

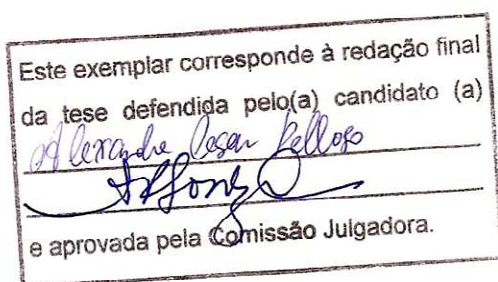
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Alexandre César Pelloso

**“Caracterização de Três Fatores de Transcrição Pertencentes
à Família LysR de *Xylella fastidiosa*.”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Vegetal e Melhoramento.

Orientador(a): Profa. Dra. Anete Pereira de Souza
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aparicio

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P366c	Pelloso, Alexandre César Caracterização de três fatores de transcrição pertencentes à família LysR de <i>Xylella fastidiosa</i> / Alexandre César Pelloso. – Campinas, SP: [s.n.], 2011. Orientadores: Anete Pereira de Souza, Ricardo Aparício. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. <i>Xylella fastidiosa</i>. 2. Patogenicidade. 3. Biofilme. 4. SAXS. 5. Western blot. I. Sousa, Anete Pereira de. II. Aparício, Ricardo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)
-------	---

Título em inglês: Characterization of three LysR type transcriptional factor from *Xylella fastidiosa*.

Palavras-chave em inglês: *Xylella fastidiosa*; Pathogenicity; Biofilm; SAXS; Western blot.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Anete Pereira de Souza, Emerson José Venâncio, Sandra Martha Gomes Dias.

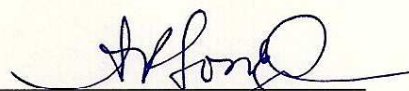
Data da defesa: 21/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

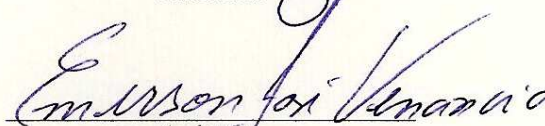
Campinas, 21 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

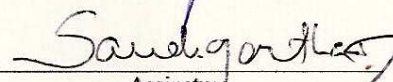
Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Emerson José Venancio


Assinatura

Profa. Dra. Sandra Martha Gomes Dias


Assinatura

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso”

(Albert Einstein)

Ofereço

Aos meus pais Arlete e César, que são o que eu mais tenho de valioso, pelos seus esforços, ensinamentos e apoio durante toda a minha vida e principalmente para a realização desta conquista.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza, por me dar a chance de aprimorar meus conhecimentos e por me transmitir seus ensinamentos;

Aos meus pais e irmão pelo amor, carinho e apoio durante estes anos e por sempre acreditarem na minha capacidade;

Aos amigos do LAGM do CBMEG e Barracão de Genética: Adriano, Aline (She-ra), Antonio, Dilaine, Julia, Lílian, Maria Augusta e Marianna pela convivência, paciência, brincadeiras e ensinamentos passados, além do grande auxílio que prestaram para a realização deste trabalho;

Em especial ao Clelton e Marcelo Szymanski por toda a ajuda, conhecimento compartilhado durante a elaboração deste trabalho. Agradeço também ao companheirismo de vocês durante todos os experimentos e madrugadas em claro que enfrentamos para o término do projeto;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Aparício por todo seu conhecimento e colaboração para a elaboração desta tese;

A minha namorada, Letícia Feix Abreu, por todo amor e carinho, além paciência e compreensão nos momentos mais difíceis;

A família Feix Abreu por me acolher de braços abertos e fazer me sentir em casa;

A Zildinha, Juverlande, Sandra e Tânia pelo apoio técnico de excelente qualidade fornecido;

A Prof^a. Dr^a. Alessandra Alves de Souza e sua aluna Raquel Caserta pela colaboração no projeto e fornecimento das amostras de biofilme;

A Prof^a. Dr^a. Dagmar Ruth Stach Machado e ao Dr^o Luis Peroni pela produção e auxílio com os anticorpos e seus experimentos;

Aos amigos Cris, Tutty, Nemaila e Natalia pela convivência e conversas realizadas;

Aos membros da minha pré-banca Prof^a. Dr^a. Sandra Martha Gomes Dias e Dr^a. Fernanda Carolina Soardi pelo tempo despendido e pela contribuição e sugestões a este trabalho;

Aos membros da banca: Prof^a. Dr^a. Sandra Martha Gomes Dias (LNBIO), Prof. Dr. Emerson José Venâncio (CCB / UEL), Prof Dr Flávio Henrique da Silva (UFSCAR) e Prof. Dr. Marcelo Brocchi (IB / UNICAMP) pela atenção, dedicação, trabalho em aceitar ao convite e por lerem a tese;

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro concedido e que foi vital para a realização deste trabalho;

A todos que auxiliaram na produção e conclusão desta tese de forma direta ou indireta.

Muito Obrigado !!!!

Sumário

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	ix
Prefácio	x
Resumo	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Citrus e CVC	2
2.2. <i>Xylella fastidiosa</i>	5
2.3. Mecanismos de Infecção	10
2.4. Reguladores Transcrpcionais da Família LysR	13
2.5. Proteínas em Estudo	18
2.5.1. XfCysB	18
2.5.2. XfLysRL	18
2.5.3. XfycjZ	20
2.5.4. XF0930, XF1459 e XF1498	20
3.1. Objetivos Gerais	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. Manuscritos	23
5. Resultados Complementares	73
5.1. Clonagem dos fragmentos	73
5.2. Expressão da XF0930	75
6. Conclusões	77
7. Perspectivas	80
8. Referencias Bibliográficas	83
9. Anexos	88
9.1. Artigo I	89
9.2. Artigo II	102

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Genes em estudo e suas característica.</i>	17
<i>Tabela 2: Padronização das ORFs XF0930, XF1459 e XF1498 e seus respectivos primers.</i>	73

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Distribuição da Laranja no estado de São Paulo.</i>	3
<i>Figura 2: Contaminação da CVC no estado de São Paulo.</i>	4
<i>Figura 3: Levantamentos da contaminação da CVC no estado de São Paulo nos últimos anos.</i>	5
<i>Figura 4: Sintomas característicos causados pela CVC.</i>	6
<i>Figura 5: Modelo dos estágios de formação do biofilme em bactérias.</i>	12
<i>Figura 6: Representação esquemática de um LTTR típico, usando uma sequência de LysR de E. coli.</i>	14
<i>Figura 7: Análise da estrutura da sequência da orf XF1448.</i>	19
<i>Figura 8: Amplificação das orfs Xf 0930, Xf 1459 e Xf 1498.</i>	73
<i>Figura 9: Amplificação das colônias transformadas em BL21 (DE3) contendo o fragmento Xf 0930.</i>	74
<i>Figura 10: teste de expressão realizado para a orf XF 0930.</i>	75

Prefácio

Os resultados referentes à dissertação de mestrado estão organizados em dois manuscritos na forma de artigos científicos e em resultados complementares. Os artigos intitulados de “Characterization of a LysR Type Transcriptional Factor From Phytopathogen *Xylella fastifiosa*” e “Study of two proteins possibly involved in biofilm formation of *Xylella fastidiosa*” representam a parte principal do trabalho desenvolvido no mestrado e neles pode se encontrar todos os resultados estruturais e funcionais obtidos em relação as proteínas XfLysRL, XfCysB e XfycjZ.

Os resultados complementares são referentes a outras 3 ORFs (XF0930, XF1459 e XF1498) que inicialmente foram propostas no projeto de mestrado, porem devido aos resultados obtidos suas análises foram parcialmente suspensas. Entretanto novos estudos com estas 3 ORFs encontram-se em perspectivas futuras, demonstrando a importância da averiguação de suas funções.

Em anexo encontram-se também os artigos científicos “Characterization of an oxidative stress response regulator, homologous to *Escherichia coli* OxyR, from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*” (Protein Expr Purif. 2011 Feb;75(2):204-10. Epub 2010 Oct 14.) e “Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa* – evidence of allosteric behaviour” (The FEBS Journal 2009. Nov;276(22):6751-62.) no qual participei como co-autor e que faz parte dos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa onde desenvolvi meu mestrado.

Como parte final desta dissertação há as conclusões gerais que são baseadas nos resultados obtido com as proteínas XfLysRL, XfCysB e XfycjZ. Inclui-se também uma perspectiva sobre o trabalho desenvolvido e futuras realizações a serem feitas com as 6 proteínas que foram propostas inicialmente para o mestrado.

Resumo

Após o sequenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa*, linhagem 9a5c houve um grande aumento de informações relacionadas a este organismo. Porém grande parte das proteínas desta bactéria ainda não apresentam funções preditas. No presente estudo, objetivou-se a caracterização inicial de três proteínas deste micro-organismo, a saber: XfCysB (orf Xf0683), XfLysRL (orf Xf1448) e XfycjZ (orf Xf1480). Essas proteínas apresentam alta similaridade com membros da família de reguladores transcricionais do tipo LysR (LTTR). Os LTTR constituem a família de reguladores mais comuns em procariotos e apresentam funções diversas tais como regulação de genes envolvidos no metabolismo, divisão celular, *quorum sense*, virulência, resposta ao estresse oxidativo, entre outras. Dentre as proteínas em estudo, a única proteína que possui predição dentro da família LysR é a XfCysB, cujas proteínas homólogas, já caracterizadas, estão envolvidas na regulação do *operon cys*, o qual está envolvido na biossíntese de cisteína. Após a clonagem das proteínas, a caracterização estrutural foi feita por Cromatografia de Exclusão por Peso Molecular, em que foi possível observar o estado oligomérico da proteína; Dicroísmo Circular para verificar se a proteína apresenta estrutura secundária estruturada e SAXS (Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos), apenas para a proteína XfLysRL, para a determinação do envelope da proteína em solução. A caracterização funcional foi feita pela análise da expressão das proteínas durante as diferentes fases de formação do biofilme (5, 10, 15, 20 e 30 dias de crescimento) de *X. fastidiosa* por *Western blot* utilizando anticorpos específicos para cada proteína em estudo. Com os resultados obtidos pode-se

estimar que a massa molecular da proteína XfLysRL é de 50 kDa quando em solução, indicando que a XfLysRL encontra-se na forma dimérica, uma vez que a massa molecular do monômero é de 23,7 kDa. Possui também a estrutura secundária estruturada, sendo estável de 4°C a 44 °C. Foi possível verificar também que a proteína está monodispersa quando em solução, é estruturalmente globular e pôde-se produzir, com os dados obtidos, um primeiro modelo para a estrutura da proteína. Já a proteína XfCysB teve a sua massa estimada em 45,3 kDa quando em solução e de 195,1 kDa quando na presença do seu co-indutor específico, além de apresentar uma estrutura secundária estruturada. Em relação à proteína XfycjZ pôde-se observar que esta quando em solução possui uma massa molecular estimada em 174,8 kDa demonstrando que sua forma oligomérica é de tetrâmero. Os estudos funcionais indicam que as três proteínas são expressas durante a formação do biofilme de *X. fastidiosa*, ou seja, estão presentes nos 6 tempos analisados. Deste modo, o estudo detalhado das presentes proteínas torna-se importante devido a sua presença na formação do biofilme de *X. fastidiosa*, um dos mecanismos de patogenicidade da bactéria. Outro fator importante é a utilização dos resultados da caracterização estrutural na elucidação do papel desempenhado pelas proteínas, visto que a estrutura protéica está diretamente envolvida com sua função.

Abstract

After sequencing the genome of *Xylella fastidiosa*, strain 9a5c, there was a large increase in information related to this organism, but most of the proteins produced by these bacteria do not have predicted functions. In this study, the objective was the initial characterization of three proteins of this organism, namely XfCysB (orf Xf0683) XfLysRL (orf Xf1448) and XfycjZ (orf Xf1480). These proteins show high similarity to members of the family of LysR-type transcriptional regulators (LTTR). The LTTR family of regulators is the most common in prokaryotes and has diverse functions such as regulation of genes involved in metabolism, cell division, quorum sense, virulence, oxidative stress response, among others. Among the proteins under study, the only protein that has more specific prediction of classification within the family is the LysR XfCysB, which already characterized homologous proteins are involved in the regulation of cys operon, which is involved in the biosynthesis of cysteine. After cloning the protein, structural characterization was performed using the techniques of Exclusion Chromatography for Molecular Weight that shows the oligomeric state of the protein; circular dichroism to determine if protein has folded and stable secondary structure and SAXS (X-Ray Scattering at Small Angle) for the determination of protein structure in solution. Functional characterization was performed by analyzing the expression of proteins during different stages of biofilm formation (5, 10, 15, 20 and 30 days of growth) of *X. fastidiosa* by producing antibodies specific for each protein under study and performance of Western blot using total protein

extract of the antibody produced against biofilm. With results obtained it was possible to estimate that the molecular weight of protein was 50 kDa XfLysRL in solution, indicating that the XfLysRL is in dimeric form, since the molecular weight of the monomer is 23.7 kDa. It also has a stable secondary structure folded and supporting a rise in temperature to 44° C. It was also verified that the protein is monodisperse in solution, is structurally globular and could be produced, with the data obtained, a first model for the structure of the protein. The protein XfCysB had its mass estimated at 45.3 kDa in solution and 195.1 kDa in the presence of its co-inducer specific, besides presents a folded secondary structure. Regarding the protein XfycjZ was observed that when this solution has a molecular mass of 174.8 kDa demonstrating that it's oligomeric form is a tetramer. Functional studies indicate that the three proteins were expressed during the biofilm formation of *X. fastidiosa*, follows that they are present in 6 times analyzed. Thus, the detailed study of these proteins is important because their presence in biofilm formation of *X. fastidiosa*, one of the mechanisms of pathogenicity of the bacteria. Another important factor is the use of results in the structural elucidation of the role of proteins because the protein structure is directly involved in its function.

1. Introdução

A bactéria *Xylella fastidiosa* é o agente causador de diversas doenças em plantas. No Brasil é responsável pela grave doença denominada Clorose Variegada dos Citros (CVC) (Lee *et al.*, 1991), a qual prejudica uma das culturas mais importantes economicamente em nosso país, a da laranja. Tendo em vista o enorme prejuízo causado pela CVC à citricultura brasileira e, com o intuito de capacitar e qualificar pesquisadores brasileiros, foi criada pela FAPESP em 1997 a Organização para Seqüenciamento e Análise de Nucleotídeos (ONSA), uma rede de laboratórios responsável pelo seqüenciamento completo do genoma da *X. fastidiosa*. Sendo o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado (Simpson *et al.*, 2000), tornou-se alvo da genômica funcional e estrutural na busca pela compreensão de seu mecanismo de infecção e adaptação nos hospedeiros, através da caracterização das proteínas codificadas pelos seus genes.

Muito embora o conhecimento da estrutura terciária seja valioso para a determinação da função protéica, o atual conhecimento da relação entre estrutura e função ainda é insuficiente para deduzir sua função global unicamente por sua estrutura. Em todos os casos, faz-se necessário combinar estudos bioquímicos (*in vitro*) e celulares (*in vivo*) com informações estruturais para completar a compreensão global do mecanismo celular protéico (Chothia & Lesk, 1986).

Como parte do programa da Rede de Biologia Molecular Estrutural (SmolBnet) da FAPESP, nosso laboratório no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, selecionou para este projeto seis

proteínas de *X. fastidiosa* para estudos de estrutura e função. Essas proteínas apresentam alta similaridade com os membros da família de proteínas *LTTR* (*LysR-type transcriptional regulators*), os quais caracterizam-se por serem reguladores transcricionais de proteínas do tipo LysR. Nosso objetivo consiste não apenas em validar os dados genômicos, mas principalmente identificar e caracterizar sistemas regulatórios da expressão dos genes em estudo e o possível envolvimento dos mesmos na patogenicidade da bactéria.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Citrus e CVC

Embora seja cultivada em mais de 100 países, a cultura de laranja apresenta uma distribuição pouco uniforme. O Brasil é o maior produtor global, sendo responsável por mais de 1/3 da produção mundial. Estima-se também que a produção anual é de 19 milhões de toneladas (AGRINUAL 2009). Mais de 80% da produção nacional se concentra no estado de São Paulo (Figura 1) (Machado, 2002) e no ano de 2009 o montante gerado com exportações foi da ordem de US\$ 1,6 bilhões (FAESP 2009). No entanto, apesar da grande importância econômica derivada da citricultura brasileira, as divisas geradas pela mesma poderiam ser bem maiores. Isso não é possível, devido à baixa produtividade em nossos pomares. Enquanto que na Flórida a produção alcança 6 caixas/árvores/ano, no Brasil é de apenas 2 caixas/árvore/ano (Machado, 2002).

Deste modo, a baixa produtividade se deve a vários fatores, principalmente pragas e doenças, que acometem grande parte das árvores causando danos

irreversíveis. Dentre estas pragas, a mais devastadora é a Clorose Variegada de Citros (CVC) conhecida popularmente como “amarelinho” e é causada pela bactéria *Xyella fastidiosa* (Lee *et al*, 1991; Laranjeira, 1997).

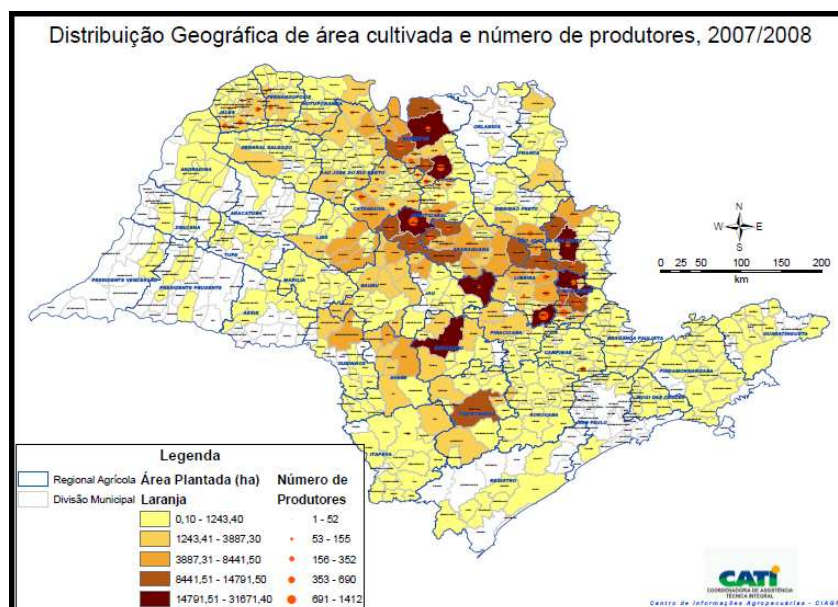


Figura 1: Distribuição da Laranja no estado de São Paulo. Mapa demonstrando a distribuição geográfica da produção de laranja no estado, dados obtidos no site www.cati.sp.gov.br/projetolupa

A Clorose Variegada de Citrus (CVC) atinge atualmente 39,19% (Figura 2) das plantas de laranja do Estado de São Paulo. Estimativas indicam um gasto de R\$ 270 milhões por ano no controle da CVC que, atualmente, reside basicamente na eliminação e poda das plantas doentes, com controle químico do vetor que são as cigarrinhas da família *Cicadellidae* (Ministério da Ciência e Tecnologia, 2007; FUNDECITRUS, 2009).

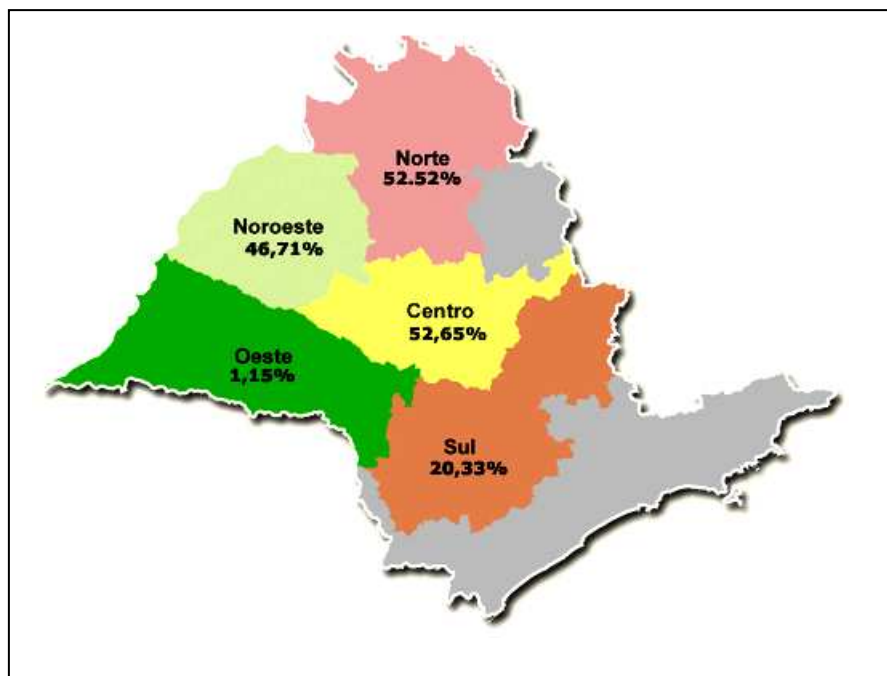


Figura 2: Contaminação da CVC no estado de São Paulo. Mapa demonstrando a distribuição da CVC nas regiões do estado de SP. Os valores correspondem a porcentagem dos pés de laranjas contaminados (FUNDECITRUS, 2009).

Atualmente existem normas governamentais que, desde janeiro de 2003, proíbe a comercialização em todo o estado de São Paulo de mudas que não tenham sido produzidas em viveiros telados totalmente livres de insetos. Observando o levantamento realizado pela Fundecitrus no período de 1996 a 2005 (Figura 3) pode-se verificar que nos anos de 2004 e 2005 houve um pequeno decréscimo na incidência da CVC, porém praticamente insignificante quando comparado com as perdas que a doença causa para os setores envolvidos.

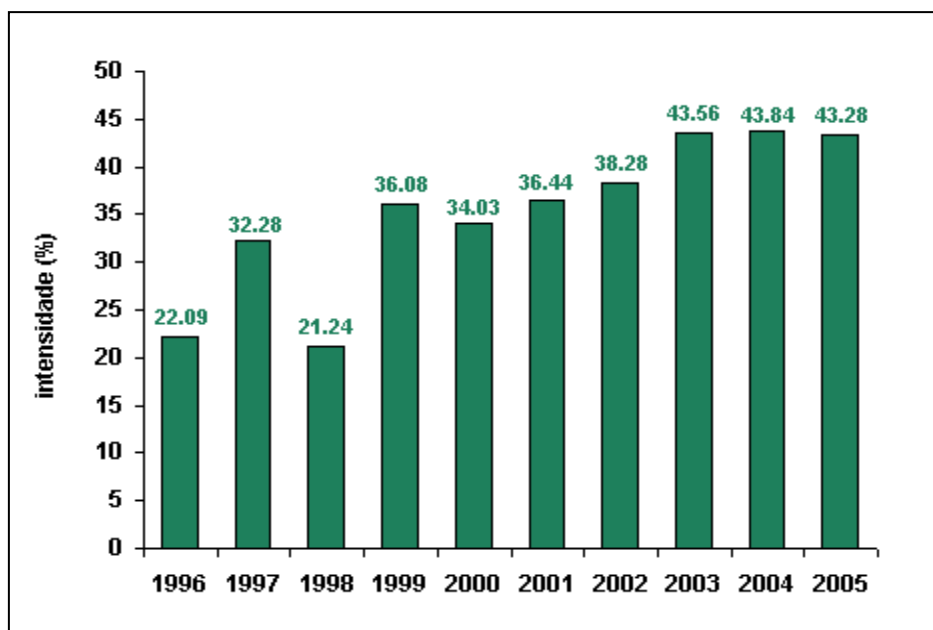


Figura 3: Levantamentos da contaminação da CVC no estado de São Paulo nos últimos anos. Gráfico demonstrando o levantamento feito entre 1996 a 2005 sobre porcentagem da contaminação dos pés de laranjas no estado de SP (FUNDECITRUS, 2008).

2.2. *Xylella fastidiosa*

A *X. fastidiosa* é uma bactéria fitopatogênica Gram-negativa, aflagelada que habita os vasos do xilema e infecta em larga escala plantas de diversos grupos taxonômicos, causando doenças economicamente importantes como a Clorose Variegada dos Citros (CVC) (Lambais *et al.*, 2000). A *X. fastidiosa*, além de causar doença em citros, também ataca diversos hospedeiros como pessegueiro (Hopkins *et al.*, 1973; Nyland *et al.*, 1973); alfafa e videira (Goheen *et al.*, 1973); amendoeira (Mircetich *et al.*, 1976); cafeeiros (Paradela Filho *et al.*, 1997) e ameixeira (Hopkins, 1989).

Em CVC os sintomas da doença (Figura 4) são a necrose marginal da folha, a abscisão foliar e o declínio do vigor da planta conduzindo à sua morte.

Estes sintomas estão relacionados a uma disfunção do sistema de condução de água na planta por oclusão vascular, desbalanço dos reguladores de crescimento e produção de fitotoxinas (Hopkins, 1989). A transmissão da bactéria se dá através de cigarrinhas sugadoras de xilema pertencentes à família Cicadellidae (Santos *et al.*, 2005), podendo também ser transmitida através do uso de porta enxertos contaminados (He *et al.*, 2000). A bactéria sobrevive no lúmen do canal alimentar das cigarrinhas transmissoras e nos vasos do xilema da planta, fechando o ciclo infectante após a sua alimentação (Hopkins *et al.*, 1995).

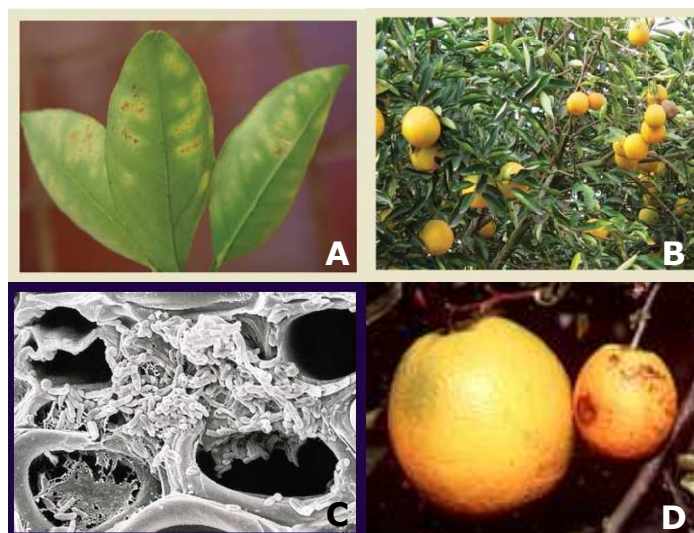


Figura 4: Sintomas característicos causados pela CVC. (A) Folhas de laranja com mancha cloróticas; (B) Ramos do pé de laranja demonstrando contaminação pela doença; (C) Fotomicrografia eletrônica de uma vaso de xilema obstruído por biofilme de *X. fastidiosa*; (D) Comparação entre um fruto sadio (esquerda) e um fruto acometido pela CVC (direita). Fotos obtidas no site www.fundecitrus.com.br.

Em 2000, Simpson e colaboradores publicaram a seqüência completa do genoma da *X. fastidiosa*. Entretanto, apesar da disponibilidade do genoma da *X. fastidiosa*, a compreensão da patogenicidade deste organismo é limitado ainda, pelo fato de que metade dos genes da bactéria codificam proteínas hipotéticas. Assim, a caracterização estrutural e funcional de proteínas da *X. fastidiosa* sem funções atribuídas ganhou destaque nos últimos anos (Barbosa & Benedetti, 2007).

A bactéria depois de instalada (aderida) no xilema da planta passa a se multiplicar e a produzir substâncias extracelulares. Entre estas substâncias, uma grande quantidade de polissacarídeos extracelulares é secretada, os quais contribuem para a formação de um biofilme na superfície dos vasos do xilema. Sobre esse material depositam-se mais bactérias que resultam em grandes agregados que podem interromper o fluxo regular de água e nutrientes através destes vasos. Esses agregados celulares podem, em tese, contribuir para concentrar atividade de exoenzimas bacterianas, auxiliar na captura de nutrientes, acumular substâncias tóxicas, manter a agregação de células e proteger contra as flutuações ambientais (Micheltore, 2000).

A partir da seqüência genômica de *Xylella fastidiosa*, foi traçado todo o perfil básico para a sobrevivência dessa bactéria como o seu metabolismo energético, a síntese de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos e os mecanismos de transcrição, tradução e reparo. Mais importante que esse perfil, o sequenciamento do genoma de *X. fastidiosa* também permitiu a formulação de hipóteses mais elaboradas sobre os mecanismos de patogenicidade dessa bactéria (Dow & Daniels, 2000; Keen *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001).

O conhecimento do sequenciamento do genoma do fitopatógeno permitiu abordagens variadas, utilizando-se diversas ferramentas da biologia molecular e bioinformática, para o estudo do mesmo e do mecanismo da patogenia que causa.

A análise comparativa do genoma da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa*, responsável pela CVC em *Citrus* sp., com de linhagens responsáveis pela patogenia em *almond* (linhagem Dixon) e *olea*Nder (linhagem Ann-1) permitiu delinear importantes características sobre este fitopatógeno e oferecer uma base científica para o desenvolvimento de drogas específicas contra o mesmo (Bhattacharyya *et al.*, 2002).

Para realizar a análise comparativa entre a seqüência gênica da linhagem 9a5c com as linhagens Dixon e Ann-1, os autores obtiveram as seqüências gênicas destas duas ultimas utilizando-se a metodologia *random shotgun* para obter o *draft genome*. O emprego de tal metodologia foi justificado pela facilidade de realização, menor tempo e custos quando comparado ao sequenciamento genômico convencional. Através desta metodologia, 95% do genoma das duas linhagens foi acessado e os índices de releitura obtidos mostraram-se satisfatórios (9,4 para Dixon e 8,1 para Ann-1). O tamanho da seqüência genômica obtida para ambas as linhagens (2,4Mb para Dixon e 2,6 para Ann-1) é bem próximo aquele publicado para a linhagem 9a5c (2,7Mb) (Simpson *et al.*, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2002). Adicionalmente, todas as três linhagens apresentaram similar porcentagem de GC.

As análises realizadas pelos autores permitiram identificar no genoma da linhagem 9a5c, uma região entre dois genes que codificam RNAt (RNA transportador) para glicina e treonina e que flanqueiam uma seqüência de genes

de origem de profagos, estando esta ausente nas demais linhagens. O possível fago codificado por tal região aparenta ser mais similar ao grupo Siphophago de fagos de DNA dupla fita (Bhattacharyya *et al.*, 2002).

A porcentagem média de GC desta região do genoma é de 65,9%, superior àquela apresentada pelo genoma da *X. fastidiosa*, de 52,6%, indicando que tal DNA exógeno foi incorporado recentemente ao genoma no processo evolutivo do genoma da linhagem (Bhattacharyya *et al.*, 2002).

Abordagens de análise genômica comparativa entre diferentes linhagens de *X. fastidiosa*, como à descrita anteriormente, permitem visualizar características inerentes de cada linhagem bem como diferenças metabólicas decorrentes de uma composição gênica diferenciada, conferindo a cada linhagem sua especificidade quanto ao hospedeiro. Adicionalmente, revelam características conservadas entre as linhagens, sugerindo possíveis sítios para o desenvolvimento de drogas para o controle específico do fitopatógeno, como mencionado pelos autores.

Exemplificando ainda tal metodologia de análise, a comparação de linhagens patogênicas e não patogênicas de *X. fastidiosa*, através de microarranjos de DNA, mostra-se como uma estratégia muito útil para identificar genes importantes para a virulência desta bactéria (Koide *et al.*, 2004).

A linhagem J1a12, isolada de citrus e passível de transformação, mostrou não deflagrar sintomas de CVC quando inoculada em plantas de Citrus ou tabaco. Tal linhagem foi comparada, através de microarranjos de DNA, com a linhagem 9a5c, que causa sintomas de CVC e não é suscetível à transformação *in vitro*, o que a inviabiliza para a manipulação genética em estudos sobre este fitopatógeno.

A grande maioria das seqüências codantes (*CDS – coding sequences*) encontra-se altamente conservada em ambas as linhagens. Contudo, 14 CDS foram tidas como altamente divergentes ou ausentes na linhagem não patogênica. Dentre estas, dez não possuíam similaridade a genes conhecidos não sendo possível, portanto, atribuir-lhes funções. Na linhagem J1a12, a subunidade de adesina fimbrial codificada pela *orf XF0077*, foi classificada como ausente, o qual foi validado por seqüenciamento da região. Tal análise corrobora com o fato de que a linhagem J1a12 apresenta, *in vitro*, um fenótipo de agregação celular bem inferior ao observado na linhagem 9a5c, possibilitando correlacionar a *orf* ausente em questão com a capacidade de adesão das células de *X. fastidiosa* (Koide *et al.*, 2004).

2.3. Mecanismos de Infecção

A hipótese mais aceita para doenças causadas por *X. fastidiosa* é que a bactéria causa uma oclusão vascular devido da formação do biofilme, conduzindo ao estresse hídrico (Osiro *et al.*, 2004). Sabe-se que o habitat natural para muitas espécies bacterianas são as comunidades de biofilme em superfícies bióticas e abióticas e mantidas por interações físico-químicas e biológicas.

A capacidade de adesão em superfícies sólidas, seguida de multiplicação e colonização bacteriana é característica de formação de biofilme. O termo biofilme descreve a habilidade das bactérias em aderir a superfícies sólidas e estabelecer, em conseqüência, uma comunidade microbiana. Na formação do biofilme, uma população de bactéria adere em superfícies ou interfaces formando uma densa

matriz composta principalmente por exopolissacarídeos (EPS) (Costerton *et al.*, 1995) que consiste em uma importante estratégia de sobrevivência para as bactérias (De Kievit & Iglewski, 1999; Marques *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado, por exemplo, que células em biofilme são 500 vezes mais resistentes a compostos antimicrobianos que em crescimento planctônico (Costerton *et al.*, 1995).

A formação de biofilme é composta por 5 estágios (Fig. 5) iniciando-se pela adesão na superfície, proliferação bacteriana dentro de microcolonias e sua expansão, formando estruturas altamente organizadas. O estágio 1, correspondente a adesão reversível das células na superfície; o estágio 2 é referente à adesão irreversível mediada principalmente pela produção de substâncias exopoliméricas; no estágio 3 inicia-se a primeira etapa de maturação do biofilme caracterizada pelo início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; a segunda fase de maturação, estágio 4, corresponde ao biofilme totalmente maduro, com alta densidade celular, e a arquitetura do biofilme apresenta-se de forma complexa; o estágio 5 é referente à fase de dispersão das células do biofilme (Sauer, 2003). Diferentes fases de formação de biofilme de *X. fastidiosa in vitro* também foram observadas através de microscopia óptica por De Souza *et al.* (2004) onde conclui-se que com 3 dias ocorreu o início da formação do biofilme, após 20 dias o biofilme maduro e em 30 dias a fase de dispersão celular.

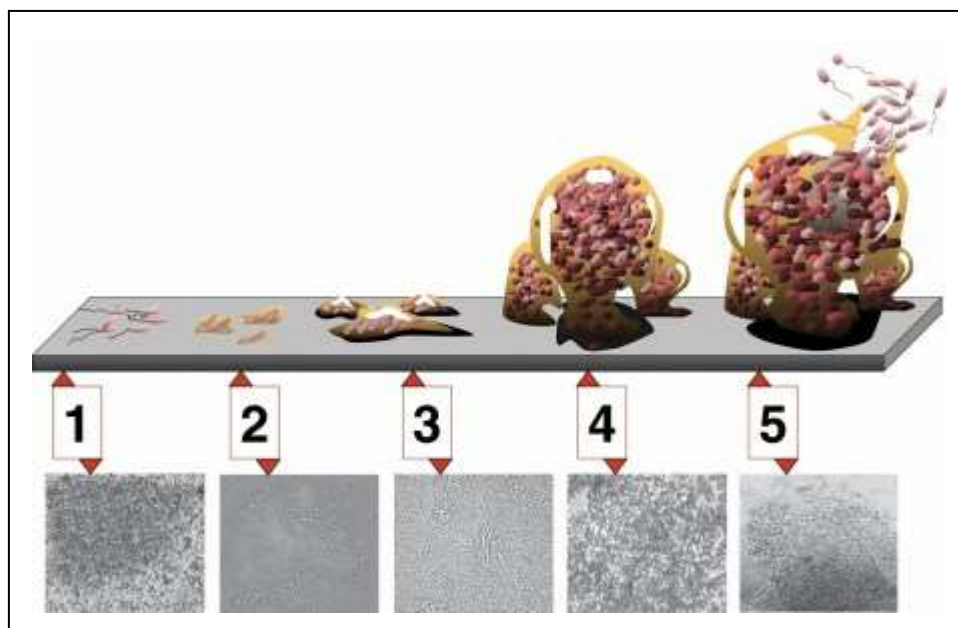


Figura 5: Modelo dos estágios de formação do biofilme em bactérias. (1) Estágio correspondente a adesão reversível das células ao substrato; (2) Adesão irreversível das bactérias ao substrato; (3) Biofilme em início da maturação, com formação da arquitetura do biofilme; (4) Biofilme totalmente maduro; (5) Início da dispersão das células para a formação de novos biofilmes. Em destaques fotomicrografia das fases de formação do biofilme. (Monroe, 2007)

Quando as células atingem o estágio de biofilme maduro, é ativado um sistema de comunicação intercelular denominado *quorum sensing* (Sauer, 2003). Esta sinalização permite que as bactérias regulem a expressão de genes específicos associados a fatores de virulência como resistência a compostos antimicrobianos, respostas de defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e conjugação de plasmídeo. Estas características permitem que as células em biofilme apresentem grande vantagem adaptativa e competitiva no hospedeiro (Davey & O'Toole, 2000).

2.4. Reguladores Transcricionais da Família LysR

Os reguladores transcricionais do tipo LysR (LTTR) são a família mais bem caracterizada do grupo de reguladores transcricionais. Eles são altamente conservados e abundantes entre as bactérias, com ortólogos funcionais identificados em *Archaea* e organismos eucariotos (Pe'rez-Rueda & Collado-Vides, 2001; Sun & Klein, 2004; Stec *et al.*, 2006).

A família LTTR foi primeiramente descrita por Henikoff *et al.* (1988), que concluíram que existem pelo menos nove proteínas reguladoras transcricionais funcionais semelhantes (identificado em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar, *Typhimurium*, *Rhizobium spp.* e *Enterobacter cloacae*), que com base na similaridade de sequência e a conservação do domínio de ligação a DNA (DBD), pode ser distinguido como um grupo de bactérias que apresentavam reguladores transcricionais relacionados.

Originalmente os LTTRs foram descritos como ativadores transcricionais de um único gene divergente transcrito, que exibiam uma autorregulação negativa (Lindquist *et al.*, 1989; Parsek *et al.*, 1994). Contudo, diversos outros trabalhos consideraram os LTTRs como reguladores transcricionais globais, atuando como ativadores ou repressores de um único gene ou operon gênico (Herna'ndez -Lucas *et al.*, 2008).

Um fator muito importante para que os LTTRs realizem suas funções é a presença e atuação dos co-indutores que podem variar de uma proteína a um íon. Geralmente, esses coindutores, participam de uma alça de *feedback*, na qual o produto ou composto intermediário de uma dada via metabólica ou de biossíntese

(geralmente ativada por um LTTR) atua como a molécula co-indutora necessária para a ativação ou repressão transcricional (Celis, 1999; van Keulen *et al.*, 2003; Picossi *et al.*, 2007).

A conservação dos LTTRs, dentro do genoma das bactérias, implica que elas têm evoluído um papel regulador importante sobre os genes, com diversas funções semelhantes, cujos produtos podem estar envolvidos no metabolismo, na divisão celular, *quórum sense*, virulência, motilidade, fixação de nitrogênio, respostas ao estresse oxidativo, produção e secreção de toxina (Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F., 2008).

Apesar do tamanho da família LTTR e as diversas funções que os LTTRs desempenham, importantes regiões estruturais permanecem altamente conservadas. Os LTTRs compreendem cerca de 330 aminoácidos, sendo a região C terminal um domínio de ligação ao cofator e a região N terminal uma sequência helix-turn-helix (HTH), que fornece um meio de ligação ao DNA (Figura 6). A sequência HTH está presente em todos os LTTRs e aproximadamente 95% de todas as proteínas de ligação a DNA em procariotos (Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F., 2008).

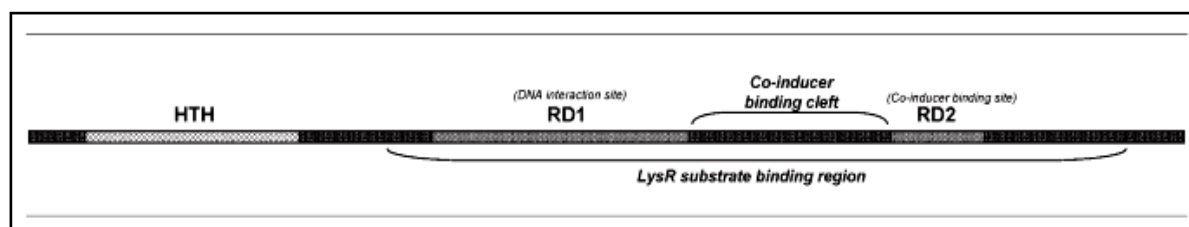


Figura 6: Representação esquemática de um LTTR típico, usando uma sequência de LysR de *E. coli*. Na figura há a indicação do domínio HTH (helix-turn-helix) e a região de ligação ao substrato da LysR, que é composta pelas subunidades RD1 (sítio de interação com DNA), fissura de ligação ao co-indutor e RD2 (sítio de ligação ao co-indutor) (Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F., 2008).

A maioria dos reguladores transcricionais que contem sequências HTH dividem-se em dois grupos distintos, ativadores ou repressores transcricionais. Ativadores transcricionais caracterizam-se por apresentar o HTH localizado na região C terminal, já os repressores transcricionais apresentam o HTH na região N terminal (Pe'rez-Rueda & Collado-Vides, 2001). Os LTTRs formam um grupo único e têm sido denominados como reguladores duplos, em que o HTH está localizado entre os primeiros 20-90 aminoácidos N terminais, independentemente do LTTR está ativando ou reprimindo a sua própria transcrição ou do gene que está regulando (Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F., 2008).

Estudos da composição de aminoácidos e estrutura secundária têm ajudado a identificar muitos LTTRs. Os primeiros 20-80 resíduos são os mais altamente conservados e estão diretamente envolvidos na interação com o DNA. Em contrapartida, há relativamente pouca conservação nos aminoácidos da região C terminal dos LTTRs. Esta região compreende dois subdomínios distintos α / β (RD1 e RD2), que são ligados por duas regiões de *crossover* que formam uma dobradiça ou fissura, que é susceptível a ligação do co-indutor (Stec *et al.*, 2006).

Os LTTRs são funcionalmente ativos quando estão na forma de tetrâmeros, revelando uma proteção a grandes regiões do DNA. Esta grande região de proteção é coerente com a observação de que os LTTRs ligam-se a vários locais na região promotora. A afinidade do LTTR para cada região de ligação distinta é determinada pelo co-indutor e apoforma da proteína que irão se ligar ao RBSs (sítios de regulação de ligação) enquanto que os sítios ABS (sítio de ativação de

ligação) serão ocupados apenas quando o co-indutor estiver vinculado a proteína (Tropel & van der Meer, 2004).

A análise de promotores de diferentes proteínas da família *LysR* indicou um sítio de ligação do fator de transcrição que se aproxima de um palíndromo incompleto: T-N₁₁-A. O número de tais seqüências pode variar dentro dos promotores de diferentes genes que codificam os fatores pertencentes à família *LysR*. Adicionalmente, tais seqüências são localizadas normalmente, 50 a 60 pares de bases *upstream* do *start codon* (Goethals *et al.*, 1992).

Uma importante característica desta família de proteínas e de relação direta com a sua função fisiológica é a autorregulação, além de atuarem como ativadores transcricionais de outros genes. Na maioria dos casos, o gene que codifica o fator de transcrição encontra-se posicionada de modo divergente ao gene alvo da regulação. Tal disposição sugere uma possível interferência nas atividades transcricionais de ambas as *orfs* (*LysR* e gene alvo da regulação). Em *E. coli*, tal interferência foi estudada, tendo-se como modelo o operon *ilvYC* (Rhee *et al.*, 1999).

Com base nas características das proteínas pertencentes a família *LysR* e suas diversas funções realizadas, este projeto tem como prioridade a análise estrutural e funcional de 6 *orfs* de *X. fastidiosa* preditas como *LysR* e, deste modo, fornecer novas informações e ferramentas para os estudos do fitopatógeno.

Em agosto de 2007 foi realizado o Workshop Internacional sobre *Xylella fastidiosa*, organizado pelo Centro de Citricultura/IAC, pela Universidade de São Paulo (USP) e o United States Department of Agriculture dos Estados Unidos (USDA). Neste evento foi lançado um *web site* para o projeto do genoma

comparativo de *X. fastidiosa* (www.xylella.lncc.br). Com este novo projeto, o genoma da linhagem 9a5c foi reanotado, sendo modificada a numeração de diversas orfs, suas seqüências nucleotídicas e a função desempenhada por algumas proteínas (predição feita por comparação de nucleotídeos). A nova nomenclatura e características de cada *orf* em estudo podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Genes em estudo e suas características. Na tabela pode ser visto as descrições dos genes em estudo tanto na antiga anotação quanto na nova, com detalhe para a mudança nas ORFs e predições conforme o banco de dados disponível em www.xylella.lncc.br.

Anotação Antiga				Nova Anotação			
ORF	pb	kDa	Predição	ORF	pb	kDa	Predição
XF0746	984	35,7	CysB	XF0683	984	35,7	CysB
XF0993	906	33,7	Regulador transcricional LysR	XF0930	906	33,7	<i>yafC</i>
XF1511	654	23	Regulador transcricional LysR	XF1448	654	23	Regulador transcricional LysR
XF1522	918	33	Regulador transcricional LysR	XF1459	918	33	<i>yafC</i>
XF1543	975	36,3	Regulador transcricional LysR	XF1480	975	36,3	<i>ycjZ</i>
XF1561	891	32,8	Regulador transcricional LysR	XF1498	891	32,8	<i>ycjZ</i>

2.5. Proteínas em Estudo

2.5.1. XfCysB

Dentre as proteínas em estudo a que é representada pela *orf XF0683* é predita, através da comparação da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos por ferramentas de bioinformática (BLAST), como sendo uma CysB, uma proteína que esta envolvida na expressão do *cys regulon* que representa uma via de utilização de compostos de enxofre inorgânicos como sulfato, tiosulfato e sulfitos, e na produção e transporte de cisteína. Os altos níveis de expressão do *cys regulon* requerem, além da CysB, a presença de um indutor (N-acetil-L-serina) e limitação de enxofre. Assim como a maioria dos membros da família de LysR, a proteína CysB age como um repressor de sua expressão ligando-se a sua própria região promotora e na presença do seu indutor, N-acetil-L-serina (NAS), diminui sua afinidade de ligação (Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995; Lilic *et al.*, 2003; Lochowska *et al.*, 2001).

2.5.2. XfLysRL

Já a proteína expressa pelo gene Xf1448 não teve modificações com a nova anotação e há poucas informações sobre sua função. Um fato curioso sobre suas características é o seu tamanho em pares de base, um valor abaixo do comum encontrado em proteínas da família LysR. Outro dado importante sobre a *orf Xf1448* é a ausência do domínio helix-turn-helix (HTH) na região N-terminal em

sua estrutura (Fig. 7), visto que este domínio é considerado obrigatório para todas as proteínas pertencentes a família LTTR. Uma possível explicação para tal fato é que esta orf em questão pode possuir um domínio HTH ancestral que é formado por uma variedade de hélices aladas que contenha um β -pleated sheet hairpin entre a segunda e terceira hélice (Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F., 2008). Através do alinhamento da sequência de aminoácidos desta proteína pelo programa BLAST observou-se que esta apresenta uma similaridade com a proteína BenM, também pertencente a família das LysR, de *Acinetobacter baylyi* que tem como função a degradação de compostos aromáticos (Ezezika et al., 2007).

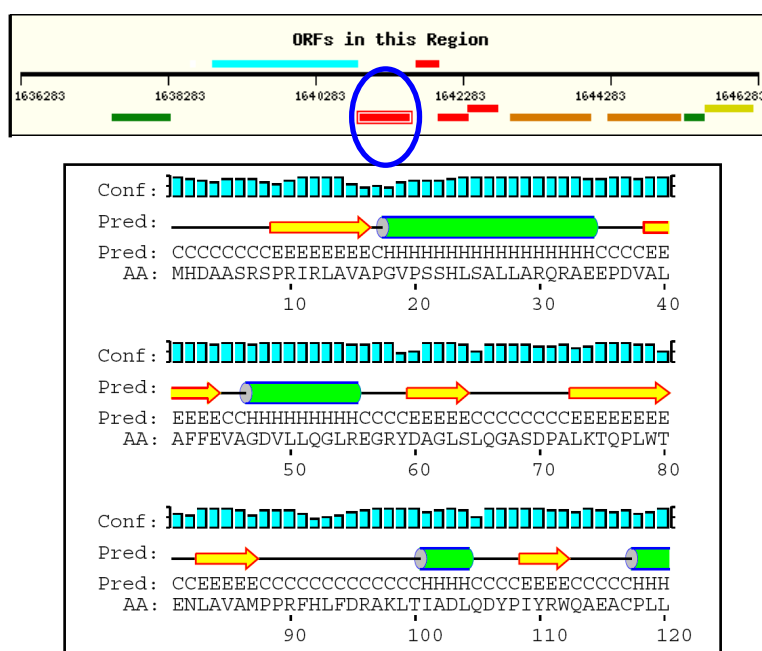


Figura 7: Análise da estrutura da seqüência da orf XF1448. Predição, utilizando-se o servidor PSIPRED, para a estrutura secundária da *orf XF1448* (120 primeiros aminoácidos mostrados apenas) indicando a ausencia da região helix-turn-helix. Flecha amarela: folha- β ; Cilindro verde: α -hélice

2.5.3. XfycjZ

A proteína codificada pelo gene *Xf1480* é classificada apenas como proteína hipotética, regulador transcricional *LysR*, e após a nova reanotação, com base em sua similaridade, foi classificada com função igual ao gene *ycjZ* de *E. coli* que tem a função hipotética a regulação transcricional da região intergênica *tpx-fnr* (<http://www.xylella.Incc.br>). Apesar desta proteína estar classificada como hipotética, quando se realiza o alinhamento de sua sequência de aminoácidos através do programa BLAST obteve-se como resultado alta similaridade desta com a proteína CrgA (contact-regulated gene A) de *Neisseria meningitidis*, que é uma LTTR e tem como função a interação entre patógeno e hospedeiro (Sainsbury *et al.*, 2009).

2.5.4. XF0930, XF1459 e XF1498

As proteínas codificadas pelas *ORFs* *XF0930* e *XF1459* eram classificadas apenas como proteínas hipotéticas, reguladores transcricionais *LysR*, e após a nova reanotação, com base em sua similaridade, a *ORF XF1459* foi classificada com função igual ao gene *yafC* de *E. coli*. O gene *yafC* tem como função hipotética a regulação transcricional da região intergênica *aspU-mltD*.

Resultados semelhantes são encontrados para o gene *XF1498*, que na nova reanotação foi classificado com funções semelhantes a proteína *ycjZ* de *E. coli*, resultado idêntico ao encontrado pelo gene *XF1480* (*XfycjZ*), porém não apresenta a similaridade com a proteína CrgA

Poucas informações há sobre as duas proteínas de *E. coli* citadas a cima, sendo que houve apenas a sua classificação e localização no cromossomo (<http://www.gene-profiles.org>)

Em síntese, o estudo de caracterização estrutural e funcional das proteínas do tipo LysR em *X. fastidiosa* é considerado de grande relevância, devido à alta variedade de membros da família *LTTR* com funções distintas. Além de validar as anotação genômica para estas *ORFs* selecionadas, a caracterização da expressão destas proteínas durante a formação do biofilme – principal mecanismo de patogenicidade da bactéria – também será avaliado.

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

- Fornecer subsídios ao estudo da estrutura tridimensional das proteínas alvo;
- Caracterizar a expressão dos fatores de transcrição *Xf0683* (XfCysB), *Xf1448* (XfLysRL) e *Xf1480* (XfycjZ) durante as diferentes fases de formação do biofilme de *X. fastidiosa*.

3.2. Objetivos Específicos

- Clonagem dos genes;
- Expressão protéica;
- Purificação das proteínas alvos;
- Resolução da estrutura tridimensional;
- Caracterização funcional.

4. Manuscritos

**Characterization of a LysR Type Transcriptional Factor From
Phytopathogen *Xylella fastidiosa***

Autores: PELLOSO, A.C.¹; TOLEDO, M.A.S.¹; SANTOS, C.A.¹; SARAIVA, A.¹;
SCHNEIDER, D.R.S.¹; AZZONI, A.R.¹; APARICIO, R.³; SOUZA, A.P.^{1,2}

1 - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

2 - Departamentos de Biologia Vegetal – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

3 - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Resumo

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria fitopatogena responsável por diversas doenças em culturas economicamente importantes para o homem. Dentre essas, encontra-se a Clorose Variegada de Citrus (CVC), que afeta fortemente a citricultura nacional. Devido a grande importância do cultivo de laranja no Brasil e os prejuízos gerados por este patógeno. Este trabalho teve como objetivo o estudo e a caracterização de uma proteína pertencente a família LysR que é caracterizada por ser reguladores transcricionais globais, em que estão envolvidos em diversos mecanismos como manutenção celular, proteção e virulência. Para a caracterização da proteína XfLysRL foram feitos testes estruturais como Dicroísmo Circular, Cromatografia de Exclusão por Peso Molecular e SAXS. Os testes funcionais realizados foram a análise da expressão da proteína XfLysRL durante a formação de biofilme de *X. fastidiosa*. Como resultado para os testes estruturais pode-se observar que a proteína XfLysRL apresenta estrutura secundária enovelada e estável até 44°C, seu estado oligomérico quando em solução é dímero e apresenta-se monodispersa. Seu peso molecular em solução é de aproximadamente 50 kDa e sua estrutura terciária demonstra-se ser semelhante a proteína BenM, proteína esta que também pertence a família LysR e que esta envolvida na degradação de compostos aromáticos. Em relação aos dados obtidos dos testes funcionais pode-se observar que os anticorpos produzidos para a proteína XfLysRL foram reativos quando colocados frente a proteínas totais referentes aos 6 pontos de formação de biofilme nas reações de Western blot, demonstrando que aparentemente a proteína em estudo tem grande importância

na patogenicidade da *X. fastidiosa*. Entretanto estes dados devem ser confirmados com a presença de um controle constituído por células planctônicas de *X. fastidiosa*.

Introdução

A bactéria *Xylella fastidiosa* é o agente causador de diversas doenças em plantas. No Brasil é responsável pela grave doença denominada Clorose Variegada dos Citros (CVC) (Lee *et al.*, 1991), que prejudica uma das culturas mais importantes economicamente em nosso país, a da laranja. A hipótese mais aceita para as doenças causadas por *X. fastidiosa* é que a bactéria causa uma oclusão vascular devido da formação do biofilme, conduzindo ao estresse hídrico (Osiro *et al.*, 2004). Sendo o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado (Simpson *et al.*, 2000), tornou-se alvo da genômica funcional e estrutural na busca da compreensão do seu mecanismo de infecção e da sua adaptação aos hospedeiros, através da caracterização das proteínas codificadas pelos seus genes. A estrutura e função de uma proteína estão intimamente correlacionadas, deste modo o conhecimento da estrutura protéica é uma valiosa informação para a determinação tanto da sua função protéica, quanto da relação existente entre ambas. Deste conceito deriva a grande importância dos estudos para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas. No entanto, sabe-se que apenas a conhecimento estrutural é insuficiente para deduzir a função global da proteína de interesse na célula, fazendo-se necessário combinar estudos bioquímicos (*in vitro*) e celulares (*in vivo*) com informações estruturais

para completar a compreensão global do mecanismo celular envolvido (Chothia & Lesk, 1986). Com o objetivo de se contribuir para um maior entendimento sobre a *X. fastidiosa* e os mecanismos de sua patogenicidade, propõe-se nesse trabalho efetuar o estudo de uma proteína (XfLysRL) que tem como predição ser um membro da família LysR

Os reguladores transcricionais de proteínas do tipo LysR (*LTTR*) constituem uma das famílias de reguladores mais comuns em procariotos. A maioria dos *LTTRs* tem uma função regulatória dupla: agindo como ativador transcricional em um ou diversos loci, e negativamente quando regula a transcrição de seu próprio gene. Os genes controlados pelo *LTTRs* apresentam funções diversas como biossíntese de aminoácido, fixação do CO₂, resistência antibiótica, catabolismo de compostos aromáticos, formação de nódulos em bactérias fixadoras de N₂ e síntese dos fatores de virulência (Muraoka *et al.*, 2003).

As proteínas da família *LTTR* apresentam similaridades na sequência dos aminoácidos, tendo um maior grau de similaridade de sequência nos 65 resíduos da porção N-terminal. A região N-terminal destas proteínas apresenta um domínio *helix-turn-helix* (HTH) que se liga a sequências específicas do DNA. A região C-terminal das proteínas possui um domínio regulatório, onde se liga o indutor (Lilic *et al.*, 2003; Schell, 1993). Proteínas *LTTR* típicas ligam-se a sequências longas de DNA (aproximadamente 50 a 60 pb) as quais apresentam dois locais de ligação distintos: (1) região de reconhecimento de ligação (*RBS – Recognition-binding site*) e (2) região de ativação da ligação (*ABS – Activation-binding site*) que se sobrepõem a região de início da transcrição do gene regulado. Os *LTTRs* quando ligados ao DNA apresentam-se como um tetrâmero na sua forma biológica ativa. A

formação deste tetrâmero provoca uma curvatura na fita de DNA alvo. A ligação do indutor à proteína *LTTR* faz com que haja um relaxamento na curvatura do DNA levando à formação de um complexo ativo junto com a RNA polimerase para iniciar a transcrição do gene (Muraoka *et al.*, 2003).

A habilidade da maioria das proteínas do tipo LysR em ativar a transcrição é dependente da presença de um co-indutor que pode ser desde um íon a uma proteína, tal como o octopina para a proteína OccR de *Agrobacterium tumefaciens*, o indoleglicerol fosfato para TrpI de *Pseudomonas aeruginosa*, o N-acetilserina para CysB de *Escherichia coli*, e os flavonóides para as proteínas NodD das diferentes espécies de *Rhizobium*. O fato de que os membros da *LTTR* apresentam baixa similaridade na região C - terminal reflete, provavelmente, a variedade dos co-indutores a que estas proteínas respondem (Kullik *et al.*, 1994).

Deste modo, esse trabalho teve como objetivo realizar a caracterização inicial da proteína XfLysRL por experimentos estruturais como dicroísmo circular, cromatografia por exclusão de peso molecular e SAXS, em que será possível a determinação do comportamento da proteína em solução, seu estado oligomérico e determinação do envelope proteico para a elaboração de um modelo tridimensional. Objetiva-se também a análise da proteína em estudo durante a formação do biofilme de *X. fastidiosa* através da produção de anticorpos específicos para a XfLysRL e realização de Western blot dos anticorpos produzidos frente o extrato proteico do biofilme referente aos dias 3, 5, 10, 15, 20 e 30. Com base nos estudos relacionados ao biofilme será possível averiguar a relevância da proteína em estudo na fase infectante da bactéria *X. fastidiosa*.

Materiais e Método

Análise Comparativa

Para a realização da análise comparativa das seqüências de aminoácidos da proteína XfLysRL (gi:9106785 / GeneBank: AAF84528.1) em estudo utilizou-se o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para a busca de seqüências similares através do programa BLASTP. Após selecionar as informações a serem tratadas, os dados foram processados pelos programas CLUSTALW 2 e GENEDOC.

Clonagem, expressão e purificação.

O gene correspondente a proteína XfLysRL foi amplificado por PCR utilizando-se como amostra o DNA genômico de *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c. Foram desenhados *primers* específicos para a seqüências alvo de modo que produziram fragmentos adaptados ao vetor de clonagem pET28a com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (*primer* *direto*: 5' – TAATCATATGCACGACGCCGCCAGT – 3' / *primer* *reverso*: 5' – ATCTCGAGTCACCTTGCACCAGCAC – 3'). O produto gerado pela amplificação por PCR foi então clonado em pET28a e transformado em linhagens competentes de *E. coli* DH5α. A verificação dos plasmídeos recombinantes foi analisada por PCR de colônias transformadas e efetuou-se o sequenciamento dos clones para

verificação de mutações e local de inserção do inserto no vetor. A linhagem competente de *E. coli* BL21(DE3) foi transformada com o vetor recombinante extraído e purificado das colônias positivas por minipreparação em lise alcalina.

As células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor recombinante foram inoculadas a 37°C overnight a 300 r.p.m. em 3mL de meio LB contendo 40 µg.mL⁻¹ do antibiótico kanamicina e posteriormente transferido para 2L de meio LB contendo a mesma concentração de antibiótico. As células foram crescidas até atingirem uma D.O.₅₆₀ correspondente a 0,6 – 0,8 e então sua super-expressão foi induzida pela adição de Lactose na concentração de 5,6 mM, seguido pela incubação a 300 r.p.m. por 4 horas a 37°C. Posteriormente as células foram centrifugadas a 5000 g por 15 min a 4°C e o pellet foi ressuspendido em tampão A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl em pH 7,5) com Lisozima (1 mg.mL⁻¹) e PMSF (1 mM) (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). Após isto as células ficaram sob agitação por 30 min a 4°C seguido de sonicação das mesmas e centrifugação do extrato protéico a 15 000 g por 20 min a 4°C. A purificação da proteína XfLysRL recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel, em que se utilizaram colunas Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Germany) equilibradas com tampão A. A eluição da proteína XfLysRL purificada foi obtida quando se utilizou um gradiente da concentração de Imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM) juntamente com o tampão A. O maior rendimento foi obtido com 100 mM de imidazol.

Dicroísmo Circular (CD)

A caracterização estrutural preliminar da proteína XfLysRL foi realizada por Dicroísmo Circular (CD). A espectroscopia do CD detecta a absorção diferencial dos componentes levógeno e destrógeno de uma radiação circularmente polarizada. Esse efeito ocorre quando a molécula possui um cromóforo quiral (opticamente ativo) ou quando está presente em meio quiral. Devido às interações específicas da luz com os cromóforos da proteína – ligação peptídica, resíduos aromáticos e pontes dissulfeto, o CD fornece espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária e terciária. Os experimentos de CD foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-180 do LNBIO. As medidas foram tomadas em cubetas de 1,0 mm de distância óptica com medidas de 190 a 260 nm, na concentração protéica de 0,350 mg/ml, variando a temperatura, para avaliar a estabilidade e o enovelamento da proteína que se encontrava em tampão Tris-HCl 5mM. A deconvolução dos dados obtidos foi feita pelo programa Dichroweb, utilizando o banco de dados CDSSTR.

Cromatografia de Exclusão por Peso Molecular

A cromatografia por gel filtração para a averiguação do estado oligomérico das proteínas em estudo foi feita utilizando-se a coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 2 volumes de coluna (48 mL) de tampão contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM e pH 7,5, e

250 µL das amostras foram injetadas a um fluxo de 0,5 mL/min. Como padrões de calibração foram utilizados *HMW (High Molecular Weight) and LMW (Low Molecular Weight) Gel Filtration Calibration Kit* (GE Healthcare) e a análise dos resultados foi feita conforme descrito no manual do kit de calibração. O estado oligomérico das proteínas foi determinado pela curva de dispersão de K_{av} versus Log10 do peso molecular dos padrões e amostras (Figura 4). O coeficiente K_{av} determinado pela equação: $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_c - V_o)$, sendo V_o o volume morto da coluna, V_e o volume de eluição da amostra e V_c o volume geométrico da coluna. Como padrões foram utilizados Thyroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Blue Dextran 2000 (2000 kDa), sendo o ultimo utilizado para o calculo do volume morto da coluna.

Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Informações sobre a técnica de SAXS podem ser encontradas em revisões relativamente recentes (por exemplo, Koch *et al.*, 2003; Svergun & Koch, 2003 e Boesecke, 2007), além de fontes na internet. Estas referências contêm os princípios da técnica, além de aspectos relacionados à instrumentação e coleta de dados e os passos envolvidos em seu processamento. Dados de SAXS foram coletados com a proteína a 1,5 mg/ml em tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM e pH 7,5 na linha D02A-SAXS2 do LNBIO, equipada com um detector bidimensional MAR CCD 345. O comprimento de onda normalmente utilizado é $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$ e a distância amostra-detector será ajustada de acordo com

a amostra e a faixa de vetor de espalhamento desejada. Em todos os casos, o procedimento de coleta consiste na aquisição de dados em várias exposições consecutivas, com duração em torno de 10 min cada uma, seguidas por uma exposição de 10 min. da solução-tampão. A integração das imagens foi feita com o programa FIT2D (Hammersley, 1996, Hammersley *et al.*, 1997). Após a integração, as curvas foram normalizadas pela intensidade total e atenuação da amostra, e o espalhamento da solução-tampão foi subtraído do espalhamento das amostras da proteína. Análises da região de Guinier e cálculo da Função Distribuição de Distâncias, $P(r)$, foram feitas em parte com o pacote ATSAS (Konarev *et al.*, 2006), utilizando-se os programas PRIMUS e GNOM. As estimativas de massa molecular foram obtidas a partir com auxílio de um padrão de calibração (Lisozima a 20 mg/mL e BSA a 3 mg/mL), através da expressão $[Mc/I(0)]_{\text{proteína}} = [Mc/I(0)]_{\text{padrão}}$ onde, para cada espécie, M é a massa molecular, c é a concentração e $I(0)$ a intensidade de espalhamento na origem. A reconstrução dos envelopes foi feita através dos programas DAMMIN e GASBOR, também incluídos no pacote ATSAS. Modelos de alta resolução foram utilizados para interpretar os envelopes de baixa resolução obtidos e para ajuste das curvas de espalhamento de SAXS através dos programas SASREF e BUNCH (Petoukhov & Svergun, 2005).

Anticorpos Policlonais

A proteína previamente purificada foi liofilizada e ressuspendida em PBS estéril. A amostra foi homogeneizada com adjuvante na proporção 1:1 (V/V) e inoculada em três coelhos da linhagem branca da Nova Zelândia, no início da maturidade sexual. A inoculação foi por via intradérmica, sendo 1 ml por animal, e intervalos de 15 dias entre a administração das doses e foram aplicadas 3 doses. Transcorridos 15 dias após a última dose, foi feita a sangria de prova e o anti-soro foi testado pelo método indireto de ELISA (Clark *et al.* 1986). Posteriormente, o soro foi coletado, inativado a 56°C e armazenado em freezer -20°C. Foi realizado também teste para a averiguação de reatividade cruzada com demais proteínas.

Western blot

As células correspondentes as 5 etapas de formação de biofilme foram produzidas e cedidas pela Professora Alessandra Alves de Souza (Centro de Citricultura / IAC - Cordeirópolis). Primeiramente as proteínas referentes as diferentes fases de biofilme foram extraídas através da adição de 1 ml de Tampão de Extração (50 mM Tris pH 8,0; 25 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 8,0; 2% Triton X-100) Lisozima (concentração final 1 mg/ml) e PMSF (concentração final 1 mM) ao pellet obtido, após isto as amostras ficaram 20 minutos sob agitação no gelo seguido por 5 sonicações de 10 segundos. Com o término das sonicações as amostras foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C e guardou-se o sobrenadante.

Amostras das proteínas totais de *X.fastidiosa* nas diferentes fases de formação de biofilme foram padronizadas para uma mesma concentração antes da aplicação em gel de SDS 12%. Após isso, o gel foi incubado por 10 min em tampão de transferência (25mM Tris; 192mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol) a temperatura ambiente. As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF durante 2 horas, a 250 mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora, sob agitação, em tampão TBST (24,7mM Tris; 136,8mM NaCl; 2,7mM KCl; 0,1% de Tween 20; pH 7,5) contendo 5% de leite em pó desnatado, seguidos por incubação overnight a 4°C. Após isto a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBST seguidas por uma incubação de 1 hora a temperatura ambiente em tampão TBST 5% de leite em pó desnatado juntamente com o anticorpo primário diluído 1:8000. Após isto a membrana foi lavada mais 3 vezes com TBST e incubadas por 1 hora em TBST contendo 5% de leite em pó desnatado e o conjugado *goat anti-rabbit IgG* fosfatase alcalina (SIGMA). A revelação da membrana foi feita em solução contendo 25ml de tampão de reação (100mM Tris-HCl pH 9,0; 150mM NaCl; 1mM MgCl₂), 2mg de BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate) e 4mg de NBT (nitro blue tetrazolium).

Resultados e Discussão

Análise Comparativa

Com base no estudo de similaridade pode-se observar que a proteína XfLysRL apresente uma identidade (Fig. 1) com BenM, uma proteína pertencente a família LysR. A proteína BenM da bactéria de solo *Acinetobacter baylyi* ADP1

tem como função o controle da regulação de uma via de degradação de compostos aromáticos e apresenta a particularidade de ativar a transcrição sinergicamente em resposta as dois indutores, benzoato e cis, cis-muconato (Ezezika *et al.*, 2006; Ezezika *et al.*, 2007). A proteína BenM tem como característica a ativação de sua expressão gênica durante o consumo de benzoato e a repressão da transcrição quando o composto acaba. (Ruangprasert, 2010). Os mecanismos de regulação que controlam a expressão dos genes do catabolismo de benzoato parecem ser muito diferentes . Dois tipos de proteínas reguladoras, uma BenR de *P. putida* e um BenM de *A. baylyi* ADP1 são conhecidas por estarem envolvidas na ativação da expressão do gene *ben* em resposta ao benzoato (Collier *et al.*, 1998; Zhan *et al.*, 2008). Em estudos recentes, Zhan *et al* (2008) demonstraram que a inativação da proteína BenM impediu a degradação de benzoato, mas não a degradação catecol, e a proteína BenM vinculado à região promotora do gene *benA* ativa a expressão gênica em resposta à presença de benzoato em *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. Curiosamente, o indutor do gene *benA* é benzoato, mas não muconato, um indutor comum para o gene *benA* em *A. baylyi* ADP1, o que implica que a estrutura do sitio de ligação do indutor da BenM em PHEA-2 difere das demais bacterias que degradam benzoato.

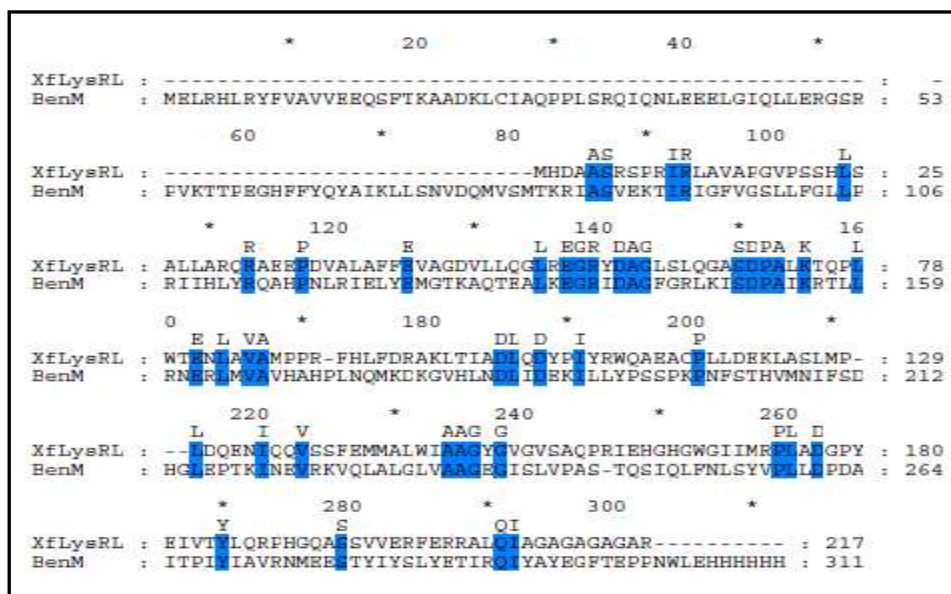


Figura 1: Alinhamento de seqüências de XfLysRL com BenM utilizando CLUSTAW2 e GENEDOC, com as identidades em parênteses. XfLysRL - *X. fastidiosa*; BenM – *Acinetobacter baylyi* (26%). As letras marcadas em azul escuro representam aminoácidos idênticos nas seqüências.

Clonagem, Expressão e Purificação

A *orf* XF1448 foi clonada corretamente no vetor de expressão pET28a, não apresentando mutações pontuais e nem discordâncias na seqüência de nucleotídeos entre a seqüência da *orf* amplificada e a seqüência presentes no banco de dados do Projeto Genoma *Xylella fastidiosa* (<http://www.xylella.Incc.br>). Após a transformação do plasmídeo em células competentes de *E. coli* BL21(DE3) o máximo de expressão da proteína XfLysRL foi obtido com 4 horas de indução utilizando-se como agente indutor 5,6 mM de Lactose e resultando em um rendimento médio da proteína por litro de cultura a uma concentração final de 3 mg/ml.

Com base nos resultados obtidos o teste de purificação por cromatografia de afinidade ao metal, que neste experimento utilizou-se o níquel, foi feito com o

pellet da proteína referente a 100 ml de meio de cultura pós-indução, sendo o mesmo ressuspensionado em 20 ml do tampão de extração como descrito na metodologia. Após a obtenção da fração solúvel da proteína, ela foi submetida ao processo cromatográfico de afinidade em resina de Ni-NTA Superflow (Qiagen) em colunas de gravidade, sendo a proteína solúvel e purificada obtida após as etapas de eluição com diferentes concentrações de imidazol. As frações da purificação protéica foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE e o resultado pode ser observado na Figura 2, que demonstra a proteína XfLysRL na sua fração solúvel com peso molecular de 23,7 kDa. Pode-se observar também que o maior rendimento de purificação da proteína foi obtido quando se utilizou imidazol na concentração de 100 mM.

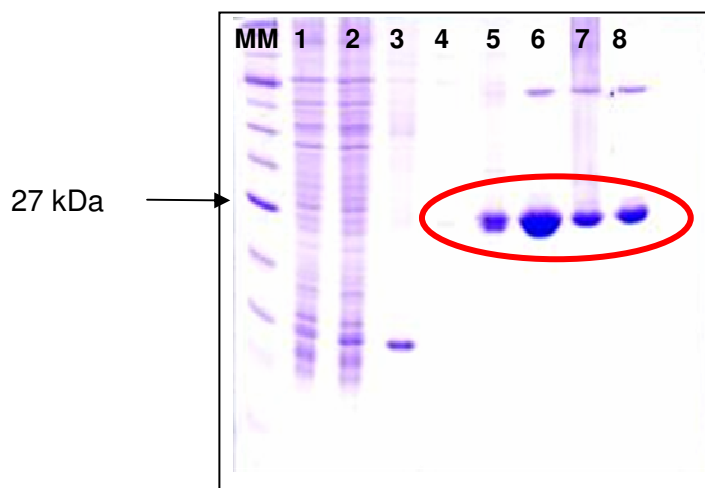


Figura 2 - Purificação da proteína XfLysRL clonada. Gel SDS-PAGE (12%) para o teste de purificação da proteína em coluna com resina Ni-NTA (Qiagen). **MM** - Marcador Protein Marker Broad Range (New England BioLabs); **5 a 8** - Eluição da proteína XfLysRL em diferentes concentrações de imidazol (50, 100, 200 e 500 mM, respectivamente);

Dicroísmo Circular (CD)

A análise da proteína XfLysRL por CD revelou que esta apresenta estrutura secundária com predominância de fitas beta (29%) e hélice - alfa (18%) (Tabela 1), e estes dados corroboram com os resultados obtidos pelo PSIPRED (programa que prediz a estrutura secundária de proteínas) que foram de 29% de folhas betas e 21% de alfa hélice. Tal resultado indica um enovelamento da proteína estudada, o que permite dar continuidade aos experimentos de caracterização funcional. Foi realizada para a proteína XfLysRL uma análise em que se variou a temperatura da amostra, sendo essa variação de 4°C a 84°C e pode-se observar (Figura 3) que a proteína permanece estável e com estrutura secundária até 44°C, sendo que após isto a proteína XfLysRL perde seu enovelamento. Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que a amostra é altamente estável, que a clonagem foi realizada com sucesso devida a presença da estrutura enovelada e podendo assim a realização de diferentes ensaios.

Tabela 1: Análise da estrutura secundária da proteína XfLysRL. Comparação entre os valores obtidos pela técnica de CD e pelo programa de predição PSIPRED para a proteína XfLysRL.

Condição	α - hélice	Folhas β	Outros
PSI-PRED	21	29	50
Dados	19	29	52

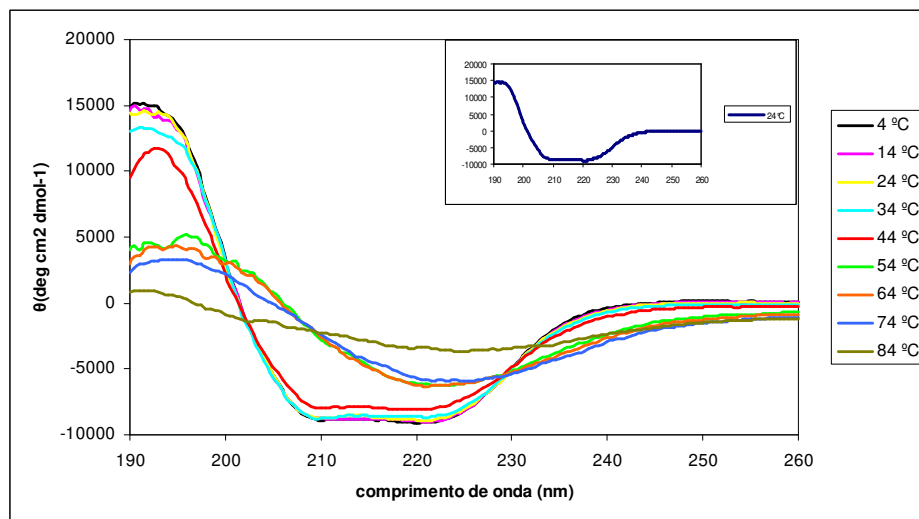


Figura 3 - Análise da proteína XfLysRL pela técnica de CD. Espectros de CD da proteína XfLysRL a 0,582 mg/mL obtido nos comprimentos de ondas entre 190 e 260 nm variando a temperatura de 4 a 84°C. Em destaque o espectro da mesma proteína a 24°C. De snaturação da proteína à 44°C.

Cromatografia de Exclusão por Peso Molecular

Através da técnica de cromatografia de exclusão por peso molecular pode-se estimar o estado oligomérico da proteína estudada quando em solução e sua possível dispersão. Os testes realizados revelaram que a proteína XfLysRL durante a eluição na coluna possui um pico único entre os padrões Ovalbumina (43 kDa) e Conalbumina (75 kDa). Com base nos dados obtidos pode-se demonstrar que a proteína XfLysRL teve a sua massa molecular estimada em 52,2 kDa, o que indica que a proteína quando em solução está na forma dimérica e monodispersa, já que a massa molecular predita da proteína é de 23,7 kDa e não apresenta mais de um pico durante a eluição na coluna. Foi realizado para esta proteína um ensaio em que foi adicionado a coluna uma mistura da protéica

juntamente com benzoato de sódio, co-indutor da proteína BenM, porem nenhuma alteração foi observada (dados não mostrados). Apesar dos resultados não serem conclusivos a hipótese não é descartada, pois a proteína XfLysRL pode pertencer a alguma proteína do grupo da BenM em que possui um co-indutor diferente ou a ausência da região HTH influenciou na ligação entre proteína + co-indutor.

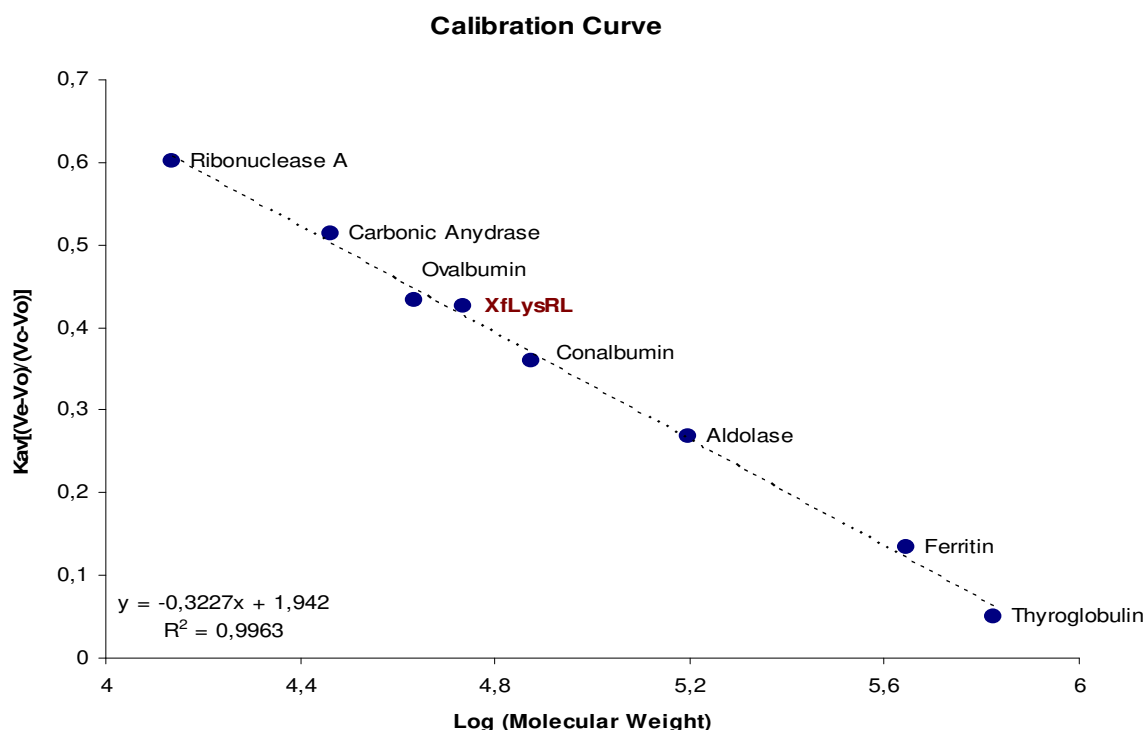


Figura 4 - Análise XfLysRL por cromatografia de exclusão por peso molecular. Curva de dispersão referente a proteína XfLysRL e padrões. Massa molecular estima pela técnica igual a aproximadamente 52,2 kDa.

Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

Nos primeiros testes realizados com a proteína XfLysRL, as leituras dos dados foram feitas em tampão TrisHCl 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 200 mM em pH 7,5. A concentração de proteína para a leitura dos dados foi de 1,5 mg/ml e utilizou-se como padrão BSA na concentração de 3,3 mg/ml. A distância amostra-detector foi de 1682,88 mm e o comprimento de onda (λ) foi de 1,488 Å. A partir dos dados coletados, fez-se a média das curvas obtidas, resultando na curva de espalhamento da proteína XfLysRL (Figura 5A) e o respectivo gráfico de Guinier (Figura 5B). O comportamento linear observado neste último, indica amostra monodispersa em solução, com um raio de giro estimado em 28,5 Å. A massa molecular foi estimada em 50 kDa, indicando que a proteína XfLysRL encontra-se na forma dimérica em solução, uma vez que a massa molecular predita do monômero é de 23,7 kDa. Pode-se inferir também que, através da análise do gráfico de Kratky (Figura 5C), a curva apresenta um máximo bem definido e a proteína se encontra com uma estrutura terciária bem definida. Pode-se observar também, através do gráfico de função de distribuição de distâncias $P(r)$ (Figura 5D), que a proteína é estruturalmente globular e apresenta uma distância intramolecular máxima de 90 Å, sendo que a maior concentração das distâncias obtidas foi aproximadamente de 30 Å. A partir da $P(r)$, uma segunda estimativa para o raio de giro foi 27,6 Å, valor compatível com aquele obtido pelo gráfico de Guinier, como esperado.

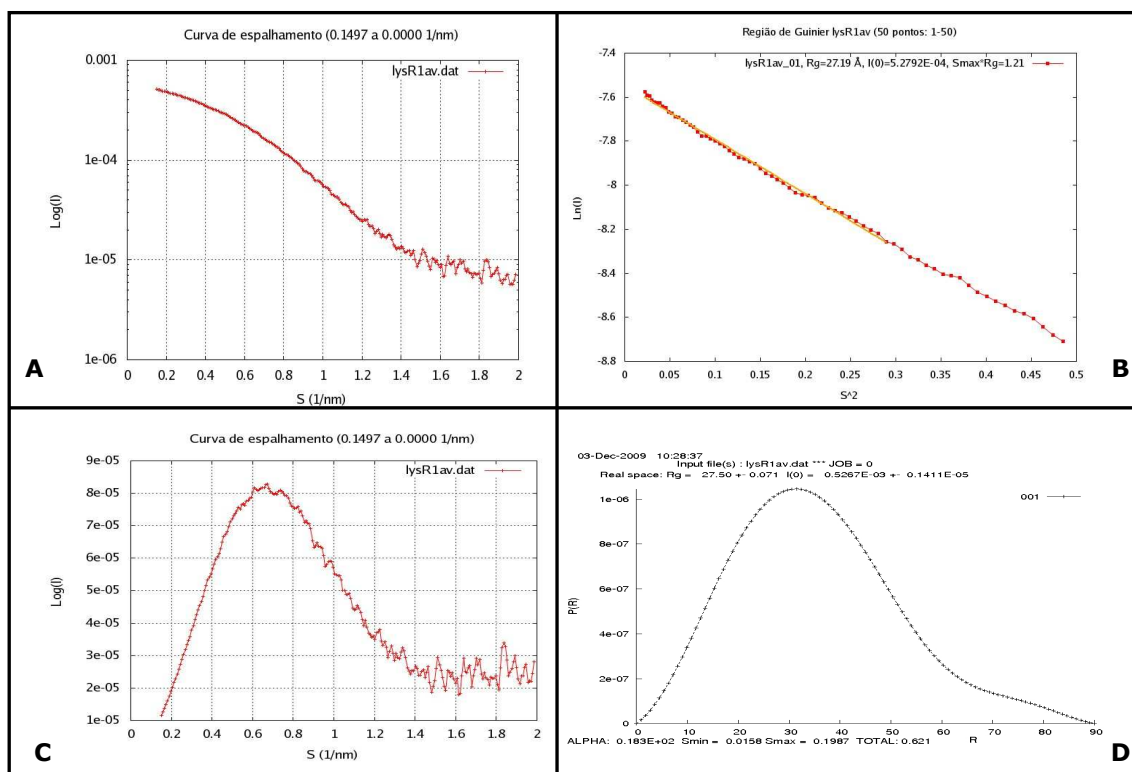


Figura 5: Análise dos dados obtidos da proteína XfLysRL pela técnica de SAXS. A – Curva experimental do espalhamento da proteína XfLysRL; B - Gráfico de Guinier; C - Gráfico de Kratky; D - Função de distribuição de distâncias, P(r).

Uma última análise, ainda bastante preliminar, foi feita a partir da construção de um envelope para a proteína XfLysRL, impondo-se simetria P2. Após a construção do envelope, utilizou-se o banco de dados PDB (Protein Data Bank) para a busca de uma estrutura homóloga que pudesse ajudar na interpretação do envelope. A proteína homóloga de maior identidade sequencial (43 % de positivos; entrada PDB 2F6G, Ezeizika *et al.*, 2007) é classificada como BenM, proteína pertencente a família LysR, de *Acinetobacter baylyi*. Deste modo foi possível fazer uma sobreposição da estrutura do envelope obtido com a estrutura obtida no PDB (Figura 6). Com a sobreposição, pode-se inferir que estas proteínas devem apresentar estruturas semelhantes em solução, devido ao bom

ajuste que a proteína BenM teve dentro do envelope da proteína XfLysRL. Além disso, é importante destacar que o modelo utilizado para interpretar o envelope da LysRL pode ser melhorado através de técnicas computacionais de predição de estruturas, e que é necessário o emprego de outros pacotes computacionais dedicados ao tratamento de dados de SAXS, capazes de realizar um melhor ajuste dos modelos, principalmente no que concerne à orientação interna dos domínios que compõem as duas subunidades diméricas.

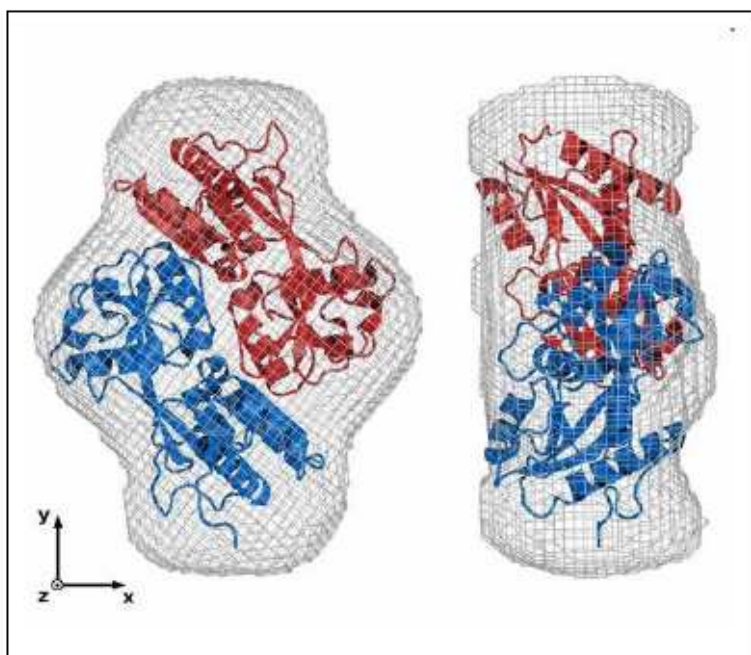


Figura 6: Desenho representativo da proteína XfLysRL. Envelope da proteína XfLysRL obtido por SAXS (em cinza) juntamente com a sobreposição da proteína BenM de *Acinetobacter baylyi* (subunidades em vermelho e azul). A figura da direita é rotacionada de +90 graus em torno do eixo y.

Anticorpos e Western blot

Os anticorpos policlonais produzidos para a proteína XfLysRL apresentam grande especificidade, sendo este teste verificado por ELISA. A figura 7 mostra os resultados obtidos por ELISA e as diluições utilizadas nos ensaios. Com todos os anticorpos produzidos e testados eles tiveram respostas específicas até a diluição de 1:40000. Em relação às proteínas referentes às diferentes fases de formação do biofilme e conseqüentemente o Western blot pode-se observar que nos ensaios realizados os anticorpos da proteína XfLysRL estão presentes nos 6 tempos analisados que correspondem a 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de formação de biofilme (Figura 8). Pode-se verificar também que a intensidade dos anticorpos referentes a proteína dimérica estão mais acentuados (aproximadamente 50 kDa). Com os dados obtidos pode-se inferir que a proteína em estudo apresenta certo grau de importância nas fases de formação de biofilme, principalmente pela similaridade com a proteína BenM, cuja função é a degradação de compostos aromáticos, um procedimento altamente importante para a sobrevivência celular e permite uma rápida integração dos sinais celulares (Ezezika, 2006).

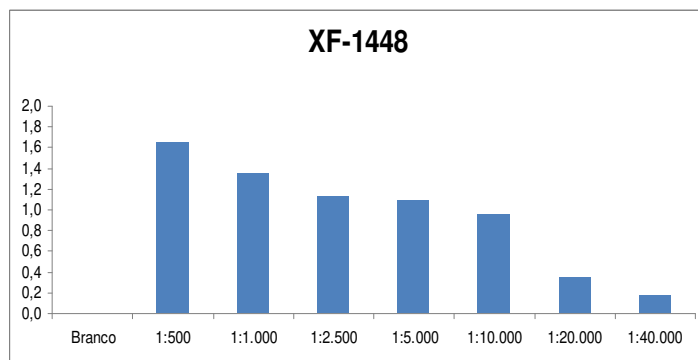


Figura 7: ELISA dos anticorpos produzidos para XfLysRL. Gráfico referente a detecção da técnica frente a diferentes diluições do anticorpo para XfLysRL.

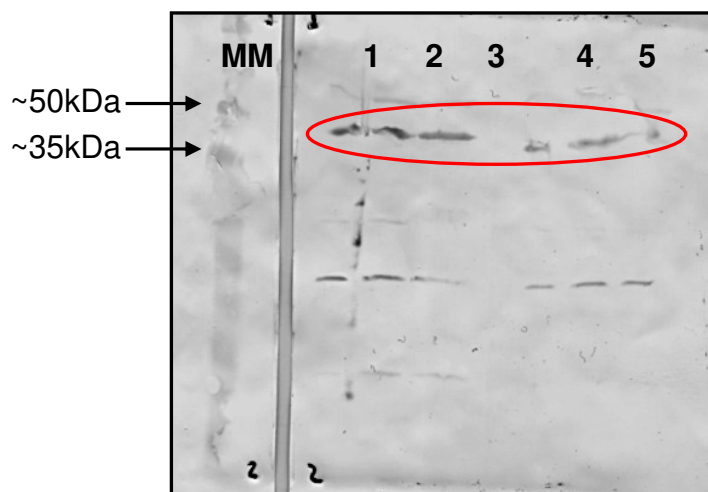


Figura 8: Resultado dos Western blot realizados com diferentes fases dos biofilme frente ao anticorpos de XfLysRL. MM – Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); 1 – Biofilme referente a 3 dias; 2 - Biofilme referente a 5 dias; 3 - Biofilme referente a 10 dias; 4 - Biofilme referente a 15 dias; 5 - Biofilme referente a 20 dias; 6 - Biofilme referente a 30 dias.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos podemos inferir que a proteína XfLysRL foi clonada corretamente, não apresentando mutações pontuais. Sua estrutura secundária é estável e enovelada, mantendo suas características de 4°C a 44°C. Quando em solução possui a forma dimérica e é monodispersa, que pode ser

comprovado por duas técnicas distintas como gel filtração e SAXS. Foi possível estabelecer um modelo para a proteína em estudo com base nos resultados obtidos por SAXS e pela análise de similaridade da proteína XfLysRL frente a proteína BenM de *Acinetobacter baylyi*, que apesar de ser baixa demonstrou um ótimo ajuste do envelope produzido quando sobreposto a estrutura da proteína BenM.

Outras informações relevantes obtidas para a proteína XfLysRL foi em relação aos resultados apresentados referentes ao biofilme, onde foi possível visualizar a presença da proteína em estudo durante os 6 tempos analisados que correspondem as 5 etapas de formação do biofilme. Estes experimentos necessitam ser repetidos com um controle constituído por células de *X. fastidiosa* no estágio planctônico. Tais dados sugerem que a proteína XfLysRL apresenta papel relevantes neste estado da bactéria, visto que a XfLysRL tem similaridade com BenM, uma proteína envolvida na degradação de compostos aromáticos, tornando-se assim um fator de extrema relevância para a sobrevivência da *Xylella fastidiosa* durante o biofilme.

Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro. A Dr^a. Alessandra Alves de Souza e Dr^a. Dagmar Ruth Stach Machado pela colaboração

científica. Ao LNBIO pelo apoio técnico, pelo suporte de equipamentos e colaboração nos experimentos.

Referencias Bibliográficas

Boesecke, P. 2007. Reduction of two-dimensional small- and wideangle X-ray scattering data. *J. Appl. Cryst.*, 44: 423–427.

Chothia C. and Lesk A.M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5: 823-826.

Collier LS, Gaines GL III, Neidle EL (1998) Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* 180:2493–2501.

Ezezika, C. O.; Haddad, S.; Clark, T. J.; Ellen L. Neidle, E. L.; Momany, C. (2006). Distinct Effector-binding Sites Enable Synergistic Transcriptional Activation by BenM, a LysR-type Regulator. *J Mol Biol* 367, 616 – 629.

Ezezika OC, Haddad S, Neidle EL, Momany C. (2007) Oligomerization of BenM, a LysR-type transcriptional regulator: structural basis for the aggregation of proteins in this family. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, May 1;63(Pt 5):361-8.

Hammersley, A.P., Svensson, S.O., Hanfland, M., Fitch, A.N. & Häusermann, D. 1996. Two-Dimensional Detector Software: From Real Detector to Idealised Image or Two-Theta Scan. *High Pressure Research*, 14, 235–248.

Hammersley, A.P. 1997. FIT2D: An Introduction and Overview. ESRF Internal Report ESRF97HA02T.

Koch, M.H.; Vachette, P.; Svergun, D.I. 2003. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q. Rev. Biophys.*, 36: 147–227.

Konarev, P.V.; Petoukhov, M.V.; Volkov, V.V.; Svergun, D. I. 2006. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, 39: 277–286.

Kullik, I.; Toledano, M. B.; Tartaglia, L. A.; Storz, G. 1994. Mutational Analysis of the Redox-Sensitive Transcriptional Regulator OxyR: Regions Important for

Oxidation and Transcriptional Activation. *Journal of Bacteriology*. 177(5): 1275-1284.

Lee, R. F.; Derrick, K. S.; Beretta, M. J. G.; Chagas, C. M. & Rosetti, V. 1991. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry*. Oct:12-15.

Lilic, M.; Jovanovic, M.; Jovanovic, G.; Savic, D. J. 2003. Identification of the CysB-regulated gene, *hslJ*, related to the *Escherichia coli* novobiocin resistance phenotype. *FEMS Microbiol Lett*. 224: 239-246.

Muraoka, S.; Okumura, R.; Ogawa, N.; Nonaka, T.; Miyashita, K.; Senda, T. 2003. Crystal Structure of a Full-length LysR-type Transcriptional Regulator, CbnR: Unusual Combination of Two Subunit Forms and Molecular Bases for Causing and Changing DNA Bend. *Journal of Molecular Biology*. 328: 555-566.

Osiro, D.; Colnago, L. A.; Otoboni, A. M. M. B.; Lemos, E. G. M.; de Souza, A. A.; Della Coletta Filho, H.; Machado, M. A. 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 236: 313-318.

Petoukhov, M.V. & Svergun, D.I. 2005. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J*, 89(2): 1237–1250.

Ruangprasert A, Craven SH, Neidle EL, Momany C. (2010) Full-length structures of BenM and two variants reveal different oligomerization schemes for LysR-type transcriptional regulators. *J Mol Biol*. 2010 Dec 10;404(4):568-86.

Schell, M. A. 1993. Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators. *Annu. Rev. Microbiol*. 47: 597-626.

Simpson, A. J. G. et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*. 406:151-157.

Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. 2003. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.*, 66: 1735–1782.

Zhan Y, Yu H, Yan Y, Chen M, Lu W, Li S, Peng Z, Zhang W, Ping S, Wang J, Lin M. (2008) Genes involved in the benzoate catabolic pathway in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Curr Microbiol*. Dec;57(6):609-14.

Study of two proteins possibly involved in biofilm formation of
Xylella fastidiosa

Autores: PELLOSO, A.C.¹; TOLEDO, M.A.S.¹; SANTOS, C.A.¹; SARAIVA, A.¹;
SCHNEIDER, D.R.S.¹; AZZONI, A.R.¹; APARICIO, R.³; SOUZA, A. P.¹²

1 - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

2 - Departamentos de Biologia Vegetal – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

3 - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Resumo

A Clorose Variegada do Citrus (CVC), uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que acomete os pomares de citrus no Brasil é responsáveis por grandes danos e prejuízos a este agronegócio, particularmente ao estado de São Paulo, o maior produtor nacional de laranja e derivados. Com base na relevância da CVC e a falta de conhecimento sobre a bactéria causadora desta doença, esse trabalho tem com objetivo o estudo de duas proteínas (XfCysB e XfycjZ) pertencentes a este microrganismo e que fazem parte da família LysR, um grupo de proteínas envolvidos na regulação globais. Para a caracterização das proteínas XfCysB e XfycjZL foram feitos testes estruturais como Dicroísmo Circular e Cromatografia de Exclusão por Peso Molecular. Os testes funcionais realizados foram a análise da expressão das proteínas durante a formação de biofilme de *X. fastidiosa*. A proteína XfCysB tem como predição a função de regular a biossíntese de cisteína, enquanto a proteína XfycjZ apresenta similaridade com a proteína CrgA que esta envolvida na adesão celular inicial. Nos testes realizados foi possível observar que a proteína XfCysB possui uma estrutura secundária enovelada, possui a forma dimérica quando em solução e a forma tetramérica na presença do seu co-indutor (N-acetil-L-serina). Já a proteína XfycjZ quando em solução esta monodispersa e na forma tetramérica, semelhante ao grupo de proteínas que apresenta similaridade. Foi realizado também para as duas proteínas uma reação de Western blot de anticorpos específicos para XfCysB e XfycjZ frente a diferentes tempos de formação de biofilme. Os resultados

revelaram que ambas as proteínas estão presente nos 6 tempos em estudo demonstrando papel relevante durante a fase infectante da *Xylella fastidiosa* devido as funções exercidas pelas proteínas em estudo.

Introdução

A *Xylella fastidiosa* é o agente causador de diversas doenças em plantas economicamente importantes para diversos países. Entre tais doenças destacam-se a clorose variegada em citrus (CVC) (Chang *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1994) e a mal de Pierce em videira (PD) (Davis *et al.*, 1978). A CVC é a doença mais severa e economicamente a mais prejudicial à citricultura brasileira, afetando principalmente laranjas doces (Donadis & Moreira, 1998). A bactéria depois de instalada no xilema da planta, passa a se multiplicar e a produzir substâncias extracelulares. Entre estas substâncias, uma grande quantidade de polissacarídeos extracelulares é secretada, os quais contribuem para a formação de um biofilme na superfície dos vasos do xilema. Sobre esse material depositam-se mais bactérias que resultam em grandes agregados que podem interromper o fluxo regular de água e nutrientes através destes vasos. Esses agregados celulares podem, em tese, contribuir para concentrar atividade de exoenzimas bacterianas, auxiliar na captura de nutrientes, acumular substâncias tóxicas, manter a agregação de células e proteger contra as flutuações ambientais (Micheltore, 2000). Os sintomas resultantes deste processo são pontos amarelos nas folhas, diminuição do porte em plantas severamente afetadas, aumento da acidez, diminuição do tamanho e enrijecimento dos frutos, que perdem seu valor

comercial, pois ficam impróprios para o consumo (Hopkins, 1989). Devido a importância da citricultura para o país e o impacto que a *X. fastidiosa* causa, este trabalho tem como objetivo o estudo de duas proteínas, a saber XfCysB e XfycjZ que tem identidades com CysB e CrgA respectivamente, pertencentes a família LysR e que estão envolvidas com a patogenicidade do microrganismo.

Sendo assim este trabalho tem como fundamento a caracterização inicial da proteína clonadas XfCysB e XfycjZ por métodos estruturais como dicroísmo circular e cromatografia de exclusão por peso molecular para a análise do comportamento das proteínas obtidas quando em solução e interações com seus co-indutores. Além da averiguação da interação/produção entre as proteínas XfCysB e XfycjZ e as 5 etapas de formação de biofilme.

Materiais e Método

Análise Comparativa

Para a realização da análise comparativa das seqüências de aminoácidos das proteínas em estudo utilizou-se o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para a busca de seqüências similares através do programa BLASTP. Após selecionar as informações a serem tratadas, os dados foram processados pelos programas CLUSTALW 2 e GENEDOC. A seqüência utilizada para a proteína XfCysB foi gi:161378172 / referencia NP_298123.2 e para a proteína XfycjZ foi gi: 9106824 / GeneBank AAF84561.1.

Clonagem, expressão e purificação

Para a amplificação por PCR das *orfs* estudadas foram desenhados primers contendo sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, sendo a sequência para XfCysB (Direto : 5' – ATAACATATGACGTTGACTCAACTTCG – 3'; Reverso: 5' – ATCTCGAGTCAATTGGTAATGGTCTGTG – 3') e para XfycjZ (Direto: 5' – ATAACATATGGCCAGACGCAACCTCAA – 3'; Reverso: 5' – ATCTCGAGCTACCAGCTCATTTGCG – 3') e utilizou-se o DNA genômico de *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c como amostra. Após a amplificação dos fragmentos foi feita a clonagem do produto gerado por PCR em vetores pET28a seguidos pela transformação em células competentes de *E. coli* da linhagem DH5α. As colônias geradas foram então analisadas e sequenciadas para a verificação de mutações. Após a checagem os vetores contendo as seqüências de interesse foram transformados em células BL21(DE3). Para a análise da expressão fez-se inicialmente uma pré-cultura contendo 2 ml de meio LB com kanamicina a 30 µg/ml e 4 µl de células transformadas adequadamente. Incubou-se a 37°C, *overnight*, 300 rpm. Uma alíquota de 1 ml desta pré-cultura foi retirada e acrescentada a 250 ml de LB com o antibiótico adequado. Preparou-se a cultura a ser induzida; sob agitação a 300rpm, 37°C, até que atingisse a densidade óptica (D.O.₆₀₀) de 0,8 a 1,0 UA. A indução da expressão foi feita pela adição de 5,6 mM de Lactose à cultura. Após a adição do agente indutor a cultura bacteriana da proteína XfCysB foi crescida a 25°C por 20 horas a 200 r.p.m., enquanto a cultura da XfycjZ foi encubada a 37°C por 4 horas a 300 r.p.m. Posteriormente as culturas

foram centrifugadas separadamente a 4000 r.p.m. por 15 a 4°C ressuspendidas em tampão A (Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 0,3 M) acrescido de inibidor de proteases (PMSF 1mM), Lisozima (1 mg/ ml) e manteve-se o material sob agitação a 4°C por 30 minutos. O material foi então sonicado e centrifugado a 15000 rpm, 10 minutos a 4°C. A purificação das proteínas foi feito por cromatografia de afinidade em coluna de gravidade em resina de Ni-NTA Superflow (Quiagen). As colunas foram equilibradas com tampão A e a eluição das proteínas foi obtida através da utilização do tampão A juntamente com Imidazol na concentração de 200 mM e 500 mM. Os resultados foram analisados por SDS-PAGE

Dicroísmo Circular

A proteína XfCysB na concentração de 0,150 mg/ml foi analisada através de dicroísmo circular para verificação e estimativa da presença de estrutura secundária e terciária. Os experimentos de CD foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-180 do LNBIO. As medidas foram tomadas em cubetas de 1,0 mm de distância óptica com medidas de 190 a 260 nm para avaliar a estabilidade e o enovelamento da proteína que se encontravam em tampão Tris-HCl 5mM. A deconvolução dos dados obtidos foi feita pelo programa Dichroweb, utilizando o banco de dados CDSSTR. Devido às interações específicas da luz com os cromóforos da proteína – ligação peptídica, resíduos aromáticos e pontes dissulfeto, o CD fornece espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária e terciária.

Cromatografia de exclusão por peso molecular

A cromatografia por gel filtração para a averiguação do estado oligomérico das proteínas em estudo foi feita utilizando-se a coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 2 volumes de coluna (48 mL) de tampão contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM e pH 7,5, e 250 µL das amostras foram injetadas a um fluxo de 0,5 mL/min. Como padrões de calibração foram utilizados *HMW (High Molecular Weight) and LMW (Low Molecular Weight) Gel Filtration Calibration Kit* (GE Healthcare) e a análise dos resultados foi feita conforme descrito no manual do kit de calibração. . O estado oligomérico das proteínas foi determinado pela curva de dispersão de K_{av} versus Log10 do peso molecular dos padrões e amostras (Figura 4). O coeficiente K_{av} determinado pela equação: $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_c - V_o)$, sendo V_o o volume morto da coluna, V_e o volume de eluição da amostra e V_c o volume geométrico da coluna. Como padrões foram utilizados Thyroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Blue Dextran 2000 (2000 kDa), sendo o ultimo utilizado para o calculo do volume morto da coluna. Nos experimentos com a proteína XfCysB foram testados amostras somente com a proteína e amostras contendo uma concentração final de 10 mM de N-acetil-L-serina. A reação contendo o co-indutor específico foi realizada incubando-se a proteína juntamente com a N-acetil-L-serina por 30 min a temperatura ambiente e após isto utilizou-se a solução para a cromatografia.

Anticorpos Policlonais

As proteínas previamente purificadas foram liofilizadas e ressuspensas em PBS estéril. As amostras foram homogeneizadas com adjuvante na proporção 1:1 (V/V) e inoculadas em três coelhos da linhagem branca da Nova Zelândia, no início da maturidade sexual. A inoculação foi por via intradérmica, sendo 1 ml por animal, e intervalos de 15 dias entre a administração das doses e serão aplicadas 3 doses. Transcorridos 15 dias após a última dose, foi feita a sangria de prova e o anti-soro foi testado pelo método indireto de ELISA (Clark *et al.* 1986). Posteriormente, o soro foi coletado, inativado a 56°C e armazenado em freezer - 20°C.

Western blot

As células correspondentes as 5 etapas de formação de biofilme foram produzidas e cedidas pela Professora Alessandra Alves de Souza (Centro de Citricultura / IAC - Cordeirópolis). Primeiramente as proteínas referentes as diferentes fases de biofilme foram extraídas através da adição de 1 ml de Tampão de Extração (50 mM Tris pH 8,0; 25 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 8,0; 2% Triton X-100) Lisozima (concentração final 1 mg/ml) e PMSF (concentração final 1 mM) ao pellet obtido, após isto as amostras ficaram 20 minutos sob agitação no gelo seguido por 5 sonicações de 10 segundos. Com o término das sonicações as

amostras foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C e guardou-se o sobrenadante.

Amostras das proteínas totais de *X.fastidiosa* nas diferentes fases de formação de biofilme foram padronizadas para uma mesma concentração antes da aplicação em gel de SDS 12%. Após isso, o gel foi incubado por 10 min em tampão de transferência (25mM Tris; 192mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol) a temperatura ambiente. As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF durante 2 horas, a 250 mA. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1 hora, sob agitação, em tampão TBST (24,7mM Tris; 136,8mM NaCl; 2,7mM KCl; 0,1% de Tween 20; pH 7,5) contendo 5% de leite em pó desnatado, seguidos por incubação overnight a 4°C. Após isto as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TBST seguidas por uma incubação de 1 hora a temperatura ambiente em tampão TBST 5% de leite em pó desnatado juntamente com os anticorpos primário (anticorpo específico para cada proteína) a uma diluição de 1:8000. Após isto as membranas foram lavadas mais 3 vezes com TBST e incubadas por 1 hora em TBST contendo 5% de leite em pó desnatado e o conjugado *goat anti-rabbit IgG* fosfatase alcalina (SIGMA). A revelação das membranas foi feita em solução contendo 25ml de tampão de reação (100mM Tris-HCl pH 9,0; 150mM NaCl; 1mM MgCl₂), 2mg de BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate) e 4mg de NBT (nitro blue tetrazolium).

Resultados e Discussão

Análise Comparativa

Com base na análise comparativa das seqüências de aminoácidos das proteínas em estudo e seqüências disponíveis em banco de dados, foi possível realizar um alinhamento de aminoácidos com base na similaridade, sendo a ORF XF 0683 similar a proteína CysB (Figura 1) e a ORF 1480 similar a proteína CrgA (Figura 2). A proteína CysB, um membro da família LysR, é um fator positivo essencial para a atividade da maioria dos genes *cys* envolvidos na via de assimilação de enxofre através da biossíntese de cisteína. A interação da proteína é estável quando está na forma de tetrâmero com um único sitio ativo, sendo esta forma par ao recrutamento da RNA polimerase (Lochowska, 2001). A transcrição da maioria dos genes *cys* é induzida sob condições de limitação de enxofre. Para a expressão dos promotores *cys* há a necessidade da presença do regulador transcricional CysB e níveis elevados de seu co-indutor, N-acetil-L-serina (NAS) ou seu derivado O-acetil-L-serina (OAS). Substratos contendo formas reduzidas de enxofre, como sulfetos ou tiosulfatos, atuam como “anti-indutores” e competem com o NAS na interação com a proteína CysB. A interação entre CysB, seu indutor e seu anti-indutor no controle transcricional permite o ajuste preciso do fluxo através da via de biossíntese de cisteína para coincidir com a disponibilidade de enxofre no ambiente (Stec, 2006). Estudos utilizando mutantes para o gene *cysB* de *E. coli*, ou seja, a baixa produção da proteína CysB, mostraram que tais mutações aumentaram a resistência da bactéria ao antibiótico novobiocina

(inibidor da replicação do DNA por bloqueio da atividade da ATPase na subunidade da DNA girase), pois esta resistência está diretamente ligada ao aumento da concentração intracelular da proteína HslJ que é codificada pelo gene *hslJ* e tem como regulador negativo da sua expressão a proteína CysB (Lilic *et al.*, 2003). Foi observado também que mutações no gene *cysB* promove o aumento da formação de biofilme quando comparado com linhagem isogênica, demonstrando que o metabolismo de enxofre afeta a formação de biofilme (Ren, 2005).

A proteína CrgA (contact-regulated gene A), uma LTTR de *Neisseria meningitidis*, esta descrita como envolvida na interação patógeno-hospedeiro. A CrgA foi inicialmente identificada como sendo induzida ao contato de *N. meningitidis* com células epiteliais humanas e fazer parte de um grupo de genes que são regulados durante a adesão inicial (Deghman, 2000; Morelle, 2003). A CrgA é um autorepressor e ativa a expressão de genes divergentes, *mdaB* (modulator of drug activity B) e uma oxidoredutase, sugerindo que podem estar envolvidos na resposta de *Neisseria* ao estresse oxidativo. A proteína CrgA está envolvido na regulação da expressão do *pilC1*, adesina envolvida na adesão bacteriana, durante a adesão por feedback negativo (Taha *et al.*, 1998; Deghmane *et al.*, 2000). Em estudos cristalográficos demonstraram que a estrutura da proteína CrgA é octamérica em forma de anel, em contraste com a forma tetramérica da CbnR, que se tornou aceito como o estado normal da oligomerização das LTTRs (Sainsbury, 2009). Utilizando estes dados podemos inferir que exista uma correlação destes mecanismos de *E. coli* com os de *X. fastidiosa* devido às semelhanças apresentadas entre as proteínas da família LTTR.

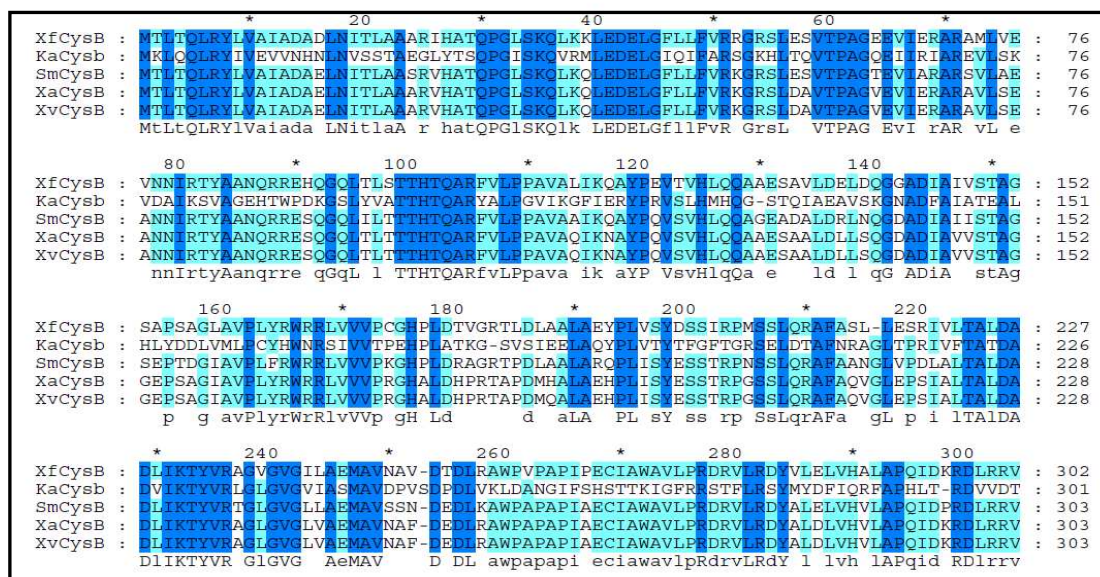


Figura1: Alinhamento múltiplo de seqüências de CysB utilizando CLUSTALW2 e GENEDOC, com as porcentagens de identidades entre parênteses. XfCysB - *X. fastidiosa*; KaCysB - *Klebsiella aerogenes* (39%); SmCysB - *Stenotrophomonas maltophilia* (79%); XaCysB - *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii str.* (82%); XvCysB - *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str.* (81%). As letras marcadas em azul escuro representam aminoácidos idênticos nas 5 seqüências, já as letras em azul claro representa identidade em algumas seqüências.

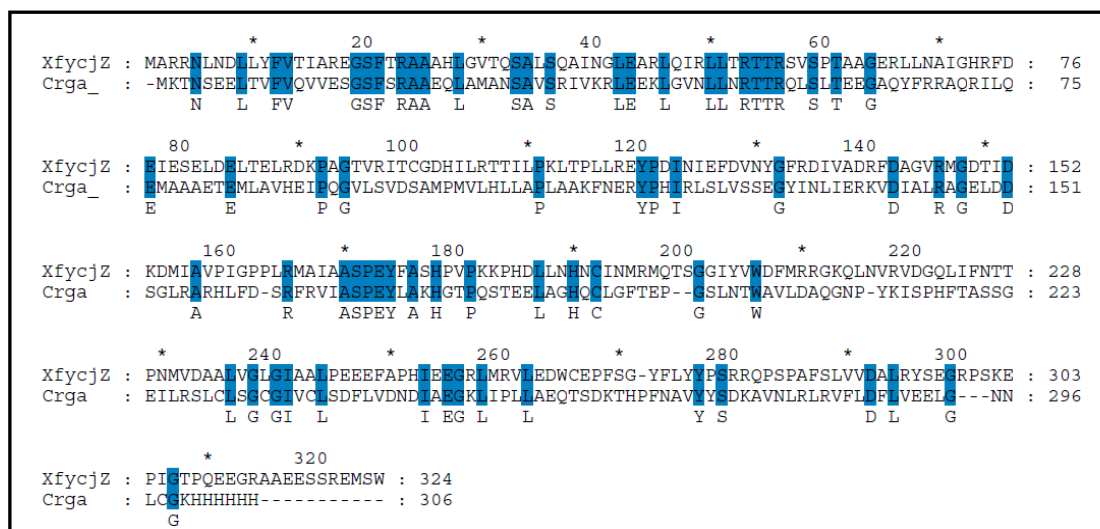


Figura 2: Alinhamento de seqüências de XfycjZ com CrgA utilizando CLUSTALW2 e GENEDOC, com a porcentagem de identidade entre parênteses. XfycjZ - *X. fastidiosa*; CrgA - *Neisseria meningitidis* (27). As letras marcadas em azul escuro representam aminoácidos idênticos nas seqüências.

Clonagem, expressão e purificação

A clonagem para as orfs XF0683 e XF1480 foi realizada com sucesso e os plasmídeos recombinantes gerados não apresentavam discordâncias em relação às sequências depositadas no banco de dados Projeto Genoma *Xylella fastidiosa* (<http://www.xylella.Incc.br>) após a realização do sequenciamento. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo que produz a proteína XfCysB teve o máximo de expressão protéica solúvel quando incubado por 20 horas a 25°, já para a proteína XfycjZ a super expressão da proteína solúvel ocorreu quando esta foi incubada por 4 horas a 37°C. Para as duas proteínas o indutor utilizado foi a lactose em uma concentração final de 5,6 mM.

Após a obtenção do extrato protéico os testes referentes a purificação das proteínas foram realizados utilizando-se a cromatografia de afinidade ao níquel. Na cromatografia foram utilizadas colunas de gravidade contendo resina de Ni-NTA Superflow (Qiagen) no qual foi adicionado o extrato protéico e após a passagem de diferentes concentrações de imidazol obteve-se a proteína solúvel e purificada. Todas as frações de eluição foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE (Figura 3), sendo que para ambas proteínas a maior eluição foi em tampão A contendo 200 mM de imidazol

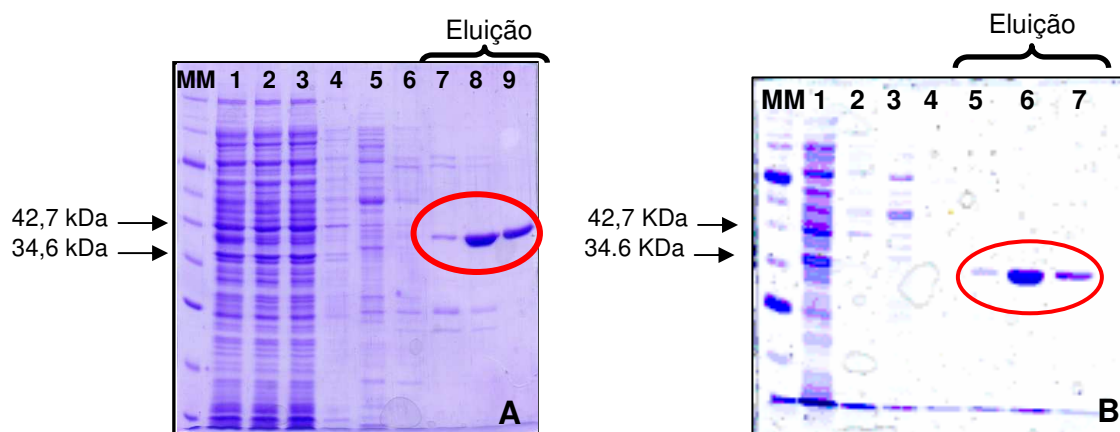


Figura 3 - Purificação das proteínas clonadas. MM - Marcador Protein Marker Broad Range (New England BioLabs); **(A)** 1 a 6 – Etapa de lavagem da coluna; 7 a 9 - Eluição da proteína XfycjZ em diferentes concentrações de imidazol (100, 200 e 500 mM, respectivamente); **(B)** 1 a 4 – Etapa de lavagem da coluna; 5 a 7 - Eluição da proteína XfCysB em diferentes concentrações de imidazol (100, 200 e 500 mM, respectivamente).

Dicroísmo Circular (CD)

Foi realizada uma análise espectrofotométrica da proteína XfCysB pela técnica de dicroísmo circular e os dados sugerem que a proteína apresenta estrutura secundária estável e enovelada (Figura 4). Adicionalmente, por se tratar de um regulador transcricional a técnica pode ser usada futuramente para averiguar a interação entre a proteína ao fragmento de DNA correspondente ao promotor de um gene possivelmente regulado por ela. Não foi possível a realização deste experimento para a proteína XfycjZ, pois a mesma é altamente instável a mudanças de concentração de sais do meio e temperatura. Apesar das leituras de dicroísmo circular possuírem baixa resolução foi possível a

identificação e confirmação da estrutura secundária enovelada da proteína XfCysB.

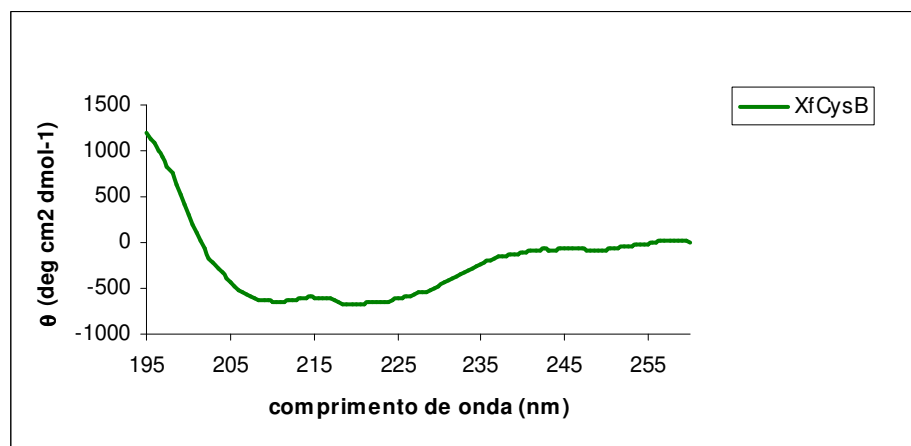


Figura 4 - Análise da proteína XfCysB pela técnica de CD. (A) Análise preliminar da proteína XfCysB pela técnica de CD.

Cromatografia de Exclusão por Peso Molecular

Para a proteína XfCysB foram realizados dois ensaios, sendo o primeiro somente com a proteína e o segundo contendo a proteína junto com seu co-indutor específico (N-Acetil-L-serina). Com os resultados obtidos pode-se inferir que a proteína XfCysB quando em solução possui uma massa molecular de 45,3 kDa, estado monomérico e monodisperso, visto que quando eluido na coluna possui apenas um pico localizado entre os padrões Ovalbumina (43 kDa) e Conalbumina (75 kDa). Já nos testes realizados com o seu co-indutor específico (N-acetil-L-serina) sua massa molecular observada foi de 195,1 kDa que indica a formação de tetrâmeros, ou seja na presença do co-indutor a proteína assume a sua forma ativa (figura 5A e 5B). Em relação a proteína XfycjZ1 teve a sua

massa molecular estimada pela técnica em 174,8 kDa quando em solução, o que sugere que a proteína se encontra no estado oligomérico de tetrâmeros, uma vez que a massa molecular predita desta proteína é de 36,3 kDa (figura 6).

Com base nos resultados obtidos, foi possível fazer uma comprovação de que a proteína XfCysB realmente é uma proteína classificada como CysB, devido a sua mudança oligomérica na presença de seu co-indutor específico. Já em relação a proteína XfycjZ pode-se inferir que o seu estado oligomérico pode ser resultante da purificação do co-indutor juntamente com a proteína ou a proteína apresenta oligomerização quando em baixa concentração. Outra hipótese para o estado tetramérico da proteína XfycjZ é que a sua oligomerização natural seja a de tetrâmeros, semelhantes ao encontrado por Sainsbury (2009), em que demonstrou que a proteína CrgA de *Neisseria meningitidis* possuía a forma octamérica quando em solução.

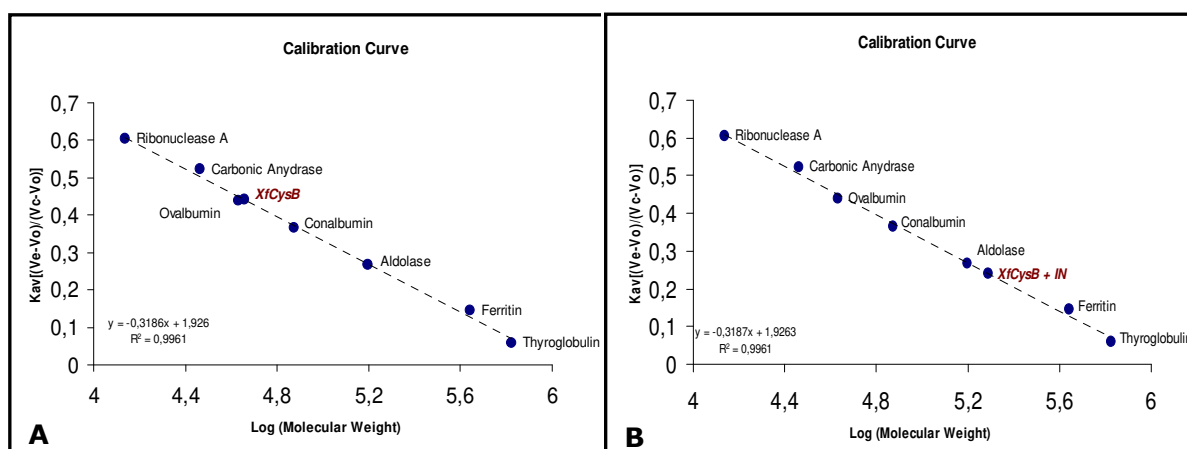


Figura 5 - Análise das proteínas LTTR em estudo por cromatografia de exclusão por peso molecular. A – Curva de dispersão referente a proteína XfCysB e padrões. Massa molecular estima pela técnica igual a aproximadamente 45,3 kDa. B - Curva de dispersão referente a proteína XfCysB + co-indutor e padrões. Massa molecular estima pela técnica igual a aproximadamente 195,1 kDa.

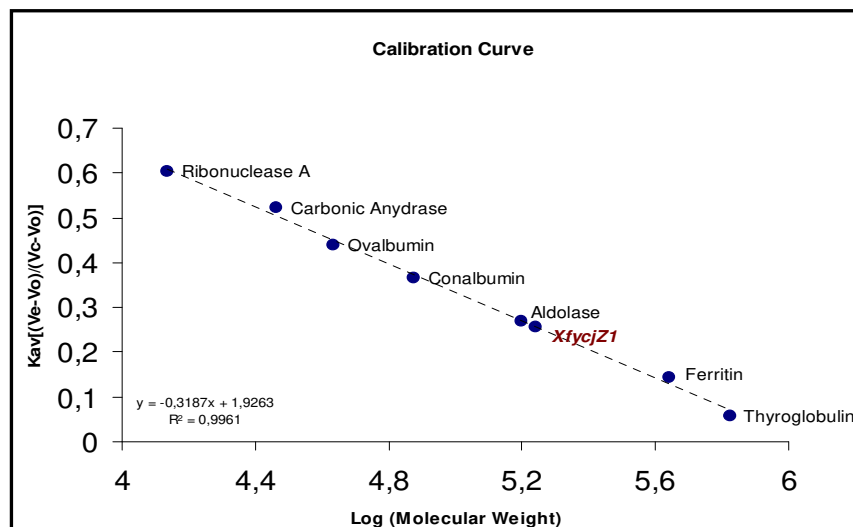


Figura 6 - Análise das proteínas LTTR em estudo por cromatografia de exclusão por peso molecular. Curva de dispersão referente a proteína XfycjZ1 e padrões. Massa molecular estima pela técnica igual a aproximadamente 174,8 kDa.

Anticorpos e Western blot

Após a produção dos anticorpos para as proteínas XfCysB e XfycjZ as suas respectivas especificidades foram analisadas por ELISA, em que foi possível observar que os anticorpos responderam aos testes até uma diluição de 1:40000 em ambos os casos (Figura 7). Em relação aos ensaios de Western blot juntamente com as proteínas totais referentes às etapas de formação de biofilme obteve-se como resultados que tanto a proteína XfCysB quanto a proteína XfycjZ estão presente nos 6 tempos analisados (Figura 8A e 8B) que correspondem ao 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de formação do biofilme. É necessário repetir o experimento com células planctônicas como controle.

Deste modo foi possível concluir que tanto a proteína XfycjZ quanto a proteína XfCysB possuem um papel relevante durante as fases de formação do biofilme, além de apresentar funções como metabolismo de enxofre e biossíntese de aminoácidos. Pode-se observar na figura 8A que os anticorpos referentes a proteína XfycjZ estão mais intensos nos tempos referentes ao 3, 5 e 30 dia de formação de biofilme, corroborando com a hipótese que a proteína em estudo pertencer ao grupo das CrgA, visto que tem a função de atuar na interação de adesão celular. Em relação a proteína XfCysB pode-se concluir que a sua presença é proporcional durante os 6 tempos analisados demonstrando possuir uma função relevante na formação e manutenção do biofilme como observado por Ren (2005) que observou a variação na formação de biofilme com mutantes de CysB em *E. coli* e Sturgill (2004) que provou que a proteína CysE mutante acelerava o crescimento do biofilme também em *E. coli*.

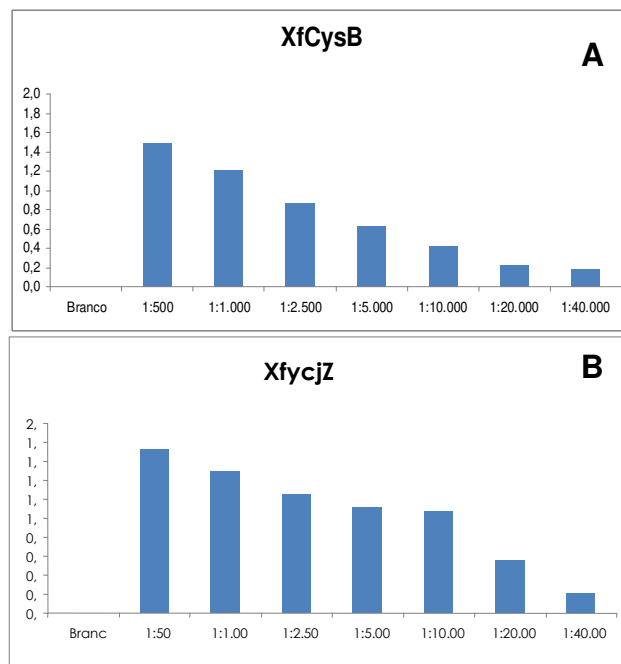


Figura 7: ELISA dos anticorpos produzidos para XfCysB e XfycjZ. Gráficos referente a detecção da técnica frente a diferentes diluições dos anticorpos para XfCysB (A) e para XfycjZ (B).

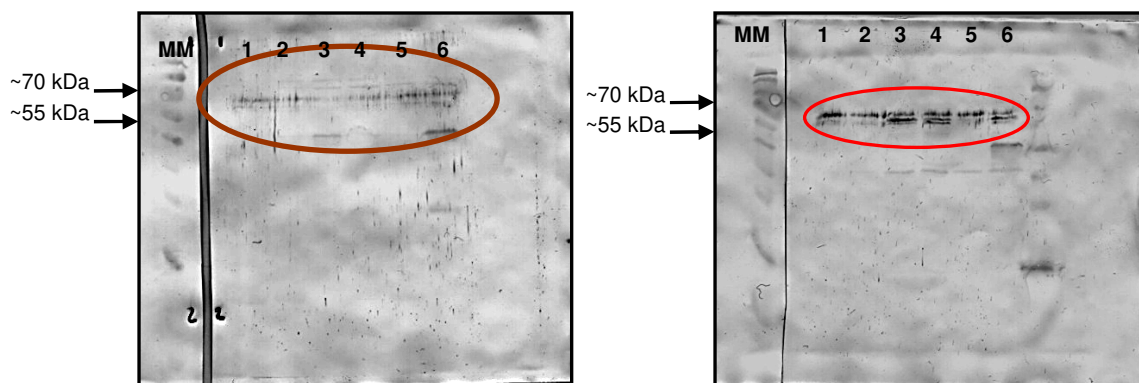


Figura 8: Resultado do Western blot realizado com diferentes fases dos biofilme frente aos anticorpos produzidos. (A) Western blot realizado com anticorpos para XfycjZ; (B) Western blot realizado com anticorpos para XfCysB; MM – PageRuler Prestained Protein Ladder; 1 – Biofilme referente a 3 dias; 2 - Biofilme referente a 5 dias; 3 - Biofilme referente a 10 dias; 4 - Biofilme referente a 15 dias; 5 - Biofilme referente a 20 dias; 6 - Biofilme referente a 30 dias.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos nos experimentos realizados para as proteínas XCysB e XfycjZ, pode-se concluir que a proteína XfCysB foi clonada corretamente possuindo uma estrutura secundária enovelada e quando em solução possui a forma dimérica e é monodispersa. Observou-se também que quando na presença do seu co-indutor específico seu estado oligomérico passa de dímero para tetrâmero, revelando sua forma ativa e comprovando sua funcionalidade, além de apresentar grande similaridade com demais proteínas CysB de outros organismos.

Em relação à proteína XfycjZ foi possível observar que sua clonagem também foi realizada com sucesso, não apresentando mutações pontuais. Não foi possível analisar o comportamento de sua estrutura secundária devido a alta instabilidade da proteína em relação a alteração da solução em que ela se encontra e variação de temperatura. Foi possível, no entanto, observar que a proteína quando em solução apresenta a forma oligomérica de tetrâmeros, sugerindo que o seu co-indutor específico tenha sido purificado juntamente com a proteína ou que a sua oligomerização quando em solução realmente seja de tetrâmeros como comprovado por Sainsbury (2009) que obteve resultados semelhantes. Ressalta-se também a similaridade da proteína XfycjZ com a proteína CrgA, uma proteína envolvida na interação inicial de patógeno e hospedeiro.

Ainda em relação às duas proteínas em estudo foi possível assegurar que as interações destas frente as diferentes fases de formação de biofilme, revelando

que estão presente nas 5 etapas de formação de biofilme. A proteína XfycjZ apresentou uma maior intensidade nos pontos referentes a primeira e quinta etapa, períodos estes em que a bactéria esta iniciando o seu contato com a planta (estágio 1) e quando esta com o biofilme totalmente maduro e iniciando a fase de discipação (estágio 5). Estas informações sugerem uma grande relevância da proteína estudada, alem de reforçar a predição da XfycjZ como uma proteína do grupo CrgA.

Por outro lado, pode-se observar que a proteína XfCysB apresenta intensidade igual durante todos os pontos analisados, demonstrando ser necessária durante toda a formação do biofilme, fato este que pode ser comprovado pela função da proteína que é metabolização de compostos aromáticos, biossíntese de cisteína e proporcionar alteração no processo de formação de biofilme. Deste modo destaca-se a importância desta proteína para a sobrevivência e patogenicidade da *Xyella fastidiosa* em plantas de citrus quando em estágio de biofilme.

Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro. A Dr^a. Alessandra Alves de Souza e Dr^a. Dagmar Ruth Stach Machado pela colaboração científica. Ao LNBIO pelo apoio técnico, pelo suporte de equipamentos e colaboração nos experimentos.

Referencias Bibliográficas

Bujacz, G. D. (2006). Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J Mol Biol* 364, 309–322.

Chang C.J., Garnier M., Zreik L., Rossetti V. and Bové J.M. (1993) Culture and serological detection of the xylem limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* 27, 137–142.

Davis M.J., Purcell A.H. and Thomson S.V. (1978) Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199, 75-77.

Deghmane AE, Petit S, Topilko A, Pereira Y, Giorgini D, Larribe M, Taha MK (2000). Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J.* Mar 1;19(5):1068-78.

Donadis L.C. and Moreira C.S. (1998) *Citrus Variagated Chlorosis*. Fundecitrus, Bebedouro, Brazil.

Hartung J.S., Beretta J., Brlansky R.H., Spisso S. and Lee R.F. (1994) Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other stains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84, 591-597.

Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytophatol.* 27:271-290.

Lilic, M.; Jovanovic, M.; Jovanovic, G.; Savic, D. J. 2003. Identification of the CysB-regulated gene, *hslJ*, related to the *Escherichia coli* novobiocin resistance phenotype. *FEMS Microbiol Lett.* 224: 239-246.

Lochowska, A.; Iwanicka-Nowicka, R.; Plochocka, D. & Hryniewicz, M. M. 2001. Functional Dissection of the LysR-type CysB Transcriptional Regulator. *J Biol Chem.* 276(3): 2098-2107.

Michelmore R. (2000) Genomic approaches to plant disease resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3, 125-31.

Morelle S, Carbonnelle E, Nassif X (2003). The REP2 repeats of the genome of *Neisseria meningitidis* are associated with genes coordinately regulated during bacterial cell interaction. *J Bacteriol.* Apr;185(8):2618-27.

Ren D, Zuo R, González Barrios AF, Bedzyk LA, Eldridge GR, Pasmore ME, Wood TK. (2005) Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Appl Environ Microbiol*, Jul;71(7):4022-34.

Sainsbury S, Lane LA, Ren J, Gilbert RJ, Saunders NJ, Robinson CV, Stuart DI, Owens RJ (2009) The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res*. August; 37(14): 4545–4558.

Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M. M., Neumann, P., Wilkinson, A. J., Brzozowski, A. M., Verma, C. S., Zaim, J., Wysocki, S. & Bujacz, G. D. (2006). Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J Mol Biol* 364, 309–322.

Sturgill, G.; Toutain, C. M.; Komperda, J.; O'Toole, G. A.; Rather, P. N. (2004). Role of CysE in Production of an Extracellular Signaling Molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: Loss of *cysE* Enhances Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Nov., 7610–7617

Taha MK, Morand PC, Pereira Y, Eugène E, Giorgini D, Larribe M, Nassif X. (1998) Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol*, Jun;28(6):1153-63.

5. Resultados Complementares

Os resultados apresentados a seguir são correspondentes aos estudos realizados com as *ORFs* XF0930 , XF1459 e XF1498 que fazem parte da proposta inicial do projeto de mestrado, porem devido as dificuldades encontradas durante o desenvolvimento do trabalho tiveram suas análises interrompidas. A metodologia utilizada para a obtenção dos fragmentos, clonagem dos mesmos, testes de expressão e solubilização é a mesma descrita no manuscrito intitulado de **Characterization of a LysR Type Transcriptional Factor From Phytopathogen *Xylella fastifiosa*.**

5.1. Clonagem dos fragmentos

Através de PCR de gradiente de temperatura pode-se estabelecer para os genes correspondentes as *ORFs* XF0930 , XF1459 e XF1498 a melhor temperatura para o anelamento de seus respectivos primers. Através dos fragmentos observados em gel de agarose 1% pode-se inferir qual a melhor temperatura para cada gene. De tal modo as temperaturas de anelamento variaram de 45 a 64,6°C para todos os genes em estudo. As temperaturas testadas foram 45°C, 46,7°C, 50,5°C, 56,7°C, 61,8°C e 64,6°C Assim, a temperatura escolhida para cada gene e seus respectivos primers estão descritos na Tabela 2 e pode ser visualizada na Figuras 8 a amplificação dos mesmos.

Tabela 2: Padronização das ORFs XF0930, XF1459 e XF1498 e seus respectivos *primers*. Temperatura escolhida como padrão para cada *orf* em estudo e seu tamanho esperado em pares de bases.

<i>orfs</i>	Temperatura padrão	Tamanho esperado (pb)	Seqüência (5' → 3')
<i>XF0930</i>	47 °C	906	<i>D - ATTACATATGCAGAACATGTTTCGATGG</i>
			<i>R - ATCTCGAGTCAGGCTTCTAGATATTTAG</i>
<i>XF1459</i>	60 °C	918	<i>D - ATAACATATGAATATCAGAGACCTCGAAACCCTG</i>
			<i>R - ATCTCGAGTCAATCGGCGTGCGAG</i>
<i>XF1498</i>	57 °C	891	<i>D - ATAACATATGCCCAAGGAAAACCTCAACGACC</i>
			<i>R - ATCTCGAGTCACCGCCAGCGCAAA</i>

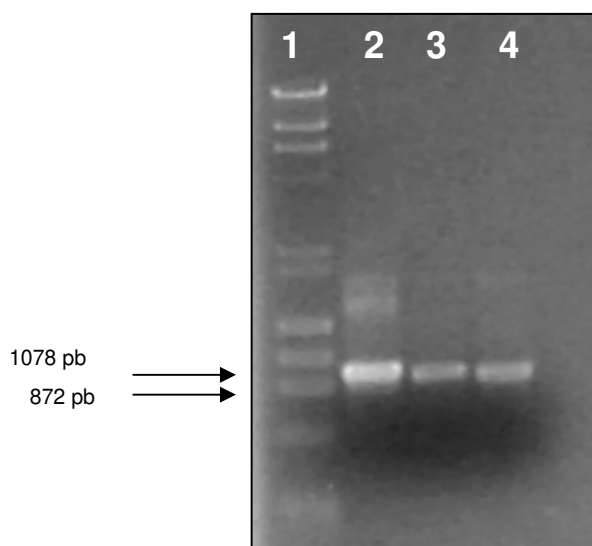


Figura 8: Amplificação das *orfs* *Xf* 0930, *Xf* 1459 e *Xf* 1498. 1 - Marcador λ HindIII ϕ xHaeIII 10 μ L; 2 - *Xf* 0930 (tamanho estimado 906 pb); 3 - *Xf* 1459 (tamanho estimado 918 pb); 4 - *Xf* 1498 ((tamanho estimado 891 pb).

Devido às dificuldades encontradas na transformação dos genes em células competentes da linhagem DH5 α e obtenção de colônias positivas para as *orfs* *Xf* 1459 e *Xf* 1498 estes experimentos foram postergados. Em relação ao fragmento

correspondente a *ORF XF0930* foi possível fazer a sua transformação em células competentes de *E. coli* da linhagem DH5α e posteriormente em BL21 (DE3) (Fig 9). Após isto foi realizado o sequenciamento do fragmento clonado para a verificação de mutações pontuais e como as mesmas não foram encontradas, foram realizados teste relativos a solubilização e expressão da proteína codificada pelo gene correspondente a *ORF XF0930*.

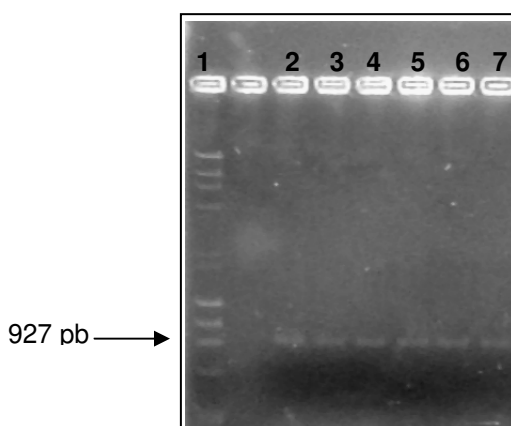


Figura 9: Amplificação das colônias transformadas em BL21 (DE3) contendo o fragmento *Xf* 0930. 1 - Marcador λ HindIII ϕ xHaeIII 10 μ L; 2 a 7- Colônias positivas para o fragmento *Xf* 0930.

5.2. Expressão da XF0930

Apesar da realização de vários testes referentes a solubilização da proteína, bem como variação no tempo de indução e na temperatura de expressão, não foi possível conseguir a proteína codificada pelo gene correspondente a *ORF XF0930* na sua forma solúvel. Deste modo os ensaios experimentais referentes a esta proteína também foram encerrados.

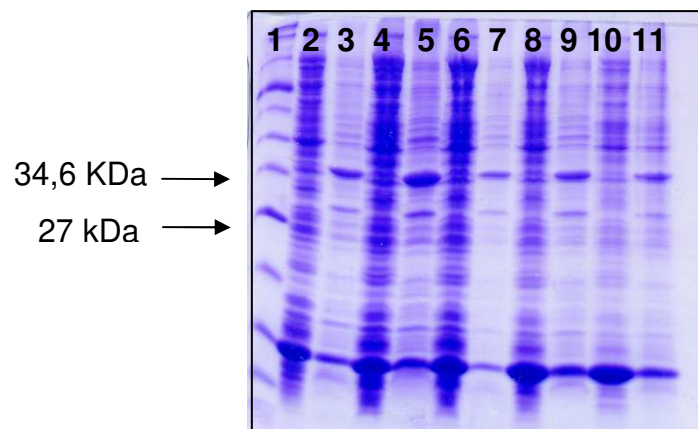


Figura 10: teste de expressão realizado para a *orf XF 0930*. O tamanho das proteínas é de aproximadamente 33,6 kDa. **1** – Marcador Protein Marker Broad Range New England BioLabs; **2, 4, 6, 8 e 10** - Fração solúvel da proteína referente a *orf Xf 0930*, respectivamente 0h, 1h, 2h, 4h e 20h de indução; **3, 5, 7, 9 e 11** - Fração insolúvel da proteína referente a *orf Xf 0930*, respectivamente 1h, 2h, 4h e 20h de indução.

6. Conclusões

Tendo-se como base os resultados obtidos e apresentados na elaboração desta dissertação e destacando-se que são os primeiros estudos realizados com tais proteínas, podemos relatar que:

Proteína XfycjZ

- Alinhamento de sequências demonstra similaridade com a proteína Crga (*Neisseria meningitidis*)
- Crga (*contact-regulated gene A*) – envolvida no mecanismo de interação patógeno X hospedeiro, parte de um grupo de genes envolvidos na adesão inicial;
- Forma tetramérica indica a possível presença do co-indutor purificado junto com a proteína ou sugere que a proteína possui a forma tetramérica quando em solução;
- Presente em todos os pontos de biofilme podendo ser uma expressão basal, porém com significativos aumentos nas fases 1 e 5 da formação do biofilme;

Proteína XfCysB

- Comprovação de ser uma proteína CysB através do alinhamento de sequências e tetramerização da XfCysB na presença de N-acetilserina;

- Presente nos 6 tempos de formação biofilme indicando atuar em atividades críticas com biossíntese de AA e metabolismo de enxofre. Sugere também ser necessária durante as etapas do biofilme;
- Possui a forma dimérica quando em solução e apresenta sua estrutura secundária enovelada e estável;

Proteína XfLysRL

- Apesar de pouca similaridade com BenM há um bom ajuste do envelope produzido indicando ser a mesma proteína ou pertencente ao grupo;
- Ausência de atividade frente ao co-indutor indica que a proteína necessita de mais compostos ou não seja seu co-indutor específico;
- A presente nos 6 tempos de formações do biofilme sugere possível relação com BenM, visto que esta tem como função a degradação de compostos aromáticos, fator de extrema importância para a célula;
- Foram obtidos também informações sobre oligomerização da proteína, revelando-se dimérica quando em solução e sua estrutura 2^a demonstra ser estável e enovelada até 44°C;
- Os estudos estruturais iniciados com baixa resolução resultaram na obtenção de modelo bem definidos, impulsionando a uma análise mais detalhada.

Proteínas XF0930 , XF1459 e XF1498

Os resultados referentes a estas três proteínas ainda são primordiais, porém foi possível realizar a clonagem destas proteínas sem a presença de mutações pontuais indicando que novos testes com diferentes linhagens de expressão devem ser adotados para a obtenção das proteínas solúveis ou mesmo refazer as clonagens em novos vetores. Apesar dos resultados obtidos é importante enfatizar o estudo de tais proteínas visto que elas pertencem ao organismo de grande relevância e com pouco conhecimento.

7. Perspectivas

7.1. Proteína XfLysRL

- Realização de novas coletas de SAXS da proteína em diferentes concentrações para confirmação do envelope obtido;
- Cristalização da XfLysRL para a obtenção da estrutura atômica da proteína;
- Busca por indutores da proteína que poderão ser auxiliado após a obtenção da estrutura;
- Ensaios para a verificação da proteína estudada com a proteína BenM
- Ensaios para a detecção da expressão gênica através de PCR Real Time em condições *in vitro* e *in vivo* da formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*, utilizando como controle células planctônicas.

7.2. Proteína XfCysB

- Obter resultados de Dicroísmo Circular em diferentes temperaturas e pHs para analisar o comportamento da proteína;
- Obtenção de dados de SAXS para a proteína para o estudo de sua estrutura e comportamento quando em solução. Testes a serem realizados com e sem o indutor;
- Realização da cristalização da XfCysB para confirmação de sua estrutura;
- Realizar Gel Shift da proteína com possíveis promotores tanto na presença do indutor quanto na ausência;
- Ensaios para a detecção da expressão gênica através de PCR Real Time em condições *in vitro* e *in vivo* da formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*, utilizando como controle células planctônicas.

7.3. Proteína XfycjZ

- Analisar a proteína através da técnica de Dicroísmo Circular;
- Realizar SAXS da proteína para o estudo das suas características quando em solução;
- Cristalização da proteína e a resolução de sua estrutura terciária;
- Realizar ensaios para a averiguação da semelhança da proteína em estudo com a proteína CrgA;
- Ensaios para a detecção da expressão gênica através de RT-PCR em condições *in vitro* e *in vivo* da formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*, utilizando como controle células planctônicas.

7.3. Proteínas XF0930, XF1459 e XF1498

- Obtenção das proteínas solúveis e purificadas
- Análise das proteínas para a possível correlação com demais proteínas e predição de função;
- Verificação do estado oligomérico destas por Cromatografia de Exclusão por peso Molecular;
- Pesquisa para possíveis indutores;
- Analisar as proteínas através da técnica de Dicroísmo Circular;
- Realizar SAXS das proteínas para o estudo das suas características quando em solução;
- Cristalização das proteínas e a resolução de sua estrutura terciária;
- Produção de anticorpos para estas 3 proteínas;
- Realização de Western blot dos anticorpos produzidos frente as diferentes fases de formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*;

- Ensaios para a detecção da expressão gênica através de PCR Real Time em condições *in vitro* e *in vivo* da formação do biofilme de *Xylella fastidiosa*, utilizando como controle células planctônicas.

8. Referencias Bibliográficas

AGRIANUAL 2009. Anuário da Agricultura Brasileira / Fnp-2009.

Barbosa, R. L. & Benedetti, C. E. 2007. BigR, a Transcriptional Repressor from Plant-Associated Bacteria, Regulates an Operon Implicated in Biofilm Growth. *Journal of Bacteriology*. 189 (17): 6185-6194.

Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Reznik, G., Feil, H., Feil, W.S., Anderson, I., Bernal, A., D'Souza, M., Ivanova, N., Kapatral, V., et al. 2002. Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Res.* 12. 3707-3714.

Celis, R. T. (1999). Repression and activation of arginine transport genes in *Escherichia coli* K 12 by the ArgP protein. *J Mol Biol* 294, 1087–1095.

Maddocks, S. E & Oyston, P. C. F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154, 3609-3623.

Chothia, C. & Lesk, A. M. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5: 823-826.

Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M. 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.

Davey, M. E. & O'Toole, G. A. 2000. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v 64, n 4, p 847-867.

De Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. 1999. Quorum sensing, Gene expression, and *Pseudomonas* Biofilms. p. 117-119. In: *Methods in Enzymology: Biofilms*. ed: Doyle, R.J. Academic Press, v. 310.

de Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* 237:341-353.

Dow J.M. and Daniels M.J. (2000) *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17(4), 263-271.

Ezezika, C. O.; Haddad, S.; Clark, T. J.; Ellen L. Neidle, E. L.; Momany, C. 2006. Distinct Effector-binding Sites Enable Synergistic Transcriptional Activation by BenM, a LysR-type Regulator. *J Mol Biol* 367, 616 – 629.

FAESP 2009. www.faespsenar.com.br (acessado em 25/07/2010)

FUNDECITRUS 2009. www.fundecitrus.com.br (acessado em 18/05/2010)

Goethals, K.; van Montagu, M.; Holsters, M. 1992. Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by *LysR*-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1646-1650.

Goheen, A. C.; Nyland, G. & Lowe, S. K. 1973. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfafa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology*. 63:341-345.

He C.X., Li W.B. and Ayres A.J. (2000) Distribution of *Xylella fastidiosa* in Citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease* 84(6): 622-626.

Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. & Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6602–6606.

Herna'ndez-Lucas, I., Gallego-Herna' ndez, A. L., Encarnacio' n, S., Ferna' ndez-Mora,M.,Marti' nez-Batallar, A. G., Salgado, H., Oropeza, R. & Calva, E. (2008). The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 190, 1658–1670.

Hopkins, D. L.; Mollenhauer, H. H. & Mortensen, J. A. 1973. Occurrence of a rickettsia-like bacterium in the xylem of peach with phony disease. *Phytophatology*. 63:1422-1423.

Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytophatol.* 27:271-290.

Hopkins, D. L.; Thompson, C. M., Wichman, R. L. et al. 1995. Effect of inoculation of Mature citrus trees in the grove with *Xylella fastidiosa* on citrus blight incidence. *Proc. Florida. State Horticulture Society*. 108: 103-106.

Iwanicka-Nowicka, R. & Hryniewicz, M. M. 1995. A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli* cys regulon. *Gene* 166: 11-17.

Keen N.T., Dumenyo C.K., Yang C. and Cooksey D.A. (2000) From rags to riches: insights from the first genomic sequence of a plant pathogenic bacterium. *Genome Biology* 1(3), 1019.1-1019.4.

Koide, T., Zaini, P.A., Moreira, L.M., Vencio, R.Z., Matsukuma, A.Y., Durham, A.M., Teixeira, D.C., El-Dorry, H., Monteiro, P.B., da Silva, A.C., et al. 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic

strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J. Bacteriol.* 186, 5442–5449.

Lambais, M. R.; Goldman, M. H. S.; Camargo, L. E. A.; Goldman, G. H. 2000. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology* 3 (5): 459-462.

Laranjeira, F. F. 1997. Ten years of citrus variegated chlorosis: What do we know? *Laranja.* 18, 123 – 141.

Lee, R. F.; Derrick, K. S.; Beretta, M. J. G.; Chagas, C. M. & Rosetti, V. 1991. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry.* Oct:12-15.

Lilic, M.; Jovanovic, M.; Jovanovic, G.; Savic, D. J. 2003. Identification of the CysB-regulated gene, *hslJ*, related to the *Escherichia coli* novobiocin resistance phenotype. *FEMS Microbiology Letters.* 224: 239-246.

Lindquist, S., Lindberg, F. & Normark, S. (1989). Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* beta-lactamase gene. *J Bacteriol* 171, 3746–3753.

Lochowska, A.; Iwanicka-Nowicka, R.; Plochocka, D.; Hryniewicz, M. M. 2001. Functional Dissection of the LysR-type CysB Transcriptional Regulator. *The Journal of Biological Chemistry.* 276(3): 2098-2107.

Machado, M. A. (2002) *Xylella fastidiosa* and the citrus variegates chlorosis (CVC), a new destructive citrus disease in Brazil. Disponível em: <http://aeg.ibi.ic.unicamp.br/xf/home/mmachado.html>

Marques L. L. R., Ceri H., Manfio G. P., Reid D. M., & Olson M. E. 2002. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* *in vitro*. *Plant Dis.* 86: 633-638.

Micheltore R. (2000) Genomic approaches to plant disease resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3, 125-31.

Ministério da Ciência e Tecnologia. 2007. Salvação da Lavoura. (<http://agenciact.mct.gov.br/index.php/content/view/42795.html>, acessado em 15.11.2010).

Mircetich, S.M.; Lowe, S.K., Moller, W.J.; Nyland, G. 1976. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66:17-24.

Monroe D (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 5(11): e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307

Nyland, G.; Goheen, A. C.; Lowe, S. K. & Kirkpatrick, A. C. 1973. The ultrastructure of a rickettsia-like organism from a peach tree affected with phony disease. *Phytophatology*. 63:1275-1278.

Osiro, D.; Colnago, L. A.; Otoboni, A. M. M. B.; Lemos, E. G. M.; de Souza, A. A.; Della Coletta Filho, H.; Machado, M. A. 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 236: 313-318.

Paradelha Filho, O.; Sugimori, M. H.; Ribeiro, I. J. A.; Garcia Júnior, A.; Beretta, M. J. G.; Harakawa, R.; Machado, M. A.; Laranjeira, F. F.; Rodrigues Neto, J. & Beriam, L. O. S. 1997. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. *Summa Phytophathologica*. 23:46-49.

Parsek, M. R., McFall, S. M., Shinabarger, D. L. & Chakrabarty, A. M. (1994). Interaction of two LysR-type regulatory proteins CatR and ClcR with heterologous promoters: functional and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12393–12397.

Pe´ rez-Rueda, E. & Collado-Vides, J. (2001). Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *J Mol Evol* 53, 172–179.

Picossi, S., Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L. (2007). Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* gltAB expression by GltC. *J Mol Biol* 365, 1298–1313.

Rhee, K. Y.; Opel, M.; Ito, E.; Hung, Arfin, S.; Hatfield, G. W. 1999. Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic *LysR*-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *PNAS*. 96, 14294 - 14299.

Sainsbury, S.; A. Lane, L. A.; Ren, J.; Gilbert, R. J.; Saunders, N. J.; Robinson, C. V.; Stuart, D. I.; Raymond J. Owens, R. J. 2009. The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Research* 37 (14), 4545 – 4558.

Santos, D.; Siqueira, D. L.; Picanço, M. C. 2005. Flutuação Populacional de Espécies de Cigarrinhas Transmissoras da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em Viçosa – MG. *Rev. Bras. Frutic.* 27 (2): 211-214.

Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*. 4:219-223.

Silva F.R.da, Vettore A.L., Kemper E.L., Leite A. and Arruda P. (2001) Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters* 203(2), 165-171.

Simpson, A. J. G. et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*. 406:151-157.

Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M. M., Neumann, P., Wilkinson, A. J., Brzozowski, A. M., Verma, C. S., Zaim, J., Wysocki, S. & Bujacz, G. D. (2006). Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J Mol Biol* 364, 309–322.

Sun, J. & Klein, A. (2004). A LysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol* 52, 563–571.

Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 474–500.

van Keulen, G., Ridder, A. N., Dijkhuizen, L. & Meijer, W. G. (2003). Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysRtype transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J Bacteriol* 185, 1245–1252.

9. Anexos

9.1. Artigo I

Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa* – evidence of allosteric behaviour

Antonio M. Saraiva¹, Marcelo A. Reis^{2,3}, Susely F. Tada¹, Luciana K. Rosselli-Murai¹, Dilaine R. S. Schneider¹, Alexandre C. Pelloso¹, Marcelo A. S. Toledo¹, Carlos Giles³, Ricardo Aparicio² e Anete P. de Souza¹

1 - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Brazil

2 - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

3 - Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

Publicado na revista The FEBS Journal 2009. Nov;276(22):6751-62.



Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa* – evidence of allosteric behaviour

Antonio M. Saraiva¹, Marcelo A. Reis^{2,3}, Susely F. Tada¹, Luciana K. Rosselli-Murai¹, Dilaine R. S. Schneider¹, Alexandre C. Pelloso¹, Marcelo A. S. Toledo¹, Carlos Giles³, Ricardo Aparicio² and Anete P. de Souza¹

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Brazil

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

³ Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

Keywords

allosteric behaviour; small-angle X-ray scattering; stationary phase survival protein E (SurE); SurE oligomeric state; *Xylella fastidiosa*

Correspondence

A. P. de Souza, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas São Paulo, Brazil
Fax: +55 19 3521 1089
Tel: +55 19 3521 1132
E-mail: anete@unicamp.br

(Received 5 June 2009, revised 11 August 2009, accepted 18 September 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07390.x

The genome data of bacterium *Xylella fastidiosa* strain 9a5c has identified several *orfs* related to its phytopathogenic adaptation and survival. Among these genes, the *surE* codifies a survival protein E (XfSurE) whose function is not so well understood, but functional assays in *Escherichia coli* revealed nucleotidase and exopolyphosphate activity. In the present study, we report the XfSurE protein overexpression in *E. coli* and its purification. The overall secondary structure was analyzed by CD. Small-angle X-ray scattering and gel filtration techniques demonstrated that the oligomeric state of the protein in solution is a tetramer. In addition, functional kinetics experiments were carried out with several monophosphate nucleoside substrates and revealed a highly positive cooperativity. An allosteric mechanism involving torsion movements in solution is proposed to explain the cooperative behaviour of XfSurE. This is the first characterization of a SurE enzyme from a phytopathogen organism and, to our knowledge, the first solution structure of a SurE protein to be described.

Structured digital abstract

- MINT-7262492: XfSurE (uniprotkb:Q9PF20) and XfSurE (uniprotkb:Q9PF20) bind (M1:0407) by x ray scattering (M1:0826)
- MINT-7262504: XfSurE (uniprotkb:Q9PF20) and XfSurE (uniprotkb:Q9PF20) bind (M1:0407) by molecular sieving (M1:0071)

Introduction

Phytopathogens attacking economically important crops are a major concern around the world. It is generally believed that, worldwide, up to 20% of potential crop yields are lost. Bacterial plant diseases are most severe in the tropical regions, where their effects can be disastrous [1]. Throughout the Americas, the bacterium *Xylella fastidiosa* infects a wide range of hosts, including grape, almond, peach and citrus [2,3]. In Brazil, the

strain 9a5c is the causal agent of citrus variegated chlorosis [4,5], which is a disease that attacks sweet orange trees and causes financial losses of up to US\$ 280–320 million per year (<http://www.fundecitrus.com.br>).

In the *Xylella* genome, there are 220 genes whose functions have been predicted on the basis of comparative sequence analysis, although they were not classified into a particular metabolic pathway (<http://www>.

Abbreviations

ASU, asymmetric unit; PDB, Protein Data Bank; pNPP, *p*-nitrophenyl phosphate; SAXS, small-angle X-ray scattering; SurE, stationary phase survival protein E.

xylella.lncc.br [6]. Among them, *orf* XF0703 encodes a stationary phase survival protein E (SurE). The *surE* gene is widely spread among archaea, eubacteria and eukaryote species and, apparently, is well conserved [7]. *orf* XF0703 has 789 bp and its correlated protein (XfSurE) has 263 amino acids (28.3 kDa) and a theoretical pI of 5.23. The N-terminal primary structure has strong similarity with other previously studied SurEs (Fig. 1).

The *surE* gene was first identified in *Escherichia coli* and belongs to an operon related to the stationary phase survival protein cluster coded by *surE-pcm-nlpD-rpoS* genes [8]. In *Xylella*, this operon has a different genome architecture (*surE-pcm-dedA-nlpD*), where the *rpoS* gene, an alternative RNA polymerase sigma factor that is expressed during the stationary phase, is not found [9]. As in *E. coli*, the *Xylella surE* gene has a four nucleotide overlap with *pcm* and the two constitute a bicistronic operon. These genes are highly expressed during the stationary phase in *E. coli*. The PCM protein is involved in rescuing cells from damage caused by isoaspartyl residues that are formed during

stress by the conversion of asparagines and aspartate residues [10]. Assays with double mutant *pcm/surE* strains show isoaspartyl residue accumulation but, interestingly, in the *pcm* single mutant strain, the *surE* gene appears to suppress this phenotype [11]. These results corroborate the hypothesis that SurE and PCM proteins act in a coordinated manner to maintain cell viability during stress [11,12].

Despite previous studies, the function of the SurE protein is not completely known, nor is its catalytic mechanism. Recently, this protein was reclassified as a nucleotidase (nucleoside 5'-monophosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.5) because of broad specificity to 5'(3') nucleosides in addition to exopolyphosphatase activity [13]. Thus, SurE protein may be involved in pathway regulation of DNA and RNA synthesis [14] or, in another hypothesis, it comprises a housekeeping enzyme implicated in noncanonical nucleoside catabolism [15,16]. Five crystallographic structures of SurE have so far been characterized, obtained from *Thermotoga maritima* (TmSurE) [17,18], *Pyrobaculum aerophilum* (PaSurE) [7], *Thermus thermophilus* (TtSurE) [19],

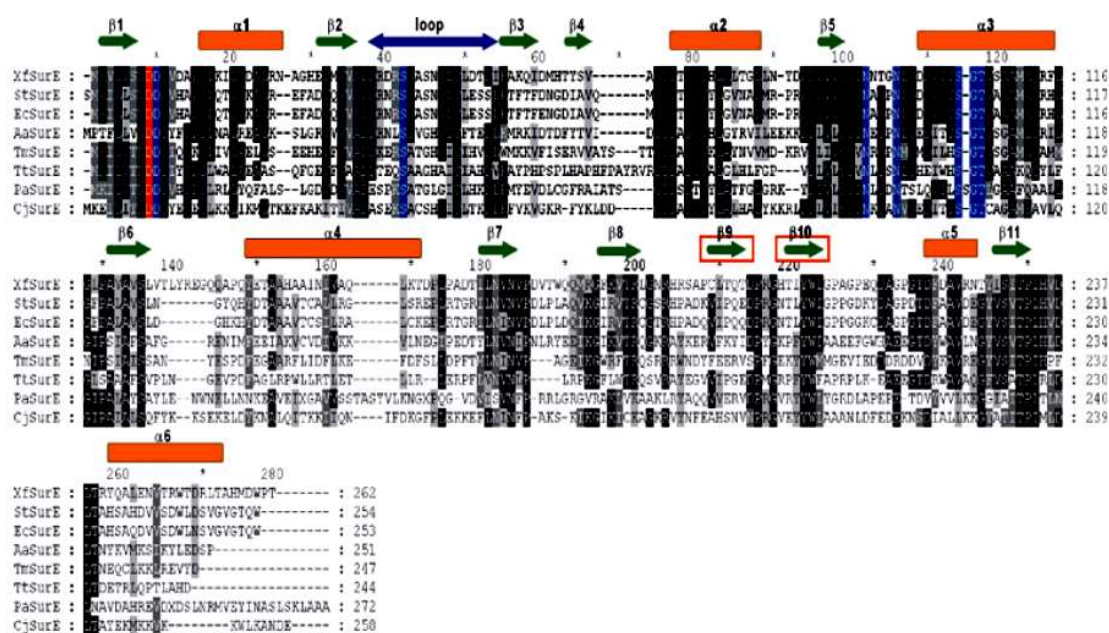


Fig. 1. Multiple sequence alignment of SurEs using CLUSTALW2 [49] and GENEDOC [50], with identities given in parentheses. XfSurE, *X. fastidiosa*; StSurE, *S. typhimurium* (54%); EcSurE, *E. coli* (54%); AaSurE, *A. aeolicus* (42%); TmSurE, *T. maritima* (37%); TtSurE, *T. thermophilus* (36%); PaSurE, *P. aerophilum* (30%) and CjSurE, *C. jejuni* (33%). Letters shaded in black indicate residues that are identical in at least four of the SurEs. Conserved substitutions are shaded in grey. Amino acids implicated in metal coordination and catalysis are highlighted in blue and Asp8 is shaded in red. Secondary structure elements (orange sticks for α -helix and green arrows for β -sheet) predicted from XfSurE sequence with PSIPRED [51] are also indicated. The blue double-arrow designates the regions corresponding to the functional loop, and two β -sheets involved in tetramerization are enclosed in red rectangles [19].

Aquifex aeolicus (AaSurE) (not described in the literature) and, recently, *Salmonella typhimurium* (StSurE) [20]. The protein from *Campylobacter jejuni* (CjSurE) is under investigation [16].

In the present study, to provide a better understanding of SurE protein function, and as part of our efforts aiming to characterize possible pathogen-related proteins from *X. fastidiosa* [21–24], we report the overexpression, purification and characterization of a new SurE protein. This is the first characterization of a SurE enzyme from a phytopathogenic organism. In addition, modelling approaches based on small-angle X-ray scattering (SAXS) data were used to obtain information on the overall shape of this protein, permitting the identification of structural features similar to those of the SurE family of proteins. These studies, associated with kinetics parameters, indicate that XfSurE has different features from the previously described SurE proteins. Therefore, this present study not only contributes to a better understanding of the SurE family of proteins, but also adds new information on the metabolism and phytopathogenicity of *X. fastidiosa*.

Results and Discussion

Cloning, expression and purification

The *X. fastidiosa* genome has provided important information on bacterial metabolism and pathogenesis [6]. In this context, several *orfs* were identified whose functional and cellular roles are so far not well understood. To better comprehend the bacterial metabolism as well to contribute to the current knowledge about the SurE protein family, we have studied the *X. fastidiosa* SurE protein. Despite early functional and biophysical studies of SurE proteins, important questions remain unanswered and the establishment of efficient expression and purification procedures for the production of XfSurE protein was first required in order to obtain sufficient protein for functional and biophysical experiments.

The *orf* XF0703 was successfully cloned into the pET29a expression vector. In *E. coli* overexpression assays, the best results were obtained by harvesting cells 20 h post-induction, using lactose 5.6 mM as the inducer agent. Approximately 20 mg of soluble XfSurE protein was obtained per litre of culture, despite the fact that part of the protein was expressed in insoluble form. The purification of the recombinant XfSurE was performed by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel, resulting in a large quantity of purified XfSurE obtained in elution frac-

tions over a imidazol concentration range of 250–500 mM. A single band with approximately 30 kDa (XfSurE plus His-Tag C-terminus) was obtained by SDS-PAGE.

CD

To investigate the secondary structural integrity of recombinant XfSurE, CD spectra were obtained at pH 7.0. Analysis of the data using CDSSTR indicated that XfSurE is mainly composed of α -helices (31%) and β -sheets (20%). These results are in agreement with the predicted secondary contents obtained with PSIPRED (29% α -helices and 20% β -sheets) and also are compatible with the data from the crystal structures of SurEs described in the literature that are composed of Rossmann-like domains with a swapping domain [18], thus indicating that the purified recombinant protein was folded and stable at room temperature.

Size exclusion chromatography

The oligomeric state of SurE proteins in solution is currently not well understood. In *T. maritima*, TmSurE was found as dimers [17] or both dimers and tetramers [18]. PaSuE, CjSurE and StSurE exist as dimers [7,16,20] and TtSurE was described as existing in equilibrium between dimers and tetramers [19]. Size exclusion assays with EcSurE indicated a tetrameric organization [13].

Studies using gel filtration and SAXS analysis point to a tetrameric form of XfSurE in solution. Gel filtration revealed that XfSurE appears during column elution as a single peak between the aldolase (158 kDa) and conalbumin (75 kDa) peaks (Fig. 2). According to a calibration curve, this XfSurE peak corresponds to a calculated molecular mass of 117 ± 1 kDa, therefore being equivalent to the expected mass of a tetramer.

Enzymatic assays

Initial enzymatic assays involving XfSurE were performed using the artificial substrate *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) to determine the best pH and cofactor, as well the kinetic parameters. As shown in Fig. 3A, the enzyme has highest activity at pH 7.0. The optimal pH is the same as those of EcSurE and StSurE [13,20], suggesting that, in mesophilic organisms, the enzyme acts at neutral pH, in contrast to thermophilic bacteria where the activity changes depending on the organism.

Various divalent metals were tested to determine the best cofactor with pNPP (Fig. 3B). The enzyme exhib-

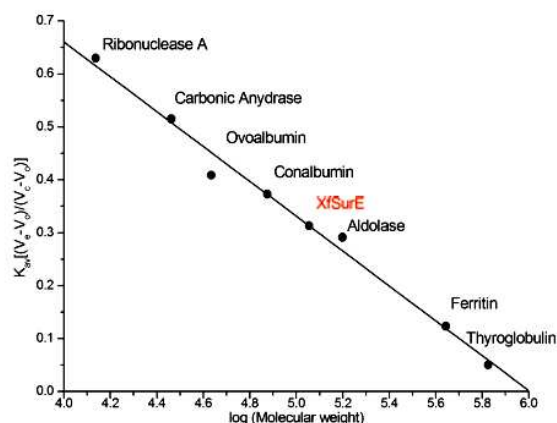


Fig. 2. Calibration curve for XfSurE in buffer B using the molecular mass calibration kits LMW and HMW (GE Healthcare). The estimate of molecular mass for XfSurE is highlighted in red.

ited the highest affinity with Mn^{2+} , followed by $Co^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$. From all characterized SurEs, only EcSurE [13] has a preference for manganese, whereas, in the other SurEs, the preference is for magnesium. Kinetic assays with pNPP (Fig. 3C) showed that, with this substrate, the enzyme has a classical Michaelis–Menten behaviour, with $K_m = 3.2$ mM. This value is higher than that found for EcSurE ($K_m = 2.49$) and TtSurE ($K_m = 2.9$), but below that of StSurE ($K_m = 4.8$). These results demonstrate that the enzyme has low affinity for this substrate.

Several phosphorylated substrates were screened. The results obtained indicate that XfSurE has activity only against monophosphate nucleosides (Fig. 3A). The enzyme has higher activity with purine nucleosides ($3'$ -AMP $>$ $5'$ -dGMP $>$ $5'$ -dAMP $>$ $5'$ -AMP), but did not exhibit a clear preference between ribo- or deoxyribonucleotide and $3'$ or $5'$ monophosphate nucleosides. This is consistent with the classification of SurE as a member of $5'(3')$ nucleotidase family [13].

Functional experiments with four natural substrates showed that the best divalent metal was Mn^{2+} for all of them. Moreover, the ions Mg^{2+} and Co^{2+} were demonstrated to be alternative metal options for $3'$ -AMP, $5'$ -dAMP and $5'$ -AMP substrates, and Co^{2+} and Mg^{2+} for $5'$ -dGMP (Table 1).

Interestingly, kinetic experiments with natural substrates revealed new catalytic properties of XfSurE. It was clearly demonstrated that, in the presence of natural substrates, XfSurE exhibits an allosteric behaviour with a sigmoidal fit for $3'$ -AMP (Fig. 3C) and other substrates (Table 1). The kinetic values obtained dem-

onstrated that XfSurE possesses the highest affinity for $3'$ -AMP ($K_{0.5} = 0.16$), followed by $3'$ -dAMP, $5'$ -dGMP and $5'$ -AMP. These results are similar to the K_m range of EcSurE (0.10–0.37 mM) [13]. Allosteric behaviour was found for EcSurE only in the presence of polyphosphate substrates, where the enzyme had an exopolyphosphate activity with a Hill coefficient of 1.86. In XfSurE, where allosteric behaviour was found for nucleotidase activity, the positive cooperative behaviour was higher, with a Hill coefficient of 2.6 for the $3'$ -AMP substrate. Other nucleotidases with allosteric properties have been characterized, such as the secreted $5'$ -nucleotidase from *Trichinella spiralis* (Hill coefficient of 1.56 for AMP) [25] cytosolic nucleotidase from chicken [26] and human cytosolic $5'$ -nucleotidase II [27–29]. These findings indicate that XfSurE possibly is a regulatory enzyme and that it is modulated most likely by purine nucleoside byproducts originating from an intricate bacterial metabolism.

Similar to EcSurE, the XfSurE enzyme is inactive towards $5'$ -ATP. To investigate a possible inhibition of XfSurE activity by $5'$ -ATP, an inhibition curve was obtained in the presence of $3'$ -AMP (Fig. 3G). The enzyme is inhibited in a dose-dependent manner, similarly to EcSurE [13]. XfSurE lost 50% of this activity in the presence of 0.86 mM $5'$ -ATP ($K_i = 0.43$ mM).

Structure analysis

SurE structures

Figure 1 shows a sequence alignment of XfSurE with the seven most identical homologues. The crystallographic structures of five homologous proteins have been previously reported both in apo and holo forms. Apo structures from *P. aerophilum* [PaSurE; Protein Data Bank (PDB) entry 1L5X] [7] and *A. aeolicus* (AaSurE; PDB entry 2PHJ) (not described in the literature) as well as a holo form with magnesium ions of *T. maritima* (TmSurE; PDB entry 1J9J) [17,18] have been determined in a crystal form containing a dimer in the crystal asymmetric unit (ASU). *T. thermophilus* SurE structures were determined in different crystal forms, in particular, the apo structures TtSurE1 (PDB entry 2E69; space group $P3_121$, with a tetramer in the ASU) and TtSurE3 (PDB entry 2E6G; space group $P2_12_12_1$, with three tetramers in the ASU) and the complex TtSurE–MnAMP with Mn^{2+} and AMP (PDB entry 2E6C; space group $P3_121$, with one tetramer in the ASU). Sulfate and phosphate ions from the crystallization buffer were observed in both apo structures [19]. Recently, the crystallographic structure of SurE from *S. typhimurium* in the presence of magnesium ions was determined in two different crystal

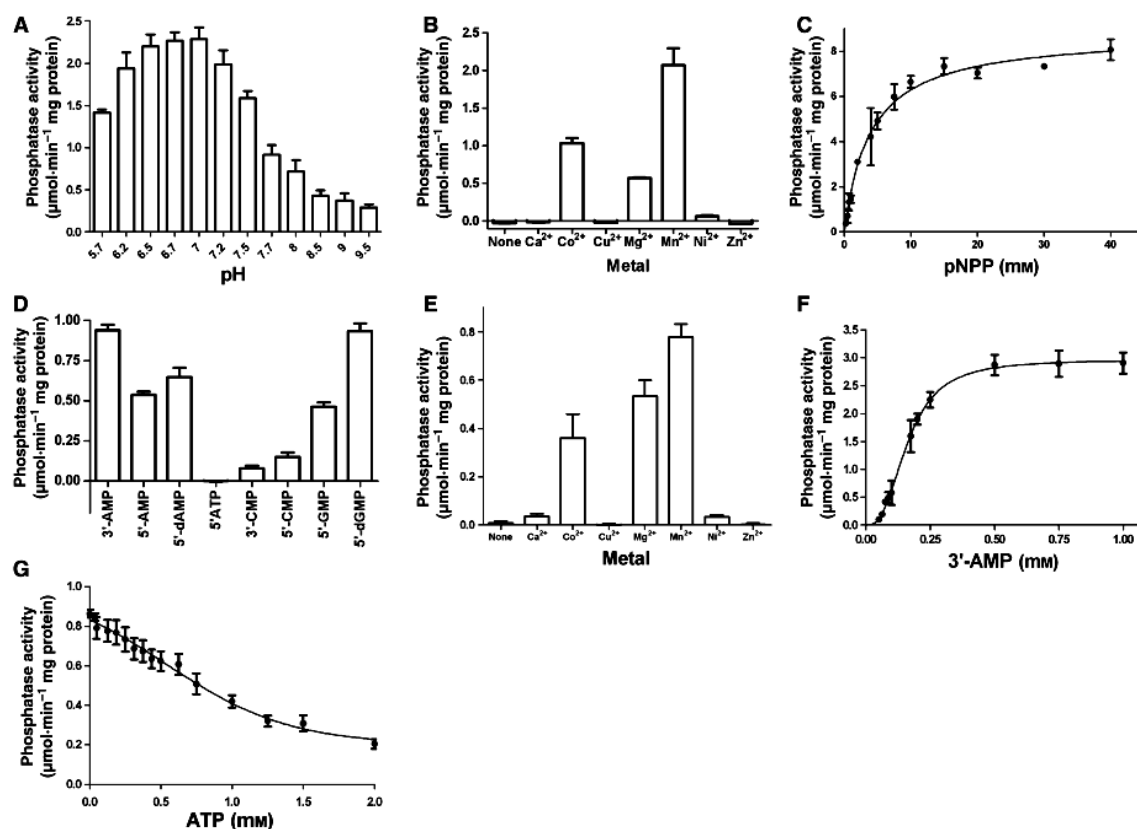


Fig. 3. Functional assays involving XfSurE enzyme. (A–C) Hydrolysis of the artificial substrate pNPP. (A) pH dependence of XfSurE in different buffers: MES-Na (pH 5.5–6.7), Hepes-Na (pH 7.0–8.0) and Tris-HCl (pH 8.2–9.5). (B) Divalent metal preference in buffer Hepes-Na (pH 7.0). Each metal was added at a 0.1 mM concentration, except Mg (added at 1 mM). (C) Kinetics curve of pNPP (0.1–40 mM). The reaction mixture contained 50 mM Hepes-Na buffer, 0.1 mM of Mn²⁺ and 4 mM of pNPP substrate. (D–F) Phosphatase activity with natural substrates. (D) Nucleotidase activity in different phosphorylated nucleosides (at 1 mM). (E) Metal predilection of XfSurE in the presence of 3'-AMP (ion concentrations are the same as those utilized in the pNPP assays). (F) Kinetics curve of 3'-AMP (0.01–1 mM). (G) XfSurE inhibition by ATP (0–2 mM) in the presence of 2.5 mM 3'-AMP.

Table 1. Kinetic parameters and metal predilection for several substrates of XfSurE.

Substrate	$K_{0.5}$ (mM)	V_{max} ([μ M]·(min·mg ⁻¹) ⁻¹)	Hill coefficient	Metals
pNPP	3.2 ± 0.4	8.8 ± 0.2	1.18 ± 0.09	Mn ²⁺ > Co ²⁺
3'-AMP	0.16 ± 0.01	2.96 ± 0.03	2.67 ± 0.09	Mn ²⁺ > Mg ²⁺
5'-dAMP	0.41 ± 0.03	0.859 ± 0.001	2.9 ± 0.1	Mn ²⁺ > Mg ²⁺
5'-AMP	0.79 ± 0.05	0.55 ± 0.02	2.6 ± 0.2	Mn ²⁺ > Mg ²⁺
5'-dGMP	0.50 ± 0.07	2.26 ± 0.08	2.6 ± 0.3	Mn ²⁺ > Co ²⁺

forms [20], which will be referred to as StSurE1 (PDB entry 2V4O, whose crystals contain a tetramer in the ASU) and StSurE2 (PDB entry 2V4N, where the ASU contains a monomer). In addition, a report on the crystallization of SurE from *C. jejuni* (CjSurE) in two crystal forms containing either a dimer or a tetramer in the ASU is available [16].

It is important to note that the crystal ASU does not necessarily reflect the protein structure in solution. Indeed, different oligomers with the same number of subunits can be generated by the application of crystallographic symmetry operations on the molecules contained in the ASU, and several cases have been reported where solution studies were essential to

provide information on the macromolecular assembly in solution [30]. In the case of XfSurE homologues, although various crystal forms were reported, containing a monomer, a dimer, a tetramer or a combination of tetramers in the ASU, additional experimental data other than crystallographic data are necessary to determine which macromolecular contacts mediate multimerization and thus the shape of the probable biologically relevant oligomer. To our knowledge, this is the first solution structure of a SurE protein to be described.

SAXS experiments

SAXS measurements taken at various concentrations showed that the oligomeric state of XfSurE does not depend on the protein concentration. Thus, we report only the data for the sample with a protein concentration of $12.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, whose experimental curve is shown in Fig. 4A. The linear behaviour in the Guinier region (Fig. 4A, inset) indicates a monodisperse system, corresponding to a scattering particle with a radius of gyration of $32.7 \pm 0.2 \text{ \AA}$. The distance distribution function $P(r)$ obtained from the experimental data (Fig. 4B) corresponds to a globular molecule with a maximum intramolecular distance $D_{\text{max}} = 100 \text{ \AA}$. Furthermore, the Kratky plot (Fig. 4B, inset), with a well-defined maximum, indicates that the protein is in a folded native conformation.

In addition to the gel filtration technique, an estimate of the molecular mass of XfSurE in solution was obtained by the method described in the Experimental procedures, using lysozyme ($M_{\text{st}} = 14.4 \text{ kDa}$) at a concentration of $c_{\text{st}} = 27.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ as standard. Values for $I(0)$ obtained by Guinier analysis for the sample and the standard were $I(0) = 1.9564 \times 10^{-3}$ and $I_{\text{st}}(0) = 5.8127 \times 10^{-4}$ (arbitrary units on the same scale), respectively, leading to 108 kDa as an estimate for the molecular mass of the protein in solution. This value is in agreement (within the error inherent to the method) with that predicted from the amino acid sequence for four monomers of XfSurE (i.e. 118 kDa). Thus, we assume that XfSurE is a tetramer in solution.

Ab initio shape restoration and structural comparisons

Theoretical scattering curves for different tetramers obtained from the available crystallographic structures of XfSurE homologues were computed by CRY SOL [31] and the values of the parameter χ are provided in Table 2. The best fit was obtained with the homologue StSurE1. The fit to the experimental curve and the dis-

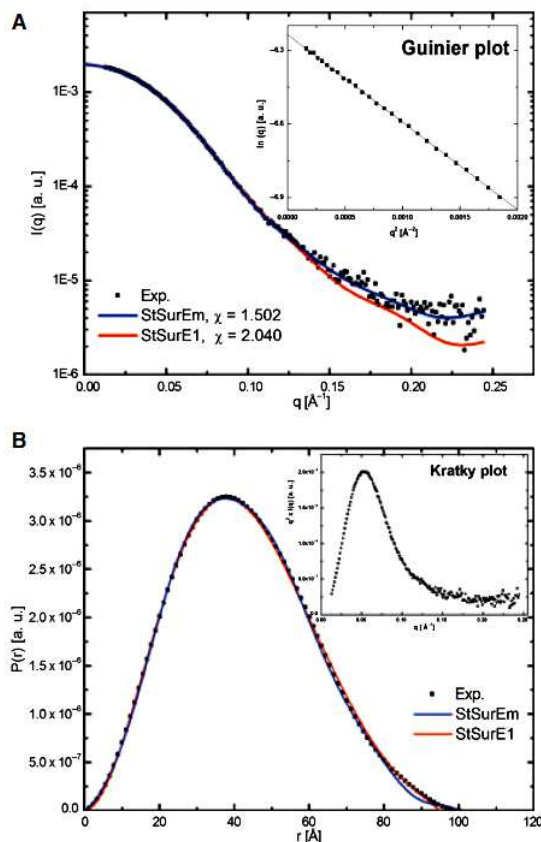


Fig. 4. SAXS experiments. (A) Experimental small-angle X-ray solution scattering curve of XfSurE and the linear behaviour observed in the Guinier plot (inset). The fit to the experimental data calculated with CRY SOL [31] for the models StSurE1 and StSurEm is also shown. (B) Distance distribution function derived from the experimental curve using GNOM [42] and the Kratky plot obtained from the experimental data (inset). $P(r)$ functions for the models StSurE1 and StSurEm calculated using CRY SOL [31] and GNOM [42] are also shown.

tance distribution function are presented in Fig. 4A,B. In both cases, good agreement is observed.

In addition to this preliminary analysis, which included calculation of global parameters and analysis of crystallographic structures of homologous proteins, a low resolution envelope for XfSurE was derived from the scattering curve. The best results during the DAMMIF [32] runs were obtained imposing the point-group symmetry P222 ($\chi = 1.65$), followed by P2 ($\chi = 1.89$), P1 ($\chi = 2.89$) and P4 ($\chi = 10.77$). The final average envelope is shown in Fig. 5, superposed onto the model StSurE1.

Taken together, the results of the present study unequivocally indicate that the overall shape of

Table 2. Structural parameters for SurE tetramers. The tetramers of TmSurE, PaSurE and AaSurE were generated by the application of crystallographic symmetry operators. Further details are provided in the text.

Model	R_g (Å)	χ	Area (Å ²)			Dihedrals (°)	d_{AC} Å	d_{BD} Å
			A-B	C-D	AB-CD			
StSurEm	32.40	1.502	2185	2403	2057	23.8	26.7	26.1
StSurE1	32.66	2.040	3781	3731	1257	15.2	26.1	25.8
TmSurE	32.40	2.197	3665	3556	1048	8.9	22.5	22.5
PaSurE	31.68	5.609	2999	2994	2231	-1.9	21.1	21.3
AaSurE	31.10	6.439	3621	3620	1434	-32.6	22.8	22.5
TtSurE-MnAMP	30.71	10.355	3272	2980	1815	-16.3	17.9	22.5
TtSurE1	30.62	10.490	3314	3032	1460	-15.3	18.7	22.4
TtSurE3	29.97	14.473	2913	2730	2147	-24.8	16.9	16.6

XfSurE in solution is very similar to that of StSurE1, the tetramer contained in the ASU of the crystallographic structure of SurE from *S. typhimurium*.

Rigid-body modelling

As shown in Fig. 4A,B, the crystallographic model StSurE1 fits the scattering curve and the distance distribution function in both anisotropy and D_{max} quite well. Differences observed at higher angles in the scattering profile and small differences in the $P(r)$ function may be explained by the superposition of the StSurE1

structure onto the XfSurE low resolution envelope. As shown in Fig. 5 (center), there are lateral empty portions that suggest differences in the β -hairpin (Fig. 1) responsible for tetramerization in these proteins. To improve the fit to the experimental solution scattering curve, we searched for a more suitable model, starting from the original StSurE1 structure and adopting an approach where protomers A, B, C and D were treated as rigid bodies subject to two independent movements with respect to Fig. 5 (left): a translation of protomers A and D along the z -axis and a rotation of the dimer formed by protomers C and D around the y -axis.

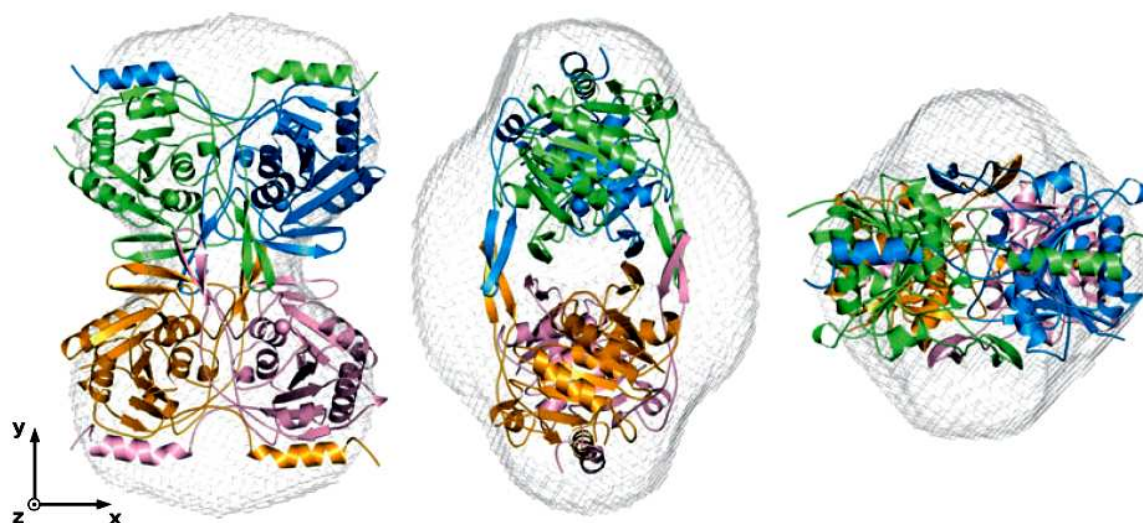


Fig. 5. Cartoon representation of the crystallographic structure of SurE from *S. typhimurium* (StSurE1) superposed onto the XfSurE envelope reconstructed from the experimental solution scattering curve. The center and right views are rotated clockwise by 90° around the x - and y -axes, respectively. Protomers A, B, C and D are shown in green, blue, orange and pink in this sequence, with the corresponding Asp8 C $_{\alpha}$ represented as a sphere. With respect to the left panel and the coordinated system of the page, the rigid-body modelling procedure described in the text involved translations (with respect to the original position) of protomers A and D along the z -axis and rotations of protomers C and D around the y -axis. The drawing was prepared using PYMOL (<http://www.pymol.org>).

Structural changes introduced during the process were visually inspected by superposing the modified models onto the experimentally-derived envelope.

A characteristic of the StSurE1 tetramer is the distance of the C α carbons of Asp8 in the monomers A/C (d_{AC}) and B/D (d_{BD}), which are responsible for the symmetry properties observed in some of the reported crystallographic structures [19]. This distance is also correlated with the dihedral angle between the plane formed by Asp8 C α in protomers ABD and the plane formed by the corresponding atoms in protomers BCD (Fig. S1), as well as with the interface area between the dimers AB and CD. These parameters have proved to be convenient for structural comparison, and the calculated values for various SurE structures are shown in Table 2.

Translational movement in steps of 1 Å and rotations in the range -90° to $+90^\circ$ in steps of 10° were carried out and the χ parameter was computed against the experimental data with CRY SOL [31], resulting in the plot shown in Fig. S2. The distances d_{AC} and d_{BD} remained essentially constant throughout the process, thus preserving structural symmetry. As shown in Fig. S2, the value of χ for a translation of approximately 7.5 Å is a minimum for several rotation angles, indicating that, in principle, more than one configuration is possible in solution. Of note, there is a central local minimum (translation and rotation of 7.5 Å and $+25^\circ$, respectively), which will be referred to as StSurEm, for which $\chi = 1.502$, and this is lower than that calculated for the initial model StSurE1 ($\chi = 2.040$). StSurEm has a dihedral angle (23.8°) higher than that of StSurE1 (15.2°) (Table 2) and a higher interaction surface area between dimers AB and CD (2057 Å^2 versus 1257 Å^2 in the case of StSurE1). The fit to the experimental curve and the $P(r)$ function corresponding to the StSurEm model are shown in Fig. 4A,B.

It is important to note that the active site of each protomer as well as other important residues for catalysis (amino acid residues 32–51 in Fig. 1) are located in the core of the tetramer, a region directly affected by changes in the interface area AB/CD. Conceivably, the possible structural configurations mentioned above may be related to a freedom of movement of the apo enzyme in solution, which would itself constitute a mechanism by which XfSurE may regulate the entry of substrate into the active sites of the tetramer. This hypothesis is in agreement with (and could provide an explanation for) the results obtained by the enzymatic assays, where the Hill coefficients unequivocally indicate the highly positive cooperative behaviour of XfSurE. Proteins of dihedral groups provide rich struc-

tural variations to build allosteric control [33], as observed in fructose-1,6-bisphosphatase tetramer [34] where, in the context of the two-state Monod–Wyman–Changeux model [35], the T state was associated with a dimer turned 17° from its position in the R state, with both coexisting in equilibrium.

Iwasaki and Miki [19] recently proposed for TtSurE that an observed cooperative behaviour was correlated with the structural asymmetry inherent in the apo enzyme, as a result of differences in the distances d_{AC} and d_{BD} (TtSurE1; Table 2). The correlation with a cooperative behaviour was inferred based on the fact that the structure of a holo enzyme (TtSurE–MnAMP) also exhibited the same asymmetry. Thus, it could not be attributed to the presence of the ligand. However, as shown in Table 2, in another apo structure (TtSurE3) determined by Iwasaki and Miki [19], no asymmetry is observed. Both TtSurE1 and TtSurE3 have an ion near the active site region. The asymmetric apo structure TtSurE1 belongs to a crystal form containing a tetramer in the ASU, whereas the ASU of the apo structure TtSurE3 contains three tetramers, with all of them being symmetric. Thus, from a different point of view, the observed asymmetry cannot be considered as an intrinsic property of the apo enzyme.

In the case of XfSurE, the data suggest that the unequivocal positive cooperative behaviour observed is not related to a permanent structural asymmetry. The results obtained in the present study provide insight into a possible allosteric behaviour of the enzyme that could account for the observed cooperativity. Because XfSurE may exhibit a twisting movement in solution, as discussed above, a simple model for an allosteric mechanism would include two configurations, R and T, similar to the Monod–Wyman–Changeux model [35]. Thus, changes in the dihedral angle and accompanying changes in the contact area between dimers AB/CD would control the access of the substrate to the active sites of the tetramer.

Experimental procedures

Cloning, expression and purification

The *surE* gene from *X. fastidiosa* orf XF0703 was amplified by PCR using purified genomic DNA as template. The PCR was carried out using specific primers with restriction enzyme sites *NdeI* and *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for cloning in pET29a vector (Novagen, Madison, WI, USA): forward primer 5'-ATAAA CATATGCGCGTTCTTGTCAGTAA-3' and reverse primer 5'-AAACTCGAGTGTGGCCAGTCCATGTG-3' (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil). The PCR

amplification product was cloned into pET29a and transformed into *E. coli* DH5- α as the cloning host. Sequencing of cloned vectors revealed *orf* XF0703 plus an expected additional eight carboxy terminus amino acid residues, including six histidines (LEHHHHHH).

The plasmid containing the *surE* insert from *X. fastidiosa* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells, inoculated overnight at 37 °C and 300 r.p.m. into 3 mL of TB medium containing 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of kanamycin antibiotic and transferred to 2 L of TB at the same antibiotic concentration. The cells were grown until D_{560} of 0.6–0.8 was reached, when XfSurE protein overexpression was induced by the addition of 5.6 mM of lactose followed by cultivation for 20 h at 37 °C and 300 r.p.m. The culture was then centrifuged at 3000 g for 15 min at 4 °C and pelleted cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 300 mM NaCl) plus 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ lysozyme and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). The cell suspension was let stand for 30 min at 4 °C followed by sonication. Clarification was performed twice by centrifugation at 27 000 g for 40 min at 4 °C. The XfSurE protein purification was performed in a single chromatography step using a Ni-NTA column (Qiagen, Hilden, Germany) equilibrated with buffer A. The purified XfSurE protein was eluted with five column volumes of buffer A containing 250 mM imidazole and the degree of purity was estimated by SDS-PAGE. Subsequently, the purified XfSurE was dialyzed in buffer B (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol). All chemical reagents used were of the highest commercially available grade.

CD

CD spectra of the purified XfSurE protein were measured using a Jasco J-810 Spectropolarimeter dichrograph (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The far-UV CD spectra were generated at 24 °C using XfSurE protein at 6.5 μM in 5 mM Tris-H₂SO₄ buffer at pH 7.0. The assays were carried out using a 1 mm pathlength quartz cuvette, and 20 accumulations within the range 260–190 nm at a rate of 50 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ at 20 °C were recorded for the sample and averaged. Deconvolution and statistical analysis of the CD spectra were performed using the DICHROWEB server [36–38].

Size exclusion chromatography

To assess the oligomeric state of purified XfSurE, gel filtration chromatography was performed using a Superdex 200 HR10/30 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) prepacked column. After equilibration of the column with buffer B (48 mL), the sample was loaded at a flow rate of 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The Superdex column was calibrated using HMW and LMW calibration kits (GE Healthcare) as standard molecular weight markers.

Enzymatic assays

Assays with artificial substrate pNPP involving pH, cofactors and kinetics were performed at room temperature and the data were obtained spectrophotometrically at 410 nm. The phosphatase activity of SurE protein was screened against different phosphorylated substrates (amino acids, sugars, lipids and nucleosides). Kinetic experiments with four substrates (3'-AMP, 5'-AMP, 5'-dAMP and 5'-dGMP) were carried out aiming to understand the behaviour of XfSurE in the presence of these substrates. The phosphatase activity with natural substrates was measured at 620 nm by the release of free phosphate using the malachite green method [39]. The experiments were performed in 50 mM Hepes-Na buffer (pH 7.0) with 0.1 mM of Mn^{2+} . All the reactions were performed in quadruplicate and repeated three times using 2.5 μg (pNPP assays) and 1.5 μg (natural substrates assays) of fresh purified protein. Kinetic parameters were obtained using GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All substrates were purchased from Sigma Chemical.

SAXS data analysis and modelling

The samples of XfSurE were prepared with concentrations in the range 2.0–12.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in buffer B (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol). SAXS data were collected at the D02A-SAXS2 beamline of the Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas SP, Brazil) using a 2D position-sensitive MarCCD detector (Marresearch, Hamburg, Germany). The sample-to-detector distance was 1306.85 mm, and the X-ray wavelength was 1.488 Å. A momentum transfer interval $0.01 < q < 0.24$ ($\text{\AA}^{-1}$) was covered, where $q = [(4\pi)/(\lambda)]\sin \theta$ and 2θ is the scattering angle. The scattering patterns were measured with a 3 min exposure time at 20 °C. For each concentration, five successive frames were recorded. Data reduction using FIT2D [40] included radial integration of the images collected and normalization to the intensity of the transmitted beam to build an average scattering curve. No radiation damage was observed. The average scattering curves underwent conventional Guinier approximation analysis to obtain R_g , the radius of gyration of the molecule and $I(0)$, the scattering intensity at zero angle, assuming Guinier's law $I(q) = I(0)\exp(-q^2[(R_g^2)/3])$ for very small angles ($q < 1.3/R_g$) [41]. More accurate estimates for R_g and $I(0)$ were obtained by the indirect Fourier transform method as implemented in GNOM [42], which also calculates the distance distribution function $P(r)$, allowing assessment of the maximum intramolecular distance (D_{max}) and molecule anisometry. Examination of the Kratky plot [$q^2 I(q) \times q$], where the native state of a compact globular protein, has a characteristic profile, was employed as a tool to characterize the conformational state of the protein in solution [43,44]. An estimate for the molecular mass of the protein was obtained using a known

protein collected in the same experimental conditions as a standard for calibration and the equation $[Mc/I(0)]_{\text{protein}} = [Mc/I(0)]_{\text{standard}}$, where, for each species, M is the molecular mass, c is the concentration and $I(0)$ is the scattering intensity at the origin. This method is capable of providing molecular mass estimates with an error of approximately 10% [45]. The number of subunits (n) and thus the oligomeric state in solution was obtained from the known molecular mass of the protein monomer (P) and the relation $n = M/P$.

Ab initio dummy bead models were calculated from the experimental curves using DAMMIF, a faster version of DAMMIN [32]. Different point-group symmetries (P1, P2, P4 and P222) were imposed. The final low resolution 3D envelope representing the protein was generated by averaging twenty independent DAMMIF runs, with the software DAMAVER and DAMFILT [46] in the automatic mode. With the objective of clearer visualization, the average model was represented by a surface calculated using the software NCSMASK [47].

In parallel to the *ab initio* methods used to construct a low resolution envelope from the experimental curve, rigid-body modelling based on the homologous protein StSurE1 was carried out in an independent fashion. Translation and rotation movements of the protein subunits were performed using PYMOL (<http://www.pymol.org>). The discrepancy (χ) between the experimental data and the theoretical scattering curve computed for each possible model was assessed with the software CRY SOL [31]. Conventionally, the parameter χ provided by CRY SOL is used as a measurement of the goodness of fit to the experimental data. Structural alignments were carried out with SUPCOMB [48]. Calculation of interaction surface areas between subunits in oligomers was performed using the software AREAIMOL available in the CCP4 package [47]. First, the accessible surface area for each individual subunit (S_i , S_j) and the surface of the complex (S_{ij}) were calculated. The interaction surface area was then obtained as half of the buried surface area, defined as: $S_i + S_j - S_{ij}$.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Process 01/07533-7 and 05/03234-6). A. M. Saraiva, S. F. Tada, L. K. Rosselli-Murai, A. C. Pelloso and M. A. S. Toledo were supported by fellowships from FAPESP. M. A. Reis and D. R. S. Schneider received PhD fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We gratefully acknowledge Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) for beamline time, Professor Nilson Zanchin for providing CD espectralimeter facilities, and Professor Dagmar Stach-Machado and Luis A. Peroni (IB/Unicamp) for technical expertise on the

kinetics experiments. We are deeply indebted to Professor Carol Collins (IQ/Unicamp) for carefully reading the manuscript and assisting with language revision.

References

- 1 Dow JM & Daniels MJ (2000) *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* **17**, 263–271.
- 2 Lambais MR, Goldman MH, Camargo LE & Goldman GH (2000) A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* **3**, 459–462.
- 3 Purcell AH & Hopkins DL (1996) Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 131–151.
- 4 Pooler MR & Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr Microbiol* **31**, 377–381.
- 5 Lee RF, Derrick KS, Beretta MJG, Chagas CM & Rosetti V (1991) Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Ind* **000**, 12–15.
- 6 Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LM, Araya JE, Baia GS, Baptista CS et al. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature* **406**, 151–159.
- 7 Mura C, Katz JE, Clarke SG & Eisenberg D (2003) Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurEalpha): an acid phosphatase with purine nucleotide specificity. *J Mol Biol* **326**, 1559–1575.
- 8 Li C, Ichikawa JK, Ravetto JJ, Kuo HC, Fu JC & Clarke S (1994) A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* **176**, 6015–6022.
- 9 da Silva Neto JF, Koide T, Gomes SL & Marques MV (2007) The single extracytoplasmic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. *J Bacteriol* **189**, 551–560.
- 10 Li C, Wu PY & Hsieh M (1997) Growth-phase-dependent transcriptional regulation of the *pem* and *surE* genes required for stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**, 3513–3520.
- 11 Visick JE, Ichikawa JK & Clarke S (1998) Mutations in the *Escherichia coli surE* gene increase isoaspartyl accumulation in a strain lacking the *pem* repair methyltransferase but suppress stress-survival phenotypes. *FEMS Microbiol Lett* **167**, 19–25.
- 12 Riehle MM, Bennett AF & Long AD (2001) Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 525–530.

- 13 Proudfoot M, Kuznetsova E, Brown G, Rao NN, Kitagawa M, Mori H, Savchenko A & Yakunin AF (2004) General enzymatic screens identify three new nucleotidases in *Escherichia coli*. Biochemical characterization of SurE, YfbR, and YjjG. *J Biol Chem* **279**, 54687–54694.
- 14 Reichard P (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**, 349–374.
- 15 Galperin MY, Moroz OV, Wilson KS & Murzin AG (2006) House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol* **59**, 5–19.
- 16 Gonçalves AMD, Rêgo AT, Thomaz M, Enguita FJ & Carrondo MA (2008) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of two crystal forms of stationary-phase survival E protein from *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**, 213–216.
- 17 Lee JY, Kwak JE, Moon J, Eom SH, Liong EC, Pedelacq JD, Berendzen J & Suh SW (2001) Crystal structure and functional analysis of the SurE protein identify a novel phosphatase family. *Nat Struct Biol* **8**, 789–794.
- 18 Zhang RG, Skarina T, Katz JE, Beasley S, Khachatryan A, Vyas S, Arrowsmith CH, Clarke S, Edwards A & Joachimiak A (2001) Structure of *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: a novel acid phosphatase. *Structure* **9**, 1095–1106.
- 19 Iwasaki W & Miki K (2007) Crystal structure of the stationary phase survival protein SurE with metal ion and AMP. *J Mol Biol* **371**, 123–136.
- 20 Pappachan A, Savithri HS & Murthy MRN (2008) Structural and functional studies on a mesophilic stationary phase survival protein (SurE) from *Salmonella typhimurium*. *FEBS J* **275**, 5855–5864.
- 21 Azzoni AR, Tada SF, Rosselli LK, Paula DP, Catani CF, Sabino AA, Barbosa JA, Guimarães BG, Eberlin MN, Medrano FJ et al. (2004) Expression and purification of a small heat shock protein from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* **33**, 297–303.
- 22 Catani CF, Azzoni AR, Paula DP, Tada SF, Rosselli LK, de Souza AP & Yano T (2004) Cloning, expression, and purification of the virulence-associated protein D from *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* **37**, 320–326.
- 23 Paula DP, Azzoni AR, Siqueira SF, Catani CF, Rosselli LK & de Souza AP (2003) Expression and purification of a putative H-NS nucleoid-associated protein from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* **32**, 61–67.
- 24 Rosselli LK, Oliveira CL, Azzoni AR, Tada SF, Catani CF, Saraiva AM, Soares JS, Medrano FJ, Torriani IL & Souza AP (2006) A new member of the aldo-keto reductase family from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Arch Biochem Biophys* **453**, 143–150.
- 25 Gounaris K, Selkirk ME & Sadeghi SJ (2004) A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol* **136**, 257–264.
- 26 Itoh R, Usami C, Nishino T & Tsushima K (1978) Kinetic properties of cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver. *Biochim Biophys Acta* **526**, 154–162.
- 27 Bretonnet AS, Jordheim LP, Dumontet C & Lancelin JM (2005) Regulation and activity of cytosolic 5'-nucleotidase II. A bifunctional allosteric enzyme of the haloacid dehalogenase superfamily involved in cellular metabolism. *FEBS Lett* **579**, 3363–3368.
- 28 Spychala J, Madrid-Marina V & Fox IH (1988) High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. *J Biol Chem* **263**, 18759–18765.
- 29 Walldén K, Stenmark P, Nyman T, Flodin S, Gräslund S, Loppnau P, Bianchi V & Nordlund P (2007) Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. *J Biol Chem* **282**, 17828–17836.
- 30 Putnam CD, Hammel M, Hura GL & Tainer JA (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* **40**, 191–285.
- 31 Svergun D, Barberato C & Koch MHJ (1995) CRY-SOL – a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* **28**, 768–773.
- 32 Svergun D (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* **76**, 2879–2886.
- 33 Goodsell DS & Olson AJ (2000) Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 105–153.
- 34 Liang JY, Zhang Y, Huang S & Lipscomb WN (1993) Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2132–2136.
- 35 Monod J, Wyman J & Changeux JP (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**, 88–118.
- 36 Whitmore L & Wallace BA (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668–W673.
- 37 Whitmore L, Janes RW & Wallace BA (2006) Protein Circular Dichroism Data Bank (PCDDb): data bank and website design. *Chirality* **18**, 426–429.
- 38 Whitmore L & Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400.
- 39 Geladopoulos TP, Sotiropoulos TG & Evangelopoulos AE (1991) A malachite green colorimetric assay for

- protein phosphatase activity. *Anal Biochem* **192**, 112–116.
- 40 Hammersley AP, Svensson SO, Hanfland M, Fitch AN & Häusermann D (1996) Two-dimensional detector software: from real detector to idealised image or two-theta scan. *High Press Res* **14**, 235–248.
 - 41 Glatter O & Kratky O (1982) *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press Inc. (London) Ltd., London.
 - 42 Svergun D (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* **25**, 495–503.
 - 43 Semisotnov GV, Kihara H, Kotova NV, Kimura K, Amemiya Y, Wakabayashi K, Serdyuk IN, Timchenko AA, Chiba K, Nikaido K et al. (1996) Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* **262**, 559–574.
 - 44 Doniach S (2001) Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering. *Chem Rev* **101**, 1763–1778.
 - 45 Mylonas E & Svergun DI (2007) Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. *J Appl Crystallogr* **40**, s245–s249.
 - 46 Volkov VV & Svergun D (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* **36**, 860–864.
 - 47 CCP4 (2002) High-throughput structure determination. Proceedings of the 2002 CCP4 (Collaborative Computational Project in Macromolecular Crystallography) Study Weekend. January, 2002. York, United Kingdom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1897–1970.
 - 48 Kozin MB & Svergun D (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Crystallogr* **34**, 33–41.
 - 49 Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R et al. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **21**, 2947–2948.
 - 50 Nicholas HB, Nicholas KB Jr & Deerfield DW (1997) Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW NEWS* **4**, 14.
 - 51 McGuffin LJ, Bryson K & Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405.

Supporting information

The following supplementary material is available:

Fig. S1. Stereoview defining the dihedral angle.

Fig. S2. The parameter χ as a function of the translation and rotation movements.

This supplementary material can be found in the online version of this article.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

9.2. Artigo II

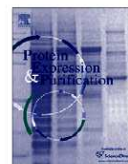
Characterization of an oxidative stress response regulator, homologous to *Escherichia coli* OxyR, from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*

M.A.S. Toledo ^a, D.R. Schneider ^a, A.R. Azzoni ^a, M.T.P. Favaro ^a, A.C. Pelloso ^a,
C.A. Santos ^a, A.M. Saraiva ^a, A.P. Souza ^{b,*}

a - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

b - Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

Publicado na revista Protein Expression and Purification 2011, Feb;75(2):204-10.
Epub 2010 Oct 14.



Characterization of an oxidative stress response regulator, homologous to *Escherichia coli* OxyR, from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*

M.A.S. Toledo^a, D.R. Schneider^a, A.R. Azzoni^a, M.T.P. Favaro^a, A.C. Pelloso^a, C.A. Santos^a, A.M. Saraiva^a, A.P. Souza^{b,*}

^a Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

^b Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2010

and in revised form 7 October 2010

Available online 14 October 2010

Keywords:

Xylella fastidiosa

OxyR

Recombinant protein

Oxidative stress

Functional complementation

ABSTRACT

The OxyR oxidative stress transcriptional regulator is a DNA-binding protein that belongs to the LysR-type transcriptional regulators (LTTR) family. It has the ability to sense oxidative species inside the cell and to trigger the cell's response, activating the transcription of genes involved in scavenging oxidative species. In the present study, we have overexpressed, purified and characterized the predicted OxyR homologue (*orfxf1273*) of the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. This bacterium is the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC) disease caused by the 9a5c strain, resulting in economic and social losses. The secondary structure of the recombinant protein was analyzed by circular dichroism. Gel filtration showed that XfoxyR is a dimer in solution. Gel shift assays indicated that it does bind to its own predicted promoter under *in vitro* conditions. However, considering our control experiment we cannot state that this interaction occurs *in vivo*. Functional complementation assays indicated that *xfoxyR* is able to restore the oxidative stress response in an *oxyR* knockout *Escherichia coli* strain. These results show that the predicted *orfxf1273* codes for a transcriptional regulator, homologous to *E. coli* OxyR, involved in the oxidative stress response. This may be important for *X. fastidiosa* to overcome the defense mechanisms of its host during the infection and colonization processes.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Oxidative stress plays an important role in the plant defense system against phytopathogens invasion and colonization [1]. Reactive oxygen species (ROS) (H_2O_2 , organic peroxides, and superoxide anions) are generated by the metabolism of the plant cell in response to microbial infection. The ROS are capable of oxidizing many cellular components including DNA, lipid membranes and proteins resulting in cell damage [1–3]. These ROS are also generated by normal aerobic metabolism [4]. Therefore, for a phytopathogen, the ability to remove these ROS could be advantageous, allowing it to avoid the harmful effects of its hosts so called oxidative burst defense mechanism [2,5].

In *Escherichia coli*, the role and mechanism of action of the OxyR transcriptional regulator has been well-characterized [6–8]. This transcription regulation factor belongs to the family of LysR-type transcriptional regulators (LTTRs), the largest known family of prokaryotic DNA-binding proteins [9], and has the capacity to sense low amounts of intracellular hydrogen peroxide [10]. Proteins from

this family have a highly conserved N-terminal DNA binding domain and a C-terminal regulatory domain that has a cleft for the association of a co-inducer molecule. This association with the co-factor is necessary for the transcription activity of the molecule which is activated by a structural change in the protein. The structural change affects its oligomerization and activity toward the promoter of the regulated gene [11]. Many classes of molecules can act as co-inducers including aminoacids, ions, carbohydrates and lipids. The co-inducers are normally involved in or are intermediate products in the pathway regulated by the LTTR [9]. Exposing the *E. coli* OxyR to oxidative stress leads to the formation of an intra molecular disulfide bond between cysteine residues in positions 199 and 208 and in this case, the covalent modification acts as the co-inducer molecule [8]. Data from the crystal structure of *E. coli* OxyR revealed that this covalent bond causes a large structural change in the regulatory C-terminal domain of the molecule [12]. The change is also implicated in the oligomerization of dimers bound to the promoter sequence leading to the transcriptional activation or repression of the regulated gene [12]. It was also shown that OxyR functions when bound to the DNA molecule as a dimer of dimers [13]. The oxidized form of *E. coli* OxyR acts as a positive transcriptional regulator acting on the expression of at least nine hydrogen peroxide-inducible genes including catalase (*katG*), glutathione reductase (*gor*), glutaredoxin (*grxA*), alkyl

* Corresponding author. Address: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. Fax: +55 19 3521 1089.

E-mail address: anete@unicamp.br (A.P. Souza).

hydroperoxide reductase (*ahpCF*), a regulatory RNA (*oxyS*), ferric uptake regulation (*fur*) and a nonspecific DNA-binding protein (*dps*) [14–17]. There is also a negative feedback loop described for the LTTRs family [9] in which the binding of the dimeric protein to its own promoter in a co-inducer independent way blocks its transcription. This feedback loop may be involved in the regulation of a divergently transcribed gene, which occurs simultaneously with the *oxyR* gene repression. In *E. coli*, the *oxyR* lacks this divergent regulation mechanism but still shows negative auto-regulation [11].

In the present work, the predicted homologue of the OxyR transcriptional regulator in the phytopathogen *Xylella fastidiosa* was biochemically and functionally characterized. *X. fastidiosa* is a Gram-negative, xylem limited phytopathogen, responsible for many diseases in economically relevant crops (citrus variegated chlorosis in citrus, Pierce's disease in grape, "phony peach" in peaches among others) [18–21]. The *orfxf1273* (936 bp, 311 aminoacids, pI 6.42) predicted to be an OxyR homologue in the *X. fastidiosa* Comparative Genome Database (<www.xylella.lncc.br>), was cloned and the protein it encodes was expressed and purified. We demonstrate that the predicted *X. fastidiosa* OxyR is able to functionally complement an OxyR knockout *E. coli* strain and despite the observed interaction with its own promoter under *in vitro* conditions, we cannot assure that this interaction occurs *in vivo* and that the predicted *xfoxyR* promoter is functional. This report, in addition to describing and providing information about another LTTR protein, contributes to an initial understanding of the bacterial resistance mechanism based on scavenging reactive oxygen species generated by its host defense system.

Methods

Alignment of *xfoxyR* with *E. coli* and *X. campestris* homologues

Sequences were obtained from the NCBI data bank (<www.ncbi.nlm.nih.gov>) and aligned using ClustalW2 (<<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>>).

Cloning of *xfoxyR* in expression vectors

The *xfoxyR* *orf* was amplified with specific primers containing endonuclease restriction sites (forward with the *Bam*HI site, 5'-AAGGATCCATGAACCTGCGTGACTT-3' and reverse with the *Eco*RI site, 5'-GGAATTCCTACCGACCTTTGTACAGCA-3') for specific insertion of the DNA fragment into the expression vector. The amplified product was purified (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and cloned in pET28 (Novagen, Madison, WI, USA). The insertion of the desired *orf* in the expression vectors was verified by PCR using specific primers and flanking primers (T7 promoter and terminator). The positive clones were sequenced using the same set of primers.

Expression and extraction of recombinant XfOxyR_{6His-tag} in *E. coli*

Plasmids containing *xfoxyR* were transformed into BL21(DE3) *E. coli* expression strain. Positive clones were incubated overnight in LB media with 30 µg ml⁻¹ of kanamycin at 37 °C, 300 rpm. They were then transferred to 1 L LB media with the same antibiotic concentration. Expression, extraction and purification steps were performed based on the literature for the *Xanthomonas campestris* *phaeoli* [22] and *E. coli* OxyR [23]. When cultures reached an O.D. of 0.6–0.8 at 600 nm, protein expression was induced by adding 5.6 mM lactose to the media and further incubation at 28 °C, 200 rpm for 4 h. Cells were harvested by centrifugation at 3000g for 15 min at 4 °C and used for protein extraction. Initial extraction

was performed using buffer containing Tris 20 mM pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) 1 mg/ml lysozyme, 0.1 mM EDTA. Cell suspensions were incubated on ice for 30 min on ice following cell lysis by sonication. Soluble protein fractions were recovered by centrifugation at 27,000g for 40 min at 4 °C. Purification of XfOxyR_{6His-tag} was performed by a single step affinity chromatography using Ni-NTA column (Qiagen, Hilden, Germany). The presence of the desired protein in the soluble fraction was analyzed by SDS-PAGE.

Circular dichroism measurements

Circular dichroism (CD) spectra of the purified XfOxyR_{6His-tag} protein were measured using a Jasco J-810 Spectropolarimeter dichrograph (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The far-UV CD spectra were generated at 20 °C using XfOxyR_{6His-tag} protein at 13.6 µM in 10 mM sodium phosphate buffer pH 8.0. The assays were carried out using a quartz cuvette with a 2 mm path length. Ten accumulations within the 260–185 nm range at a rate of 50 nm/min at were recorded. Deconvolution and statistical analysis of the CD spectra were performed using the Dichroweb server [24–26].

Size exclusion chromatography

To assess the oligomeric state of purified XfOxyR_{6His-tag}, size exclusion chromatography was performed using a Superdex 200 HR10/30 prepac column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). After equilibration of the column with buffer containing 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 200 mM imidazole, the sample (250 µL) was loaded at a flow rate of 0.75 mL/min. The calibration curve was prepared using thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa), ovalbumin (43 kDa), and ribonuclease A (13.7 kDa) (GE Healthcare) as molecular weight standards.

Electrophoretic mobility shift assay

For the DNA–protein interaction analysis, the 104 bp region upstream of the *xfoxyR* gene start codon, corresponding to its promoter, was cloned into the pGEM-T Easy vector (Novagen, Madison, WI, USA) using specific primers (forward: 5'-TGAGCCCAATGCAGTACAGCGGTTTA-3', reverse: 5'-CATAAAGCCAAACCTCGCGGCAAG-3'). As a control, we amplified and cloned into the pGEM-T Easy vector the final 162 bp fragment from the *xf1272* *orf*, localized upstream of the *xfoxyR* promoter (forward: 5'-GTGTTCTGCTGCTGGTGATGCA-3', reverse: 5'-TCACGCTGCCTGTGCTGAGC-3'). The cloned fragments were amplified, purified (by standard ethanol precipitation and with GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and used in shift assays. We used 100 ng of the DNA fragment in each shift reaction, 10 mM MgCl₂, 100 mM DTT (only for reduced conditions) and a gradient of purified XfOxyR_{6His-tag} in a final volume of 40 µL (to reach this final volume XfOxyR_{6His-tag} extraction buffer was used). Shift reactions with 50, 100 and 150 mM NaCl were also tested (data not shown). Different DNA:protein molar ratios were used (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:12, 1:16 and 1:20). Due to the protein's instability XfOxyR_{6His-tag} was used in shift reactions immediately after purification by affinity chromatography without a further dialysis step. Reactions were incubated at room temperature for 45 min. Before loading onto the gel, 8.7% glycerol was added to the reaction. The DNA–protein interaction was analyzed in 1% agarose gels run in TAE buffer (40 mM Tris–acetate, 1 mM EDTA). Densitometry analysis was performed with Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS).

Functional complementation assay

To analyze the ability of the *xfoxyR* gene product to act as an oxidative stress regulator we performed a functional complementation assay using an *oxyR* mutant *E. coli* strain (GS047 – MC4100 $\Delta oxyR::kan$), kindly provided by Dr. Gisela Storz. The *xfoxyR* *orf* was cloned into pGEM-T Easy vector (Novagen) and the construct was transformed into *E. coli* $\Delta oxyR$ mutant strain and into a wild type strain. The clones obtained were analyzed by PCR using specific primers for *xfoxyR* listed above. The response of transformed cells to oxidative stress was analyzed by the hydrogen peroxide diffusion disc method [27]. Cells were grown overnight and plated (200 μ L) in LB medium supplemented with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside). A 5 mm diameter Whatman disc with 10 μ L hydrogen peroxide (3.5%) was then put on the plates which were incubated overnight at 37 °C. The growth inhibition zones were measured and compared with those obtained for the wild type strain and control clones (harboring the pGEM-T Easy vector only). Experiments were performed in triplicate and the collected data was analyzed by Student's *t*-test.

Results and discussion

Alignment of XfOxyR with homologues

Alignment of the *X. fastidiosa*, *E. coli* and *Xanthomonas campestris* *pv. campestris* OxyR amino acid sequences (Fig. 1) showed a high degree of conservation (81% identity between *X. fastidiosa* and *X. campestris* and 47% identity between *X. fastidiosa* and *E. coli*). The N-terminal sequences (generally the first 90 amino acids) presented more identities in agreement with the fact that among LTTRs the DNA binding domain is highly conserved [11]. Another interesting feature observed is the conservation of the redox switch composed of two cysteines in all sequences (located in positions 199 and 208 in the *E. coli* OxyR sequence). Prediction of secondary structure for XfOxyR using the PSIPRED server [28] also showed, for the N-terminal domain, a helix–turn–helix (HTH) pattern composed of three α -helices followed by two β -sheets which matches a LTTR DNA binding domain (data not shown).

Expression and extraction of recombinant

XfOxyR_{6His-tag} in *E. coli*

The *xfoxyR* gene was successfully cloned in the expression vector. The positive clones were sequenced and no alteration in the DNA sequence was found. XfOxyR_{6His-tag} was successfully expressed and purified according to the described methodology. The purity of the protein was assessed by 12% SDS–PAGE (Fig. 2).

The recombinant XfOxyR_{6His-tag} was obtained at a satisfactory purity level and concentration (~1 mg/ml).

XfOxyR_{6His-tag} initial characterization

The secondary structure of the purified protein was assessed by CD and a signal indicating the presence of α -helices and β -sheets was obtained (Fig. 2) showing that the protein has a secondary fold and could be used for further experiments. The oligomeric state of most LysR family proteins is a dimer, however, gel filtration and sedimentation experiments showed that *E. coli* OxyR is a tetramer in solution [13] although a dimeric state was also described [27]. Size exclusion chromatography showed that XfOxyR_{6His-tag} is a dimer in solution right after elution from affinity chromatography. The predicted molecular weight for the recombinant protein is 38.64 kDa and we obtained an elution peak corresponding to a protein with 60.48 kDa which is close to the expected dimer molecular weight (Fig. 3). The purified sample showed a small fraction of protein aggregates that were almost completely removed when the sample was incubated with 50 mM DTT for 30 min. We also observed that increasing protein concentration leads to its aggregation and precipitation even under reducing conditions.

This behavior may be explained by the nature of the protein itself. Each molecule has four cysteines, two of them are in a conserved position (Cys199 and Cys208 that compose the redox switch in *E. coli* OxyR) forming the so called oxi-redox switch of the protein. Under oxidizing conditions and high protein concentration (*in vitro* conditions) the oxidation of the cysteines is favored and so is the oligomerization of molecules. This oligomerization process may be favored by the C-terminal domain of the molecule, involved in the formation of dimers and tetramers when bound to DNA [11]. This domain, under *in vitro* conditions, may favor non-specific oligomerization leading to aggregation. This also may explain the short stability period of the purified protein *in vitro* that tends to aggregate quickly (around 30 min at room temperature when at a concentration higher than 1 mg/ml) and the fact that addition of a reducing agent (DTT or β -mercaptoethanol) delays this process.

XfOxyR_{6His-tag} does not interact with its own predicted promoter

We looked for the ability of the purified XfOxyR_{6His-tag} to interact with its own promoter using an electrophoretic mobility shift assay. Interaction of XfOxyR_{6His-tag} with the 104 bp DNA fragment between the *xfoxyR* start codon and the previous *orf* (*xf1272*) was observed under reducing and non-reducing conditions (Fig. 5). The DNA fragment harbored the TATA box site and the predicted LysR type recognition sequences (a degenerated false palindrome, T-N₁₁-A). With similar methodologies used to show the interaction of *Legionella pneumophylla* OxyR ortholog with *ahpC2*

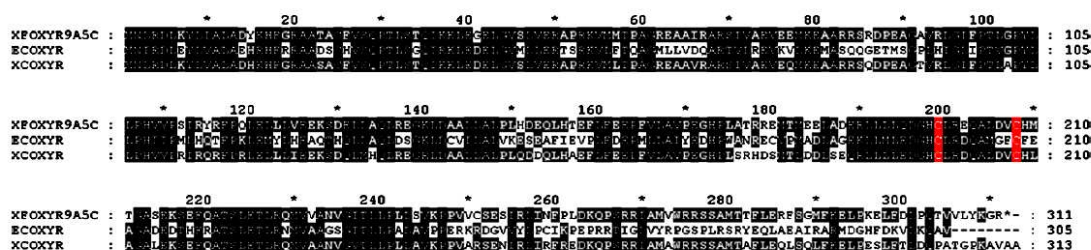


Fig. 1. ClustalW2 alignment of OxyR sequences from *X. fastidiosa* strain 9a5c (XFOXYR9A5C), *Escherichia coli* (ECOXYR), *Xanthomonas campestris* (XCOXYR). Regions conserved in the three sequences (black) and regions conserved only in two sequences (gray) are highlighted. Greater similarity between *X. fastidiosa* and *X. campestris* OxyR sequences can be observed. The oxi-redox switch, composed of two cysteines is indicated in red in all three sequences.

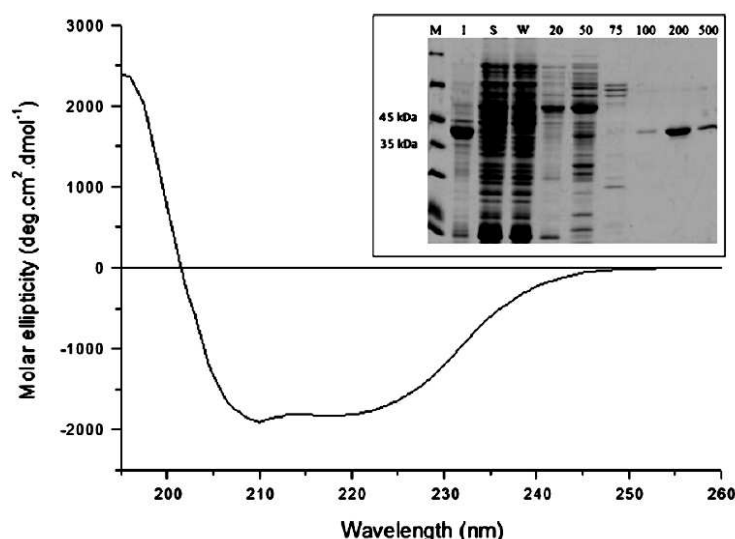


Fig. 2. Circular dichroism curve obtained for purified XfOxyR_{6His-tag} in 10 mM sodium phosphate buffer pH 8.0. In detail, 12% SDS–PAGE. Purification of XfOxyR_{6His-tag}: M, fermentas unstained protein molecular weight marker; I, insoluble fraction; S, soluble fraction; W, wash fraction. 20–500: elution steps with 20–500 mM imidazole. XfOxyR_{6His-tag} predicted weight: 38,64 kDa.

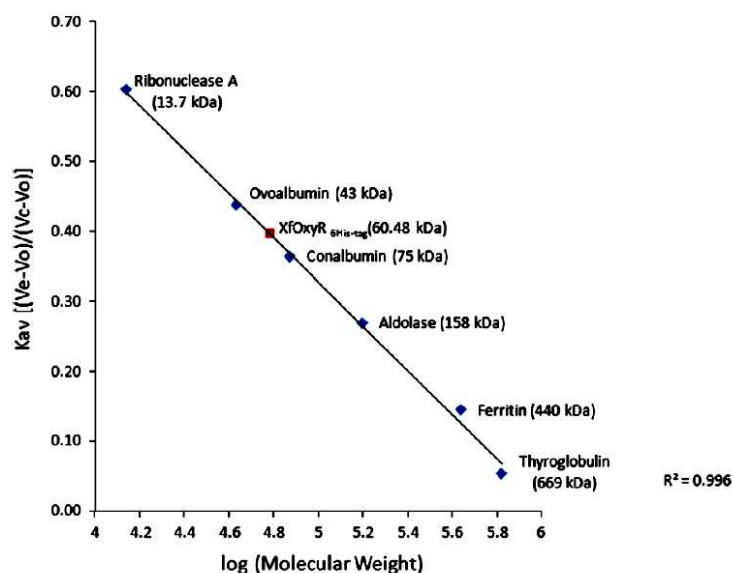


Fig. 3. Size exclusion chromatography calibration curve for XfOxyR_{6His-tag}. The estimated molecular mass for XfOxyR_{6His-tag} is indicated in the trend line as a red square. Estimated molecular weight for the XfOxyR_{6His-tag} dimer: 60.48 kDa. Monomer molecular weight: 38.64 kDa. Expected dimer molecular weight: 77.28.

promoter [29], we were able to show that XfOxyR_{6His-tag} interacts *in vitro* with its own promoter in both, oxidized and reduced form but with different affinities in each case. As a control DNA fragment we used the last 162 bp from the previous *orf* (*xf1272*). Because it is a coding region, we expected no interaction between purified XfOxyR_{6His-tag} and the control fragment. We performed the same DNA:protein molar ratio gradient (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:12, 1:16 and 1:20) with the *xfoxyR* promoter and the control fragment

under reducing and oxidizing conditions to analyze its interaction with the purified protein and the affinities involved in each case. Interaction was observed with both fragments (the *xfoxyR* promoter and the control fragment) under reducing and non-reducing conditions. Shifted bands were observed from 1:2 to 1:20 DNA:protein molar ratios. The interaction of XfOxyR with the control fragment showed shifted bands with less intensity and lower shift compared to those seen with the *xfoxyR* promoter at the same

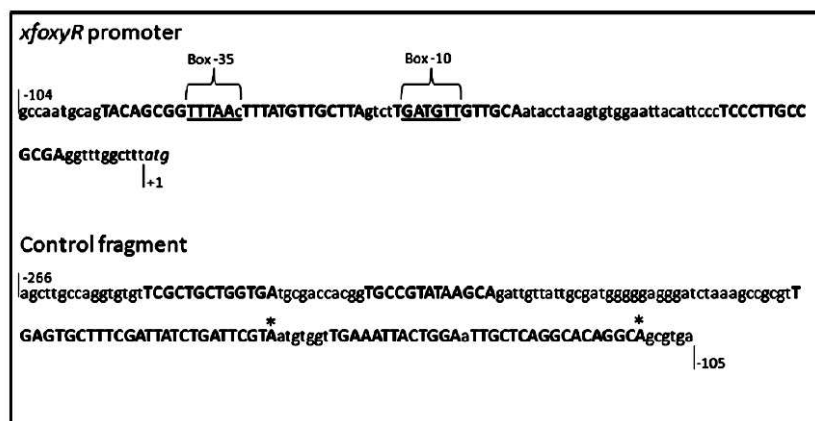


Fig. 4. Diagram showing the DNA fragments used in shift assays. The predicted Box-10 and Box-35 for *xfoxyR* promoter are indicated. +1 indicates the beginning of *xfoxyR* coding region. In both fragments LTTR predicted binding site (T-N₁₁-A) are indicated in uppercase letters. * Indicates that two or more binding sites are overlapped.

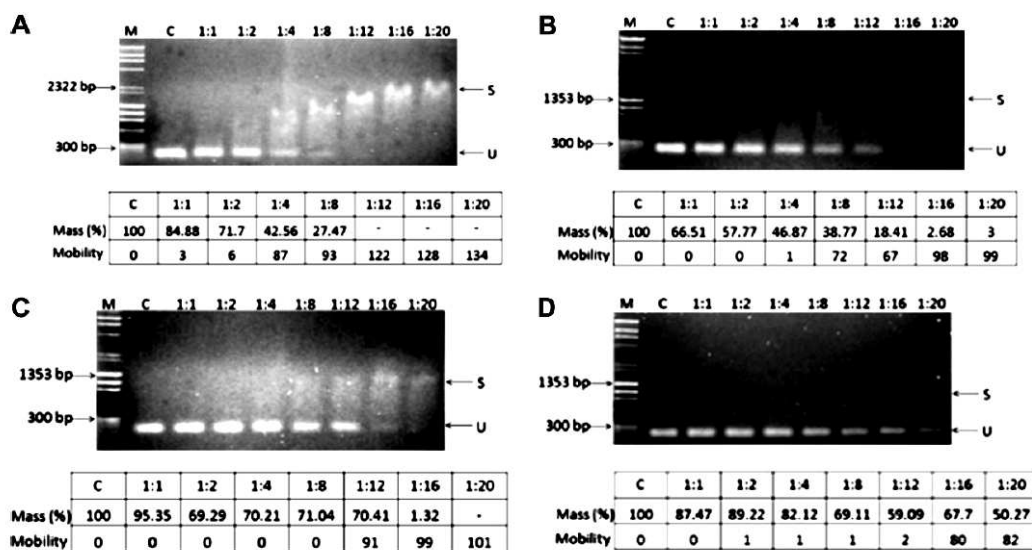


Fig. 5. Interaction of XfoxyR_{6His-tag} with its own predicted promoter and control fragment (coding region from previous *orf xfl272*). Reducing and non-reducing conditions were tested in a DNA:protein molar ratio gradient. (A) *xfoxyR* promoter with reduced XfoxyR_{6His-tag}. (B) control fragment with reduced XfoxyR_{6His-tag}. (C) *xfoxyR* promoter with non-reduced XfoxyR_{6His-tag}. (D) control fragment with non-reduced XfoxyR_{6His-tag}. (C) control reaction with DNA fragment and no protein. 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:12, 1:16 and 1:20: gradient of DNA:protein molar ratio. Shift bands (S) and unbound DNA fragment (U) are indicated. M: Molecular Weight Marker λ/ϕ x. Densitometry analysis is shown below each respective gel. Mass (%) indicates the decrease in mass of the unbound fragment (in percentage). Mobility indicates the relative shift observed for the shifted bands with highest molecular weight in comparison with the unbound fragment (unbound fragment = 0 mobility).

molar ratio, indicating a lower affinity interaction for the control fragment. As mentioned, this fragment was chosen as a control for being a coding region. However, the binding site described for LysR family proteins is a pseudo-palindrome, T-N₁₁-A, that is often found to form part of an imperfect, dyadic region and such sequences were found in the *xfoxyR* promoter and in the control fragment as well. Indeed, more T-N₁₁-A sequences were found in the control fragment than in the *xfoxyR* promoter (Fig. 4). Initially, for *E. coli* OxyR it was found that it recognizes seemingly dissimilar sequences by using a multidegenerate recognition code [27], but in a more recent work [30] it was described a consensus binding site

composed of ATAGnt elements spaced at 10 bp intervals. It was also reported a similar binding site for the of *X. campestris* *pv. phaseoli* OxyR in the *ahpC-oxoR* operon promoter (22). However, by sequence analysis such sequences could not be found in the *xfoxyR* promoter or in the control fragment. Another consideration to be made is the described operon organization of the *X. campestris* *pv. phaseoli* *oxyR* *orf*, which lies organized in a head-to-tail fashion with the *ahpF* and *ahpC* *orfs* coding for a 57 kDa flavoprotein and a 22 kDa protein respectively and both are transcriptionally regulated by OxyR. Together, they form a alkyl hydroperoxide reductase (AhpR), an enzyme responsible for the reduction of

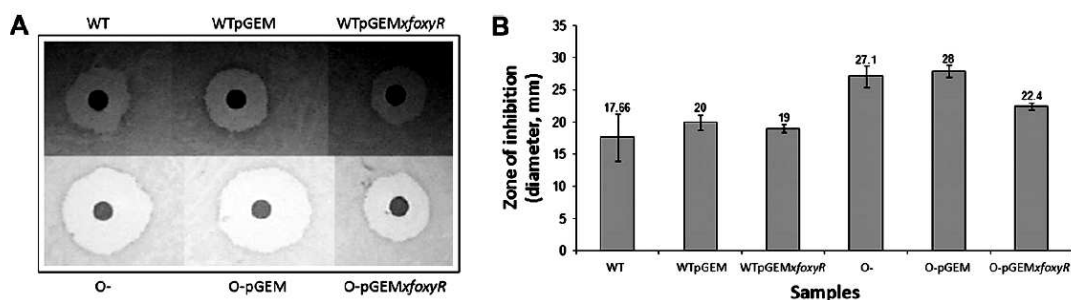


Fig. 6. H₂O₂ disk diffusion assay. (A) Photos showing the zones of growth inhibition by H₂O₂. (B) Histogram showing the results of the H₂O₂ growth inhibition assay. WT: *E. coli* MC4100 strain. WTpGEM: *E. coli* MC4100 strain transformed with pGEM-T Easy vector. WTpGEM *xfoxyR*: *E. coli* MC4100 strain complemented with *xfoxyR* cloned into the pGEM-T vector. O-: GS047 MC4100ΔoxyR::kan knockout strain. O-pGEM: GS047 MC4100ΔoxyR::kan knockout strain transformed with pGEM-T Easy vector. O-pGEM *xfoxyR*: GS047 MC4100ΔoxyR::kan knockout strain complemented with *xfoxyR* cloned into the pGEM-T vector. The recovery of H₂O₂ resistance can be shown by the fact that no statistically significant difference could be noted between wild type strain harboring only the pGEM vector (WT pGEM) and the knockout strain complemented with the *xfoxyR* gene: O-pGEM *xfoxyR* ($P = 0.124$).

organic peroxide to the corresponding alcohols. The *ahpC* *orf* is monocistronic while the *oxyR* and *ahpF* are transcribed together in the *ahpF*-*oxyR* operon. This unusual genome organization of the OxyR protein is highly conserved in *Xanthomonas* spp [31]. Therefore, gel shift assays performed with *X. fastidiosa* OxyR and its predicted promoter show that they interact under the *in vitro* conditions tested. However, we cannot state that this interaction occurs *in vivo* considering the facts that only LTTRs binding motifs were found in the *xfoxyR* promoter sequence and they were also found in the control fragment, which may have caused the observed shifted bands. No OxyR binding motifs similar to those described for *E. coli* or *X. campestris* were found in both fragments. Finally, the *xfoxyR* *orf* is in a similar genome organization compared to *X. campestris* *oxyR* with the *orfs* Xf1271 and Xf1272 coding for AhpF and AhpC respectively while the Xf1273 *orf* corresponds to *xfoxyR*. Considering the phylogenetic proximity of both species (*X. fastidiosa* and *X. campestris* that are enclosed in the *Xanthomonadales* group) [32] and the similarity shown in their OxyR protein sequence (see Fig. 1) we can consider that the operon organization of *oxyR* *orf* observed for *X. campestris* could also be present in *X. fastidiosa*. In this scenario, *xfoxyR* would be transcriptionally regulated by the promoter region upstream the *orf* Xf1272 (that codes for AhpF). For this characterization, further experiments involving shift assays, DNA footprinting experiments with *X. fastidiosa* *ahpC* and *ahpF* promoter regions would lead to a best understanding and characterization of the genome organization of *xfoxyR* as well as its transcriptional regulation and DNA recognition mechanism by the encoded protein.

XfOxyR acts as a transcriptional regulator *in vivo* activating the oxidative stress response

Once we confirmed that *XfOxyR* acts as a DNA-binding protein under the *in vitro* conditions tested, we looked for its role as an oxidative stress response regulator *in vivo*. The *xfoxyR* *orf* cloned into pGEM-T Easy vector (Novagen) was used to transform an *oxyR* defective *E. coli* strain (GS047 – MC4100 ΔoxyR::kan). Functional complementation was observed using the H₂O₂ diffusion disc assay (Fig. 6). Comparison of the growth inhibition zones allowed us to conclude that the *oxyR* defective strain that received the *xfoxyR* gene cloned into pGEM-T vector was significantly more resistant to hydrogen peroxide killing than the *oxyR*::kan mutant harboring only the pGEM-T vector ($P = 0.0167$). This functional complementation could also be concluded from the fact that no statistically significant difference was found when comparing the wild type strain harboring only the pGEM-T vector and the mutant strain

complemented with the *xfoxyR* ($P = 0.124$). Therefore, OxyR from *X. fastidiosa* does function as an oxidative stress sensor transcriptional regulator, able to functionally complement an OxyR defective *E. coli* strain, probably involved in the transcriptional activation of many genes involved in scavenging oxidative molecules.

Conclusions

Oxidative stress stands as a defense mechanism for plants in response to infection by bacteria. Therefore, for a phytopathogen, it is essential to count on a metabolic pathway capable of scavenging all the reactive oxygen species generated by its host or those originated from its own metabolism as well. We describe here, the characterization of the oxidative stress response transcriptional regulator OxyR from *X. fastidiosa*. This transcriptional regulator has been characterized in many bacteria [6,11,22,23,29] and is shown to be involved in activating the transcription of many genes involved in the oxidative stress response. Based on our results, we show that the *xfoxyR* *orf* (xf1273, according to the *Xylella fastidiosa* Genome DataBase) encodes a 311 aminoacids polypeptide with a secondary structure signal that indicates the presence of α -helices and β -sheets in agreement with *in silico* predictions. Under reducing conditions, the purified *XfOxyR*_{6His-tag} protein appears as a dimer in solution. However, at elevated concentrations in solution and under non-reducing conditions, it tends to aggregate quickly, probably due to nonspecific disulfide bond formation in its C-terminal domain, a domain that is involved in the dimerization process described for *E. coli* OxyR. Shift assays showed that purified *XfOxyR*_{6His-tag} interacts with its own promoter *in vitro*, but it also interacts with an intragenic DNA fragment used as control. This indicates that there is no clear evidence that *XfOxyR*_{6His-tag} interacts with its own promoter that would suggest an auto-regulation mechanism. Considering the genomic organization of the *oxyR* *orf*, described for *X. campestris* and its phylogenetic proximity to *X. fastidiosa*, it may also be possible that *xfoxyR* is transcribed in an operon with the *ahpF* *orf*. Finally, complementation studies revealed that the *xfoxyR* gene is able to restore the oxidative stress response to an OxyR defective *E. coli* mutant strain, indicating that the coded protein indeed acts as an oxidative stress transcriptional regulator. For a phytopathogen like *X. fastidiosa*, a molecular mechanism that senses small amounts of oxidative molecules inside the cell may play an important role during the infection and colonization processes, helping to overcome the host defense system. Considering the biological relevance of this transcriptional factor

to *X. fastidiosa* metabolism and pathogenicity, further studies will uncover the mechanisms that underlie the oxidative stress response that allows this bacterium to infect and colonize successfully their hosts.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil), process 2006/52844-4. We would like to thank the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron and Dr. Gisela Storz (National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), Bethesda, MD) for the *E. coli* knockout strain.

References

- [1] C.J. Baker, E.W. Orlandi, Active oxygen in plant pathogenesis, *Annu. Rev. Phytopathol.* 33 (1995) 299–321.
- [2] A. Levine, R. Tenhaken, R. Dixon, et al., H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response, *Cell* 79 (1994) 583–593.
- [3] C. Lee, S.M. Lee, P. Mukhopadhyay, et al., Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 1179–1185.
- [4] B. Gonzalez-Flecha, B. Dimple, Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 382–388.
- [5] S.B. Farr, T. Kogoma, Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.* 55 (1991) 561–585.
- [6] M.F. Christman, G. Storz, B.N. Ames, OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3484–3488.
- [7] G. Storz, S. Altuvia, OxyR regulon, *Methods Enzymol.* 234 (1994) 217–223.
- [8] I. Kullik, M.B. Toledano, L.A. Tartaglia, et al., Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 1275–1284.
- [9] M.A. Schell, Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators, *Annu. Rev. Microbiol.* 47 (1993) 597–626.
- [10] M. Zheng, F. Aslund, G. Storz, Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science* 279 (1998) 1718–1721.
- [11] S.E. Maddocks, P.C. Oyston, Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins, *Microbiology* 154 (2008) 3609–3623.
- [12] H. Choi, S. Kim, P. Mukhopadhyay, et al., Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor, *Cell* 105 (2001) 103–113.
- [13] I. Kullik, J. Stevens, M.B. Toledano, et al., Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 1285–1291.
- [14] M.F. Christman, R.W. Morgan, F.S. Jacobson, B.N. Ames, et al., Positive control of a regulon for defense against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*, *Cell* 41 (1985) 753–762.
- [15] B. González-Flecha, B. Dimple, Biochemistry of redox signalling in the activation of oxidative stress genes, in: D.L. Gilbert, C.A. Colton (Eds.), *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*, Kluwer/Plenum, New York, 12, 1999, pp. 133–153.
- [16] D.J. Jamieson, G. Storz, Transcriptional regulators of oxidative stress response, in: J.G. Scandalios (eds.), *Oxidative Stress and The Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 16, 1997, pp. 91–1.
- [17] R.W. Morgan, M.F. Christman, F.S. Jacobson, et al., Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8059–8063.
- [18] C.J. Chang, M. Garnier, L. Zreik, et al., Culture and serological detection of the xylem limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*, *Curr. Microbiol.* 27 (1993) 137–142.
- [19] J.S. Hartung, J. Beretta, R.H. Brlansky, et al., Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*, *Phytopathology* 84 (1994) 591–597.
- [20] M.J. Davis, A.H. Purcell, S.V. Thomson, Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium, *Science* 199 (1978) 75–77.
- [21] J.M. Wells, B.C. Raju, G. Nyland, Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony peach disease, *Phytopathology* 73 (1983) 859–862.
- [22] S. Loprasert, M. Fuangthong, W. Whangskul, et al., Molecular and physiological analysis of an OxyR-regulated *ahpC* promoter in *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 1504–1514.
- [23] K. Tao, K. Makino, S. Yonei, et al., Purification and characterization of the *Escherichia coli* OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide-inducible regulon, *J. Biochem. (Tokyo)* 109 (1991) 262–266.
- [24] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W668–W673.
- [25] L. Whitmore, R.W. Janes, B.A. Wallace, Protein Circular Dichroism Data Bank (PCDDb): data bank and website design, *Chirality* 18 (6) (2006) 426–429.
- [26] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* 89 (5) (2008) 392–400.
- [27] L.A. Tartaglia, C.J. Gimeno, G. Storz, B.N. Ames, Multidegenerate DNA recognition by the OxyR transcriptional regulator, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2038–2045.
- [28] K. Bryson, L.J. McGuffin, R.L. Marsden, et al., Protein structure prediction servers at University College London, *Nucl. Acids Res.* 33 (2005) 36–38.
- [29] J.J. LeBlanc, A.K. Brassinga, F. Ewann, et al., An ortholog of OxyR in *Legionella pneumophila* is expressed postexponentially and negatively regulates the alkyl hydroperoxide reductase (*ahpC2D*) operon, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 3444–3455.
- [30] M.B. Toledano, I. Kullik, F. Trinh, et al., Redox-dependent shift of OxyR–DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection, *Cell* 78 (1994) 897–909.
- [31] S. Mongkolsuk, S. Loprasert, W. Whangskul, et al., Characterization of transcription organization and analysis of unique expression patterns of an alkyl hydroperoxide reductase C gene (*ahpC*) and the peroxide regulator operon *ahpF-oxyR-orfX* from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli, *J. Bacteriol.* 179(12) (1997) 3950–3955.
- [32] M.A. Van Sluys, C.B. Monteiro-Vitorello, L.E.A. Camargo, et al., Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria, *Annu. Rev. Phytopathol.* 40 (2002) 169–189.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada **Caracterização de Três Fatores de Transcrição Pertencentes à Família LysR de *Xylella fastidiosa***:

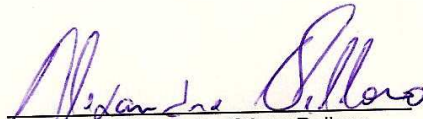
() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

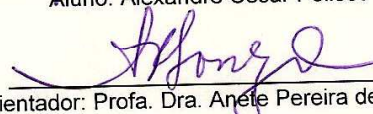
(X) está inserida no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 15/2003), intitulado Determinação de estruturas tridimensionais de proteínas relacionadas à patogenicidade de *Xylella fastidiosa*.

() tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

_____, sob Protocolo(s) nº _____.

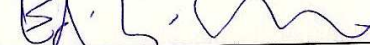
* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.


Aluno: Alexandre César Peloso


Orientador: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Função: Presidente do CIBio/CBMEG

