

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

NAYARA PATRICIA VIEIRA DE LIRA

**“EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ENSAIO DE
ATIVIDADE DOS DOMÍNIOS DUF442 E ETHE1 DA
PROTEÍNA BIh DE *Xylella fastidiosa* E *Agrobacterium
tumefaciens*”**

Campinas - SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

NAYARA PATRICIA VIEIRA DE LIRA

**“EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ENSAIO DE ATIVIDADE DOS
DOMÍNIOS DUF442 E ETHE1 DA PROTEÍNA Blh DE *Xylella*
fastidiosa E *Agrobacterium tumefaciens*”**

Este exemplar corresponde à
redação final da DISSERTAÇÃO
defendida pela candidata

***NAYARA PATRICIA
VIEIRA DE LIRA***

e aprovada pela Comissão
Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Genética e Biologia
Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Dr. Celso Eduardo Benedetti

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L67e Lira, Nayara Patricia Vieira de, 1988-
Expressão, purificação e ensaio de atividade dos domínios DUF442 e ETHE1 da proteína Blh de *Xylella fastidiosa* e *Agrobacterium tumefaciens* / Nayara Patricia Vieira de Lira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dioxigenase de enxofre. 2. Proteína bigR. 3. Proteínas - Purificação. 4. Sulfurtransferases. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expression, purification and activity assay of the DUF442 and ETHE1 of Blh protein of *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*

Palavras-chave em inglês:

Sulfur dioxxygenase

BigR protein

Proteins - Purification

Sulfurtransferases

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Celso Eduardo Benedetti [Orientador]

Andréa Balan Fernandes

Artur Torres Cordeiro

Data de defesa: 21-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 21 de fevereiro de 2014

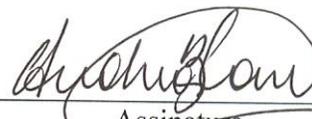
BANCA EXAMINADORA

Dr. Celso Eduardo Benedetti (orientador)



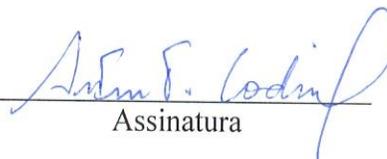
Assinatura

Dra. Andréa Balan Fernandes



Assinatura

Dr. Artur Torres Cordeiro



Assinatura

Dra. Juliana Helena Da Costa Smetana

Assinatura

Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Assinatura

Resumo

Xylella fastidiosa e *Agrobacterium tumefaciens* são bactérias fitopatogênicas que infectam, respectivamente, o interior do xilema e de tecidos vasculares de raiz, ambientes cuja tensão de oxigênio é relativamente baixa. Uma vez que *Xylella* e *Agrobacterium* são bactérias estritamente aeróbicas, elas apresentam o *operon bigR*, responsável pela detoxificação do sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico, um potente inibidor do citocromo c oxidase e respiração aeróbica.

O *operon bigR* codifica cinco proteínas denominadas Blh (Beta-Lactamase-Like hydrolase), BigR (*biofilm growth-associated repressor*), um repressor transcricional e regulador do *operon*, e MP1-3, proteínas que compõem um transportador de membrana.

Em trabalho anterior, foi demonstrado que mutantes de *Agrobacterium* deficientes na produção de Blh acumulavam gás sulfídrico, enquanto mutantes no repressor BigR secretavam mais sulfito, indicando que a proteína Blh converte gás sulfídrico em sulfito e que este, que também é tóxico, seria exportado pelo complexo MP1-3. Além disso, dados de modelagem molecular indicaram que Blh poderia desempenhar funções de sulfotransferase e dioxigenase de enxofre, uma vez que apresenta os domínios DUF442 (rodanase) e ETHE1 (dioxigenase). A fim de testar tais hipóteses, este trabalho teve como principais objetivos a caracterização enzimática dos domínios DUF442 e ETHE1 da Blh de *Xylella* e *Agrobacterium*, como também confirmar interações proteína-proteína entre os componentes do *operon bigR*.

Ensaio de atividade enzimática usando-se proteínas recombinantes purificadas confirmaram a função de dioxigenase de enxofre e de rodanase dos domínios ETHE1 e DUF442, respectivamente. Além disso, verificou-se que ambos os domínios produzem sulfito como produto final da reação, embora atuando em substratos diferentes. Ainda, ensaios de duplo híbrido de levedura mostraram haver inúmeras interações entre as proteínas do *operon bigR*, mas não entre os dois domínios DUF442 e ETHE1 de Blh que, de acordo com os ensaios enzimáticos, atuam de forma independente.

Palavras-chave: dioxigenase de enxofre, *operon bigR*, purificação de proteína, sulfotransferase

Abstract

Xylella fastidiosa and *Agrobacterium tumefaciens* are phytopathogenic bacteria that infect, respectively, the xylem vessels and root vascular tissues, where the oxygen tension is relatively lower. Since *Xylella* and *Agrobacterium* are strict aerobic organisms, they use the *bigR operon* for the detoxification of hydrogen sulfide, a potent inhibitor of cytochrome c oxidase and aerobic respiration.

The *bigR operon* encodes five proteins designated Blh (Beta-lactamase-like hydrolase), BigR (*biofilm growth-associated repressor*), a transcriptional repressor that regulates the *operon*, and MP1-3, proteins that act as a membrane transporter.

In a previous work, it was shown that *Agrobacterium* mutants deficient in Blh production accumulated hydrogen sulfide, whereas BigR-deficient mutants secreted sulfite at higher levels than the wild type bacteria, indicating that Blh converted hydrogen sulfide into sulfite, which would be exported by the MP1-3 complex. In addition, molecular modeling indicated that Blh could function as a sulfur transferase and sulfur dioxygenase, since it carries a DUF442 (rhodanese) and ETHE1 (dioxygenase) domains. To test such hypothesis, this work aimed to demonstrate the enzymatic activities of the DUF442 and ETHE1 domains of Blh from *Xylella* and *Agrobacterium*, as well as to confirm protein-protein interactions between components of the *bigR operon*.

Enzyme activity assays using the purified proteins confirmed the sulfur dioxygenase and rhodanese activities of the ETHE1 and DUF442 domains, respectively. In addition, it was found that both domains produce sulfite as a final product, although having different substrates. Furthermore, yeast two-hybrid assays showed that many of the *bigR operon* proteins interact with each other, suggesting the formation of a protein complex. However, no physical interactions were detected between DUF442 and ETHE1 domains, which, according to the enzyme activity assays, act independently.

Key words: operon bigR, protein purification, sulfur dioxygenase, sulfur transferase

Sumário

1. Revisão Bibliográfica	23
1.1 <i>Xylella fastidiosa</i> : bactéria limitada ao xilema	23
1.2 Operon <i>bigR</i> e sua função na detoxificação de gás sulfídrico.....	25
1.3 A proteína Blh como proteína efetora do operon <i>bigR</i>	31
1.4 A proteína Blh apresenta dois domínios funcionais	32
1.4.1 Provável função e mecanismo de ação do domínio ETHE1 de Blh	32
1.4.2 Atividade de dioxigenase de enxofre.....	33
1.4.3 Provável função e mecanismo de ação do domínio DUF442 de Blh	35
1.4.5 Atividade sulfotransferase ou rodonase	37
2. Objetivos.....	38
2.1. Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. Metodologia	39
3.1. Clonagem dos domínios ETHE1 e DUF442	39
3.2. Testes de expressão dos domínios da BLH	40
3.3. Lise celular bacteriana.....	41
3.4. Purificação dos domínios DUF442 e ETHE1 de <i>X. fastidiosa</i> e <i>A. tumefaciens</i>	42
3.4.1. Cromatografia de afinidade - Fluxo por gravidade.....	42
3.4.2. Cromatografia de afinidade Fluxo por pressão em aparelho FPLC	42
3.4.3. Cromatografia de exclusão molecular da proteína Blh inteira.....	43
3.5. Purificação do domínio XFDUF442 por precipitação em sulfato de amônio.....	43
3.6. Ensaio de atividade do domínio ETHE1 de <i>X. fastidiosa</i> e <i>A. tumefaciens</i>	44
3.7. Ensaio de atividade do domínio DUF442 de <i>X. fastidiosa</i>	45
3.8. Modelagem do domínio ETHE1	45
3.9. Ensaio de fluorescência de raio-x para identificação de metais ligantes.....	46
3.10. Predição de interações proteína-proteína envolvendo a proteína Blh.....	46
3.11. Ensaio de duplo híbrido de levedura	46

3.11.1. Clonagens para análise de interação por duplo-híbrido	46
3.11.2. Transformação de leveduras.....	47
3.11.3. Mini preparação plasmidial de leveduras	48
3.11.4. Teste de autoativação do gene GAL1-HIS3	48
3.11.5. Teste de autoativação do gene repórter GAL7-LacZ.....	49
3.11.6. Ensaio de interação.....	49
4. Resultados.....	50
4.1. Expressão e purificação dos domínios da Blh	50
4.1.1. Domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i> e <i>X. fastidiosa</i>	50
4.1.2. Domínio DUF442 de <i>A. tumefaciens</i> e <i>X. fastidiosa</i>	53
4.1.3. Purificação do domínio DUF442 de <i>X. fastidiosa</i> por precipitação com sulfato de amônio.....	55
4.1.4. Teste de expressão e purificação na presença de metais.....	56
4.1.5. Proteína Blh de <i>X. fastidiosa</i>	57
4.2. Ensaio de atividade dioxigenase de enxofre.....	58
4.2.1. Propriedades cinéticas do domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i>	61
4.3. Ensaio de atividade sulfotransferase	62
4.3.1. Propriedades cinéticas do domínio DUF442 de <i>X. fastidiosa</i>	63
4.3.2. Ensaio de atividade sulfotransferase para o DUF442 de <i>X. fastidiosa</i> na presença de metais.....	64
4.4. Modelagem do domínio ETHE1 de <i>X. fastidiosa</i>	65
4.5. Ensaio de fluorescência de raios-x para identificação de metais ligantes do domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i>	66
4.6. Predições de interação proteína-proteína envolvendo a proteína Blh de <i>X. fastidiosa</i>	68
4.7. Confirmação das interações preditas pelo <i>STRING</i>	68
4.7.1. Teste de autoativação do gene GAL1-HIS3	69
4.7.2. Ensaio de interação	70
5. Discussão	71
5.1. Expressão e Purificação dos domínios ETHE1 e DUF442 de <i>X. fastidiosa</i> e <i>A. tumefaciens</i>	71
5.2. Atividade de dioxigenase de enxofre do domínio ETHE1	72

5.3. Propriedades cinéticas da proteína Blh	73
5.4. A função de detoxificação de gás sulfídrico do <i>operon bigR</i> é dependente da produção e transporte de sulfito.....	73
5.5. Influência de metais na atividade de rodanase	74
5.6. O domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i> liga ferro em sua estrutura	75
5.7. As proteínas do <i>operon bigR</i> interagem entre si para desempenhar a função de detoxificação de gás sulfídrico	75
6. Conclusões	77
7. Perspectivas	77
8. Referências Bibliográficas.....	78
Anexos	83

**Dedico esta dissertação às minhas amadas, mãe e avó, Fátima e
Romilda e ao meu tio querido Beto Vieira**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e as forças dos orixás e mestres espirituais nas quais acredito que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador Celso Benedetti, pela oportunidade de vir à Campinas, primeiro como Bolsista de Verão e em seguida para desenvolver o presente trabalho. Agradeço as sugestões valiosas, a preocupação e atenção dispensada para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha família que, apesar da distância, acompanhou cada passo, cada vitória, cada lágrima. À minha mãe, minha avó, meu tio e irmã que abdicaram da minha presença nos natais, finais de ano e aniversários sem jamais questionar, apenas confortando e mandando forças para seguir em frente.

À Ismaela pela paciência, compreensão, carinho e amor apesar da distância que minhas escolhas provocaram.

À minha família campineira: Mirela, Suelen, Andressa, Matheus, Ju Valente, Ju Viana e Newton, Glória, Nil e família, Rodolfo, Bianca, Tati e Dan, Ana, Wendell e os demais batuqueiros de responsa do Maracatucá, amigos que amo e que são para a vida toda. Amigos irmãos que nos momentos felizes e nos momentos mais difíceis da minha estada aqui estiveram comigo. Agradeço infinitamente o apoio e amizade dessas pessoas lindas com as quais aprendi muito e quero continuar aprendendo.

À Jaqueline Rodrigues, técnica, amiga e companheira de aventuras, de café, de dança, que sabe tudo sobre esse trabalho e todos os seus caminhos, eu agradeço pelo companheirismo e amizade na bancada e fora dela. Levarei essa amizade aqui construída num lugar especial do coração.

À Vanessa Cardoso pelo apoio e conversas em 'nordestinês'.

À Mariana Moraes que me acolheu com todo carinho e dividiu comigo seu lar quando cheguei aqui em Campinas.

À Jaqueline Zanella pelo apoio técnico, conselhos valiosos de pesquisa e de vida.

Aos meus demais colegas de laboratório: Adriana, Bruna, Mariane, Valéria e Caio pela torcida e apoio na bancada.

Ao Artur Hernandez pelo apoio na realização dos experimentos, que foi feito de forma bastante solícita, pela gentileza e coleguismo.

Ao Prof. Dr. Anibal Vercesi pela acolhida em seu laboratório, e ao Dr. Carlos Perez, pelos experimentos de fluorescência de raios-X.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais e mais especificamente ao Laboratório Nacional de Biociências.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Disposição dos genes que compreendem o <i>operon bigR</i> em <i>X. fastidiosa</i> (Xf), <i>A. tumefaciens</i> (At) e outras bactérias associadas a planta/raiz/solo incluindo <i>Sinorhizobium meliloti</i> (Sm), <i>Mesorhizobium loti</i> (Ml), <i>Chromobacterium violaceum</i> (Cv) e <i>Nitrosomonas europaea</i> (Ne).....	26
Figura 2: Alinhamento das sequências de proteínas BigR de diferentes bactérias com proteínas associadas à oxidação de enxofre como SoxR.....	28
Figura 3: Estrutura dimérica do repressor BigR.	29
Figura 4: a) mutantes de <i>A. tumefaciens</i> crescidos no meio BiGGY Agar, indicador de produção de gás sulfídrico, através de precipitado escuro.	30
Figura 5: Em a, mutantes de <i>A. tumefaciens</i> crescendo em meio com concentrações crescentes de tiosulfato que sabidamente produz gás sulfídrico.	31
Figura 6: Esquema representativo dos domínios funcionais da proteína Blh de <i>Xylella</i> e <i>Agrobacterium</i> , DUF442 e ETHE1.....	32
Figura 7: Fórmula geral da reação realizada pela dioxigenase de enxofre.	34
Figura 8: Modelagem molecular do sítio ativo do domínio ETHE1 da Blh de <i>X. fastidiosa</i> com uma glutatona reduzida (GSH) no <i>pocket</i> da enzima	34
Figura 9: O domínio DUF442 é estruturalmente semelhante à rodanases.....	36
Figura 10: Esquema geral da reação realizada pela enzima rodanase..	37
Tabela 1: Cepas transformadas com as construções contendo os domínios DUF442 e ETHE1 com (pET28) e sem (pET29) cauda de histidina (HIS-tag).....	40
Tabela 2: Condições de expressão testadas para cada construção.....	41
Figura 11: Resultado da análise da sequência do domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i> no webserver iPDA : Integrated Protein Disorder Analyzer	50
Figura 12: Sequência do domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i> . Em verde região truncada da sequência. A metionina inicial veio do plasmídeo utilizado.	51
Figura 13: Gel SDS-PAGE 13% com os ensaios de expressão do domínio ETHE1 de <i>X. fastidiosa</i> e <i>A. tumefaciens</i> em meio autoinduzido com lactose à 20°C, 200 rpm por 16h e purificação com Tris-NaCl.....	52
Figura 14: Gel SDS-PAGE 13% com os ensaios de expressão do domínio ETHE1 de <i>X. fastidiosa</i> e <i>A. tumefaciens</i> em meio autoinduzido com lactose à 20°C, 200 rpm por 16h e purificação com Tris-NaCl com sulfato de amônio e glicerol.	53
Figura 16: Gel SDS-PAGE 13% com as etapas de purificação do domínio DUF442 utilizando o protocolo de precipitação com sulfato de amônio em pH 4,7.	56

Figura 17: Gel SDS-PAGE 13% com etapas principais de purificação da proteína Blh inteira expressa em 250 ml de meio ZYM5052 na cepa BLI12(pLysE), induzido com lactose, por 16h, à 20°C E 200rpm.	57
Figura 18: Consumo médio de oxigênio do domínio ETHE1 em relação ao consumo médio dos controles testados.....	58
Figura 19: Atividade da proteína ETHE1 com base no consumo de oxigênio.	59
Figura 20: Curvas de consumo de oxigênio pelo domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i> com diferentes concentrações de substrato.....	60
Figura 21: Detecção de sulfito no meio de reação da ETHE1 após 20min de reação.	61
Tabela 3: Constante de <i>Michaelis-Menten</i> (Km) medida para o domínio ETHE1 de <i>X. fastidiosa</i> comparado aos dados publicados para a dioxigenase de enxofre (SDO) de <i>U. unicinctus</i> ..	62
Figura 22: Gráfico da atividade dioxigenase de enxofre do domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i> em função da concentração de substrato. O gráfico evidencia o comportamento Michaeliano da reação.	62
Figura 23: Tiocianato formado em milimolar por minuto pelo domínio DUF442 (rodanase) medido pela absorbância à 460 nm. Ensaio com 25 µg de proteína parcialmente purificada à 25°C.	63
Tabela 4: Valores de Km para o tiosulfato da proteína rodanase de <i>X. fastidiosa</i> e de bactérias depositadas no banco de dados BRENDA Enzymes	64
Figura 24: Em a, gráfico de atividade sulfotransferase em função da concentração do substrato do domínio DUF442 de <i>X. fastidiosa</i>	64
Figura 25: Efeito de metais na atividade rodanase da proteína Blh de <i>X. fastidiosa</i>	65
Figura 26: Modelagem computacional por homologia do domínio ETHE1 de <i>Xylella fastidiosa</i> utilizando a ferramenta webserver HHpred.....	66
Figura 27: Ensaio de fluorescência de raios-x evidenciando o metal ligado á estrutura do domínio ETHE1 de <i>A. tumefaciens</i>	67
Figura 28: Resultado do STRING utilizando a Blh de <i>X. fastidiosa</i> como modelo e restringindo os resultados para o grau de confiança acima de 700.	68
Tabela 5: Duplos transformantes obtidos dentre as proteínas do <i>operon bigR</i> de <i>X. fastidiosa</i> representados nos quadros cheios	69
Figura 29: Placas com os clones das iscas (pOBD) de interesse resultantes dos teste de autoativação do gene HIS3 após 5 dias de crescimento à 30°C.	70
Figura 30: Ensaio de duplo híbrido de levedura em meio SC +Ade –His com leveduras crescidas à 30°C por 4 dias. Houve interação nas colônias crescidas..	70
Figura 31: Modelo de interação entre as proteínas do <i>operon bigR</i> com base no resultado do duplo híbrido de levedura. Mostrando a produção e secreção do sulfito produzido pelo complexo de proteínas.....	76

Abreviaturas

aa - aminoácido

3AT - 3-amino triazol

Da - daltons

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FPLC - '*Fast Protein Liquid Chromatography*'

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa – quilodaltons

km – constante de Michaelis-Menten

MOPS - Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

O.D. - densidade óptica

pb - pares de base

rpm - rotações por minuto

SDS - sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE - eletroforese em gel de SDS-poliacrlameida

TRIS - tris-(hidroximetil)aminometano

X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D-galctopiranosídeo

1. Introdução

1.1 *Xylella fastidiosa*: bactéria limitada ao xilema

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram-negativa com formato de bastonete que apresenta dimensões de 0,3 a 0,5 µm de diâmetro e 1 a 5 µm de comprimento. É uma bactéria desprovida de flagelos, aeróbica estrita, sistêmica e que não apresenta pigmentos característicos que a diferencie de outras bactérias fitopatogênicas. *X. fastidiosa* apresenta crescimento lento e coloniza o interior dos vasos do xilema de várias plantas hospedeiras, sendo portanto classificada como bactéria limitada ao xilema, cuja sigla em inglês é XLB (xylem-limited bacterium) (Hopkins, 1989).

Pierce, pela primeira vez, associou os sintomas observados em plantas de videira a uma doença e não a fatores ambientais como se pensava até então, uma vez que tais sintomas eram muito semelhantes aos provocados por estresse hídrico e/ou nutricional. A doença ficou conhecida mais tarde como “Mal de Pierce” (Hopkins & Purcel, 2002; Sherald, 2007).

Após sua descoberta, sintomas parecidos ao do “Mal de Pierce” foram relatados em inúmeras outras plantas. Além disso, verificou-se que na maioria dos casos, a transmissão da doença se dava por um inseto vetor, a cigarrinha (Hemiptera: Cicadellidae). A partir de então, o “Mal de Pierce” passou a ser associada a um vírus por não se conseguir isolar o agente etiológico (Davis et al, 1978). Apenas em 1971 a doença foi associada a uma bactéria através dos estudos de Hopkins e Moertensen (1971) que perceberam uma redução dos sintomas após tratamento das plantas com o antibiótico tetraciclina. Na mesma época, levantou-se a hipótese de que os sintomas do “Mal de Pierce”, semelhantes ao de déficit hídrico, eram consequência da oclusão vascular causada pelo crescimento de alguma bactéria (Kuhn, 2006).

A dificuldade em se identificar o agente causal do “Mal de Pierce” veio do fato dessa bactéria ser de difícil cultivo em laboratório e conseqüentemente de difícil isolamento. Por isso, a mesma foi classificada como bactéria “Rickettsia-like” (Hopkins, 1977). Em 1978, Davis e Purcel conseguiram isolar e caracterizar a bactéria causadora do “Mal de Pierce” e a denominaram de *Xylella fastidiosa*.

Além da videira, *X. fastidiosa* infecta diversas outras plantas de interesse econômico como o café, pera, ameixa, amêndoa e citros. No citros, *Xylella* causa a “Clorose Variegada do Citros” (CVC), doença popularmente conhecida como “Amarelinho” (Hopkins, 1989).

A CVC é bastante comum na América do Sul e foi primeiramente identificada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais em meados de 1980 (Hopkins, 1989; Lee et al., 1991). A doença é caracterizada pela clorose nas folhas e frutos mal desenvolvidos, os quais se tornam impróprios para o mercado (Hopkins & Purcel, 2002). Os sintomas da CVC, como os do “Mal de Pierce”, foram também, por muito tempo, confundidos com aqueles provocados por deficiência de nutrientes e água.

A hipótese de que a bactéria estaria afetando a distribuição e/ou transporte de água na planta foi confirmada com estudos evidenciando que a oclusão longitudinal de vasos xilemáticos, causada pela bactéria, era suficiente para provocar estresse hídrico na planta (Hopkins, 1989).

Atualmente, considera-se que a formação do biofilme bacteriano, a dinâmica de agregação das células no interior dos elementos de vasos e sua dispersão e invasão de vasos xilemáticos adjacentes são os principais aspectos da patogenicidade de *X. fastidiosa* (Tarbah e Goodman, 1987; Chatterjee et al., 2008a; Chatterjee et al., 2008b). Contudo, não se sabe ainda se, além do efeito de oclusão dos vasos xilemáticos, *Xylella* secreta substâncias que poderiam ser tóxicas às células da planta, contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas da CVC.

A transmissão de *X. fastidiosa* se dá através de insetos vetores conhecidos como cigarrinhas, que se alimentam do xilema e apresentam aparelho bucal especializado para a sucção da seiva bruta (Hill & Purcell, 1997). Por essa razão, a disseminação da bactéria é muito facilitada tornando-se um dos principais problemas à erradicação da CVC.

A melhoria das técnicas de manejo, que inclui viveiros cobertos e uso de inseticidas trouxe uma tendência de queda da doença nas regiões sul e sudeste do Estado de São Paulo, maior produtor de citros do Brasil. Porém, essa queda está ligada a árvores mais jovens, pois as árvores com mais de 10 anos, as quais ainda compõem

mais de 50% dos pomares no Estado, apresentam a bactéria, e portanto permanecem como fonte de inóculo (Fundecitrus, 2014).

Devido à sua importância como patógeno de culturas como os citros, *X. fastidiosa* foi escolhida como primeiro fitopatógeno a ter seu genoma sequenciado, com a finalidade de se entender os mecanismos moleculares que levam à infecção e sua relação com o hospedeiro (Simpson et al., 2000).

O genoma de *X. fastidiosa* foi publicado em 2000, porém, os avanços esperados pelo projeto genoma no entendimento da biologia desse patógeno foram dificultados pela falta de informação nos bancos de dados naquele momento. Por ser o primeiro fitopatógeno sequenciado numa época em que a genômica ainda não dispunha de muitas sequências caracterizadas, a maioria das proteínas identificadas no seu genoma foi anotada como proteína hipotética ou sem função conhecida (Simpson et al., 2000). Apesar disso, o projeto genoma da *Xylella* deu um grande impulso à ciência do país e abriu inúmeras portas para o entendimento da biologia dessa bactéria e função de inúmeras de suas proteínas associadas à patogenicidade e adaptação.

1.2 Operon *bigR* e sua função na detoxificação de gás sulfídrico

O operon *bigR* (*biofilm-associated repressor*) foi primeiramente identificado na cepa 9a5c de *X. fastidiosa* (**Figura 1**). Posteriormente, verificou-se que o mesmo estava conservado em um grupo restrito de fitobactérias associadas a tecidos vasculares e de raiz como *Agrobacterium tumefaciens* e várias espécies de *Rhizobium* e *Mesorhizobium* (**Figura 1**) (Barbosa e Benedetti, 2007).

O operon *bigR* de *Xylella* apresenta cinco genes que codificam: o repressor do próprio operon (a proteína BigR), três proteínas de membrana (MP1-3) e uma proteína com domínios DUF442 e beta-lactamase/ETHE1 (**Figura 1**) com propriedades catalíticas até então desconhecidas e que foi denominada de Blh (*beta-lactamase-like hydrolase*). Em *A. tumefaciens*, o gene correspondente à proteína de membrana designada MP3, localiza-se em outra região do genoma da bactéria, separada do operon *bigR* (**Figura 1**) (Barbosa e Benedetti, 2007).

O interesse em se estudar o *operon bigR* se deu por se acreditar que as proteínas desse *operon*, as quais são exclusivamente encontradas nesse arranjo gênico nessa classe de bactérias, estariam envolvidas com resistência à antibióticos ou metais, dada a similaridade entre BigR e sensores de metais tipo ArsR/SmtB, e entre Blh e membros da família das β -lactamases (Barbosa & Benedetti, 2007).

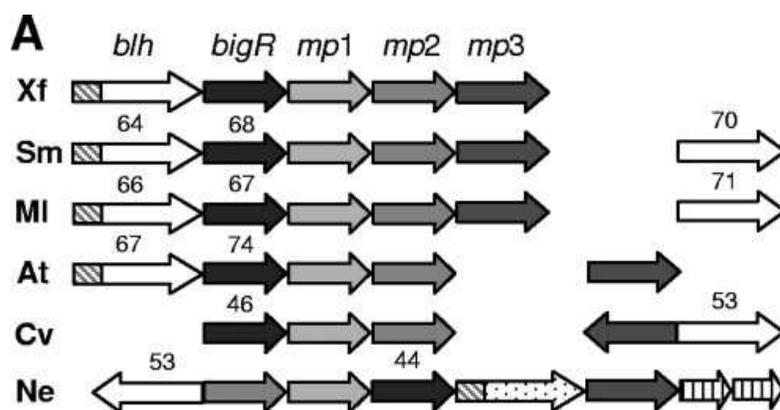


Figura 1: Disposição dos genes que compreendem o *operon bigR* em *X. fastidiosa* (Xf), *A. tumefaciens* (At) e outras bactérias associadas a planta/raiz/solo incluindo *Sinorhizobium meliloti* (Sm), *Mesorhizobium loti* (MI), *Chromobacterium violaceum* (Cv) e *Nitrosomonas europaea* (Ne). Setas conectadas representam ORFs do *operon*; setas com as mesmas cores correspondem aos ortólogos. Os domínios DUF442 e ETHE1 de Blh estão representados pela região hachurada e branca da primeira ORF, respectivamente. Os números sobre as setas indicam a porcentagem de identidade entre as respectivas ORFs com as de *X. fastidiosa*. Figura retirada de Barbosa e Benedetti, 2007.

O *operon bigR* é regulado pela proteína BigR (*biofilm growth-associated repressor*), um membro da família ArsR/SmtB de repressores transcricionais de bactérias caracterizados pelo domínio “winged-helix-turn-helix” (WHTH) de ligação ao DNA. As proteínas BigR de *Xylella* e *Agrobacterium* ligam-se fortemente à sequências -10 regulatórias do promotor do gene *blh*, bloqueando assim a transcrição dos genes do *operon* (Barbosa e Benedetti, 2007). Verificou-se ainda que o *operon bigR* é expresso em maiores níveis na condição de biofilme e que mutantes de *A. tumefaciens*

deficientes em BigR formam biofilmes maiores em superfícies inertes e em raiz de tabaco, sugerindo portanto o papel desse *operon* na formação do biofilme bacteriano (Barbosa e Benedetti, 2007).

Dada a semelhança das proteínas BigR com membros da família ArsR/SmtB, que compõe os sensores de metais principalmente, testou-se a possibilidade de BigR ligar metais e do *operon bigR* conferir tolerância ou resistência a metais, embora a maioria das proteínas codificadas pelo *operon* não apresentam semelhança com proteínas envolvidas em resistência a metais.

Através de ensaios de gel-shift e crescimento de mutantes de *Agrobacterium* deficientes na produção de BigR ou Blh, foi verificado que o *operon bigR* não confere tolerância a metais. Da mesma forma, foi demonstrado que esse *operon* também não está envolvido em resistência a antibióticos apesar da presença de um domínio tipo beta-lactamase na proteína Blh (Barbosa e Benedetti, 2007). Esses resultados sugeriram, portanto, que as proteínas BigR e Blh estariam desempenhando funções distintas das dos sensores de metais e beta-lactamases, respectivamente.

Análises de sequência de aminoácidos mostraram que a semelhança entre BigR e os sensores de metais era restrita ao domínio WHTH. Além disso, sítios de ligação a metais como os encontrados nas proteínas ArsR e SmtB, as quais ligam arsênio e zinco, respectivamente, não estão conservados em BigR (Barbosa e Benedetti, 2007). Ainda, proteínas BigR de diversas bactérias apresentam resíduos de cisteínas (C42 e C108) e metionina (M18) conservados que são comuns a um subgrupo apenas das proteínas pertencentes a família ArsR/SmtB; porém esses resíduos estão presentes em proteínas associadas à oxidação de enxofre (**Figura 2**). Esses dados sugeriram que BigR poderia estar envolvida com metabolismo de enxofre e funcionar com um sensor diferente dos sensores de metais.

De fato, foi demonstrado que BigR funciona como um novo sensor redox e não como sensor de metal, como se pensou inicialmente (Guimarães et al., 2011). Análises da estrutura cristalográfica de BigR revelaram que a proteína encontra-se em dois estados redox. Na sua forma oxidada, as duas cisteínas conservadas, C42 e C108, formam uma ponte intra-cadeia que gera mudanças conformacionais profundas no domínio WHTH, alterando a capacidade de ligação ao DNA da proteína (Guimarães et

al., 2011). Assim, a ligação ao DNA é regulada pelo estado de oxidação das cisteínas C42 e C108 de BigR.

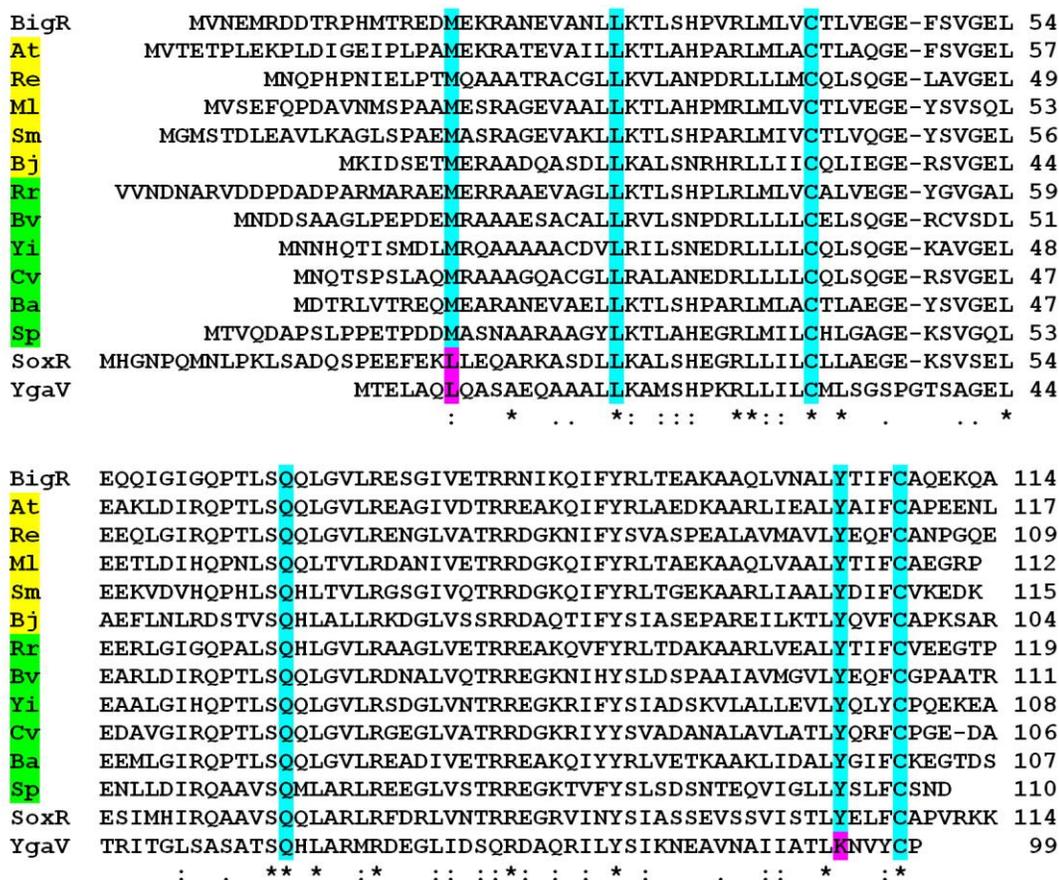


Figura 2: Alinhamento das sequências de proteínas BigR de diferentes bactérias com proteínas associadas à oxidação de enxofre como SoxR. As cisteínas C42 e C108, e a metionina M18, entre outros aminoácidos conservados, estão indicados em azul. Bactérias associadas à raiz estão em amarelo, enquanto outras de vida livre estão em verde. Figura retirada de Guimarães et al., 2011.

O estado reduzido das cisteínas C42 e C108 diminui a abertura entre as hélices de interação ao DNA e a proteína encaixa-se perfeitamente nos sulcos maiores do DNA alvo. Por outro lado, na forma oxidada a proteína assume uma conformação mais alongada onde as hélices que fazem a interação com o DNA apresentam-se mais afastadas, dificultando a interação com o DNA alvo (**Figura 3**).

Apesar de tais estudos terem elucidado um novo mecanismo regulatório de controle da transcrição para membros da família ArsR/SmtB, ainda não se sabia qual era a função biológica do *operon bigR*, pois a proteína que contém o domínio betalactamase-like/ETHE1, essencial para função do *operon*, ainda não havia sido funcionalmente caracterizada. Porém, em 2009, um artigo foi publicado descrevendo a função biológica da proteína humana ETHE1 como sendo uma dioxigenase de enxofre que converte sulfeto de hidrogênio, ou gás sulfídrico, em dióxido de enxofre (Tiranti et al., 2009). Essa proteína está também envolvida na detoxificação de gás sulfídrico em mitocôndria (Hildebrandt e Grieshaber, 2008).

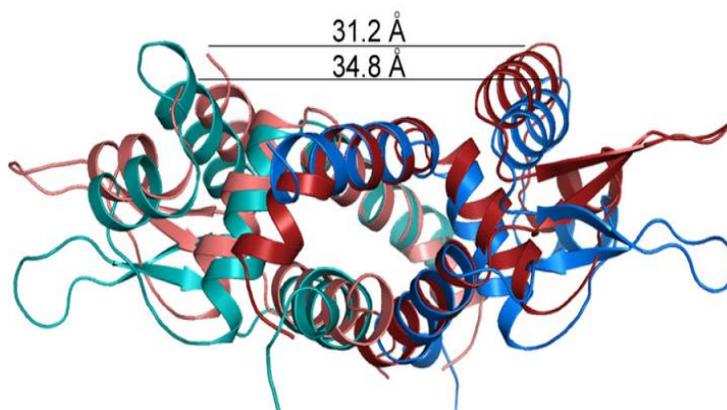


Figura 3: Estrutura dimérica do repressor BigR. Em vermelho, a forma reduzida e funcional; em azul, a forma oxidada, mais alongada, não funcional. Acima estão evidenciados os valores de distancia (em Angstroms) entre as hélices de ligação ao DNA em cada estado redox.

Embora o domínio beta-lactamase de Blh, agora denominado de domínio ETHE1, apresente apenas 29% de identidade e 46% de similaridade com a proteína ETHE1 humana, dados de modelagem molecular indicam que esses domínios possuem o mesmo tipo de enovelamento e conservação de resíduos considerados chaves numa função catalítica (Guimarães et al., 2011). Esses dados levaram o grupo a testar se o *operon bigR* estaria envolvido na detoxificação de gás sulfídrico em *Xylella* e *Agrobacterium*.

Pela facilidade em se obter mutantes de deleção em células de *Agrobacterium*, relativo à *Xylella*, a função de dioxigenase de enxofre de Blh foi testada em mutantes de *A. tumefaciens*, onde os genes *bigR* ou *blh* foram deletados por recombinação

homóloga (Barbosa e Benedetti, 2007). No caso do mutante *bigR*⁻, os demais genes do *operon* são expressos de forma constitutiva, ao passo que no mutante *blh*⁻, apenas o gene *blh* teve sua expressão abolida (Barbosa & Bnedetti, 2007). Avaliando-se o crescimento das células em meios de cultura apropriados, percebeu-se que havia acúmulo de gás sulfídrico nos mutantes *blh*⁻ e acúmulo de sulfito no meio de cultura onde se havia crescido mutantes *bigR*⁻ (**Figura 4**).

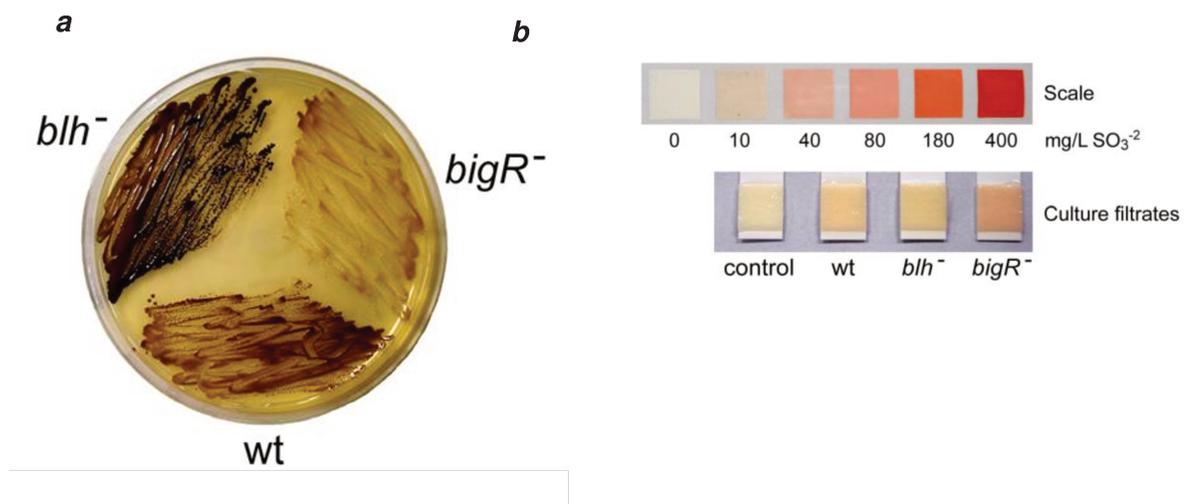


Figura 4: a) mutantes de *A. tumefaciens* crescidos no meio BiGGY Agar, indicador de produção de gás sulfídrico, através de precipitado escuro. Pode-se perceber maior acúmulo de gás sulfídrico quando o *operon bigR* está inativo (mutante *blh*⁻), quando comparado ao *operon* com expressão constitutiva (mutante *bigR*⁻) e na bactéria selvagem (wt). Em b, fitas indicadoras da produção de sulfito, demonstrando maior acúmulo deste íon no filtrado do meio de crescimento dos mutantes *bigR*⁻, indicando que o sulfeto de hidrogênio é oxidado à sulfito de maneira dependente de *blh* e que sulfito é secretado pela bactéria.

Isso levou à conclusão de que a função do *operon bigR* estaria ligada à detoxificação de gás sulfídrico devido a função de dioxigenase de enxofre da proteína Blh e possível atividade de secreção de sulfito das proteínas de membrana (**Figura 4**) (Guimarães et al., 2011). Porém, apesar de todos os indícios de que o *operon* estaria envolvido na detoxificação de enxofre pela conversão de gás sulfídrico em sulfito, a atividade dioxigenase de enxofre da proteína Blh ainda não havia sido confirmada experimentalmente (Guimarães et al., 2011).

Sabe-se que o sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico é altamente tóxico por inibir fortemente a citocromo c oxidase (COX) impedindo a respiração em condições aeróbicas. Como *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* são bactérias aeróbias obrigatórias e vivem em ambientes que apresentam baixa pressão de oxigênio, a presença do sulfeto de hidrogênio nessas células pode se tornar impeditiva ao crescimento das mesmas (**Figura 5a**). De fato, verificou-se que o *operon bigR* é necessário para que essas bactérias cresçam em condições de baixa tensão de oxigênio quando gás sulfídrico é produzido (**Figura 5b**) (Guimarães et al., 2011).

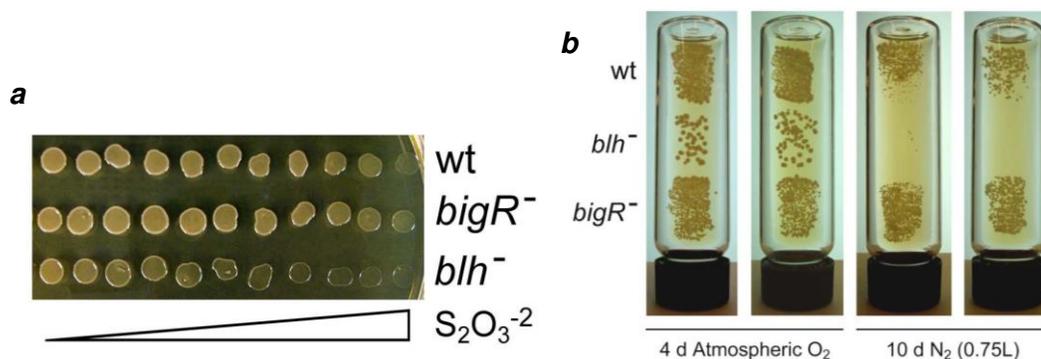


Figura 5: Em *a*, mutantes de *A. tumefaciens* crescendo em meio com concentrações crescentes de tiosulfato que sabidamente produz gás sulfídrico. Os mutantes *blh*⁻ não crescem em concentrações aumentadas de gás sulfídrico. Em *b*, mutantes crescendo em atmosfera de oxigênio (esquerda) e em atmosfera de nitrogênio (direita). Pode-se observar que os mutantes sem o *operon* funcional (*blh*) não crescem em baixa tensão de oxigênio (Guimarães et al., 2011).

1.3 A proteína Blh como proteína efetora do *operon bigR*

Sabendo-se que a função do *operon bigR* é a detoxificação de gás sulfídrico e que essa função é essencial para sobrevivência bacteriana sob baixas tensões de oxigênio, torna-se relevante entender como o *operon*, ou seus componentes, funcionam ao nível molecular. Considerando-se ainda que a Blh é uma enzima chave na detoxificação de gás sulfídrico, o entendimento da sua função e relação com as demais proteínas do *operon* é fundamental para elucidar o mecanismo de ação do mesmo.

Considera-se que o produto da reação catalisada pela Blh seja o dióxido de enxofre, que em solução aquosa é rapidamente convertido a sulfito, um composto que também é tóxico às células bacterianas e precisa ser eliminado. Foi verificado que uma das proteínas de membrana codificadas pelo *operon bigR* tem um domínio TauE, envolvido no transporte de sulfito e taurina, o que sugere que as proteínas de membrana do *operon bigR* devem compor um provável transportador de sulfito (Guimarães et al., 2011). Embora tenha ficado claro que o *operon bigR* é importante para que a bactéria cresça na presença de gás sulfídrico em condições limitantes de oxigênio, ainda não se sabe como essa reação de oxidação de enxofre ocorre ao nível molecular.

1.4 A proteína Blh apresenta dois domínios funcionais

A proteína Blh possui 431 aminoácidos e contém dois domínios funcionais, o domínio DUF442 (140 aminoácidos) no N-terminal, e o domínio ETHE1 (291 aminoácidos), no C-terminal (**Figura 6**).

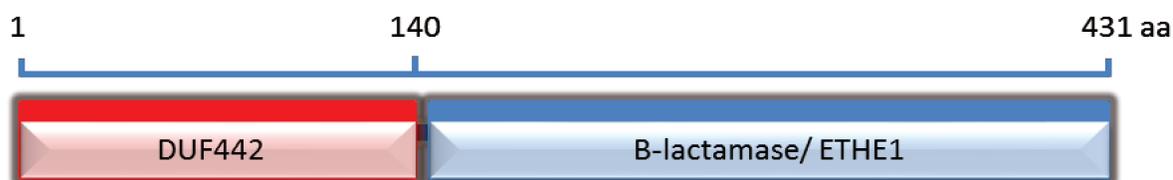


Figura 6: Esquema representativo dos domínios funcionais da proteína Blh de *Xylella* e *Agrobacterium*, DUF442 e ETHE1.

1.4.1 Provável função e mecanismo de ação do domínio ETHE1 de Blh

Em humanos, a proteína mitocondrial ETHE1 (**E**thylmalonic **E**ncephalopathy protein1) está associada à detoxificação de enxofre, e mutações ou deleções na sua sequência causam uma doença autossômica recessiva denominada encefalopatia etilmalônica (EE). Esta doença é caracterizada por encefalopatia de início precoce, identificada ainda em recém-nascidos, microangiopatia, diarreia crônica e alterações na função do citocromo c oxidase (COX) no músculo e cérebro e alta excreção de ácido etilmalônico na urina (Tiranti et al 2009; Holdorf et al 2012).

Além da ETHE1 humana, a estrutura e função de outras ETHE1 vêm sendo estudadas. Dentre elas está a ETHE1-Like de *Arabidopsis thaliana* que possui 46% de identidade com a ETHE1 humana e tem atividade de dioxigenase de enxofre (Holdorf et al, 2012). A ETHE1-Like está contida na família das beta-lactamases e apresenta grande similaridade às glioxalases II que estão envolvidas na detoxificação do 2-oxoladeído, desempenhando um importante papel na sobrevivência de plantas como também no desenvolvimento do embrião e endosperma em *A. thaliana* (Holdorf et al., 2012).

Hildebrandt e Grieshaber (2008) estudando a via de oxidação do sulfeto e tiosulfato nas mitocôndrias de mamíferos e invertebrados elegeram três atividades enzimáticas como atuantes desta via. A primeira delas corresponde à oxidação do sulfeto de hidrogênio pela quinona redutase. A segunda reação é a da dioxigenase enxofre que capta o enxofre do grupo persulfeto da quinona redutase e forma sulfeto com consumo de oxigênio e água. A terceira e última reação é a da sulfotransferase ou rodanase que transfere outro enxofre da quinona persulfeto para o sulfeto formando tiosulfato. Esta via, segundo os autores, é muito importante para manutenção do metabolismo e evita danos à cadeia respiratória da mitocôndria.

1.4.2 Atividade de dioxigenase de enxofre

A atividade de dioxigenase de enxofre (EC 1.13.11.18) foi descrita em bactérias acidófilas e sulfo-oxidantes como *Acidiphilium acidophilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* (Rohwerdert e Sand, 2003). A enzima dioxigenase de enxofre catalisa a formação de sulfeto partir do enxofre de uma molécula doadora com consumo de oxigênio e água. Porém, o enxofre elementar forma anéis com oito moléculas bastante estáveis e de difícil acesso por parte das enzimas. Assim, para ser utilizado como substrato, o enxofre precisa estar 'ativado', ou seja, ligado a uma molécula doadora que não é consumida na reação. Para *Acidithiobacillus ferrooxidans* a molécula doadora parece ser a glutatona persulfeto (GSSH), conhecida também como persulfeto de glutatona (GSSH) (Rohwerdert e Sand, 2003; Hildebrandt e Grieshaber, 2008) (**Figura 7**).



Figura 7: Fórmula geral da reação realizada pela dioxigenase de enxofre. À direita estão os produtos: água, oxigênio molecular e enxofre complexado ao doador glutaciona. À esquerda os respectivos produtos: sulfito, glutaciona e o próton H^+ (Hildebrandt e Grieshaber, 2008)

Além da homologia com a proteína ETHE1 humana, o domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* apresenta 46% de similaridade com a proteína ETHE1 de *Arabidopsis thaliana*. Um modelo molecular do domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* obtido com base na estrutura cristalográfica da proteína ETHE1 de *Arabidopsis* indica que esse domínio possui o mesmo enovelamento e conservação de resíduos considerados chaves numa função catalítica (**Figura 8**) (Guimarães et al., 2011). Além disso, o modelo prevê a ligação de uma molécula de glutaciona reduzida (GSH) no *pocket* considerado o sítio ativo da enzima (**Figura 8**) (Guimarães et al., 2011).

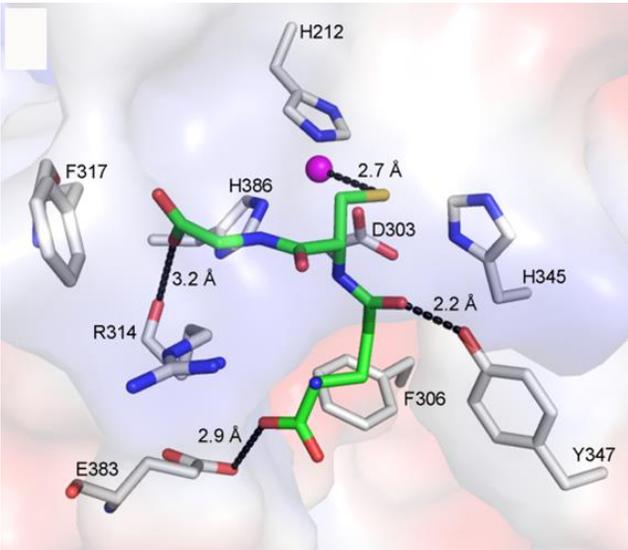


Figura 8: Modelagem molecular do sítio ativo do domínio ETHE1 da Blh de *X. fastidiosa* com uma glutaciona reduzida (GSH) no *pocket* da enzima (verde) e um sítio de coordenação de metal (resíduos em azul), incluindo a histidina 212, importante para a atividade da ETHE1 de *Arabidopsis* (extraído de Guimarães et al., 2011).

Outra maneira de se avaliar a atividade da dioxigenase de enxofre é através da medida do consumo de oxigênio. Tal medida é feita avaliando-se a concentração do oxigênio dissolvido em um meio hermeticamente fechado durante um intervalo de tempo, usando-se um oxígrafo. Este contém um eletrodo polarográfico de oxigênio coberto por uma membrana desenvolvido por L. C. Clark. O oxigênio nestes aparelhos é medido segundo o princípio de que o mesmo sofre redução eletrolítica em meio aquoso com a produção de uma corrente que pode ser medida por meio de um sistema de amplificação apropriado (Clark, 2002).

1.4.3 Provável função e mecanismo de ação do domínio DUF442 de Blh

Inicialmente, postulou-se que o domínio N-terminal da proteína Blh seria uma tirosina fosfatase, dada a semelhança estrutural com o domínio DUF442 de *Neisseria meningitidis*, descrita como tirosina fosfatase (Krishna, 2007). Entretanto, análises de modelagem molecular sugeriram fortemente que o domínio DUF442 apresenta semelhanças estruturais com proteínas da família das rodanases, ou sulfotransferases de bactérias, como a rodanase de *Escherichia coli* (**Figura 9**) (Guimarães et al, 2011).

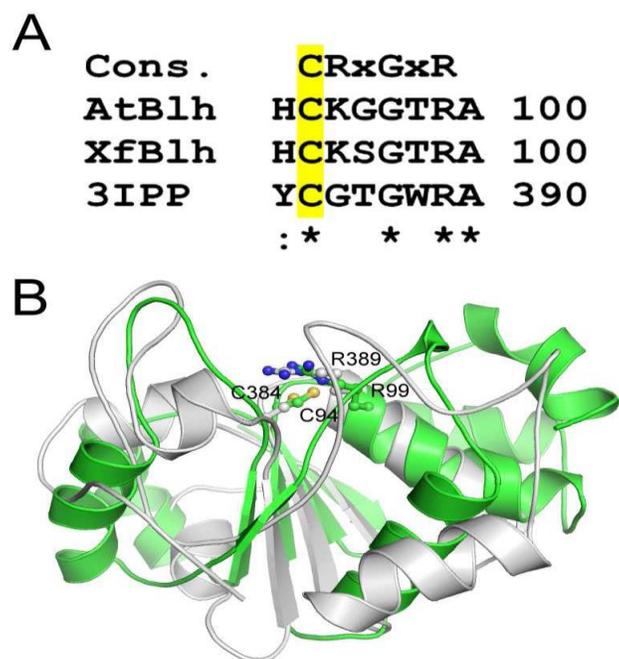


Figura 9: O domínio DUF442 é estruturalmente semelhante à rodanases. *A*, alinhamento de sequencia do sítio ativo da rodanase YnjE (3IPP) com as sequencias correspondentes dos domínios DUF442 de *Xylella* (XfBlh) e *Agrobacterium* (AtBlh). O motivo do sítio ativo foi alinhado e os resíduos de cisteínas responsáveis pela atividade estão em amarelo. *B*, sobreposição do modelo do domíno DUF442 de *Xylella* DUF442 (verde) com o domínio catalítico da rodanese YnjE (cinza) de *E. coli* mostrando a similaridade de conformação e a conservação dos resíduos catalíticos principais: C49 e R99 do DUF442 sobrepostos aos resíduos C384 e R389 YnjE (Guimarães et al. 2011).

A semelhança com tirosinas fosfatases pode, contudo ser explicada pelo fato de que uma classe das proteínas tirosina fosfatase, mais especificamente a classe III originou-se de rodanases de bactérias, o que faz com que essas duas famílias de proteínas conservem semelhanças na sua sequência e estrutura (Alonso, 2004). Além disso, a família rodanase apresenta significativa variação de aminoácidos de sítio ativo indicando que o reconhecimento do substrato e interações biológicas sejam dirigidas por específicas estruturas de sítio ativo.

As rodanases podem estar presentes sozinhas ou fusionadas a outros domínios de funções distintas o que suporta a sua habilidade em interagir com outras proteínas (Remelli et al, 2012).

Ainda há controvérsias quanto à função biológica dessa proteína e as vias as quais participa (Saidu, 2004). Embora sua principal função esteja relacionada à detoxificação de cianeto, outras funções têm sido relacionadas às rodanases como a via de regeneração de glutathione (Remelli et al, 2012), produção de proteínas, síntese de cisteína e modulação da taxa de respiração pela interação com a cadeia transportadora de elétrons, síntese de ferredoxina e detoxificação por enxofre (Saidu, 2004; Hildebradt, 2008). A função exclusiva de detoxificação de cianeto das rodanases é controversa e há autores que acreditam que essa enzima seria multifuncional (Smith & Urbanska, 1986).

1.4.5 Atividade sulfotransferase ou rodonase

A atividade de transferase de enxofre ou rodanase é suportada pela presença dos grupos sulfidrílica (-SH). Todos os resíduos de cisteína do sítio ativo deste tipo de enzima formam grupos sulfidrílica livres (Guang-Xiang & Horowitz, 1993). A atividade catalítica de rodanases pode ser avaliada através de vários métodos, porém o mais comumente utilizado é o método descrito por Sorbo (1955). Neste método, a atividade foi caracterizada pela capacidade de transferir um enxofre do tiossulfato para o íon cianeto resultante da ionização do cianeto de potássio, formando tiocianato que, ao reagir com nitrato de ferro produz um composto colorido que pode ser mensurado em espectrofotômetro à 460 nm (**Figura 10**).

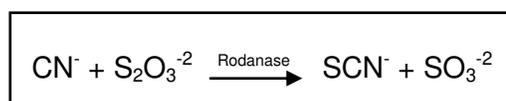


Figura 10: Esquema geral da reação realizada pela enzima rodanase. A enzima catalisa a transferência do enxofre tiossulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) para o cianeto (CN^-) formando tiocianato (SCN^-) e sulfito (SO_3^{-2}).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Dado o exposto acima, este trabalho teve como objetivos, a purificação e caracterização da atividade enzimática dos domínios ETHE1 e DUF442 da proteína BIh de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens*. Além disso, avaliou-se uma possível rede de interações entre as proteínas do *operon bigR* a fim de se identificar possíveis mecanismos regulatórios e a formação de complexos proteicos associados ao transporte de sulfito.

2.2 Objetivos Específicos

- Amplificar as sequências contendo os domínios ETHE1 e DUF442 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* e subcloná-los em vetores tipo pGEM-T, pET28a e pET29a para expressão em *E. coli*;
- Expressar e purificar domínios DUF442 e ETHE1;
- Realizar testes de atividade enzimática considerando a hipótese de que o domínio DUF442 é uma rodanase e o domínio ETHE1 é uma dioxigenase de enxofre;
- Clonar sequências das proteínas do *operon bigR* em vetores para ensaio de duplo híbrido de levedura;
- Realização de ensaios de interação entre as proteínas do *operon*.

3. Metodologia

3.1. Clonagem dos domínios ETHE1 e DUF442

Primers sense e antisense para amplificar a região correspondente ao domínio ETHE1 (~800 bp) de Blh de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* já haviam sido sintetizados e continham sítios de restrição para as enzimas *NdeI/XhoI* (para a clonagem do ETHE1 de *X. fastidiosa*), e *NdeI/EcoRI* (para a clonagem de ETHE1 de *A. tumefaciens*), respectivamente. Os *Primers* sense e antisense para amplificar o domínio DUF442 (~400 bp) também já haviam sido sintetizados e continham os sítios de restrição *NdeI/SacI* (para a clonagem de DUF422 de *X. fastidiosa*), e *NdeI/EcoRI* (para a clonagem de DUF442 *A. tumefaciens*), respectivamente. Os fragmentos contendo as sequências dos domínios separados foram amplificados por PCR a partir do cosmídio 12 de *X. fastidiosa* e plasmídeo de *A. tumefaciens* contendo as sequências do *operon*. Os fragmentos amplificados foram ligados em pGEM-T *Easy* e transformados, por choque térmico, em *E. coli* DHA5 α . A integridade dos clones foi confirmada por sequenciamento.

Os fragmentos foram excisados usando-se as respectivas enzimas de restrição e subclonados em vetores pET-28a e 29a por transformação em *E. coli* DH5 α , a fim de que as proteínas de interesse pudessem ser expressas com ou sem cauda de histidina no N-terminal. As construções foram verificadas por sequenciamento e transformadas em cepas de *E. coli*, especializadas na expressão de proteínas recombinantes, por choque térmico. As construções para expressão feitas e cepas utilizadas encontram-se dispostas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Cepas transformadas com as construções contendo os domínio DUF442 e ETHE1 com (pET28) e sem (pET29) cauda de histidina (HIS-tag)

Domínio	Organismo	Cepas	Vetor de expressão
DUF442	<i>X. fastidiosa</i>	BL21(DE3) BL21pLySE	pET28, pET29
ETHE1	<i>X. fastidiosa</i>	Artic Express BL21(DE3) BL21pLySE	pET28, pET29
DUF442	<i>A. tumefaciens</i>	BL21(DE3)	pET28, pET29
ETHE1	<i>A. tumefaciens</i>	C41 Origami2 BL21(DE3)	pET28, pET29

3.2. Testes de expressão dos domínios da BLH

Foram feitos diversos testes para estabelecer a melhor condição de expressão para cada construção. Todas as construções da **Tabela 1** foram testadas. Foram testados dois meios de cultura com tipos de indução e composição diferentes. O primeiro deles foi o LB com indução por IPTG. O segundo tipo de meio de cultura testado foi o meio ZYM5052 (1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 5 mM sulfato de sódio, 50 mM cloreto de amônio, 25 mM de fosfato de potássio, 25 mM fosfato de sódio, 0,5% de glicerol, 0,05% de glicose e 2% de lactose) descrito por Studier (2005) também chamado autoinduzido por conter lactose. Cada construção foi pré-inoculada em de 2 ml de cada meio de cultura com canamicina (50 µg/ml) e crescidas por 16h à 37°C. Em seguida 40 ml de cada meio contendo canamicina foi inoculado com 500 µL do pré-inóculo crescido. Os inóculos (40 ml) do meio tipo LB foram crescidos até a O.D. de 0,6. Depois de atingida a O.D. foi feita a indução pela adição 0,4 mM de IPTG. Após a adição do IPTG a cultura cresceu por mais 3h, sob agitação constante de 200 rpm e à temperatura escolhida que variou de 12 à 37°C dependendo da cepa testada **Tabela 2**.

Tabela 2: Condições de expressão testadas para cada construção.

Construção	Organismo	Cepa	Meio de Cultura	Tempo de Indução	Temperatura de Indução
DUF442_pEt28 DUF442_pEt29 DUF442_pEt28 DUF442_pET29	<i>X. fastidiosa</i> <i>X. fastidiosa</i> <i>A. tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens</i>	BL21(DE3)	LB ZYM5052	3h (LB) 16h(ZYM5052)	20, 25, 30,37°C
ETHE1_pEt28 ETHE1_pET29 ETHE1_pEt28 ETHE1_pET29	<i>X. fastidiosa</i> <i>X. fastidiosa</i> <i>A. tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens</i>	BL21pLySE	LB ZYM5052	16h	20, 25°C
ETHE1_pEt28 ETHE1_pET29	<i>X. fastidiosa</i> <i>X. fastidiosa</i>	Artic Express	LB ZYM5052	16h	12°C
ATETHE1_pEt28 ATETHE1_pET29	<i>A. tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens</i>	C41	ZYM5052	16h	25, 30°C
ETHE1_pEt28 ETHE1_pET29 ETHE1_pEt28 ETHE1_pET29	<i>A. tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens</i> <i>X. fastidiosa</i> <i>X. fastidiosa</i>	Origami2	ZYM5052	16h	25, 30°C

Para o meio autoinduzido ou ZYM5052 o inóculo de 40 ml foi crescido por 16h na temperatura escolhida, sob agitação constante de 200 rpm. A verificação da expressão foi feita através de gel SDS-PAGE 10 ou 13% com alíquotas retiradas antes e depois da indução.

3.3. Lise celular bacteriana

Para os testes de purificação foram utilizadas apenas as construções com cauda de histidina feita através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Os tampões de lise testados foram: *B-PER* (Bacterial Protein Extraction Reagente - Pierce), tampão Tris-NaCl (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 200 mM de NaCl, 10 mM de PMSF), tampão MOPS (10 mM de MOPS pH 7,5, 10mM de PMSF), tampão fosfato de sódio (100 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 10mM de PMSF) e tampão Tris-NaCl com sulfato de amônio (20 mM de Tris-HCl, 200 mM de NaCl, 300 mM de sulfato de amônio, 10% de

glicerol e 10 mM de PMSF). Para cada um dos tampões testados o inóculo de 250 ml foi centrifugado à 8000xg por 12 min e o pellet foi ressuspendido em 10 ml do respectivo tampão de lise. As células ressuspensas foram lisadas com auxílio de lisozima (10 mg/ml) e para garantir uma lise completa foi utilizado sonicador (Sonics). Foram dados 8 pulsos de 20 segundos cada à uma amplitude de 30%. Alternativamente, as amostras foram lisadas em disruptor à uma pressão de 25 kpsi e 4°C. O lisado foi submetido à centrifugação à 18000xg e 4°C por 30min. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 micra (Millipore) e submetido à cromatografia por afinidade.

3.4. Purificação dos domínios DUF442 e ETHE1 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens*

3.4.1. Cromatografia de afinidade - Fluxo por gravidade

A primeira etapa de purificação foi a cromatografia de afinidade em resina de níquel (Ni-NTA - Nalgene). Foi utilizado 1 ml de resina para 10 ml de extrato. A resina foi previamente equilibrada com 10 volumes do respectivo tampão em seguida o extrato foi passado pela coluna à 4°C. Após a passagem do extrato a resina foi lavada com tampão de lavagem que corresponde ao tampão de lise adicionado de 50 mM de imidazol. Após a lavagem as proteínas que aderiram a coluna foram eluídas com o tampão de eluição que corresponde ao tampão de lise adicionado de 300 mM de imidazol. A fração eluída da proteína recombinante foi utilizada para os ensaios de atividade.

3.4.2. Cromatografia de afinidade Fluxo por pressão em aparelho FPLC

Depois de estabelecido o melhor tampão e condições de purificação na bancada, as amostras passaram a ser processadas no sistema ÄKTA™ FPLC™ (GE Healthcare) a fim de se obter um maior controle das etapas de purificação e ajuste de parâmetros para obter uma proteína mais pura. Foi utilizada a coluna HiTrap™ Chelating de 1 ml (GE Healthcare) acoplada ao sistema à 4°C e um fluxo de 0,5 ml/min. A coluna foi

previamente carregada com solução 100 mM de sulfato de níquel e equilibrada com tampão de lise, de acordo com especificações do fabricante. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão de lise (Tris-NaCl com sulfato de amônio e glicerol) até a absorbância 280 nm estabilizar. Em seguida foi iniciada a injeção da amostra que continha 50 ml do lisado bacteriano filtrado. A eluição da proteína de interesse foi feita através de *steps* com concentrações crescentes de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 1000 mM) cada *step* foi ajustado para 10 volumes de coluna. A fração eluída contendo a proteína recombinante foi utilizada nos ensaios de atividade.

3.4.3. Cromatografia de exclusão molecular da proteína Blh inteira

A amostra que passou pela cromatografia de afinidade foi submetida à cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel. Para tal, a mostra foi concentrada por filtração em Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter (Millipore) com poros de 30 kDa centrifugando-se a 4000 rpm a 4°C até obter-se 1ml. A cromatografia foi realizada em sistema ÄKTA™ FPLC™ (GE Healthcare), usando-se coluna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão de lise sem imidazol, à 4°C com um fluxo de 0,5 ml/min.

3.5. Purificação do domínio XFDUF442 por precipitação em sulfato de amônio

O domínio foi expresso em 500 ml de meio ZYM5052 por 16h, 20°C e 200 rpm e a lise foi feita como descrito acima utilizando o sonicador e o tampão Tris-NaCl com sulfato de amônio e glicerol e o lisado foi submetido ao protocolo de purificação descrito por Miller e colaboradores (1992). Ao lisado foram adicionadas cerca duas gotas de sulfato de glicina até o pH atingir 4,7 para auxiliar na precipitação das proteínas de *E. coli* e manutenção da atividade. O pH foi aferido com fitas medidoras de pH da (Sigma). Adicionou-se sulfato de amônio em pó até a concentração de 0,4 M e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 18000xg por 20 min. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até a

concentração atingir 1,4 M e a amostra foi incubada no gelo por 30 min. Em seguida centrifugou-se a 18000xg por 20 min e à 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até a concentração de 2,25 M. Em seguida a amostra foi novamente incubada por 30 min no gelo e em seguida centrifugada à 18000xg por 20 min e 4°C. O pellet foi ressuspenso no tampão de diálise (2 mM de acetato de sódio; 2 mM de tiosulfato de sódio; 10% de glicerol e pH 4,9). A diálise foi feita em membrana porosa Spectra/Por Dialysis (Spectrumlabs) com cobertura para 6-8,000 Da, por 16h à 4°C. Essa fração foi submetida à ensaio de atividade de rodanase como descrito no item 3.9.

3.6. Ensaio de atividade do domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens*

O ensaio de atividade do domínio ETHE1 foi realizado no Laboratório de Bioenergética da UNICAMP com suporte do professor Anibal Vercesi e seu aluno Artur Hernandez-Felipe. As medidas foram realizadas segundo ensaio descrito por Hildebrandt e Grieshaber (2008) usando-se um volume 2 ml contendo: enzima parcialmente purificada (12 µg), tampão fosfato de potássio (0,1 M), glutathiona reduzida (GSH; 1mM) e 30 µL de uma solução saturada de enxofre (17 mM) em acetona (enxofre acetônico) que foi adicionada por último dando início à reação. As medições de consumo de oxigênio foram feitas em oxígrafo Hansatech (Hansatech Instruments - Oxygraph Plus Recording, v.1.01). Os ensaios foram realizados à 21°C tiveram duração de 20 min para o ETHE1 de *X. fastidiosa* e 7 min para *A. tumefaciens*. No minuto 1 o enxofre foi adicionado, tempo necessário para estabilização do eletrodo. Como controle foram feitas medições sem a enzima, sem o doador de enxofre (GSH) e sem o enxofre (apenas com acetona). Além da medida do oxigênio consumido, foi feito também um ensaio predominantemente qualitativo a fim de detectar a produção de sulfito nas amostras. Este foi feito através de fitas indicadoras (Merkquant) segundo recomendações do fabricante. Os parâmetros cinéticos foram calculados para o ETHE1 de *A. tumefaciens* utilizando o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad).

3.7. Ensaio de atividade do domínio DUF442 de *X. fastidiosa*

O ensaio foi feito em triplicata segundo o proposto por Sorbo (1955) para um volume final de 2 ml de reação. Foram adicionados: 40 μ L de tampão fosfato de potássio (200 mM pH 7,4); 65 μ L de solução de tiosulfato de sódio (125 mM); 30 μ L de solução de cianeto de potássio (250 mM de cianeto de potássio em tampão fosfato 200 mM e pH 7,4) e por fim a enzima 25 μ g. No ensaio do branco não foi adicionado nada nesse momento e no controle com proteínas de *E. coli* foi adicionado 25 μ g de proteína. Os reagentes foram misturados por inversão e a reação foi mantida à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de solução de formalina 37% parando a reação. Neste ponto a mesma quantidade de enzima foi adicionada ao branco. Os reagentes foram misturados por leve agitação e em seguida foram adicionados 163 μ L de nitrato de ferro 410 mM em ácido nítrico 14% e 1,63 ml de água. Os reagentes foram agitados levemente e a absorbância foi aferida em espectrofotômetro à 460 nm. Os ensaios positivos apresentam cor alaranjada.

Foram realizados ensaios de atividade de rodanase na presença de metais e do quelante ETDA para tal foram realizados ensaios como descritos acima. Porém ao *mistura* de reação, logo após a adição da enzima, foi adicionada uma solução contendo EDTA ou o respectivo metal a ser testado. Foram realizados dois ensaios em um deles a concentração de metal foi de 200 μ M e no segundo a concentração de metal foi ajustada para 5 μ M. Para tal, soluções estoque dos metais sulfato de cobre (CuSO_4), cloreto de cobalto (CoCl_2), sulfato de zinco (ZnSO_4), sulfato de ferro (FeSO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4) e do ETDA foram preparadas na concentração de 10 mM. Em ambos os ensaios foram utilizados 13 μ g de proteína parcialmente purificada. Os cálculos dos parâmetros cinéticos foram realizados no programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad).

3.8. Modelagem do domínio ETHE1

A sequência do domínio ETHE1 foi submetida à modelagem através da ferramenta webserver HHpred (Homology detection & structure prediction by HMM-

HMM comparison) disponível no *ToolKit* das ferramentas de bioinformática do Max-Planck Institute da Alemanha (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred/>). A sequência foi alinhada com a estrutura da beta-lactamase de *Burkholderia pseudomallei* (4EFZ).

3.9. Ensaio de fluorescência de raio-x para identificação de metais ligantes

Ensaio de fluorescência de raios-x foram realizados na linha de luz XRF do Laboratório Nacional de Luz Sícontron (LNLS) com a colaboração do Dr. Carlos Perez. A proteína ETHE1 de *A. tumefaciens* foi parcialmente purificada em coluna de níquel como descrito acima. Vinte microgramas de proteína em tampão de eluição foram aplicados em placas Perspex. A gota foi evaporada à temperatura ambiente até formar um filme seco. Essas amostras foram medidas por 300 s e os espectros de raios-x obtidos foram analisados usando o PyMCA program (Balan et al., 2006; Solé et al., 2007).

3.10. Predição de interações proteína-proteína envolvendo a proteína Blh

Foi utilizada a sequência da proteína Blh inteira (sequência XF0768) para buscar parceiros de interação para esta proteína. A busca foi realizada na ferramenta *online* chamada *STRING* (<http://string-db.org/>) que é um preditor de interações com base em critérios genômicos e funcionais. A busca foi feita com a Blh como modelo e o resultado foi filtrado para interações mais fortes com graus de confiança acima de 700, sendo que o padrão da análise é 400.

3.11. Ensaio de duplo híbrido de levedura

3.11.1. Clonagens para análise de interação por duplo-híbrido

As sequências dos domínios de Blh e da proteína BigR que se encontravam no vetor pGEM-T *Easy* foram subclonadas nos vetores pOAD e pOBD (nos sítios *NdeI/NotI*) para os ensaios de duplo híbrido. Para as três proteínas de membrana

denominadas MP1, MP2 e MP3 foram desenhados primers com sítios *NdeI/NotI* para amplificação por PCR utilizando o cosmídeo 12 de *X. fastidiosa* como modelo. Os insertos foram amplificados e purificados utilizando o *DNA extraction Kit* (Quiagem). Em seguida, os fragmentos foram ligados no pGEM-T Easy e transformados na cepa de *E. coli* DH5 α . A verificação da clonagem foi feita por sequenciamento dos clones positivos. Os insertos confirmados foram clonados nos vetores pOAD e pOBD nos sítios *NdeI/NotI* na cepa DH5 α e confirmados por PCR de colônia e sequenciamento dos positivos. Obtidos os vetores com os insertos procedeu-se a transformação da cepa PJ694a de levedura.

3.11.2. Transformação de leveduras

A cepa PJ69-4a de *Saccharomyces cerevisiae* foi crescida por 16h em 3 ml de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona) à 30°C. O inóculo foi centrifugado à 13000 rpm por 1 min à temperatura ambiente e o meio foi retirado. O pellet foi ressuspensão no mistura de transformação (240 μ L de PEG 50%, 36 μ L cloreto de lítio 1M, 50 μ L de SS-DNA de esperma de salmão 2 μ g/ml - Sigma). A levedura selvagem ressuspensa no mistura de transformação foi incubada à 42°C por 2h e 30 min. Em seguida foi centrifugada à 13000 rpm por 1 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão em 200 μ L de água estéril e plaqueado em meio SC +Ade (0,66% de base de nitrogênio, 2% de glicose, 1,6% de ágar bacteriológico e 0,083% de mistura de aminoácidos incluindo adenina). Os meios foram complementados com histidina e as marcas de auxotrofia dos vetores pOAD (contém leucina, foi plaqueado em histidina e triptofano) e pOBD (contém triptofano, foi plaqueado em histidina e leucina). As placas foram acondicionadas em estufa à 30°C por 2-4 dias. Para os duplos transformantes, o mesmo protocolo de transformação foi utilizado, porém desta vez os inóculos foram crescidos em 3 ml de meio SC+Ade líquido com o aminoácido correspondente a cada monohíbrido (leucina, pOBD ou triptofano, pOAD).

3.11.3. Mini preparação plasmidial de leveduras

A verificação da presença dos insertos nas leveduras foi feita por PCR utilizando DNA plasmidial extraído dos clones como molde. Para a extração dos plasmídeos, as colônias foram inoculadas em 2 ml de meio SC +Ade +His +Trp (com adenina, histidina e triptofano) ou SC +Ade +His +Leu (com adenina, histidina e leucina) e crescidas por 16h 250 rpm e 30°C. Após crescidos os inóculos foram centrifugados à 13000rpm por 1min à temperatura ambiente. O meio foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 10 µL de liticase (5 U/ µL). Este foi incubado à 37°C por 1h à 250 rpm. Após incubação foram adicionados 20 µL de solução de SDS (sódio dodecil sulfato) 20% e agitou-se vigorosamente a suspensão por 1 min. Após agitação as células foram submetidas à dois ciclos de congelamento de cerca de 30 min à 20°C intercalados de descongelamento à temperatura ambiente por agitação. Após a lise das células o volume foi ajustado para 200 µL com tampão TE pH 7 (Tris-EDTA - Sigma) e procedeu-se a extração do DNA. Para tal foram adicionados 200 µL de FCIA (fenol 25%; clorofórmio 24% e álcool isoamílico 1%). A amostra foi agitada vigorosamente por 5 min e contrifugada à 13000 rpm por 10 min à 4°C. A parte aquosa superior foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 8 µL de solução 10 M de acetato de amônio e 500 µL de etanol puro. As amostras foram acondicionadas à -70°C por 1h e em seguida centrifugadas à 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente. Após seco o *pellet* foi ressuspensionado em 20 µL de água milli-q estéril. Para verificar a eficácia da extração o DNA extraído foi avaliado em gel de agarose 1% e em seguida submetido ao PCR.

3.11.4. Teste de autoativação do gene GAL1-HIS3

As colônias transformadas da isca de interesse foram diluídas em 50 µL de água milli-Q estéril. Essas colônias foram repicadas pingando-se 10 µL dessa suspensão de células em placas de meio SC +Ade -His -Trp (com adenina e histidida, sem triptofano) contendo concentrações crescentes de 3-amino triazol (3AT): 0 mM, 3 mM, 5 mM e 10 mM. As placas foram crescidas à 30°C por 5 dias e as concentrações inibitórias de 3AT foram determinadas.

3.11.5. Teste de autoativação do gene repórter GAL7-LacZ

Círculos de papel de filtro com 120 mm foram recortados e dispostos em cima de colônias transformadas da isca de interesse que foram diluídas em 50µL de água milli-Q estéril. Essas colônias foram repicadas pingando-se 10 µL dessa suspensão de células em placas de meio SC +Ade -His -Trp (com adenina, sem histidina e triptofano) e crescidas por 5dias à 30°C. Após entrar em contato com as colônias crescidas o papel de filtro foi mergulhado em nitrogênio líquido por 15 segundos e deitados sobre placas com a face das colônias adsorvidas para cima, até o descongelamento. Este procedimento foi repetido duas vezes. O papel de filtro foi umedecido em placa contendo cerca de 500 µL de tampão Z (NaH₂PO₄.H₂O 1,38%; KCL 0,0075%; MgSO₄7H₂O 0,025%; β-mercaptoetanol 0,27%; X-gal 167 mg/ml). Tomou-se o cuidado de manter a face com as colônias voltadas para cima. As leituras foram realizadas com 1h, 2h e 24h de incubação à 37°C.

3.11.6. Ensaio de interação

Os ensaios foram conduzidos em meio SC +Ade -His -Trp -Leu (com adenina e por isso menos restrigente) e em meio SC -Ade -His -Trp -Leu (sem adenina e por isso mais restrigente). Ensaio preliminares com duplos transformantes em meio menos estrigente SC +Ade - His - Leu - Trp (com adenina e sem histidina, leucina e triptofano). Os ensaios foram feitos diluindo-se uma colônia de cada duplo transformante em 50µL de água milli-q e 10 µL dessa solução foi pingada em placas contendo o meio para realização do ensaio. As placas foram crescidas à 30°C por 3 a cinco dias. Os duplos transformantes crescidos foram considerados positivos para interação.

4. Resultados

4.1. Expressão e purificação dos domínios da BIh

4.1.1. Domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* e *X. fastidiosa*

Com o objetivo de purificação em larga escala e cristalização, as construções feitas para o domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* foram truncadas na região C-terminal a fim de eliminar regiões preditas como desenoveladas. Essas regiões foram identificadas com auxílio da ferramenta *online* iPDA: *Integrated Protein Disorder Analyzer* (<http://biominer.bime.ntu.edu.tw/ipda/>) que busca regiões com alto grau de desorganização na molécula (**Figura 11**).

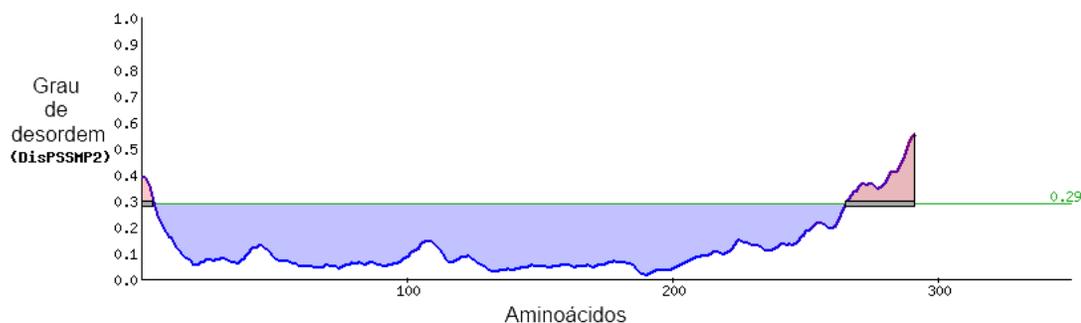


Figura 11: Resultado da análise da sequência do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* no webserver iPDA : *Integrated Protein Disorder Analyzer* (<http://biominer.bime.ntu.edu.tw/ipda/>) ferramenta que busca prever na sequência regiões desorganizadas que venham interferir na estabilidade da estrutura da proteína. A linha verde representa o limite de ordem da sequência e foi de 0,29. Regiões acima do limite (rosa) representam as partes da sequência com algum grau de desenovelamento. A região abaixo do limite (azul) representa a região enovelada.

As regiões em rosa na **Figura 11** correspondem às porções desenoveladas. Apesar de haver regiões desenoveladas em ambas as extremidades da molécula, apenas a região C-terminal foi truncada. Dessa forma a sequência do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* que foi expressa em *E.coli* encontra-se na **Figura 12**.

Por outro lado, O domínio de *X. fastidiosa* foi mantido inteiro, uma vez que o objetivo era a obtenção deste domínio para realização de ensaios de atividade enzimática.

```
SAAVPHIKAFFDPRTWSVQYVVSDPATGGCAIIDPVYDFDEKSGATGTMNAD  
AILDYVKRHGLSVEWILDTHPHADHFSAADYLKQKTGAKTAIGAKVTGVQKL  
WQEKYNWSDFKTDGSDQDQLFEAGDRFSIGSLEARVLFSPGHTLASVTYVVG  
NAAFVHDTLFMPDSGTARADFPGGSAKQLWASIQDILALPDDTRLFTGHDYQ  
PGGRAPKWESTVGEQTRSNNPHLAGMTEEDFVRLREARDRTLPMPKLILHALQ  
VNIRGGRLPEPEANGKHYLKFP LDVLEGSTW
```

Figura 12: Sequencia do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens*. Em verde região truncada da sequencia. A metionina inicial veio do plasmídeo utilizado.

Os testes iniciais de expressão do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* e *X. fastidiosa* utilizando o meio autoinduzido (ZYM5052) e o meio LB, com indução por IPTG, demonstrou que o meio autoinduzido apresentou maior indução da proteína recombinante (dados não mostrados). Por outro lado, nenhuma fração solúvel foi identificada com os tampões B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagente - Pierce), tampão Tris-NaCl, tampão MOPS ou fosfato de sódio como exemplificado na **Figura 13** com o tampão Tris-NaCl.

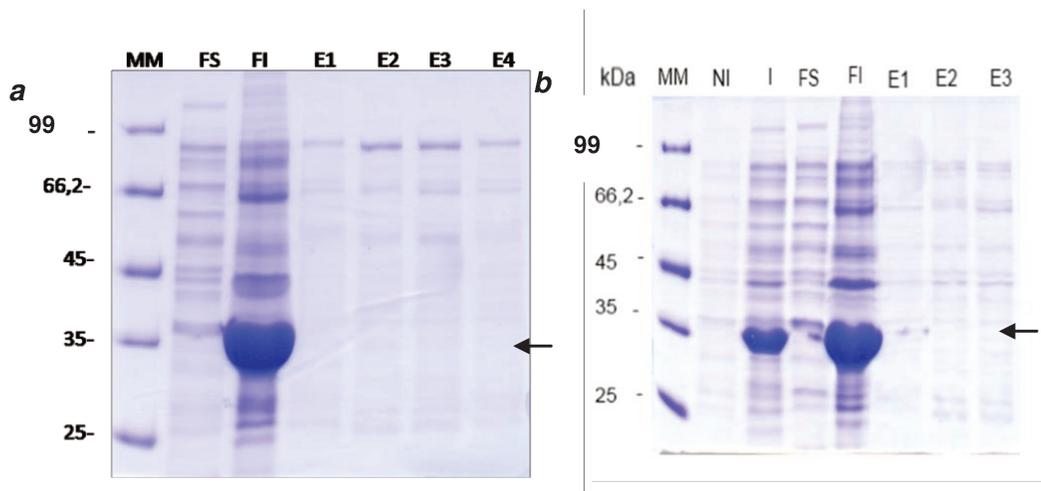


Figura 13: Gel SDS-PAGE 13% com os ensaios de expressão do domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* em meio autoinduzido com lactose à 20°C, 200 rpm por 16h e purificação com Tris-NaCl. Em **a** resultado do teste de expressão na cepa BL21pLisE (DE3) do ETHE1 de *X. fastidiosa*. Em **b** o resultado do teste de expressão do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* na cepa BL21 (DE3). As setas indicam a altura da banda da proteína recombinante. MM= Marcador molecular; FS= fração solúvel; FI= fração insolúvel; E1, 2 e 3= Eluição 1, 2, 3 e 4.

Dessa forma, alternativas para obtenção do domínio ETHE1 recombinante foram buscadas. Nesse período, foi depositada no *Protein Data Bank* (PDB) a estrutura de uma β -lactamase (4EFZ) semelhante ao domínio ETHE1 de *X. fastidiosa*. Embora este trabalho não tenha ainda sido publicado, observa-se os ligantes sulfato e glicerol na estrutura de 4EFZ. A partir dessa observação, foram adicionados ao tampão Tris-NaCl o sulfato de amônio e o glicerol. Esses aditivos foram suficientes para obtenção do domínio ETHE1, de ambas as bactérias, na forma solúvel (**Figura 14**). Entretanto a forma truncada do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* apresentou maior solubilidade (**Figura 14b**).

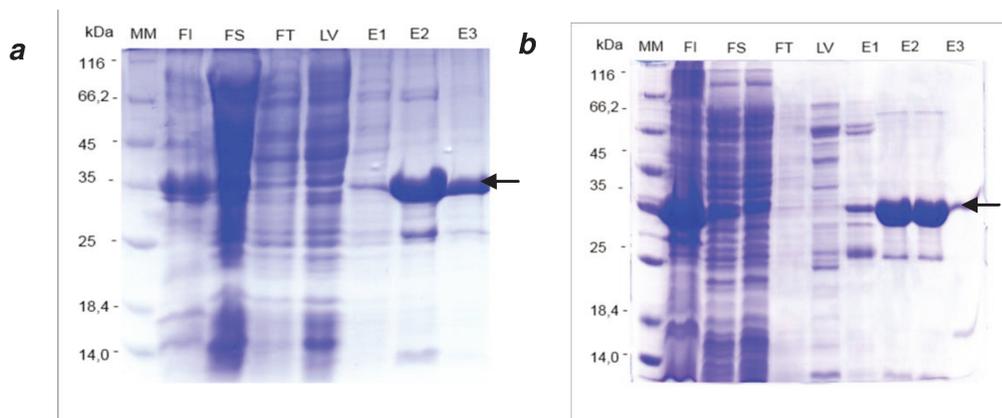


Figura 14: Gel SDS-PAGE 13% com os ensaios de expressão do domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* em meio autoinduzido com lactose à 20°C, 200 rpm por 16h e purificação com Tris-NaCl com sulfato de amônio e glicerol. Em **a** resultado do teste de expressão na cepa BL21pLisE (DE3) do ETHE1 de *X. fastidiosa* utilizando cromatografia por afinidade com fluxo pela gravidade. Em **b** o resultado do teste de expressão do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* na cepa BL21 (DE3) realizado no ÄKTA™ FPLC™ (GE Healthcare) acima encontra-se o cromatograma obtido. As setas indicam a altura da banda da proteína recombinante. MM= Marcador molecular; FS= fração solúvel; FI= fração insolúvel; LV= lavagem; FT= não ligado à resina; E1, 2 e 3= Eluição 1, 2, 3 e 4.

Além dos tampões testados, foi verificada a expressão do domínio ETHE1 tanto de *X. fastidiosa* quanto de *A. tumefaciens*, nas diversas cepas de *E. coli* testadas. Parâmetros como temperatura e tempo de indução também foram otimizados. O domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* apresentou melhor condição de expressão na cepa BL21pLysE em meio suplementado com lactose (meio ZYM5052) crescido por 16h à 20°C e agitação constante de 200 rpm. O domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* mostrou alta solubilidade na cepa BL21(DE3) nas mesmas condições (**Figura 14**).

4.1.2. Domínio DUF442 de *A. tumefaciens* e *X. fastidiosa*

Para o domínio DUF442, foram feitos testes com os meios, cepas e condições de expressão dispostos na **Tabela 2**. Foram testados os mesmos tampões utilizados para o domínio ETHE1. Porém, o domínio DUF442, de ambas as bactérias, apresentou-se

majoritariamente na fração insolúvel (dados não mostrados). Contudo, a adição dos estabilizadores utilizados para purificação do domínio ETHE1 possibilitou a obtenção de uma fração solúvel do domínio DUF442 de *X. fastidiosa*. O rendimento da purificação foi menor que o observado para o domínio ETHE1 da mesma bactéria e a pureza também foi inferior (**Figura 15**). A fração obtida deste domínio foi suficiente para realização dos ensaios de atividade. Da mesma forma que o domínio ETHE1 de *X. fastidiosa*, a melhor condição de expressão da proteína foi na cepa BL21pLisE (DE3), em meio ZYM5052, com 16h de indução à 20°C e agitação constante de 200 rpm.

O domínio DUF442 de *A. tumefaciens* não apresentou-se solúvel em nenhuma das condições testadas (dados não mostrados). Optou-se assim, por prosseguir com os ensaios de atividade com o DUF442 de *X. fastidiosa*.

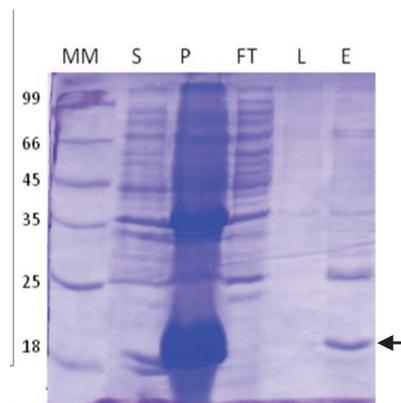


Figura 15: Gel SDS-PAGE 13% com etapas principais de purificação do domínio DUF442 expresso em 250 ml de meio ZYM5052 na cepa BLI12(pLysE), induzido com lactose, por 16h, à 20°C e 200 rpm. Na primeira canaleta (da esq. para dir.) foi aplicado o marcador de massa molecular (MM); na segunda encontra-se a fração solúvel (S); na terceira a fração insolúvel (P); em seguida o não ligado à resina (FT); na quinta canaleta encontra-se a fração da lavagem que foi feita com 20 mM de imidazol (L) e por fim a eluição realizada com 300 mM de imidazol (E). A seta indica altura da banda do domínio DUF442 parcialmente purificada que ficou em torno do 18 kDa. MM= Marcador molecular; FS= fração solúvel; FI= fração insolúvel; LV= lavagem; FT= não ligado à resina; E1, 2 e 3= Eluição 1, 2, 3 e 4.

4.1.3. Purificação do domínio DUF442 de *X. fastidiosa* por precipitação com sulfato de amônio

Foram buscadas alternativas para a purificação do domínio DUF442 de *X. fastidiosa* com o objetivo de aumentar a fração solúvel desse domínio. Foi testado o método de purificação por precipitação ácida com glicina e sulfato de amônio, o qual tem sido usado na purificação de rodanases, sem contudo interferir na atividade dessa enzima após *refolding* (Miller et al, 1992). Assim, foram feitas precipitações seriadas em concentrações crescentes de sulfato de amônio em pH 4,7. A proteína foi recuperada em maior quantidade e com maior grau de pureza que o observado utilizando o protocolo sem precipitação, porém a fração obtida não apresentou atividade enzimática. (Figura 16).

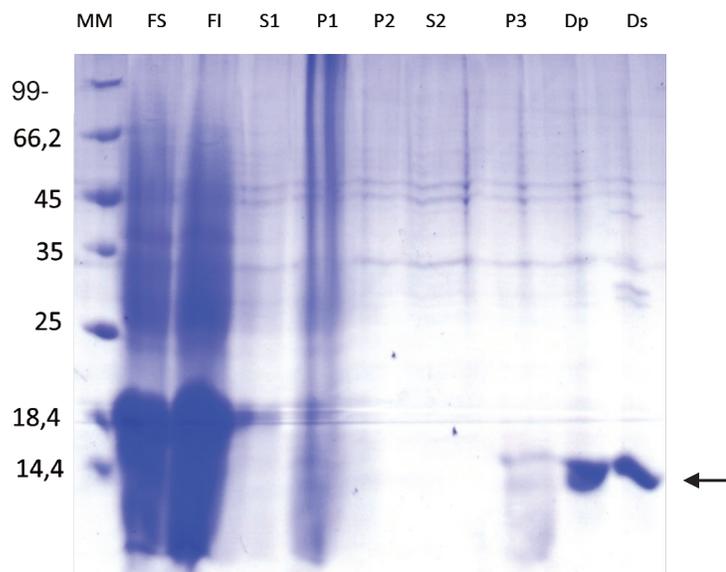


Figura 16: Gel SDS-PAGE 13% com as etapas de purificação do domínio DUF442 utilizando o protocolo de precipitação com sulfato de amônio em pH 4,7. MM = marcado molecular; FS = fração solúvel; FI = fração insolúvel; S1 = sobrenadante pH 4,7; P1 = precipitado pH 4,7 e 0,4 M de sulfato de amônio; P2 = precipitado pH 4,7 e 1,4 M de sulfato de amônio; S2 = sobrenadante 2,5 M de sulfato de amônio; P3 = precipitado 2,5 M de sulfato de amônio; Dp = precipitado da diálise; Ds = sobrenadante da diálise. As setas indicam a altura da banda da proteína purificada pelo protocolo.

4.1.4. Teste de expressão e purificação na presença de metais

A presença de metais como ligantes ou co-fatores de ambos os domínios proteicos foram sugeridos na literatura. A proteína ETHE1 de *A. thaliana*, caracterizada como da família de glioxilases II, liga o íon zinco. Além disso, modelagem do domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* sugere que este domínio tem um sítio de coordenação para ferro ou zinco (Holdorf et al, 2012; Guimarães et al., 2011). O domínio DUF442 também necessitaria de metal como co-fator para sua atividade enzimática. Sabendo disso, foi testada a influência de metais na solubilidade dos domínios DUF442 e ETHE1 de *X. fastidiosa*, através da adição do *mistura* de metais proposto por Studier (2000) ao meio ZYM5052 para expressão dos domínios recombinantes. Alternativamente ao *mistura*,

foram adicionados ferro e zinco separadamente a fim de evitar a influência da competição por sítio de ligação com outros metais do *mistura*.

A adição de metais ao meio de cultura não teve qualquer influência na solubilidade dos domínios da Blh. Apesar do ETHE1 ser um domínio que apresenta centro de coordenação de metal, a adição do *mistura* de metais não fez diferença na sua solubilidade (dados não mostrados).

4.1.5. Proteína Blh de *X. fastidiosa*

Uma vez que a adição de sulfato de amônio e glicerol no tampão de purificação aumentou de forma significativa a solubilidade dos domínios ETHE1 e DUF442, resolveu-se testar o mesmo protocolo de purificação para expressão e purificação da proteína Blh inteira, uma vez que a mesma só havia sido produzida anteriormente na fração insolúvel (Barbosa & Benedetti, 2007). Assim, a proteína Blh de *X. fastidiosa*, expressa em meio ZYM5052, à 20°C, por 16h sob agitação de 200 rpm, apresentou-se na forma solúvel (**Figura 17a**).

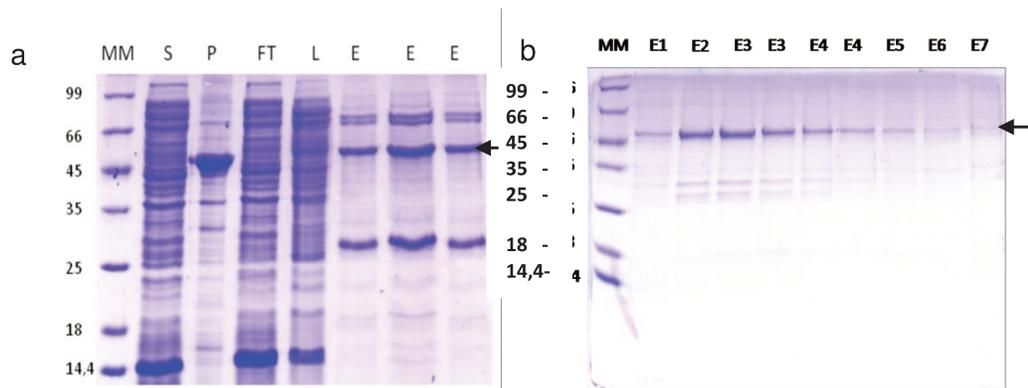


Figura 17: Gel SDS-PAGE 13% com etapas principais de purificação da proteína Blh inteira expressa em 250 ml de meio ZYM5052 na cepa BLI12(pLysE), induzido com lactose, por 16h, à 20°C E 200rpm. Em a na primeira canaleta (da esq. para dir.) foi aplicado o marcador de massa molecular (MM); na segunda encontra-se a fração solúvel (S); na terceira a fração insolúvel (P); em seguida o não ligado à resina (FT); na quinta canaleta encontra-se a fração da lavagem que foi feita com 20 mM de imidazol (L) e por fim as três eluições realizadas com 300 mM de imidazol (E). Em b estão as eluições da filtração em gel (E). A seta indica altura da banda da proteína parcialmente purificada que ficou em torno de 45 kDa.

Etapa adicional de purificação envolvendo gelfiltração resultou numa fração mais pura da proteína Blh recombinante. Porém, o rendimento não foi satisfatório optando-se por prosseguir os ensaios de atividade com a proteína purificada pela cromatografia por afinidade apenas (**Figura 17b**).

4.2. Ensaio de atividade dioxigenase de enxofre

O ensaio de atividade realizado para o domínio ETHE1 evidenciou o consumo de oxigênio pela enzima na presença da glutathiona perssulfeto (GSSH) como sugerido por Hildebrandt e colaboradores (**Figura 18**). Foi verificado também que não há consumo significativo de oxigênio na ausência do enxofre ou de GSH. Quando um destes componentes está ausente na reação, não ocorre a formação de GSSH que, segundo Hildebrandt e colaboradores (2008), seria o substrato da enzima. Assim, este trabalho revela pela primeira vez que, o domínio ETHE1 funciona como uma dioxigenase de enxofre e que seu substrato é o GSSH que está sendo formado pela união espontânea de GSH com o enxofre acetônico (**Figura 18**).

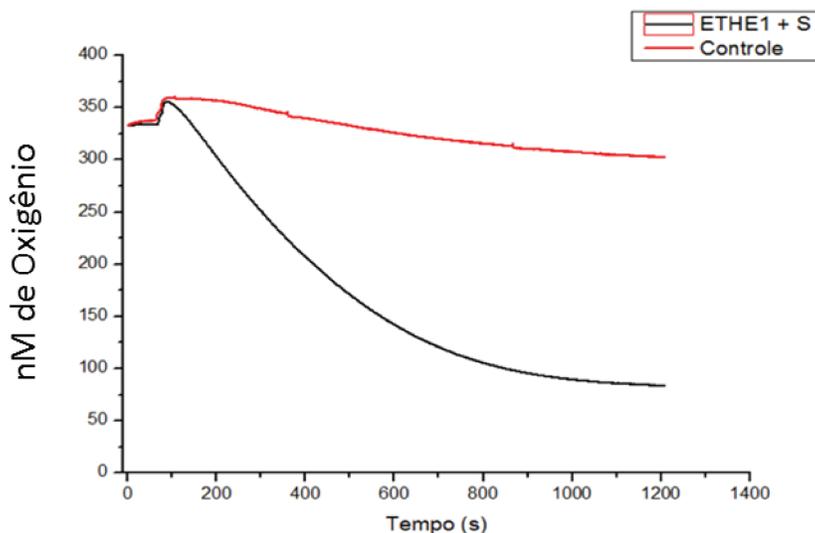


Figura 18: Consumo médio de oxigênio do domínio ETHE1 em relação ao consumo médio dos controles testados. As curvas referem-se à média das quatro medições realizadas com a enzima e os demais substratos (vermelho) e a média dos controles testados: sem a enzima, sem o substrato e sem o doador de enxofre GSH (preto).

Embora tenha havido consumo de oxigênio nas amostras controle (sem enzima e sem GSH), em média, esse consumo foi significativamente menor que aquele onde ETHE1 e GSH estavam presentes na reação. A atividade enzimática foi calculada com base no consumo de oxigênio e foi de $1,3 \mu\text{M de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (**Figura 19**).

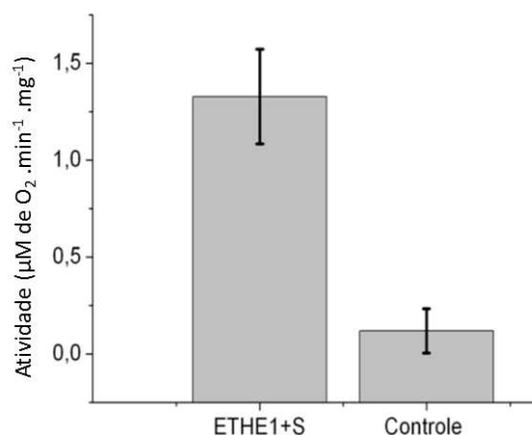


Figura 19: Atividade da proteína ETHE1 e dos controles com base no consumo de oxigênio. Nos controles foi identificada uma atividade residual muito inferior ao experimento com a enzima e os substratos.

O mesmo tipo de ensaio foi realizado com o domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* que apresentou maior grau de pureza e solubilidade. Neste ensaio, foi variada a concentração do enxofre (**Figura 20**). Pode-se perceber que ambos os domínios ETHE1 tem atividade de dioxigenase de enxofre e a região truncada do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* não resultou na perda dessa atividade. Como esperado, a taxa de consumo de oxigênio aumentou com o aumento da concentração de substrato (**Figura 20**).

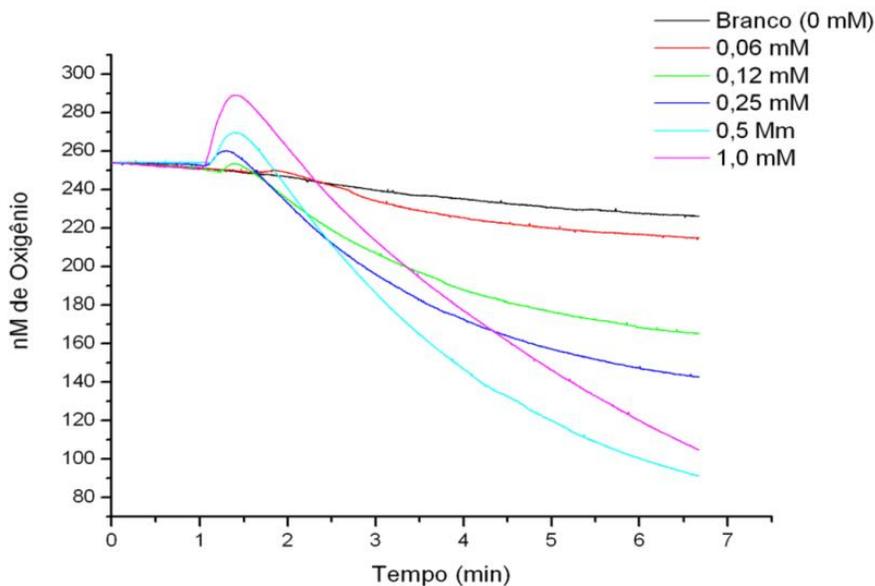


Figura 20: Curvas de consumo de oxigênio pelo domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* com diferentes concentrações de substrato. Ensaio realizado em oxígrafo em volume de 2ml à 25°C, pH 7,4 com duração de 7min.

Como a reação sugerida por Hildebrandt e colaboradores (2008), adotada como hipótese de mecanismo de ação do domínio ETHE1, tem como produto final o sulfito, este foi medido no meio de reação através de fitas detectoras de sulfito. Este íon, resultante da reação de dioxigenase de enxofre, de fato se acumula no meio de reação, como mostra a **Figura 21**.

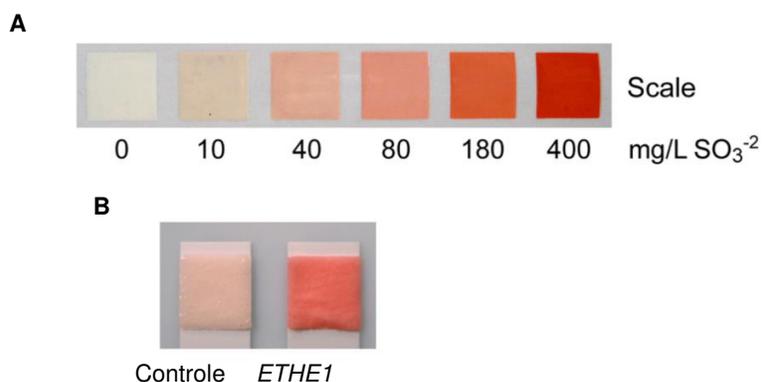


Figura 21: Detecção de sulfito no meio de reação da ETHE1 após 20min de reação. Em **A** encontra-se a escala de cores e a concentração de sulfito correspondente. Em **B** estão as fitas do teste com a enzima e os substratos (direita) e o controle sem a enzima (esquerda).

É possível perceber que há uma pequena concentração de sulfito na amostra controle, porém ocorre um aumento significativo do mesmo no meio com a enzima e os substratos depois de 20 min de reação. De acordo com a escala fornecida pelo fabricante a concentração de sulfito foi de aproximadamente 10mg/L no controle após 20min de ensaio sem o substrato e de cerca de 80mg/L na presença da enzima e seus substratos.

4.2.1. Propriedades cinéticas do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens*

A partir dos resultados obtidos com o domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* no oxígrafo (**Figura 22**), foi feito o cálculo do Km aparente para este domínio (**Tabela 3**). O km do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* foi de 260 μ M de enxofre, semelhante ao encontrado para a proteína de *Urechis unicinctus* quando esta foi truncada em um de seus sítios de metal considerado não essencial para atividade (Zang et al, 2013). A velocidade máxima observada para o domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* foi 18 μ M de enxofre. min⁻¹. mg⁻¹.

Tabela 3: Constante de *Michaelis-Menten* (K_m) medida para o domínio ETHE1 de *X. fastidiosa* comparado aos dados publicados para a dioxigenase de enxofre (SDO) de *U. unicinctus*

Proteína	Organismo	K_m	Referência
<i>ETHE1</i>	<i>A. tumefaciens</i>	260 μM	-
<i>SDO del 1</i>	<i>Urechis unicinctus</i>	82 μM	Zang et al, 2013
<i>SDO wt</i>	<i>Urechis unicinctus</i>	218,9 μM	Zang et al, 2013

SDO = dioxigenase de enxofre; SDO wt = dioxigenase de enxofre selvagem

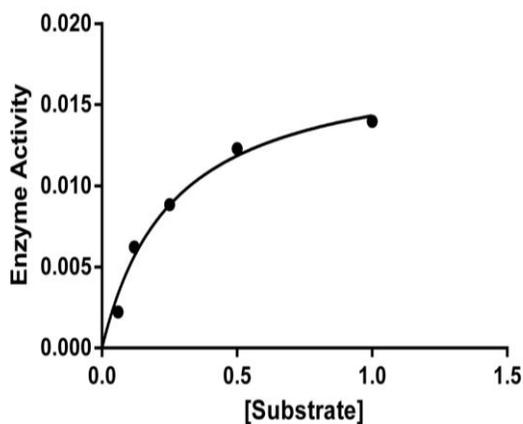


Figura 22: Gráfico da atividade dioxigenase de enxofre do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* em função da concentração de substrato. O gráfico evidencia o comportamento Michaeliano da reação.

4.3. Ensaio de atividade sulfotransferase

O ensaio da rodanase do domínio DUF442 de *X. fastidiosa* demonstrou que ocorre a transferência do enxofre do tiosulfato para o cianeto com formação de tiocianato e sulfito como descrito por Sorbo (1955) (**Figura 23**)

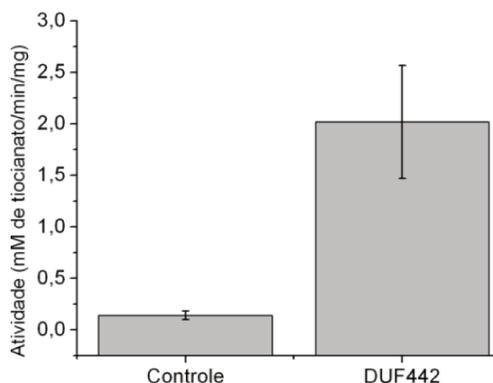


Figura 23: Tiocianato formado em milimolar por minuto pelo domínio DUF442 (rodanase) medido pela absorbância à 460 nm. Ensaio com 25 µg de proteína parcialmente purificada à 25°C.

A atividade da rodanase medida foi de 1,8 mM de tiocianato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ a 25°C, maior que aquela mensurada no ensaio para a dioxigenase de enxofre (domínio ETHE1). Os resultados dos ensaios de atividade demonstram que a atividade em cada um dos domínios ocorre independente da presença do domínio complementar

Não foi possível estimar a quantidade sulfito produzido na reação mediada pelo domínio DUF442 usando-se as fitas indicadoras, uma vez que o produto final do ensaio e tem coloração alaranjada semelhante a reação da fita de sulfito.

4.3.1. Propriedades cinéticas do domínio DUF442 de *X. fastidiosa*

O cálculo do K_m aparente para o tiosulfato mostrou que o domínio DUF442 apresenta um K_m de 6,1 mM de tiosulfato (**Figura 24**). Esse valor corresponde aos valores encontrados para a proteína sulfotransferase ou rodanase cujos dados de catálise encontra-se depositados no BRENDA *enzyme data base* (**Tabela 4**).

As frações da proteína Blh recombinante inteira que foram submetidas ao ensaio para sulfotransferase apresentaram um valor de K_m menor que àquele observado para o domínio DUF442 e um K_m menor em relação à *E. coli* e ao DUF442 separado (**Tabela 4**). A velocidade máxima observada para o domínio DUF442 foi de 2,24 mM de tiocianato. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e para a Blh inteira foi de 8,1 mM de tiocianato. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Tabela 4: Valores de Km para o tiosulfato da proteína rodanase de *X. fastidiosa* e de bactérias depositadas no baco de dados BRENDA Enzymes

Proteína	Organismo	Km	Referência
<i>Duf442</i>	<i>X. fastidiosa</i>	6,1 mM	-
<i>Blh</i>	<i>X. fastidiosa</i>	2,6 mM	-
<i>GlpE</i>	<i>E. coli</i>	78 mM	<i>Ray et al, 2000</i>
<i>PspE</i>	<i>E. coli</i>	4,6 mM	<i>Adams et al, 2002</i>
<i>Pa RhdA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 mM	<i>Cipollone et al, 2004</i>

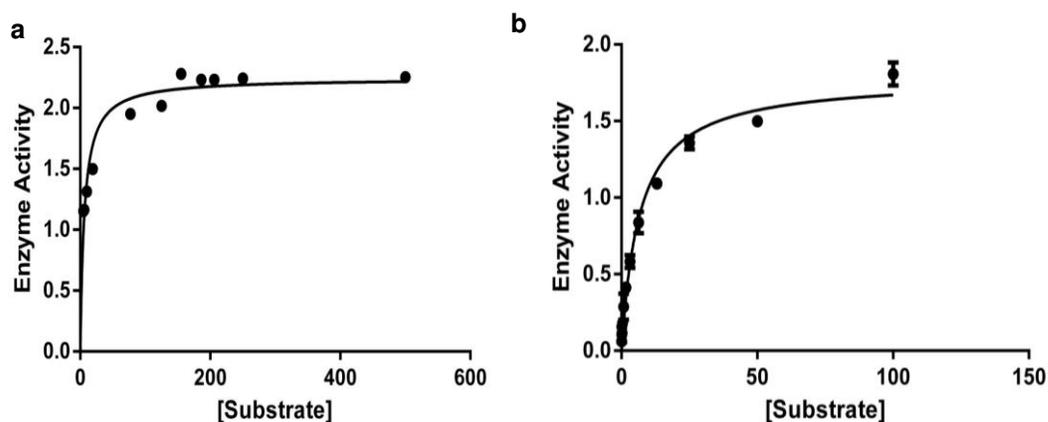


Figura 24: Em **a**, gráfico de atividade sulfotransferase em função da concentração do substrato do domínio DUF442 de *X. fastidiosa*. Em **b**, atividade sulfotransferase em função da concentração do substrato da proteína *Blh* inteira. Ambos correspondem a reações Michaeliana.

4.3.2. Ensaio de atividade sulfotransferase para o DUF442 de *X. fastidiosa* na presença de metais

Sabendo-se que o domínio DUF442 é uma rodanase e esta necessita de metal para catálise, testes de atividade na presença de metais foram realizados. Volini e colaboradores (1978) testaram a influencia dos metais na catálise da rodanase. Alguns dos metais utilizados por eles foram testados em ensaios com o domínio DUF442 de *X.*

fastidiosa. Duas condições foram avaliadas, uma onde o meio foi saturado com o metal e a outra onde a proporção de metal e proteína é equivalente.

O teste na condição de saturação de metais indicou um aumento de atividade provocado pelo cobalto enquanto todos os outros metais parecem influenciar a atividade rodanase de forma negativa (**Figura 25**).

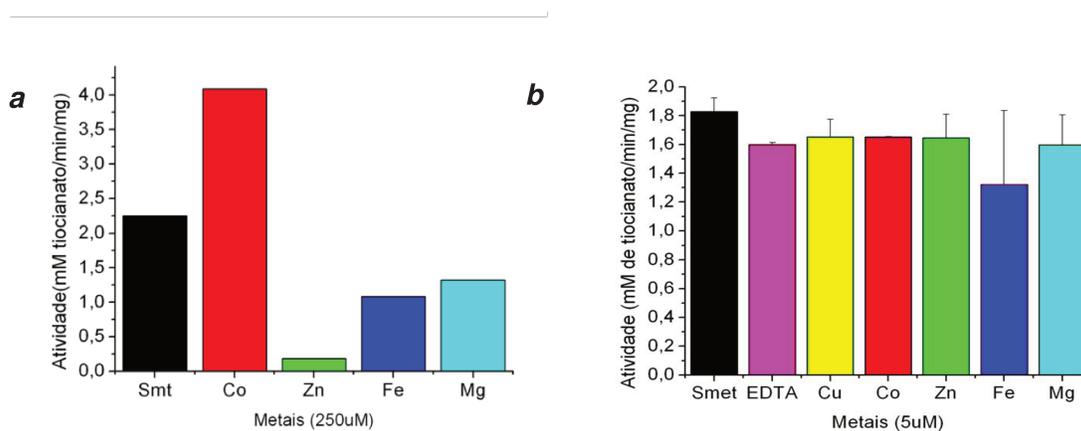


Figura 25: Efeito de metais na atividade rodanase da proteína Blh de *X. fastidiosa*. Em *a* ensaio com 2 μM do domínio DUF442 na presença de 250 μM de cada metal. Em *b* ensaio com 5 μM do DUF442 na presença de 5 μM de cada metal. Smt= sem metal; Co= cobalto; Zn= zinco; Fe = ferro; Mg = magnésio; EDTA = quelante EDTA; Cu= cobre.

Quando a concentração de metais foi de 1:1 em relação a proteína não houve variação significativa da atividade. Nesse teste o EDTA foi utilizado na tentativa de inibir a enzima pela perda do metal, porém este não se mostrou um bom quelante (**Figura 25**).

4.4. Modelagem do domínio ETHE1 de *X. fastidiosa*

A modelagem do domínio ETHE1 com base na nova estrutura de uma beta-lactamase de *Burkholderia pseudomallei* (4EFZ) (**Figura 26a**) não apresentou grandes discrepâncias em relação ao modelo anterior obtido com base na proteína de *A. thaliana* (**Figura 26b**). A estrutura de *B. pseudomallei* apresenta maior identidade com a

os domínios ETHE1 de *X. fastidiosa* e de *A. tumefaciens* do que a ETHE1-like de *A. thaliana*. Contudo, a diferença mais significativa observada entre os dois modelos está justamente numa região desorganizada C-terminal que forma alças na estrutura. Esta alça pode estar envolvida na estabilidade da proteína ou ainda apresentar alguma mobilidade que venha interferir na sua conformação durante a catálise.

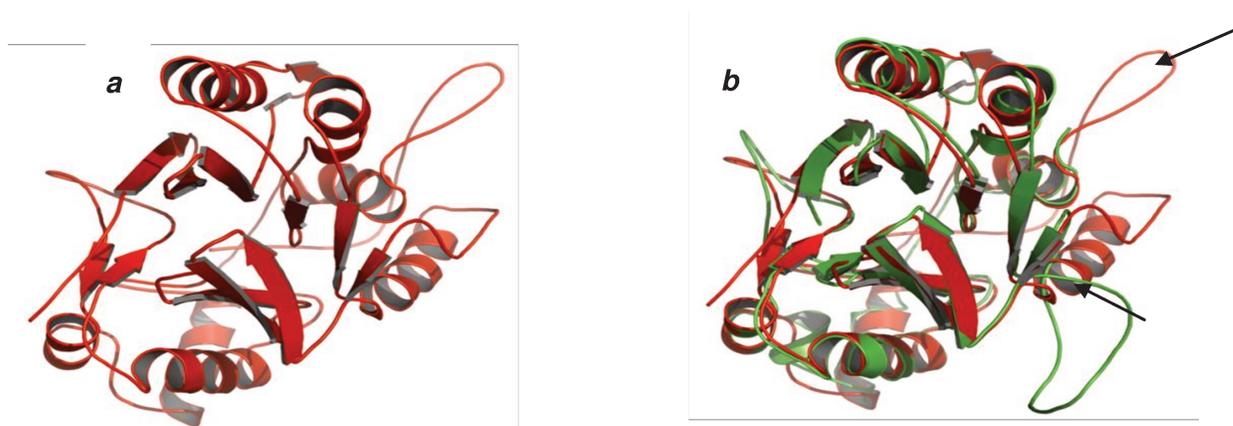


Figura 26: Modelagem computacional por homologia do domínio ETHE1 de *Xylella fastidiosa* utilizando a ferramenta webserver HHpred. Em **a** o modelo obtido por homologia com utilizando a estrutura de *Burkholderia pseudomallei* como molde. Em **b** o alinhamento dos modelos gerados utilizando a proteína de *A. thaliana* como molde (vermelho) e o modelo com base na 4EFZ de *Burkholderia pseudomallei*. As setas indicam a *mismatch* entre as estruturas que corresponde às alças na região C-terminal.

4.5. Ensaio de fluorescência de raios-x para identificação de metais ligantes do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens*

Os espectros de fluorescência identificaram que o metal ligante na estrutura do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* é o ferro (**Figura 27**). Ainda não é sabida a valência desse metal ligado á estrutura da proteína, nem qual seria a função catalítica do mesmo. A presença de ferro no domínio ETHE1 é bastante interessante, pois o ferro é conhecido por se ligar ao oxigênio em sítios ativos de enzimas para realização de atividades de oxidoredução.

Outros dois picos foram identificados no espectro contendo a proteína e que não aparecem nos controles. Embora as dioxigenases de enxofre sejam descritas como

contendo dois sítios de metal (Zhang et al, 2013), um desses picos era esperado corresponder ao níquel, metal que compõe a coluna de afinidade utilizada na purificação. Assim, alguma fração de níquel era esperada, e como nem o tampão nem a BSA haviam passado pelo processo de purificação, os controles não apresentaram esse pico. O outro pico corresponde ao ouro; este deve ter sido algum tipo de contaminação da placa de sílica utilizada para evaporação da amostra, uma vez que ouro não é um metal comum em proteínas.

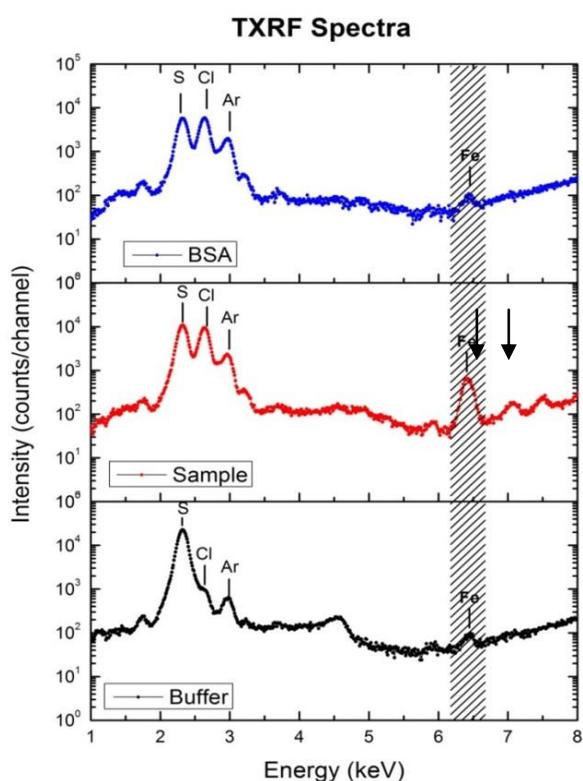


Figura 27: Ensaio de fluorescência de raios-x evidenciando o metal ligado á estrutura do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens*. Foram utilizados como controle a proteína albumina bovina sérica (BSA) no tampão de lise e o tampão (Buffer). Em achurado o pico diferencial correspondente ao ferro. As setas indicam os picos de níquel e ouro encontrado apenas na amostra.

4.6. Predições de interação proteína-proteína envolvendo a proteína Blh de *X. fastidiosa*

O ensaio *in silico* para busca de parceiros de interação mostrou haver interação entre Blh e todas as demais proteínas do *operon* (**Figura 28**). Porém, a interação mais forte predita foi entre as proteínas XF_0765 E XF_0766 que correspondem às proteínas de membrana MP2 e MP3 do *operon* respectivamente. Essa predição forneceu uma indicação de que estas proteínas devem estar muito próximas entre si dentro da célula para desempenhar a função do *operon* e que poderiam interagir fisicamente.

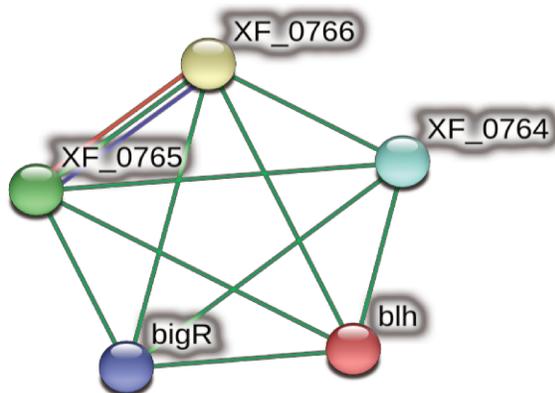


Figura 28: Resultado do STRING utilizando a Blh de *X. fastidiosa* como modelo e restringindo os resultados para o grau de confiança acima de 700.

4.7. Confirmação das interações preditas pelo *STRING*

Com o objetivo de identificar tais interações preditas pela ferramenta online *STRING*, 14 clones com as sequências dos domínios da BLH, BigR, MP1, MP2 e MP3 de *X. fastidiosa* nos vetores pOBD ou pOAD foram obtidos para a realização de ensaios de duplo híbrido em leveduras (**Tabela 5**).

Tabela 5: Duplos transformantes obtidos dentre as proteínas do *operon bigR* de *X. fastidiosa* representados nos quadros cheios

pOAD	<i>BigR</i>	<i>ETHE1</i>	<i>DUFF442</i>	<i>MP1</i>	<i>MP2</i>	<i>MP3</i>
<i>BigR</i>						
<i>ETHE1</i>						
<i>DUFF442</i>						
<i>MP1</i>						
<i>MP2</i>						
<i>MP3</i>						

4.7.1. Teste de autoativação do gene GAL1-HIS3

É possível perceber que não houve crescimento significativo das colônias na ausência do 3AT no ensaio sem histidina. Nos ensaios com 5 e 10mM de 3AT não houve crescimento de leveduras. Os clones testados não mostraram ativação do gene HIS3 na ausência nem na presença de 3AT que viesse comprometer o ensaio em leveduras (**Figura 29**).

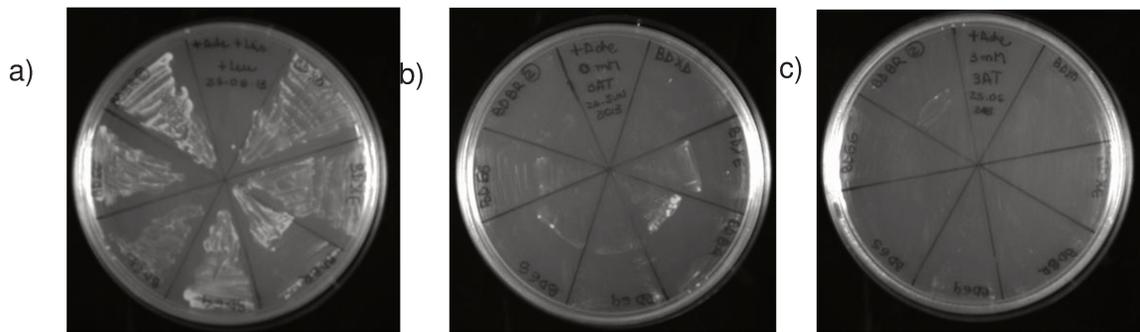


Figura 29: Placas com os clones das iscas (pOBD) de interesse resultantes dos teste de autoativação do gene HIS3 após 5 dias de crescimento à 30°C. Em *a* cepas crescidas em meio com histidina de onde foram repicadas para o ensaio. Em *b*, cepas crescidas sem histidina e 0 mM de 3AT. Em *c*, cepas crescidas na presença de 3mM de 3AT.

4.7.2. Ensaio de interação

Como pode ser visto na **Figura 30**, os ensaios de duplo híbrido de levedura corroboram as predições feitas *in silico*. Em particular, foram confirmadas as interações entre as proteínas MP2 e MP3 nos duplo-recíprocos (**Figura 30**).

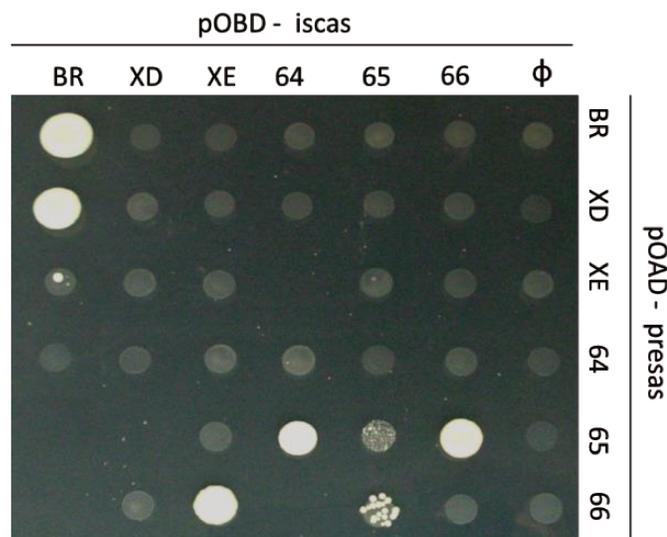


Figura 30: Ensaio de duplo híbrido de levedura em meio SC +Ade -His com leveduras crescidas à 30°C por 4 dias. Houve interação nas colônias crescidas. BR = BigR; XD = XFDUF442; XE = XFETHE1; 64= MP1; 65= MP2; 66=MP3; ϕ = plasmídio vazio.

Além dessas, foram observadas interações entre BigR e BigR, BigR e DUF442, ETHE1 e MP3, MP1 e MP2, e MP2 e MP2. Esses dados sugerem portanto que as atividades de regulação do *operon* e produção e secreção de sulfito estão interligadas.

5. Discussão

5.1. Expressão e Purificação dos domínios ETHE1 e DUF442 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens*

Os domínios ETHE1 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* mostraram-se insolúveis nas condições iniciais testadas e o sulfato de amônio e glicerol foram essenciais para solubilização desses domínios. O íon sulfato é citado na literatura como estabilizador estrutural de proteínas de bactéria envolvidas no metabolismo de enxofre cujas estruturas foram resolvidas apenas na presença deste íon no sítio ativo (Sekowska et al, 2000).

Os estabilizadores utilizados para o domínio ETHE1 *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* foram escolhidos com base na alta identidade entre a proteína depositada no PDB (4EFZ) pertencente a bactéria *B. pseudomallei* que encontra-se anotada como β -lactamase e é dimérica. Embora os tampões utilizados ETHE1 humana e das ETHE1 de *A. thaliana* não continham nenhum dos compostos estabilizadores utilizados neste trabalho (Holdorf et al, 2012; Tiranti et al, 2009). A diferença nos parâmetros de estabilização dessas proteínas pode ser devido à origem das mesmas uma vez que ambas são proteínas de eucariotos, enquanto que o dímero de *B. pseudomallei* é uma proteína de bactéria e apresenta maior identidade com a ETHE1 de *X. fastidiosa*. A anotação como β -lactamase desse dímero deve ser devido à análise de sequencia, semelhante ao que ocorre com o domínio ETHE1 da Blh.

Dentre as temperaturas testadas que variaram de 37 à 18°C a temperatura de 20°C mostrou-se melhor produção da proteína solúvel. Somado à isso, o fato de os domínios DUF442 e ETHE1 de *X. fastidiosa* serem expressos na forma solúvel em cepa própria para proteínas tóxicas ressalta a possível toxicidade da Blh quando expressa em altos níveis. O *operon* bigR é fortemente reprimido dentro da célula necessitando de condições especiais de pH e estado redox para ser ativado, o que pode ser devido à

toxicidade desse *operon* em condições normais de metabolismo (Barbosa e Benedetti, 2007).

O domínio DUF442 é estruturalmente semelhante às sulfotransferases ou rodanases. Partindo-se disso, foram testados métodos de purificação descritos para rodanases, porém este domínio apresentou-se insolúvel. Dessa forma, testou-se o mesmo método utilizado para o domínio ETHE1, o qual, apesar de melhorar os níveis de DUF442 não apresentou uma fração significativa de proteína solúvel.

Protocolos envolvendo *refolding* são citados na literatura. O protocolo utilizado aqui envolve a diminuição do pH e *refolding* por diálise. Segundo os autores do método, a atividade rodanase após o *refolding* é igual ou maior a observada antes do procedimento (Miller et al., 1992). A perda da atividade observada na fração obtida do DUF442 após a diálise deve-se provavelmente ao mau dobramento após o *refolding*. O enovelamento errado pode ter afetado as cisteínas do sítio ativo que precisam necessariamente estar livres para serem funcionais (Guang-Xiang & Horowitz, 1993).

Ao tentar purificar a proteína Blh inteira percebeu-se um alto grau de insolubilidade semelhante ao que ocorre com o domínio DUF442. Assim, a baixa solubilidade da proteína inteira pode estar relacionada ao domínio DUF442 podendo esta ser a causa da dificuldade em se purificar a proteína Blh inteira.

Os testes com metais no meio de expressão dos domínios da Blh não exerceram nenhuma influência na solubilidade dos mesmos. Assim, acredita-se que o metal contido no próprio meio de cultura foi suficiente para o enovelamento correto das proteínas.

5.2. Atividade de dioxigenase de enxofre do domínio ETHE1

A hipótese inicial de que a Blh apresentava atividade de dioxigenase de enxofre e que essa reação era responsável pela função de detoxificação de gás sulfídrico pelo *operon bigR* foi sugerida por Guimarães e colaboradores (2011) com base na reação descrita por Hildebrandt e colaboradores (2008). Nessa reação, GSSH formado pela complexação espontânea de sulfeto de hidrogênio (SH) com GSH seria o substrato da dioxigenase de enxofre. Ao se realizar os ensaios de atividade com o domínio ETHE1

de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* pode-se verificar que de fato o GSSH é o substrato desse domínio.

5.3. Propriedades cinéticas da proteína Blh

Uma vez que o k_m estimado para o domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* foi mais próximo daquele da proteína de *U. uncinctus* na sua forma truncada, faz-se necessário realizar o mesmo ensaio com a proteína Blh inteira, a fim de verificar se a afinidade pelo substrato varia com a presença do domínio adjacente DUF442. Sabe-se também que a valência do ferro influencia a atividade observada da enzima e que as condições de ensaio ou purificação da proteína podem ter afetado essa propriedade (Zang et al, 2013).

O K_m calculado para o domínio DUF442 de *X. fastidiosa* e para proteína Blh inteira variaram (**Tabela 4**). Esse resultado evidencia que a proteína inteira tem maior afinidade pelo substrato que o domínio isolado. Porém, é necessário um maior grau de pureza para determinar se essa diferença não está relacionada apenas à diferença das proporções de proteína recombinante em relação aos contaminantes.

5.4. A função de detoxificação de gás sulfídrico do *operon bigR* é dependente da produção e transporte de sulfito

Ambas as reações enzimáticas catalizadas pelos domínios ETHE1 e DUF442 da proteína Blh produzem sulfito e ocorrem mesmo na ausência do domínio adjacente, o que sugere que apesar de comporem a mesma proteína as atividades sulfotransferase e dioxigenase de enxofre parecem independentes. Assim, esse pode ser um ponto de convergência para os mecanismos de detoxificação de gás sulfídrico realizado pelo *operon*. Essa hipótese está de acordo com o fato de o *operon* codificar uma proteína de membrana (MP3) com provável função de transportador de sulfito por conter um domínio TauE. Além disso, o sulfito se acumula no meio de cultura quando *operon* está ativado (Guimarães & Benedetti, 2011). Em eucariotos e em bactérias acidófilas, as atividades dioxigenase de enxofre e rodanase são complementares, realizando assim uma reação em cadeia para detoxificação de enxofre, e possuem substratos e produtos

diferentes. Nesses casos, o sulfito é um intermediário entre as reações de uma e da outra enzima (Hildebrandt & Grieshaber, 2008; Remelli et al, 2012).

5.5. Influência de metais na atividade de rodanase

Estudos sobre os efeitos dos metais na atividade de rodanases mostraram que a concentração de metal é importante para a atividade enzimática e que a ligação do metal à enzima é inespecífica uma vez que os metais zinco, cobre, magnésio, cálcio platina, entre outros, tem ação na atividade desta enzima. Estudos cinéticos com rodanase de fígado bovino mostraram que os complexos de cianeto-metal ligam-se muito fortemente à enzima, atuando como inibidores eficazes (Volini et al, 1978).

Volini e colaboradores (1978) estudando a influência do metal na atividade enzimática da rodanase verificaram que os metais se ligam de maneira estequiométrica a proteína numa proporção de 1 íon de metal para cada 18,5kDa da enzima. Assim, há uma concentração de metal capaz de ligar à proteína e deve ser mantida na solução para que este tenha ação sobre a mesma. Concentrações muito abaixo dessa quantidade estequiométrica não tem ação sobre a atividade da proteína (Volini, 1978). Por outro lado, em condição de saturação, os metais podem ter precipitado a proteína fazendo, portanto, que a mesma perdesse sua função. O zinco apresentou um efeito mais drástico na atividade nessa mesma condição (Volini, 1978).

O magnésio e o cálcio tem ação positiva na atividade enzimática enquanto que o zinco e outros metais de transição como ferro, níquel, cobre e cobalto atuam inibindo a função rodanase (Volini et al, 1978). Esses resultados corroboram com os encontrados para o DUF442 na situação de saturação exceto pela ação do cobalto que teve ação positiva na atividade da enzima e do magnésio que apresentou ação negativa.

Estruturas atômicas de rodanases depositadas no PDB mostram o zinco como metal ligante do sítio ativo da enzima. Além deste, metais complexados a cianeto, como ouro, platina e níquel podem ligar-se ao cianeto e interferir na atividade enzimática (Lijk et al., 1983). O ferro, que sabidamente pode ligar na estrutura da rodanase e funcionar como acceptor de elétrons do enxofre, não provocou diferença significativa na atividade da enzima (Volini et al, 1977).

5.6. O domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* liga ferro em sua estrutura

Os ensaios de fluorescência de raios-x evidenciaram que o ferro é o metal ligante na estrutura do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens*, confirmando as hipóteses iniciais propostas por Guimarães colaboradores (2011) que sugerem este íon como ligante na estrutura do domínio ETHE1.

5.7. As proteínas do operon *bigR* interagem entre si para desempenhar a função de detoxificação de gás sulfídrico

As interações proteína-proteína, envolvendo as proteínas do operon *bigR*, previstas na análise *in silico*, puderam ser confirmadas pelo duplo híbrido de leveduras. O fato de BigR interagir com ela mesma é um indicativo de que o duplo híbrido funcionou bem, visto que BigR é um dímero em solução (Guimarães et al, 2011). A interação entre BigR e DUF442 é de especial interesse, uma vez que não se sabe ainda como BigR é regulado.

Sabe-se, contudo que BigR precisa ser oxidado para desligar-se do DNA, entretanto, o sinal molecular para que isso ocorra não é conhecido.

Quanto ao domínio ETHE1, este interagiu com uma das proteínas de membrana (MP3), que compõe o possível transportador de sulfito. Considerando que MP1 e MP2 interagiram entre si, e que MP2 interagiu com MP3, foi proposto um modelo onde as proteínas de membrana estariam formando um complexo para transporte de sulfito, associado à proteína Blh (**Figura 31**).

Estudos da via de detoxificação de gás sulfídrico em mitocôndria mostraram que as proteínas que a compõe estão próximas entre si e da membrana mitocondrial. Por ser uma via de detoxificação que visa a proteção da cadeia transportadora de elétrons, esta via está não apenas próxima à cadeia transportadora como utiliza uma quinona redutase da cadeia transportadora como doadora de enxofre (Rohwerdert & Sand, 2003). Essa via em mitocôndria e em bactérias acidófilas produz força próton motriz para a fosforilação oxidativa (Rohwerdert & Sand, 2003).

Diante disso, e com os dados obtidos por duplo híbrido, acredita-se que em *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* pode ocorrer algo parecido. As proteínas de membrana estariam formando um complexo transportador de sulfito que interage com a porção ETHE1 da Blh e todas as proteínas estariam próximas à cadeia transportadora de elétrons (**Figura 31**).

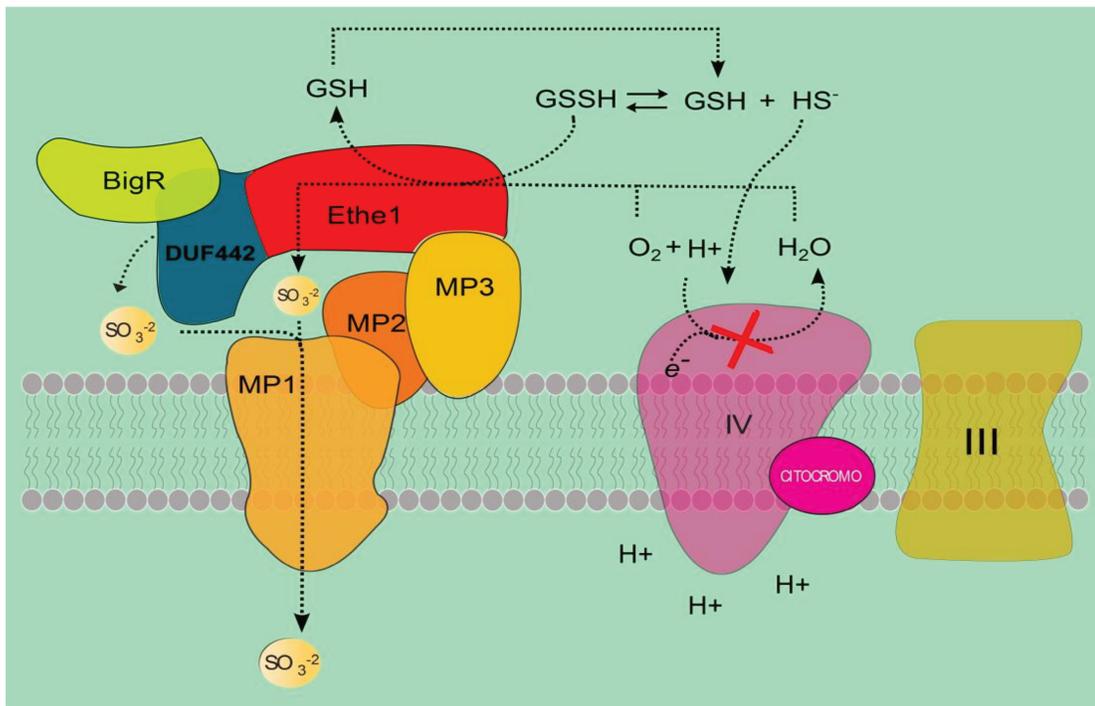


Figura 31: Modelo de interação entre as proteínas do *operon bigR* com base no resultado do duplo híbrido de levedura. Mostrando a produção e secreção do sulfito produzido pelo complexo de proteínas.

Todas as interações proteína-proteína observadas no duplo híbrido são em meio de cultura menos restrigente, o que indica serem interações fracas. Isso sugere que a interação não é contínua na membrana uma vez que as proteínas MP2 e MP3 não são integrais e podem flutuar na camada de lipídios de acordo com modificações elétricas da membrana. A interação com o ETHE1 pode inclusive ser o sinal para união das proteínas e formação do canal, como acontece com vias de sinalização celular. Dessa forma, as interações existem, mas são fracas permitindo essa plasticidade entre as proteínas que precisam ser ativadas para se unirem. Essa pode ser mais uma forma de regulação do *operon*, reforçando o que já foi dito a respeito da regulação genica do mesmo. O *operon bigR* encontra-se fortemente reprimido e precisa de condições bem

específicas de pH, potencial redox e concentração de oxigênio para ser ativado (Guimarães et al., 2011).

Assim, o *operon* bigR atua na detoxificação do gás sulfídrico pela ação de duas atividades enzimáticas principais que são as atividades de rodanase e dioxigenase de enxofre, ambas produzindo sulfito. Este sulfito é exportado da célula e pode estar sendo eliminado através de um complexo protéico de membrana formado pelas proteínas MP1, MP2 e MP3. Ainda, não é possível saber quem ativa o *operon*, mas o domínio DUF442 da proteína Blh pode estar ligado a esse processo.

6. Conclusões

- Os domínios ETHE1 de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* recombinantes são passíveis de purificação na forma solúvel e funcional. O domínio DUF442 recombinante de ambas as bactérias mostrou-se bastante insolúvel e pode ser a causa da dificuldade em se obter a proteína Blh inteira na forma solúvel.
- O domínio ETHE1 é uma dioxigenase de enxofre que converte GSSH, oxigênio e água em sulfito.
- O domínio DUF442 tem função sulfotransferase ou rodanase por ser capaz de transferir o enxofre do tiosulfato ao cianeto formando sulfito e tiocianato.
- As proteínas do *operon* interagem entre si para formar um complexo na membrana responsável pela produção e transporte do sulfito produzido pela Blh.

7. Perspectivas

Resolver a estrutura do domínio ETHE1 de *A. tumefaciens* e entender em nível atômico qual o mecanismo de catálise envolvido na conversão de GSSH a sulfito, como também estudar o papel do ferro nessa reação de oxidação do enxofre. Resolver a estrutura do complexo envolvendo a proteína MP1, MP2 e MP3 uma vez que não se conhece a estrutura ou mecanismo de transporte dessas proteínas. Estudar se há e

qual seria a relação do sulfito secretado com os sintomas provocados pela *X. fastidiosa* nas plantas, uma vez que este é sabidamente tóxico. Entender como o *operon* bigR é ativado pela oxidação de suas cisteínas e como o domínio DUF442 estaria envolvido nesse processo. Buscar inibidores para Blh e conseqüentemente inibir a função detoxificadora deste *operon* impedindo o crescimento bacteriano.

8. Referências Bibliográficas

- ALONSO, A.; SASIN, J.; BOTTINI, N. *et al.* Protein Tyrosine Phosphatases Review in the Human Genome. **Cell**. v. 117. p. 699–71.2004
- BALAN, A.; SANTACRUZ, C. P.; MOUTRAN, A.; FERREIRA, R. C.; MEDRANO, F. J.; PÉREZ, C. A.; RAMOS, C. H.; FERREIRA, L. C. The molybdate-binding protein (ModA) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Protein Expression and Purification**. vol. 50. p. 215–222. 2006
- BARBOSA, R. L., BENEDETTI, C. E. BigR, a Transcriptional Repressor from Plant-Associated Bacteria, Regulates an *Operon* Implicated in Biofilm Growth. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.17. p. 6185–6194. 2007.
- CHATTERJEE, S.; NEWMAN, K. L.; LINDOW, S. E. Cell-to-Cell Signaling in *Xylella fastidiosa* Suppresses Movement and Xylem Vessel Colonization in Grape. **MPMI**. v.21, n.10. p. 1309–1315. 2008a.
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. P.; LINDOW, S. LIVING IN TWOWORLDS: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review Phytopathology**, v.46. p. 243–271. 2008b.
- CLARK, J.B. Eletrochemical assays: the oxygen electrode. In: EISENTHAL, R. & DANSON, M. J. (Ed). **Enzyme Assays**. Segunda Edição. P. 141-148. 2009
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H.; THOMSON, S. V. Pierce's Disease of Grapevines: Isolation of the Causal Bacterium. **Science**. vol. 199, n. 6. p. 75-77. 1978

FUNDECITRUS: Fundação de Defesa da Citricultura. Acesso: <
<http://www.fundecitrus.com.br/>> Acessado em janeiro de 2014.

GUANG-XIANG, L. & HOROWITZ, P. M. The sulfurtransferase activity and structure of Rhodanese are affected by site-directed replacement of Arg-186 or Lys-249. *V.269*, n 11. p. 8220-8225. 1994

GUIMARÃES, B. G.; BARBOSA¹, R. L.; SOPRANO, A. S.; CAMPOS, B. M.; SOUZA, T. A.; TONOLI, C. C. C.; LEME, A. F. P.; MURAKAMI, M. T.; BENEDETTI, C. E. Plant Pathogenic Bacteria Utilize Biofilm Growth-associated Repressor (BigR), a Novel Winged-helix Redox Switch, to Control Hydrogen Sulfide Detoxification under Hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n. 29. p. 26148–26157. 2011

HILL, B. L.; PURCELL, A. H. Populations of *Xylella fastidiosa* in Plants Required for Transmission by an Efficient Vector. **Phytopathology**, v. 87, n. 12. p. 1197-1201. 1997

HILDEBRANDT, T. M.; GRIESHABER, M. K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J.* 275: 3352–3361, 2008.

HOLDORF, M.M.; OWEN, H.A.; LIEBER, S.R.; YUAN, L.; ADAMS, N.; DABNEY-SMITH, C.; MAKAROFF, C.A. Arabidopsis ETHE1 encodes a sulfur dioxygenase that is essential for embryo and endosperm development. **Plant Physiology**. vol 160. p. 226-36. 2012

HOPKINS, D. L. Diseases Caused by Leafhopper-Borne, Rickettsia-Like Bacteria. **Annual Review Phytopathology**. vol. 17. p. 277-294. 1977

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. **Annual Review Phytopathology**, v.27. p.271-90. 1989.

- HOPKINS, D. L.; MORTENSEN, J. A. Suppression of Pierce's disease symptoms by tetracycline antibiotics. **Journal Plant Disease Reporter**. vol 55, n7. p. 610-612. 1971
- HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. Xylella fastidiosa: Cause of Perce's Disease of Grapevine and Other Emergent Diseases. **Plant Disease**. vol. 86 n.10. p. 1056-1066. 2002
- KRISHNA, S. S.; TAUTZ, L.; XU, Q. *et al.* Cristal structure of NMA 1982 from *Neisseria meningitides* at 1.5Å resolution provides a structural scaffold for nonclassical, eukaryotic-like phosphatases. **Proteins – Structure Note**. 2007
- KUHN, G. B. "Mal de Pierce" - doença bacteriana da videira de importância quarentenária para o Brasil. **Artigo de mídia disponibilizado no site da Embrapa Uva e Vinho**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>>. Acesso em: 11 de Julho de 2011
- LEE, R. F., DERRICK, K. S., BERETTA, M. J. G., CHAGAS, C. M.; ROSETTI, V. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brasil. **Citrus Industry**, v.72, n. 10, p. 12-15, 1991.
- REMELLI, W.; GUERRIERI, N.; KLODMANN, J.; PAPENBROCK, J.; PAGANI, S.; FORLANI, F. Involvement of the *Azotobacter vinelandii* Rhodanese- Like Protein RhdA in the glutathione regeneration Pathway. **Plos One**. v 7. p. 1-9. 2012
- ROHWERDERT, T.; SAND, W. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacilos* and *Acidiphilum* spp. **Microbiology**. v 149. p. 1699-1709. 2003
- SAIDU, Y. Physicochemical Features Of Rhodanese: A Review. **African Journal Of Biotechnology**. vol. 3. p. 370-374. 2004

- SEKOWSKA, A.; HSIANG-FU, K.; DAUCHIN, A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. v. 2. p. 145-177. 2000
- SHERALD, J. L. Bacterial Leaf Scorch of Landscape Trees: What We Know and What We Do Not Know. **Arboriculture & Urban Forestry**. Vol 33, n 6. p.376–385. 2007
- SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406. p.151–157. 2000
- SOLÉ, V. A.; PAPILLON, E.; COTTE, M.; WALTER, P.; SUSINI, J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive x-ray fluorescence spectra. **Spectrochim Acta Part B At Spectrosc**. vol. 62: p. 63–68.2007
- STEIN, A.; BAILEY S. M. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Redox Biology**. Vol. 1. n.1.p. 32-39. 2013
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Proteins Expression & Purification**. v.41. p. 207-234. 2005
- TARBAH, F.; GOODMAN, R. N. Systemic Spread of *Agrobacterium tumefaciens* Biovar3 in the vascular systems of grapes. **Physiology and Biochemistry**, v.77, n.6. p. 915-920. 1987
- TIRANTI, V.; VISCOMI, C.; HILDEBRANDT, T.; DI MEO, I.; MINERI, R.; TIVERON, C.; LEVITT, M. D.; PRELLE, A.; FAGIOLARI, G.; RIMOLDI, M.; ZEVIANI, M. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. **Nat Med**. V.15, n. 2. p. 200-205. 2009
- ZHANG, L.; LIU, X.; LIU, J.; ZHANG, Z. Characteristics and Function of Sulfur Dioxygenase in Echinuran Worm *Urechis unicinctus*. **PLoS One**. Vol. 8, n.21. p. e81885. 2013

Anexos

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada EXPRESSÃO PURIFICAÇÃO E ENSAIO DE ATIVIDADE DOS DOMÍNIOS DUF442 E ETHE1 DA PROTEÍNA BLH DE *Xylella fastidiosa* E *Agrobacterium tumefaciens*

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:
Laboratório Nacional de Biotecnologia

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** 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.*

Nayana Patrícia Vieira de Lima
Aluno: (nome completo)

Ulso Buedelli
Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Ulso Buedelli

Carimbo e assinatura

 Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

PROTODDLO/1.B./UNICAMP -14-Jan-2014-09:38:014932-1/1

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: “Clonagem, purificação, cristalização e análise da atividade dos domínios ETHE1 e DUF442 da proteína BLH de *Xylella fastidiosa* e *Agrobacterium tumefaciens*”

Pesquisador responsável: Celso Eduardo Benedetti

Experimentador: Nayara Patrícia Vieira de Lira

Nível do treinamento do experimentador: -Iniciação científica, -mestrado, -doutorado, -doutorado direto, -pós-doutorado, -nível técnico, -outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

Nosso grupo de pesquisa descobriu que tanto *Xylella fastidiosa* quanto *Agrobacterium tumefaciens* apresentam um operon denominado “bigR” necessário para a detoxificação de gás sulfídrico, um composto tóxico que inibe o citocromo C oxidase bloqueando a respiração aeróbica. Verificamos que o operon bigR é necessário para catalisar a formação e secreção de sulfito a partir de gás sulfídrico, permitindo que as células cresçam em ambientes com concentrações limitantes de oxigênio, como é o caso do tecido vascular das plantas. Embora muito se saiba sobre a regulação transcricional dos genes do operon bigR, pouco se conhece ainda sobre a função da proteína BLH (beta-lactamase-like hydrolase), responsável pela conversão de gás sulfídrico em sulfito. BLH apresenta dois domínios funcionais, o domínio N-terminal DUF442, supostamente com atividade de rodanase, e o domínio C-terminal ETHE1, com provável função de dioxigenase de enxofre. Este projeto visa a expressão, purificação e a cristalização dos domínios funcionais ETHE1 e DUFF442 das proteínas BLH de *X. fastidiosa* e *A. tumefaciens* para análises estruturais e de atividade enzimática. Esperamos obter dados sobretudo de atividade enzimática desses domínios que nos permita comprovar suas ações como rodanase e dioxigenase de enxofre, respectivamente.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 9.1.2012.

Parecer final: -projeto aprovado, -projeto recusado, -projeto com deficiências, favor comentários anexo.



Presidente de CIBio – ABTLuS-LNBio
Jörg Kobarg



Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti



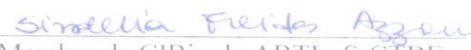
Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Andrea Balan



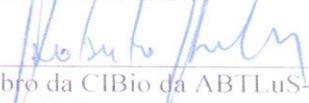
Membro da CIBio – ABTLuS-SGT
Carolina Barbosa Marini



Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Fabio Squina



Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Sindelia Freitas Azzoni



Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Roberto Ruller