeo obtido foi digerido com enzimas de restrições cujos sítios foram inseridos na seqüência pelos óligonucleotídeos (*HindIII* e *BamHI*). A digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% e em seguida, o fragmento referente à seqüência do promotor de *MpTLP1* foi purificada do gel através do *Kit* de purificação *PureLink* (Invitrogen, EUA).

O fragmento purificado foi ligado no plasmídeo YEP358, e introduzido em *S. cerevisiae* eletrocompetente cepa HD93-15D, preparada conforme protocolo padrão. Os transformantes foram selecionados em meio YNB (6,7g/l YNB, 3% glicose, Triptofano, Histidina, Leucina e *mix* de aminoácidos denominado *Drop out*; Ausubel *et al.*, 1998) deficiente em Uracila. Em paralelo, foram transformadas leveduras com YEP358 sem inserto para serem utilizadas como controle negativo, e também, com uma construção utilizada por Carraro *et al.*, (1998), como controle positivo de repressão à glicose e indução à glicerol. Em seguida, foi feito o experimento para teste de expressão do gene repórter *LacZ* da seguinte forma: após o crescimento dos transformantes, foi feita uma suspensão das colônias que foram pingadas em meio SC + glicose 2%; SC+ glicose 4%; SC+ glicerol 1%; SC + glicerol 2%; SC + extrato de cacau 2%; SC + extrato de cacau 4%. As colônias a serem testadas foram transferidas para uma membrana de náilon (Hybond N<sup>+</sup> - GE Healthcare, EUA), colocando a membrana sobre as culturas e esperando estas ficarem bem molhadas. Em seguida as células foram lisadas por imersão em nitrogênio líquido. A revelação foi feita utilizando solução Z. A formação de colônias azuis nas membranas foi acompanhada visualmente. Outras alterações foram testadas na busca de resultados conclusivos: 1) plaqueamento de X-gal (20ug/ ml de meio) em placa de YPD Ura-, seguido de inóculo de colônias

positivas. As placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias e observadas diariamente para detecção de colônias azuis. 2) adição de 100ul de solução Z para cada 25ml de YPD Ura<sup>r</sup>. Inóculos e incubação foram feitos conforme descrito anteriormente.

Devido à falta de precisão nos resultados obtidos, alterações no protocolo foram testadas. Resultados obtidos em *Northern blot* nos guiaram a mais uma condição de teste de ativação do promotor, substituindo a glicose por extrato de cacau no meio YNB.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Análise do gene *MpTLP1*

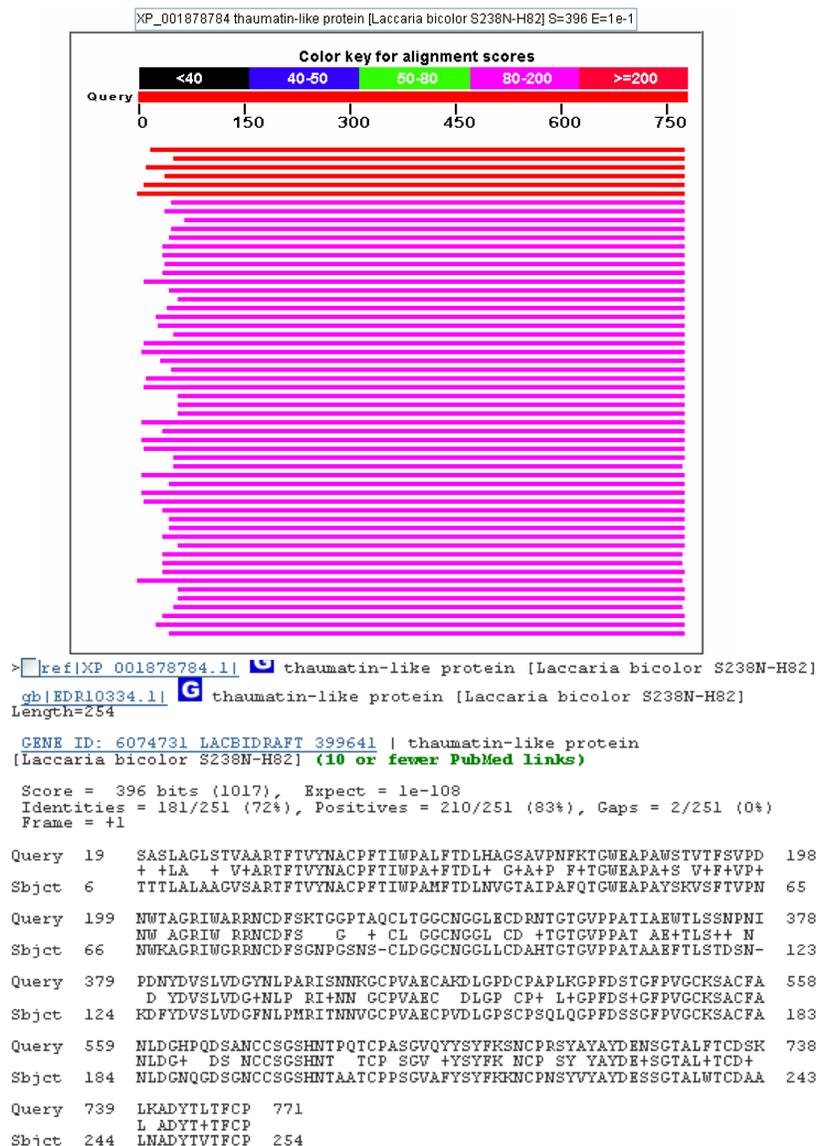
A partir de análises nos bancos de dados de EST de *M. pernicioso*, foi encontrada uma seqüência contendo similaridade com TLPs: o EST CP02-EC-001-001-E11-UE. Essa biblioteca de ESTs é advinda de micélios necrotróficos cultivados em extrato dializado de cacau (EC).

Para isolar o gene completo, utilizamos os oligonucleotídeos M13 aninhados no plasmídeo pDNRLIB (Clontech, EUA), utilizado para a construção das bibliotecas de ESTs de *M. pernicioso* (Rincones *et al.*, 2008). O resultado do seqüenciamento foi uma seqüência de 1086 pb, contendo uma matriz de leitura de 774 pb, uma região 5'UTR de 163 pb e um 3'UTR de 149 pb.

```
TCTCGCAGGAGCATTCAACACCTGCCGAGGCATCGTGTGGCTCGTATACCGTGCCTATCAGAGCGTATGGAAGAA
CATCTAGAGCGCAGACGGGAAGAGTATAAGTAGACCATTTTACAAGGTCGAATTCTTCAGTCTGAACTCGCCTTCTGAATT
CTCAACATGAAACTTTTCGTGCAAGTCTTCTCTCGCTGGGTTGTCCACCGTTGCAGCTCGTACCTTCACGGTCTATAAC
GCGTGTCCGTTTACCATCTGGCCAGCTCTATTTACGGATCTCCATGCTGGATCCGCTGTTCTTAAGTCAAGACCGGCTGG
GAAGCTCCCGCATGGTCCACGGTAACGTTCTCGGTGCCAGACAACCTGGACGGCAGGAAGGATCTGGGCCAGACGTAAGTGC
GACTTCTCCAAGACCGGAGGTCCCACTGCTCAGTGCCTCACTGGCGGGTGAATGGAGGCCTCGAATGCGACAGAAACACA
GGCACCGGTGTGCCTCCCGCAACGATAGCGGAGTGGACTTTGTGAGTAACCCCAATATTCCCGATAACTACGATGTCTCG
CTTGTGGACGGTTACAATCTTCTGCCAGGATCTTAACAACAAGGGTGCCCCGTTGCCGAATGTGCAAAGGATCTAGGA
CCAGACTGTCTGCTCCCTTGAAAGGCCATTTGACTCGACGGGATCCCCGTGGGTTGCAAGAGTGCTTGCTTTGCAAAC
TTGGACGGCCACCCTCAGGACTCGGCCAATTGTTGTTCTGGCAGCCATAACACCCCGCAAACCTGCCCTGCCAGCGGCGTT
CAATACTATAGTTACTTCAAGTCAAATTTGTCCAAGGCTTTACGCCTACGCCTACGACGAGAATAGTGGCACTGCTTTGTTC
ACTTGGCACTCGAAACTCAAGGCTGATTATACTTTGACATTTGTCCC TGA GCGGGGAGCGCGCGGGGAGCGCTNNTGAGC
TCACCGCGGGGTAATAACCCGTAACCAGGGTAATGGATTCTAGTTGTATATCACATTTTGAAATGTAAGTGTGTTGAGGACCC
CAAGATGAATGAATATTGTTGATGGAAAAAAAAAAAAAA
```

**Figura 5: Seqüência do gene *MpTLP1* presente no EST CP02-EC-001-001-E11-UE.** Realce verde: códon de início de tradução. Realce vermelho: códon de parada de tradução. Cinza: Sítio de reconhecimento da enzima *BamHI*.

Essa seqüência foi lançada no banco de dados do NCBI através de um BLASTX. Verificou-se que o EST CP02-EC-001-001-E11-UE possui alta similaridade com as duas TLPs do fungo *Laccaria bicolor* (75% e 72% de identidade), com a três TLPs do fungo *Coprinopsis cinerea* (68%, 67% e 58% de identidade) e com a TLP do fungo shitake japonês *Lentinula edodes* (64 de identidade; Sakamoto *et al.*, 2006). A ORF derivada do EST foi denominada **MpTLP1 (M. perniciosa Thaumatin-Like Protein 1)**.



**Figura 6: BlastX da seqüência do EST referente ao gene *MpTLP1* de *M. perniciosa*.** Query = EST CP02-EC-001-001-E11-UE; Sbjct = *thaumatin-like protein* de *Laccaria bicolor* (ref|XP\_001878784.1)

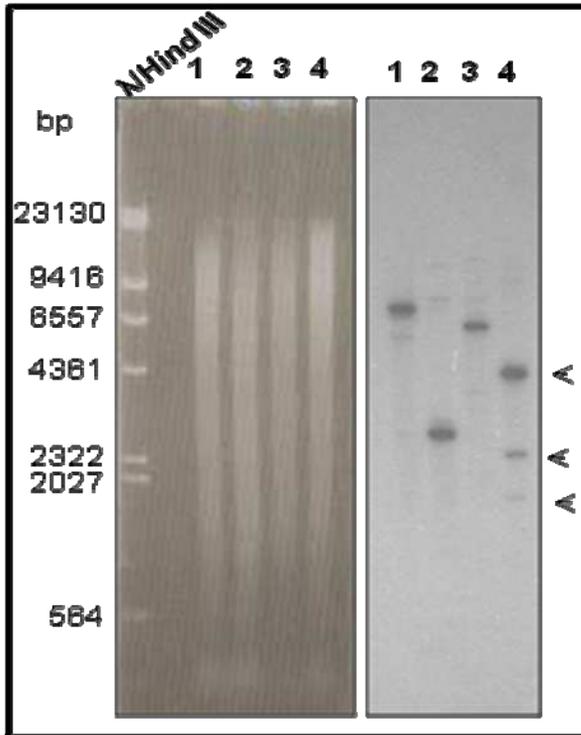
Através de análises no site EXPASY ([http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi\\_tool](http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool)), verificamos que a seqüência de nucleotídeos de *MpTLP1* origina uma proteína de 257 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 27,2 KDa e ponto isoelétrico de 5,5. O preditor de peptído sinal usado foi <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

MKLFVASASLAGLSTVAARTFTVYNACPFTIWPALFTDLHAGSAVPNFKTGWEAPAWSTVTFVSPDNWTAGRI  
 WARRNCDFSKTGGPTAQCLTGGCNGGLECDRNTGTGVPPATIAEWTLSSNPNIIPDNYDVS LVDGYNLPARISN  
 NKGCPVAECAKDLGPDPCAPLKGPFDSGTGFPVVGCKSACFANLDGHPQDSANCCSGSHNTPQTCPASGVQYYSY  
 FKSNCPRSYAYAYDENSGTALFTCDSKCLKADYTLTFCP

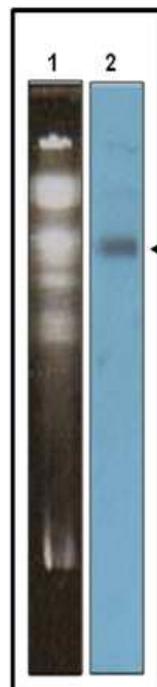
**Figura 7: Seqüência de aminoácidos de MpTLP1.** Sublinhado: peptídeo sinal para secreção.

A fim de verificarmos o número de cópias similares a *MpTLP1* no genoma, o fragmento referente ao gene foi digerido do EST CP02-EC-001-001-E11-UE utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Essa digestão foi aplicada em gel de agarose e a banda referente à *MpTLP1* foi purificada. Após purificação, esse fragmento foi utilizado para o preparo da sonda radioativa que foi utilizada no experimento de *Southern*, e também em experimentos de *Pulse-Field* e *Northern blot*.

O resultado de *Southern blot* sugeriu que possam existir genes similares a *MpTLP1* no genoma do fungo *M. pernicioso*, já que foi possível visualizar pelo menos três bandas na trilha referente à digestão com *BamHI*, sítio que corta dentro do gene (figura 8). O resultado de *Pulse-field* sugere que estes genes podem estar localizados no mesmo cromossomo, já que nesse experimento foi possível visualizar apenas uma banda intensa (figura 9).



**Figura 8: Análise de Southern blot do gene *MpTLP1*:** DNA genômico de *M. pernicioso* foi digerido com enzimas de restrições e hibridizado com o gene *MpTLP1*. A esquerda: gel de agarose corado com brometo de etídeo. Direita: Southern blot com *MpTLP1*. 1- *EcoRI*, 2 - *EcoRV*, 3- *HindIII*, 4- *BamHI*



**Figura 9: Análise do gene *MpTLP1* em gel de Pulse-field.** 1 - Gel de Pulse Field contendo cromossomos de *M. pernicioso*. 2- Cromossomos hibridizados com o gene *MpTLP1*.

---

#### 4.2- Análise de taumatinas em *M. pernicioso* e filogenia de *MpTLP1*:

Apesar de termos a seqüência completa do EST referente a *MpTLP* e uma cobertura de 2X do genoma de *M. pernicioso* seqüenciado pelo método Sanger (Mondego *et al.*, 2008), até então não era possível mapear todos os éxons e íntrons de *MpTLP* pois somente 344 pb do início do EST tinham similaridade com uma seqüência do genoma, o clone da biblioteca de *shotgun* CP02-S2-000-101-G05-UE. Em 2008, foram adicionadas à montagem genômica de *M. pernicioso*, seqüências derivadas de pirosequenciamento, executado em colaboração com a Univerisdade Penn State e o ARS-USDA (Estados Unidos). Após a montagem híbrida (Sanger + pirosequenciamento), aumentamos a cobertura do genoma para 6,2 X sendo possível alinhar o gene *MpTLP1* na seqüência do genoma. Através de BlastN contra o banco de dados do genoma, foi verificado que *MpTLP1* alinhou com o Contig 5418. Por alinhamento visual e com auxílio de programas de predição de genes aplicados pelo grupo de Bionformática do LGE, foi possível mapear os éxons e íntrons de *MpTLP1* (figura 10). *MpTLP1* possui 12 introns, o mesmo número de introns presente na TLP de *L. edodes* (Sakamoto *et al.*, 2006).

Tendo em vista uma maior cobertura do genoma, nossos dados de *Southern blot* e dados da literatura que demonstram que as taumatinas formam famílias gênicas em diversos organismos, buscamos outras taumatinas no genoma de *M. pernicioso*. Essa mineração de dados foi feita primeiramente utilizando a seqüência de *MpTLP1* em um TBlastN contra a montagem híbrida de *M. pernicioso* (figura 11). Esse Blast resultou no alinhamento de outros *contigs* além do Contig 5418 com *MpTLP1*, sendo que 10 contigs apresentaram similaridade maior que 50%.

**CGCAGGAGCATTCAACACCTGCCGCAGGCATCGTGTGGCTCGTATACCGTGCCTATCAGAGCGTATGGAA**  
**GAACATCTAGAGCGCAGACGGGAAGAGTATAAGTAGACCATTTTACAAGGTCGAATTCTTCAGTCTGAAC**  
**TCGCCTTCTGAATTCTCAACATGAAACTTTTCGTCGCAAGTGCTTCTCTCGCTGGGTTGTCCACCGTTGC**  
M K L F V A S A S L A G L S T V A  
**AGCTCGTACCTTCACGGTATGGCAGTCCCTTTTTCCGTGGGGTTTCTTCTGATCCCTCATCAACCAGGTC**  
A R T F T V  
**TATAACCGGTGTCCGTTTACCATCTGGTGAGTTACTGCCATTAATCACGTAGTATATACCTTTTTTCTCAT**  
Y N A C P F T I W  
**TCACCAACACAGGCCAGCTGTAATTTACGCTTTTGCTTCCTGGACTTTTCCTCACAAGAGTCCTAGCT**  
P A L  
**ATTTACGGATCTCATGCTGGATCCGCTGTTTCCCTAACTTCAAGACCGGGTGCCTTCATGAATAGTCTTG**  
F T D L H A G S A V P N F K T G  
**GGAATATCGCTCTGACTCTTTTTATTGTAGCTGGGAAGCTCCCGCATGGTCCACGGTAAACGTTCTCGGTGC**  
W E A P A W S T V T F S V P  
**CAGGTAAGTCCAAGTTCCATTTAGCTGCGTTTCACTTCTAACAATGCGCAGACAACCTGGACGGCAGGAAG**  
D N W T A G R  
**GATCTGGGCAAGTAATATACTTGGTTTGTAAAGGCAGACAGCTAACTGCTCAATACAGGCCAGACGTAA**  
I W A R R N  
**CTGCGACTTCTCCAAGACCGGAGGTCCCACTGCTCAGTGCCTCACTGGCGGGTGAATGGAGGCCTCGAA**  
C D F S K T G G P T A Q C L T G G C N G G L E  
**TGCGACAGAAACACAGGCACCGGTGTGCCTCCCGCAACGATAGCGAAAATATTAGCTTATTTGATGACCA**  
C D R N T G T G V P P A T I A  
**TCTTCCCTTACTGACATTGCTTTGTATTATAGGGAGTGGACTTTGTGCGAGTAACCCCAATATTCCCGATA**  
E W T L S S N P N I P D N  
**ACTACGATGGTAAGCGGCTGCTTTTATCACACCGGTAATATGATGCTGACACCTCCTACCTAGTCTCGC**  
Y D V S L  
**TTGTGGACGGTTACAATCTTCTGCCAGGTACCAGCAGAAAGCCTCAGTGTGGACTACTTCTGATCAGC**  
V D G Y N L P A R  
**TACCCAGGATCTCTAACAACAAGGGTGCCCCGTTGCCGAATGTGCAAAGGATCTAGGACCAGACTGTAA**  
I S N N K G C P V A E C A K D L G P D C  
**GGAATAGATACATCTTACTGGGGAATGATACAGATCTGATTGTTTACGTAGGTCTCTGCTCCCTTGAAAG**  
P A P L K G  
**GCCATTTGACTCGACGGGATTCCCCGTGGGTTGCAAGAGTGCTTGC**  
P F D S T G F P V G C K S A C  
**AAGGCCAAGACTGAAATTATCTCAGTTTGCAACTTGGACGGCCACCCTCAGGACTCGGCCAATTGTTGT**  
F A N L D G H P Q D S A N C C  
**TCTGGCAGCCATAACACCCCGCAAACCTGCCCTGCCAGCGGCTTCAATACTATAGTTACTTTCAGTGCCT**  
S G S H N T P Q T C P A S G V Q Y Y S Y F K  
**CGGGTTGCATTCAATTTATAGGCTTCTGGGATACTCAACATCATTCAATCAGAGTCAAATTGTCCAAGGTC**  
S N C P R S  
**TTACGCCTACGCCTACGACGAGAATAGTGGCACTGCTTTGTTCACTTGGGACTCGAAACTCAAGGCTGAT**  
Y A Y A Y D E N S G T A L F T C D S K L K A D  
**TATACTTTGACATTCTGTCCCTGAGCGGGGAGCGCTGCTGAGCTCACCGGGGTACTAACCGTAAACAAGG**  
Y T L T F C P  
**CGTAATGGATTCTAGTTGTATATCACATTTTCAAATGTACTGTTTGGAGACCCAAGATGAATGAATATTG**  
**TTGATGGA**

Figura 10: Sequências de nucleotídeos e aminoácidos de MpTLP alinhadas com contig genômico 5418. Em verde o códon de início de tradução e em vermelho o códon de parada de tradução.

### Distribution of 56 Blast Hits on the Query Sequence

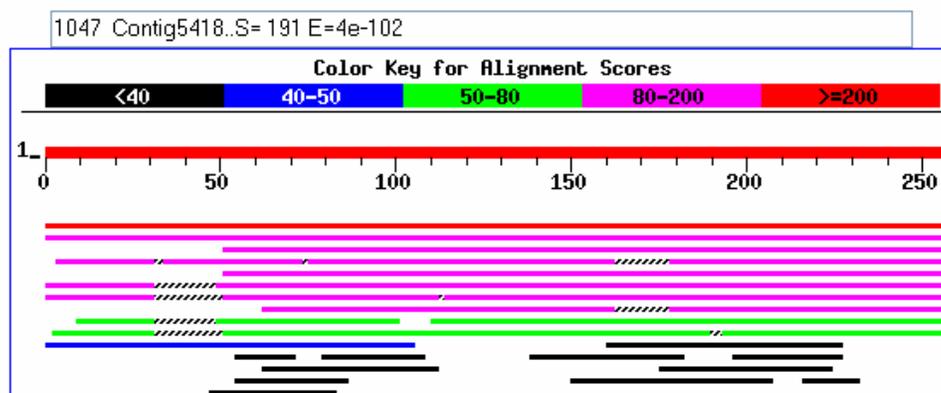


Figura 11: tBlastN da seqüência de MpTLP1 contra os *contigs* genômicos de *M. pernicioso*.

Em seguida as seqüências desses contigs foram lançadas no preditor utilizado pela bioinformática de LGE, a fim de localizarmos dentro de cada *contig* os genes similares a MpTLP1. Dos 10 *contigs* analisados o preditor gênico conseguiu mapear taumatinas em 7 destes, sendo que no Contig 11536 existem duas seqüências *in tandem* similares a taumatinas (MpTLP3 e MpTLP4). No total foi possível anotar 9 taumatinas em *M. pernicioso*. Três das proteínas hipotéticas estão incompletas (MpTLP2, MpTLP5 e MpTLP9), pois não apresentam o códon de iniciação e alguns aminoácidos na porção N-terminal. Essas seqüências foram alinhadas através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>; figura 12), juntamente com a sequencia da taumatina de *L. edodes* (Sakamoto *et al.*, 2006) e esse alinhamento foi usado para a predição de um cladograma (figura 13)

Pelo alinhamento foi possível verificar que todas as MpTLPs, assim como a taumatina de *L. edodes*, apresentam aminoácidos ácidos conservados nas posições apropriadas do “acidic cleft”, região importante para atividade de ligação a  $\beta$ -1,3-glucanas (Koiwa *et al.*, 1999). Em MpTLP1, esses aminoácidos seriam E117, D131, e D136.

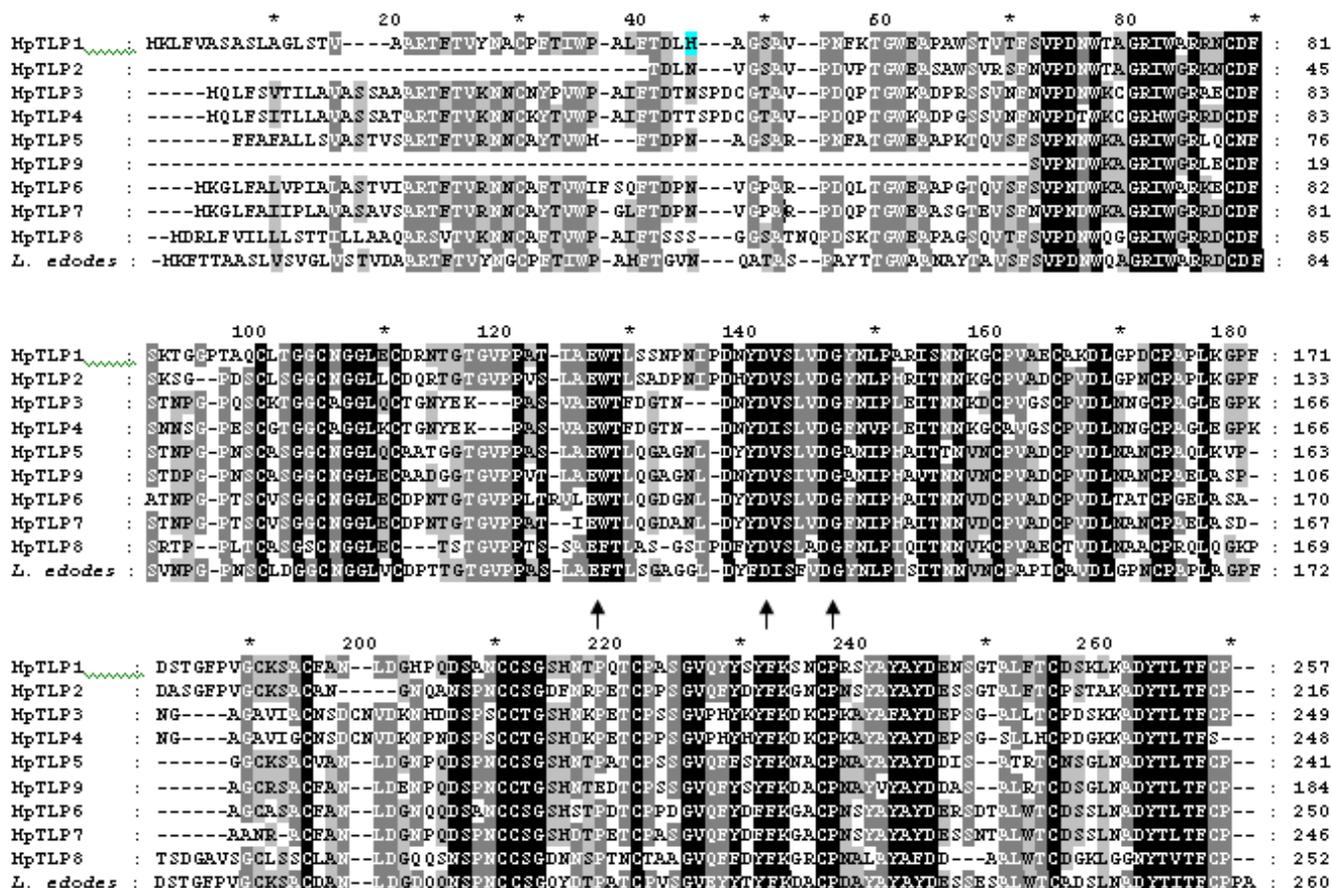


Figura 12: Alinhamento das MpTLPs com a taumatina de *L. edodes* (Sakamoto *et al*, 2006). As setas indicam aminoácidos ácidos que circundam o “acidic cleft” importantes para função de ligação à glucanas. *L. edodes* – *Lentinula edodes* - (dbj|BAE95855.1|)

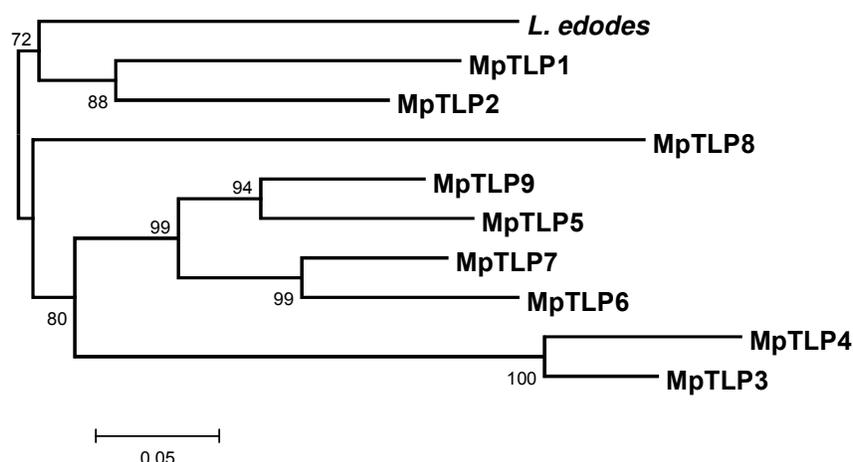
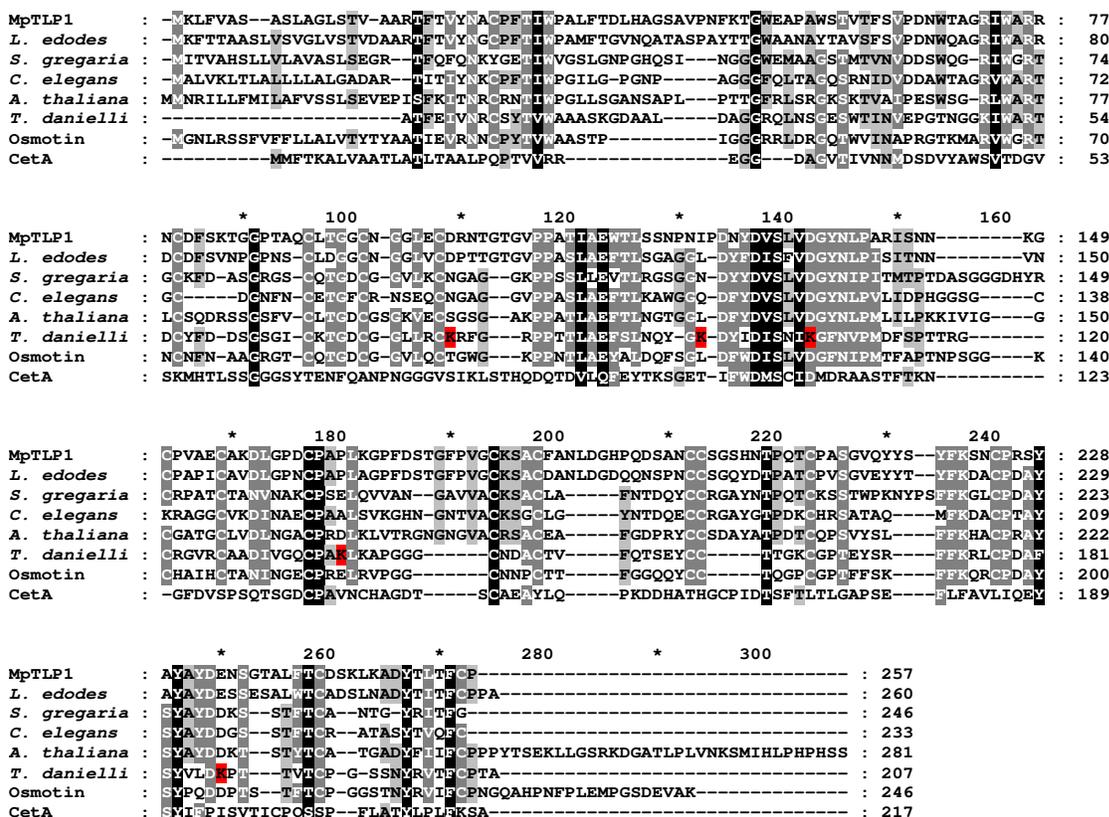


Figura 13: Cladograma das taumatinas de *M. pernicioso*. A topologia da árvore foi construída pelo método de *Neighbor joining* através do programa MEGA4. As distâncias entre seqüências foram calculadas pelo modelo de distância *p*. Os números nos ramos indicam as porcentagens do teste de confiança de *Bootstrap* (5000 réplicas).

O cladograma demonstra que MpTLP1 e MpTLP2 são as taumatinas de *M. pernicioso* mais similares a de *L. edodes*. Por esse cladograma também é possível separar as MpTLPs em alguns sub-grupos provavelmente relacionados com a história evolutiva dessas proteínas em *M. pernicioso*.

A fim de buscarmos mais inferências sobre a função das MpTLPs foi feito um alinhamento MpTLP1 com outras seqüência de TLPs depositadas em banco de dados (figura 14).

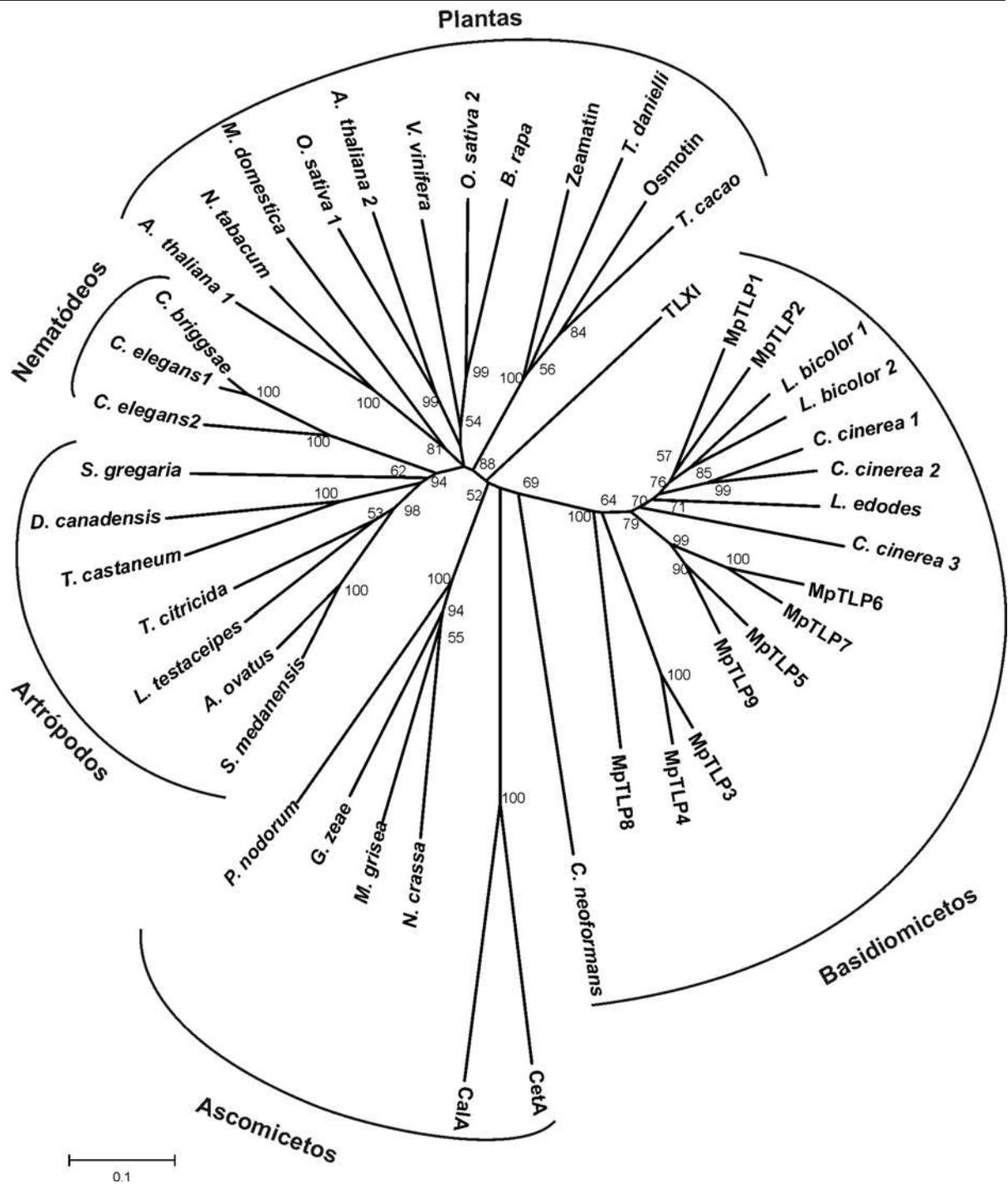


**Figura 14: Alinhamento de TLP1 com outras TLPs.** Em vermelho estão as lisinas descritas como possíveis sinalizadoras de sabor doce na taumatina de *T. danielli*. *L. edodes* – *Lentinula edodes* - (dbj|BAE95855.1|), *S. gregaria* - *Schistocerca gregaria* – (gb|AAR97603.1|), *A. thaliana* 2 – *Arabidopsis thaliana* - (ref|NP\_195579.2|), *T. danielli* – *Thaumatococcus danielli* – (dbj|BAF44567.1|), Osmotin – *Nicotiana tabacum* – (emb|CAA46623.1|) *C. elegans* 1 – *Caenorhabditis elegans* - ref|NP\_502362.1|.

---

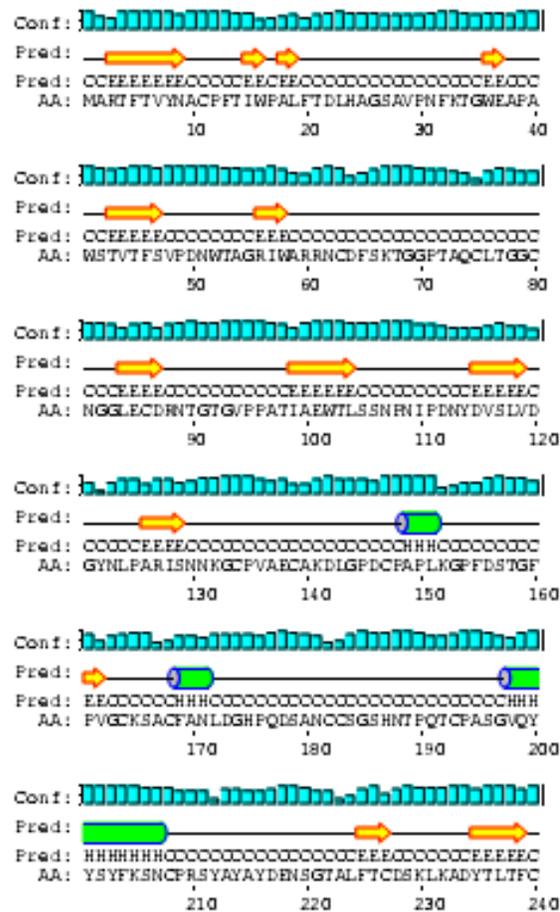
Pelo alinhamento foi possível verificar que nenhuma outra TLP além da taumatina de *T. danielli* possui lisinas alinhadas na posição das lisinas que corroboram para a sinalização de sabor doce (Kaneko e Kitabake, 2001). Curiosamente uma dessas lisinas está alinhada na posição de um aspartato importante para a atividade glucanólítica. Além da taumatina de *T. danielli* somente a proteína CetA de *A. nidulans* (Greenstein *et al.*, 2006) não possui todos os aminoácidos ácidos conservados no “acidic cleft”, o que indica que as TLPs possam ter atividade conservada em diversos organismos.

As 9 MpTLPs foram alinhadas com 36 seqüências de TLPs depositadas no banco de dados, sendo 7 TLPs de artrópodes, 3 de nematódeos, 13 de plantas, 6 de fungos ascomicetos e mais 7 TLPs de fungos basidiomicetos. O resultado desse alinhamento foi utilizado na construção de uma árvore filogenética. A filogenia separou as TLPs em cinco grandes grupos condizentes com a origem evolutiva dos organismos utilizados (figura 15). Este resultado também indicou que MpTLP1 e MpTLP2 são as TLPs de *M. pernicioso* mais similares as taumatinas de *L. bicolor* e *C. cinerea*. As outras 7 MpTLPs formam dois clados a parte, um mais próximo do grupo de MpTLP1 e MpTLP2 (contendo MpTLP5 a MpTLP9) e outro contendo MpTLP3 e MpTLP4. A presença de 9 taumatinas em *M. pernicioso*, enquanto que em outros dois agaricomycetos, existem 2 a 3 TLPs indica uma expansão dessa família gênica em *M. pernicioso* e sugere uma diversificação na função dessa família de proteínas em nosso microorganismo de estudo.



**Figura 15: Árvore filogenética das TLPs de fungos ascomicetos e basidiomicetos, artrópodos, nematódeos e plantas.** A topologia da árvore foi construída pelo método de *Neighbor joining* através do programa MEGA4. As distâncias entre sequências foram calculadas pelo modelo de distância *p*. Os números nos ramos indicam as porcentagens do teste de confiança de *Bootstrap* (10000 réplicas). Veja anexo 1 para informações sobre as sequências usadas.

A predição da estrutura secundária de MpTLP1 gerou um dado bem próximo ao citado na bibliografia (Leone *et al*, 2005), que descreve TLPs contendo uma grande quantidade de estruturas folhas- $\beta$  (figura 16).

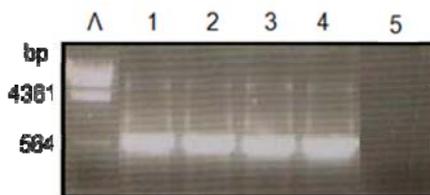


**Figura 16: Predição da estrutura secundária de MpTLP1.** Predição feita através do programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Setas amarelas: folhas- $\beta$ , cilindro verde:  $\alpha$ -hélice

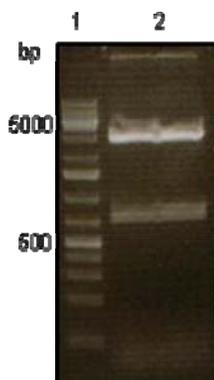
### 4.3- Clonagem do gene *MpTLP1*

Para dar início à clonagem do gene *MpTLP1*, oligonucleotídeos contendo seqüências reconhecidas por enzimas de restrições em suas terminações foram desenhados para a amplificação do fragmento. As mesmas enzimas foram utilizadas para introduzir o fragmento nos plasmídeos de expressão de proteínas. As primeiras amplificações se deram utilizando os quatro pares de oligonucleotídeos descritos no item 3.4.3 e a enzima *Taq High Fidelity* (Invitrogen, EUA). Para que houvesse ligação em pGEM-T Easy, seguimos orientação do

fabricante da polimerase que recomenda acrescentar cauda de adenina no começo e no final da seqüência. Para evitar problemas de metilação no sítio de restrição *Xba*I, a transformação do fragmento amplificado com o oligonucleotídeo contendo essa terminação foi feita em *E. coli* cepa GM2163, enquanto as demais foram inseridas em DH10B. Em paralelo, os plasmídeos para a expressão da proteína recombinante foram digeridos utilizando as mesmas enzimas de restrição usadas para digerir o plasmídeo pGEM-T Easy.



**Figura 17:** PCR do gene *MpTLP1* utilizando os 4 pares de oligonucleotídeos para as construções em pMALp2X (1), pET28a (2), pSW202 (3) e pPIC9K (4) e controle negativo (5).



**Figura 18:** 1- marcador de peso molecular 1Kb, 2- perfil de digestão com *Eco*RI de *MpTLP1* clonada em pGEM-T Easy .

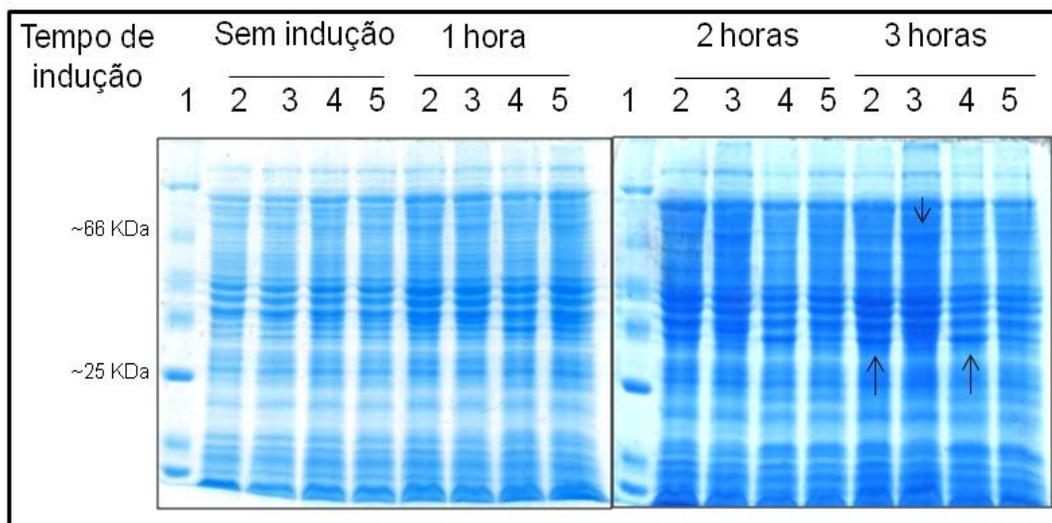
Após digestão, os fragmentos foram purificados com *Kit PureLink* (Invitrogen, EUA), e ligados em seus plasmídeos correspondentes, e novamente transformados em DH10B.

#### 4.4- Superexpressão da proteína *MpTLP1*

A partir de estudos com a seqüência de aminoácidos da proteína, juntamente com dados da literatura, definimos algumas estratégias para expressão da proteína. *MpTLP1* possui 16 cisteínas o que indica que podem ser formadas oito pontes dissulfeto em sua estrutura. Foram escolhidos plasmídeos de expressão com características especiais como pSW202 e pMALp2X, que

possuem seqüências sinalizadoras capazes de enviar a proteína formada para o periplasma, onde ocorre a formação das pontes dissulfeto em bactérias.

Em nosso primeiro experimento em pequena escala, utilizamos as construções pMalp2X-MpTLP1 nas cepas de *E.coli* BL21-TrxB e BL21-PRIL (figura 19).

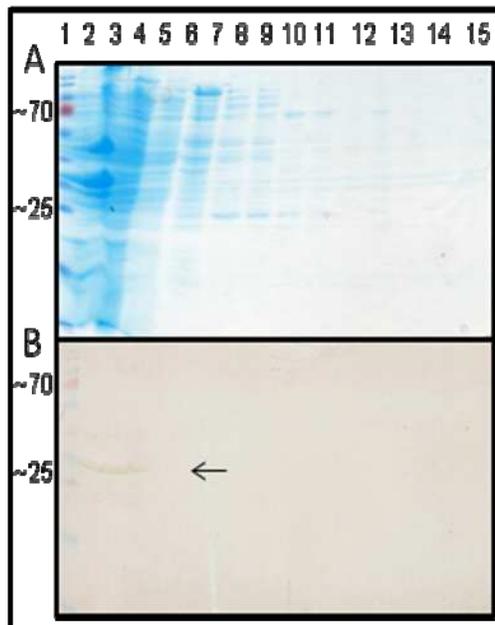


**Figura 19: Experimento de indução em pequena escala de MpTLP1.** SDS-PAGE contendo proteína total de *E. coli* BL21-TrxB (2 e 3) e BL21-PRIL (4 e 5) transformadas com plasmídeo pMALp2X (2 e 4) e pMALp2X -MpTLP1 (3 e 5). A expressão de proteína foi induzida com 0,3 mM de IPTG e o conteúdo celular foi coletado após 1, 2 e 3 horas de indução. 1 – marcador de peso molecular de proteína. Setas superiores indicam expressão de MpTLP1 recombinante ligada a MBP. Setas inferiores indicam MBP sendo expressa pelas bactérias transformadas com pMALp2X sem inserto.

Nesse experimento, observamos que a construção com pMALp2X em BL21-TRX-B obteve uma expressão mais eficiente. Optamos por testar as outras construções que são purificadas pela cauda de 6 histidinas. Após o experimento de expressão com as construções pET28a-MpTLP1 e pSW202-MpTLP1, observamos que a quantidade de MpTLP1 produzida com o tempo de indução de 3 horas não produzia uma quantidade suficiente de proteína. Desse modo, decidimos induzir as células por doze horas. Esta indução resultou em uma maior quantidade de proteína, porém, após a purificação, teste de solubilidade, e observação em gel SDS-PAGE, verificamos que a proteína se encontrava predominantemente em corpos de inclusão, o que nos levou a uma repetição do experimento em temperatura mais baixa (24°C) para que a proteína fosse produzida mais

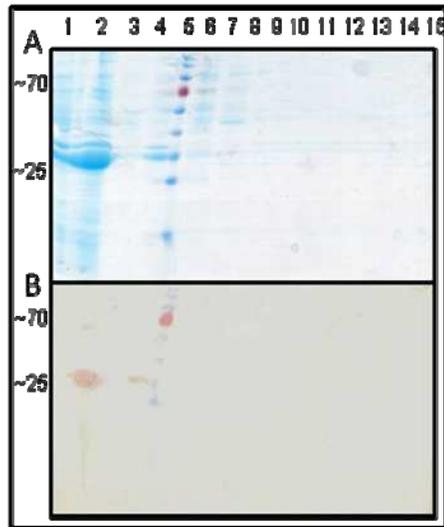
lentamente e ficasse em uma conformação mais favorável para sua solubilidade. Os resultados obtidos foram idênticos aos anteriores.

As figuras 20 e 21 mostram os experimentos de *Western blot*, cujos eluatos derivados da purificação via *His-Tag* de pET28a-MpTLP1 e pSW202-MpTLP1, foram incubados com anticorpo Anti-6xHis. Essa análise mostra que a proteína preponderante na fração insolúvel contém uma sequência Anti-6xHis, o que indica que essa se trata de MpTLP1.



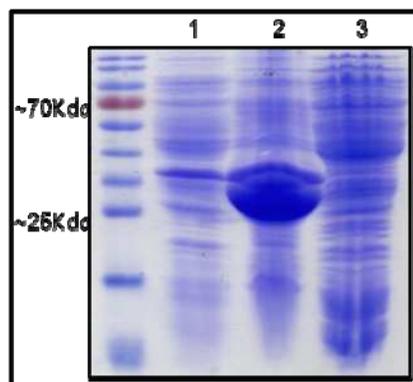
**Figura 20: Purificação por afinidade a His-Tag da proteína MpTLP1 e *Western blot* (construção pET28a-MpTLP1):** A: gel SDS-PAGE contendo diferentes etapas de purificação de MpTLP1. 1-marcador de peso molecular, 2- sem indução, 3-sedimento, 4- *flow through*, 5- Imidazol 5 mM, 6- Imidazol 25 mM, 7- Imidazol 50 mM, 8- Imidazol 100 mM-1; 9- Imidazol 100 mM-2; 10- Imidazol 100 mM-3, 11- Imidazol 100 mM-4, 12- Imidazol 100 mM-5, 13- Imidazol 200 mM-1, 14- Imidazol 200 mM-2, 15- Imidazol 500 mM; B: *Western blot* contendo proteínas presentes na figura A, utilizando anticorpo Anti His-Tag.

Para a purificação de MpTLP1 a partir da construção pSW202-MpTLP1, foi executado um experimento de choque osmótico, que propicia a quebra da parede celular bacteriana e liberação do conteúdo periplasmático. Em todos os experimentos de choque osmótico foi evidenciada a turbidez do tampão, indicando a precipitação da proteína recombinante. O tampão de choque osmótico foi submetido a centrifugação a 9000 X g durante 20 minutos. O sedimento foi então separado do sobrenadante, o que gerou as amostras 3 e 4 mostradas na figura 15. Esse resultado indicou que a maior parte da proteína MpTLP1 expressa através da construção pSW202-MpTLP1 ficou insolúvel seja na fração intercelular quanto no periplasma bacteriano.



**Figura 21: Purificação por afinidade a His-Tag da proteína MpTLP1 e Western blot (construção pSW202-MpTLP1):** A: gel SDS-PAGE contendo diferentes etapas de purificação de MpTLP1. 1-sem indução, 2-sedimento, 3- líquido periplasmático, 4-sedimento do choque osmótico, 5-marcador de peso molecular, 6-Imidazol 5 mM, 7- Imidazol 25 mM, 8- Imidazol 50 mM 1; 9- Imidazol 100 mM-1; 10- Imidazol 100 mM-2, 11- Imidazol 100 mM-3, 12 Imidazol 100 mM-4 ,13- Imidazol 100 mM-5, 14- Imidazol 200 mM-1 , 15- Imidazol 200 mM-2. B: *Western blot* contendo proteínas presentes na figura A, utilizando anticorpo Anti 6xHis-Tag.

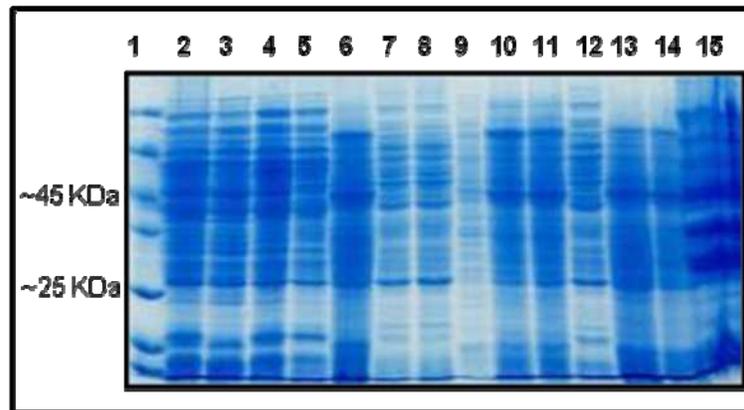
Todas as tentativas de expressão em *E.coli* resultaram em MpTLP1 na fração insolúvel. Foi observado que a cepa de *E.coli* BL21-C41 quando transformada com a construção pET28a-MpTLP1, produziu maior quantidade da proteína (figura 22). Essa construção foi então utilizada para tentativa de obtenção da proteína em seu estado nativo. Para eliminar a dúvida de que a cauda de histidina existente nessa construção poderia estar atrapalhando no enovelamento da mesma, testes de renaturação também foram realizados com a construção em MpTLP1- pET29a.



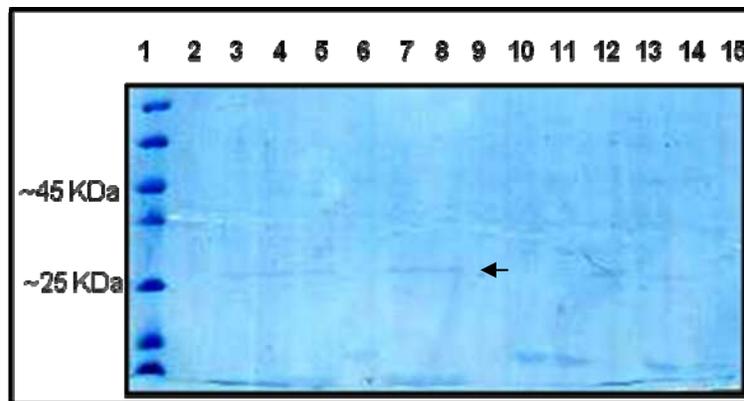
**Figura 22. Indução de MPTLP1 em pET28a *E.coli* BI21- C41:** 1- Sem indução 2- fração insolúvel, 3- fração solúvel

Tentativas de expressão da proteína em *P. pastoris* em sua forma solúvel também foram realizadas. A transformação de *P. pastoris* GS115 foi confirmada através de crescimento em placas contendo meio seletivo (HIS-) e posteriormente

através de PCR de colônia. Logo após, teste Mut<sup>+</sup> e Mut<sub>s</sub> foram realizados, resultando em 1 colônia de cada condição (colônia 1 = Mut<sup>+</sup>; colônia = 28 Mut<sub>s</sub>). Essas colônias foram submetidas a teste de indução em pequena escala.



**Figura 23. Fração intracelular da indução de *P. pastoris* contendo *MpTLP1*** 2 a 8: colônia 1, 9 a 15, colônia 28. 1 : marcador de peso molecular, 2: Sem indução, 3: 1 dia de indução, 4: 2 dias de indução, 5: 3 dias de indução, 6: 4 dias de indução, 7: 5 dias de Indução, 8: 6 dias de indução, 9 Sem indução, 10: 1 dia de indução, 11: 2 dias de indução, 12: 3 dias de indução, 13: 4 dias de indução, 14: 5 dias de indução, 15: 6 dias de indução.

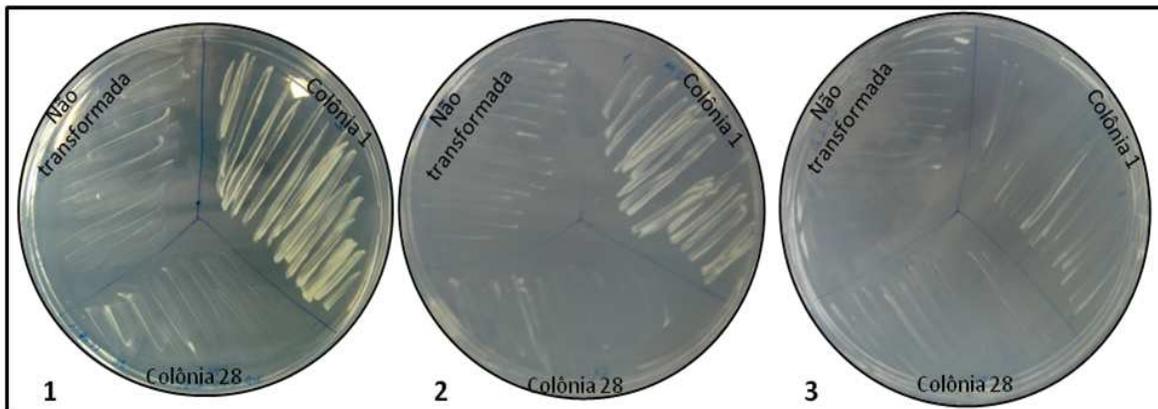


**Figura 24: Fração extracelular da indução de *P. pastoris* contendo *MpTLP1*** . 2 a 8: colônia 1; 9 a 15, colônia 28 . 1: marcador de peso molecular, 2: Sem indução, 3: 1 dia de indução, 4: 2 dias de indução, 5: 3 dias de indução, 6: 4 dias de indução, 7: 5 dias de Indução, 8: 6 dias de indução, 9 Sem indução, 10: 1 dia de indução, 11: 2 dias de indução, 12: 3 dias de indução, 13: 4 dias de indução, 14: 5 dias de indução, 15: 6 dias de indução.

Na figura 23, correspondente a fração intracelular da indução, não foi observada nenhuma banda diferencialmente expressa, o que já era esperado, já que o plasmídeo contém um peptídeo sinal, responsável pela expressão da proteína extracelular. Na figura 24 que mostra a fração extracelular da indução de

MpTLP1-pPIC9K em *P. pastoris*, observamos uma banda diferencialmente expressa próxima à altura de 25KDa, que pode corresponder a MpTLP1.

Como não observamos nenhuma banda induzida com tamanho esperado advindo da indução com a colônia 28, esta levedura “transformante” e a colônia 1 foram novamente riscadas em meio de cultura MM e MD (2% glicose, 5% glicose) sem histidina (marca de seleção de pPIC9K). Um controle, pPIC9K GS115 sem transformação também foi inoculado nesse meio como controle (figura 25).



**Figura 25: Teste de confirmação de transformante em *P. pastoris* GS115:** 1- colônias riscadas em MD glicose 5%, 2- colônias riscadas em MD glicose 2%, 3- colônias riscadas em MM .

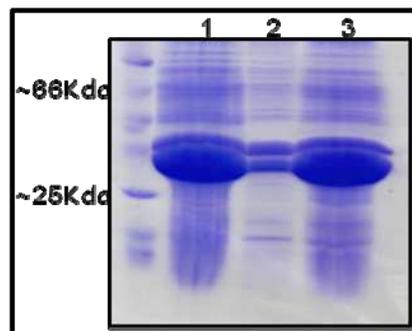
O resultado indica que a colônia 28 é um falso-positivo, já que não houve crescimento em meio sem histidina. A colônia 1 é um transformante real, pois foi capaz de crescer sem histidina. Esse dado reforça o resultado na figura 24, sugerindo que a banda indicada é MpTLP1. Tentativas de indução em larga escala foram realizadas, porém sem sucesso, já que o inóculo não atingia massa celular adequada para uma indução em meio de cultura. Devido a esses problemas na indução de MpTLP1 em *P. pastoris* resolvemos seguir com os experimentos de desnaturação/renaturação de MpTLP1 expressa em *E. coli*.

#### **4.5- Desnaturação e renaturação de MpTLP1:**

As tentativas de renaturação da proteína foram feitas através da expressão de MpTLP1 em pET28a em *E.coli* BL21 C41, já que essa foi a construção que

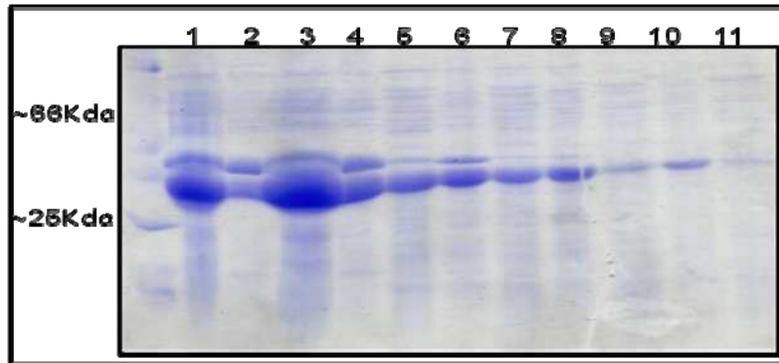
mais produzia MpTLP1. Primeiramente, testamos um protocolo citado por Hu e Reddy (1997), com adaptações a condições de nosso laboratório. O tampão utilizado para desnaturação protéica continha 8 M uréia, 50 mM Tris pH 8,0, 19 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT 0,2M e arginina.

A figura 26 mostra que grande parte de MpTLP1 foi desnaturada com sucesso, e esse material foi utilizado para tentativas de ressolubilização da proteína através de diálises para retirada do agente desnaturante (uréia) de forma gradativa como descrito no tópico 3.8.1

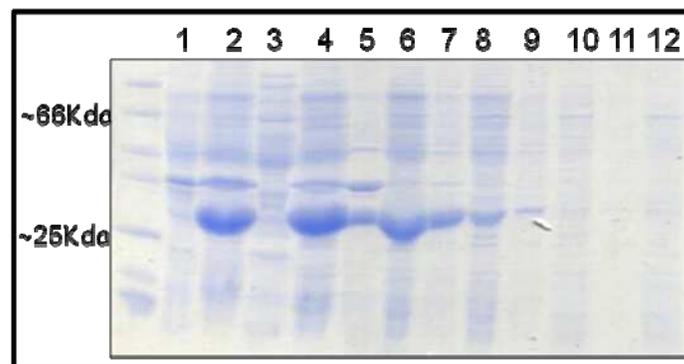


**Figura 26. Desnaturação de MpTLP1 pela metodologia descrita em 3.8.1** : 1- fração insolúvel da indução; 2- sedimento após incubação com tampão uréia 8M; 3- Sobrenadante após incubação com solução Uréia 8M

A cada troca de solução com menores concentrações de uréia ocorreu a precipitação de parte da proteína. Ao final da diálise a 0 M Uréia, não foi possível observar a presença de MpTLP1 na solução correspondente a fração solúvel (figura 27) Para nos certificarmos de que a cauda de histidina presente na proteína expressa não estaria prejudicando a renaturação da proteína, o mesmo método foi testado com a proteína sem a cauda, expressa em pET29a (figura 28)



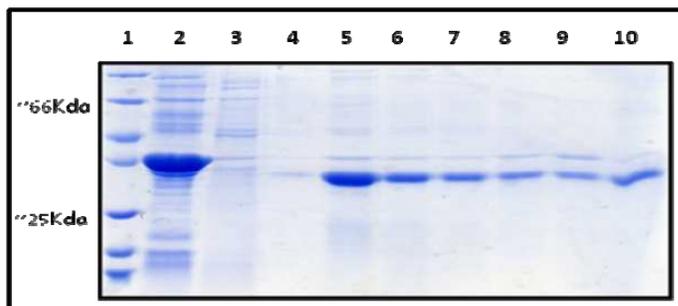
**Figura 27: Renaturação de MpTLP1 pela metodologia descrita em 3.8.1:** 1- Fração insolúvel da indução; 2- sedimento em 6M de uréia; 3- sobrenadante 6M de uréia; 4- sedimento em 4M uréia; 5- sobrenadante em 4M Uréia; 6- sedimento em 2M de uréia; 7- sobrenadante de 2M de uréia; 8- sedimento em 1M de uréia; 9- sobrenadante em 1M de uréia; 10- sedimento em 0,5M de uréia; 11- sobrenadante em 0,5M de uréia.



**Figura 28: Teste de renaturação de MpTLP1 em pET29a:** 1- Sem indução; 2- fração insolúvel da expressão; 3- fração solúvel da expressão; 4- sobrenadante em 6M de uréia ; 5- sedimento em 4M de uréia; 6- Sobrenadante 4M uréia; 7- sedimento em 2M de uréia; 8- sobrenadante em 2M de uréia; 9- sedimento em 1M de uréia; 10- sobrenadante em 1M de uréia; 11- sedimento em 0,5M de uréia; 12- sobrenadante em 0,5M de uréia.

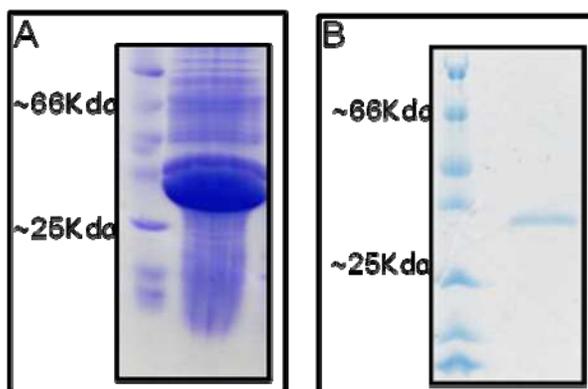
Um fato que deve ser levado em consideração é que nesse experimento, a proteína MpTLP1 não foi purificada, e, portanto, a desnaturação e renaturação de MpTLP1 pode ter sofrido interferência de outras proteínas celulares presentes no sistema de renaturação. Pensando nisso, o próximo experimento foi feito com a inclusão do passo de purificação de MpTLP1 por coluna de afinidade Ni-NTA em condição desnaturante, excluindo DTT do tampão. A nova tentativa de obtenção de MpTLP1 solúvel foi feita como descrito por Hu e Reddy, (1997), que utilizou sistema de glutationa oxidada e reduzida na tentativa de estabelecimento de

pontes dissulfeto de taumatinas de *A. thaliana*. Primeiramente, purificamos MpTLP1 em coluna de afinidade (figura 29).



**Figura 29: Purificação de MpTLP1 desnaturada em 8M de Uréia, purificado em coluna de afinidade Ni-NTA.** 1- marcador de peso molecular, 2- *Flow-through*, 3- 25 mM Imidazol, 4- 50 mM Imidazol, 5- 100 mM Imidazol, 6- 200 mM Imidazol (1), 7- 200 mM Imidazol (2), 8- 200 mM Imidazol (3), 9- 200 mM Imidazol (4), 10- 200 mM Imidazol (5).

As frações que continham MpTLP1 pura foram submetidas a diálises consecutivas e ao final do procedimento o resultado obtido foi semelhante ao descrito anteriormente, não resultando em MpTLP1 solúvel sem agente desnaturante (uréia). Paralelamente, diálises para retirada total de uréia e glutathione foram realizadas com o intuito da obtenção da proteína purificada em estado insolúvel para confecção de anticorpo anti-MpTLP1. Curiosamente, essa tentativa resultou em uma parcela de proteína em estado solúvel. A figura 30 compara a quantidade inicial de MpTLP1 total produzida no experimento de indução, e a quantidade de MpTLP1 resultante do processo de desnaturação e renaturação.



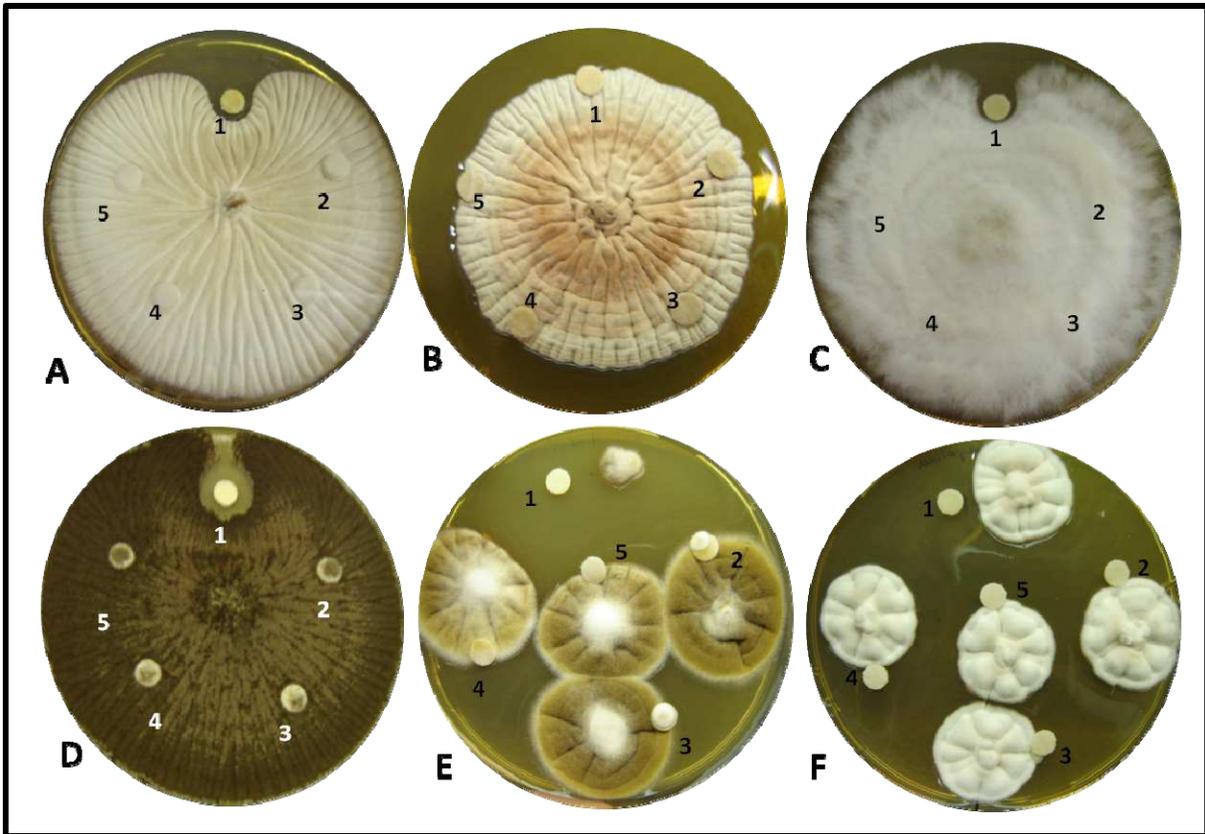
**Figura 30: Obtenção de MpTLP1 solúvel:** A) A: gel SDS-PAGE contendo 5µl de extrato proteico da indução desnaturada; B: gel SDS-PAGE contendo 10µl da proteína purificada e renaturada da indução.

---

Na tentativa de renaturação segundo Campos *et al.*, (2008), a solução de MpTLP1 obtida através das diálises consecutivas em 200 mM Tris-HCl, pH7,5; 500 mM NaCl não suportou a concentração do volume e sofreu precipitação.

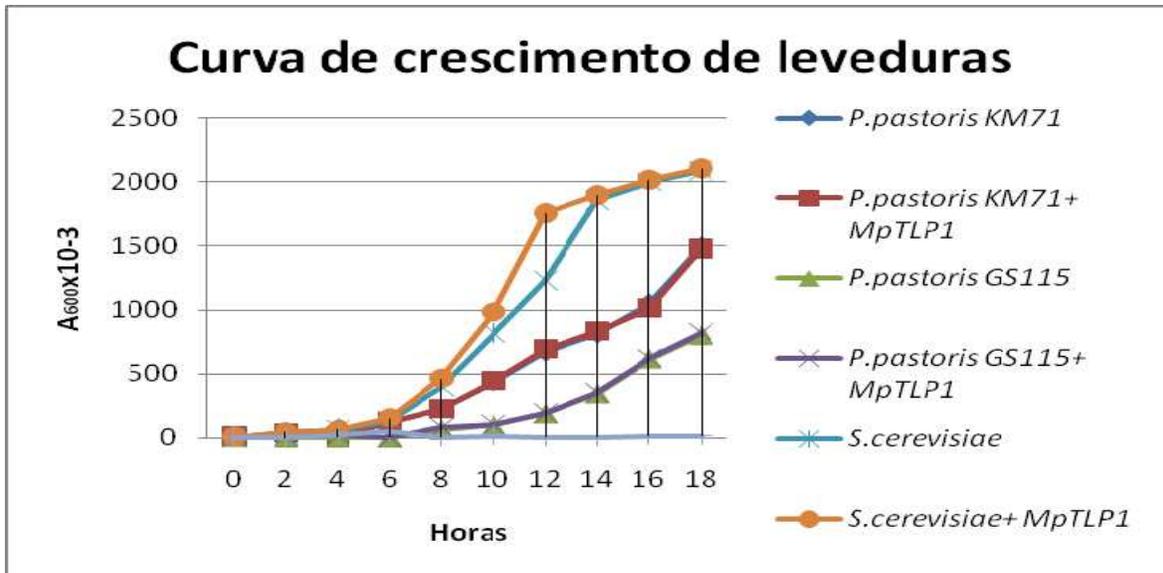
#### **4.6- Teste de atividade antifúngica de MpTLP1**

Experimentos foram montados com o intuito de verificarmos a existência de atividade antifúngica e enzimática de MpTLP1. Primeiramente, testamos a possível atividade inibitória de MpTLP1 ao crescimento de fungos filamentosos (*Alternaria alternata*, *Curvilaria eragrostides*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspegillus fumigatus*, e também *Moniliophthora pernicioso*). Concentrações crescentes de MpTLP1 foram adicionadas a discos de papel de filtro estéreis posicionados a uma distância de 1 cm do ponto de inoculação dos fungos na placa. Os experimentos também contaram com um controle positivo (Nistatina) e um controle negativo (tampão de diluição de MpTLP1). Esses testes foram feitos em 4 repetições, sendo que nas 2 primeiras, as doses de MpTLP1 utilizadas foram de 3, 6 e 12 µg de proteína. Os testes subseqüentes foram feitos com maiores quantidades de proteína (10, 20 e 30 µg). Para todos os fungos não foi possível constatar uma ação antifúngica clara de MpTLP1. Em nenhum dos casos observamos formação de halo de inibição de crescimento fúngico em quaisquer das concentrações de MpTLP1 utilizadas (figura 31). Além disso, verificamos se essa proteína poderia exibir atividade fungicida (se ela é capaz de matar o fungo após seu crescimento estabelecido). Após crescimento total do fungo em placas, adicionamos o papel de filtro e pingamos concentrações crescentes de MpTLP1, controle negativo e controle positivo. Nenhuma atividade foi observada.



**Figura 31: Teste de atividade antifúngica de MpTLP1 em fungos filamentosos.** A) *Aspergillus fumigatus*, B) *Aspergillus nidulans*, C) *Moniliophthora perniciososa*, D) *Aspergillus niger*, E) *Alternaria alternata*, F) *Curvularia eragrotides*. 1- Controle positivo (Nistatina 5000u), 2- 30ug de MpTLP1, 3 - 20ug de MpTLP1, 4- 10ug de MpTLP1, 5 – Tampão da proteína (100ul).

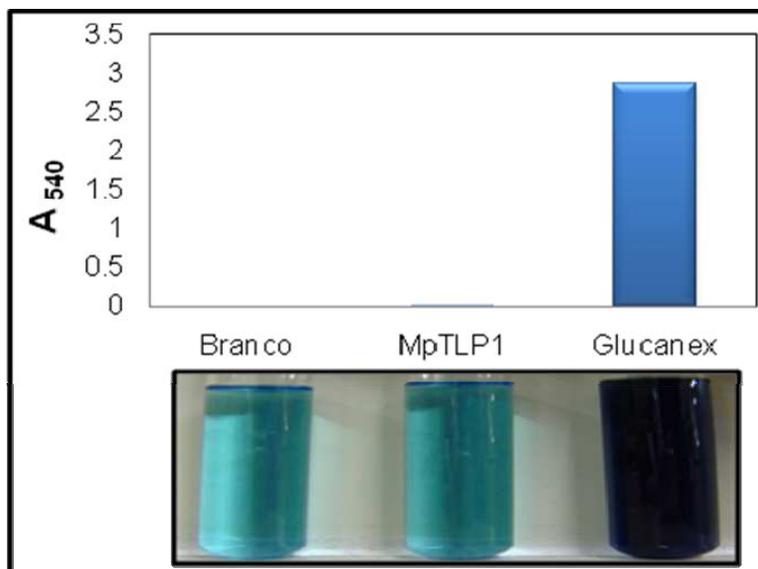
Para fungos leveduriformes (*P. pastoris* e *S. cerevisiae*), o teste de atividade antifúngica se deu através de curva de crescimento feita em cultura em YPD + 1,6 ug/ml de MpTLP1. Foi utilizada Nistatina (2000U) como controle positivo de inibição de crescimento. Não foi observada a diminuição do crescimento das leveduras em presença de MpTLP1 (figura 32).



**Figura 32: Curva de crescimento de leveduras.** As leveduras contendo e não contendo MpTLP1 foram crescidas durante 18 horas, e seu crescimento foi acompanhado através de medições da absorbância ( $A_{600}$ ) a cada 2 horas.

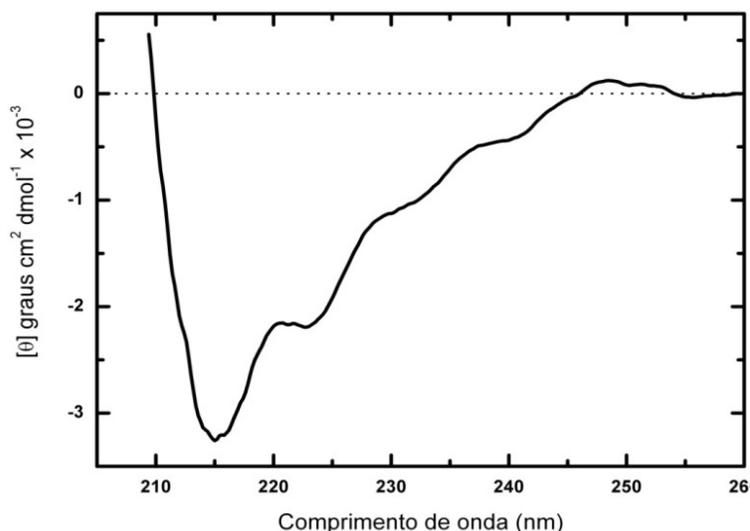
Foram executados experimentos para verificar se MpTLP1 apresenta atividade  $\beta$ -glucanólítica (teste de Somogyi-Nelson) utilizando laminarina como substrato. Esse teste é capaz de medir a liberação de açúcares residuais derivados da quebra de um açúcar contendo ligações do tipo  $\beta$  1-3. O composto Glucanex (300U/g de  $\beta$ -glucanase de *Trichoderma* sp.) foi utilizado em um controle positivo de reação. A leitura da absorbância ( $A_{540}$ ) indicou que MpLTP1 não apresentou atividade  $\beta$ -glucanólítica. (figura 33).

Devido aos resultados negativos para ação anti-fúngica e  $\beta$ -glucanólítica decidimos verificar a conformação estrutural de MpTLP1 após ter sofrido desnaturação e renaturação. Esses processos podem não ter sido eficientes no enovelamento da proteína, resultando em uma conformação molecular alterada, o que poderia afetar a sua atividade enzimática.



**Figura 33: Teste Somogyi- Nelson para atividade  $\beta$ -glucanolítica de MpTLP1:** Painel superior: gráfico gerado pela absorbância em 540nm para medida de glicose presente da amostra. Painel inferior: imagem do teste.

Experimento de dicroísmo circular (CD) gerou uma curva de absorbância, que mostra que a proteína apresenta predominantemente folhas  $\beta$  em sua estrutura (mínimo em 215 nm). O gráfico gerado (figura 34), quando comparado ao gráfico publicado por Masuda *et al.* (2004) apresenta uma diferença em relação à absorção a 230 nm, o que pode representar a falta de algumas ligações que poderiam mudar a conformação da proteína, prejudicando assim sua atividade enzimática.



**Figura 34: Dicroísmo circular (CD) de MpTLP1**

Dados de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) indicaram que MpTLP1 em solução apresenta um peso molecular aproximado de 126 KDa (figura 35). A seqüência da proteína recombinante (MpTLP1 sem peptídeo sinal mais 6XHis tag), indica um peso molecular de 28,607 KDa. Analisando esses dados, podemos dizer que na solução de trabalho, MpTLP1 está formando tetrâmeros, já que o peso molecular estimado por DLS foi de aproximadamente 4 vezes maior que o peso molecular de um monômero da proteína. Pela literatura, TLPs são monoméricas. Logo, a formação de tetrâmeros em solução poderia estar afetando a capacidade enzimática de MpTLP1. Além disso, não foi possível concentrar a proteína além de 0,2 mg/ml. Quando esta é submetida a técnicas para concentração (p.e., diálise reversa em PEG 8000), ela rapidamente forma agregados e precipita. Podemos então concluir que a renaturação da proteína não foi totalmente eficaz para garantir sua estrutura nativa e seu funcionamento enzimático.

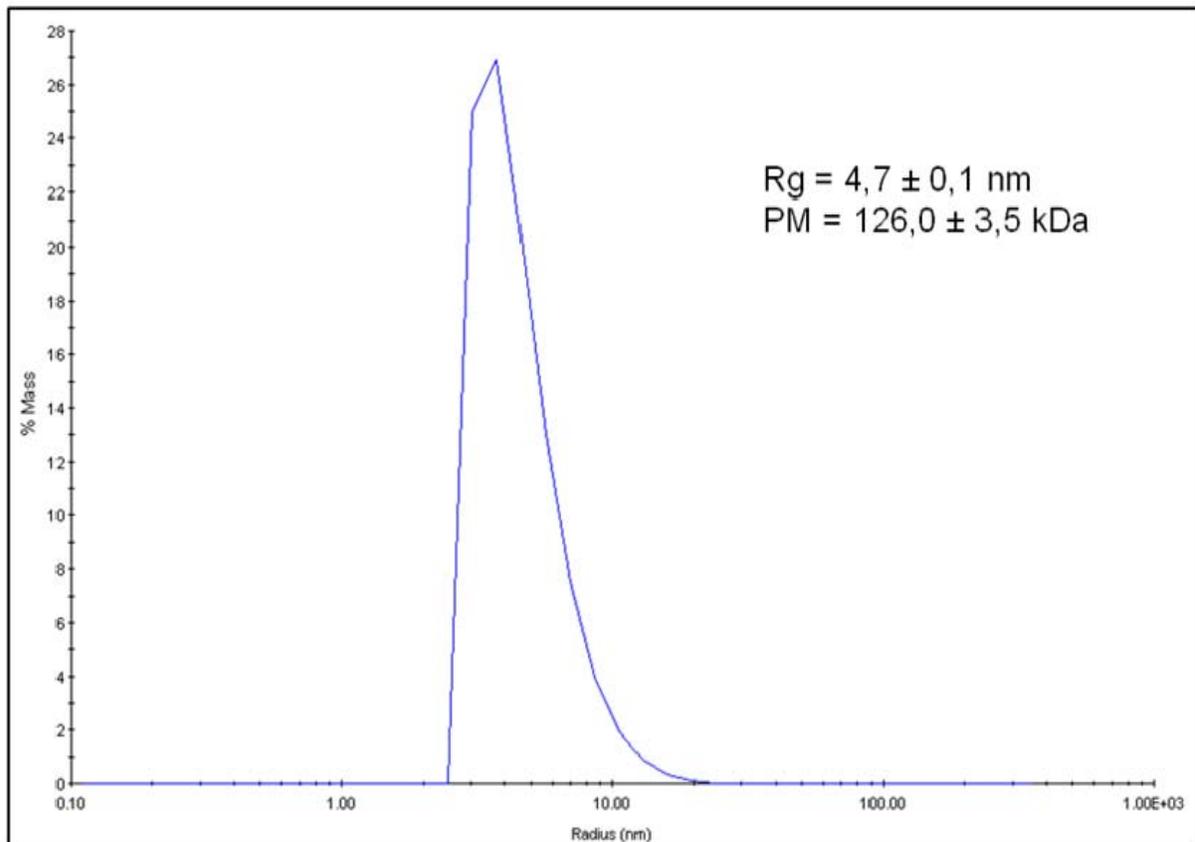


Figura 35: Espalhamento dinâmico de luz (DLS) de MpTLP1

A título de comparação fizemos a estimação da estrutura terciária de MpTLP1 através do programa de modelagem online CPHmodels-2.0 *Server - prediction results* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>). Para isso, fizemos um alinhamento de MpTLP1 com as TLP com estrutura resolvida através de cristalografia. A comparação da seqüência entre elas mostra que MpTLP1 é mais parecida com Pru av 2 de *Prunus avium*, como mostra o alinhamento entre as seqüência de TLPs com estrutura resolvida (figura 36). A seqüência de Pru av 2 foi então utilizada como molde para o programa, resultando num modelo estrutural para MpTLP1 (figura 37).

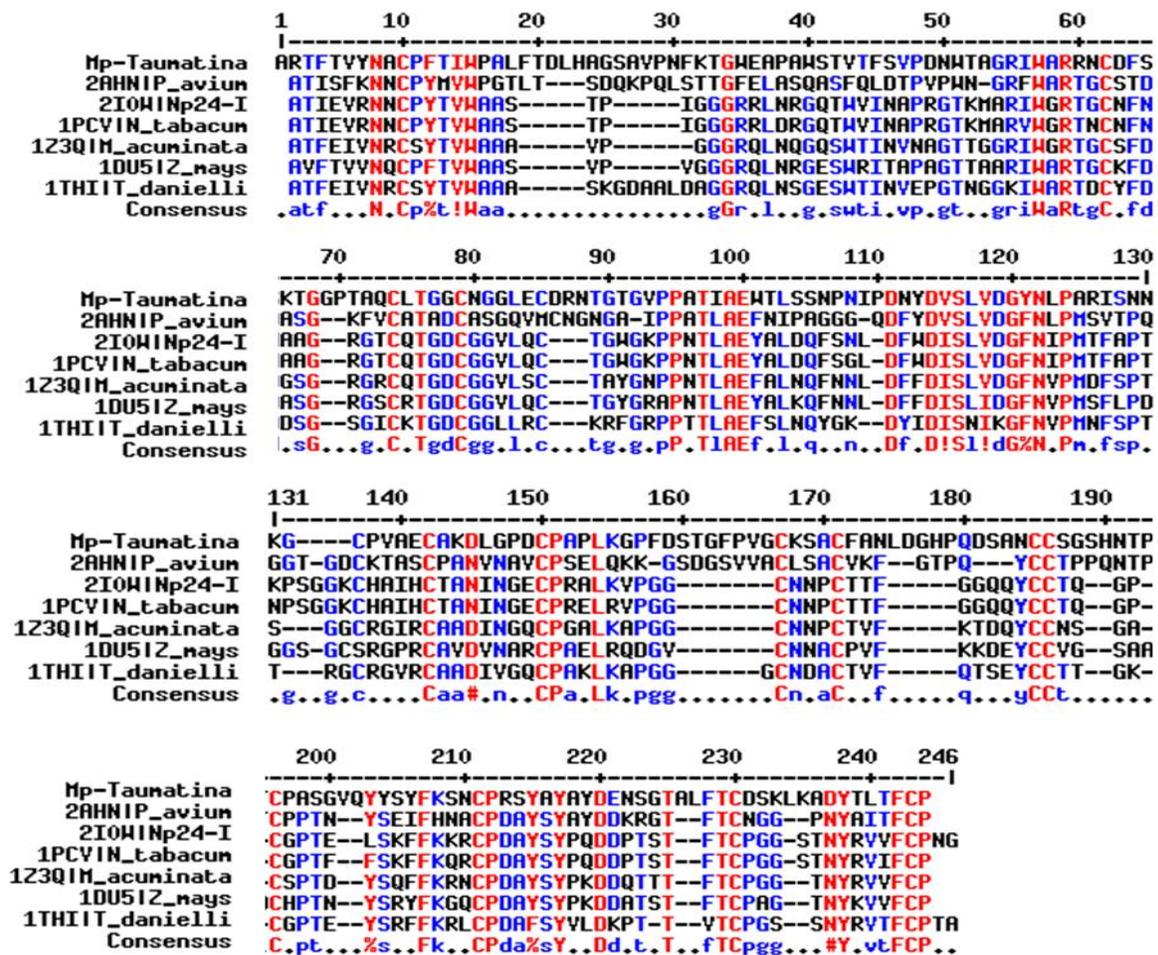
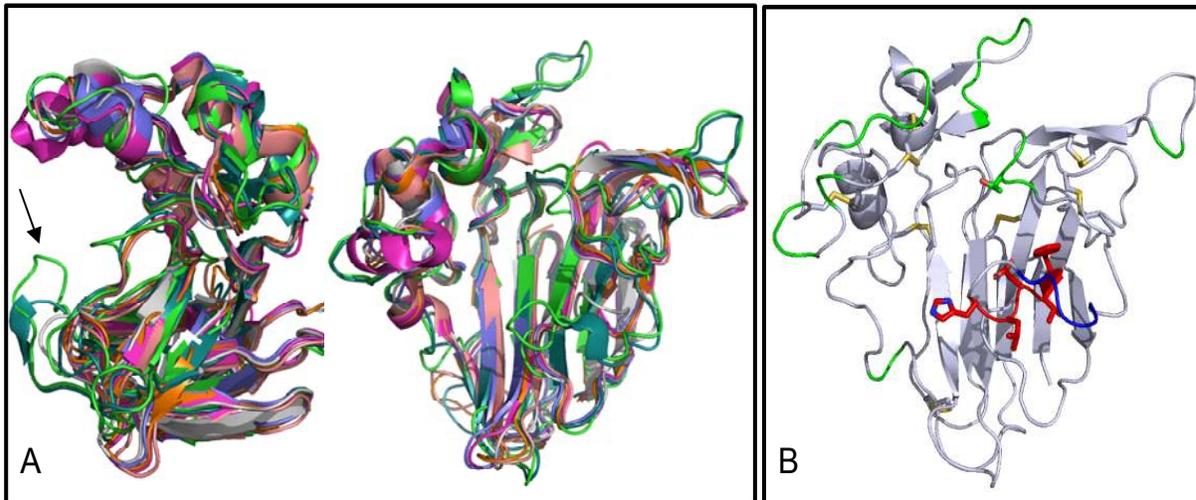


Figura 36: Alinhamento de TLPs que possuem estrutura terciária resolvida e MpTLP1. MpTLP1 de *Moniliophthora perniciosa*, 2AHN (Pru av 2) de *Prunus avium*: 2IOW (NP24-I) de *Lycopersicon esculentum*, 1PCV (PR-5d) de *Nicotiana tabacum*, 123Q (BanTLP) de *Musa acuminata*, 1DU5 (Zlp) de *Zea mays*, 1THI (Taumatina-1) de *Thaumatococcus danielli*. Vermelho: alto consenso, azul: baixo consenso

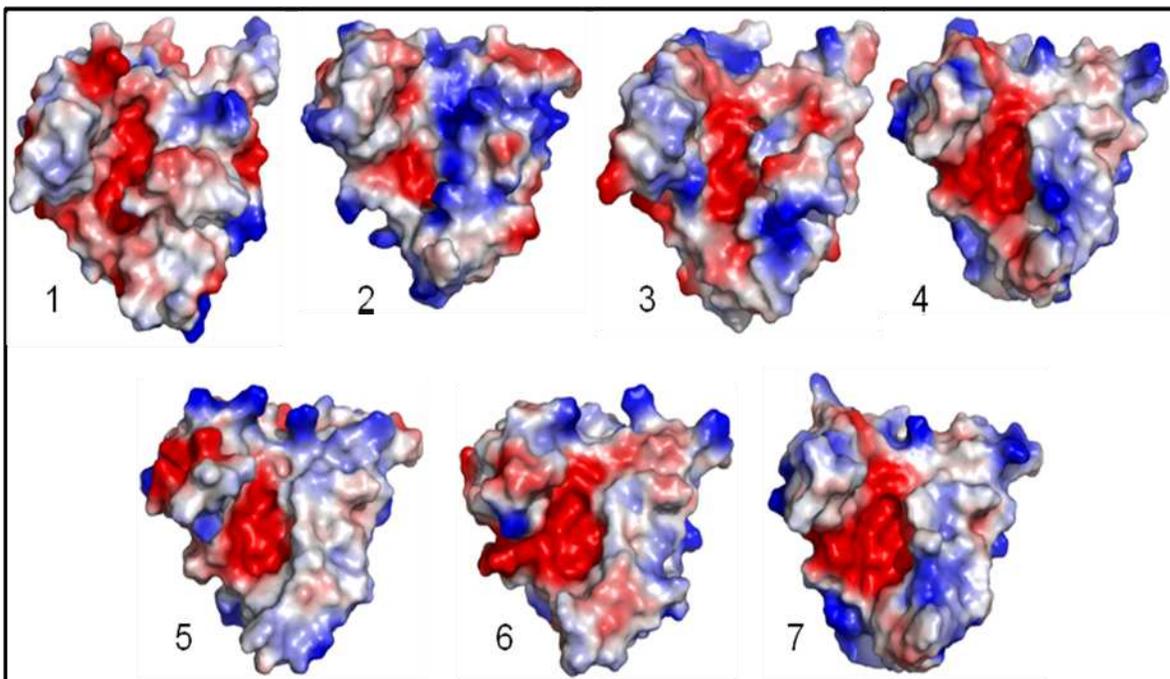


**Figura 37: Estrutura terciária de MpTLP1 modelada por *CPHmodels-2.0 Server - prediction results***

Em seguida, comparamos a estrutura terciária de MpTLP1 com todas as TLPs com estrutura terciária resolvida (figura 38). Podemos notar que MpTLP1 possui loops a mais que as demais TLPs. Foram utilizadas para comparação: Taumatina1 de *Thaumatococcus danielli* (van der Wel, 1975), Pru av 2 de *Prunus avium* (Dall'Antonia *et al.*, 2005), NP24-I de *Lycopersicon esculentum* (Ghosh e Chakrabarti, 2005), Zeamatina de *Zea mays* (Batalia *et al.*, 1996), Ban TLP de *Musa acuminata* (Leone *et al.*, 2006), osmotina de *Nicotiana tabacum* (Min *et al.*, 2004). A superfície eletrostática dessas proteínas também foram observadas e comparadas, através da utilização do software *PyMOL* (figura 39)



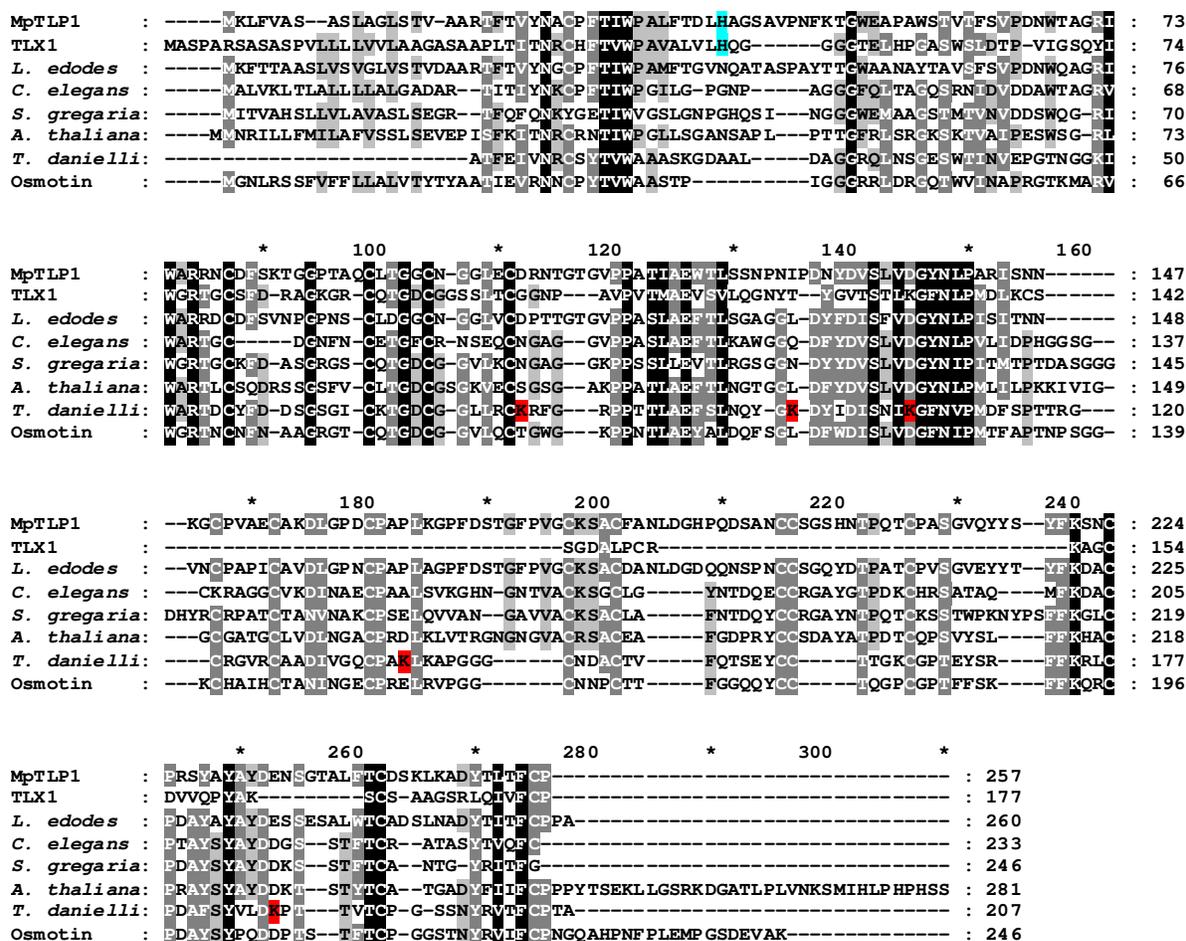
**Figura 38: Comparação da estrutura terciária de MpTLP1 com outras TLPs com estruturas resolvidas.** A- TLPs e MpTLP1 sobrepostas, vista em 2 ângulos: verde: MpTLP1, Rosa: Zlp, Salmão: PR-5d, Azul: Ban-TLP, Laranja: NP24-I, Ciano: Pru av 2 B- Destaque para regiões que se mostram diferente das demais TLPs. Seta indica alça a frente do *acidic cleft*



**Figura 39: comparação da superfície eletrostática de MpTLP1 com outras TLPs obtidas através do software *Pymol*.** 1: MpTLP1 de *Moniliophthora perniciosa*, 2: Taumatina de *Thaumatococcus daniellii*, 3: Pru av 2 de *Prunus avium*, 4: NP24-I de *Lycopersicon esculentum*, 5: Zlp de *Zea mays*, 6: BanTLP de *Musa acuminata*, 7: PR-5d de *Nicotiana tabacum*

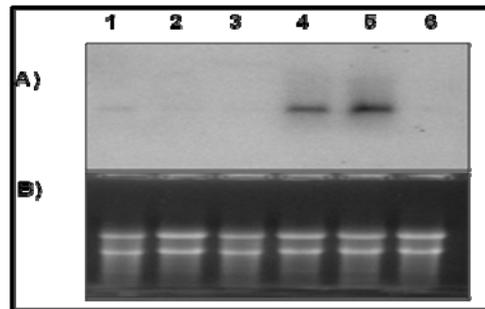
Podemos observar na figura acima que a região que corresponde ao *acidic cleft* de MpTLP1 possui uma alça em frente a entrada (seta indicada). Dentre as regiões observadas, é a que apresenta maior diferenciação nessa região. Essa

alça é formada pelo *loop* 1 da proteína, região marcada em vermelho na figura 34-B. Essa região se tornou ainda mais importante para nosso estudo após a publicação do trabalho de Roubouts *et al* (2008), onde o autor atribui uma nova atividade a um resíduo de histidina presente nessa *loop* de uma proteína inibidora de xilanase similar a taumatina, nomeada como TLXI (Fierens *et al.*, 2007). MpTLP1 também possui essa histidina no *loop* 1, não sendo observada em nenhuma outra seqüência de TLPs (figura 40), inclusive as de *M. perniciososa* (figura 12).

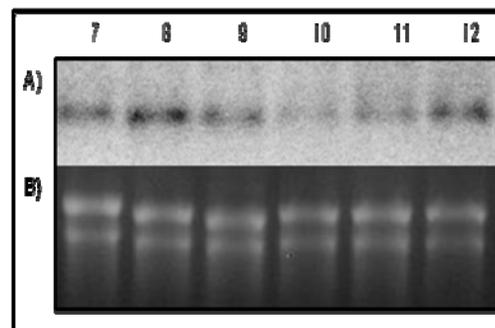


**Figura 40: Alinhamento de MpTLP1 com outras TLPs.** Em azul destaque para o resíduo de histidina responsável pela atividade inibidora de xilanase de TLXI (Roubouts *et al.*, 2008) presente também em MpTLP1. Em vermelho estão as lisinas descritas como possíveis sinalizadoras de sabor doce na taumatina de *T. danielli*.

Os experimentos de indução da expressão gênica de *MpTLP1* realizados até o momento correspondem a culturas de micélios na fase necrotrófica. Os ensaios foram executados conforme descrito no tópico 3.17. O RNA dos micélios foi extraído e aplicado em gel de agarose-formaldeído ideal para ensaios de *Northern blot*. O primeiro experimento mostra um considerável aumento da expressão gênica de *MpTLP1* em presença de extrato de cacau em relação ao controle (crescimento em meio mínimo + glicose) (figura 41). No segundo experimento, medimos o comportamento da expressão gênica submetida a estresse oxidativo com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em concentrações crescentes (2,5 mM; 5 mM; 10 mM). Nesse caso, nos micélios incubados com 2,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve um aumento na expressão gênica de *MpTLP1*. Porém, quando adicionamos a concentração de 10 mM, ocorreu uma diminuição no nível de expressão. Esse resultado pode ser derivado da sensibilidade do fungo *M. perniciosus* a altas concentrações de peróxido (figura 42), o que pode ter causado uma inibição da transcrição de *M. perniciosus*. Também foi adicionado aos micélios ácido salicílico (SA), em concentrações crescentes (1 mM e 2 mM). Foi possível observar um pequeno aumento no nível de indução de expressão de *MpTLP1* com 2 mM de SA. Como o SA é uma molécula sinalizadora de defesa em plantas que induz a expressão de TLPs, esse resultado pode ser relacionado com a indução de *MpTLP1* pelo extrato de cacau. Como este extrato é derivado de um exsudato que contém moléculas pequenas (filtrado de macerado de cacau dialisado em membrana de poro 12KDa), pode ser que exista SA em sua composição. De todo modo, esse resultado é bastante interessante, o que nos permite sugerir a existência de uma via em comum de indução de TLPs dependente de SA em plantas e fungos, além de reforçar nossa hipótese de que *MpTLP1* possa participar ativamente da interação planta-patógeno.

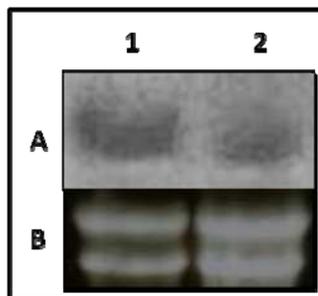


**Figura 41: Northern blot do gene *MpTLP1* em micélios necrotróficos crescidos em presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.** *M. perniciosa* foi crescido em meio mínimo - MM (KCl + MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>) + 1% Glicose e 0,6% NaNO<sub>3</sub> durante 3 semanas. O meio foi trocado, os micélios foram crescidos durante 24 horas, depois coletados para extração de RNA. O novo meio continha todos os componentes do meio mínimo mais: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> (controle1); 2: 2% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 3: 3% glicerol + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 4 : extrato de cacau suscetível + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 5: extrato de cacau resistente + 0,6% NaNO<sub>3</sub>; 6: 1% glicose + 2% BSA; A) *MpTLP1* hibridizado com RNA de *M. perniciosa* . B) gel de agarose- formaldeído corado com brometo de etídeo, utilizado como controle de quantidade de RNA presente no *Northern blot*.



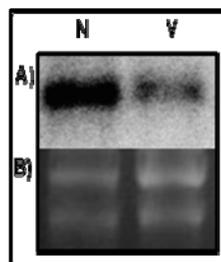
**Figura 42: Northern blot do gene *MpTLP1* em micélios necrotróficos crescidos em presença de moléculas sinalizadoras de defesa em plantas.** *M. perniciosa* foi crescido em meio mínimo - MM (KCl + MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>) + 1% Glicose e 0,6% NaNO<sub>3</sub> durante 3 semanas. O meio foi trocado, os micélios foram crescidos durante 24 horas, depois coletados para extração de RNA. O novo meio continha todos os componentes do meio mínimo mais: 7: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> (controle2); 8: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5mM; 9: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM; 10: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM; 11: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + Ácido salicílico 1mM, 12: 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> + Ácido salicílico 2mM. A) *MpTLP1* hibridizado com RNA de *M. perniciosa* . B) gel de agarose - formaldeído corado com brometo de etídeo, utilizado como controle de quantidade de RNA presente no *Northern blot*

Para verificarmos que o gene *MpTLP1*, além de ser induzido por extrato de cacau, é reprimido por glicose, um experimento inverso ao demonstrado na figura 38 foi executado. O micélio necrotrófico foi crescido em meio contendo extrato de cacau, e após o crescimento, o meio foi trocado por outro contendo glicose como fonte de carbono. Para controle, o meio foi trocado pelo mesmo meio de cultura inicial. Após 24 horas o micélio foi coletado, seu RNA foi extraído e esse foi submetido a *Northern blot* que gerou a figura 43. Podemos observar que o gene *MpTLP1* foi reprimido pela adição de glicose ao meio.



**Figura 43: Northern blot do gene *MpTLP1* em micélios necrotróficos de *M. perniciosa* crescido com extrato de cacau como fonte de carbono, induzido com glicose.** *M. perniciosa* foi crescido em meio mínimo - MM (KCl + MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>) + 1% extrato de cacau 0,6% NaNO<sub>3</sub>. O meio foi trocado, os micélios foram incubados durante 24 horas, depois coletados para extração de RNA. O novo meio continha todos os componentes do meio mínimo mais: 1% extrato de cacau + 0,6% NaNO<sub>3</sub> (controle 1), e 1% glicose + 0,6% NaNO<sub>3</sub> (2). A) *MpTLP1* hibridizado com RNA de *M. perniciosa*. B) gel de agarose - formaldeído corado com brometo de etídeo, utilizado como controle de quantidade de RNA presente no *Northern blot*

Em outro experimento, comparamos a expressão de *MpTLP1* em micélios necrotróficos novos em relação à micélios necrotróficos senescentes (figura 44). Podemos observar uma maior expressão de *MpTLP1* em micélios novos (N) do que em relação ao micélio senescente (V). Esse resultado sugere que *MpTLP1* possa exercer suas funções durante o início do desenvolvimento do fungo necrotrófico. Podemos extrapolar esse resultado para a interação *M. perniciosa* – cacauzeiro, onde *MpTLP1* seria mais expressa nos estágios iniciais do desenvolvimento da hifa necrotrófica.



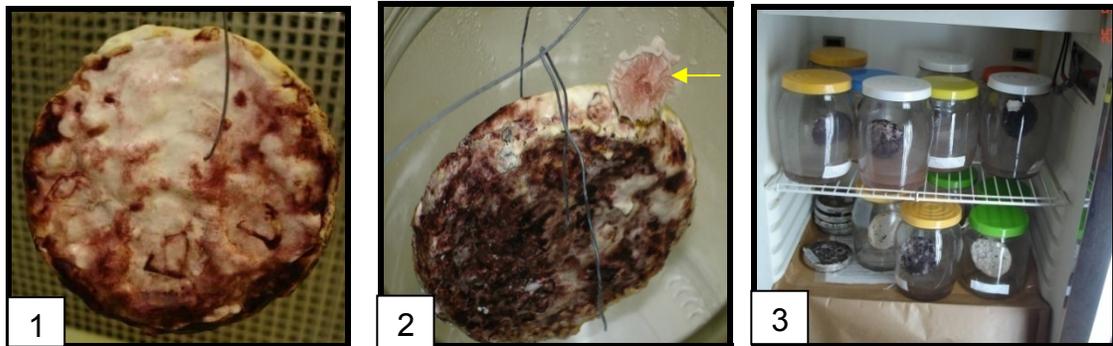
**Figura 44: Northern blot do gene *MpTLP1* em micélios necrotróficos de *M. perniciosa* em estágios jovem (N) e senescente (V).** Os micélios foram crescidos em meio malte (extrato de levedura + extrato de malte). A) *MpTLP1* hibridizado com RNA de *M. perniciosa*. B) gel de agarose - formaldeído corado com brometo de etídeo, utilizado como controle de quantidade de RNA presente no *Northern blot*

---

Visando à obtenção de basidiocarpos e esporos utilizados para o desenvolvimento do fungo na fase biotrófica, otimizamos um sistema de produção *in vitro* de cogumelos de *M. pernicioso* (figura 45).

O método inicial de produção de basidiocarpos consistia em manter o fungo em bolachas, sendo submetido a regas periódicas até que o fungo começasse a apresentar uma coloração vermelho escuro. Nesse estágio, esta era submetida a um estresse de seca de cerca de sete dias, e a rega era então retomada. Após algumas semanas pós-estresse de seca era possível observar em algumas bolachas a formação de basidiocarpos, que eram colhidos para realização da coleta de esporos. Para isso, o basidiocarpo era fixado em uma placa de petri utilizando parafina e essa placa era emborcada em um Becher pequeno, com cerca de 10 ml de solução de coleta de esporos. O frasco era então incubado a 25°C durante a noite até que os esporos caíssem no líquido. Este líquido era então plaqueado em meio de germinação de esporos para a obtenção da fase biotrófica.

Recentemente, o aluno de Iniciação Paulo Teixeira iniciou uma série de testes com o intuito de aprimorar essa técnica, já que esta é bastante trabalhosa, seu rendimento é baixo (produção de esporos em apenas 1 entre 10 bolachas produzidas) sendo também bastante demorada (cerca de 4 a 6 meses após inoculação das bolachas para aparecer os basidiomas). O aluno citado acima aumentou o rendimento de produção de basidiocarpos em nosso laboratório inoculando *M. pernicioso* em pequenos galhos de *T. cacao* fixados em meio agar-água (2% agar) dentro de pequenos frascos. Essa técnica é menos trabalhosa, pois não requer regas periódicas e por permanecer tampado, o frasco é menos susceptível a contaminantes. Entre 1 a 2 meses é possível observar a formação de primórdios.



**Figura 45: Cultivo de bolachas de *M. perniciosus*.** 1) bolacha de aproximadamente 30 dias após a transferência em ponto de submissão a estresse de seca; 2) bolacha com aproximadamente 20 dias após estresse de seca, com um basidiocarpó indicado pela seta; 3) potes contendo bolachas na estufa BOD

#### **4.8- Análise da expressão do gene *MpTLP1* ao longo do ciclo de vida de *M. perniciosus***

*M. perniciosus* é um fungo basidiomiceto e possui um ciclo de vida hemibiotrófico, com dimorfismo entre as fases biotrófica e necrotrófica. Experimentos preliminares (Rincones *et al.*, 2008) mostraram uma variação da expressão do gene *MpTLP1* em diferentes fases de desenvolvimento do fungo. Assim, a análise da expressão desse gene no ciclo de vida do fungo foi realizada com o intuito de se confirmar e complementar o perfil de expressão deste gene em todas as fases de desenvolvimento de *M. perniciosus*, buscando possíveis mecanismos de ação da proteína. As amostras analisadas foram: A) micélio biotrófico (crescido em meio biotrófico de manutenção), B) micélio necrotrófico novo (crescido em meio biotrófico de manutenção), C) primórdio de basidiocarpó e D) basidiocarpó, e também E) micélio necrotrófico novo em meio rico malte, F) micélio necrotrófico senescente em meio malte, sendo que E e F foram comparados entre si. Não foi possível incluir os esporos nestes experimentos, pois a obtenção dos mesmos era uma condição limitante em nosso laboratório.

As diferenças entre os meios utilizados para crescimento se devem ao fato de que o micélio biotrófico só pode ser mantido em condições axênicas no meio biotrófico de manutenção, evitando-se assim sua mudança para fase saprotrófica. Por outro lado, não é viável fazer as análises do micélio novo e senescente em meio biotrófico, pois, este é um meio com menor disponibilidade de nutrientes em relação ao meio malte, e tal fato pode induzir consideravelmente a expressão

gênica de *MpTLP1*. Como a variação da expressão gênica entre os micélios novo e senescente é pequena, o meio poderia mascarar as diferenças relacionadas à fase de desenvolvimento, caso existam.

A extração de RNA do micélio biotrófico em meio biotrófico de manutenção, do primórdio do basidiocarpo e do basidiocarpo foram feitos com o kit *RNeasy Mini Kit* da Qiagen foi utilizado devido à limitação da quantidade de material destas três fases de desenvolvimento do fungo como também em consequência das grandes quantidades de polissacarídeos presentes nos basidiocarpos, que impossibilitaram a extração de RNA pelo método fenol quente.

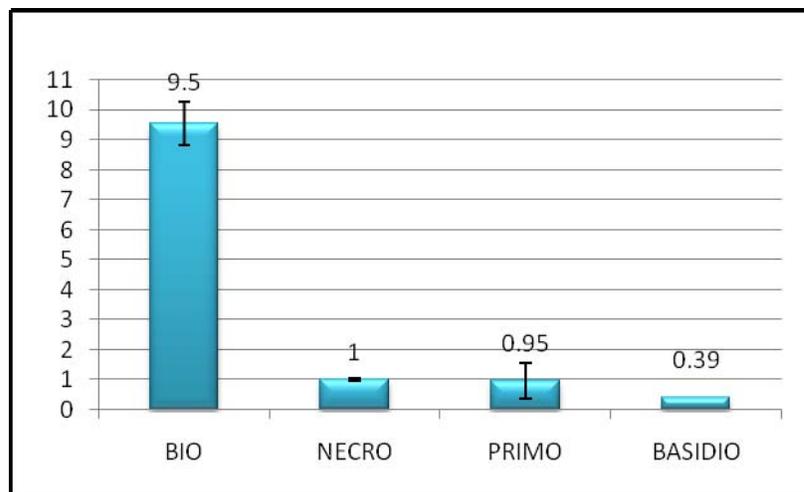
RNAs de todas as condições acima mencionadas foram extraídos, testados quanto à contaminação por DNA genômico através de amplificação por PCR e quantificados. Prosseguiu-se então para a síntese de cDNA com *primers* ao acaso. Uma vez obtidos os cDNAs de todas as condições em questão, os *primers* desenhados para os experimentos de *Real time* foram testados com estes cDNAs. Além do gene *MpTLP1*, três outros genes foram adicionados às análises, os genes da  $\alpha$ -actina e os ribossomais 60S e 18S com o intuito de se avaliar a estabilidade da sua expressão entre as diferentes amostras de RNA e, assim, selecionar um ou mais controles internos apropriados. Uma menor variação foi observada para os genes 60S e actina, de acordo com análises realizadas com o programa *geNORM* para *Microsoft Excel* (Vandesompele et al. 2002). A condição de referência foi determinada como sendo o micélio saprotrófico em meio de manutenção de biotrófico. As placas com as reações de amplificação para análise da expressão gênica de cada gene continham a curva padrão (com uma diluição seriada do cDNA de puro até  $10^{-7}$ ) e as condições a serem analisadas.

O método de eficiência descrito por Pfaffl (2001) foi utilizado para tratamento dos dados de expressão gênica obtidos. A quantidade de RNA normalizada das amostras em relação ao controle endógeno foi calculada com base na fórmula:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}}}{\text{Normalization Factor}}$$

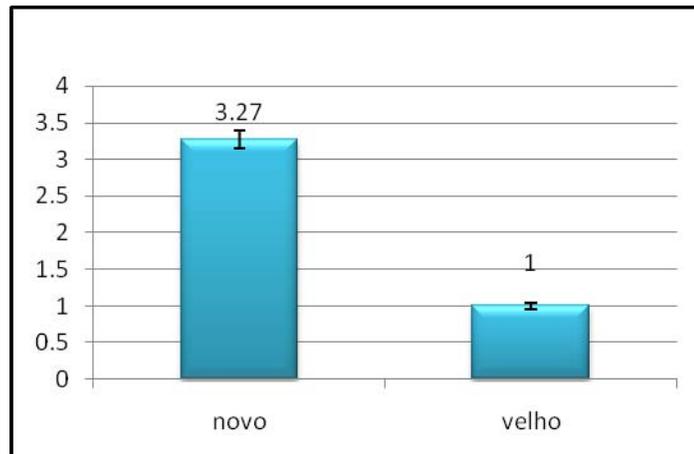
$E_{\text{target}}$  é a eficiência do *primer* do gene alvo e  $\Delta CP_{\text{target}}$  é a diferença de Cts médios (*cycle threshold*) entre a condição que está sendo analisada (por exemplo, o basidiocarpo) e a condição com menor Ct (para o gene em questão). O fator de normalização (*normalization factor*) é obtido para condição com o programa *geNORM*.

Os resultados já tratados (ou seja, o *fold* dos níveis de expressão gênica em relação à condição de referência) foram utilizados para a confecção do gráfico que mostra a expressão diferencial do gene *MpTLP1* no ciclo de vida do fungo (figura 46).



**Figura 46: Expressão diferencial do gene *MpTLP1* no ciclo de vida de *M. perniciosa* :** BIO – Biotrófico em meio biotrófico, NECRO: necrotrófico em meio biotrófico, PRIMO: primórdio do basidiocarpo, BASIDIO: Basidiocarpo

A expressão do gene *MpTLP1* na fase biotrófica mostrou-se muito maior do que em qualquer outra fase de vida do fungo (9 vezes mais expresso que na fase necrotrófica). Em outro gráfico, comparamos a expressão de *MpTLP1* em micélios necrotróficos novo e velho. Como já havia sido observado em experimentos de *Northern Blot*, o micélio novo apresenta uma expressão de *MpTLP1* cerca de 3x maior do que em micélio velho, como mostra a figura 47.



**Figura 47: Expressão diferencial do gene *MpTLP1* em micélios necrotróficos novo e senescente.** Novo: micélio necrotrofico novo; Velho: micélio necrotrófico senescente.

#### 4.9- Clonagem e estudo do promotor do gene *MpTLP1*.

Foi feita uma busca por similaridade entre o EST CP02-EC-001-001-E11-UE.F e as seqüências da biblioteca genômica de *Shotgun* de *M. pernicioso*. Verificamos que 344 pb deste EST alinhavam na região do genoma referente ao clone de *Shotgun* CP02-S2-000-101-G05-UE.R. Por esse alinhamento verificamos mais 264 pb a montante da seqüência do EST. Buscamos então o *read* referente ao seqüenciamento com o oligonucleotídeo M13 *forward* para o clone de *shotgun* CP02-S2-000-101-G05-UE. O alinhamento entre as duas seqüências do clone de *shotgun* deu origem a um *Contig* de 1376 pb, sendo que 829 estão antes da seqüência do EST e 992 pb estão antes do ATG referente a *MpTLP1* (figura 48). Desse modo verificamos que o promotor de *MpTLP1* está presente em nosso banco de dados. Entretanto essa seqüência apresentava regiões de baixa qualidade no seqüenciamento.

Como mencionado anteriormente, com a montagem híbrida foi possível demarcar os íntrons e exons de *MpTLP1* no contig 5418, melhorar a qualidade da seqüência do promotor de *MpTLP1* e inclusive verificar o gene a montante desta taumatina de *M. pernicioso*. Curiosamente este gene é similar a uma  $\beta$  1,3 glucana sintase de *L. bicolor* (GenBank ref|XP\_001875386.1).

A partir de análises computacionais, o promotor de *MpTLP1* não apresenta uma seqüência TATA-box clássica, podendo ser classificado como um gene

---

“TATA-less”. Submetemos o fragmento de 829 pb ao programa de predição de cis-elementos MATCH (figura 49) que utiliza um banco de dados. Utilizando a matriz de fungos, foram encontrados cis-elementos de ligação aos fatores de transcrição NIT2 (regulador do metabolismo de nitrogênio; Pellier *et al.*, 2003), GCR1 (regulador global da expressão de enzimas glicolíticas; Sasaki *et al.*, 2005), ADR1 (regulador do metabolismo de glicerol, etanol e da biogênese de peroxissomos; Bemis e Dennis, 1998) e MATalpha2 (repressor transcricional de genes específicos de haploidia em leveduras diplóides; Mathias *et al.*, 2004). Os cis-elementos correspondentes estão anotados nas figuras 48 e 49.

ATTGGAATTGCGGTCATTTCCCTTGGTCCTATCGTTTGGAAACGCGGCCAT  
 TCTCTTGGTGTGTTTCATCTTCTCCCTCTTCTCGGACCAATGTTGGATC  
 CCGTCTTCCCTTTGTTTGGAAACCATCATGGCCTTCATTGCCCATACGCTC  
 GCTGTAGTTGGAATGATTGGTTTCTTTGAATTCCTGGTATGTATCACCGC  
 CGAACATGAACATCTTGTCATCTTACATTTGATTGTAGTGGTTCCTGGG  
 GCTTTGGCAAGTTTCTCATGCGGTACTTGGTCTGATTGCAGTCGTCGCTA  
 TTCAGCGTGAATTCACAAAGTCTCATTGCCGTCTTCTTTCTCGAGAG  
 TTCAAGCACGATGAGACGAATAGGGCGTGGTGGTCAGGACGCTGGTATGG  
 CCGCGGTCTTGGTACACATGCCATGTCGACGACGCTCGTGAATTTGTCG  
 TCAAGATCATCGAACTGTCACCTCTGGAGTCTGATCTCATCATTGGACAT  
 ATCCTGCTGTTTCATGCTCACACCTCCCATACTCATTCCCTACTTCGACCG  
 CTTCCATGCCACTATTCTGTGTAAGCTGGTTCCTCGTAATGTGATTCTTT  
 CTGGTGTGATCATTGTGCGATAGTCTGGCTGCGTCCATCAAAGCAAATTC  
 GCGCACCCCTTTACTCCATCAAGCAAAGCAACGGCGTGGTGGTATGGT  
 AGTTATTATTGTTTCATCATTGTTCTCCGCTCTCATCGTCTTCTTCCGAC  
 AGATAATAAAAATACGGAATCATATATATACTCGTCATCGCCGTTTTCCT  
 GCATTAATAGCTATTCTGTGAGTTCACCGAGCGCTATTTTCGAGGCTTCCG  
 TTCGCTAACTTGCTCACCCATAGCTGCCATCTTCCGTACTACCATGCATC  
 TGAACGTGAACCTTGGCAACAATCTTTAAATGGACTTCTACGATTCTGTCA  
 CGACAGTACACATCACTTAGATCCCTTTTCTTATACACCCCTGTATTC  
 ATGTTTGGTTTTTCCCATGCCAGTGTGGTGTGAGTGGACGTTTATTTT  
 TTCCGCCACCTCCGTGGAAGAAATTTCTAAACTATGTCAAGGACTTTT  
 TTTTAGTTAGTGTATGCTAGCATGATACCAATTCATTGATATCGCTAA  
 ACCTTCGCTTTGTGTTGCATATGCTTTCTGGTGGAAATGCCATCAGCACGA  
 GAC**TATCTCTCCTCAAGGTATATTTGCCACATCTCTGACAATCTATTCT**  
**AGATGATATGTCATTTGCAAGGTATTTGTTCACTGCCGAGTCCGTACTG**  
**CGCGTTGATGCTTTTGGTAGTAATCTATCTATGAATCTATCTATCTCC**  
**CGTTTCCACGGA**CTTGT**TTTGGGATTCTGTTGTCTCTATAATCCTCTCA**  
**CCGAACAGCATCCAGCTATCTACGCATTGGCGGCACACCATAGCTTAGTC**  
**ATTTGCCGGAATTCGCCGTGCACAAATCCGTTGCCGATGCTCCTTTTTG**  
**CTCCACCGATATTGGTCACTCAGTTGAATTATAGAGTCCGTGAAGCGAA**  
**TTTGTGCTTTGAGATCTGGCAACTGAACCTTATCACAGAAGAGAGCAT**  
**GGGTATTGTGATCATAAGGTAAGAATCTACCTCGATACCTGAGCAGCAT**  
**CTGATACCAGCAACCAGAC**GGCTTCCAG**CCCTCCGCCTCAGACTGTGCG**  
**GGGTAAAGCTAGCGCGCTTCACTGCAATCGACCGCATGCAGCCTTCCGC**  
**CCAATCTGCACGGG**TGGACATCA**ATTTGACAAAAAATCGGATCATTAG**  
**GCCCTGGCTGAACATCACCATATCGAAACGATCCCTGCCAATCTACATGA**  
**CTGTGTTTATTCAATTTACCGGTAAAATTCG**GGGT**GCGACCCCACTATCG**  
**TGGAGGCAGAG**GGT**TACACGAGGAAAGACGATCGCGGTAATCAATTTCTA**  
**TGCTGCTTTGAGACGATTGACTATTTCTGCTTGGTGGTCTTCTTTTGA**  
**ATCAATTGAATACGTAGAACACACGGGTCTCGCAGGAGCATTCAACACCT**  
**GGCCGCAGGCATCGTGTGGCTCGTATACCGTGCCTATCAGAGCGTATGGA**  
**AGAACATCTAGAGCGCAGACGGGAAGAGTATAAGTAGACCATTTTACAAG**  
**GTGCAATCTTTCAGTCTGAACTCG**CCTTCTGAATTTCTCA**ACATGAAACTT**  
**TTCGTGCAGTGTCTTCTCGCTGGGTTGTCCACCGTTGCAGCTCGTAC**

**Figura 48: Seqüência hipotética do promotor *MpTLP1*.** A seqüência está presente no Contig5418 da montagem híbrida do genoma de *M. pernicioso*. Em negrito: região do promotor hipotético de *MpTLP1*. Sublinhado: seqüência referente ao EST CP02-EC-001-001-E11-UE.F. Em verde: seqüência referente aos oligonucleotídeos usados na amplificação. Realces em cor: *cis*-elementos hipotéticos encontrados no promotor hipotético de *MpTLP1* (análise via programa MATCH, detalhes no texto - Cinza: NIT2, Amarelo: ADR1, Rosa: GCR1, Verde: MatAlpha2); gene da Beta 1,3 glucana sintase de *M. pernicioso* realçado em azul.

Thank you for using Match at Host - It's Thu, 9.8.2007 - 0:9 MEZ

[Start a new search](#)

The name of your search is: **default**  
 Search for sites by WeightMatrix library: matrixTFP60.lib  
 Sequence file: default.seq  
 Matrix groups: fungi  
 Cut-offs: to minimize the sum of both error rates

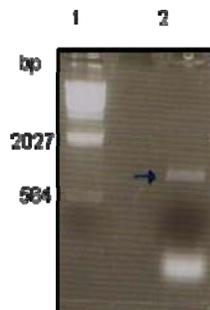
Scanning sequence ID: MpTLP promoter;

View a [graphic](#) of the following search results

| matrix identifier                  | position (strand) | core match | matrix match | sequence (always the (+)-strand is shown) | factor name               |
|------------------------------------|-------------------|------------|--------------|---|---------------------------|
| <a href="#">F&amp;ADR1_01</a>      | 8 (-)             | 0.994      | 0.993        | CCCCCg                                    | <a href="#">ADR1</a>      |
| <a href="#">F&amp;NIT2_01</a>      | 18 (+)            | 1.000      | 0.996        | TATCTc                                    | <a href="#">NIT2</a>      |
| <a href="#">F&amp;NIT2_01</a>      | 142 (+)           | 1.000      | 1.000        | TATCTa                                    | <a href="#">NIT2</a>      |
| <a href="#">F&amp;NIT2_01</a>      | 154 (+)           | 1.000      | 1.000        | TATCTa                                    | <a href="#">NIT2</a>      |
| <a href="#">F&amp;NIT2_01</a>      | 158 (+)           | 1.000      | 0.996        | TATCTc                                    | <a href="#">NIT2</a>      |
| <a href="#">F&amp;MATALPHA2_01</a> | 176 (+)           | 0.950      | 0.911        | aCTTGTtttc                                | <a href="#">MATalpha2</a> |
| <a href="#">F&amp;NIT2_01</a>      | 231 (+)           | 1.000      | 1.000        | TATCTa                                    | <a href="#">NIT2</a>      |
| <a href="#">F&amp;GCR1_01</a>      | 487 (+)           | 1.000      | 0.967        | ggCTTCcag                                 | <a href="#">GCR1</a>      |
| <a href="#">F&amp;ADR1_01</a>      | 515 (+)           | 1.000      | 0.999        | cGGGGT                                    | <a href="#">ADR1</a>      |
| <a href="#">F&amp;MATALPHA2_01</a> | 581 (-)           | 0.905      | 0.899        | ttggACATCa                                | <a href="#">MATalpha2</a> |
| <a href="#">F&amp;MATALPHA2_01</a> | 657 (-)           | 1.000      | 0.980        | atctACATGa                                | <a href="#">MATalpha2</a> |
| <a href="#">F&amp;ADR1_01</a>      | 694 (+)           | 1.000      | 0.999        | cGGGGT                                    | <a href="#">ADR1</a>      |
| <a href="#">F&amp;MATALPHA2_01</a> | 784 (+)           | 0.950      | 0.903        | gCTTGTggtg                                | <a href="#">MATalpha2</a> |
| <a href="#">F&amp;HSF_01</a>       | 793 (-)           | 1.000      | 1.000        | GTTCT                                     | <a href="#">HSF</a>       |
| <a href="#">F&amp;MATALPHA2_01</a> | 819 (-)           | 0.972      | 0.937        | gtacACACGg                                | <a href="#">MATalpha2</a> |

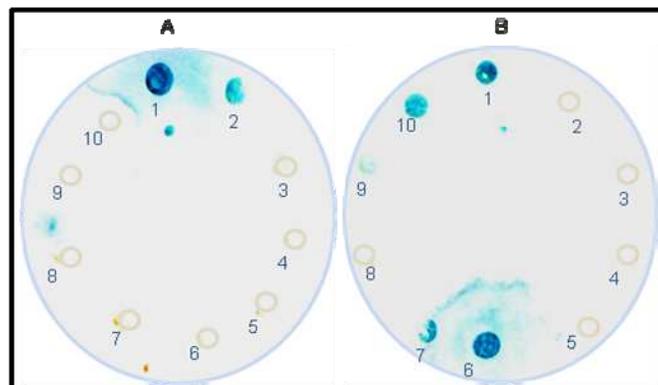
**Figura 49: Análise de cis-elementos na seqüência de 829 pb a montante do EST CP02-EC-001-001-E11-UE.F, através do programa MATCH (<http://www.gene-regulation.com>) O score match de 1.0 indica similaridade total com cis-elementos no banco de dados.**

Oligonucleotídeos foram desenhados de modo a adicionar em cada ponta do fragmento um sítio de enzima de restrição, no caso, *Bam*HI e *Hind*III. Todas as etapas da clonagem foram realizadas como descrito no tópico 3.20. O promotor de MpTLP1 foi clonado em pGEM-T-Easy e em seguida em YEP358. Através de análise por padrão de digestão com enzimas de restrição foi possível verificar que fragmento amplificado era realmente o promotor de *MpTLP1* (figura 50).



**Figura 50: Amplificação por PCR da seqüência do promotor hipotético de *MpTLP1*- Marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III, 2 - promotor *MpTLP1* amplificado por PCR com oligonucleotídeos específicos para clonagem. Gel de agarose corado com brometo de etídeo**

Foram feitos experimentos para verificar a indução do gene LacZ sob o controle do promotor de *MpTLP1* em leveduras crescidas em YNB - glicose 3% e depois passadas para meio SC contendo glicose 2%, glicose 4%, glicerol 1% ou glicerol 2%. Esses experimentos foram montados baseados nas análises da seqüência promotora, onde foram encontrados *cis*-elementos onde se ligam os fatores de transcrição GCR1 e ADR, relacionados com o metabolismo de glicerol e glicose. Os experimentos não geraram resultados satisfatórios, pois o controle positivo utilizado, que seria reprimido em crescimento em glicose 2% e induzido em crescimento com glicerol (*YEpCB-lacZ*, Carraro *et al.*, 1998), não manteve esse padrão de expressão. O controle negativo (plasmídeo YEP358 sem inserto), que não apresentaria atividade em nenhuma nas condições de crescimento, apresentou expressão em algumas réplicas experimentais das condições de crescimento citadas em 3.20 (figura 51). Devido a dados obtidos em *Northern blot*, os transformantes também foram inoculados em meio SC contendo extrato de cacau como fonte de carbono para testar se o promotor apresentava atividade em uma condição onde era evidente a indução de *MpTLP1*. Entretanto, não obtivemos resultados satisfatórios para essa análise, utilizando diferentes métodos de detecção da coloração azul (veja material e métodos, tópico 3.20).



**Figura 51: Indução do gene LacZ através da seqüência promotora de *MpTLP*.** Membranas contendo colônias de *S. cerevisiae* HD93-15D transformadas, crescidas em SC- glicose 2%, em réplicas A e B. As colônias 1 a 6 referem-se a transformantes contendo *YEP358- MpTLP*, As colônias 7 e 8 foram transformadas com a construção referente ao controle positivo *YEpCB-lacZ*, e as colônias 9 e 10, foram transformadas com o plasmídeo YEP358, utilizado como controle negativo

## 5- DISCUSSÃO:

### **Estrutura gênica de *MpTLP1*, expansão de taumatinas e análises filogenéticas.**

As proteínas similares à taumatina (TLP), classificadas como PR-5, foram descritas primeiramente em plantas, agindo na defesa durante a interação planta-patógeno, em especial, interação com fungos (Ryals *et al.*, 1996, Guzzo, 2004). Essa família de proteínas vem sendo estudada em diversos organismos como artrópodes (Wang e Duman, 2006), nematódeos (Shatters *et al.*, 2006), fungos ascomicetos (Cheong *et al.*, 1997; Greenstein *et al.*, 2006) e basidiomicetos (Sakamoto *et al.*, 2006).

O projeto genoma Vassoura de Bruxa gerou um banco de dados de ESTs e seqüências genômicas, obtidos pela metodologia Sanger. Essas seqüências foram analisadas, sendo encontrado num banco de dados de EST um gene que codifica uma proteína similar a taumatina, que nomeamos de *MpTLP1*. Essa proteína foi objeto de estudo da presente dissertação.

Experimentos de *Southern blot* sugeriram que mais de uma *MpTLP* está presente no genoma do fungo (figura 8). Em 2007, após análises de seqüências de *M. pernicioso* obtidas pelo método de pirosequenciamento observamos a presença de mais 8 proteínas similares a taumatina, que foram nomeadas *MpTLP2* a *MpTLP9*. Uma cladograma foi construído indicando que *MpTLP1* e *MpTLP2* são as taumatinas de *M. pernicioso* mais similares a de *L. edodes* (figura 13). Pelo cladograma é possível inferir que houve eventos de duplicação gênica das taumatinas durante a evolução de *M. pernicioso*; algumas ancestrais (separam os clados *MpTLP9/MpTLP5* – *MpTLP7/MpTLP6*) e outras mais recentes (gerando *MpTLP3 /MpTLP4*).

Uma árvore filogenética com 45 TLPs foi construída. A análise filogenética separou as TLPs em cinco grandes grupos condizentes com a origem evolutiva dos organismos utilizados (figura 15). Como citado em “resultados” a presença de 9 taumatinas em *M. pernicioso*, indica uma expansão dessa família gênica em *M. pernicioso*. *C. cinerea* e *L. bicolor* possuem apenas 3 e 2 TLPs, respectivamente.

Dados comparativos entre os genomas de fungos demonstram que *M. pernicioso* é o fungo descrito que contém o maior número de taumatinas (Mondego *et al.*, 2008). A diversificação das TLPs em *M. pernicioso* sugere que essas proteínas tenham adquirido novas funções. Tendo em vista que *M. pernicioso* é um basidiomiceto patógeno de partes aéreas vegetais, uma característica incomum entre os basidiomicetos, a diversificação de *MpTLPs* pode estar relacionada com a patogenicidade do causador da vassoura de bruxa.

Curiosamente, *MpTLP1* e a *TLP* de *L. edodes* (*tlg1*) possuem a mesma quantidade de introns (12). Além disso, o terceiro exon dos dois genes tem apenas 7 pb (figura 10, Sakamoto *et al.*, 2006). A análise filogenética corrobora com essa semelhança das estruturas gênicas de *MpTLP1* e *tlg1*, pois juntamente com *MpTLP2*, *MpTLP1* é a taumatina de *M. pernicioso* mais próxima filogeneticamente a de *L. edodes*. Sakamoto *et al.*, (2006) descrevem que *tlg1* tem atividade  $\beta$ -1,3-glucanase, sendo mais expressa após a colheita dos cogumelos, o que indicou que esse gene está envolvido na senescência pós-colheita e na difusão dos esporos. Para buscarmos evidências da função de *MpTLP1* no desenvolvimento e na patogenicidade de *M. pernicioso* executamos experimentos de expressão gênica, expressão de proteínas e testes atividade e modelagem de proteínas.

### **Análise da expressão gênica de *MpTLP1***

Devido ao isolamento de um EST com similaridade a uma taumatina numa biblioteca de EST advindo de micélios cultivados em um extrato dializado de cacau, e pelo fato de que as taumatinas de plantas (PR-5) serem bastante caracterizadas como envolvidas em defesa de plantas, decidimos testar se a interação de *T. cacao* e *M. pernicioso* causaria alguma alteração no nível de expressão de *MpTLP1*. Ou seja, verificar se durante uma interação fungo-planta ocorre a estimulação da expressão de uma TLPs fúngica. Resultados obtidos mostram que em fungos crescidos em meio cuja única fonte de carbono foi o extrato de cacau houve uma clara indução da expressão de *MpTLP1* (figura 41). Após a execução de um experimento no qual o fungo em sua fase necrotrófica foi cultivado em meio com extrato de cacau sendo em seguida transferido para meio

---

mínimo de glicose, verificamos que a expressão de *MpTLP1* foi reprimida (figura 43). Esse resultado demonstra que substâncias presentes no exsudato de cacau são capazes de induzir a expressão de *MpTLP1* e que a retirada desses compostos do meio reprime sua expressão, o que indica que a expressão desse gene possa estar diretamente relacionada com a interação entre fungo e planta. Além disso, no experimento no qual o micélio sofre indução por ácido salicílico, molécula sinalizadora de defesa em plantas, notamos o aumento da indução de *MpTLP1* (figura 42), resultado este que corrobora com a relação do gene com a interação entre o fungo e a planta. Curiosamente, *M. perniciosa* possui uma família de genes similares a proteínas PR-1. Assim como taumatinas, proteínas PR-1 estão relacionadas com defesa vegetal e sua expressão é induzida por SA (Van Loon *et al.*, 2006). Um dado ainda mais interessante, é que o gene *MpPR-1a* é induzido por extrato de cacau e AS, assim como *MpTLP1* (dados não mostrados), o que sugere que proteínas de *M. perniciosa* com similaridade a proteínas PR vegetais possuem padrão de expressão similar, e que provavelmente devem exercer um papel importante na interação *M. perniciosa/T.cacao*.

Outro fato que reforça a hipótese de que *MpTLP1* esteja relacionada com a interação planta-patógeno é de que esse gene é cerca de 10 vezes mais expresso em micélios biotróficos do que em outras fases de desenvolvimento do fungo (figura 46). Durante a etapa biotrófica, ocorre o estabelecimento da doença e o aparecimento dos sintomas da planta. Logo, genes expressos nessa etapa provavelmente estão relacionados com o estabelecimento da doença. Curiosamente, verificamos uma baixa expressão de *MpTLP1* em *basidiomas*, dados que se contrapõem a observado para *Tlg1* de *L. edodes* que é bastante expressa em cogumelos pós-colheita (Sakamoto *et al.*, 2006). Apesar de essas proteínas serem próximas filogeneticamente, estas não compartilham o mesmo padrão de expressão, o que pode ser atribuído aos estilos de vida de cada fungo: *M. perniciosa* é um patógeno hemibiotrófico e *L. edodes* é um saprobo.

Foi verificado também que *MpTLP1* é mais expressa (cerca de 3x) em micélios necrotróficos novos, quando comparados ao micélio necrotrófico velho ou

---

senescente (figura 47). O processo de senescência é caracterizado pelo declínio da taxa de alongação das extremidades da hifa que é acompanhado pelo aparecimento gradual de alguns sintomas característicos, dentre eles a redução da formação de hifas aéreas, a secreção de um pigmento escuro e o aparecimento de defeitos respiratórios. Isso ocorre após os micélios atingirem um tempo crítico de vida (Rizet, 1957). Desse modo, hifas necrotróficas novas seriam aquelas que realmente desempenhariam a ação de necrose. Assim sendo, acreditamos que além da expressão de *MpTLP1* estar associada com a etapa infectiva do fungo, *MpTLP1* poderia exercer funções no início do estágio necrotrófico de *M. pernicioso*.

Durante o delineamento do experimento para verificação de expressão de *MpTLP1* durante o ciclo de vida de *M. pernicioso*, aconteceram algumas limitações experimentais: não possuíamos todas as fases do ciclo de vida provenientes de um mesmo isolado e a quantidade de material disponível de micélio na fase biotrófica e de primórdios e basidiocarpos era limitante. Assim, o experimento do ciclo de vida foi realizado utilizando principalmente dois isolados do fungo, FA553 e BP10. Os micélios necrotróficos novo e senescente são provenientes do isolado FA553, já o micélio biotrófico, necrotrófico novo em meio biotrófico e primórdio são provenientes do isolado BP10. O basidiocarpo foi coletado em campo na região de Ilhéus, Sul da Bahia, sendo provenientes de isolados desconhecidos de *M. pernicioso*, pois não possuíamos quantidades suficientes de material em laboratório. Atualmente, o aluno de iniciação científica Paulo Teixeira estabeleceu um método de produção de basidiocarpos do fungo em laboratório, possibilitando a obtenção do ciclo de vida completo do isolado do genoma FA553. Deste modo, pretende-se repetir estes experimentos utilizando unicamente o isolado FA553 para que assim possamos ter uma análise rigorosa da expressão gênica no ciclo de vida do fungo, evitando variações isolado-dependentes. Entretanto, os resultados aqui apresentados são interessantes e confirmam algumas hipóteses anteriormente estabelecidas, dando suporte também à formulação de novas hipóteses acerca da importância desta expressão diferencial do gene *MpTLP1* ao longo do ciclo de vida do fungo. Experimentos de indução com AS e extrato de

---

cacau serão executadas com micélio biotrófico, a fim de que possamos comparar a expressão de MpTLP1 nessas condições com resultados obtidos com o micélio necrotrófico.

A proteína TLP denominada *CetA* não é expressa nos conídios mas é altamente expressa nas primeiras horas pós-germinação. Além disso, *CetA* é reprimida por glicose (Greenstein *et al.*, 2006). Esses dados de expressão são similares ao observados para MpTLP1, que é bastante expresso no estágio biotrófico (“estágio pós-germinação”) e pouco expresso nas estruturas reprodutivas (conídios). No momento estamos padronizando a extração de RNA de esporos; RNA este que nos servirá para verificarmos a expressão de MpTLP1 na estrutura infectiva de *M. perniciososa*.

### **Expressão da proteína, testes de atividade e avaliação da estrutura de MpTLP1**

Para a expressão da proteína MpTLP1, várias estratégias foram traçadas, visto que na seqüência da proteína existem 16 cisteínas, que provavelmente formam oito pontos dissulfeto, como descrito para outras TLPs (Campos *et al.*, 2008; Breiteneder, 2004, Fils-Lycaon, 1996). Os plasmídeos pSW202 e pMal2pX foram utilizados já que são capazes de enviar a proteína recombinante para o periplasma, local onde é mais provável a ocorrência de formação de pontes dissulfeto no caso de expressão em bactéria. O plasmídeo pET28a foi escolhido por ter sido utilizado na expressão de TLPs (Hu e Reddy, 1997).

Apesar de nossos esforços, não obtivemos sucesso com a tentativa de expressão de MpTLP1 solúvel a partir de expressão em *E. coli*. Por isso, tentativas de renaturação da proteína insolúvel foram traçadas. A proteína foi submetida à desnaturação com uréia e adição de compostos para promover a formação de pontes dissulfeto, como o sistema de glutathione (oxidada e reduzida) (Hu and Reddy, 1997). Essas tentativas não resultaram em proteína solúvel. Apenas quando utilizamos uma fração da proteína desnaturada em tampão de desnaturação (6M uréia), e retiramos completamente a uréia através de três diálises em tampão sem uréia é que conseguimos uma fração de MpTLP1 solúvel.

Essa proteína solúvel foi então utilizada em ensaios para testar atividades enzimáticas que são comumente descritas na bibliografia desta proteína, como a atividade glucanólítica e antifúngica (Hu e Reddy; 1997, Ye *et al.*, 1999; Lam e Ng, 2001).

A proteína obtida em renaturação não foi capaz de impedir ou retardar o crescimento dos fungos utilizados (figura 31). Estudos sugerem que a capacidade de TLPs impedirem o crescimento de fungos se dá ao fato de que estas proteínas são capazes de hidrolisar  $\beta$  1-3 glucanas (Grenier *et al.*, 1999). Porém, a atividade antifúngica pode não estar ligada à atividade hidrolítica, já que nem todas as TLPs capazes de inibir o desenvolvimento fúngico possuem a capacidade de hidrolisar glucanas (Van damme *et al.*, 2002). Baseado nessas informações, testes para verificar a capacidade de MpTLP1 hidrolisar glucanas também foram feitos. Por este ensaio verificamos que MpTLP1 não foi capaz de clivar o substrato laminarina (figura 33). A partir desses resultados negativos, executamos experimentos de avaliação da estrutura de MpTLP1, a fim de verificarmos se a renaturação de MpTLP1 ocorreu de forma satisfatória.

Dados de dicroísmo circular (CD) indicam que a estrutura secundária obtida corresponde à estrutura estimada obtida através da análise da seqüência de aminoácidos da proteína (figura 16), já que em ambos os casos a proteína apresenta predominantemente folhas  $\beta$  em sua estrutura. Entretanto, MpTLP1 apresenta diferenças em relação a absorção a 230 nm quando comparado a dados de CD obtidos por Masuda *et al.*, (2004) com a proteína Taumatina II de *T. daniellii*, o que pode significar que as pontes dissulfeto não foram bem estabelecidas, o que afetaria a manutenção da forma nativa da proteína. Outro resultado que indica que a proteína mesmo estando solúvel não está em sua conformação correta foi obtido através de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Por essa técnica, MpTLP1 apresentou um peso molecular aproximado de 126 KDa, indicando que MpTLP1 é um tetrâmero em solução. Pela literatura, não existe nenhum relato de TLPs que não sejam monoméricas (Grenier *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2004; van der Wel *et al.*, 1975). Podemos supor que o tetrâmero de MpTLP1 não é funcional e sim fruto de uma agregação da proteína. De fato, não

---

foi possível concentrar a proteína além de 0,2mg/ml, pois acima dessa concentração ela rapidamente forma agregados e precipita.

Logo, os dados de CD e DLS sugerem que a capacidade de MpTLP1 em desempenhar qualquer atividade enzimática pode estar está sendo prejudicada pela sua conformação estrutural incorreta.

Em paralelo aos experimentos de tentativa de renaturação de proteínas, tentamos expressar MpTLP1 na levedura metilotrófica *P. pastoris*, clonando MpTLP1 no plasmídeo pPIC9K, que possui um peptídeo sinal para secreção no meio extracelular. Em ensaios de expressão em pequena escala, obtivemos uma proteína diferencialmente expressa na fração extracelular que possui tamanho similar a MpTLP1. A expressão foi realizada durante 7 dias, porém a intensidade da banda indica que não houve uma alta expressão da proteína recombinante. Não foi possível a realização de experimento de indução em larga escala, pois o inóculo não atingia massa celular adequada para uma indução em meio de cultura. Fizemos então testes de viabilidade das colônias transformadas. As colônias obtiveram crescimento aparentemente normal em meio de cultura seletivo MD, enquanto não apresentaram crescimento quando a fonte de carbono muda para metanol (meio MM). Isso nos leva a pensar que MpTLP1 pode estar sendo tóxica para o crescimento da levedura. Por essa hipótese, a pequena quantidade de MpTLP1 expressa inviabilizaria o crescimento da levedura levando a pouca expressão da proteína recombinante. Normalmente a expressão em leveduras metilotrópicas é regulada pelo promotor MOX. Esse promotor sofre um forte controle pela quantidade de glicose presente no meio. Provavelmente a concentração de glicose no decorrer do crescimento da levedura cai rapidamente, causando a derepressão do promotor. Isso acarreta uma expressão basal de MpTLP1 que pode ser tóxica para a levedura, impedindo seu crescimento. Novos testes serão feitos para a confirmação dessa teoria.

Além disso, novos experimentos de expressão com a utilização de plasmídeos diferentes para o sistema de expressão em bactéria e leveduras, incluindo também *Sacharomices cerevisiae*, estão sendo traçados para dar continuidade ao estudo dessa proteína.

Como mencionado anteriormente, os resultados de CD e DLS sugerem que a capacidade de MpTLP1 em desempenhar as atividades testadas pode estar está sendo prejudicada pela sua conformação estrutural não estar correta. Porém, alinhamentos de seqüência e dados de modelagem de MpTLP1 nos sugerem uma outra função para essa proteína.

### **Modelagem de MpTLP1 e análise de estrutura-função entre taumatinas**

Estudos apontam que o sabor extremamente doce, principal característica de taumatina de *T. danielli*, está relacionado com resíduos de lisina presentes em sua estrutura (Kaneko e Kitabake, 2008). Esses resíduos estão apontados na figura 14 no alinhamento de TLPs com MpTLP1. Esse alinhamento mostra que as TLPs não possuem esses resíduos na mesma posição da taumatina de *T. danielli*. De fato, nenhuma outra TLP testada conferiu sabor doce (Fils-Lycaon *et al*, 1996, Grenier *et al*, 1999; Ghosh e Chakrabarti, 2008). A ausência dessas lisinas em MpTLP1 e nas outras TLPs de *M. perniciososa* indica que essas proteínas não devem apresentar sabor doce.

No alinhamento mostrado na figura 12 também podemos observar as regiões que contém aminoácidos que circundam o *acidic cleft*, região fundamental para a ligação a  $\beta$ -1,3-glucanas e para a atividade  $\beta$ -1,3-glucanólítica (Koiwa *et al.*, 1999). Estudos estruturais obtidos através da cristalografia de TLP de banana (Ban-TLP, Leone *et al*, 2005) e tomate (NP24, Ghosh e Chakrabarti, 2008), mostram que a região pertencente ao *acidic cleft* está situada entre os domínios 2 e 3 da proteína. Todas as MpTLPs apresentam aminoácidos ácidos conservados nas posições apropriadas no *acidic cleft*. Por esse alinhamento, acreditamos que as MpTLPs possuam atividade glucanólítica ou de ligação a açúcares.

Nossa hipótese inicial de trabalho foi de que o fungo estaria produzindo MpTLP1 como uma proteína antifúngica, (Hu e Reddy., 1997, Ye *et al.*, 1999, Lam e Ng, 2001) com possível atividade  $\beta$ -glucanólítica e de ligação a açúcares (Grenier *et al.*, 1999). A ação de MpTLP1 se daria pela inibição do crescimento de outros fungos competidores. Entretanto, não foi possível detectar atividade

---

antifúngica ou glucanólítica, talvez por MpTLP1 não estar em sua conformação nativa.

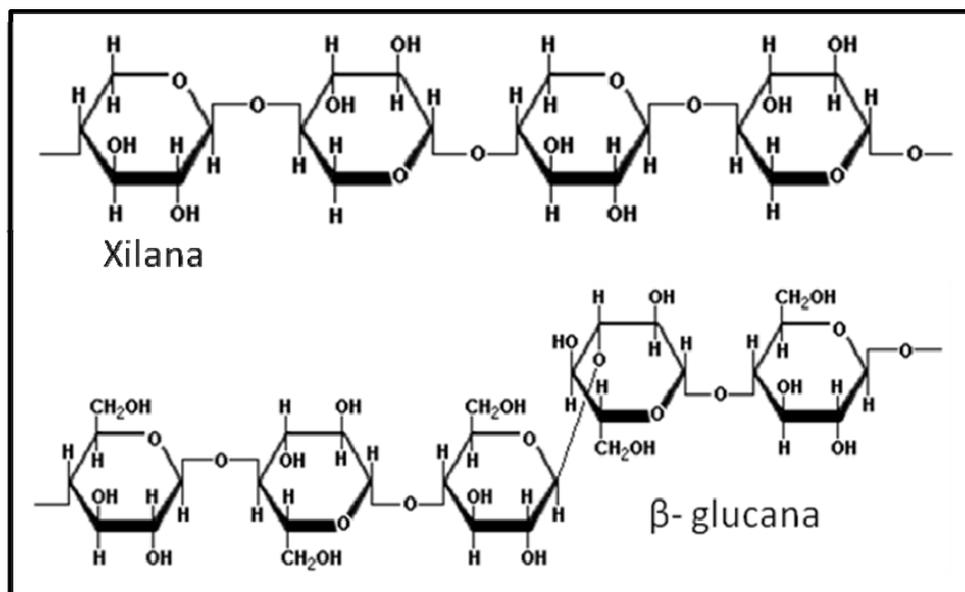
Foi demonstrado que a proteína similar a taumatinas TLXI possui ação inibidora de xilanases (Fierens *et al.*, 2007), e que essa atividade é atribuída a um resíduo de histidina presente na posição 22 da seqüência de aminoácidos da proteína (Roumbouts *et al.*, 2008). Curiosamente, MpTLP1 possui uma histidina alinhada com a Histidina importante para a inibição de xilanase de TLXI (figura 40). Além disso, MpTLP1 é a única das MpTLPs que possui este resíduo nessa posição (His40) (figura 12). TLXI é um inibidor de xilanase não competitivo, ou seja, não se liga ao sítio ativo das xilanases, interagindo com um sítio alostérico da enzima (Fierens *et al.*, 2007). Em um trabalho mais recente, Fierens *et al.*, (2008) verificaram que TLXI além de se ligar a enzima também é capaz de se ligar aos substratos de interação da xilanase, demonstrando sua capacidade de ligação a açúcares.

Podemos então supor que MpTLP1 possa participar no estabelecimento da doença vassoura de bruxa em cacau agindo como uma molécula que combate a formação de HR na planta. Não é interessante para *M. pernicioso* que, enquanto ocorre sua invasão em *T. cacao*, ocorra uma resposta hipersensível no local de contaminação. Tendo como hipótese que MpTLP1 é um inibidor de xilanases, essa proteína pode estar combatendo o sistema de defesa de planta, impedindo que xilanases possam quebrar as paredes da planta liberando fragmentos que serviriam como moléculas sinalizadoras de defesa. Levando em conta que MpTLP1 seria um inibidor não competitivo ligante do substrato, assim como TLXI, a inibição poderia se dar pela ligação dessa proteína aos açúcares de parede liberados, pela ação de xilanases fúngias ou vegetais.

Outra possibilidade é que MpTLP1 seja um inibidor de outras enzimas hidrolíticas, que não xilanases. De fato, TLXI é capaz de se ligar também a  $\beta$ -glucanas (Fierens *et al.*, 2008). Logo, sua possível ação inibitória pode se estender as outras enzimas hidrolíticas. Proteínas inibidoras de glucanases (GIP) são produzidas tanto por patógenos quanto por plantas. No caso de plantas, essas proteínas agem basicamente no momento de ataque por um patógeno, inibindo

celulases secretadas pelo fungo para atacar a parede celular vegetal (York *et al.*, 2003). Em contrapartida, fungos e oomicetos também produzem GIPs que bloqueiam a ação de glucanases vegetais. Desse modo, a parede celular fúngica permanece intacta, não ocorrendo a liberação de glucanas que agiriam como moléculas efetoras da defesa da planta (York *et al.*, 2003).

Outra possibilidade seria a ligação de MpTLP1 às glucanas na parede fúngica, inibindo a ação das enzimas vegetais. Esse sistema de supressão de defesa hipotético tem certa similaridade com o mecanismo desempenhado pela proteína AVR4 do fungo ascomiceto biotrófico *Cladosporium fulvum*. Assim como *M. pernicioso*, *C. fulvum* não possui estruturas de penetração como apressórios e haustórios, habitando o apoplasto vegetal durante a sua fase biotrófica. Durante a infecção de tomateiros, *C. fulvum* secreta Avr4 que se liga em quitinas de sua parede celular inibindo a ação de quitinases produzidas pelo hospedeiro que degradariam a parede celular fúngica (van de Burg *et al.*, 2006).



**Figura 52: Desenho esquemático comparativo de xilana e  $\beta$ -glucana.**

Analisando todos os resultados obtidos no decorrer desse trabalho, existem fortes indícios que MpTLP1 participa da interação planta patógeno, pois: (i) sua expressão é aumentada na presença de extrato da planta e por ácido

---

salicílico, (ii) sua expressão é maior em fases importantes para o estabelecimento e manutenção do fungo na planta (biotrófico e necrotófico novo) e (iii) MpTLP1 possui similaridade com enzimas que tem a capacidade de se ligar a açúcares, podendo ou não exercer atividade hidrolítica. Além disso, dados comparativos de seqüência e modelagem de MpTLP1 apontam para uma função relacionada à inibição de proteínas hidrolíticas.

A partir desses dados podemos formular três hipóteses da participação de MpTLP1 na interação planta-patógeno:

- 1- MpTLP1 pode agir como um inibidor de crescimento antifúngico (Hu e Reddy; 1997, Ye *et al.*, 1999; Lam e Ng, 2001). No estágio biotrófico é importante para *M. perniciosus* que não haja competidores na vassoura verde. Como observamos que *MpTLP1* é mais expresso nessa fase de desenvolvimento do fungo, esta proteína pode estar agindo como glucanase digerindo a parede celular de fungos competidores que podem estar co-colonizando a planta no momento de sua infecção.
- 2- Como esta proteína possui similaridade com um inibidor de xilanase não competitivo com afinidade pelo substrato, MpTLP1 pode estar agindo de três maneiras: (i) ligando-se a xilanas presentes na parede celular vegetal, impedindo assim que essas sejam digeridas pelas xilanases produzidas pela própria planta durante a defesa contra patógeno, (ii) ligando-se a xilanases, impedindo que essas clivem a parede celular vegetal, ou (iii) ligando-se a xilanas livres impedindo a sinalização de defesa. Nesse caso, a liberação das xilanas poderia ser executada tanto pela ação de xilanases vegetais ou fúngicas.
- 3- Tendo em vista que em interações planta-patógeno, glucanas livres podem sinalizar a defesa de planta (York *et al.*, 2003) MpTLP1 pode (i) estar se ligando a glucanas livres liberadas no apoplasto produzidas pelo ataque inicial da planta no fungo, impedindo que estas se liguem a receptores vegetais e sejam reconhecidas como elicitoras de defesa, (ii) MpTLP1 poderia se ligar à parede celular fúngica impedindo a ação de glucanases vegetais, protegendo o fungo da ação de enzimas vegetais e

---

ao mesmo tempo impedindo a liberação de glucanas sinalizadoras de defesa, ou (iii) MpTLP1 poderia inibir diretamente a ação das glucanases.

**Perspectivas:**

Pretendemos dar continuidade com as análises de expressão gênica de MpTLP1, além de ampliarmos as análises comparativas entre as demais TLPs existentes no genoma de *M. pernicioso*. A obtenção das proteínas em seu estado solúvel também é essencial para que o estudo sobre essa classe de proteínas em *M. pernicioso* seja executado. A obtenção dessas proteínas irá permitir que testes de atividade sejam feitos (atividade antifúngica,  $\beta$ -glucanolítica), além de testes de ligação a enzimas (xilanas) e componentes de parede celular, tanto vegetal (xilanas) quanto fúngica (glucanas). Esses experimentos nos ajudarão a elucidar o mecanismo de ação dessa proteína durante o estabelecimento do fungo no hospedeiro

**6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agrios G N.** *Plant pathology*. San Diego, Academic Press, 1997, 635
- Aime MC, Phillips-Mora W.** The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 2005; 97:1012-22.
- Andrew P, F and Bert V.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1983; 132:6-13
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struh I K.** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. 1997; Inc, USA
- Bastos CN.** Avaliação de Fungicidas Sistêmicos no Controle da Vassoura-de-Bruxa do Cacauiero. *Agrotropic*. 1989; 1: 128-132.
- Bastos CN.** Redução na Produção de Basidiocarpos de *Crinipellis perniciososa* por *Trichoderma viride*. *Summa Phytopathologica*. 1992; 18: 235-238.
- Batalia MA, Monzingo AF, Ernst S, Roberts W, Robertus JD.** The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural & Molecular Biology*. 1996; 3:19-23
- Bemis LT, Denis C L.** Identification of functional regions in the yeast transcriptional activator ADR1. *Molecular Cell Biology*. 1988; 8:2125-2131
- Benko-Iseppon A M, Winter P, Huettel B, Staginnus C, Muehlbauer FJ, Kahl G.** Molecular markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003; 107: 379–386.
- Brandazza A, Angeli S, Tegoni M, Cambillau C, Pelos P.** Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. *FEBS Letters*. 2004; 572: 3–7.
- Breiteneder H.** Thaumatin-like proteins - a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*. 2004; 59:479-481.
- Brutus A, Reca IB, Herga S, Mattei B, Puigserver A, Chaix JC, Juge N, Bellincampi D, Giardina T.** A family 11 xylanase from the pathogen *Botrytis cinerea* is inhibited by plant endoxylanase inhibitors XIP-I and TAXI-I. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 337(1):160-166.
- Campos MA, Silva MS, Magalhães CP, Ribeiro SG, Sarto RPD, Vieira EA, Sá MFG.** Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microbial Cell Factories*, 2008; 7:7.
- Carraro D M, Ferreira JRJ, Schumacher R, Pereira GAG, Hollenberg C P, Dorry HA.** Region of the Cellobiohydrolase I Promoter from the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* Mediates Glucose Repression in *Saccharomyces cerevisiae*, Dependent on Mitochondrial Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* .1998; 253, 407–414
- Caspers MP, Lok F, Sinjorgo KM, van Zeijl MJ, Nielsen KA, Cameron-Mills V.** Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo-beta-1,4-xylanase from barley aleurone during germination. *Plant Journal*. 2001; 26:191-204.
- Ceita GO, Macedo JNA, Santos TB, Alemanno L, Gesteira AS, Micheli F, Mariano AC, Gramacho KP, Silva DC, Meinhardt LW, Pereira GAG, Cascado JCM.** Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in

- Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science*. 2007; 173: 106-117.
- Cheong NE, Choi YO, Kim WY, Bae IS, Cho MJ, Hwang I, Kim JW, Lee SY.** Purification and characterization of an antifungal PR-5 protein from pumpkin leaves. *Molecular Cells*. 1997; 30: 214-9.
- Colditz F, Niehaus K, Krajinski F.** Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta*. 2007; 226:57-71
- Collins T, Gerday C, Feller G.** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005; 29:3-23.
- Dall'Antonia Y, Pavkov T, Fuchs H, Breiteneder H, Keller W.** Crystallization and preliminary structure determination of the plant food allergen Pru av 2. *Acta Crystallogr Section F Structural Biology and Crystallization Communications*. 2005; 61:186-188
- Dangl JL, Jones JD.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 2001 Jun 14:826-33.
- Daniell S, Mellits KH, Faus I, Connerton I.** Refolding the sweettasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesized in *Escherichia coli*. *Food Chemistry*. 2000; 7: 105-110.
- Evans HC e Bastos CN.** Uma Avaliação do ciclo de vida da Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do Cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira*. 1979; 4: p. 104.
- Evans HC e Prior C.** Cocoa pod diseases: Causal agents and control. *Outlook on Agriculture*. 1987; 16: 35-41.
- Fierens E, Gebruers K, Courtin CM, Delcour JA.** Xylanase inhibitors bind to nonstarch polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 23:564-70
- Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, Goesaert H, Brijs K, Beaugrand J, Volckaert G, Van Campenhout S, Proost P, Courtin CM, Delcour JA.** TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochemical Journal*. 2007; 403:583-91.
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P.** A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiology*. 1996; 111:269-73.
- Fujikawa T, Ishihara H, Leach JE, Tsuyumu S.** Suppression of defense response in plants by the avrBs3/pthA gene family of *Xanthomonas* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006; 342-9.
- Garcia O, Macedo JN, Zapparoli G, Tiburcio R, Micheli F, Gesteira A, Meinhardt LW, Rincones J, Alvim F, Schiavinato M A, Pereira GAG, Cascardo JCM.** Identification and characterization of novel Necrosis and Ethylene inducing Proteins (NEPs) in the hemibiotrophic basidiomycete *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Mycological Research*. 2007; 111: 443-55.
- Ghosh R, Chakrabarti C.** Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of NP24-I, an isoform of a thaumatin-like protein from ripe tomato fruits. *Acta Crystallogr Section F Structural Biology and Crystallization Communications*. 2005; 61:806-7

- Greenstein S, Shadkchan Y, Jadoun J, Sharon C, Markovich S, Osherov N.** Analysis of the *Aspergillus nidulans* thaumatin-like *cetA* gene and evidence for transcriptional repression of *pyr4* expression in the *cetA*-disrupted strain. *Fungal Genetics and Biology*. 2006; 43:42-53.
- Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A.** Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric  $\beta$ -1,3-glucans. *Plant Journal*, 1999; 19: 473-480.
- Griffith GW, Bravo-Velasque E, Wilson FJ, Lewis DM, Hedger JN.** Autecology and evolutions of the witches' broom pathogen (*Crinipellis perniciososa*) of cocoa. *Ecology of planta pathogens*. Wallingford: CAB International, 1994; 15: 245-267.
- Guzzo S.D.** Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia Vastatrix*. Centro de energia nuclear e agricultura do estado de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- Hagiwara A, Yoshino H, Sano M, Kawabe M, Tamano S, Sakaue K, Nakamura M, Tada M, Imaida K, Shirai T.** Thirteen-week feeding study of thaumatin (a natural proteinaceous sweetener), sterilized by electron beam irradiation, in *Sprague-Dawley* rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43:1297-302.
- Hedger JN, Pickering V, Aragundi J.** Variability of populations of the witch's broom disease of cocoa *Crinipellis perniciososa*. *Transactions of the British Mycological Society*. 1987; 88:533-546.
- Hegde P, Qi R, Abernathy R, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Earle-Hughes J, Snesrud E, Lee N. H, Quackenbush J.** A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis-II. *Biotechniques*. 2000; 29 :548-562
- Hiilovaara-Teijo M, Hannukkala A, Griffith M, Yu XM, Pihakaski- Maunsbach K,** Snow-mold- induce apoplastc proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiology*. 1999; 121: 665-674.
- Hu X, Reddy AS.** Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology*. 1997; 34:949-959.
- Jung YC, Lee HJ, Yum SS, Soh WY, Cho DY, Auh CK, Lee TK, Soh HC, Kim YS, Lee SC.** Drought-inducible-but ABA-independent-thaumatin-like protein from carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*. 2005; 24:366-73.
- Kaneko R, Kitabatake N.** Structure-sweetness relationship in thaumatin: importance of lysine residues. *Chemical Senses*. 2001; 26:167-77.
- Knogge W.** Fungal Infection of plants. *The Plant Cell*. 1996; 8:1711-1722.
- Lam SK, Ng TB.** First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence of synergism of their antifungal effects. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001; 171-280.
- Leone P, Menu-Bouaouiche L, Peumans WJ, Payan F, Barre A, Roussel A, Van Damme EJ, Rougé P.** Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. *Biochimie*. 2006; 88:45-52
- Lima EL, Barros EV, Araújo JG, Thiébaud JT.** Frequência da Poda Fitossanitária no Controle da Vassoura-de-bruxa do Cacaueiro. *Agrotropica*, 1991; 3: 75-80.
- Manenoi A, Paull RE.** Papaya fruit softening, endoxylanase gene expression, protein and activity. *Plant Physiology*. 2007; 131:470-80.
- Marathe R, Dinesh-Kumar SP.** Plant defense: one post, multiple guards?! *Molecular Cell*. 2003 Feb;11.284-6.

- Masuda T, Tamaki S, Kaneko R, Wada R, Fujita Y, Mehta A, Kitabatake N.** Cloning, expression and characterization of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 2004; 30:761-9.
- Mathias JR, Hanlon SE, O'Flanagan RA, Sengupta AM, Vershon AK.** Repression of the yeast HO gene by the MATalpha2 and MATa1 homeodomain proteins. *Nucleic Acids Ressearch*. 2004; 32:6469-78
- Meinhardt LW, Bellato CM, Rincones J, Azevedo RA, Pereira GAG.** Development of an in vitro germination and growth method for the biotrophic phase of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, 2006; 52: 191- 196.
- Milanesi L, Muselli M, Arrigo P.** Hamming Clustering method for signals prediction in 5' and 3' regions of eukaryotic genes. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996; 12 :399-404.
- Min K, Ha SC, Hasegawa PM, Bressan RA, Yun DJ, Kim KK.** Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins*. 2004; 1;54:170-3.
- Mondego JMC, Carazzolle M F, Costa GGL, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H, Vidal RO, Estrela RC, García O, Thomazella DPT, Oliveira BV, Pires ABL, Rio MCS, Araújo MRR, Moraes MH, Castro LAB, Gramacho KP , Gonçalves MS, Moura Neto JP, Neto AG, Barbosa LV, Guiltinan MJ , Bailey BA, Meinhardt LW, Cascardo JCM , Pereira GAG .** A genome survey of *Moniliophthora Perrnicioso* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics* 2008, no prelo
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C.** Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*. 2002; 89:380-6
- Myers AM, Tzagoloff A, Kinney DM, Lusty CJ.** Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene*. 1986;45:299-310.
- Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA.** Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Molecular Cell*. 2005; 17: 171-180.
- Nicholas KB, Nicholas Jr HB.** Gene doc - a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. Available from <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.1997.
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BF 3rd, Dangl JL.** Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* . 2003; 37:579-609.
- Ohta K, Masuda T, Ide N, Kitabatake N,** Critical molecular regions for elicitation of the sweetness of the sweet-tasting protein, thaumatin I. *FEBS Journal*. 2008; 275:3644-52.
- Pellier AL, Laugé R, Veneault-Fourrey C, Langin T.** CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. 2003. *Molecular Microbiology* 48 (3), 639–655.

- Pereira JL, Ram A, Figueiredo J M, de Almeida L C.** La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba*. 1989: 459-461.
- Pinheiro MM, Sandroni M, Lummerzheim M, Oliveira DE.** A defesa das plantas contra as doenças.. *Ciência Hoje* 147. *Universidade Federal do Rio de Janeiro*.1999. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/materia/resources/files/chmais/pass/ch147/planta.rtf>
- Pires, J. L. L., E. D. M. N.** Resistência à Vassoura-de-Bruja na espécie *Theobroma cacao*. *Fitopatologia Brasileira*. 1995, 20: 303.
- Pirovani P C, Cascardo JCM and Pereira GAG.** Proteínas do fluido apoplástico. In *I Workshop da Vassoura-de-bruja*. Ilhéus: UESC and UNICAMP. 2005
- Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers DA, Vance CP.** Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000; 13: 159-69.
- Purdy LH, Schmidt RA.** Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual review of phytopathology*, 1996; 34: 573-94.
- Reese MG.** Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Journal of Computational Chemistry*. 2001; 26: 51-6.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD.** Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*. 1996; 8:1809-1819.
- Rincones J, Mazotti GD, Griffith GW, Pomela A, Figueira A, Leal Jr GA, Queiroz MV, Pereira JF, Azevedo RA, Pereira GAG, Meinhardt LW,** Variabilidade Genética e Polimorfismos Cromossômicos de *C. pernicioso* Isolado de Diversos Hospedeiros na América do Sul. *Mycological Research*. 2006; 110:821-32.
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GAG.** Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research*. 2003; 107: 452-458.
- Rincones J, Scarpari LM, Carazzolle M, Mondego JMC, Formighieri E, Barau JG, Costa GGL, Carraro DM, Brentani HP, Vilas-Boas L, Oliveira B V, Sabha M, DIAS R, Cascardo J, Azevedo RA.** Differential gene expression between the biotrophic-like and the saprotrophic mycelia of the Witches' broom pathogen *Moniliophthora pernicioso*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2008; 21:891-908
- Rio MC, de Oliveira BV, de Thomazella DP, Silva JA, Pereira GA.** Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of Cacao. *Curr Microbiol*. 2008; 56:363-70
- Rizet, G.** Are modifications leading to senescence in *Podospora* of cytoplasmic nature. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1957; 244, 663-5.
- Rombouts S, Fierens E, Vandermarliere E, Voet A, Gebruers K, Beaugrand J, Courtin CM, Delcour JA, de Maeyer M, Rabijns A, Van Campenhout S, Volckaert G.** His22 of TLXI plays a critical role in the inhibition of glycoside hydrolase family 11 xylanases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2008; 12:1.
- Ruperti B, Cattivelli L, Pagni S, Ramina A.** Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *Journal of Experimental Botany*. 2002; 53: 429-37.

- Sakamoto Y, Watanabe H, Nagai M, Nakade K, Takahashi M, Sato T.** Lentinula edodes tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence. *Plant Physiol.* 2006; 141(2):793-801.
- Sambrook JRDW.** Molecular cloning: a laboratory manual. New York, U.S.A.: 2001; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sasaki H, Kishimoto T, Mizuno T, Shinzato T, Uemura H.** Expression of GCR1, the transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is positively autoregulated by Gcr1p. *Yeast.* 2005; 22:305-19
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JC, Pereira GAG.** Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany*, 2005; 56: 865-77
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RA.** Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell.* 2008; 20:1169-83.
- Shatters RG Jr, Boykin LM, Lapointe SL, Hunter WB, Weathersbee AA 3rd.** Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. *Journal of Molecular Evolution.* 2006;63:12-29.
- Suzuki M, Kato A, Nagata N, Komeda Y.** A xylanase, AtXyn1, is predominantly expressed in vascular bundles, and four putative xylanase genes were identified in the Arabidopsis thaliana genome. *Plant Cell Physiology.* 2002; 43:759-67.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24: 1596-1599
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL.** The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 2007; 20:955-65.
- Van Damme EJ, Charels D, Menu-Bouaouiche L, Proost P, Barre A, Rouge P, Peumans WJ.** Biochemical, molecular and structural analysis of multiple thaumatin-like proteins from the elderberry tree (*Sambucus nigra* L.). *Planta.* 2002; 214: 853-62.
- Van den Ackerveken GF, Van Kan JA, Joosten MH, Muisers JM, Verbakel HM, De Wit PJ.** Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 1993; 6:210-5.
- van den Hooven HW, van den Burg HA, Vossen P, Boeren S, de Wit PJ, Vervoort J.** Disulfide bond structure of the AVR9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: evidence for a cystine knot. *Biochemistry.* 2001; 27;40:3458-66.
- van der Wel H, van Soest TC, Royers EC.** Crystallization and crystal data of thaumatin I, a sweet-tasting protein from *Thaumatococcus daniellii* benth. *FEBS Letters.* 1975; 15;56:316-7

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Peleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3:1-12
- van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJ, Thomma BP.** The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2007; 20:1092-1101
- Wang L, Duman JG.** A thaumatin-like protein from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* enhances the activity of antifreeze proteins. *Biochemistry*. 2006; 31;45: 1278-1284.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM.** Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol*. 2006. 44:135-162
- Wang H, Ng TB.** Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*. 2004; 25: p.1-5.
- Ye XY, Wang HX, Ng TB.** First Chromatographic Isolation of an Antifungal Thaumatin-like Protein from *French Bean* Legumes and Demonstration of Its Antifungal Activity, *Biochemica land Biophysical Research Communications*. 1999; 263, 130–134,
- York WS, Qin Q, Rose JK.** Proteinaceous inhibitors of endo-beta-glucanases. *Biochimica et Biophysica Acta* . 2004; 12;1696:223-33
- Yu XM, Griffith M.** Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes. *Plant Physiology*. 1999; 119: 1361-70.
- Zaparoli G, Garcia O, Medrano FJ, Tiburcio R, Costa GL, Pereira GAG:** Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom disease in cacao, encoding necrosis inducing proteins similar to cerato platanins. *Mycological Research* 2008. No prelo

---

**ANEXO 1** : Seqüências presentes nos alinhamentos das figuras 12 e 14 e nos cladogramas das figuras 13 e 15.

*M. grisea* – *Magnaporthe grisea* - ref|XP\_366968.1|  
*N. crassa* – *Neurospora crassa* – ref|XP\_964733.1|  
*G. zeae* – *Giberella zeae* - ref|XP\_388725.1|  
*P. nodorum* - *Phaeosphaeria nodorum* - ref|XP\_001792998.1|  
*L. bicolor* 1 – *Laccaria bicolor* - ref|XP\_001878783.1|  
*L. bicolor* 2 – *Laccaria bicolor* - ref|XP\_001878784.1|  
*C. cinerea* 1 - *Coprinopsis cinerea* - ref|XP\_001837765.1|  
*C. cinerea* 2 - *Coprinopsis cinerea* - ref|XP\_001837753.1|  
*C. cinerea* 3 - *Coprinopsis cinerea* - ref|XP\_001837754.1|  
*L. edodes* – *Lentinula edodes* - dbj|BAE95855.1|  
*C. neoformans* – *Cryptococcus neoformans* - ref|XP\_570780.1|  
*C. elegans* 1 – *Caenorhabditis elegans* - ref|NP\_502362.1|  
*C. elegans* 2 - *Caenorhabditis elegans* - ref|NP\_502361.1|  
*C. briggsae* - *Caenorhabditis briggsae* - ref|XP\_001670734.1|  
*S. meidanensis* – *Suidasia medanensis* - gb|ABU97476.1|  
*A. ovatus* - *Aleuroglyphus ovatus* - gb|ABU97465.1|  
*L. testaceipes* – *Lysiphlebus testaceipes* - gb|AAW56445.1|  
*T. citricida* – *Toxoptera citricida* - gb|AAW56444.1|  
*D. canadensis* – *Dendroides canadensis* - gb|AAY45729.1|  
*T. castaneum* – *Tribolium castaneum* - ref|XP\_968724.1|  
*S. gregaria* - *Schistocerca gregaria* - gb|AAR97603.1|  
*O. sativa* 1 – *Oryza sativa* - emb|CAB53479.1|  
*O. sativa* 2 – *Oryza sativa* - ref|NP\_001058421.1|  
*B. rapa* - *Brassica rapa* - gb|AAB95118.1|  
*V. vinifera* – *Vitis vinifera* - emb|CAN80000.1|  
*A. thaliana* 1 – *Arabidopsis thaliana* - ref|NP\_177893.1|  
*A. thaliana* 2 – *Arabidopsis thaliana* - ref|NP\_195579.2|  
*N. tabacum* – *Nicotiana tabacum* - emb|CAA06927.1|  
*M. domestica* – *Malus domestica* - gb|AAC36740.1|  
*Osmotin* – *Nicotiana tabacum* - emb|CAA46623.1|  
*T. cacao* – *Theobroma cacao* - gb|AAV34889.2|  
*Zeamatin* – *Zea mays* - ref|NP\_001105356.1|  
*TLXI* – *Triticum aestivum* - emb|CAH10283.1|  
*T. danielli* – *Thaumatococcus danielli* - dbj|BAF44567.1|  
*CetA* – *Aspegillus nidulans* - ref|XP\_660683.1|  
*CalA* - *Aspegillus nidulans* - ref|XP\_680888.1|